



BOZO RESEARCH
CENTER INC.



最終報告書

インデンのラットを用いた
経口投与による急性毒性試験

B-5517

2006年11月15日

株式会社ボンリサーチセンター

東京本部	〒151-0065	東京都渋谷区大山町36-7
本社・東京研究所	〒156-0042	東京都世田谷区羽根木1-3-11
御殿場研究所	〒412-0039	静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所	〒419-0101	静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目 次

	頁
目 次	1
試験実施概要	3
要 約	6
緒 言	7
試験材料及び方法	8
1. 被験物質及び媒体	8
1) 被験物質	8
2) 媒体	9
2. 被験液の調製	9
1) 被験液の調製方法	9
2) 被験液の保存方法	9
3) 被験液の安定性	9
4) 被験液の濃度確認	9
3. 試験動物	11
4. 飼育条件	11
5. 投与経路の選択理由、投与方法及び観察期間	11
6. 投与量及び試験手順	12
7. 検査方法	12
1) 一般状態及び生死の観察	12
2) 体重測定	12
3) 病理学検査	12
8. LD ₅₀ 値の推定	12

要 約

インデンの急性経口毒性を毒性試験ガイドライン「急性毒性等級法」に従って検討した。動物は6週齢のSprague-Dawley系SPFラット〔CrI:CD(SD)〕とし、1投与段階につき雌3匹を用いて2000 mg/kgの投与量で2段階行った。

1. LD₅₀ 値

第1段階に死亡はみられなかった。第2段階に1/3例が死亡したが、急性毒性等級法に従い、LD₅₀値は2000 mg/kgを上回るものと推定され、GHSのCategory 5 (>2000-5000 mg/kg)に分類される。

2. 死亡動物

第2段階で死亡した2000 mg/kg投与群の1例(動物番号:2102)は、投与1時間後に流涙、流涎及び眼瞼下垂、投与2から6時間後に流涙、眼瞼下垂、異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れが継続してみられた。投与翌日には投与日に比べ体重が10g減少し、腹臥/横臥、呼吸数の減少、体温低下、眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れを呈し、同日の午後に死亡した。剖検では、鼻口腔周囲の汚れ、肺の暗赤色巣及び被験液貯留による小腸(空腸から回腸)の白色化が認められた。

3. 一般状態(生存動物)

投与1時間後に流涙、流涎及び眼瞼下垂、投与2から6時間後に流涙、眼瞼下垂、異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れが継続してみられた。投与翌日には眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れのみとなり、投与2日後に正常に復した。その後はいずれの動物にも異常はなかった。

4. 体重(生存動物)

投与翌日に体重減少が認められたが、その後は増加に転じ、以降各投与段階いずれの動物にも体重推移に異常は認められなかった。

5. 剖検(生存動物)

剖検結果に異常は認められなかった。

結 言

厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室の依頼により、インデンの安全性評価の一環として、ラットを用いた急性経口毒性試験を実施したので、その成績を報告する。なお、遵守した基準及び準拠したガイドラインなどは以下の通りである。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

インデンは厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室から提供された。使用した被験物質の名称及びロット番号などを以下に示した（添付資料 1）。

名 称 : インデン、Indene

CAS 番号 : 95-13-6

構造式又は示性式

: C_9H_8

分 子 量 : 116.16

純 度 : 96.3%

ロット番号 :

不 純 物 : ベンゾニトリル 1.7%、他に 1%以上含まれる不純物はない

性 状 : 淡黄色又は無色透明の液体

沸 点 : 182.6°C

融 点 : -1.6°C

引 火 点 : 49°C

発 火 点 : 517°C

空気中の爆発範囲（容積）

: 下限 0.4vol% 上限 4.1vol%

蒸 気 圧 : 147Pa (25°C)

密 度 : 0.990g/cm³ (15°C)

