

最終報告書

表 題：トリリン酸、アルミニウム塩のラットにおける急性経口投与毒性試験

試験番号：SR00108

株式会社 化合物安全性研究所

目次

	頁
要約	3
緒言	4
材料および方法	4
成績	9
考察	9
参考文献	10
Figures	添付
1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
Tables	添付
1 Experimental design for acute oral toxicity test triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) in rats (SR00108)	
2 Mortality of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
3 General appearance of male rats in acute oral toxicity test triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
4 General appearance of female rats in acute oral toxicity test triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
5 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
6 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	
7 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)	

要 約

トリリン酸、アルミニウム塩の 0(対照群)および 2000 mg/kg を 1 群につき雌雄各 5 匹の Crj:CD(SD)IGS ラットに単回経口投与してその毒性を検討し、以下の成績を得た。

2000 mg/kg 投与群で死亡例はなく、一般状態、体重推移および剖検所見においても変化は認められなかった。

以上のことから、トリリン酸、アルミニウム塩の本試験条件下での LD₅₀ 値は雌雄とも 2000 mg/kg 以上と推定された。

緒言

OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、トリリン酸、アルミニウム塩を雌雄ラットに単回経口投与して、その毒性を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は、トリリン酸、アルミニウム塩[triposphoric acid, aluminium salt (1:1)、別名：K-Fresh 100P、CAS No. : 13939-25-8、ロット番号： 純度：94.7%(P_2O_5 として63.4%の換算値)、提供者：]で、分子式 $AlH_2P_3O_{10} \cdot 2H_2O$ 、分子量 317.94、融点約 1200°C、比重 2.3、水に難溶の白色粉末である。トリリン酸、アルミニウム塩は安定で反応しないが、気密容器に入れ、冷所(実測範囲 3~6°C)に保存した。被験物質サンプルとして、上記ロットについて約 1 g を採取し、試験施設の検体保存室に保存した。試験期間中の被験物質の安定性については、残余被験物質を用いて提供者である が純度の分析を行い確認した(Appendix 1-1~2)。

2. 対照物質

カルメロースナトリウム(日本薬局方カルメロースナトリウム、ロット番号 9318、丸石製薬株式会社)を精秤し、精製水(日本薬局方精製水、ロット番号 12D1、ヤクハン製薬株式会社)に溶解し調製した0.5%カルメロースナトリウム水溶液(以下0.5%CMCと略す)を対照物質として投与および投与液の調製に使用した。

0.5%CMC は遮光気密容器に入れ、冷暗所(実測範囲 2~7°C)に保存し、調製後 1 週間以内に使用した。

3. 投与液の調製および化学分析

(1) 投与液の調製

投与の前日に投与量ごとにトリリン酸、アルミニウム塩を精秤し、乳鉢で細砕後、所定の濃度となるように対照物質を用いて懸濁し、スターラーを用いて分散させた。調製の際にはマスクおよび手袋を着用し、作業をクリーンベンチ内で行った。調製液は調製後速やかに遮光気密容器に入れ冷暗所(実測範囲 2~7°C)に保存し、室温に戻してから投与に用いた。残余調製液は焼却処分とした。

(2) 投与液の化学分析

投与に先立って 200 mg/mL の濃度の調製液中のトリリン酸、アルミニウム塩の均一性および室温保存 24 時間の安定性について(3)濃度分析方法にしたがって分析した。その結果、トリリン酸、アルミニウム塩は 200 mg/mL 調製液について調製液中で均一、かつ室温保存 24 時間で安定であることが確認された(Appendix 3-1 および 3-2)。

投与に用いる 200 mg/mL の調製液についてトリリン酸、アルミニウム塩の濃度を分析した結果、含有率は所定の濃度の 101.7% であり、判定基準内(85~115%)の数値であった(Appendix 3-3)。

なお、200 mg/mL 調製液の冷暗所保存 7 日の安定性についても確認され(Appendix 3-2)、また、1 mg/mL 調製液中のトリリン酸、アルミニウム塩の均一性および安定性についても分析を実施し、調製液中で均一、かつ室温保存 24 時間および冷暗所保存 7 日間で安定であることが確認された(Appendix 3-4 および 3-5)。

(3)濃度分析方法

りん標準液(P:1000 mg/L、水質試験用、和光純薬工業株式会社)を蒸留水(和光純薬工業株式会社)で希釈し、発色試薬を加えて標準溶液を調製し、紫外可視分光光度計(UV-160A、株式会社 島津製作所)で吸光度(波長 405 nm)を測定した。

