

食薬セ研第10-1618号

2000年 7月25日

N,N-ジメチルメタンアミンのラット
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	7
結果	8
1. 死亡動物	8
2. 一般状態	8
3. 体重推移	10
4. 病理学検査	11
5. LD ₅₀	12
考察	13
文献	15

Tables 1～5

【要 約】

5週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雄ラットを用い、1群5匹からなる4群に、*N,N*-ジメチルメタンアミン（以下 TMA と略記）の 200、350、600、1000 mg/kg を、同週齢の雌ラット5匹には TMA 350 mg/kg をそれぞれ単回強制経口投与した（第1期）。その結果、最低用量である 200 mg/kg 投与群で2例が死亡し、雌の投与群でも1例が死亡した。そこで、200 mg/kg での死亡の再確認および LD₅₀ を求めることを目的に、雌雄各30匹のラットを1群5匹からなる6群に分け、TMA の 125、200、320、512、820 および 1310 mg/kg 投与（第2期）による急性経口投与毒性試験を実施し、以下の結果を得た。

TMA 投与における死亡例は、雄では 820 mg/kg 以上の高用量投与で投与日に死亡するグループと、320 mg/kg 以下の用量で観察第6日以降に死亡するグループに二分された。512 mg/kg 投与群は両グループに属する死亡例がみられた。雌では、512 mg/kg 以上の投与で投与日に死亡例がみられた。

投与日死亡グループでは、投与後1時間以内に一般状態が悪化し、死期が近づくと呼吸不整、体温低下、蒼白等を呈した。投与から死亡に至るまでの時間は、投与量の増加に伴って短くなる傾向がみられた。剖検所見では、全例で腺胃粘膜に暗色部が認められ、一部の例で実施した組織学検査では前胃のびらん、前胃および腺胃粘膜下組織の浮腫がみられた。

一方、観察第6日以降の遅延性の死亡グループ例では、観察第2日以降にラッセル音が観察され、死亡日の1～4日前には腹部の膨満がみられるのが特徴的であった。剖検所見では、胃や腸にガスが貯留し、腹水の認められる例もあった。胃腸の病理組織学検査では、胃粘膜にうっ血、びらん、潰瘍、炎症性細胞浸潤等の軽度の変化がみられたが、ガス充満の原因を推察できるような変化は認められなかった。また、腹部の膨満に前後して排便量の減少がみられ、体重も減少し、病理学的には脾臓の萎縮が認められた。

本試験条件下における TMA の LD₅₀ は、雄で 396.9 mg/kg（95%信頼限界は 271.0～580.2 mg/kg）であり、雌では 512～820 mg/kg の間にあると考えられた。

【緒 言】

N,N-ジメチルメタンアミン（以下 TMA と略記）は、トリメチルアミンとも称し、動物組織に広く分布し、ガス体では皮膚や眼に刺激性があり、魚類の腐敗臭を有する物質¹⁾であり、ラットにおける単回経口投与時の LD₅₀ は 500 mg/kg であることが報告されている²⁾。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、TMA 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。

本試験では、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-022）の結果に基づいて、片性（雄）について 200、350、600 および 1000 mg/kg（公比約 $\sqrt{3}$ ）の4用量を設定し、雌については、明らかな毒性が発現しかつ死亡しないと考えられる用量として 350 mg/kg の1群を設定して投与を行った（第1期）。その結果、観察期間中に最低用量である 200 mg/kg 投与群の雄5例中2例が死亡した。そこで、本被験物質の LD₅₀ を求めることを目的として、雌雄に 125、200、320、512、820 および 1310 mg/kg 投与群（公比約 1.6）の6用量の投与を行った（第2期）。

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、*N,N*-ジメチルメタンアミン（以下 TMA と略記）を用いた。本被験物質の英名は *N,N*-dimethylmethanamine であり、CAS No. 75-50-3、分子量 59.11、分子式 C_2H_7N のガス体である。TMA の構造式を以下に示す。

構造式 $(CH_3)_2N$

本試験には、より提供された TMA の水溶液（ロット番号：含有量：30.8wt%）を用いた。受領した被験物質は、無色透明の液体で、不純物としてジメチルアミンを 10 ppm 以下含有していた。受領物質は、使用時まで被験物質受領保管室において、冷蔵保管した。

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 8 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 50 匹 雌 35 匹（第 1 期：雄；20 匹、雌；5 匹、第 2 期：雄；30 匹、雌；30 匹）を用いた。第 1 期には、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 4 群に分け、雌は動物番号の若い方から 5 匹を使用した。第 2 期には、雌雄とも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 6 群に分けた。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 $24 \pm 1^\circ C$ 、基準湿度 50～65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間（7 時～19

（注）

第 1 期
動物入荷日：1999 年 2 月 10 日
入荷時匹数：雄 23 匹、雌 6 匹
入荷時体重：雄 80.8～92.6 g
雌 75.4～82.1 g
投与日：1999 年 2 月 18 日
投与時体重：雄 129.3～144.9 g
雌 110.1～126.2 g

第 2 期
1999 年 4 月 14 日
雄 33 匹、雌 33 匹
雄 80.7～91.6 g
雌 72.3～84.1 g
1999 年 4 月 22 日
雄 129.9～149.5 g
雌 107.3～130.7 g

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 23.5～25.0℃、51.0～67.5%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、受領した被験物質の水溶液を注射用水（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第1期試験では 10 w/v%溶液を、第2期試験では 13.1 w/v%溶液をそれぞれ調製し、これを注射用水により各濃度に段階希釈し、密栓して投与時まで冷蔵、遮光下で保存し、調製3日後に使用した。

本試験において動物実験に先立ち、0.08 および 10 w/v%の調製検体については8日間、15.00 w/v%の調製検体については4日間の、冷蔵、遮光条件下での安定性を確認した（Appendix A、B）。また、各濃度の投与検体について、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 C、D-1、D-2）。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、ガスクロマトグラフ法により測定した（Appendix E）。

4. 投与量の設定および投与方法

第1期における投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：A-98-022）の結果に基づいて決定した。すなわち、予備試験において 250 mg/kg 投与群で体重増加抑制がみられ、死亡が 500 mg/kg（雄 1 / 3 例、雌 2 / 3 例）および 1000 mg/kg（雄 2 / 3 例、雌全 3 例）の投与で認められたため、片性（雄）について 200、350、600 および 1000 mg/kg（公比約 $\sqrt{3}$ ）の4用量を設定し、雌については、明らかな毒性が発現しかつ死亡しないと考えられる用量として 350 mg/kg の1群を設定して投与を行った（第1期）。

