B031635

最終報告書

N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンのラットを用いた
経口投与による急性毒性試験

（試験番号：B031635）

2005年12月5日

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

1. 陳述書 …… 2
2. 目次 …… 3

5. 要約 …… 8
6. 緒言 …… 8
7. 材料および方法 …… 9
 7.1 被験物質 …… 9
 7.2 試験動物 …… 9
 7.3 動物飼育 …… 10
 7.4 投与液の調製 …… 12
 7.5 投与液の分析方法 …… 12
 7.6 投与 …… 13
 7.7 使用動物数と用量 …… 14
 7.8 群構成 …… 15
 7.9 観察・測定項目 …… 15
 7.10 コンピュータシステムの使用 …… 15
8. 結果および結論 …… 16
 8.1 一般状態 …… 16
 8.2 体重および体重増加量 …… 16
 8.3 剖検 …… 16
 8.4 結論 …… 16
9. 参考文献 …… 17

群別表および個体別表（ページ 1 – 15）

5. 要約

N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンを OECD Guideline for the Testing of Chemicals（TG 423, 2001）Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method に従って 8 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットに強制経口投与し，その急性経口毒性を検討した．投与用量は第一回投与を 300 mg/kg とし，第二回および第三回投与はそれぞれ 300 および 2000 mg/kg とした．N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンは注射用水で溶解調製し，投与前日の夕方から絶食したラットに 10 mL/kg の液量で投与した．

その結果，2000 mg/kg 投与群で第 2 日までに全例が死亡した．死亡までの一般状態の変化として自発運動低下，不整呼吸，軟便，下腹部の汚れがみられ，剖検では消化管障害を示唆する変化が認められた．300 mg/kg 投与群では一般状態，体重および剖検とも変化は認められなかった．

以上，本試験条件下における N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンの概略の半数致死量は, 300 mg/kg 以上, 2000 mg/kg 未満, Globally Harmonized Classification System（GHS）は Category 4（>300-2000 mg/kg b.w.）に分類された．

6. 緒言

N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンはカルボキシベタイン型の両性界面活性剤で，繊維仕上げ剤，化粧品，シャンプー，医薬品，金属イオン封鎖剤等の幅広い分野で使用されている[1]．毒性情報としては，ラット LD_{50} 値が 71 mg/kg との報告がある[2]．今回，OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として，OECD TG423 に従いラットの急性毒性試験を行ったので報告する．

7. 材料および方法

7.1 被験物質（添付資料 11.1）

7.1.1 名称

N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシン（別名；アンヒトール 24B [Amphitol 24B]）

7.1.2 CAS 番号

683-10-3

7.1.3 入手先

7.1.4 入手日

2003 年 11 月 19 日

7.1.5 ロット番号

7.1.6 純度

27.1%

7.1.7 不純物

石油エーテル可溶分 0.1%，乾燥減量 65.8%，強熱残分 7.0%

7.1.8 保存条件

室温，遮光，密栓容器（温度実測値；12.5～23.0℃，被験物質保管場所(15),(41)）

7.1.9 安定性の確認

被験物質の入手先より安定性を保証する資料を入手し，投与中の被験物質が安定であることを確認した（添付資料 11.2）．

7.1.10 取扱上の注意

保護具（ゴム手袋，マスク，眼鏡）着用

7.2 試験動物

7.2.1 動物種

ラット

7.2.2 系統

Crj:CD(SD)IGS

7.2.3 系統選択理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用され，背景データが豊富であり，多数の個体の入手が可能である．

7.2.4　微生物レベル
SPF 動物

7.2.5　購入先
日本チャールス・リバー株式会社（厚木生産所）

7.2.6　購入動物数
入荷 1 回あたり雌 10 匹，合計で雌 20 匹とした（入荷日；第 1 回 2004 年 1 月 28 日，第 2 回 2004 年 2 月 4 日）．

7.2.7　性別選択理由
OECD テストガイドライン No.423 に基づき，雌を選択した．

7.2.8　検疫・馴化
検疫として一般状態を 5 日間 1 日 1 回観察し，健康状態が良好であることを確認した．また，動物入荷時および検疫終了時に体重を測定し，体重増加が認められることを確認した．検疫終了後も投与日まで 1 日 1 回一般状態を観察し，馴化を継続した．この結果，第 1 回入荷動物で馴化中の体重増加がみられない動物が 1 例，第 2 回入荷動物で眼瞼の異常が 1 例に認められた．