被験物質調製液の一定量を正確に採取し、35%水酸化ナトリウム溶液、蒸留水、さらに硝酸(1/2)溶液を加えて分解液とした。この分解液を 3500 回転/分で遠心分離後、上清を採取し、さらに蒸留水、硝酸(1+1)溶液、発色試薬を加え吸光度を測定した。

また、蒸留水に硝酸(1+1)溶液を加えて空試験液とし、この空試験液の吸光度を測定した。

安定性および濃度確認試験では、被験物質調製液の中層から 3 回採取し、各 1 回調製後、吸光度を測定した。均一性試験では、被験物質調製液の上層および下層から各 3 回採取し、各 1 回調製後、吸光度を測定した。

標準液および試料溶液の吸光度から、試料溶液中の $\text{AlH}_2\text{P}_3\text{O}_{10}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 濃度および被験物質調製液の濃度を求め、含有率、残存率および変動係数を算出した。なお、含有率は 85~115%、残存率は 90% 以上、変動係数は 5% 以内を合格とした。

$$\begin{aligned} \text{試料溶液中の } \text{AlH}_2\text{P}_3\text{O}_{10}\cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ 濃度 (mg/mL)} &= (\text{試料溶液の吸光度} - \text{BL}^{*1}) / \\ &(\text{標準液の平均吸光度} - \text{BL}) \times \\ &\text{標準液濃度 (0.01 mg/mL)} \times \text{換算係数}^{*2} \end{aligned}$$

*1 BL : 空試験液の平均吸光度

*2 換算係数 (P → $\text{AlH}_2\text{P}_3\text{O}_{10}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

$$317.95 / (30.97 \times 3) = 3.422$$

$$\text{被験物質調製液の濃度 (mg/mL)} = \text{試料溶液中の } \text{AlH}_2\text{P}_3\text{O}_{10}\cdot 2\text{H}_2\text{O} \text{ 濃度} \times \text{希釈係数}^{*3}$$

*3 希釈係数

$$\text{試料溶液の総液量 (mL)} \times \text{分解液の総液量 (mL)} / \text{分解液採取量 (mL)} / \text{被験物質調}$$

製液採取量(mL)

含有率(%) = (被験物質調製液濃度平均値)/(被験物質調製液表示濃度) × 100

残存率(%) = (保存後の被験物質調製液濃度平均値) /
(調製日の被験物質調製液濃度平均値) × 100

変動係数(%) = (被験物質調製液濃度標準偏差) / (被験物質調製液濃度平均値) × 100

以上の分析は、株式会社 化合物安全性研究所において行った。

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社厚木飼育センター生産の SPF Crj:CD(SD)IGS ラットを用いた。ラットはこの種の試験で通常用いられている動物種であり、当研究所での使用経験が豊富であることからこの系統を選定した。

雌雄各 13 匹を 2001 年 6 月 20 日に 4 週齢で購入した。受入時の動物の体重範囲は、雄で 81 ~ 92 g、雌で 72 ~ 80 g であった。

(2) 検疫および馴化

受入後、個々の動物について 7 日間一般状態を 1 日 1 回観察した。さらに、期間中に体重測定を 2 回行った。検疫および馴化期間中、動物に異常はみられなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間終了後、健康な動物を雌雄各 10 匹を選抜して、5 週齢で試験に供した。検疫および馴化期間終了日(投与前日)の体重に基づいて層化無作為抽出法により各群の平均体重が均一になるように群分けを行った。これらの動物の体重範囲は、雄で 142 ~ 156 g、雌で 115 ~ 128 g であり、平均体重(雄 147.5 g、雌 121.9 g)の ±20% 以内であった。選抜から外れた動物は試験から除外した。

(4) 動物およびケージの識別

動物は、油性フェルトペンで尾部に印を付け、個体識別を行った。飼育ケージは、群分け前は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。群分け後は性別毎に色分けしたラベルに、試験番号、試験群および動物番号を明記し、各ケージの前面に標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 22 ± 3°C(実測範囲 22 ~ 27°C)、湿度 50 ± 20%(実測範囲 50 ~ 64%)、換気回数 10 ~ 15 回/時間、照明時間 12 時間(午前 8 時点灯、午後 8 時消灯の人工照明)の動物飼育室(304 号室)で飼育した。動物飼育室の温度および湿度を毎日監視した。

2) 飼育器材および飼育方法

雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ(260W × 380D × 180H, mm)に、検疫および馴化