その結果、雄の 1000 mg/kg 投与群で5例、600 mg/kg 投与群で3例、350 mg/kg 投与

群で2例が死亡し、最低用量である 200 mg/kg 投与群でも2例が死亡し、雌でも 350 mg/kg 投与群で1例が死亡した（いずれの群も5例中）。そこで、200 mg/kg 投与群での死亡の再現性を確認するとともに、本被験物質の LD₅₀ を求めることを目的として、雌雄に 125、200、320、512、820 および 1310 mg/kg（公比約 1.6）の用量を追加設定した（第2期）。

投与容量は体重 1 kg 当たり 10 mL とし、動物を投与前日の16時以降絶食させた後、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 9 時39分～9 時53分（第1期）および午前 9 時16分～10時12分（第2期）の間にいき、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
第1期	TMA	200	2	10	1～5	
	TMA	350	3.5	10	6～10	21～25
	TMA	600	6	10	11～15	
	TMA	1000	10	10	16～20	
第2期	TMA	125	1.25	10	101～105	131～135
	TMA	200	2.00	10	106～110	136～140
	TMA	320	3.20	10	111～115	141～145
	TMA	512	5.12	10	116～120	146～150
	TMA	820	8.20	10	121～125	151～155
	TMA	1310	13.10	10	126～130	156～160

5. 観察および検査

第1期および第2期とも、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時間まで連続していき、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。なお、第2期で、赤色尿がみられた例について尿検査試験紙（マルチスティックス®、バイエル・三共株式会社）を用いて潜血および蛋白反応を調べた。

体重は生存した全例について、投与直前、観察第2、4、8、11および15日に測定した。また、死亡例については死亡発見時に体重を測定した。

剖検は、死亡例では死亡発見後可及的速やかに、生存例では観察第15日に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、大腿骨骨髓、舌および病変部の肉眼観察を行った。これらのうち、以下に示した動物の器官を0.1Mリン酸緩衝10%ホルマリン溶液で固定した。

固定器官：

（第1期） 200 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：5）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、脳および大腿骨

600 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：12）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、小腸、大腸および大腿骨

1000 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：16）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃

（第2期） 320 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：114）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、小腸および大腸

512 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：117）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃および大腿骨

512 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：118）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、小腸、精巣および大腿骨

820 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：125）

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および胃

1310 mg/kg 投与群 雄1例（動物番号：129）

胃

512 mg/kg 投与群 雌1例（動物番号：150）

胃

固定した器官のうち、第1期の200 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号：5）の胃および脾臓、600 および 1000 mg/kg 投与群の雄各1例（動物番号：12、16）の胃および小腸、第2期の320 および 512 mg/kg 投与群の雄各1例（動物番号：114、118）の胃、小腸および脾臓、512 mg/kg 投与群の雄1例（動物番号：117）の胃および脾臓、820、1310 mg/kg 投与群の雄各1例（動物番号：125、129）および 512 mg/kg 投与群の雌1例（動物番号：150）の胃について組織学検査を実施した。すなわち、これらの器官を固定後、パラフィン包埋後薄切してヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡を用いてその組織を観察した。

6. データ解析法

体重の測定値については、平均値および標準偏差を求めた。

第1期の雄では、 LD_{50} は算出しなかった。

第2期では、雄については probit 法により LD_{50} を 95%信頼限界と併せて求めたが、雌については死亡率が 0 %または 100%以外の投与群が 3 群以下であったため、 LD_{50} は算出しなかった。

【結 果】

1. 死亡動物

(1)第1期 (Table 1-1)

投与当日に、1000 mg/kg 投与群の雄全例および 600 mg/kg 投与群の雄 3 例が死亡し、観察第 2 日に 350 mg/kg 投与群の雌 1 例、第 6 日に 200 mg/kg 投与群の雄 2 例が、第 7 および 10 日には 350 mg/kg 投与群の雄がそれぞれ 1 例死亡した。

(2)第2期 (Table 1-2)

投与当日に、1310 mg/kg 投与群の雌雄全例、820 mg/kg 投与群の雄 4 例、雌全例、512 mg/kg 投与群の雄 1 例、雌 2 例が死亡した。観察第 2 日には 820 mg/kg 投与群の雄 1 例、観察第 6 日には 512 および 320 mg/kg 投与群の雄各 1 例、観察第 7 および 9 日には 200 mg/kg 投与群の雄がそれぞれ 1 例死亡した。

2. 一般状態

(1)第1期 (Table 2-1～2-2)

雄の 200 mg/kg 投与群では、3 例では特記すべき変化はみられなかったが、2 例で観察第 2 日からラッセル音（呼吸異常音）が観察され、観察第 4 あるいは 5 日に排便量が減少し、観察第 5 日には 2 例で腹部の膨満がみられ、観察第 6 日に死亡した。

雄の 350 mg/kg 投与群では、投与日に 2 例で半眼が、1 例で流涎が認められた。観察第 2 日には、3 例でラッセル音が観察され、2 例では観察第 4 あるいは 6 日に回復したが、1 例ではラッセル音に加えて観察第 4 日から自発運動が減少し、観察第 5 日に排便量が減少し、観察第 6 日には排便がみられず、観察第 7 日に死亡した。一方、他の 1 例では、ラッセル音は観察されなかったが、観察第 6 日から自発運動および排便量が減少し、観察第 9 日に腹部の膨満がみられて観察第 10 日に死亡した。

雄の 600 mg/kg 投与群では、3 例で投与後 1 時間以内から腹臥位、自発運動の減少、半眼あるいは閉眼がみられ、その後、1 例で蒼白が、1 例で体温低下、蒼白および緩徐呼吸が、1 例で歩行失調がみられて死亡した。一方、他の 2 例では投与日に半眼や自発運動の減少、腹臥位、流涎あるいは赤色尿がみられたが、2 例とも観察第 2 日には回復し、その後特記すべき変化はみられなかった。

雄の 1000 mg/kg 投与群では、全例で投与後 1 時間以内に腹臥位、自発運動の減少、半

眼あるいは閉眼がみられ、投与後2～5時間に死亡した。その間、歩行失調が3例で、体温低下が4例で、あえぎ呼吸および流涎が各1例で観察され、死亡前には全例で蒼白がみられた。

