1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのラットを用いる単回経口投与毒性試験

最　終　報　告　書

作成日　２０００年８月２９日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約 …… 8
緒言 …… 9
方法
1.被験物質および媒体 …… 9
2.投与検体および濃度確認 …… 9
3.使用動物および飼育条件 …… 10
4.投与経路，投与方法，群構成および投与量 …… 11
5.観察および検査項目 …… 11
6.統計学的方法 …… 12
結果および考察
1.死亡状況および一般状態 …… 12
2.体重 …… 12
3.剖検 …… 12
文献 …… 13

Attachment, Table, Fig. および Appendix の目次

Table 1 Mortality and LD_{50} value of rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 16

Table 2 General signs of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 17

Table 3 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 18

Table 4 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 19

Table 5 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 20

Table 6 Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 21

Table 7 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 22

Fig.1 Chemical structure of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 23

Fig.2 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 24

Fig.3 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)- 25

要約

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンを雌雄ラット各群5例に1回経口投与し，その毒性について検討した．投与量はOECD毒性試験ガイドラインにより限界用量とされている2000 mg/kgを高用量とし，以下公比2により1000および500 mg/kgとした．対照として媒体(注射用水)投与群を設けた．

1) 死亡状況および一般状態

死亡例は，いずれの群にも認められなかった．一般状態観察において，いずれの群の雌雄とも投与による変化はみられなかった．

2) 体重

各投与群の雌雄とも，投与による変化はみられなかった．

3) 剖検

いずれの群の雌雄においても，異常はみられなかった．

以上の結果から，1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのLD_{50}値は，雌雄とも2000 mg/kg以上と考えられる．

緒言

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン(CAS No.839-90-7)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test (401) に従って，1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンを雌雄ラットに 1 回経口投与して，その毒性について検討した．

方法

1.被験物質および媒体

被験物質の1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオン(CAS No.839-90-7)は，Fig.1に示す化学構造を有し，分子量：261.24，融点：135 ℃であり，融点以上の温度(180 ℃，3 mmHg)で分解し，沸点に至らない．分解温度は135 ℃であり，また，水(120 g/100 g，25 ℃)，アセトン(1.9 g/100 g，25 ℃)そしてメタノール(20 g/100 g，25 ℃)に溶解する非揮発性白色結晶粉末である．当試験には，1998年10月1日に厚生省生活衛生局企画課　生活化学安全対策室から提供されたものを用いた[製造元：　　，Lot No.　　純度：99.0 %，ただし，不純物として，イソシアヌル酸を含む]．入手後は，試験施設の被験物質保管庫に室温・遮光条件下で保管した．なお，反復投与・生殖発生毒性併合試験の投与期間の終了後に当試験施設での保管分を除いた残余被験物質は　　に返却し，その一部について分析した結果，使用期間中の安定性が確認された．

媒体として，注射用水を用いた．注射用水(株式会社大塚製薬工場，Lot No.8I79N，入手日：1998年11月26日，使用期限：2003年9月)は，入手後，試験施設の被験物質保管室に室温条件下で保管した．

2.投与検体および濃度確認

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは，各濃度ごとに注射用水で溶解して調製した．なお，2，20および200 mg/mLの調製液は，室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されている[1)] (Attachment 1)．各濃度の調製液は，用時調製とし、調製後6時間以内に使用した．投与後の残余投与検体は廃棄した．なお，被験物質は純度による換算を行なわなかった．

投与に使用した各投与検体中の被験物質濃度を試験施設内で高速液体クロマトグラフを用いて測定した．その結果，被験物質濃度は表示濃度の99.6～100.6 %であり，濃度に問題はなかった(Attachment 2)．

3.使用動物および飼育条件

1) 動物種および系統

試験には，毒性試験に一般的に用いられている動物種で，その系統維持が明らかであり集積データも揃っているSprague-Dawley系雌雄ラット［(SPF), Crj : CD(SD)IGS］を用いた．動物は，1999年3月17日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から4週齢で雌雄各31匹を購入した．入手後1日の体重範囲は，雄が77～87 g，雌が73～82 gであった．

2) 検疫および馴化，群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は，5日間の検疫期間およびその後2日間の馴化期間を設けた．この間に，4回の体重測定および毎日一般状態の観察を行って，検疫・馴化とし，一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた．

