

試 験 報 告 書

単回投与毒性試験、13 週間反復投与毒性試験

試験実施機関	クロレラ工業株式会社 R/D 部
試験実施期間	2009 年 9 月～2010 年 1 月
試験実施場所	R/D 部クリエート第一室 動物実験施設
試験責任者	R/D 部 部長 丸山 功
試験実施者	R/D 部クリエート第一室 瀧山和志

2010 年 2 月 23 日

新規メチルサルフォニルメタン(MSM-SY)の毒性試験

要約

合成法により製造した新規メチルサルフォニルメタン(MSM-SY)の安全性を評価するために、ICR マウスを用いる単回投与毒性試験および13週間反復投与毒性試験を行った。

マウスが摂取可能な最大量を用いたMSM単回投与毒性試験において試験物質投与の影響は全く認められず、最小致死量は5.0g/kg-BWより大きいと判断した。

13週間反復投与毒性試験においては、雄で約2.3g/kg-BW/day、雌で約2.6g/kg-BW/dayの投与で毒性は認められず、試験物質に有害作用を示す物質は含まれないものと推察された。

1.目的

合成法により製造した新規メチルサルフォニルメタン(MSM-SY)の安全性を評価するため、ICR マウスを用いた単回投与毒性試験および13週間反復投与毒性試験を行った。

2.被験物質

MSM-SY(LOT NUMBER: 0903001)を試験に供した。

3.単回投与毒性試験

3-1.試験動物および動物飼育

7週齢の雄雌ICRマウス(Crlj:CD1)を日本チャールス・リバー(株)より入手した、5日間の馴化期間の後、外観および行動に異常がない健康な動物を試験に使用した。試験動物は、ポリオレフィン樹脂(TPX)製ケージに、雄は1匹ずつ、雌は2匹ずつ収容し、温度 $23\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 10\%$ 、換気回数15回/時、照明12時間に管理した飼育室で飼育した。飼料(マウス・ラット用飼料:CE2, 日本クレア株式会社)及び水(オートクレーブ滅菌水)は自由に摂取させた。

3-2.投与量、投与方法および観察

試験動物は、雄雌各5匹ずつの3群に分け、25%MSM水溶液を低用量群は2.5g/kg-BW/10ml、高用量群は5.0g/kg-BW/20ml、それぞれゾンデ投与した。また対照群(雌雄各5匹)は蒸留

水を 20ml/kg-BW ゾンデ投与した。なお投与前には試験動物を約 18 時間絶食させ、投与 2 時間後に再び餌を与えた。

観察期間は 14 日間とし、投与日は頻回、翌日から 1 日 1 回外観および行動等一般状態観察を行った。投与前日および投与前、投与後 1, 2, 3, 7, 14 日に体重測定を行った。試験終了時に全ての試験動物を剖検した。

3-3.結果

3-3-1.死亡例

雄の低用量群の 1 匹がゾンデ投与直後に死亡した。このマウスを死亡後に剖検したところ胸腔に出血が認められたことより、試験物質投与の影響ではなく投与過誤による死亡と判断した。その他は、いずれの群においても観察期間中に死亡例は認められなかった。

3-3-2.一般状態観察

雄雌いずれの群においても、観察期間中に一般状態の異常は認められなかった。

3-3-3.体重

投与後 1, 2, 3, 7, 14 日に行った体重測定で、投与群と対照群との間に差は見られなかった。

表 1 MSM 単回経口投与マウスの体重変化

		投与後の日数					
		0	1	2	3	7	14
雄	対照群	31.6±1.5	36.7±1.8	36.9±0.9	37.8±0.8	37.9±1.1	39.3±1.1
	低用量群(2.5g/kg)	32.1±0.7	36.4±1.0	36.7±1.0	37.7±1.3	38.0±1.8	39.5±1.7
	高用量群(5.0g/kg)	32.5±0.9	35.2±0.6	36.2±1.1	37.5±1.1	38.1±1.0	38.6±1.6
雌	対照群	24.5±1.8	28.7±1.9	29.3±2.2	29.8±2.3	29.8±2.0	30.9±2.0
	低用量群(2.5g/kg)	25.5±1.0	28.3±1.8	28.7±1.7	29.7±1.8	29.0±1.6	30.1±1.5
	高用量群(5.0g/kg)	24.7±1.3	28.3±1.7	28.8±1.7	29.4±1.7	28.8±1.3	30.2±1.1