雌の350 mg/kg 投与群では、投与日には2例で投与後1時間以内に流涎がみられた以外、特記すべき変化は認められなかったが、観察第2日に1例が死亡した。また、2例で観察第2日からラッセル音が観察され、観察第4日からは自発運動の減少が1例で、排便量の減少が2例でみられたが、これらの症状は観察第15日にはすべて消失した。

(2)第2期 (Table 2-3～2-4)

125 mg/kg 投与群では、雄1例で観察第2および3日にラッセル音が観察された以外、特記すべき変化は認められなかった。

200 mg/kg 投与群では、投与日には雌雄とも特記すべき変化はみられなかったが、観察第2日に雄3例雌1例でラッセル音が観察され、雄2例では観察第3日以降もラッセル音が持続し、排便量の減少や腹部の膨満が観察され、観察第7および9日に死亡した。また、雌の例では観察第3日以降ラッセル音は観察されなかったが、雄1例では観察第3日に一旦回復したものの観察第8日以降観察第15日までラッセル音が認められた。

320 mg/kg 投与群でも、投与日には特記すべき変化はみられなかったが、観察第2日以降ラッセル音が雄2例雌1例で観察された。これらのうち、雄2例ではラッセル音が持続し、排便量の減少や腹部の膨満も観察され、1例は観察第6日に死亡し、1例では観察第10～12日にチアノーゼもみられ、観察第15日までラッセル音は消失しなかった。一方、雌の例では観察第5日以降ラッセル音は観察されなかった。

512 mg/kg 投与群では、投与日に腹臥位が雄全例雌4例で、半眼あるいは閉眼が雄全例雌4例で、自発運動の減少が雄3例雌4例で認められ、雄では鼻汁が、雌では歩行失調、流涙、流涎が観察された例があり、雄1例雌2例が投与後3時間に死亡した。雌の死亡例では、緩徐呼吸、体温低下および蒼白も認められた。また、雌雄各1例で赤色尿が観察され、試験紙法で調べた結果、潜血反応および蛋白反応が強陽性を示した。観察第2日以降、雄では、観察第2日に生存していた全例で排便量の減少がみられ、2例では観察第3日には回復したが、他の2例では観察第5日まで持続した。後者の2例では観察第2あるいは3日からラッセル音が観察され、観察第5日には腹部の膨満が認められ、1例は観察第6日に死亡し、他の1例では観察第15日までラッセル音が持続した。雌では3例で排便量の減少がみられたが、観察第5日以降全例で特記すべき変化は認められなかった。

820 および 1310 mg/kg 投与群では、投与日あるいは観察第 2 日に雌雄全例が死亡したが、投与日にみられた異常所見として、雌雄全例で腹臥位あるいは横臥位が投与後 1 時間以内にみられ、多くの例で自発運動の減少、半眼あるいは閉眼が認められたほか、歩行失調、緩徐呼吸、開口呼吸、呼吸不整、体温低下、蒼白、流涙あるいは流涎が観察された。投与から死亡に至るまでの時間は、投与量の増加に伴って短くなる傾向がみられた。また、鼻汁が 820 mg/kg 投与群の雌雄各 1 例および 1310 mg/kg 投与群の雌 2 例でみられ、これらのうち 820 mg/kg 投与群の雌 1 例および 1310 mg/kg 投与群の雌 2 例では鼻汁が赤色を呈しており、1310 mg/kg 投与群の他の雌 1 例では鼻出血が認められた。さらに、820 mg/kg 投与群の雌 1 例で振戦が、1310 mg/kg 投与群の雄 1 例では潜血反応および蛋白反応が強陽性の赤色尿が、同群の雌 1 例では横転および間代性痙攣がみられた。

3. 体重推移

(1) 第 1 期 (Table 3-1~3-2)

200 mg/kg 投与群の観察第 6 日死亡例の雄 2 例は、観察第 2 日に引き続き観察第 4 日もさらに体重が減少した。

350 mg/kg 投与群の雄における観察第 2 日の平均体重は観察第 1 日とほぼ同じであったが観察第 4 日に体重が減少した例は観察第 7 日に、観察第 8 日に体重減少を示した例は観察第 10 日にそれぞれ死亡した。生存した例ではその後順調な体重増加がみられた。一方、観察第 2 日に体重減少あるいは増加抑制を示した雌においてはその後回復傾向を示したが、観察第 15 日の体重は他の生存 2 例と比較して低値であった。

600 mg/kg 投与群の生存 2 例では、1 例で観察第 2 日に体重増加抑制がみられたが、その後順調に体重は増加した。

(2) 第 2 期 (Table 3-3~3-4)

125 mg/kg 投与群では雌雄とも、観察期間中順調な体重増加がみられた。

200 mg/kg 投与群の雄において、観察第 2 日に 2 例で体重減少が、1 例で体重増加抑制がみられた。体重減少を示した 2 例は観察第 4 日でさらに体重が減少し、1 例は観察第 7 日に死亡し、1 例は観察第 8 日に体重をなおも減少させて観察第 9 日に死亡した。観察第 2 日に体重増加抑制を示した個体は、観察第 4 日に体重が減少し、観察第 8 日には回復傾向を示したが、観察第 11 日に体重がまた減少し、観察第 15 日では生存していた他の 2 例と

比較して大いに低値を示した。雌では、観察第2日に1例が体重増加抑制を示した。

320 mg/kg 投与群では、観察第2および第4日に2例で体重減少がみられ、そのうち1例は観察第6日に死亡し、生存した例では観察第8日に回復傾向がみられたが、観察第11日に体重が減少し、観察第15日では他の生存個体と比較し、低値を示した。雌では、観察第2日に1例が体重増加抑制を示したが、それ以降は順調な体重増加を認め、125 mg/kg 投与群と同等の推移を示した。

512 mg/kg 投与群の雄では、1例が観察第2日および第4日と体重が減少し、観察第6日に死亡した。観察第2日に2例で体重増加抑制がみられ、1例はその後回復したが、1例は観察第4日に体重が減少し、その後の回復も遅れ、観察第15日には他の個体よりかなりの低値を示した。雌においては、観察第2日に1例で体重減少が、2例で体重増加抑制がみられ、体重が減少した例では観察第4日に体重増加抑制がみられた。

4. 病理学検査

(1)第1期 (Table 4-1、5-1)

