2007年2月22日

トリチオシアヌル酸の
ラットを用いる急性経口投与毒性試験

厚生労働省医薬食品局審査管理課
化学物質安全対策室　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

試験目的 …… 1

材料と方法 …… 2

1. 被験物質 …… 2

2. 使用動物と飼育方法 …… 2

3. 投与検体の調製 …… 3

4. 投与方法 …… 4

5. 観察と検査 …… 4

6. データの解析 …… 5

試験成績と考察 …… 6

1. 死亡と一般状態 …… 6

2. 体重 …… 6

3. 病理学検査 …… 6

表 1～7

添付資料 1 および 2

要約

トリチオシアヌル酸の概略の致死量を知るために、単回経口投与による急性毒性試験を、雌性ラット 9 匹を用い、OECD 化学物質試験法ガイドライン 423 に従って実施した。被験物質は0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液に懸濁し、第一段階(3 例)では 300 mg/kg の用量で投与した。この第一段階投与 7 日後までに動物に一般状態の異常が認められなかったため、第二段階として同じ 300 mg/kg を他の 3 例に投与したが、同様に 7 日後まで一般状態に異常は認められなかった。この結果より第三段階として新たに 3 例に 2,000 mg/kg を投与したところ、投与日(観察第 1 日)の投与約 2 時間後に 1 例が死亡し、残りの 2 例も観察第 3 および 4 日にそれぞれ死亡した。300 mg/kgを投与した6例は観察期間中の体重推移も順調で、観察最終日(観察第15日)に行なった剖検においても異常は認められなかった。一方、2,000 mg/kg投与後に死亡した動物では、生存期間中に体重の減少、活動性の低下等が認められた。死亡した動物の剖検では、全例に右心房内に血液の貯留が認められ、観察第 3 および4日に死亡した 2 例では腎臓および副腎の大型化、脾臓の小型化が認められた。また、投与日および観察第 3 日に死亡した動物では胃内に検体と考えられる白色の液体が残留していた。死亡例の組織学検査では全例の腎臓の乳頭部に水腫が、皮質の近位尿細管上皮および糸球体に明らかな変性および壊死が認められた。また、2 例の脾臓では白脾髄領域の顕著な減少が認められた。以上の結果から、トリチオシアヌル酸はラットにおいて 300 mg/kg の単回経口投与では何ら毒性を示さないが、2,000 mg/kg では極めて短時間で組織、主に腎臓を傷害し、動物を死に至らしめることが明らかとなった。また、Globally Harmonized Classification System(GHS)はクラス 4(300～2,000 mg/kg b.w.)に、LD50 区切り値(LD_{50} cut-off 値)は 500 mg/kg b.w.と判断された。

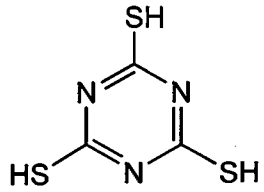
試験目的

トリチオシアヌル酸は含ハロゲンポリマーの架橋剤および含ハロゲンポリマーとジエン系ゴムとの共架橋剤であり、工業用ゴム全般、ゴム-金属間の接着、金属の防錆剤として用いられている。OECD既存化学物質安全性点検等に係わる毒性調査の一環として、ラットを用いた経口投与による急性毒性を検討し、安全性評価の資料とする。

材料と方法

1. 被験物質

被験物質トリチオシアヌル酸　　は、　　より譲渡を受け（添付資料A）、用時まで室温で保存した。被験物質の性状については下に記載した。

化学名	トリチオシアヌル酸
略称	TTC
英名	1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trithione
CAS No.	638-16-4
分子式	$C_3H_3N_3S_3$
分子量	177.27
含量	99.8%(HPLC)
不純物	イオウ分:0.13%
物理化学的性質	性状:　淡黄色粉末 融点:　300℃以上 沸点:　提供元からのデータなし 比重:　提供元からのデータなし 分配係数:提供元からのデータなし 蒸気圧:　提供元からのデータなし 溶解性:　水に難溶、メタノール、アセトン、ジオキサンに微溶、セロソルブ、THF に可溶 安定性:　通常の取り扱いにおいては安定
構造式	