群分けは，コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に，無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った．また，個々の動物の体重が平均体重の±20 %を越えていないことを確認した．群分け後の残余動物は，投与翌日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した．

動物の個体識別は，検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法および色素塗布法を，群分け後は色素塗布法および耳パンチ法を併用して行った．さらに，検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号，入手年月日，性別および検疫・馴化動物番号を記入したラベルを，群分け後の各ケージには試験番号，投与量，性別および動物番号を記入し，群ごとに色分けしたラベルを取り付けた．

3) 環境条件および飼育管理

動物は，室温20～26 ℃(実測値：21～22 ℃)，湿度40～70 %(実測値：53～67 %)，明暗各12時間(照明：午前6時～午後6時)，換気回数12回／時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持されている飼育室(E棟7号室)で飼育した．

検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中はステンレス製懸垂式ケージ(W：240×D：380×H：200 mm)を用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし，群分け後はステンレス製五連ケージ(W：755×D：210×H：170 mm)を用いて個別飼育した．ケージの受け皿および給水瓶の交換は1週間に2回以上，ステンレス製五連ケージならびに給餌器の交換は2週間に1回以上行った．なお，動物飼育室の清掃（床の掃き掃除）および0.02%次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った．

4) 飼料および飲料水

飼料は，入手後3カ月以内の固型飼料（CRF-1，オリエンタル酵母工業株式会社）を給餌器に入れ，自由に摂取させた．ただし，投与前日の夕刻(午後3時20分)から投与までの約20時間と投与後約6時間まで絶食させ，その後に飼料を与えた．使用した飼料の分析結果は，財団法人日本食品分析センターおよびオリエンタル酵母工業株式会社で実施した成績を入手した．

飲料水は，水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた．ただし，群分け時から投与後約6時間までは絶水させ，その後に飲料水を与えた．飲料水の水質検査結果は，ほぼ6カ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した．

飼料および飲料水の検査結果は，いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった．

4.投与経路，投与方法，群構成および投与量

1）投与経路および投与方法

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンは，経口的に人に摂取される可能性が考えられるため，投与経路として経口投与を選択した．

投与に際しては，経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒を用いて，強制経口投与した．投与液量は，投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した．投与時刻は午前11時13分～11時34分の間で，投与回数は1回とした．

投与日の週齢は5週齢であり，体重範囲は雄が104～113 g，雌が95～101 gであった．

2）群構成および投与量

群構成は，下記のように被験物質投与群として3群を設定し，その他に対照群を設けた．1群の動物数は，雌雄それぞれ5匹とした．

群	試験群	投与量（濃度）	動物数(動物番号) 雄	動物数(動物番号) 雌
第1群	対照(注射用水)	0 mg/kg (0 mg/mL)	5(001～005)	5(051～055)
第2群	1,3,5-ﾄﾘｽ(2-ﾋﾄﾞﾛｷｼｴﾁﾙ)-1,3,5-ﾄﾘｱｼﾞﾝ-2,4,6-(1H,3H,5H)-ﾄﾘｵﾝ	500 mg/kg (50 mg/mL)	5(101～105)	5(151～155)
第3群	1,3,5-ﾄﾘｽ(2-ﾋﾄﾞﾛｷｼｴﾁﾙ)-1,3,5-ﾄﾘｱｼﾞﾝ-2,4,6-(1H,3H,5H)-ﾄﾘｵﾝ	1000 mg/kg (100 mg/mL)	5(201～205)	5(251～255)
第4群	1,3,5-ﾄﾘｽ(2-ﾋﾄﾞﾛｷｼｴﾁﾙ)-1,3,5-ﾄﾘｱｼﾞﾝ-2,4,6-(1H,3H,5H)-ﾄﾘｵﾝ	2000 mg/kg (200 mg/mL)	5(301～305)	5(351～355)

1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのラット経口投与時のLD_{50}値は10000 mg/kg以上との報告がある[2]．そこで，当試験では，OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity Test (401) で限界用量とされている2000 mg/kgを高用量とし，以下公比2により1000および500 mg/kg群を設定した．また，対照として媒体(注射用水)のみを同容量投与する群を設けた．

5.観察および検査項目

1）観察期間

投与後14日間とした．

2）一般状態

投与日は投与前および投与後6時間(投与直後～投与後30分，投与後2，4および6時間)まで，投与翌日からの観察期間中は1日1回，一般状態および死亡の有無を観察した．

3) 体重測定

投与日(投与直前)および投与後1, 3, 7, 10ならびに14日に測定した.