期間中は1あるいは3匹、群分け後は1匹収容した。ケージおよび給餌器は群分け時に1回、受皿は週2回洗浄滅菌済みのものと交換した。自動給水装置の水抜きは週1回実施した。動物飼育室内の清掃および清拭消毒は、1日1回の頻度で実施した。清拭消毒に際しては、塩素系消毒薬およびヨウ素系消毒薬を1週間単位で交互に使用した。

3) 飼料

オリエンタル酵母工業株式会社製γ線照射固型飼料、CRF-1を金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質あるいは微生物の有無を、使用したロット(010406)の飼料について分析した。汚染物質の分析は財団法人日本食品分析センターにおいて、微生物検査は飼料製造業者がそれぞれ行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 4-1 および 4-2)。

4) 飲料水

札幌市水道水を、自動給水装置を用いて自由に摂取させた。

試験に悪影響を及ぼす恐れのある汚染物質の有無を、2001年4月20日に試料を採取して分析した。分析は日本衛生株式会社において行った。分析項目と許容値は(株)化合物安全性研究所の標準操作手順書に準拠した。分析の結果、いずれの項目にも許容値を超える値は認められなかった(Appendix 5)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を Table 1 に示す。

雌雄ともトリリン酸、アルミニウム塩の 2000 mg/kg 投与群および 0.5%CMC のみを投与する対照群の計 2 群を設定した。

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

致死量の概要を検索するために、1群につき雌雄各3匹のSD系ラット[Crj:CD(SD)IGS]に0.5%CMCに懸濁したトリリン酸、アルミニウム塩の2000 mg/kgを、10 mL/kgの投与容量で単回経口投与した予備試験¹⁾の結果、2000 mg/kg投与群において死亡は認められず、50%致死量は2000 mg/kg以上と考えられた。このことから、本試験では限界試験を行うこととし、2000 mg/kg投与群と対照として0.5%CMCを投与する群の計2群を設定した。

2) 投与

トリリン酸、アルミニウム塩がヒトに経口的に暴露される可能性を考慮し、OECD試験法ガイドライン(401)に従って、一晩(18~19時間)の絶食後、午前11時から12時の間に胃ゾンデを用いて1回強制的に胃内に経口投与した。投与後約4時間を経過した時点で給餌を再開した。

投与容量は10 mL/kgとし、各個体の投与液量は投与日の体重に基づいて算出した。

(8) 観察、測定および検査項目

1) 一般状態観察

全例について動物の生死、外観、行動等を、投与日(0日)の投与直後から投与後1時間までは連続して観察し、以降は投与後2、4および6時間に観察した。投与後1日から投与後14日の剖検日までは、1日1回観察した。

2) 体重測定

全例について動物の体重を、0(投与日の投与前)、投与後1、3、5、7、10および14日(剖検日)に、電子式上皿天秤(ザルトリウス 1407 MP8-1 および LA4200、カールツァイス株式会社およびザルトリウス株式会社)を用いて測定し、1gまで記録した。

体重増加量および体重増加率を以下の計算式により算出した。

$$\text{体重増加量} = (\text{投与後14日体重}) - (0\text{日体重})$$

$$\text{体重増加率} = [(\text{体重増加量}) / (0\text{日体重})] \times 100$$

3) 剖検

全例について投与後14日の剖検日に体外表を観察後、エーテル麻酔下で腹部大動脈からの放血により安楽死させ、いずれも全身の器官・組織を肉眼的に観察した。以下の器官・組織を10%中性緩衝ホルマリン液で固定・保存した。なお、精巣および精巣上体の固定にはブアン液を、保存には70%エタノールを使用した。

脳(大脳および小脳)、肝臓、腎臓(左右)、脾臓、心臓、肺(気管支含む)、胃(前胃および腺胃)、十二指腸、空腸、回腸(パイエル板を含む)、盲腸、結腸、直腸、精巣(左右)、精巣上体(左右)、卵巣(左右)。

4) 病理組織学的検査

病理組織学的検査は実施しなかった。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および体重増加率について、Bartlettの検定法によって等分散性を解析した。等分散の場合は一元配置分散分析法で解析し、不等分散の場合はKruskal-Wallisの検定法で解析した。一元配置分散分析の結果、有意差がみられた場合は、Dunnettの検定法を用いて対照群との比較を行った。Kruskal-Wallis法の解析の結果、有意差がみられた場合は、Mann-WhitneyのU-検定法を用いて対照群との比較を行った。対照群との比較検定については、群平均および標準偏差を用い、危険率5%以下を統計学的に有意とした。

