

試験報告書

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントレン]-3-オンの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0748

2010年 1月19日

日本バイオアッセイ研究センター

表題

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験目的

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンを雌のラットに 1 回、強制経口投与し、急性毒性に関する情報を得ることを目的とした。

試験法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン 423「Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method」(1996 年 3 月 22 日採択、2001 年 12 月 17 日改訂) ¹⁾に基づいて実施した。

GLP 対応

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

試験委託者

経済産業省製造産業局化学物質管理課
東京都千代田区霞ヶ関 1-3-1

試験施設及び運営管理者

日本バイオアッセイ研究センター
[REDACTED]
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日		2009年 9月 24日
動物導入日		2009年 9月 29日
被験物質投与日	第1段階	2009年 10月 6日
	第2段階	2009年 10月 10日
解剖終了日	第1段階	2009年 10月 20日
	第2段階	2009年 10月 24日
試験終了日		2010年 1月 19日

試験関係者一覧

試験責任者	:	██████████ (試験管理部)
報告書案作成者	:	██████████ (試験管理部)
被験物質の管理・分析	:	██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
被験物質投与液の 調製・投与	:	██████████ (試験管理部)
動物管理	:	██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
病理検査	:	██████████ (病理検査部)
		██████████ (病理検査部)
		██████████ (病理検査部)
試験情報管理	:	██████████ (企画調整部)
		██████████ (企画調整部)

試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、被験物質、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係る資料は、試資料保管施設に保管する。なお、被験物質は 50g を保管した。

保管期間は、最終報告書提出後、原則として 10 年間とする。ただし、この期間にあっても被験物質及び標本については品質が評価に耐え得る期間の保管とする。

試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付

試験管理部

2010 年 1 月 19 日

陳 述 書

試験名：2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのラットを用いた急性経口投与毒性試験

本試験は、試験計画書に基づき、また、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用して実施された。

本報告書はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

日本バイオアッセイ研究センター

試験責任者

2010 年 1 月 19 日

運営管理者

2010 年 1 月 19 日

信 頼 性 保 証 証 明 書

表題 2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号 0748

被験物質の名称 2'-アミノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オン

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン 423「Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method」(1996年3月22日採択、2001年12月17日改訂)に基づいて実施された。

最終報告書には、試験で使用方法及び手順が正確に記載されており、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを認める。

なお、監査・査察の実施日及び報告日は以下のとおりである。

対 象	監査・査察実施日	運営管理者及び試験責任者への報告日
試験計画書	2009年 09月 24日	2009年 09月 24日
試験動物の受け入れ・検疫	2009年 09月 29日	2009年 09月 30日
被験物質濃度調製	2009年 09月 28日	2009年 09月 28日
群構成	2009年 10月 05日	2009年 10月 05日
動物飼育管理操作		
投与作業	2009年 10月 06日	2009年 10月 06日
病理解剖	2009年 10月 20日	2009年 10月 20日
被験物質の管理	2009年 09月 28日、12月 18日	2009年 09月 28日、12月 18日
データの取り扱い管理	2009年 12月 15～18日	2009年 12月 18日
最終報告書	2009年 12月 15～18日	
	2010年 01月 19日	2010年 01月 19日

2010年1月19日

信頼性保証責任者

所 属 中央労働災害防止協会
日本バイオアッセイ研究センター
職 名 信頼性保証主管

氏 名



目 次

	頁
本文	
I 要約	2
II 材料・方法	3
1. 被験物質及び媒体	3
1.1 被験物質の名称等	3
1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量	3
1.3 被験物質の物理化学的性状等	3
1.4 被験物質の使用ロット等	4
1.5 被験物質の同一性	4
1.6 被験物質の安定性	4
1.7 媒体	4
2. 投与	4
2.1 投与方法	4
2.2 投与用量及び投与液量	5
2.3 被験物質投与液の調製方法	5
2.4 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性	5
3. 動物	5
3.1 試験動物	5
3.2 群の構成と動物数	6
3.3 群分け方法	6
3.4 動物の個体識別	6
3.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別	6
3.6 投与時週齢	7
3.7 飼育条件	7
1) 飼育環境	7
2) 飼料	7
3) 飲水	7
4. 観察・検査	8
4.1 一般状態の観察	8
4.2 体重測定	8
4.3 剖検	8
4.4 臓器の採取、保存	8
4.5 投与未実施動物	8
5. 試験成績の信頼性への影響	8