7.2.9　投与時週齢
8 週齢

7.2.10 投与時体重
動物の体重範囲は平均体重±20%以内であることを確認した．
雌；182～203 g

7.2.11 動物選抜
各投与前日に，動物は無作為に抽出・選抜した．ただし，検疫・馴化期間中にみられた 2 例の異常動物は動物選抜前に除外した．

7.2.12 動物の識別
油性ペンで尾にマーキングを行い，個体識別した．ケージには検疫・馴化期間（動物選抜前）は試験番号，ケージ番号，検疫・馴化期間中の動物番号，動物種，系統および性別を記載したラベルを，動物選抜以降は試験番号，群名（用量），性別，動物種，系統および動物番号を記載したラベルをそれぞれ付けた．

7.2.13 余剰動物の措置
余剰動物は投与日以降に麻酔下で腹大動脈を切断・放血し安楽死処分した．

7.3 動物飼育

7.3.1　飼育室
ラット・マウス飼育室（検疫期間：4125 室，検疫終了後：2124 室）

7.3.2 飼育環境

(1) 温度

19.9～22.8℃（許容範囲 19.0～25.0℃）

(2) 相対湿度

43.1～69.3%（許容範囲 35.0～75.0%）

(3) 換気

6～20 回/時，オールフレッシュエアー供給

(4) 照明時間

12 時間/日（7:00～19:00）

7.3.3 飼育器材

(1) ケージ

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200H mm，トキワ科学器械㈱）を使用し，動物選抜時および第 8 日に交換した．第二回投与動物のケージは検疫終了日にも交換した．

(2) 給餌器

オートクレーブ滅菌したステンレス製固型飼料用給餌器（トキワ科学器械㈱）を使用し，ケージ交換時に交換した．

(3) 給水瓶

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶（700 mL，トキワ科学器械㈱）を使用し，ケージ交換時に交換した．

(4) 架台

ベンザルコニウム系特殊洗浄剤（マイクロカット，エコラボ㈱）の希釈液で消毒したスチール製架台（トキワ科学器械㈱）を使用した．

7.3.4 床敷

(1) 種類

オートクレーブ滅菌した実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー㈱）を使用し，ケージ交換時に交換した．

(2) 汚染物質の確認

残留農薬等の汚染物質の分析結果を供給者から定期的に入手し，当研究所の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した．

7.3.5 飼料

(1) 種類

実験動物用固型飼料（MF，オリエンタル酵母工業㈱）

(2) 給餌法

自由摂取とし，給餌器交換時に交換した．なお，投与前日の夕方（投与の約 18 時間前）から投与後 3 時間までは絶食させた．

(3) 汚染物質の確認
財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を供給者から入手し，使用したロット（ロット番号： 031106, 031202）の残留農薬等の汚染物質濃度が，当研究所の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した.

7.3.6 飲用水
(1) 種類
5 μm フィルター濾過後，紫外線照射した水道水
(2) 給水法
自由摂取とし，給水瓶交換時に交換した.
(3) 分析
株式会社ダイヤ分析センターで水質検査を定期的に実施し，得られた分析値が当研究所の標準操作手順書の基準に適合することを確認した.

7.3.7 収容動物数
動物選抜前は 1 ケージ当たり 5 匹，動物選抜後は 3 匹とした.

7.4 投与液の調製

7.4.1 方法・頻度
有効成分の純度が 27.1%であることから，所定量の 3.7 倍（100/27.1=3.69≒3.7 倍）の被験物質を秤量した．投与液の調製は，媒体（日本薬局方注射用水，㈱大塚製薬工場 Lot No.3C72N）を加え，メスシリンダーでメスアップして溶解させた. 300 mg/kg（30 mg/mL）および 2000 mg/kg 群（200 mg/mL）の投与液は，第 1 回および第 2 回投与をまとめて調製した（2000 mg/kg 群は第 2 回投与は実施せず）．投与液は冷蔵・遮光・密栓条件下で保存し，7 日以内に使用した．被験物質保管場所（42），温度実測値 3.0～7.0℃.

7.4.2 安定性の確認
投与液の分析バリデーション試験（試験番号：B031700）において，投与液中の被験物質の冷蔵･遮光･密栓保存条件下で 8 日間の安定性が 2.5 および 200 mg/mL の濃度で HPLC 法により確認されている（添付資料 11.3）.