成 績

1. 死亡状況

死亡状況およびLD₅₀値をTable 2に示す。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに死亡例は認められなかった。

2. 一般状態

一般状態の成績をTable 3および4、INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-2-2に示す。

2000 mg/kg 投与群および対照群の雌雄ともに変化は認められなかった。

3. 体重

体重推移をFigure 1および2、Table 5および6、INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-2-2に示す。

2000 mg/kg 投与群の雌雄ともに対照群と比較して有意差はなく、投与後14日間の体重増加量および体重増加率にも有意差は認められなかった。

4. 剖検

剖検所見をTable 7、INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-2-2に示す。

2000 mg/kg 投与群の雄1例(No. 201)の肝臓に多巣性の黄白色斑が認められた以外には、対照群も含め雌雄ともに変化は認められなかった。

考 察

OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、トリリン酸、アルミニウム塩を1群雌雄各5匹のCrj:CD(SD)IGSラットにそれぞれ0(対照群)および2000 mg/kgの投与量で単回経口投与して、その毒性を検討した。

2000 mg/kg 投与群に死亡例はなく、一般状態および体重推移に変化は認められなかった。剖検で2000 mg/kg 投与群の雄1例の肝臓に多巣性の黄白色斑が認められたのみであり、予備試験¹⁾においても認められていないことから、被験物質投与との関連性はないと考えられた。

以上のことから、トリリン酸、アルミニウム塩の本試験条件下でのLD₅₀値は雌雄とも2000 mg/kg以上と推定された。

参考文献

- 1) トリリン酸、アルミニウム塩のラットにおける単回経口投与毒性試験(予備試験)
(SR00108P) : 最終報告書、株式会社 化合物安全性研究所(2001)

Figures

Figure 1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Figure 2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Tables

Table 1 Experimental design for acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) in rats (SR00108)

Table 2 Mortality of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 3 General appearance of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 4 General appearance of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 5 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 6 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 7 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