2. 使用動物と飼育方法

7 週齢の Sprague-Dawley 系〔Crl;CD(SD), SPF〕雌性ラット（日本チャールス・リバー、厚木飼育センター）25 匹を購入し、105 号室に搬入した。動物は、許容温度 21.0～25.0℃、許容湿度 40.0～75.0%、換気回数約 15 回／時、照明 12 時間（7～19 時点灯）に設定された飼育室で、金

属製金網床ケージ(220 w×270 d×190 h mm)に 1 匹ずつ収容し、固型飼料(CE-2、日本クレア) と水道水(秦野市水道局給水)を自由に摂取させて飼育した。なお、飼育期間中の飼育室の温湿度の実測値はそれぞれ 23.0～24.5℃、49.0～59.0.%であった。また、供給した飼料および水道水には試験に支障を来す可能性のある混入物は認められなかった。

検疫と飼育環境への馴化を兼ね、搬入した動物は入荷日も含めて 8 日間飼育した。検疫期間中は個体識別のため、飼育ケージに試験番号、性別、仮動物番号を記入した動物カードを掛けた。検疫・馴化期間中 1 日 1 回、動物の一般状態を観察した結果、いずれの動物にも異常は認められなかったため、検疫終了時の測定体重をもとに上位 5 匹、下位 2 匹を棄却し、残り 18 匹について体重別層化無作為抽出法により 1 群あたり 3 匹の 6 群に群分けを行い、試験に使用した。試験においては第三段階までの投与結果により被験物質の毒性分類が確定したため、第四段階以降の動物 9 例および群分け時に除外された 7 例には投与は行わなかった。これら試験に使用しなかった 16 匹は、同じ動物室内で飼育を続け、毒性分類が確定した 2005 年 6 月 14 日に炭酸ガスにより安楽殺した。

群分け後は個体識別のため、尾にフェルトペンで一連の動物番号を標識した。また、投与段階毎に色彩で識別した動物カードに、試験番号、性別、動物番号、投与量および投与年月日を記入し、飼育ケージに掛けた。

入荷日 2005 年 5 月 16 日	入荷時体重 158.4～183.6 g
投与日(第一段階)2005 年 5 月 24 日	投与時体重 186.2～202.4 g
投与日(第二段階)2005 年 5 月 31 日	投与時体重 204.2～219.6 g
投与日(第三段階)2005 年 6 月 7 日	投与時体重 227.2～242.2 g

3. 投与検体の調製

被験物質を秤量し、乳鉢で磨砕後、媒体の 0.5%カルボキシメチルセルロース・ナトリウム水溶液[日局カルメロースナトリウム(丸石製薬、ロット番号;4720)を日局注射用水(光製薬、ロット番号;A4ZCT1)で溶解]を加えて懸濁状態とした。これをメスシンリンダーに移し、媒体を加えて濃度 20%(w/v)の懸濁液とし、さらに、媒体で段階希釈して 0.05、0.5 および 3%(w/v)を調製、使用した。なお、調製検体は冷蔵保管した。

投与に先立ち、秦野研究所で濃度 0.05 および 20%(w/v)の調製検体の冷蔵、遮光条件下での調製後 8 日間の安定性試験を実施し、許容範囲内(調製日の測定値の 90%以上)であることを確認した(付録 2)。また 2005 年 5 月 23 日に調製した濃度 0.05、0.5, 3 および 20%(w/v)の投与検体については、含量および均一性が許容範囲内(懸濁液中含量については調製指示値の 85.0～115%、均一性については各測定値のバラつきが平均値の 90.0～110%以内)であることを確認した(付録 3 および 4)。

調製検体中の被験物質濃度の測定は、各濃度調製検体の 0.5 mL を採取し、メタノールで適宜希釈して理論濃度 2 μg/mL の試料溶液を調製した。別に、被験物質 10 mg を秤取し、メタノールに溶解、段階希釈して標準溶液(1、2、5 μg/mL)を調製した。試料溶液および標準溶液を高速液体クロマトグラフ(HPLC)法により測定し、標準溶液から作成する検量線を用いて濃度を求め

た。HPLC 測定条件を下記に示す。

HPLC 条件

分析カラム	Atlantis dC_{18} (内径 4.6 mm、長さ 50 mm、粒子径 5 μm、Waters)
移動相	メタノール/0.05 mol/L リン酸塩緩衝液(pH 2.5) (1:9 v/v)
流速	1.0 mL/min
カラム設定温度	40℃
検出波長	294 nm
試料注入量	10 μL