Ⅲ 試験成績	9
1. 死亡状況	9
2. 一般状態	9
3. 体重	9
4. 剖検	9
Ⅳ 考察	9
Ⅴ 文献	10

FIGURE & TABLES

Figure 1	The flow chart of test procedure and GHS category	12
Table 1	Mortality of female rats treated orally with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one in acute oral toxicity test - acute toxic class method	13
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one in acute oral toxicity test - acute toxic class method	14
Table 3	Body weight changes of female rats treated orally with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one in acute oral toxicity test - acute toxic class method	15
Table 4	Necropsy findings of female rats treated orally with 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one in acute oral toxicity test - acute toxic class method	16

APPENDICES

Appendix 1	Identity of 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one	18
Appendix 2	Stability of 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one	20
Appendix 3	Concentration of test sample (2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one)	22
Appendix 4	Homogeneity of test sample (2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one)	24
Appendix 5	Clinical signs (Individual)	26
Appendix 6	Body weights (Individual)	31
Appendix 7	Necropsy findings (Individual)	34

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0748

本文

I 要約

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの急性経口毒性を検討するために、OECD化学品テストガイドライン 423「Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method」¹⁾に基づき、試験を実施した。

動物は CrI:CD(SD)ラットの 8 週齢の雌を使用した。投与は 1 投与段階（1 群）につき 3 匹を用いて、2000 mg/kg の投与量で 2 段階実施した。

第 1 段階及び第 2 段階ともに 2000 mg/kg の投与による死亡は認められなかった。また、一般状態、体重推移及び剖検での異常も観察されなかった。

2000 mg/kg の投与量で死亡がみられなかったことから、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンは、GHS（Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures）における急性毒性の等級として Category 5 (>2000 mg/kg)に分類される。

II 材料・方法

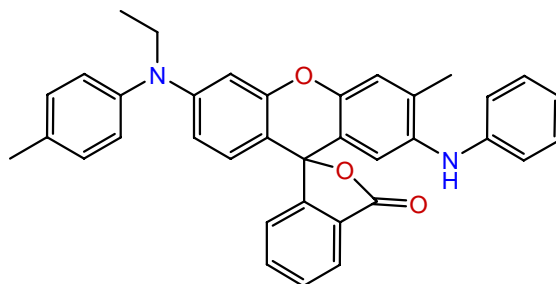
1. 被験物質及び媒体

1.1 被験物質の名称等

名 称 : 2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサントエン]-3-オン
 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro
 [isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
 別 名 : ETAC ²⁾
 CAS No. : 59129-79-2

1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量

構 造 式 :



分 子 式 : $C_{36}H_{30}N_2O_3$

分 子 量 : 539

1.3 被験物質の物理化学的性状等²⁾

性 状 : 微着色粉末
 沸 点 : —
 融 点 : 205℃以上
 溶 解 性 : 水に不溶
 保 管 条 件 : 室温かつ遮光

1.4 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号： [REDACTED]
製 造 元： [REDACTED]
純 度： 99.0% ([REDACTED] 検査成績書データ)

1.5 被験物質の同一性 (Appendix 1)

被験物質の同一性は、赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定した赤外吸収スペクトルを文献値³⁾と比較することで確認した。

その結果、被験物質の赤外吸収スペクトルが文献値と同じ波数にピークを示したことから、被験物質は2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンであると判断した。

1.6 被験物質の安定性 (Appendix 2)