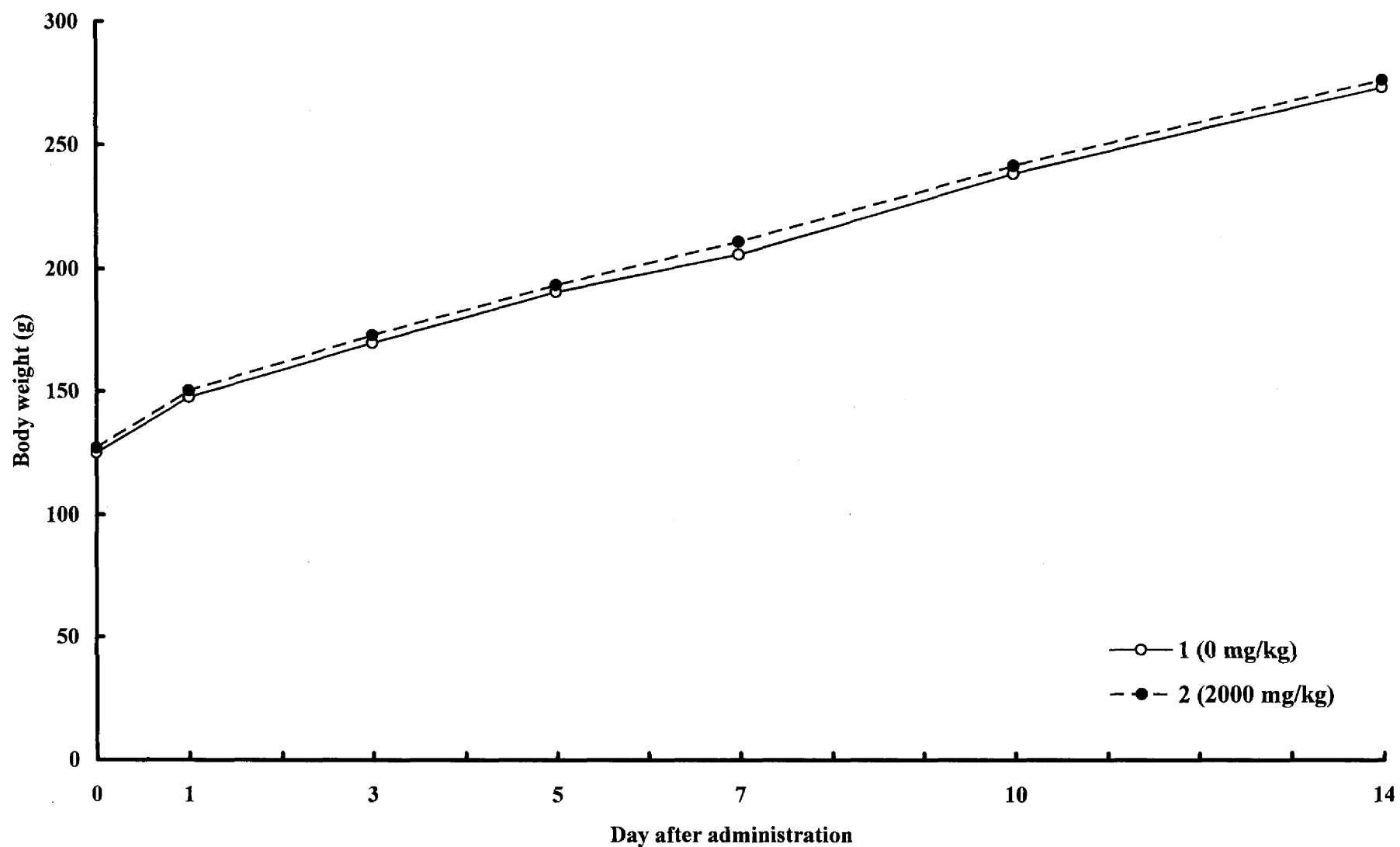


Figure 1 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

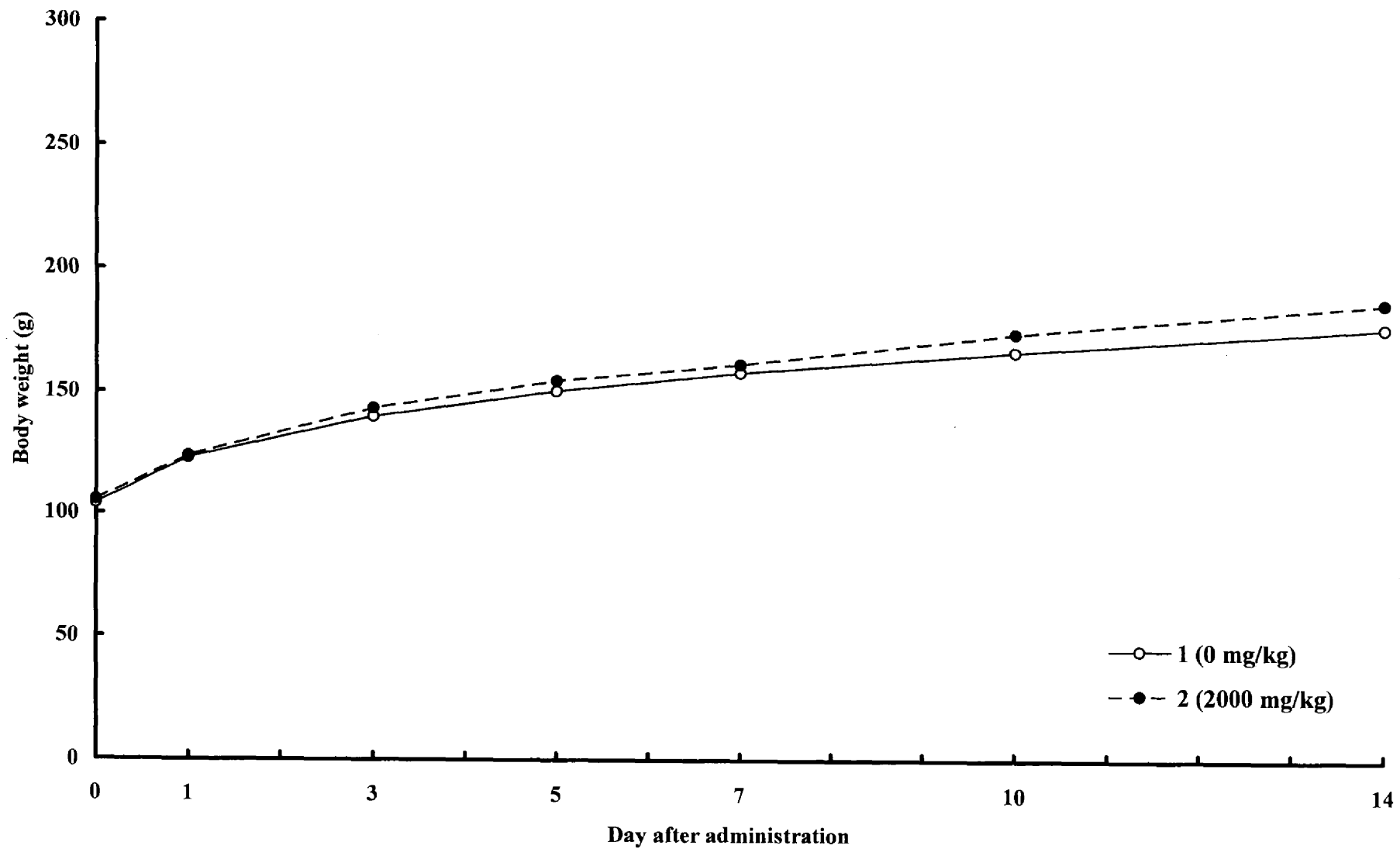


Figure 2 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Table 1 Experimental design for acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) in rats (SR00108)

Group	Dose	Concentration ^a	Administration volume	Number of animals ^b (Animal No.)	
	(mg/kg)	(mg/mL)	(mL/kg)	Male	Female
1	0	0	10	5 (101~105)	5 (151~155)
2	2000	200	10	5 (201~205)	5 (251~255)

a : triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) were suspended in 0.5% carmellose sodium.

b : Crj: CD(SD)IGS rats were dosed orally at the age of 5 weeks.

Table 2 Mortality of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Sex	Group; Dose	Number of dead animals					Mortality ^a	LD ₅₀ (mg/kg)
		Day of the administration	1 day after the administration	2 days after the administration	3 days after the administration	4-14 days after the administration		
Male	1 (0 mg/kg)	0	0	0	0	0	0 / 5	2000 <
	2 (2000 mg/kg)	0	0	0	0	0	0 / 5	
Female	1 (0 mg/kg)	0	0	0	0	0	0 / 5	2000 <
	2 (2000 mg/kg)	0	0	0	0	0	0 / 5	

a: Number of dead animals / number of animals dosed.

Table 3 General appearance of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Group	Day of the administration						Days after the administration 1 - 14
	Pre-administration	30 minutes after the administration	Hours after the administration				
			1	2	4	6	
1 (0 mg/kg)							
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5	5	5	5	5
2 (2000 mg/kg)							
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5	5	5	5	5