4. 投与方法

OECD 化学物質試験法ガイドライン 423 に従って投与経路は経口投与とした。被験物質のラット経口投与時の 50%致死量に関しては 9,500 mg/kg との報告がある(RTECS;Number: XZ2830000)。このため、本試験に先立ち実施した観察期間 4 日間のラットを用いた経口投与予備試験では OECD 化学物質試験法ガイドライン 423 で推奨されている最大投与量である 2,000 mg/kg の用量について検討を行ったが、観察期間中に全例(3 例)が死亡したため、投与開始用量は一段階低い 300 mg/kg を選択した。なお、予備試験で全例が死亡するまでに投与後 3 日を要したため、本試験では各段階の投与 7 日後までの生存例数を基に次の段階の投与量を決定した。

動物を投与前日の 16 時から絶食させた後、直前に測定した体重を基に個体別に投与液量を算出し、ラット用胃管を用いて単回経口投与した。投与は第一段階(動物番号1～3)を 2005 年 5 月 24 日の 9 時 27 分～9 時 28 分の間に、第二段階(動物番号 4～6)を 2005 年 5 月 31 日の 9 時 31 分～9 時 33 分の間に、第三段階(動物番号 7～9)を 2005 年 6 月 7 日の 9 時 25 分～9 時 27 分の間にそれぞれ行い、投与 3 時間後から給餌を行った。

5. 観察と検査

投与日を観察第 1 日として第 15 日まで毎日、死亡の有無を確認した。一般状態の観察を、投与当日は投与前および投与後 1 時間にわたって継続的に、その後は 1 時間間隔で投与後 6 時間まで実施し、観察第 2 日以降は、毎日 1 回の頻度で行った。体重は、投与直前、観察第 2、4、8、11 および 15 日と死亡発見時に測定した。生存例は観察第 15 日にペントバルビタール麻酔下で放血致死させて剖検し、外表、皮下および主要器官(脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、顎下腺、下顎リンパ節、心臓、肺、気管、胸腺、甲状腺、舌、食道、消化管、腸間膜リンパ節、肝臓、膵臓、脾臓、副腎、腎臓、膀胱、大動脈、生殖器、大腿骨骨髄、乳腺および皮膚)を観察し、各投与段階の動物番号の若い 1 例(動物番号 1 および 4)の主要器官・組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、消化管)を0.1 Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液に固定保存した。死亡例全例についても同様に剖検、主要器官および肉眼的に変化が認められた器官(動物番号 7 および 9 の副腎)、組織の保存を行い、さらに死亡全例の脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃に関してヘマトキシリン・エオジン標本を作製し、病理組織学検査を行った。

6. データの解析

体重の平均値および標準偏差を算出した。

試験成績と考察

1. 死亡と一般状態

300 mg/kg を投与した 6 例(動物番号 1～6)では 15 日間の観察期間中に死亡および一般状態の異常は観察されなかった(表 1 および 2)。

2,000 mg/kgを投与した1例(動物番号8)では投与後約1時間から腹ばい歩行が認められた。その後、閉眼、横臥、呼吸困難が約 1 時間 30 分後までに認められ、約 2 時間後に死亡が確認された。死亡時には全身の硬直が認められた(表 3)。他の 1 例(動物番号 9)では投与約 2 時間後に軟便排泄が、3 時間後にはこれに加えて活動性の低下が認められたが、6 時間後には活動性の低下は消失した。この動物では翌日(観察第 2 日)に排便量の減少が認められ、観察第 3 日の午前に死亡が確認された。残る 1 例(動物番号 7)では投与日には何ら異常は認められなかったが、観察第 2 日に排便量の減少、第 3 日に活動性の低下が認められ、第 4 日に死亡が確認された(表 3)。

2. 体重

300 mg/kg を投与した 6 例では投与日から観察終了日まで順調な体重増加が認められた(表 4)。2,000 mg/kg 投与後約 2 時間で死亡した 1 例(動物番号 8)では死亡時体重は投与前よりも若干減少していた(投与前体重の約 1.8%の減少、表 5)。生存した 2 例の投与翌日(観察第 2 日)の体重は、投与前値と比較してそれぞれ 3.4(動物番号 7)および 4.6%(動物番号 9)減少し、観察第 3 日の午前中に死亡した 1 例(動物番号 9)では死亡発見時体重は投与前値と比較して 13.2%減少していた。また、観察第 4 日に死亡した 1 例(動物番号 7)では死亡発見時体重は投与前と比較して 17.6%減少していた(表 5)。

