食薬セ研第１０－１６２５号

２０００年　８月　７日

（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウム＝クロリドのラットにおける急性経口投与毒性試験

厚生省生活衛生局　委託

財団法人食品薬品安全センター

秦　野　研　究　所

【目　　次】

要約 …… 1
緒言 …… 2
方法 …… 3
　1．被験物質 …… 3
　2．使用動物および飼育方法 …… 3
　3．投与検体の調製 …… 4
　4．投与量の設定および投与方法 …… 4
　5．観察および検査 …… 5
　6．データ解析法 …… 5
結果 …… 6
　1．死亡動物 …… 6
　2．一般状態 …… 6
　3．体重推移 …… 6
　4．病理学検査 …… 6
考察 …… 7
文献 …… 8

Tables 1～2

【要　　約】

（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウム＝クロリド（以下 META と略記）の Sprague-Dawley 系［Crj:CD(SD)IGS, SPF］ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施した。

1群5匹からなる5週齢の雄ラットに META 1000 および 2000 mg/kg を、5匹の5週齢雌ラットに META 2000 mg/kg をそれぞれ単回経口投与し、観察第1日（投与日）から14日間観察を行い、観察第15日に屠殺して剖検した。

雌雄のいずれの投与群でも死亡例はみられなかった。2000 mg/kg 投与群の雌1例で投与後8分から約20分間一過性の流涎がみられたが、その他異常所見は認められなかった。

体重の推移および観察第15日に実施した剖検所見においては、全例で異常は認められなかった。

これらのことより、本試験条件下における META の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【緒　　言】

（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウム＝クロリド（以下 META と略記）は、マウスにおける単回経口投与時の LD_{50} が 1044 mg/kg であることが報告されている[1]。今回、OECD 既存化学物質安全性点検等に係る毒性調査の一環として、META の安全性確認の資料を得るために、ラットにおける急性経口投与毒性試験を実施したので、その結果を報告する。

本試験は、OECD 化学物質試験法ガイドライン「[401] 急性経口毒性試験（1987年2月24日採択）」および「化学物質 GLP」（昭和59年3月31日、環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和63年11月18日改正、環企研第233号、衛生第38号、63基局第823号）に準拠して実施した。

【方　　法】

1．被験物質

被験物質として、（メタクリロイルオキシエチル）トリメチルアンモニウム＝クロリド（以下 META と略記）を用いた。本被験物質は、別名をメタクリル酸ジメチルアミノエチルメチルクロライド塩と称し、英名は [2-(Methacryloyloxy) ethyl]trimethylammonium chlorideであり、CAS No. 5039-78-1、分子量 207.75、分子式$C_9H_{18}ClNO_2$、融点（凝固点）－10℃の無色透明の液体である。META の構造式を以下に示す。

構造式　　$H_2C=C(CH_3)CO_2CH_2CH_2N(CH_3)_3Cl$

本試験には、　　より提供された META を 78.1 wt%含有する水溶液（ロット番号：　　）を用いた。提供された水溶液は、安定剤として4-メトキシフェノールを 1962 ppm 含有していた。受領した提供物質は、使用時まで被験物質保管室において、密栓、冷蔵、遮光下で保管した。

2．使用動物および飼育方法

4週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雌雄ラットを、日本チャールス・リバー株式会社筑波飼育センターから購入し、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて7日間予備飼育した。予備飼育中、動物の一般状態に異常は認められなかった。試験には、雄10匹雌5匹を用い、雄は検疫終了時の測定体重を基に体重別層化無作為抽出法により1群5匹からなる2群に分け、雌は入荷番号の若い方から5匹を選んで1群とした。投与開始時の週齢は、雌雄ともに5週齢であった（注）。

全飼育期間を通じ、動物を金属製金網床ケージ（220w×270d×190hmm）に1匹ずつ収容し、基準温度24±1℃、基準湿度50～65%、換気回数約15回／時、照明12時間（7時～19時点灯）に制御された飼育室で、固型飼料（CE-2、日本クレア株式会社）および水道