被験物質の安定性は、使用開始前（投与開始前）と使用終了後（投与動物の飼育観察終了後）に、高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて測定したクロマトグラムを比較することで確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後のクロマトグラムに差がみられなかったことから、被験物質はこの期間において安定していたと判断した。

1.7 媒体

名 称： オリーブ油（日本薬局方）
製 造 元： 丸石製薬(株)
ロ ッ ト 番 号： 8X01
保 管 条 件： 室温かつ遮光

2. 投与

2.1 投与方法

投与経路は経口とした。午前9時から12時の時間帯に胃ゾンデとシリンジを用いて1回の強制経口投与を実施した。

投与動物は、投与前日の16時以降から投与後約3時間まで絶食させた。

2.2 投与用量及び投与液量

被験物質の製造元発行の「製品安全データシート」²⁾に、「ラットのLD₅₀値は16000 mg/kg以上」と記載されている。この情報をもとに、第1段階の投与用量をOECD化学品テストガイドライン 423¹⁾で推奨されている最高用量の2000 mg/kgとした。第2段階以降の投与用量は、前投与段階の投与3日後までの生死状況をもとに、Figure 1に示したフローチャートに従い決定した。

第1段階の2000 mg/kgで投与3日後までに死亡が認められなかったため、第2段階の投与用量も2000 mg/kgとした。第2段階の投与でも死亡がみられなかったため、第3段階は実施しなかった。

投与液量は体重1kg当たり10 mLとし、投与日の投与直前に測定した体重をもとに個体別に算出した。

2.3 被験物質投与液の調製方法

秤量した被験物質にオリーブ油を加えて攪拌し、200 mg/mLの濃度 (wt/vol) になるように調製した。被験物質はオリーブ油に懸濁した状態であった。投与液は投与日の投与前に調製した。

2.4 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性 (Appendix 3, 4)

被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性は、第1段階の投与前に上記調製方法で作製した調製液を用いて確認した。OECD化学品テストガイドライン 423¹⁾で規定されている5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg及び2000 mg/kgの投与用量、すなわち濃度 (wt/vol) に換算して0.5 mg/mL、5 mg/mL、30 mg/mL及び200 mg/mLの被験物質調製液を作製し、濃度毎に調製容器内の調製液を7点サンプリングし、それぞれの被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて測定した。

その結果、被験物質調製液における7点の平均濃度は各設定濃度に対して98～101%の範囲にあり、7点における濃度のばらつきは変動係数0.74～4.64%の範囲にあった。

3. 動物

3.1 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株) (神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6) 筑波飼育センター生産のCrI:CD(SD)ラット (SPF) の雌を使用した。

この動物を選択した理由は、毒性試験で一般的に使用され背景データが豊富な動物種及び系統であること、またOECD化学品テストガイドライン 423¹⁾で雌動物が推奨されているこ

とによる。

雌 23 匹を 7 週齢で導入し、導入日を含む 7 日間を検疫と馴化を兼ねて飼育した。一般状態を毎日観察し、導入日と検疫・馴化終了日（群分け日）には体重を測定した。

検疫・馴化期間中に一般状態や体重の推移に異常がみられなかった動物の中から、体重の中央値に近い雌 18 匹を試験動物として選定した（群分け時体重範囲、208～226g）。

選定されなかった雌 5 匹は群分け後に安楽死させた。

3.2 群の構成と動物数

群の構成は 6 群（6 投与段階）とし、1 群当たり 3 匹の動物数とした。

群 名 称（投与段階）	投与用量	動物数（動物番号）
第 1 段階	2000 mg/kg	3 匹（2001～2003）
第 2 段階	2000 mg/kg	3 匹（2101～2103）
第 3 段階	投与未実施 ^{a)}	3 匹（2201～2203）
第 4 段階	投与未実施 ^{a)}	3 匹（2301～2303）
第 5 段階	投与未実施 ^{a)}	3 匹（2401～2403）
第 6 段階	投与未実施 ^{a)}	3 匹（2501～2503）