平均値(g)±標準偏差値，試験物質投与日：0 day

3-3-4.剖検所見

観察期間終了後の剖検所見では、全ての試験動物の主要臓器に異常は見られなかった。

3-4.考察

投与方法は可溶化限界に近い 25%MSM 水溶液を作製し、10ml/kg-BW（低用量群）と通常は使用しないが最大限界量とされる 20ml/kg-BW（高用量群）の 2 用量を単回経口投与し、14 日間観察を行った。なお対照群には蒸留水 20ml/kg-BW を投与した。各群の MSM 投与量

は、低用量群は 2.5g/kg-BW、高用量群は 5.0g/kg-BW となる。

投与過誤による死亡以外は、いずれの群においても観察期間中の死亡例および一般状態異常、剖検時の臓器異常は認められず、また体重および主要臓器重量も投与群と対照群との間に差は見られなかった。

以上より、今回のマウスが摂取可能な最大量を用いた MSM 単回投与毒性試験において試験物質投与の影響は全く認められず、最小致死量は 5.0g/kg-BW より大きいと判断した。

4.13 週間反復経口投与毒性試験

4-1. 試験動物および動物飼育

4 週齢の雄雌 ICR マウス(Slc:ICR)を日本エスエルシー(株)より入手し、1 週間の馴化期間の後、外観および行動に異常がない健康な動物を試験に使用した。試験動物は、ポリオレフィン樹脂(TPX)製ケージに、雄は実験開始時は 2 匹ずつ、開始 9 週後以降は 1 匹ずつ収容し、雌は 2 匹ずつ収容して、温度 23±1.5℃、湿度 55±10%、換気回数 15 回/時、照明 12 時間に管理した飼育室で飼育した。飼料(マウス・ラット用飼料:CE2、日本クレア株式会社)及び水(オートクレーブ滅菌水)は自由に摂取させた。

4-2. 投与量および投与方法

試験動物は雄雌各 12 匹ずつの 3 群に分け、対照群にはオートクレーブ滅菌水を、低用量群には 0.3%MSM 溶液を、高用量群には 1.0%MSM 溶液を、13 週間それぞれ自由に摂水させた。

4-3. 観察および検査方法

4-3-1. 一般状態、体重、摂餌量、摂水量

毎日、試験動物の外観および行動を観察し、異常がないか確認した。体重および摂餌量は週 1 回、摂水量は週 3 回測定した。

4-3-2. 採血・剖検所見

試験物質を投与終了した全動物を約 17 時間絶食後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で腹部大静脈より採血を行った。採取した血液は血液学的検査、または血漿生化学的検査に使用した。

採血後、放血致死させた動物について、全身の臓器の異常の有無を肉眼的に観察した後、主要臓器を採取した。

4-3-3.血液学的検査

ヘパリンナトリウムを含む血液を用いて各群半数の試験動物の血液学的検査を行った。検査項目は、ヘモグロビン(Hb)、赤血球数(RBC)、ヘマトクリット(Ht)、白血球数(WBC)とした。

4-3-4.血漿生化学的検査

各群半数の試験動物の血漿生化学的検査を行った。検査項目は、総タンパク(TP)、アルブミン(ALB)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、尿酸(UA)、ナトリウム(Na)、カリウム(K)、クロール(Cl)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、乳酸脱水素酵素(LDH)、アミラーゼ(AMY)、総コレステロール(T-CHO)、中性脂肪(TG)、HDL-コレステロール(HDL-C)、総ビリルビン(T-BIL)、グルコース(GLU)とした。

