

最終報告書

表 題：Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate のラットに
おける急性経口投与毒性試験

試 験 番 号：SR05356

株式会社 化合物安全性研究所

目次

	頁
表紙 -----	1
目次 -----	5
要約 -----	9
緒言 -----	10
材料および方法 -----	10
成績および考察 -----	17
参考資料 -----	18

Figure

1	Body weight changes of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356) -----	19
---	--	----

Tables

1	Mortality of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356) -----	20
2	General appearance of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356) -----	21
3	Body weight changes of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356) -----	22
4	Gross findings of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356) -----	23

要 約

Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate(媒体:0.5%CMC-Na)の300 mg/kg(第1、2群)および2000 mg/kg(第3、4群)を1群につき各3匹のCr1:CD(SD)系雌ラットに毒性等級法(OECD 試験法ガイドライン 423)により単回経口投与して、死亡の有無ならびに急性毒性の概要を検討し、以下の成績を得た。

1. 死亡率は、300 および 2000 mg/kg のいずれも 0/6 であった。
2. 一般状態では、300 mg/kg の投与後 14 日間に毒性徴候の発現は認められなかった。
2000 mg/kg の投与後 4 時間に 2 例、投与後 6 時間に 1 例に粘液便がみられたが、投与後 1 日には回復し、以降は投与後 14 日まで異常は認められなかった。
3. 300 あるいは 2000 mg/kg を投与した各投与群ともに順調な体重増加がみられ、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。
4. 剖検所見では、300 あるいは 2000 mg/kg を投与した各投与群とも全例に異常所見は認められなかった。

以上のように、Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate の 2000 mg/kg の投与により、粘液便がみられたが、300 mg/kg の投与では異常は認められなかった。300 および 2000 mg/kg の投与後に死亡例はみられず、また、剖検所見にも異常は認められなかった。

したがって、Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate は OECD 試験法ガイドライン(423)の ANNEX 2c より GHS(Globally Harmonized Classification System)の Category 5 あるいは Unclassified と結論された。

緒言

Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate(媒体:0.5%CMC-Na)の300 mg/kg(第1、2群)および2000 mg/kg(第3、4群)を1群につき各3匹のCr1:CD(SD)系雌ラットに毒性等級法(OECD試験法ガイドライン 423)により単回経口投与して、死亡の有無ならびに急性毒性の概要を検討した。

材料および方法

1. 被験物質

被験物質は 500 g 提供された純度 100.0%の Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate、 使用した(Appendix 1-1)。

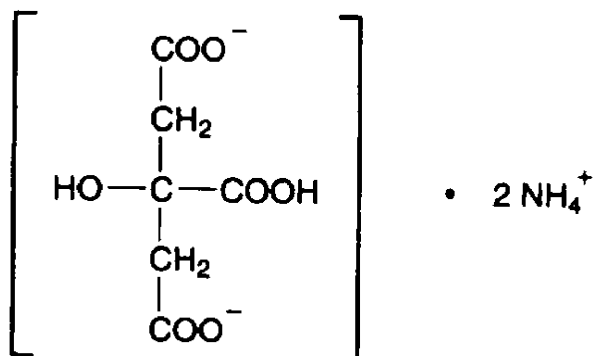
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate を受入後は、容器を密栓して冷蔵庫内(実測範囲 2~7°C : 受入から実験終了日まで)に保存し、取扱い時には手袋およびマスクを着用し、クリーンベンチ内で取り扱った。

試験操作終了後は、被験物質の純度に関する再分析の成績を入手し、被験物質の保存安定性を確認した(Appendix 1-2)。

Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate の被験物質に関する情報を以下に示す。

名称	: Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate
略名	: クエン酸水素二アンモニウム
別名	: Diammonium Hydrogen citrate ; クエン酸水素二アンモニウム Ammonium citrate, dibasic ¹⁾ 、Diammonium citrate ¹⁾ Citric acid diammonium salt ¹⁾
CAS No.	: 3012-65-5
化審法官報公示整理番号	: (2)-1318、(1)-391 ³⁾

示性式 : $(\text{NH}_4)_2\text{HC}_6\text{H}_5\text{O}_7^{2)}$



分子式 : $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7^{1)}$

分子量 : 226.19³⁾

物理化学的性質 : 外観 ; 無色の結晶又は結晶性粉末 (Appendix 1-1)。Granules or crystals¹⁾。無色・無臭・結晶または結晶性粉末²⁾。無色透明の結晶、塊または白色の結晶性粉末³⁾。