4) 剖検

生存動物は観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した.

6.統計学的方法

当試験では, 死亡例は認められなかったことから, LD_{50}値は概略の範囲を推定した.

有意差検定は下記のように, 対照群と各投与群の間で行い, 危険率を5 %とし, 5 %未満($p<0.05$)と1 %未満($p<0.01$)とに分けて表示した.

〈検定方法〉

体重は, 各群で平均値および標準偏差を算出した. その後, Bartlett法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い, 有意ならばDunnett法により行った. 一方, 等分散と認められなかった場合は, 順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い, 有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った.

結果および考察

1.死亡状況および一般状態(Table 1～3, Appendix 1-1～1-4 および 2-1～2-4)

いずれの群の雌雄においても, 死亡例は認められなかった. 1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンのLD_{50}値は, 雌雄とも2000 mg/kg以上と考えられた.

一般状態の観察において, いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった.

2.体重(Table 4 および 5, Fig.2 および 3, Appendix 3-1～3-4 および 4-1～4-4)

各投与群の雌雄とも, 対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった.

3.剖検(Table 6 および 7, Appendix 5-1～5-4 および 6-1～6-4)

いずれの群の雌雄においても, 異常はみられなかった.

以上のように, 1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンはOECD毒性試験ガイドラインで限界用量とされている2000 mg/kgを投与しても, 雌雄ともに死亡例は認められず, LD_{50}値は雌雄とも2000 mg/kg以上と考えられる.

文献

1)　　：1,3,5-トリス(2-ヒドロキシエチル)-1,3,5-トリアジン-2,4,6-(1H,3H,5H)-トリオンの調製液の安定性確認試験(試験番号：401118P)(株式会社日本バイオリサーチセンター　羽島研究所)

2) 日産化学工業株式会社　社内資料(製品安全データシート)

Table 1 Mortality and LD_{50} value of rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Sex	Group (mg/kg)		Number of animals	Number of deaths																		Total number of deaths	LD_{50} (mg/kg)
				Hours after administration				Days after administration															
				0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		
Male	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD_{50}>2000
	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Female	Control	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	LD_{50}>2000
	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		2000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Table 2 General signs of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group (mg/kg)		Number of males and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris (2-hydroxyethyl)-	500	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 3 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group (mg/kg)		Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration													
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Control	0	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione, 1,3,5-tris (2-hydroxyethyl)-	500	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 4 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group	Control	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-		
(mg/kg)	0	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5
Days after administration 0	109.2 ± 2.9	109.2 ± 2.4	108.6 ± 3.0	109.0 ± 2.7
1	125.8 ± 3.3	126.2 ± 2.6	123.0 ± 3.5	124.8 ± 3.1
3	149.2 ± 6.5	149.6 ± 4.2	145.4 ± 3.0	147.2 ± 6.5
7	182.2 ± 9.0	190.6 ± 7.3	177.6 ± 6.9	183.8 ± 8.4
10	199.6 ± 12.5	207.4 ± 6.5	198.2 ± 7.9	202.0 ± 8.6
14	230.0 ± 21.9	244.0 ± 11.4	231.6 ± 7.3	238.2 ± 12.8

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 5 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group		Control	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-		
(mg/kg)		0	500	1000	2000
Number of females		5	5	5	5
Days after administration	0	97.8 ± 2.6	97.6 ± 2.1	97.4 ± 2.1	97.6 ± 2.1
	1	111.2 ± 2.9	112.0 ± 3.0	111.8 ± 2.8	112.0 ± 2.2
	3	130.2 ± 3.3	129.4 ± 4.1	129.6 ± 3.6	132.8 ± 3.6
	7	152.0 ± 5.1	156.0 ± 4.2	153.8 ± 3.0	155.8 ± 5.5
	10	163.2 ± 9.1	164.2 ± 4.8	165.2 ± 3.9	164.4 ± 8.0
	14	179.4 ± 11.4	184.4 ± 3.9	184.2 ± 3.7	181.4 ± 11.2

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 6 Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group	Control	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-		
(mg/kg)	0	500	1000	2000
Number of males	5	5	5	5
Findings Normal	5	5	5	5