剖検所見として、観察第2日死亡例の350 mg/kg 投与群の雌1例、投与日死亡例の600 mg/kg 投与群の雄3例および1000 mg/kg 投与群の雄全例で腺胃粘膜の暗色部が観察された。観察第6日以降に死亡した350 および 200 mg/kg 投与群の雄各2例では、胃、腸内にガスが貯留し、350 mg/kg 投与群の雄1例で腹水が認められたほか、200 mg/kg 投与群の雄2例および350 mg/kg 投与群の雄1例の脾臓は小型で淡色化しており、200 mg/kg 投与群および350 mg/kg 投与群の雄各1例では大腿骨骨髓の暗色化が認められた。

観察第15日屠殺例の剖検では、600 mg/kg 投与群の雄2例で前胃粘膜に淡色部がみられた。

組織学検査では、投与日に死亡した1000 mg/kg 投与群の雄1例で十二指腸粘膜に軽度のうっ血がみられ、観察第6日に死亡した200 mg/kg 投与群の雄1例で腺胃粘膜に軽微なうっ血、脾臓の白脾髄の強い萎縮がみられた。観察第15日屠殺例の600 mg/kg 投与群の雄1例では胃腸に著変はみられなかった。

(1)第2期 (Table 4-2～4-3、5-2)

剖検所見として、投与日あるいは観察第2日に死亡した512 mg/kg 投与群の雄1例雌2例、820 および 1310 mg/kg 投与群の雌雄全例で腺胃粘膜の暗色部が観察され、

820 mg/kg 投与群の雄 2 例では前胃粘膜の剥離もみられた。観察第 6 日以降に死亡した 200 mg/kg 投与群の雄 2 例、320 および 512 mg/kg 投与群の雄各 1 例では、胃から盲腸あるいは小腸にガスの貯留がみられ、200 mg/kg 投与群の雄 1 例では腹水が認められたほか、200、320 および 512 mg/kg 投与群の雄各 1 例で脾臓の小型化が、200 mg/kg 投与群の 1 例で肺の気腫が観察された。

観察第15日屠殺例の剖検では、512 mg/kg 投与群の雌 2 例で前胃粘膜に淡色部が観察された。

組織学検査では、投与日に死亡した 1310 mg/kg 投与群の雄 1 例で前胃のびらん、前胃および腺胃粘膜下織の浮腫、観察第 2 日に死亡した 820 mg/kg 投与群の雄 1 例で前胃および腺胃のびらん、前胃および腺胃粘膜下織の浮腫がいずれも軽度に観察された。観察第 6 日に死亡した 512 mg/kg 投与群の雄 1 例では、前胃の潰瘍、前胃粘膜下織の炎症細胞浸潤、腺胃のびらんがそれぞれ軽度にみられたほか、中等度の脾臓の萎縮が認められた。観察第 6 日に死亡した 320 mg/kg 投与群の雄 1 例では、中等度の脾臓の萎縮がみられた。

観察第15日屠殺例の 512 mg/kg 投与群の雄 1 例では、前胃および腺胃粘膜固有層に炎症細胞浸潤、ならびに脾臓に髄外造血がいずれも軽度にみられ、同群の雌 1 例では前胃および腺胃に粘膜の再生が軽度から中等度に、前胃および腺胃の粘膜下織に炎症細胞浸潤、前胃にびらんが軽度に観察された。

5. LD₅₀

第 2 期の雄で算出された LD₅₀ は 396.9 mg/kg で、95%信頼限界は 271.0～580.2 mg/kg であり、雌の LD₅₀ は、512～820 mg/kg の間にあると考えられた。

【考 察】

TMA を 5 週齢の Sprague-Dawley 系 [Crj:CD(SD) IGS, SPF] 雌雄ラットに単回強制経口投与して、単回投与時の TMA の毒性を検討した。

雄では、第 2 期で、200 mg/kg 投与群の 2 例、320 mg/kg 投与群の 1 例、512 mg/kg 投与群の 2 例、820 および 1310 mg/kg 投与群の全例が死亡し、LD₅₀ は 396.9 mg/kg であった。第 1 期では 200 および 350 mg/kg 投与群の各 2 例、600 mg/kg 投与群の 3 例、1000 mg/kg 投与群の全例が死亡したことから、LD₅₀ は第 2 期とほぼ同様の値であると考えられた。雌では、第 1 期では 350 mg/kg 投与群の 1 例が死亡し、第 2 期では 512 mg/kg 以上の投与で死亡が認められたことから LD₅₀ は 500 mg/kg 付近であると推察された。

TMA による死亡例は、雄では 820 mg/kg 以上の投与群でみられた投与日に死亡するグループと、320 mg/kg 以下の投与群でみられた観察第 6 日以降に死亡するグループの二つに分類された。なお、投与翌日に死亡が確認された例は、実際には投与日に死亡した可能性が高く、前者のグループに含まれるものと考えられた。512 mg/kg 投与群では、これら二つのグループのいずれも認められた。雌では、350 mg/kg 以上の投与で投与日あるいは観察第 2 日に死亡例がみられた。

投与日死亡グループでは、投与後速やかに一般状態が悪化し、腹臥位、自発運動の減少、半眼あるいは閉眼が多くの例でみられたほか、歩行失調、流涙あるいは流涎がみられ、死期が近づくと呼吸不整、体温低下、蒼白等を呈した。投与から死亡に至るまでの時間は、投与量の増加に伴って短くなる傾向がみられた。剖検所見では、全例で腺胃粘膜の暗色部が認められ、一部の例で実施した組織学検査では前胃や腺胃のびらん、前胃および腺胃粘膜下組織の浮腫がみられた。これらの所見は、被験物質の水溶液がきわめて強い塩基性を示すことに起因した変化と考えられた。

一方、観察第 6 日以降死亡グループ例では、観察第 2 日以降にラッセル音すなわち呼吸異常音が観察され、死亡日の 1～2 日前には腹部の膨満がみられるのが特徴的であった。剖検所見では、胃や腸にガスが貯留し、腹水の認められる例もあり、直接の死因は胃腸の膨満により横隔膜が圧迫され、呼吸困難に陥ったことによると推察された。呼吸器系の変化としては、200 mg/kg 投与群の 1 例で肺気腫がみられたのみであり、これらのグループでは鼻汁も観察されておらず、ラッセル音の原因は明らかではなかった。胃腸の病理組織

学検査では、胃粘膜にうっ血、びらん、潰瘍、炎症性細胞浸潤等がみられたが、いずれも軽度の変化であり、腸閉塞を疑わせる所見も認められなかった。鼻孔の閉鎖により空気が嚥下され、腸管内に過剰な空気が貯留することが実験的に認められているが³⁾、本試験では鼻腔の閉塞が疑われるような所見は認められず、ガス充満の原因は推察できなかった。また、腹部の膨満に前後して排便量の減少がみられ、体重も減少し、病理学的に脾臓の萎縮が認められた。