溶 解 性 : 水に不溶。アルコール、エーテルに可溶。

オクタノール/水分配係数

: $\log Pow = 2.92$

安 定 性 : 関連試験終了後、被験物質製造業者にて安定性を確認した結果、被験物質に問題はなく、安定であった（添付資料 2）。

保 存 方 法 : 冷暗所（冷蔵庫、保存期間中の実測値：2～8°C）

保 存 場 所 : 御殿場研究所 被験物質保存室及び第 2 研究棟被験物質調製室

取扱い上の注意

： マスク、ゴーグル、手袋を着用した。

取扱い場所及び周囲の火気、静電気、衝撃火花などの着火源の存在を厳禁とした。

動物試験終了後の残余被験物質は被験物質製造業者に返却した。

2) 媒体

名 称 : コーンオイル

メーカ : 和光純薬工業株式会社

ロット番号 : CEE2389

保存方法 : 室温

保存場所 : 御殿場研究所 第2研究棟被験物質調製室

2. 被験液の調製

1) 被験液の調製方法

必要量の被験物質を秤取し、コーンオイルで希釈して規定量とし、所定濃度とした。被験液の調製は第1段階の4日前、第2段階の7日前に行い、調製後は褐色ガラス瓶（遮光瓶）に入れ保存した。

2) 被験液の保存方法

褐色ガラス瓶（遮光瓶）に入れ、冷暗所（冷蔵庫内、保存期間中の実測値：2～6℃）で保存し、使用前に室温に戻して投与に用いた。

3) 被験液の安定性

本被験物質の0.1及び200 mg/mL溶液（媒体：コーンオイル）は、遮光容器で冷暗所（冷蔵庫内）8日間保存後室温24時間は安定であることが株式会社ボゾリサーチセンターで確認されている（添付資料3）。

4) 被験液の濃度確認

30及び200 mg/mL濃度の被験液について実施した。なお、30 mg/mL濃度の被験液は投与には使用しなかった。

(1) 濃度確認分析実施施設

株式会社ボゾリサーチセンター 御殿場研究所

〒412-0039 静岡県御殿場市かまど 1284

(2) GCによる Indene の被験液中濃度測定法

① 測定対象物質

Indene

② 測定対象標準物質

名 称 : Indene
 供給者 : 厚生労働省医薬食品局審査管理課 化学物質安全対策室
 ロット番号 : Y3545289
 保存方法 : 冷暗所 (冷蔵庫、保存期間中の実測温度 : 2~6℃)
 保存場所 : 御殿場研究所 生化学部標準物質保存場所

③ 使用機器

・ GC システム (Agilent Technologies)

GC	HP6890N
インジェクタ	G2613A
オートサンプラトレイ	G2614A
データ処理ソフト	GC ChemStation G2070AJ

・ 天秤

分析用上皿電子天秤	AE240 (Mettler-Toledo AG)
-----------	---------------------------

④ 測定条件

カラム : G-100 (1.2 mm I.D.×40m、膜厚 2.0μm、
財団法人 化学物質評価研究機構)
 キャリアガス : He
 流量モード : コンスタントフローモード
 キャリアガス流量 : 15mL/min
 注入口 : Purged/Packed 注入口
 注入口温度 : 150℃
 検出器 : Flame ionization detector (FID)
 検出器温度 : 150℃
 H₂ 流量 : 40mL/min
 Air 流量 : 450mL/min
 オープン温度 : 130℃
 試料注入量 : 1μL

⑤ 測定結果

被験液は表示濃度に対し 101.0 及び 101.3%を示し（添付資料 4）、濃度の許容範囲（濃度；表示値±10%以下）内であり、調製に問題はなかった。

3. 試験動物

Sprague-Dawley 系 SPF ラット [CrI:CD(SD)、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター] の雌 21 匹^{注)} を 5 週齢で入手し、当所で 1 週間以上検疫・馴化飼育した後、一般状態及び体重を基に健康な動物を選び、6 週齢で試験に供した。投与時の体重範囲は 127～139g（平均体重±20%の範囲内）であった。動物は各投与段階の投与前日に段階内（群内）の体重ができるだけ均等となるよう体重層別化無作為抽出法により群分けを行った。動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標を付けて行った。飼育ケージには、投与日ごとに色分けしたケージラベルに試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び投与日を明記して表示した。余剰動物は、試験系から除外した。