Table 7 Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

Group	Control	1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-		
(mg/kg)	0	500	1000	2000
Number of females	5	5	5	5
Findings Normal	5	5	5	5

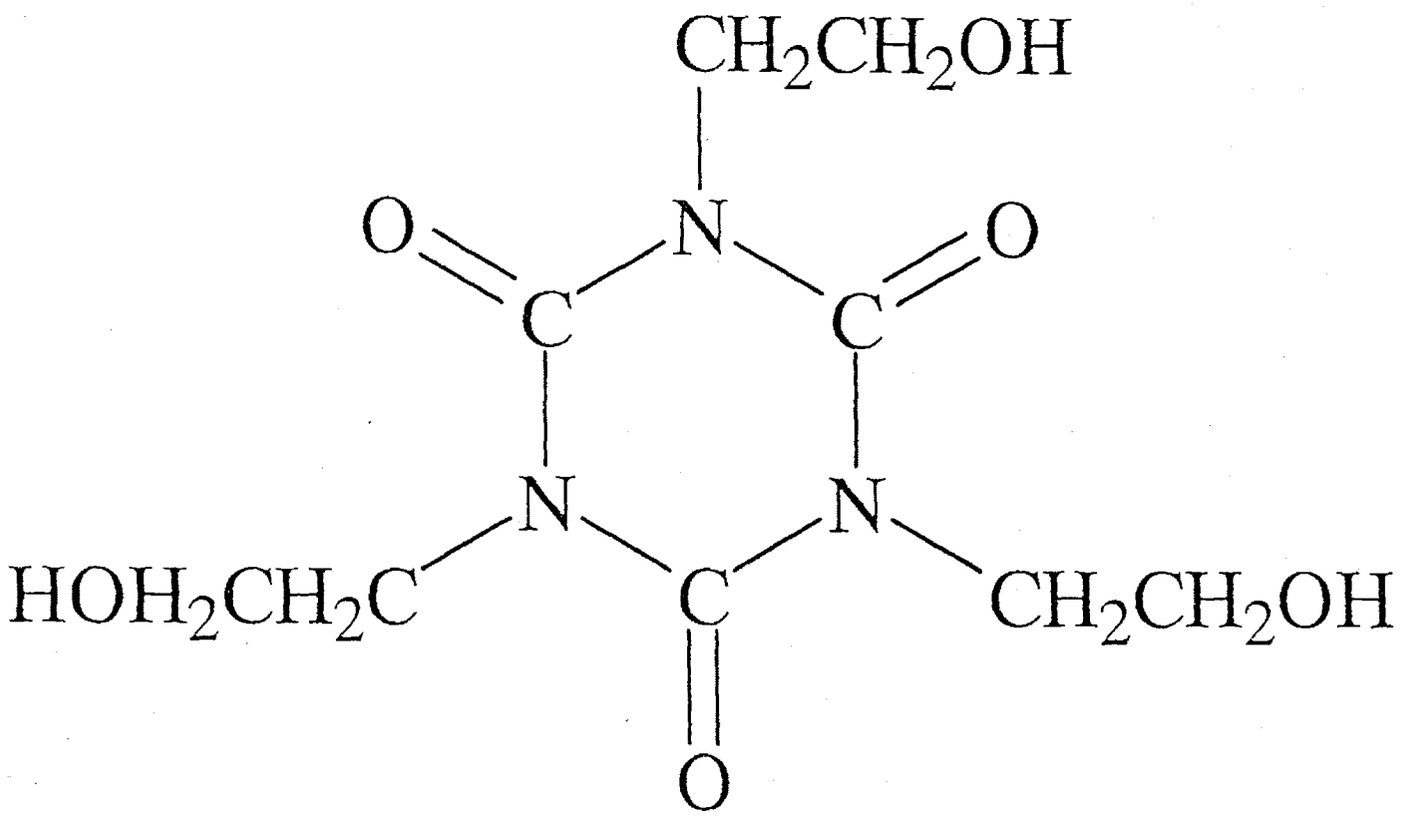

Fig. 1 Chemical structure of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