7.4.3 濃度の確認
調製した投与液を HPLC 法により分析し，各濃度の平均値が設定濃度±10%以内であることを確認した. 各投与液の対設定濃度は 30 mg/mL が 102.0%, 200 mg/mL が 100.0%であった（添付資料 11.4，11.5）.

7.5 投与液の分析方法

投与液の分析は，分析バリデーション（試験番号：B031700，表題：調製液中ア

ンヒトール 24B の分析バリデーション）の方法に従って実施した．分析法を以下に示した．

7.5.1 HPLC 操作条件

ポンプ： LC-6A，島津製作所
検出器： L-3300，日立製作所
カラム： CAPCELL PAK, UG120, 5 μm, 4.6 mm i.d. × 150 mm, SHISEIDO Co., Ltd.
移動相： methanol/water (85:15, v/v) containing 0.1 mol/L $NaClO_4$ pH 3.5 (by H_3PO_4)
流速： 1.0 mL/min
注入量： 20 μL

7.5.2 標準溶液の調製

下表に従い標準溶液を調製した．

溶液略号	調製方法	濃度 (mg/mL)
SS-1	被験物質，2.31 g → 25 mL/ メタノール	25.0*
ST-1	SS-1，1 mL → 20 mL/ メタノール	1.25
ST-2	SS-1，2 mL → 20 mL/ メタノール	2.50
ST-3	SS-1，4 mL → 20 mL/ メタノール	5.01

* 純度（27.1%）換算値

7.5.3 試料溶液の調製

投与液の一部を分取し，メタノールを加えて希釈した．被験物質として 2 あるいは 3 mg/mL の溶液を調製して試料溶液とした．

7.5.4 HPLC 測定

標準溶液および試料溶液を条件設定した HPLC に注入して，クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を測定（保持時間約 4～15 分に溶出する 3 成分の合計）した．測定した標準溶液の濃度およびそのピーク面積から検量線の一次式を求めた．検量線の一次式および試料溶液測定から得られた被験物質のピーク面積から試料溶液中の濃度を求め，試料溶液の希釈倍率から投与液中の濃度を算出した．

7.6 投与

7.6.1 経路・方法

経口（強制経口投与）．投与前日の夕方から約 18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを装着したディスポーザブルシリンジを用いて投与した．投与後約 3 時間は飼料を与えなかった．