^{注)}：注文匹数は 20 匹であったが、実際には 21 匹が納入された。

4. 飼育条件

動物は、温度 23±3℃、相対湿度 50±20%、換気回数 1 時間当たり 10～15 回、照明 1 日 12 時間（07：00～19：00）となるように設定した動物飼育室（飼育室番号：706 号室）でブラケット式金属製網ケージ（W 254×D 350×H 170 mm：リードエンジニアリング株式会社）に個別収容し、固形飼料 CRF-1（放射線滅菌：オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：050609）及び飲料水（御殿場市営水道水：自動給水装置使用）を自由に摂取させ飼育した。飼育期間中の飼育室の実際の温度は 21～25℃、相対湿度は 40～59%であった。また、飼料は使用したロットについて財団法人日本食品分析センターで分析したデータを手し、飲料水は水道法に準拠した水質の分析を財団法人静岡県生活科学検査センター（2005 年 5 月まで検査）及び東芝機械環境センター株式会社（2005 年 8 月 1 日以降の検査）に定期的（年 4 回）に依頼してそのデータを手し、それぞれ混入物質などの異常がないことを確認して、それらの写しを保存した。

5. 投与経路の選択理由、投与方法及び観察期間

投与経路は毒性試験ガイドラインに準じ、経口を選択した。

投与容量は 10 mL/kg 体重とし、投与前一夜（約 16 時間）絶食させたラットに胃ゾンデを用

いて、所定量の被験液を1回強制経口投与した。絶食後の再給餌は投与後6時間の一般状態の観察終了後に実施した。また、観察期間は投与後14日間とした。

6. 投与量及び試験手順

被験物質の急性経口毒性は極めて弱いと予想されたことから、開始投与量は2000 mg/kgを選択した。以降の投与量については、毒性試験ガイドライン「急性毒性等級法」の試験手順に従って設定した。すなわち、第1段階の投与において死亡動物が認められなかったことから、第2投与段階においても2000 mg/kgを選択した。各投与段階の動物数は雌3匹とした。群構成を次に示す。

投与段階	投与量 (mg/kg)	被験物質濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg 体重)	性	動物数	動物番号
第1	2000	200	10	雌	3	1101~1103
第2	2000	200	10	雌	3	2101~2103

7. 検査方法

1) 一般状態及び生死の観察

投与後6時間は頻繁（投与直後～投与5分後、～15分後、～30分後、～1時間後、～2時間後、～4時間後、～6時間後）に、その後は1日1回（08:08～10:55）14日間、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

2) 体重測定

投与日（投与直前）、投与1、3、7及び14日後に体重を測定（08:08～10:55）した。投与日の体重を投与液量算出の基準にした。

3) 病理学検査

死亡動物は発見しだい速やかに、生存動物は14日間の観察期間終了後にエーテル麻酔下で放血致死（腹部大動脈切断）させ、体外表並びに頭部、胸部及び腹部の器官・組織を肉眼的に観察した。なお、死亡動物（動物番号：2102）において肺及び腸管に異常が認められたことから、これらの器官・組織を保存した。

8. LD₅₀ 値の推定

毒性試験ガイドライン「急性毒性等級法」に従って、投与後14日間の死亡状況をもとに、おおよそのLD₅₀値を推定した。

試験結果

1. LD₅₀ 値

死亡状況及び LD₅₀ 値を Table 1 に示した。

第 1 段階に死亡は認められなかったが、第 2 段階に 1/3 例が死亡した。従って、急性毒性等級法に従い、LD₅₀ 値は 2000 mg/kg を上回るものと推定され、GHS の Category 5 (>2000-5000 mg/kg) に分類される。