融点 ; なし³⁾

沸点 ; なし³⁾

比重 ; 1.48^{1~3)}。嵩比重 ; 0.8154³⁾。

pH ; 4.9 (50 g/L, 25°C, Appendix 1-1)。4.3 (0.1M 水溶液)¹⁾。4.6~5.2 (50 g/L, 25°C)²⁾。4.6~5.2 (5% aq at 25°C)³⁾

溶解性 ; 溶解度 ; 水 50%³⁾、エタノール 微溶³⁾、エーテル 不溶³⁾。水に約 1% 溶解¹⁾、アルコールに微溶¹⁾、水 50%²⁾、エタノールに難溶²⁾

安定性 : 常温で徐々にアンモニアを放出する²⁾。酸化剤と接触すると反応することがある²⁾。

取扱上の注意 : 酸と反応する¹⁾。

2. 媒体

「溶解度；水 50%³⁾」および「比重；1.48¹⁾」との情報から、0.5(w/v)%カルメロースナトリウム水溶液(0.5%CMC-Na)を媒体とし、投与液の調製に使用した。0.5%CMC-Naは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 5610、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 5XA1、ヤクハン製薬株式会社)で0.5(w/v)%となるように溶解させることで調製した。

調製年月日	濃度(mg/mL)	被験物質秤量値(g)	調製量(mL)
2006年10月24日	0.5	0.5001	100
2006年10月27日	0.5	0.5001	100
2006年10月31日	0.5	0.5000	100
2006年11月3日	0.5	0.5001	100

3. 投与液の調製

被験物質を精秤し、所定の濃度となるように媒体にスターラーを用いて混和(溶解)し、均一であることを目視により確認後、投与液とした。調製は以下のように、投与毎に用時調製を4回行った。調製後は遮光気密容器に入れ、投与に用いた。残余の投与液は、焼却処分するために、産業廃棄物として回収した。

調製年月日	濃度(mg/mL)	被験物質秤量値(g)	調製量(mL)
2006年10月24日	30	0.3002	10
2006年10月27日	30	0.3001	10
2006年10月31日	200	2.0021	10
2006年11月3日	200	2.0001	10

4. 試験方法

(1) 試験系

試験には、日本チャールス・リバー株式会社生産の SPF Cr1:CD(SD)系雌ラットを用いた。ラットは急性毒性試験等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。

2006年10月18日に第1、2群用として8週齢、第3、4群用として7週齢の雌ラットを各8匹同時に購入した。受入時の動物の体重範囲は、7週齢 141～175 g、8週齢 168～192 gであり、微生物学的モニタリングでも問題がないことを確認した。

(2) 検疫および馴化

受入から群分けまでの期間を検疫および馴化期間とし、個々の動物について一般状態の観察を1日1回、体重測定を受入時および群分け時を含む、週1または2回行った。

受入日を馴化1日と起算して、第1群の動物は馴化6日に、第2群の動物は馴化9日に、第3群の動物は馴化13日に、第4群の動物は馴化16日に検疫および馴化期間を終了とした。検疫および馴化期間中に、異常例は認められなかった。

(3) 群分け

検疫および馴化期間中に実施した一般状態観察および体重測定の結果を参考にして、動物の使用の適否を決定した。検疫および馴化期間終了日の体重に基づいて、各群の平均体重が均一になるように1群あたり3匹、計12匹をそれぞれの投与前日に選抜した。これらの動物の体重範囲は、207～224 gであり、最終的な全使用動物の平均体重(212.8 g)の±20%以内であった。選抜から外れた第1、2群用および第3、4群用の雌ラット各2匹は試験から除外して、安楽死させた。

なお、投与時の体重範囲は180～208 g、平均値は189.2 gであった。

(4) 動物およびケージの識別

受入時および群分け時に、油性フェルトペンで尾部に印を付け、動物の個体識別を行った。

飼育ケージについては、各ケージの前面に、群分け前は試験番号および受入時の動物番号を、群分け後は試験番号、試験群および動物番号を、ラベルに明記して標示した。

(5) 動物飼育

1) 飼育環境

動物を温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測範囲 $19 \sim 24^{\circ}\text{C}$)、湿度 $50 \pm 20\%$ (実測範囲 $33 \sim 57\%$)、換気回数 $10 \sim 15$ 回/時間、照明時間 12 時間(人工照明、8:00~20:00)の動物飼育室(309 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、異常のないことを確認した。

2) 飼育器材および飼育方法

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 2 匹ずつ、群分け後は 1 匹ずつ収容した。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 を金属製給餌器により自由に摂取させた。

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(060706)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式会社 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 2-1~2-2)。

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、2006 年 10 月 2 日および 2007 年 1 月 9 日に当該飼育室と同系統配管の最末端(306 号室)から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式会社 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 3-1 および 3-2)。