3. 病理学検査

300 mg/kg を投与した 6 例では観察第 15 日の剖検において何ら異常は観察されなかった。

2,000 mg/kg 投与後約 2 時間で死亡した 1 例(動物番号 8)では死亡直後に全身の硬直が認められた。観察第 3 日および 4 日に死亡した 2 例(それぞれ動物番号 9 および 7)では鼻周囲の被毛の汚れ、腎臓および副腎の大型化、脾臓の小型化が認められ、観察第 3 日に死亡した 1 例(動物番号 9)では肺に暗赤色域が認められた。また、投与日および観察第 3 日に死亡した 2 例(それぞれ動物番号 8 および 9)では胃内に検体と考えられる白色の液体が残留していた。さらに、死亡した 3 例全例で右心房の血液の充満が認められた(表 6)。

死亡した2,000 mg/kg投与群3例のヘマトキシリン・エオジン標本を作製し、病理組織学検査を実施したところ、全例で腎臓の皮質の近位尿細管上皮および糸球体に変性および壊死、乳頭部に水腫が認められた。観察第 3 日および 4 日に死亡した 2 例(それぞれ動物番号 9 および 7)では、皮質の尿細管腔や間質および血管壁に細胞浸潤、乳頭部に壊死、髄質の集合管上皮に変性および壊死，髄質の尿細管腔や間質および血管にも細胞浸潤が観察され、さらに乳頭部の集

合管上皮に硝子滴もみられた。また、観察第 3 日に死亡した 1 例(動物番号 9)では皮質に鉱質沈着、髄質に硝子円柱が、投与後約 2 時間で死亡した 1 例(動物番号 8)および観察第 3 日に死亡した 1 例(動物番号 9)では遠位尿細管の拡張が観察された(表 7)。

脾臓では、全例で軽度もしくはごく軽度の髄外造血および褐色色素の沈着が観察され、観察第 3 日および 4 日に死亡した 2 例(それぞれ動物番号 9 および 7)では白脾髄領域の明らかな減少が認められた(表 7)。

肺では、全例でうっ血が、観察第 3 日および 4 日に死亡した 2 例(それぞれ動物番号 9 および 7)では水腫および肺胞に泡沫細胞の集簇が、1 例(動物番号 9)では肺胞中隔に好中球の浸潤も認められた。肝臓では、全例の門脈周囲の肝細胞に脂肪化、小葉中間帯の肝細胞に空胞変性が認められた。心臓、脳および胃には組織学的な異常は認められなかった(表 7)。

以上の結果から、トリチオシアヌル酸はラットにおいて 300 mg/kg の単回経口投与では何ら毒性を示さないが、2,000 mg/kg では極めて短時間で組織、主に腎臓を傷害し、動物を死に至らしめることが明らかとなった。また、Globally Harmonized Classification System(GHS)はクラス 4(300～2,000 mg/kg b.w.)に、LD50 区切り値(LD_{50} cut-off 値)は 500 mg/kg b.w.と判断された。

表1 トリチオシアヌル酸単回経口投与を行った雌性ラットの死亡数

投与用量	投与	動物数	観察日															死亡率
(mg/kg)	段階		1[a)]	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
300	第一段階	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
300	第二段階	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
2,000	第三段階	3	1	0	1	1												3/3

a) 投与日(第一段階では2005年5月24日、第二段階では2005年5月31日、第三段階では2005年6月7日)

表 2 トリチオシアヌル酸 300 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの一般状態

投与用量 (mg/kg)	投与階段	動物番号	観察された症状	投与後時間 1 0～30	1 31～60 (分)	2	3	4	5	6 (時間)	観察日 2～15(日)
300	第一段階	1	異常	–	–	–	–	–	–	–	–
		2	異常	–	–	–	–	–	–	–	–
		3	異常	–	–	–	–	–	–	–	–
	第二段階	4	異常	–	–	–	–	–	–	–	–
		5	異常	–	–	–	–	–	–	–	–
		6	異常	–	–	–	–	–	–	–	–