2. 死亡動物

第 2 段階において、2000 mg/kg 投与群の 1 例（動物番号：2102）が死亡した。この動物は、投与 1 時間後に流涙、流涎及び眼瞼下垂、投与 2 から 6 時間後に流涙、眼瞼下垂、異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れが継続してみられた。投与翌日には投与日に比べ体重が 10g 減少し、腹臥/横臥、呼吸数の減少、体温低下、眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れを呈し、同日の午後に死亡した。剖検では、鼻口腔周囲の汚れ、肺の暗赤色巣及び被験液貯留による小腸（空腸から回腸）の白色化が認められた。

3. 一般状態（生存動物）

一般状態を Table 2 及び 3 に示した。

第 1 及び 2 段階の生存動物ともに、投与 1 時間後に流涙、流涎及び眼瞼下垂、投与 2 から 6 時間後に流涙、眼瞼下垂、異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れが継続してみられた。投与翌日に眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れのみとなり、投与 2 日後に正常に復した。

4. 体重（生存動物）

体重変化を Fig. 1、Table 4 及び 5 に示した。

第 1 及び 2 段階ともに、投与翌日に平均値で約 6g 体重減少したが、投与 3 日後には増加に転じた。その後の体重推移に異常はなかった。

5. 剖検（生存動物）

剖検所見を Table 6 及び 7 に示した。

各投与段階のいずれの動物にも、体外表並びに頭部、胸部及び腹部の器官・組織に異常は認められなかった。

考 察

インデンの急性経口毒性を毒性試験ガイドライン「急性毒性等級法」に従って検討した。動物は6週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔CrI:CD(SD)〕とし、1投与段階につき雌3匹を用いて2000mg/kgの投与量で2段階行った。

2000mg/kg投与の第1段階に死亡はなかったが、第2段階で1/3例が死亡したことから、急性毒性等級法に従い、LD₅₀値は2000 mg/kgを上回るものと推定され、GHSのCategory 5 (>2000-5000 mg/kg)に分類される。

第2段階で死亡した2000 mg/kg投与群の1例は、投与1時間後に流涙、流涎及び眼瞼下垂、投与2時間後以降更に異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れ、投与翌日に眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れに加え、腹臥/横臥、呼吸数の減少及び体温低下を呈し、同日の午後に死亡した。剖検では、鼻口腔周囲の汚れ、肺の暗赤色巣及び被験液貯留による小腸（空腸から回腸）の白色化がみられた。インデンのラットにおける急性吸入毒性はLC₅₀ 14 mg/m³であり、ヒトの目に対して蒸気・液ともに中等度の刺激性があり、皮膚に対しても弱い刺激性があることが知られている（MSDSより）。流涙、流涎及び眼瞼下垂は、本剤が胃で暖められ、蒸気が上気道性に上昇し、症状を惹起したとも考えられた。鼻口腔周囲の汚れは流涎及び鼻腔分泌物の亢進を反映した変化であり、歩行異常、腹臥/横臥、呼吸数の減少及び体温低下は全身状態の悪化によるものと考えられた。

生存動物においては、死亡動物と同様、投与当日に流涙、流涎、眼瞼下垂、異常歩行及び鼻口腔周囲の汚れがみられたが、投与翌日には眼瞼下垂及び鼻口腔周囲の汚れに軽減し、投与2日後に回復した。体重の変動も一般状態を反映し、投与翌日に減少、投与3日後に増加に転じたことから、回復は速やかであると考えられた。また、いずれの動物の剖検においても異常はみられなかった。