(6) 試験群の構成

試験群の構成と各群の動物番号を以下に示す。

試験群	投与量 (mg/kg)	濃度 (mg/mL)	動物数(動物番号) 雌
第1群	300	30	3 (151~153)
第2群	300	30	3 (251~253)
第3群	2000	200	3 (351~353)
第4群	2000	200	3 (451~453)

(7) 被験物質の投与

1) 投与量の設定

ラットのLD₅₀値(経口)に関する報告がないことから、本試験の開始用量を300 mg/kgに設定した。第2群以降の投与量は、投与後3日までの死亡率により、Appendix 4に従って決定した。

2) 投与

OECD試験法ガイドラインに従って、一晩(16~18時間)の絶食後、ディスポーザブル胃ゾンデおよびディスポーザブルシリンジを用いて強制的に胃内に1回経口投与した。給餌の再開は投与後4時間とした。9:00から10:00の間に、10 mL/kgの投与容量で、各個体毎に投与日の体重に基づいて算出した投与液量を投与した。

(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)の投与前、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時間および4時間に観察し、第3および4群については投与後6時間にも観察した。投与後1日から13日までは毎日午前・午後の1日2回観察し、投与後14日は午前にのみ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日に、電子式上皿天秤(GX-2000、株式会社 エー・アンド・デイ)を用いて測定し、1g単位で記録した。

以下の式により体重増加量および体重増加率を算出した。

$$\begin{aligned} \text{体重増加量 (g/14d)} &= \text{投与後 14 日体重 (g)} - \text{0 日体重 (g)} \\ \text{体重増加率 (\%/14d)} &= \frac{\text{体重増加量 (g/14d)}}{\text{0 日体重 (g)}} \times 100 \end{aligned}$$

3) 剖検

投与後14日にエーテル麻酔下で安楽死させ、全例について、体外表を観察後、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。

5. 統計学的方法

体重、体重増加量および増加率の成績について平均値および標準偏差を算出した。

成績および考察

1. 死亡状況および死亡率

死亡状況および死亡率を Table 1 に示す。

第 1 および 2 群(300 mg/kg)では、投与後 14 日間に死亡例は認められなかった。

第 3 および 4 群(2000 mg/kg)では、投与後 14 日間に死亡例は認められなかった。

死亡率は 300 および 2000 mg/kg のいずれも 0/6 であった。

2. 一般状態

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

第 1 および 2 群(300 mg/kg)では、投与後 14 日間に毒性徴候の発現は認められなかった。

第 3 および 4 群(2000 mg/kg)では、投与後 4 時間に各 1 例(No. 352、453)に粘液便がみられ、投与後 6 時間にも 1 例(No. 453)に粘液便がみられたが、投与後 1 日には回復し、以降は投与後 14 日まで異常は認められなかった。

3. 体重

体重推移を Figure 1、Table 3、INDIVIDUAL DATA 2-1 および 2-2 に示す。

各投与群(300 および 2000 mg/kg)ともに順調な体重増加がみられ、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

4. 剖検

剖検所見を Table 4、INDIVIDUAL DATA 3-1 および 3-2 に示す。

各投与群(300 および 2000 mg/kg)とも全例に異常所見は認められなかった。

以上のように、Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate の 2000 mg/kg の投与により、粘液便がみられたが、300 mg/kg の投与では異常は認められなかった。300 および 2000 mg/kg の投与後に死亡例はみられず、また、剖検所見にも異常は認められなかった。

したがって、Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1, 2, 3-tricarboxylate は OECD 試験法ガイドライン(423)の ANNEX 2c より GHS(Globally Harmonized Classification System)の Category 5 あるいは Unclassified と結論された。