（注）　動物入荷日：1999年1月27日
入荷時匹数：雄12匹、雌6匹
入荷時体重：雄 81.4～92.3g、雌 78.8～85.1g
投　与　日：1999年2月3日
投与時体重：雄 126.4～134.7g、雌 102.4～119.5g

水（秦野市水道局給水）を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中、飼育室の温湿度の実測値は、それぞれ24.0～24.5℃、48.5～65.5%で、湿度は基準値をわずかながらはずれる値を示したが、1時間以内の逸脱であり、それ以外は基準の範囲内にあった。また、供給した飼料および水には試験に支障を来す可能性のある混入物はなかった。

動物の個体識別は、各動物の尾に油性フェルトペンで雌雄に一連の番号を付した。また、各飼育ケージには個体識別の補助として試験計画番号、投与量、性および動物番号を記入した動物カードを掛けた。

3．投与検体の調製

投与検体の調製においては、供給物質を局方注射用水（製造番号：9707SA、光製薬株式会社）で希釈して被験物質濃度として 20 w/v%溶液を調製し、これを注射用水により希釈して 10 w/v%溶液を調製し、投与時まで冷蔵・遮光下で保存し、調製2日後に使用した。

本試験に先立ち、秦野研究所で実施した本被験物質のラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験（試験計画番号：C-98-015）において、被験物質の1および 20 w/v%の調製検体の、冷蔵、遮光条件下での8日間の安定性を確認した（Appendix A）。また、各濃度の投与検体中の被験物質の含量を測定し、規定範囲内にあることを確認した（Appendix B）。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。調製検体中の被験物質の濃度は、高速液体クロマトグラフ法により測定した（Appendix C）。

4．投与量の設定および投与方法

本試験における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-036）の結果に基づいて決定した。すなわち、雌雄各3匹に 2000 mg/kg の META を経口投与し、雌1例で下痢、流涎、流涙、自発運動の減少、よろめき歩行、立毛、体重増加抑制が認められたことから、片性（雄）について、1000 および 2000 mg/kg の2用量を設定した。また、予備試験では明らかな性差は認められなかったことから、雌については、2000 mg/kg の1用量を設定した。

投与容量は体重1kg当たり 10 mL とし、動物を約18時間絶食させた後、投与直前に測定した体重を基に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて強制的に単回経口投与した。投与は午前10時～10時8分の間に行い、給餌は投与後約3時間に行った。

各群の投与物質、投与量、濃度、投与容量および動物番号は次の通りである。

投与物質	投与量 (mg/kg)	濃度 (w/v%)	投与容量 (mL/kg)	動物番号	
				雄	雌
META	1000	10	10	1～5	
META	2000	20	10	6～10	11～15

5．観察および検査

観察第1日（投与日）から14日間にわたって死亡の有無を確認し、各動物の一般状態を観察した。観察は投与日においては投与直後から1時間まで連続して行い、その後は投与後6時間まで約1時間間隔で実施した。観察第2日から15日までは毎日1回行った。

体重は全例について、投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。

剖検は、観察第15日に全例をペントバルビタール・ナトリウム麻酔下で放血屠殺して実施した。剖検時に、脳、下垂体、胸腺、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、生殖器、顎下腺、甲状腺、副腎、大動脈、気管、食道、消化管、膀胱、眼球（ハーダー腺を含む）、皮膚、乳腺、頸部および腸間膜リンパ節、大腿骨骨髄および舌の肉眼観察を行った。これらのうち、2000 mg/kg 投与群の雄の1例（動物番号：6）について心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃を 0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。なお、観察第2日以降、一般状態に異常は観察されず、剖検によっても異常は認められなかったことから、組織学検査は実施しなかった。