4-3-5.臓器重量

剖検後、全動物の肝臓、腎臓、心臓、胸腺、肺、脾臓、脳、副腎、前立腺、精嚢、精巣、精巣上体、子宮、卵巣の重量を測定した。また、各臓器の体重100g当たりの相対重量を算出した。

4-4.統計解析

得られたデータは、Bartlett法で等分散検定を行った後、一元配置分散分析あるいはKruskal-Wallisの検定を行い、Dunnett型の検定法で多重比較を行った。有意水準は両側5%とした。

4-5.結果

4-5-1.一般状態、体重、摂餌量、摂水量、

実験期間中、雄の高用量群の1匹がファイティングにより死亡した。その他は、実験期間を通して雄雌ともに死亡例は無く、外観および行動においても異常はみられなかった。

体重および摂餌量は、雄雌ともに投与群と対照群との間に有意差はなかった。雄の摂水量は、投与群が対照群より有意に増加していた。

表 2 MSM 13 週間反復投与マウスの体重, 摂餌量, 摂水量

		対照群(0%MSM)	低用量群(0.3%MSM)	高用量群(1.0%MSM)
雄	投与開始時体重 (g)	33.6±1.5	33.5±1.5	33.5±1.3
	投与終了時体重 (g)	50.8±4.6	50.1±6.4	50.9±5.6
	体重増加量(g)	17.2±4.1	16.6±5.1	17.4±4.8
	平均摂餌量(g/day)	6.1±0.6	6.7±0.8	6.4±0.4
	平均摂水量(ml/day)	8.1±1.3	10.9±2.4**	10.4±1.2**
	MSM 摂取量(g/kg-BW/day)	0	0.72±0.23	2.29±0.34
雌	投与開始時体重 (g)	27.7±1.8	28.1±1.5	27.7±1.9
	投与終了時体重 (g)	39.7±5.7	38.1±4.6	39.0±5.1
	体重増加量(g)	12.1±4.8	9.5±4.1	11.3±4.5
	平均摂餌量(g/day)	6.2±0.4	6.1±0.6	6.0±0.5
	平均摂水量(ml/day)	8.6±0.3	9.2±0.8	9.1±0.9
	MSM 摂取量(g/kg-BW/day)	0	0.80±0.10	2.60±0.32

平均値±標準偏差値を示す。 ** ; 対照 (0%) 群に対し有意差あり(危険率 1%未満).

体重と摂水量から算出した全期間の MSM 概算摂取量は, 雄では低用量群, 高用量群で各々 0.72±0.23, 2.29±0.34 g/kg-BW/day, 雌では 0.80±0.10, 2.60±0.32 g/kg-BW/day となった。

4-5-2.剖検所見

雄の対照群の 1 匹に右精巣上の脂肪組織に腫瘍, 低用量群の 1 匹に右腎の腫れと片方の精巣の委縮が確認された。

雌の対照群の 2 匹に胃の出血, 低用量群の 1 匹に肝臓の腫瘍と胃の出血, 高用量群の 1 匹に胃の出血が確認された。

4-5-3.血液学的検査

血液学的検査成績を表 4 に示す。全ての項目で投与群と対照群との間に有意な差はなかった。

表 4 13 週間 MSM 経口投与 ICR マウスの血液学的検査値

		対照群(0%MSM)	低用量群(0.3%MSM)	高用量群(1.0%MSM)	
雄	ヘモグロビン	g/dl	13.5±0.4	13.6±0.8	13.4±1.2
	赤血球数	×10000/μl	852±36	846±43	816±61
	ヘマトクリット	%	43±1	44±3	41±3
	白血球数	/μl	3267±1481	3017±956	3217±1074
雌	ヘモグロビン	g/dl	14.3±0.8	13.8±0.6	13.8±0.4
	赤血球数	×10000/μl	886±46	834±50	836±32
	ヘマトクリット	%	44±2	42±2	42±1
	白血球数	/μl	2733±1127	1867±686	2667±905