なお、512 mg/kg 以上の投与群で、投与日に赤色尿がみられ、試験紙法による検査で蛋白および潜血陽性反応がみられたが、観察第2日以降には観察されておらず、一過性の変化であった。また、剖検により腎臓や膀胱に変化はみられず、その成因は不明であった。

以上のように、TMA の単回投与で観察された死亡例の死に至る経過としては、820 mg/kg 以上の投与群でみられた歩行失調、流涙、流涎、自発運動の減少を伴って約24時間以内に死亡した即発性の変化と、それ以下の投与群でみられた呼吸異常音、腹部の膨満を伴った遅延死が認められたが、いずれも死因を推察することは出来なかった。

本試験条件下における TMA の LD_{50} は、雄では 396.9 mg/kg (95%信頼限界は 271.0~580.2 mg/kg) であり、雌についての LD_{50} は、512~820 mg/kg の間にあると推定された。

【文 献】

- 1) The Merck index. Tvelefth edition. Merck & Co., Inc. (1996) pp.1655
- 2) Air Products and Chemicals, Inc., MSDS . (Cited in NIOSH Report 7, Revised),
Secondary and tertiary aliphatic monoamines, (1981)
- 3) Nakajima K. and Ohi G.: Aerophagia induced by the nasal obstruction on
experimental animals. Exp.Anim., 26(2)149-159 (1977)

Table 1-1 Mortality of rats after single oral administration of TMA in the first stage

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Hours after administration						Days of observation															Total
			0 ~ 1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Male	200	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 / 5	
	350	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	2 / 5	
	600	5	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 / 5	
	1000	5	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 / 5	
Female	350	5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 / 5	

The first day, the day of administration.

Table 1-2 Mortality of rats after single oral administration of TMA in the second stage

Sex	Dose (mg/kg)	No. of animals	Hours after administration						Days of observation															Total
			0 ~ 1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Male	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5	
	200	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2 / 5	
	320	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 / 5	
	512	5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 / 5	
	820	5	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 / 5	
	1310	5	0	0	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 / 5	
Female	125	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5	
	200	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5	
	320	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 / 5	
	512	5	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 / 5	
	820	5	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 / 5	
	1310	5	1	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5 / 5	

The first day, the day of administration.

Table 2-1 Clinical findings in male rats after single oral administration of TMA in the first stage

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	11	12	13	14	15	
200	1	No abnormality																					
	2	No abnormality																					
	3	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+											
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
													D										
	4	No abnormality																					
	5	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+											
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+											
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+											
													D										
350	6	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+							
		Incomplete eyelid opening	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
		Salivation	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+							
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+							
																	D						
	7	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	8	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+									
		Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+										
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-										
		No-feces	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+										
													D										
	9	Incomplete eyelid opening	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	10	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-1 (Continued-1)

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	11	12	13	14	15	
600	11	Prone position	+	+	+	+																	
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+																	
		Bradypnea	-	-	-	+																	
		Hypothermia	-	-	+	+																	
		Pale skin	-	-	+	+																	
		Incomplete eyelid opening	+	+	+	+																	
								D															
	12	Decrease in locomotor activity	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Incomplete eyelid opening	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	13	Prone position	+	+	+	+	+																
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+	+																
		Ataxic gait	-	-	-	+	+																
		Incomplete eyelid opening	+	+	+	+	+																
		Eyelid closure	+	-	-	-	-																
								D															
	14	Prone position	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in locomotor activity	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Lacrimation	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Incomplete eyelid opening	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Red urine	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	15	Prone position	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+																			
		Pale skin	-	+																			
		Incomplete eyelid opening	+	+																			
		Eyelid closure	+	-																			
							D																

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-1 (Continued-2)

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	11	12	13	14	15	
1000	16	Prone position	+	+	+	+																	
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+																	
		Ataxic gait	+	-	-	-																	
		Hypothermia	-	-	-	+																	
		Pale skin	-	-	-	+																	
		Incomplete eyelid opening	+	-	-	+																	
		Eyelid closure	+	+	+	-																	
							D																
	17	Prone position	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+																			
		Hypothermia	-	+																			
		Pale skin	-	+																			
		Incomplete eyelid opening	+	+																			
						D																	
	18	Prone position	+	+	+	+	+																
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+	+																
		Gasping	-	-	-	-	+																
		Hypothermia	-	+	+	+	+																
		Pale skin	-	+	-	+	+																
		Incomplete eyelid opening	+	-	-	+	+																
Eyelid closure		+	+	+	-	-																	
Salivation		-	+	-	-	-																	
					D																		
19	Prone position	+	+																				
	Decrease in locomotor activity	+	+																				
	Ataxic gait	+	-																				
	Pale skin	-	+																				
	Incomplete eyelid opening	+	-																				
	Eyelid closure	+	+																				
				D																			
20	Prone position	+	+	+																			
	Decrease in locomotor activity	+	+	+																			
	Ataxic gait	+	-	-																			
	Hypothermia	-	+	+																			
	Pale skin	-	+	+																			
	Incomplete eyelid opening	+	-	-																			
	Eyelid closure	-	+	+																			
					D																		

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 2-2 Clinical findings in female rats after single oral administration of TMA in the first stage

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	11	12	13	14	15	
350	21	Salivation	+	-	-	-	-	-	D														
	22	No abnormality																					
	23	Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	24	Salivation	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
		Decrease in feces volume	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	No abnormality																						

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 2-3 Clinical findings in male rats after single oral administration of TMA in the second stage

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	11	12	13	14	15	
125	101	No abnormality																					
	102	No abnormality																					
	103	No abnormality																					
	104	No abnormality																					
	105	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
200	106	Rale	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	
	107	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+								
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+								
		Decrease in feces volume								-	-	-	+	+	+	+							
320	108	No abnormality																					
	109	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+										
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+										
		Decrease in feces volume								-	+	+	+	+									
320	110	No abnormality																					
	111	No abnormality																					
	112	No abnormality																					
	113	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Cyanosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Decrease in feces volume								-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-		
320	114	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+										
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+										
		Decrease in feces volume								-	-	-	+	+									

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-3 (Continued-1)

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	11	12	13	14	15	
512	116	Prone position	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in locomotor activity	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Incomplete eyelid opening	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in feces volume							+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	117	Prone position	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Rale	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		Incomplete eyelid opening	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Eyelid closure	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Red urine	-	-	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Nasal discharge	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in feces volume								+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	118	Prone position	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-										
		Decrease in locomotor activity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+										
		Rale	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+										
		Incomplete eyelid opening	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-										
		Abdominal distention	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+										
119	Decrease in feces volume								+	+	+	+											
	Prone position	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Decrease in locomotor activity	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Incomplete eyelid opening	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
120	Decrease in feces volume								+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Prone position	+	+																				
120	Incomplete eyelid opening	-	+																				
D																							
D																							

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

*, Severe in occult blood and protein action.