Table 4 General appearance of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Group	Day of the administration						Days after the administration 1 - 14
	Pre-administration	30 minutes after the administration	Hours after the administration				
			1	2	4	6	
1 (0 mg/kg)							
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5	5	5	5	5
2 (2000 mg/kg)							
Number of animals examined	5	5	5	5	5	5	5
No abnormal findings	5	5	5	5	5	5	5

Table 5 Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Group	Number of animals		Body weight (g) on day after administration							Body weight gain	
			0	1	3	5	7	10	14	g	%
1 (0 mg/kg)	5	Mean	125.0	147.6	169.8	190.8	206.0	238.4	272.8	147.8	118.128
		S.D.	2.8	4.0	4.5	7.9	11.3	13.8	21.3	19.5	14.467
2 (2000 mg/kg)	5	Mean	127.0	150.4	173.0	193.6	211.2	241.6	275.8	148.8	117.176
		S.D.	3.1	4.4	6.2	7.6	9.3	16.0	19.4	18.7	14.618

Table 6 Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Group	Number of animals		Body weight (g) on day after administration							Body weight gain	
			0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	
										g	%
1 (0 mg/kg)	5	Mean	104.0	122.6	139.8	150.4	158.0	166.6	176.4	72.4	69.250
		S.D.	4.7	7.2	9.1	10.8	12.8	17.7	19.2	14.8	11.545
2 (2000 mg/kg)	5	Mean	105.4	123.4	143.2	154.6	161.4	174.0	186.2	80.8	76.562
		S.D.	3.5	2.8	5.4	5.0	8.3	11.4	14.1	11.9	10.385

Table 7 Gross findings of rats in acute oral toxicity test of triphosphoric acid, aluminium salt (1:1) (SR00108)

Item	Sex Group Dose (mg/kg)	Male		Female	
		1	2	1	2
		0	2000	0	2000
Number of animals examined ^a		5	5	5	5
No abnormal findings		5	4	5	5
Liver : Yellowish white patch		0	1	0	0

a : All animals were survived for 14 days after the administration.