^{a)} 第 2 段階までの投与でGHSに定められた急性毒性の等級が決定したため、第 3 段階以降の投与は実施しなかった。

3.3 群分け方法

群分けは、第 1 段階の投与前日に群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）⁴⁾で行った。18 匹の試験動物のうち、初めに体重値の大きい動物から順に各群に 1 匹ずつ無作為に割り当て、二巡目以降は各群の動物の合計体重を比較し、値の小さい群から順に体重値の大きい動物を割り当てた。

3.4 動物の個体識別

動物の個体識別は尾に油性マーカーで色素塗布する方法で行った。ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

3.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した飼育室（713 室）に収容し、室入口の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

3.6 投与時週齢

投与時の週齢は第 1 段階及び第 2 段階ともに 8 週齢であった。

3.7 飼育条件

1) 飼育環境

飼育室の環境条件及び使用したケージ等を以下に示した。飼育室の温度と湿度は実測値の範囲を＜ ＞内に示した。

温度：23±2℃ ＜22.8－23.1℃＞

湿度：55±15% ＜47－53%＞

明暗サイクル：12 時間点灯(8:00～20:00)／12 時間消灯(20:00～8:00)

換気回数：15～17 回／時

ケージへの動物の収容方法：単飼

ケージの材質・形状・寸法等：

ステンレス製 2 連網ケージ (170(W)×294(D)×176(H) mm／匹)

飼育器材の滅菌方法：

飼育器材（ラック・ケージ・餌箱・給水ノズル・作業台車・トレイ等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120℃、15 分以上）した。

2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)（東京都板橋区小豆沢 3-6-10）千葉工場生産の CRF-1 固型飼料（30KGy-γ 線照射滅菌飼料、Lot No.090805）を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、投与前日の 16 時以降、投与後約 3 時間まで絶食させた。

使用した飼料の栄養成分と夾雑物の分析データは、オリエンタル酵母工業(株)から入手し保管した。夾雑物の分析結果については、試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

3) 飲水

飲水は市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

飲水の水質は、試験施設として実施している飲水の定期サンプリングによる水質検査結果を、水道法を参考にして試験計画書で規定した項目及び許容基準と照合して、異常のないことを確認した。水質検査は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に依頼し、その結果は保管した。

4. 観察・検査

4.1 一般状態の観察

投与前の動物については、毎日1回、一般状態の観察を行った。

投与した動物については、投与日（観察1日）は、投与後約1時間継続して観察し、その後は約1時間ごとに投与後約6時間まで観察した。観察2日以降の14日間は、毎日1回の観察を行った。

4.2 体重測定

投与した動物については、投与日の投与直前、その後は観察2、4、8、11及び15日に体重を測定した。

4.3 剖検

投与した全ての動物を観察15日に剖検した。動物はエーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血・致死させてから肉眼による観察を行った。

4.4 臓器の採取、保存

剖検した動物については、下記に示した臓器・組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入した）、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩・鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）

4.5 投与未実施動物

投与に使用しなかった第3段階以降の動物は、第2段階の動物の搬出（投与した全ての動物の飼育観察終了）後、実験動物技術研修用として有効利用した。

5. 試験成績の信頼性への影響

試験計画書と実施内容に不整合は認められなかった。また、試験成績の信頼性に影響を及ぼすような飼育環境等の異常は認められなかった。

Ⅲ 試験成績

1. 死亡状況 (Table 1) (Appendix 5)

2000 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物計 6 例に死亡は認められなかった。

2. 一般状態 (Table 1, 2) (Appendix 5)

2000 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に一般状態の異常は認められなかった。

3. 体重 (Table 3) (Appendix 6)

2000 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に体重推移の異常は認められなかった。

4. 剖検 (Table 4) (Appendix 7)

2000 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に異常は認められなかった。

Ⅳ 考察

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H),9'-[9H]キサンテン]-3-オンのラットのLD₅₀値は、16000 mg/kg以上であるとの報告²⁾以外に、本化合物の急性毒性に関する情報は得られていない。