7.6.2　回数

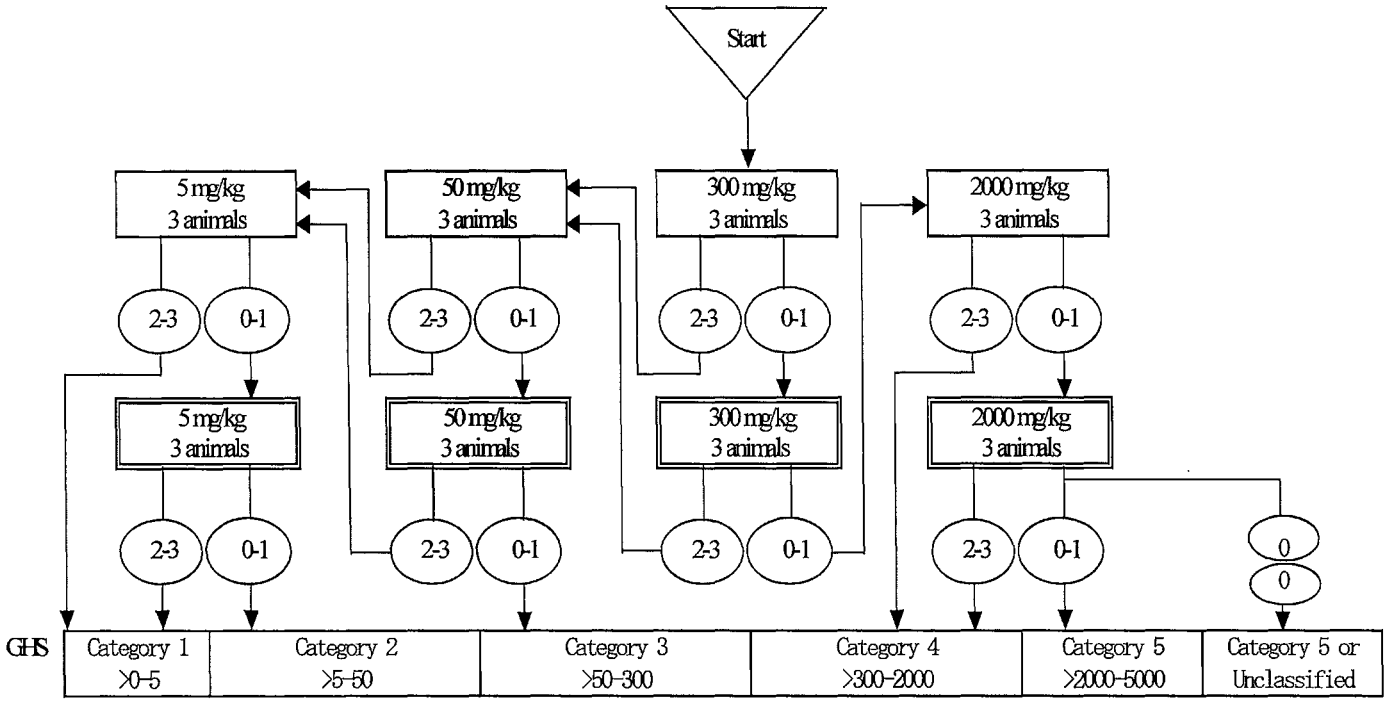
各動物あたり 1 回

7.6.3　投与液量

10 mL/kg とし，投与直前に測定した体重に基づいて算出した．

7.7 使用動物数と用量

各投与段階につき雌 3 匹を使用した．被験物質製造者（花王株式会社）の MSDS（Material Safety Data Sheet）では 29.1%水溶液でラット LD_{50} が 3.6 mL/kg [3]，RTECS (Registry of Toxic Effects of Chemical Substances) ではラット LD_{50} が 71 mg/kg [2]との報告がある．よって，試験の開始投与用量は 300 mg/kg とし，下記のフローチャートに従って試験を行った．



※楕円の中の数字は死亡動物数を示す（死亡動物数には瀕死のため屠殺した動物を含む）．

GHS：Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w.)

第一回および第二回投与の 300 mg/kg ではいずれも死亡は認められなかった．このため，第三回投与として 2000 mg/kg を投与した結果，第 2 日までに全例が死亡した．2000 mg/kg で全例が死亡したため，フローチャートに従い第四回投与は実施しなかった．

7.8 群構成

投与群の構成を以下に示す.

用量	動物数 (匹)	動物番号
第一回投与群 300 mg/kg	雌 3	50101-50103
第二回投与群 300 mg/kg	雌 3	60101-60103
第三回投与群 2000 mg/kg	雌 3	70101-70103

7.9 観察・測定項目

以下に示す項目を観察・測定した. なお, 日の表記は投与日を第 1 日とした.

7.9.1 一般状態の観察

各動物の生死, 一般状態を投与日には投与前, 投与後 10 分, 30 分, 1, 3, 6 時間の 6 回, その後は 1 日 1 回, 14 日間にわたって観察した.

7.9.2 体重測定

全生存動物について投与直前, 第 4, 8 および 15 日に測定した. なお, 死亡例は死亡発見時にも測定した. 各測定日間の増加量を算出した.

7.9.3 病理学検査

死亡例および第 15 日まで生存した動物の全例について剖検した. 第 15 日まで生存した動物は, チオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺製薬㈱) の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し, 安楽死させた後剖検した. 死亡動物は発見後速やかに剖検した. なお, 肉眼的異常部位 (胃, 小腸) を 10v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した.

7.10 コンピュータシステムの使用

一般状態および体重データの収集, 投与液量の算出には安全性試験システム (MiTOX, 三井造船システム技研㈱) を使用した. 当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲, データ収集の日程等を登録した. コンピューターシステムのプロトコール番号は第一回投与用に B031635A, 第二回に B031635B, 第三回に B031635C を用いた. 第四回投与用の B031635D は投与を行わなかった

ため，検疫・馴化期間の体重測定のみに用いた．

8. 結果および結論

8.1 一般状態（Table 1, Appendices 1 - 3）

300 mg/kg 投与群では異常は認められなかった．
2000 mg/kg 投与群では，投与後 30 分から症状の発現がみられ，自発運動低下，不整呼吸および軟便が投与後 6 時間までに全例で認められた．さらに，下腹部の汚れが投与後 3 時間で 1 例にみられ，本動物は投与後 6 時間に死亡した．他の 2 例も投与翌日（第 2 日）に死亡が発見された．