以上のことから、本剤のLD₅₀値は2000 mg/kgを上回るものと推定された。

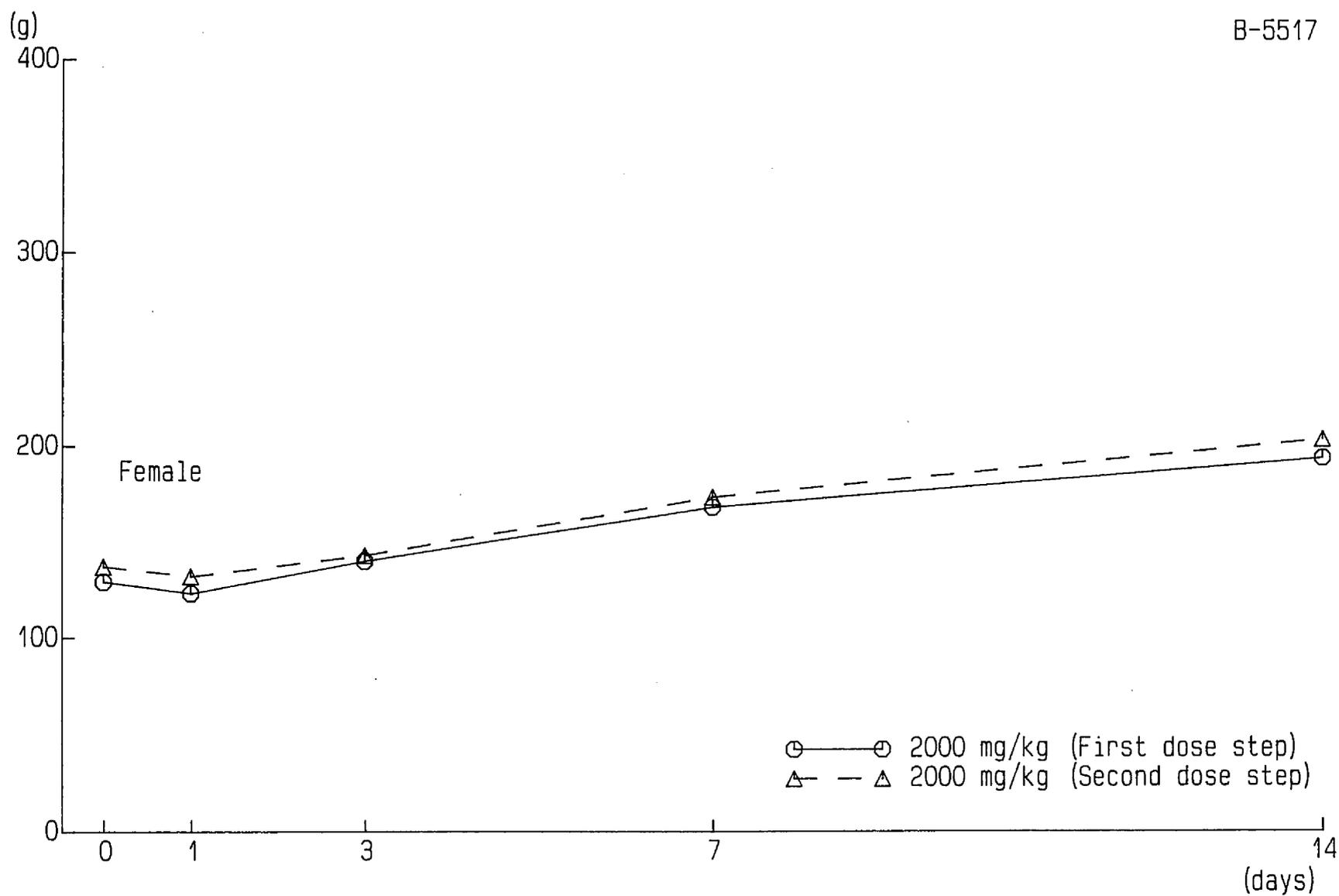


Fig.1 Acute oral toxicity study of Indene in rats

———— Body weight ————

Table 2 Acute oral toxicity study of Indene in rats

Clinical signs

Sex : Female

Dose (mg/kg) : 2000 (First dose step)

Animal number	minutes			hours				days														
	i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
1101	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	TU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1102	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	TU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1103	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	TU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

i : Immediately after dosing

- : No abnormality

G : Abnormal gait

N : Lacrimation

P : Salivation

T : Ptosis

U : Smudge, peri-nasal/mouth area

Table 3 Acute oral toxicity study of Indene in rats

Clinical signs

Sex : Female

Dose (mg/kg) : 2000 (Second dose step)