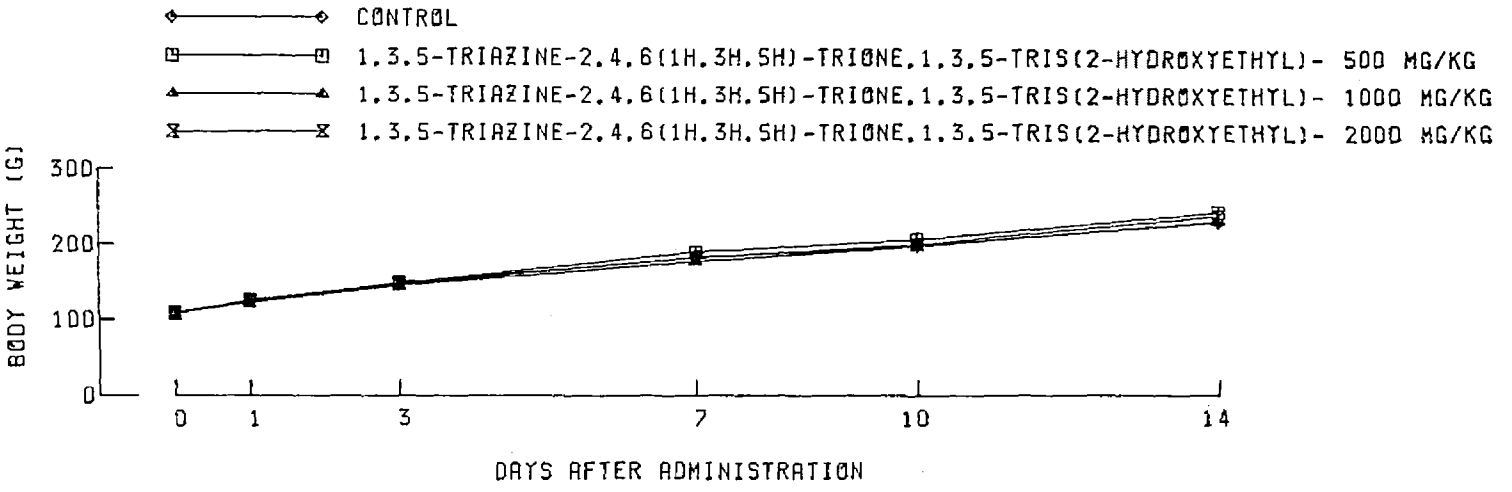

Fig. 2 Body weight of male rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-

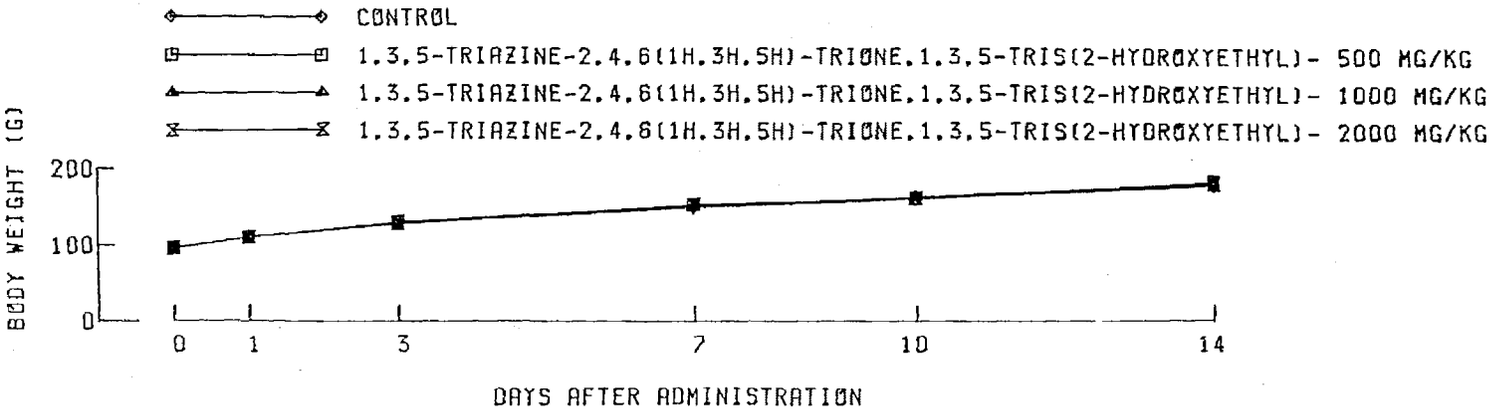

Fig. 3 Body weight of female rats in single dose oral toxicity test of 1,3,5-triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione,1,3,5-tris(2-hydroxyethyl)-