8.2 体重および体重増加量（Tables 2 and 3, Appendices 4 - 8）

300 mg/kg 投与群の体重は順調に増加した．

8.3 剖検（Table 4, Appendices 9 - 11）

300 mg/kg 投与群では異常は認められなかった．
2000 mg/kg 投与群では，胃および小腸の膨満が 2 例，腺胃粘膜の赤色化，小腸の異常内容物，胸腔内の出血，赤色透明な腹水の貯留がそれぞれ 1 例に認められた．

8.4 結論

N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンを 300 または 2000 mg/kg の用量で雌ラットに単回経口投与した．

その結果，2000 mg/kg 投与群で第 2 日までに全例が死亡した．死亡までの一般状態の変化として，自発運動低下，不整呼吸，軟便，下腹部の汚れがみられ，剖検では胃および小腸全域に消化管障害を示唆する変化が認められた．被験物質はカルボキシベタイン型の両性界面活性剤であることから[1]，その作用により消化管障害が発現し，死亡したものと考えられる．なお，被験物質による神経障害と考えられる症状は認められなかった．300 mg/kg 投与群では一般状態，体重および剖検とも変化は認められなかった．

以上，本試験条件下における N,N-ジメチル-N-ドデシルグリシンの概略の半数致死量は，300 mg/kg 以上，2000 mg/kg 未満，GHS は Category 4（>300-2000 mg/kg b.w.）に分類された．

9. 参考文献

[1] 13901 の化学商品，化学工業日報社，東京，2001. pp.1262-1264.

[2] RTECS（Registry of Toxic Effects of Chemical Substances）, CAS No. 683-10-3.

[3] 製品安全データシート，“アンヒトール 24B”，花王株式会社，2003.

B031635

群別表および個体別表

目次

Table 1　一般状態 1
Table 2　体重 2
Table 3　体重増加量 3
Table 4　剖検所見 4

Study No. B031635

Table 1 Clinical Sign - Summary Female

Test Substance Dose(mg/kg)	Findings	Day Time	1 10	20	30	40	50	60	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Amphitol 300 (First)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Amphitol 300 (Second)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No Abnormality		3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Amphitol 2000	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	2													
	No Abnormality		3	3	2	0	0	0	0													
	Death	+	0	0	0	0	0	1	2													
	Decrease in locomotor activity	1	0	0	1	2	3	2	0													
	Irregular respiration	+	0	0	0	3	1	2	0													
	Soiled perineal region	+	0	0	0	0	1	0	0													
	Loose stool	+	0	0	0	2	0	1	0													

+ , Present; 1 ,Slight; 2 ,Moderate; 3 ,Severe;
Time 10 , Before dosing; Time 20 , 10 min. after dosing; Time 30 , 30 min. after dosing; Time 40 , 1 hr. after dosing; Time 50 , 3 hr. after dosing;
Time 60 , 6 hr. after dosing;

Study No. B031635

Table 2 Body Weight - Summary Female Unit : g

Test Substance Dose(mg/kg)	Day	1	4	8	15
Amphitol 300 (First)	Mean	197.7	225.3	240.7	268.0
	S.D.	6.1	4.0	7.0	12.2
	n	3	3	3	3
Amphitol 300 (Second)	Mean	199.7	221.3	237.3	262.7
	S.D.	2.1	4.0	4.0	8.3
	n	3	3	3	3
Amphitol 2000	Mean	185.3			
	S.D.	3.1			
	n	3			

Study No. B031635

Table 3 Body Weight Gain - Summary Female Unit : g

Test Substance Dose(mg/kg)	Day	1−4	4−8	8−15
Amphitol 300(First)	Mean	27.7	15.3	27.3
	S.D.	2.1	3.2	7.0
	n	3	3	3
Amphitol 300(Second)	Mean	21.7	16.0	25.3
	S.D.	2.3	2.6	4.5
	n	3	3	3

Study No. B031635

Table 4 Necropsy Findings - Summary

Organ Findings	Sex :	Female	Female	Female
	Test Substance :	Amphitol	Amphitol	Amphitol
	Dose (mg/kg) :	300 (First)	300 (Second)	2000
	Number of Animals :	3	3	3
	Number of Animals Examined :	<3>	<3>	<3>
Stomach				
Distention		0	0	2
Reddish, glandular stomach		0	0	1
Small intestine				
Abnormal contents		0	0	1
Distention		0	0	2
Thoracic cavity				
Hemorrhage		0	0	1
Abdominal cavity				
Ascites, red		0	0	1