本試験の結果、第 1 段階及び第 2 段階の 2000 mg/kg の投与による死亡はなく、一般状態、体重推移及び剖検での異常も認められなかった。

以上のことから、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンのラットのLD₅₀値は 2000 mg/kg以上であると推定される。

2000 mg/kg の投与量で死亡がみられなかったことから、2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンは、GHS における急性毒性の等級として Category 5 (>2000 mg/kg)に分類される。

V 文献

- 1) OECD. 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals 423 “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” , Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 2) [REDACTED] 2009. 「製品安全データシート」. ETAC.
- 3) [REDACTED] 2009. 赤外吸収スペクトル. ETAC.
- 4) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット, マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 14 : 7285–7302.

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0748

FIGURE
&
TABLES

Figure 1 The flow chart of test procedure and GHS category

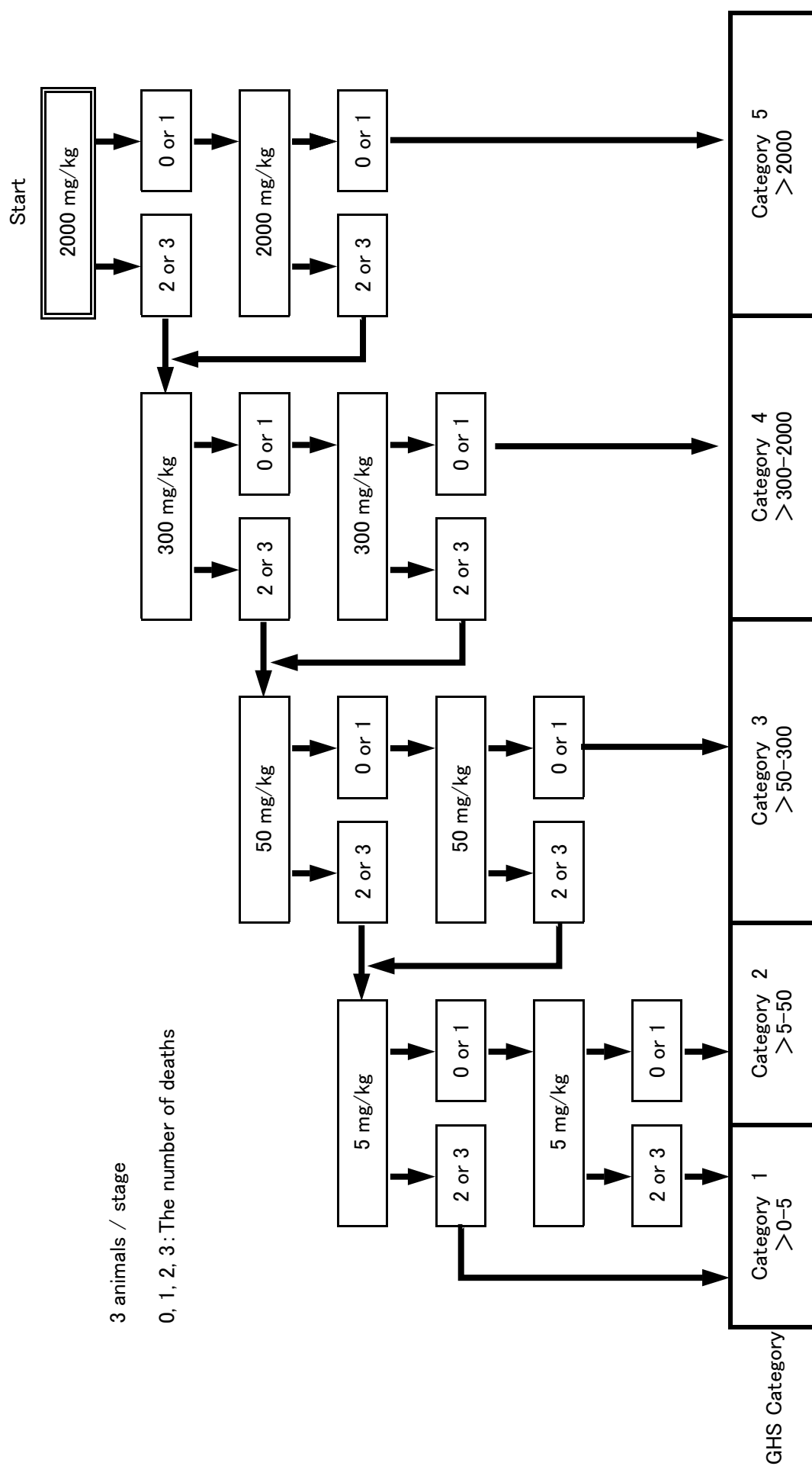


Table 1 Mortality of female rats treated orally with
 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
 in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths for 14 days
1st	2000	3	0
2nd	2000	3	0

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with
 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
 in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs
1st	2000	3	No abnormalities detected (3)