(continued)

Table 2-3 (Continued-2)

[illegible]

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-3 (Continued-3)

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	11	12	13	14	15			
1310	126	Prone position	+	+	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+	+	+																			
		Lacrimation	—	—	—	+																			
		Incomplete eyelid opening	+	—	+	+																			
		Red urine	—	—	—	—	+	*																	
							D																		
	127	Prone position	+	+																					
		Decrease in locomotor activity	+	+																					
		Eyelid closure	+	+																					
							D																		
	128	Prone position	+	—																					
		Side position	+	+																					
		Irregular respiration	—	+																					
		Eyelid closure	+	+																					
		Salivation	+	—																					
							D																		
	129	Prone position	+	+																					
		Decrease in locomotor activity	+	+																					
		Lacrimation	+	—																					
		Eyelid closure	—	+																					
							D																		
130	Prone position	+	+																						
	Decrease in locomotor activity	+	+																						
	Lacrimation	+	—																						
	Eyelid closure	+	+																						
						D																			

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

*, Severe in occult blood and protein action.

Table 2-4 Clinical findings in female rats after single oral administration of TMA in the second stage

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	11	12	13	14	15	
125	131	No abnormality																					
	132	No abnormality																					
	133	No abnormality																					
	134	No abnormality																					
	135	No abnormality																					
200	136	No abnormality																					
	137	No abnormality																					
	138	No abnormality																					
	139	No abnormality																					
	140	Rale	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
320	141	No abnormality																					
	142	No abnormality																					
	143	No abnormality																					
	144	Rale	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	145	No abnormality																					

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-4 (Continued-1)

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	11	12	13	14	15	
512	146	Ataxic gait	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Decrease in feces volume								+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	147	Prone position	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+																			
		Ataxic gait	+	-																			
		Bradypnea	-	+																			
		Hypothermia	-	+																			
		Pale skin	-	+																			
		Eyelid closure	+	+																			
		Salivation	+	-																			
					D																		
		148	Prone position	+	+																		
			Decrease in locomotor activity	+	+																		
			Bradypnea	-	+																		
			Hypothermia	-	+																		
			Pale skin	-	+																		
			Incomplete eyelid opening	+	-																		
			Eyelid closure	-	+																		
						D																	
		149	Prone position	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Decrease in locomotor activity	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Ataxic gait	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Lacrimation	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Incomplete eyelid opening	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Red urine	-	-	-	-	-	+	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Decrease in feces volume								+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		150	Prone position	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Decrease in locomotor activity	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Ataxic gait	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Lacrimation	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Incomplete eyelid opening	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Salivation	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			Decrease in feces volume								+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.
 *, Severe in occult blood and protein action.

(continued)

Table 2-4 (Continued-2)

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	11	12	13	14	15	
820	151	Prone position	+	+	+																		
		Decrease in locomotor activity	+	+	+																		
		Lacrimation	-	-	+																		
		Eyelid closure	+	+	+																		
								D															
	152	Prone position	+	+	+																		
		Decrease in locomotor activity	+	+	+																		
		Incomplete eyelid opening	+	+	+																		
								D															
	153	Prone position	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+																			
		Bradypnea	-	+																			
		Gasping	-	+																			
		Incomplete eyelid opening	+	-																			
								D															
	154	Prone position	+	+	+																		
		Decrease in locomotor activity	+	+	+																		
		Incomplete eyelid opening	+	+	+																		
		Reddish nasal discharge	-	+	+																		
								D															
	155	Prone position	+	+																			
		Decrease in locomotor activity	+	+																			
		Ataxic gait	+	-																			
		Tremor	+	-																			
		Pale skin	+	+																			
		Hypothermia	-	+																			
		Incomplete eyelid opening	+	+																			
							D																

+, positive; -, negative; D, death; The first day, the day of administration.

(continued)

Table 2-4 (Continued-3)

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	11	12	13	14	15	
1310	156	Prone position	+	+	+																		
		Decrease in locomotor activity	+	+	+																		
		Bradypnea	—	—	+																		
		Gasping	+	—	—																		
		Hypothermia	—	—	+																		
		Eyelid closure	—	+	+																		
		Reddish nasal discharge	+	—	—																		
								D															
	157	Prone position	+																				
		Rolling	+																				
		Clonic convulsion	+																				
		Hypothermia	+																				
		Reddish nasal discharge	+																				
								D															
	158	Prone position	+																				
		Decrease in locomotor activity	+																				
		Ataxic gait	+																				
		Incomplet eyelid opening	+																				
								D															
	159	Prone position	+																				
		Decrease in locomotor activity	+																				
								D															
	160	Prone position	+	+																			
		Gasping	+	+																			
		Nasal hemorrhage	+	+																			
		Incomplet eyelid opening	—	+																			
								D															

+, positive; —, negative; D, death; The first day, the day of administration.

Table 3-1 Body weight changes in male rats after single oral administration of TMA in the first stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period					
		1 *	2	4	8	11	15
200	1	129.3	149.6	172.4	215.8	244.3	279.6
	2	135.4	154.6	179.0	223.2	247.4	286.7
	3	138.7	130.3	111.0 (100.6) [6]	—	—	—
	4	138.9	164.9	181.1	220.6	246.8	280.7
	5	134.7	122.9	102.9 (90.6) [6]	—	—	—
	Mean	135.4	144.5	149.3	219.9	246.2	282.3
350	S. D.	3.9	17.4	38.9	3.8	1.6	3.8
	6	139.6	130.9	131.6	110.3 (103.1) [10]	—	—
	7	136.5	137.2	161.3	203.7	227.8	262.8
	8	133.4	136.1	108.6 (98.1) [7]	—	—	—
	9	139.3	149.4	169.6	215.7	244.2	282.9
	10	135.2	129.4	138.1	195.2	230.1	277.0
600	Mean	136.8	136.6	141.8	181.2	234.0	274.2
	S. D.	2.7	7.9	24.4	48.0	8.9	10.3
	11	132.3 (131.6) [1]	—	—	—	—	—
	12	131.8	148.2	176.5	217.4	246.2	289.4
	13	139.5 (139.3) [1]	—	—	—	—	—
	14	134.5	137.5	160.1	198.6	224.9	267.0
1000	15	137.3 (136.1) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	135.1	142.9	168.3	208.0	235.6	278.2
	S. D.	3.3	—	—	—	—	—
	16	133.5 (132.3) [1]	—	—	—	—	—
	17	129.3 (128.5) [1]	—	—	—	—	—
	18	134.4 (132.7) [1]	—	—	—	—	—
1000	19	144.9 (143.9) [1]	—	—	—	—	—
	20	129.9 (129.8) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	134.4	—	—	—	—	—
	S. D.	6.3	—	—	—	—	—