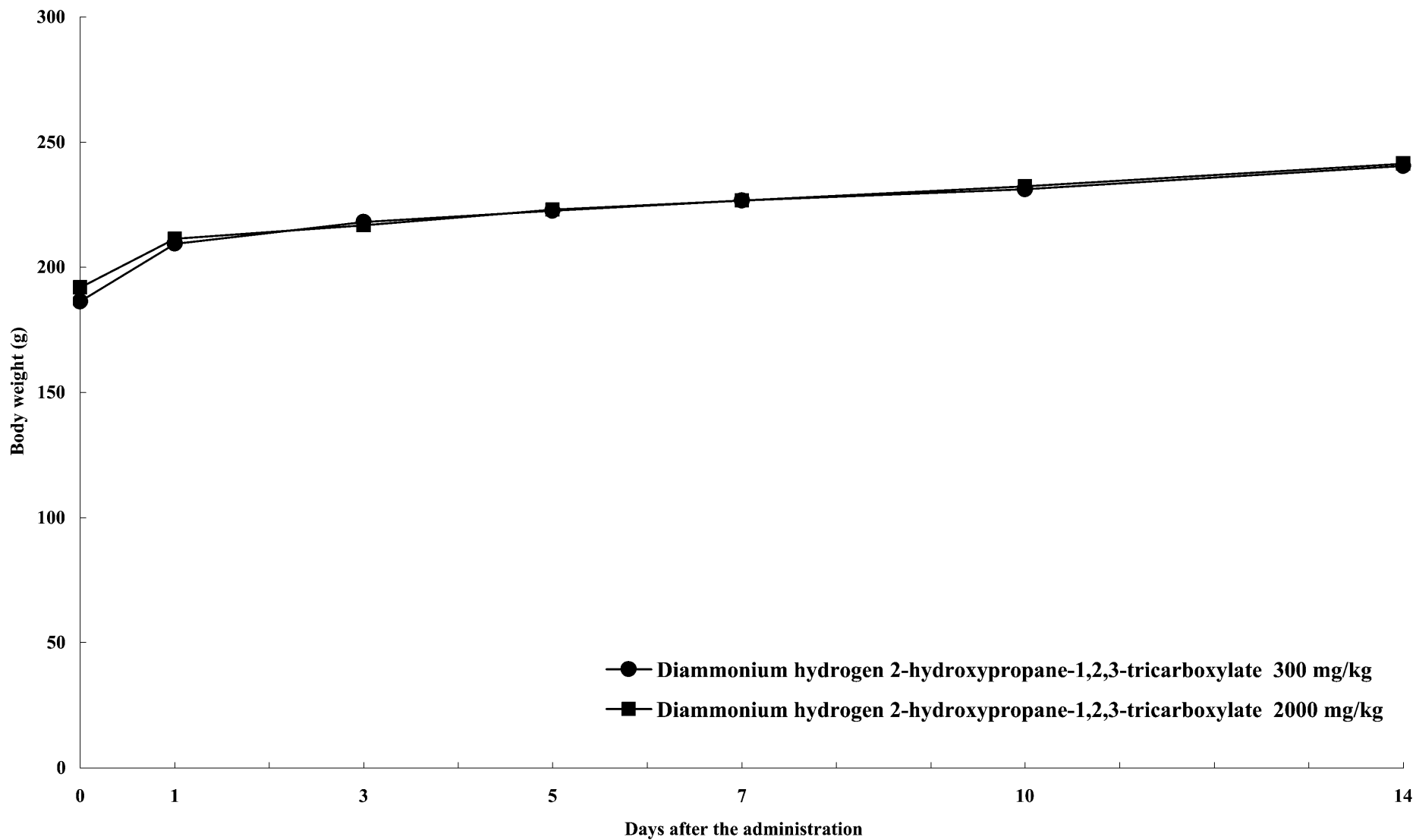


Figure 1 Body weight changes of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356)

Table 1 Mortality of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356)

Group	Number of animals	Number of dead animals								Mortality
		Hours after the administration						Days after the administration		
		Pre	0.5	1	2	4	6	1 - 14		
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 300 mg/kg	6	0	0	0	0	0	-	0		0 / 6
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 2000 mg/kg	6	0	0	0	0	0	0	0		0 / 6

Pre : Pre-administration.

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

- : Blank value.

Table 2 General appearance of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356)

Group	Findings	Hours after the administration						Days after the administration
		Pre	0.5	1	2	4	6	1 - 14
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 300 mg/kg	Number of alive animals	6	6	6	6	6	-	6
	No abnormal findings	6	6	6	6	6	-	6
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 2000 mg/kg	Number of alive animals	6	6	6	6	6	6	6
	No abnormal findings	6	6	6	6	4	5	6
	Mucous feces	0	0	0	0	2	1	0

Pre : Pre-administration.

Values are number of animals with findings.

- : Blank value.

Table 3 Body weight changes of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356)

Group	Body weight (g) on days after the administration								Body weight gain	
	0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14		
								g	%	
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 300 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	
	MEAN	186.3	209.3	218.2	222.7	226.7	231.2	240.5	54.2	29.093
	S.D.	2.3	5.3	3.4	5.0	3.9	2.1	5.2	6.2	3.547
Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate 2000 mg/kg	N	6	6	6	6	6	6	6	6	
	MEAN	192.0	211.3	216.8	223.0	226.7	232.3	241.3	49.3	25.812
	S.D.	9.1	8.4	7.2	8.6	5.3	11.9	10.2	8.8	5.269

Day 0 : Pre-administration.

Table 4 Gross findings of female rats in an acute oral toxicity test of Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (SR05356)

Findings	Diammonium hydrogen 2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylate (mg/kg)	
	300	2000
Number of animals examined	6	6
No abnormal findings	6	6

Values are number of animals with findings.