2nd	2000	3	No abnormalities detected (3)

Parentheses represent the number of animals.

Table 3 Body weight changes of female rats treated orally with
 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
 in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Days	Body weights (g)					
				1	2	4	8	11	15
1st	2000	3		193 ± 6	216 ± 11	226 ± 4	239 ± 8	251 ± 17	263 ± 20
2nd	2000	3		206 ± 5	229 ± 8	239 ± 4	251 ± 5	259 ± 7	272 ± 5

Data represent mean ± S.D.

Table 4 Necropsy findings of female rats treated orally with
 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
 in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Necropsy findings
1st	2000	3	No abnormalities detected (3)
2nd	2000	3	No abnormalities detected (3)

Parentheses represent the number of animals.

2'-アニリノ-6'-[N-エチル-N-(4-トリル)アミノ]-3'-メチルスピロ
[イソベンゾフラン-1(3H), 9'-[9H]キサンテン]-3-オンの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0748

APPENDICES

Appendix 1

Identity of
2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro
[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

IDENTITY OF 2'-ANILINO-6'-[N-ETHYL-N-(4-TOLYL)AMINO]-3'-METHYLSPIRO
[ISOBENZOFURAN-1(3H),9'-[9H]XANTHEN]-3-ONE

Test Substance : 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-
1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

Lot No. :