*, the day of administration; unit, g; (), body weight at death; [], died day

Table 3-2 Body weight changes in female rats after single oral administration of TMA in the first stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period					
		1 *	2	4	8	11	15
350	21	112.4	(103.4) [2]	—	—	—	—
	22	116.8	134.6	149.2	167.5	179.1	189.8
	23	116.5	115.1	100.2	102.7	134.5	166.8
	24	126.2	126.8	132.0	144.1	168.8	180.4
	25	110.1	122.0	143.3	162.4	176.3	190.3
	Mean	116.4	124.6	131.2	144.2	164.7	181.8
	S. D.	6.2	8.2	21.8	29.4	20.6	11.0

*, the day of administration; unit, g; (), body weight at death; [], died day

Table 3-3 Body weight changes in male rats after single oral administration of TMA in the second stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period					
		1 *	2	4	8	11	15
125	101	144.3	166.6	187.3	222.2	250.4	293.9
	102	146.1	157.7	189.8	234.7	263.7	305.8
	103	138.1	162.0	183.0	221.1	244.5	280.1
	104	138.5	156.4	178.3	216.5	242.6	270.5
	105	132.0	142.9	160.6	192.7	213.1	242.4
	Mean	139.8	157.1	179.8	217.4	242.9	278.5
	S. D.	5.6	8.9	11.6	15.4	18.6	24.2
200	106	137.4	142.5	115.8	162.6	153.6	203.9
	107	144.8	134.6	113.2	99.3 (101.4) [9]	—	—
	108	139.8	158.8	178.7	221.8	248.5	286.2
	109	142.6	130.0	114.2 (99.5) [7]	—	—	—
	110	137.9	161.4	185.5	229.3	256.1	299.0
	Mean	140.5	145.5	141.5	178.3	219.4	263.0
	S. D.	3.2	14.1	37.2	60.5	57.1	51.6
320	111	142.1	168.8	187.7	230.8	258.6	298.7
	112	139.2	163.0	184.7	231.0	261.9	301.5
	113	134.1	129.3	107.1	148.5	119.9	163.1
	114	141.7	128.4	104.0 (91.1) [6]	—	—	—
	115	144.2	164.6	186.5	221.2	247.3	284.5
	Mean	140.3	150.8	154.0	207.9	221.9	262.0
	S. D.	3.9	20.2	44.3	39.8	68.3	66.3
512	116	149.5	168.3	193.5	244.9	275.3	316.7
	117	142.5	143.4	128.6	169.7	165.5	180.1
	118	145.5	135.6	113.4 (96.6) [6]	—	—	—
	119	136.7	138.0	165.2	206.6	237.0	271.6
	120	134.9 (134.6) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	141.8	146.3	150.2	207.1	225.9	256.1
	S. D.	6.1	15.0	36.2	37.6	55.7	69.6
820	121	132.1 (132.2) [1]	—	—	—	—	—
	122	141.6 (140.6) [1]	—	—	—	—	—
	123	136.6 (136.6) [1]	—	—	—	—	—
	124	141.0 (141.0) [1]	—	—	—	—	—
	125	146.1 (141.5) [2]	—	—	—	—	—
	Mean	139.5	—	—	—	—	—
	S. D.	5.3	—	—	—	—	—
1310	126	141.2 (140.8) [1]	—	—	—	—	—
	127	129.9 (129.8) [1]	—	—	—	—	—
	128	142.5 (142.0) [1]	—	—	—	—	—
	129	137.4 (137.0) [1]	—	—	—	—	—
	130	145.6 (146.2) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	139.3	—	—	—	—	—
	S. D.	6.0	—	—	—	—	—

*, the day of administration; unit, g; (), body weight at death; [], died day

Table 3-4 Body weight changes in female rats after single oral administration of TMA in the second stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Days of observation period					
		1 *	2	4	8	11	15
125	131	124.7	146.3	165.4	185.4	198.3	215.5
	132	119.4	143.0	159.1	181.5	195.4	216.6
	133	112.9	135.6	151.6	174.1	185.8	204.6
	134	122.3	142.5	159.6	180.6	193.4	212.1
	135	114.3	134.5	148.1	167.7	176.0	195.4
	Mean	118.7	140.4	156.8	177.9	189.8	208.8
	S. D.	5.1	5.1	6.9	7.0	9.0	8.9
200	136	117.0	139.3	156.4	182.9	196.0	221.2
	137	130.7	150.8	167.1	191.0	209.6	230.6
	138	118.4	138.4	154.6	176.8	190.0	206.4
	139	125.3	147.8	162.1	183.7	204.2	227.3
	140	113.9	119.9	136.2	153.2	162.3	176.1
	Mean	121.1	139.2	155.3	177.5	192.4	212.3
	S. D.	6.8	12.1	11.7	14.5	18.4	22.3
320	141	122.5	145.0	162.0	178.5	187.7	210.2
	142	115.9	135.7	152.4	167.8	179.3	192.6
	143	120.6	135.8	153.5	176.0	187.0	208.4
	144	113.3	121.6	139.6	164.6	173.3	188.7
	145	127.7	150.4	167.7	193.8	209.1	232.8
	Mean	120.0	137.7	155.0	176.1	187.3	206.5
	S. D.	5.6	11.0	10.7	11.4	13.6	17.5
512	146	121.5	132.2	153.0	178.0	189.9	213.1
	147	120.7 (121.5) [1]	—	—	—	—	—
	148	107.3 (110.1) [1]	—	—	—	—	—
	149	125.0	128.8	152.3	186.1	197.1	222.4
	150	115.4	107.8	113.3	147.0	162.4	180.2
	Mean	118.0	122.9	139.5	170.4	183.1	205.2
	S. D.	6.9	13.2	22.7	20.6	18.3	22.2
820	151	126.2 (125.1) [1]	—	—	—	—	—
	152	122.6 (122.3) [1]	—	—	—	—	—
	153	121.2 (121.4) [1]	—	—	—	—	—
	154	112.7 (112.2) [1]	—	—	—	—	—
	155	124.5 (124.8) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	121.4	—	—	—	—	—
	S. D.	5.2	—	—	—	—	—
1310	156	122.1 (121.5) [1]	—	—	—	—	—
	157	127.4 (126.2) [1]	—	—	—	—	—
	158	113.6 (113.9) [1]	—	—	—	—	—
	159	119.1 (120.0) [1]	—	—	—	—	—
	160	116.9 (116.3) [1]	—	—	—	—	—
	Mean	119.8	—	—	—	—	—
	S. D.	5.3	—	—	—	—	—