Animal number	minutes			hours				days														
	i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
2101	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	TU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2102	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	FIMTU+														
2103	-	-	-	NPT	GNTU	GNTU	GNTU	TU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

i : Immediately after dosing

- : No abnormality

F : Prone/Lateral position

G : Abnormal gait

I : Bradypnea

M : Hypothermia

N : Lacrimation

P : Salivation

T : Ptosis

U : Smudge, peri-nasal/mouth area

+ : Died

Table 4 Acute oral toxicity study of Indene in rats

Body weight

Sex : Female

Dose (mg/kg) : 2000 (First dose step)

Animal number	Day after administration					Gain 0-14
	0	1	3	7	14	
1101	132	128	143	180	210	78
1102	127	120	139	167	195	68
1103	128	122	137	160	179	51
Mean	129	123	140	169	195	66
S.D.	3	4	3	10	16	14

Unit : g

Table 5 Acute oral toxicity study of Indene in rats

Body weight

Sex : Female

Dose (mg/kg) : 2000 (Second dose step)

Animal number	Day after administration					Gain 0-14
	0	1	3	7	14	
2101	139	140	148	181	207	68
2102	136	126 D				
2103	136	130	138	167	202	66
Mean	137	132	143	174	205	67
S.D.	2	7	7	10	4	1

Unit : g
D : Died

Table 6 Acute oral toxicity study of Indene in rats
 Gross pathological findings
 Sex : Female
 Dose (mg/kg) : 2000 (First dose step)

Organs	Findings	Animal number		
		1101	1102	1103
External appearance	Smudge, peri-nasal/mouth area	-	-	-
Brain		-	-	-
Spinal cord		-	-	-
Sciatic nerve		-	-	-
Pituitary		-	-	-
Salivary gland		-	-	-
Submandibular lymph node		-	-	-
Trachea		-	-	-
Thyroid		-	-	-
Thoracic cavity		-	-	-
Thymus		-	-	-
Heart		-	-	-
Lung	Focus, dark red	-	-	-
Abdominal cavity		-	-	-
Liver		-	-	-
Spleen		-	-	-
Pancreas		-	-	-
Kidney		-	-	-
Adrenal		-	-	-
Esophagus		-	-	-
Stomach		-	-	-
Small intestine	White change	-	-	-
Large intestine		-	-	-
Mesenteric lymph node		-	-	-
Bone marrow		-	-	-
Femoral muscle		-	-	-
Urinary bladder		-	-	-
Ovary		-	-	-
Uterus		-	-	-
Vagina		-	-	-
Other tissues or organs		-	-	-

- : No abnormality

Table 7 Acute oral toxicity study of Indene in rats
 Gross pathological findings
 Sex : Female
 Dose (mg/kg) : 2000 (Second dose step)

Organs	Findings	Animal number		
		2101	2102D	2103
External appearance	Smudge, peri-nasal/mouth area	-	+	-
Brain		-	-	-
Spinal cord		-	-	-
Sciatic nerve		-	-	-
Pituitary		-	-	-
Salivary gland		-	-	-
Submandibular lymph node		-	-	-
Trachea		-	-	-
Thyroid		-	-	-
Thoracic cavity		-	-	-
Thymus		-	-	-
Heart		-	-	-
Lung	Focus, dark red	-	+	-
Abdominal cavity		-	-	-
Liver		-	-	-
Spleen		-	-	-
Pancreas		-	-	-
Kidney		-	-	-
Adrenal		-	-	-
Esophagus		-	-	-
Stomach		-	-	-
Small intestine	White change	-	+	-
Large intestine		-	-	-
Mesenteric lymph node		-	-	-
Bone marrow		-	-	-
Femoral muscle		-	-	-
Urinary bladder		-	-	-
Ovary		-	-	-
Uterus		-	-	-
Vagina		-	-	-
Other tissues or organs		-	-	-

- : No abnormality + : Positive for respective changes D : Died