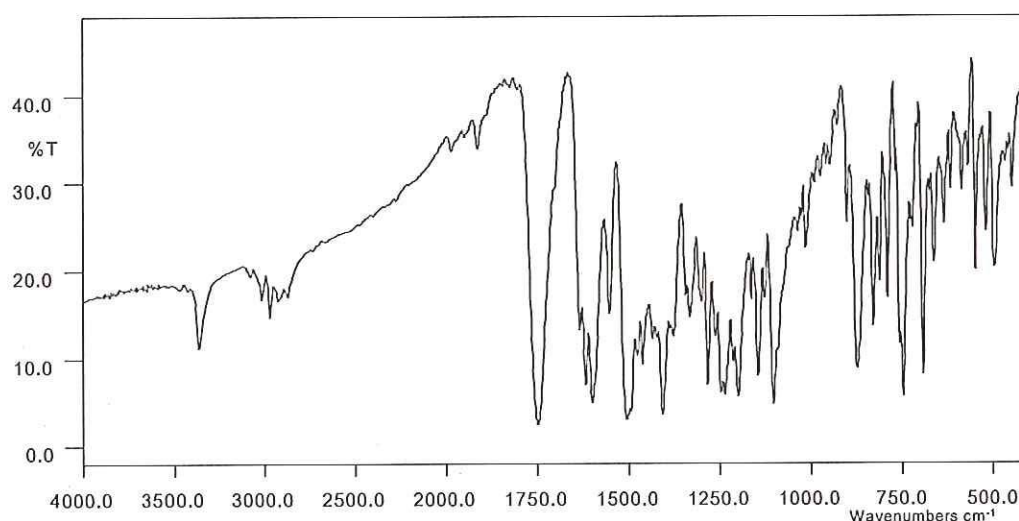
1. Spectral Data

Infrared Spectrometry

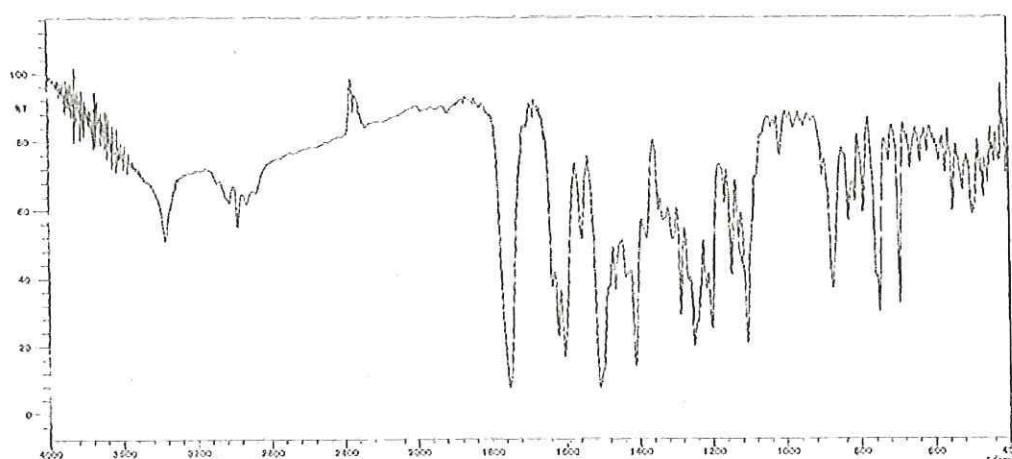
Instrument : Shimadzu FTIR-8200PC Infrared Spectrometer

Cell : KBr

Resolution : 4 cm⁻¹



Infrared Spectrum of Test Substance



Infrared Spectrum of Literature Data*

Result: The infrared spectrum was consistent with literature spectrum.

2. Conclusion: The test substance was identified as 2'-anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one by infrared spectrum.

Appendix 2

Stability of
2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro
[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

STABILITY OF 2'-ANILINO-6'-[N-ETHYL-N-(4-TOLYL)AMINO]-3'-METHYLSPIRO
[ISOBENZOFURAN-1(3H),9'-[9H]XANTHEN]-3-ONE

Test Substance : 2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro[isobenzofuran-
1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one [REDACTED]

Lot No. : [REDACTED]

1. High Performance Liquid Chromatography

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 95 : 5

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (290 nm)

Injection Volume : 10 μ L

Date Analyzed	Peak No.	Retention Time (min)	Area (%)
2009.10.02	1	3.587	100
2009.10.27	1	3.590	100

Result: High performance liquid chromatography indicated one major peak (peak No.1) analyzed on 2009.10.2 and one major peak (peak No.1) analyzed on 2009.10.27. No new trace impurity peak in the test substance analyzed on 2009.10.27 was detected.

2. Conclusion: The test substance was stable for the period that the test substance had been used for the study.

Appendix 3

Concentration of test sample
(2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro
[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one)

CONCENTRATION OF TEST SAMPLE (2'-ANILINO-6'-[N-ETHYL-N-(4-TOLYL)AMINO]-3'-METHYLSPIRO[ISOBENZOFURAN-1(3H),9'-[9H]XANTHEN]-3-ONE)

Analytical Method : The samples were analyzed by high performance liquid chromatography.

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 95 : 5

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (290 nm)

Injection Volume : 10 μ L

Date Analyzed	Target Concentration			
	500 ^a	5000	30000	200000
2009.09.28	505 ^b (101) ^c	4970 (99.4)	30200 (101)	196000 (98.0)

^a μ g/mL

^b μ g/mL (Mean measured concentration.)

^c % (Mean measured concentration/target concentration \times 100.)