*, the day of administration; unit, g; (), body weight at death; [], died day

Table 4-1 Macroscopic findings in male and female rats after single oral administration of TMA in the first stage

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
Male	200	1	General	No abnormality
		2	General	No abnormality
		3 (D, 6)	Spleen	Pale, small
			Stomach and intestine	Accumulation, gas, lumen
			Bone marrow of femur	Dark
		4	General	No abnormality
	350	5 (D, 6)	Spleen	Pale, small
			Stomach and intestine	Accumulation, gas, lumen
		6 (D, 10)	Stomach and intestine	Accumulation, gas, lumen
			Abdominal cavity	Ascites (reddish, 0.5mL)
		7	General	No abnormality
		8 (D, 7)	Spleen	Pale, small
			Stomach and intestine	Accumulation, gas, lumen
			Bone marrow of femur	Dark
		9	General	No abnormality
		10	General	No abnormality
	600	11 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		12	Stomach	Area, pale, mucosa, forestomach
		13 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		14	Stomach	Area, pale, mucosa, forestomach
		15 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	1000	16 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		17 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		18 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		19 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		20 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
Female	350	21 (D, 2)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
		22	General	No abnormality
		23	General	No abnormality
		24	General	No abnormality
		20	General	No abnormality

(D, number), death and died day

Table 4-2 Macroscopic findings in male rats after single oral administration of TMA in the second stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
125	101	General	No abnormality
	102	General	No abnormality
	103	General	No abnormality
	104	General	No abnormality
	105	General	No abnormality
200	106	General	No abnormality
	107 (D, 9)	Lung	Emphysema
		Spleen	Small
		Stomach ~ cecum	Accumulation, gas, lumen
	108	Abdominal cavity	Ascites (clear)
		General	No abnormality
	109 (D, 7)	Stomach ~ cecum	Accumulation, gas, lumen
	110	General	No abnormality
320	111	General	No abnormality
	112	General	No abnormality
	113	General	No abnormality
	114 (D, 6)	Spleen	Small
		Stomach ~ cecum	Accumulation, gas, lumen
	115	General	No abnormality
512	116	General	No abnormality
	117	General	No abnormality
	118 (D, 6)	Spleen	Small
		Small intestine	Accumulation, gas, lumen
	119	General	No abnormality
	120 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
820	121 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	122 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
			Detachment, mucosa, forestomach
	123 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	124 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	125 (D, 2)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
			Detachment, mucosa, forestomach

(D, number), death and day

(continued)

Table 4-2 (Continued)

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
1310	126 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	127 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	128 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	129 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	130 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach

(D, number), death and died day

Table 4-3 Macroscopic findings in female rats after single oral administration of TMA in the second stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
125	131	General	No abnormality
	132	General	No abnormality
	133	General	No abnormality
	134	General	No abnormality
	135	General	No abnormality
200	136	General	No abnormality
	137	General	No abnormality
	138	General	No abnormality
	139	General	No abnormality
	140	General	No abnormality
320	141	General	No abnormality
	142	General	No abnormality
	143	General	No abnormality
	144	General	No abnormality
	145	General	No abnormality
512	146	General	No abnormality
	147 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	148 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	149	Stomach	Area, pale, mucosa, forestomach
	150	Stomach	Area, pale, mucosa, forestomach
820	151 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	152 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	153 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	154 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	155 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
1310	156 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	157 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	158 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	159 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach
	160 (D, 1)	Stomach	Area, dark, mucosa, glandular stomach

(D, number), death and died day

Table 5-1 Histopathological findings in male rats after single oral administration of TMA in the first stage

Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
200	5 (D, 6)	Stomach Spleen	Congestion, mucosa, glandular stomach ($\pm$) Atrophy, white pulp (+++)
600	12	Stomach Duodenum Jejunum Ileum Colon	No abnormality No abnormality No abnormality No abnormality No abnormality
1000	16 (D, 1)	Stomach Duodenum	No abnormality Congestion, mucosa (+)

(D, number), death and died day; $\pm$, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe

Table 5-2 Histopathological findings in male and female rats after single oral administration of TMA in the second stage

Sex	Dose (mg/kg)	Animal No.	Organ	Findings
Male	320	114 (D, 6)	Spleen Stomach Small intestine	Atrophy (++) No abnormality No abnormality
	512	117	Spleen Stomach	Hematopoiesis, extramedullary (+) Cellular infiltration, inflammatory, lamina propria, forestomach (+) Cellular infiltration, inflammatory, lamina propria, glandular stomach (+)
		118 (D, 6)	Spleen Stomach	Atrophy (++) Ulcer, forestomach (+) Cellular infiltration, inflammatory, submucosa, forestomach (+) Erosion, glandular stomach (+)
			Small intestine	No abnormality
	820	125 (D, 2)	Stomach	Erosion, forestomach (+) Edema, submucosa, forestomach (+) Erosion, glandular stomach (+) Edema, submucosa, glandular stomach (+)
	1310	129 (D, 1)	Stomach	Erosion, forestomach (+) Edema, submucosa, forestomach (+) Edema, submucosa, glandular stomach (+)
Female	512	150	Stomach	Erosion, forestomach (+) Regeneration, mucosa, forestomach (+) Cellular infiltration, inflammatory, submucosa, forestomach (+) Regeneration, mucosa, glandular stomach (++) Cellular infiltration, inflammatory, submucosa, glandular stomach (+)

(D, number), death and died day; ±, very slight; +, slight; ++, moderate; +++, severe