6．データ解析法

体重の測定値について、平均値および標準偏差を求めた。

【結　　果】

1．死亡動物

雌雄ともに、死亡例はなかった。

2．一般状態（Table 1）

雄では、1000 および 2000 mg/kg 投与群ともに、観察期間を通じて一般状態に異常は認められなかった。

雌では、2000 mg/kg 投与群の1例で、投与後8分から約20分間流涎がみられたが、その他、観察期間を通じて一般状態に異常は認められなかった。

3．体重推移（Table 2）

雌雄ともに、体重減少を示す例はおらず、特記すべき変化は認められなかった。

4．病理学検査

観察第15日に実施した剖検では、雌雄全例の器官・組織に異常所見は認められなかった。

【考　　察】

META 1000 および 2000 mg/kg を5週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] 雄ラットに、また、META 2000 mg/kg を同週齢同系統の雌ラットに単回強制経口投与して単回投与時の META の毒性を検討した。

その結果、雌雄ともに死亡例はみられなかった。2000 mg/kg 投与群の雌1例で投与後に流涎がみられた。流涎は本試験の投与量設定のための予備試験でもみられたが、予備試験および本試験ともに1例での変化であり、ごく短時間の一過性の変化であるため、極めて軽度の影響であると推測された。

観察第2、4、8、11および15日に測定した体重の推移では、特記すべき変化は認められず、剖検でも異常はみられなかった。

これらのことより、本試験条件下における META の LD_{50} は、雌雄ともに 2000 mg/kg を上回ると推定された。

【文　　献】

1) Lawrence, W. H., Bass, G.E., Purcell, W. P., and Autian J. : Use of Mathematical Models in the Study of Structure-Toxicity Relationships of Dental Compounds: I. Esters of Acrylic and Methacrylic Acids. Journal of Dental Research. 51 : 526-535 (1972)

Table 1 Clinical findings in male and female rats after single oral administration of META

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Clinical findings	Hours after administration						Days of observation								
				0～1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10～15
Male	1000	1	No abnormality															
		2	No abnormality															
		3	No abnormality															
		4	No abnormality															
		5	No abnormality															
	2000	6	No abnormality															
		7	No abnormality															
		8	No abnormality															
		9	No abnormality															
		10	No abnormality															
Female	2000	11	Salivation	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
		12	No abnormality															
		13	No abnormality															
		14	No abnormality															
		15	No abnormality															

+, positive; −, negative; The first day, the day of administration.

Table 2 Body weight changes in male and female rats after single oral administration of META

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation 1 *	2	4	8	11	15
Male	1000	1	130.9	158.1	178.9	219.4	251.3	288.6
		2	131.0	156.8	174.8	214.0	244.4	291.2
		3	130.6	153.8	174.9	209.9	233.9	266.0
		4	126.4	155.3	174.5	214.8	245.2	279.7
		5	134.6	160.7	188.0	226.9	260.7	294.1
		Mean	130.7	156.9	178.2	217.0	247.1	283.9
		S.D.	2.9	2.6	5.8	6.5	9.8	11.4
	2000	6	130.5	149.3	175.4	225.5	259.3	304.8
		7	132.9	150.0	171.0	216.9	245.2	282.9
		8	131.0	152.4	177.9	219.2	256.1	294.2
		9	129.4	139.8	162.5	202.6	236.2	276.6
		10	134.7	156.7	173.5	211.8	238.8	276.8
		Mean	131.7	149.6	172.1	215.2	247.1	287.1
		S.D.	2.1	6.2	5.9	8.6	10.3	12.2
Female	2000	11	110.3	124.3	143.2	166.8	178.2	188.3
		12	109.8	123.2	139.2	157.5	166.8	186.0
		13	102.4	115.8	131.5	150.6	161.1	176.8
		14	119.5	136.2	155.1	180.7	191.9	206.3
		15	117.2	136.0	159.3	185.7	195.1	217.2
		Mean	111.8	127.1	145.7	168.3	178.6	194.9
		S.D.	6.8	8.8	11.4	14.9	15.0	16.4

*, the day of administration; unit, g