Appendix 4

Homogeneity of test sample
(2'-Anilino-6'-[N-ethyl-N-(4-tolyl)amino]-3'-methylspiro
[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one)

HOMOGENEITY OF TEST SAMPLE (2'-ANILINO-6'-[N-ETHYL-N-(4-TOLYL)AMINO]-3'-METHYLSPIRO[ISOBENZOFURAN-1(3H),9'-[9H]XANTHEN]-3-ONE)

Analytical Method : The samples were analyzed by high performance liquid chromatography.

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 95 : 5

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (290 nm)

Injection Volume : 10 μ L

	Target Concentration			
	500 ^a	5000	30000	200000
Coefficient of Variation	4.64 ^b	0.74	3.87	1.01

^a μ g/mL

^b % (n=7)

Appendix 5

Clinical signs (Individual)

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 1 (Administration day)

Clinical signs (Individual)
1st Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 1

Approximate time after administration	Animal ID-No. 2001	2002	2003
10 min	NAD	NAD	NAD
20 min	NAD	NAD	NAD
30 min	NAD	NAD	NAD
40 min	NAD	NAD	NAD
50 min	NAD	NAD	NAD
60 min	NAD	NAD	NAD
2 hr	NAD	NAD	NAD
3 hr	NAD	NAD	NAD
4 hr	NAD	NAD	NAD
5 hr	NAD	NAD	NAD
6 hr	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 1 (Administration day)

Clinical signs (Individual)

2nd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 3

Approximate time after administration	Animal ID-No. 2101	2102	2103
10 min	NAD	NAD	NAD
20 min	NAD	NAD	NAD
30 min	NAD	NAD	NAD
40 min	NAD	NAD	NAD
50 min	NAD	NAD	NAD
60 min	NAD	NAD	NAD
2 hr	NAD	NAD	NAD
3 hr	NAD	NAD	NAD
4 hr	NAD	NAD	NAD
5 hr	NAD	NAD	NAD
6 hr	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0748
ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)
SEX : Female
DAY : 2 to 15 days

Clinical signs (Individual)
1st Stage (2000 mg/kg)

Observation days	Animal ID-No. 2001	2002	2003
2	NAD	NAD	NAD
3	NAD	NAD	NAD
4	NAD	NAD	NAD
5	NAD	NAD	NAD
6	NAD	NAD	NAD
7	NAD	NAD	NAD
8	NAD	NAD	NAD
9	NAD	NAD	NAD
10	NAD	NAD	NAD
11	NAD	NAD	NAD
12	NAD	NAD	NAD
13	NAD	NAD	NAD
14	NAD	NAD	NAD
15	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 2 to 15 days

Clinical signs (Individual)

2nd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 4

Observation days	Animal ID-No. 2101	2102	2103
2	NAD	NAD	NAD
3	NAD	NAD	NAD
4	NAD	NAD	NAD
5	NAD	NAD	NAD
6	NAD	NAD	NAD
7	NAD	NAD	NAD
8	NAD	NAD	NAD
9	NAD	NAD	NAD
10	NAD	NAD	NAD
11	NAD	NAD	NAD
12	NAD	NAD	NAD
13	NAD	NAD	NAD
14	NAD	NAD	NAD
15	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

Appendix 6

Body weights (Individual)

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Body weights (Individual)

1st Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 1

Observation days	Animal ID-No. 2001	2002		2003	
		Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)
1	198			193	
2	226		28	218	25
4	228		30	229	36
8	245		47	243	50
11	267		69	252	59
15	282		84	264	71

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Body weights (Individual)

2nd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 2

Observation days	Animal ID-No. 2101	2102		2103	
		Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)
1	211			202	
2	236		25	221	19
4	243		32	235	33
8	255		44	245	43
11	265		54	252	50
15	276		65	267	65

Appendix 7

Necropsy findings (Individual)

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Necropsy findings (Individual)
1st Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 1

Animal ID-No.	Findings
2001	NAD
2002	NAD
2003	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0748

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Necropsy findings (Individual)
2nd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 2

Animal ID-No.	Findings
2101	NAD
2102	NAD
2103	NAD

NAD: No abnormalities detected