–:陰性

表 3 トリチオシアヌル酸 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの一般状態

投与用量 (mg/kg)	投与段階	動物番号	観察された症状	投与後時間 1 0〜30	1 31〜60	2 61〜90	2 91〜120	3 121〜150	3 151〜180 (分)	4	5	6 (時間)	観察日 2	3	4
2,000	第三段階	7	排便量減少	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	
			活動性低下	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	
			死亡	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
		8	腹ばい歩行	−	+ (0:50)	−	−								
			閉眼	−	−	+ (01:02)	+								
			横臥	−	−	+ (01:19)	+								
			呼吸困難	−	−	+ (01:19)	+								
			全身硬直	−	−	−	−	+ (02:03)							
			死亡	−	−	−	−	+ (02:04)							
		9	軟便	−	−	−	−	+ (02:03)	+	+	+	+	−		
			活動性低下	−	−	−	−	−	+ (03:03)	+	+	−	−		
			排便量減少	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+		
			死亡	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	

−:陰性、+:陽性、( )カッコ内は、観察された投与後時間

表 4 トリチオシアヌル酸 300 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの体重推移;g

投与段階	動物番号	試験期間（日）					
		1[a)]	2	4	8	11	15
第一段階	1	186.7	206.5	217.0	225.9	226.8	235.1
	2	202.4	225.7	248.6	269.7	278.9	299.1
	3	186.2	209.7	217.7	225.8	241.2	255.2
	例数	3	3	3	3	3	3
	平均	191.8	214.0	227.8	240.5	249.0	263.1
	標準偏差	9.2	10.3	18.0	25.3	26.9	32.7
第二段階	4	204.2	233.4	248.9	256.5	258.9	262.3
	5	219.6	243.3	254.3	264.6	267.1	279.6
	6	208.5	235.3	237.4	247.3	263.1	274.6
	例数	3	3	3	3	3	3
	平均	210.8	237.3	246.9	256.1	263.0	272.2
	標準偏差	7.9	5.3	8.6	8.7	4.1	8.9

a) 投与日（第一段階では 2005 年 5 月 24 日、第二段階では 2005 年 5 月 31 日）

表 5 トリチオシアヌル酸 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの体重推移;g

投与段階	動物番号	試験期間（日）				
		1[a)]	1(死亡時)	2	3(死亡時)	4(死亡時)
第三段階	7	236.4		228.3		194.8
	8	227.2	223.0			
	9	242.2		231.1	210.2	
	例数	3		2		
	平均	235.3		229.7		
	標準偏差	7.6				

a) 投与日（2005 年 6 月 7 日）

表 6 トリチオシアヌル酸 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの死亡時剖検所見

	動物番号		
剖検所見	7	8	9
心臓			
右心房に血液の貯留	+	+	+
肺			
暗赤色	−	−	+
胃			
検体様白色液残留	−	+	+
腎臓			
大型化	+	−	+
脾臓			
小型化	+	−	+
副腎			
大型化	+	−	+
外表および皮膚			
鼻周囲の汚れ	+	−	+

[陽性, +;　陰性, −]

表 7 トリチオシアヌル酸 2,000 mg/kg 単回経口投与を行った雌性ラットの観察器官および組織学検査所見

組織学検査所見	動物番号		
	7	8	9
肺			
うっ血	++	+	+
水腫	++	−	+
肺胞に泡沫細胞の集簇	±	−	±
肺胞中隔に好中球の浸潤	−	−	±
肝臓			
門脈周囲性の肝細胞の脂肪化	+	±	+
小葉中間帯の肝細胞の空胞変性	+	+	+
腎臓			
皮質の近位尿細管上皮の変性/壊死	++	++	++
皮質の糸球体の変性／壊死	++	+	++
皮質の尿細管腔／間質／血管に細胞浸潤	++	−	+
皮質の遠位尿細管腔の拡張	−	±	+
皮質に鉱質沈着	−	−	+
髄質の集合管上皮の変性／壊死	++	−	++
髄質の尿細管腔／間質／血管に細胞浸潤	+	−	±
髄質に硝子円柱	−	−	+
乳頭部の集合管上皮に硝子滴	+	−	++
乳頭部の壊死	+	−	+
乳頭部の水腫	+	±	+
脾臓			
白脾髄領域の減少	++	−	++
髄外造血	+	±	±
褐色色素の沈着	+	±	+
心臓, 脳 & 胃			
異常	−	−	−

±:ごく軽度、 +:軽度、 ++:中等度、 +++:重度