平均値±標準偏差値を示す。

4-5-4.血漿生化学的検査

血漿生化学的検査成績を表 5 に示す。雄は全ての試験項目で有意な差が認められなかった。雌は高用量群の血漿尿素窒素 (BUN) レベルの低値が観察された。

表 5 13 週間 MSM 経口投与 ICR マウスの血漿生化学的検査値

		対照群(0%MSM)	低用量群(0.3%MSM)	高用量群(1.0%MSM)	
雄	TP	g/dL	4.5±0.3	4.3±0.2	4.3±0.2
	ALB	g/dL	2.6±0.2	2.4±0.1	2.4±0.1
	BUN	mg/dL	30.9±6.6	34.8±3.8	32.7±5.9
	CRE	mg/dL	0.10±0.03	0.10±0.03	0.10±0.02
	UA	mg/dL	0.8±0.3	0.8±0.1	0.7±0.4
	Na	mEq/L	152±1	153±1	152±2
	K	mEq/L	4.1±0.4	4.3±0.8	4.0±0.2
	Cl	mEq/L	114±4	116±2	118±2
	Ca	mg/dL	7.6±0.2	7.6±0.2	7.4±0.3
	IP	mg/dL	6.6±0.8	6.7±1.1	6.1±0.6
	AST	IU/L	55±12	54±21	47±7
	ALT	IU/L	34±9	25±7	27±6
	LDH	IU/L	328±104	331±169	337±164
	AMY	IU/L	2483±472	2378±307	2246±313
	T-CHO	mg/dL	110±26	88±18	97±22
	TG	mg/dL	63±35	135±114	67±14
	HDL-C	mg/dL	65±14	55±11	59±12
	T-BIL	mg/dL	0.09±0.03	0.08±0.02	0.08±0.01
	GLU	mg/dL	192±23	179±24	193±24
	雌	TP	g/dL	4.2±0.2	4.2±0.2
ALB		g/dL	2.6±0.1	2.6±0.2	2.6±0.2
BUN		mg/dL	36.6±7.8	29.7±9.2	23.7±7.3*
CRE		mg/dL	0.10±0.02	0.09±0.02	0.09±0.01
UA		mg/dL	1.2±0.5	0.8±0.5	0.7±0.2
Na		mEq/L	150±2	151±2	152±2
K		mEq/L	4.2±1.5	3.7±0.2	3.8±0.3
Cl		mEq/L	116±3	117±3	117±2
Ca		mg/dL	7.1±0.6	7.7±0.4	7.4±0.3
IP		mg/dL	7.2±1.7	7.1±0.6	6.6±0.6
AST		IU/L	105±51	90±45	76±31
ALT		IU/L	33±12	34±14	35±8
LDH		IU/L	339±148	281±82	291±102
AMY		IU/L	1895±307	2190±466	2057±309
T-CHO		mg/dL	69±13	60±22	77±16
TG		mg/dL	45±46	43±32	65±22
HDL-C		mg/dL	30±9	32±12	42±9
T-BIL		mg/dL	0.05±0.02	0.05±0.01	0.05±0.01
GLU		mg/dL	124±24	146±29	150±13

平均値±標準偏差値を示す。* ; 対照 (0%) 群に対し有意差あり(危険率 5%未満).

4-5-5.臓器重量

剖検日の絶食時体重と体重 100g 当たりの相対臓器重量を表 6 に示す。雄雌ともに全ての項目で、投与群と対照群との間に有意な差はなかった。

表 6 13 週間 MSM 経口投与 ICR マウスの相対臓器重量

		対照群(0%MSM)	低用量群(0.3%MSM)	高用量群(1.0%MSM)	
雄	体重	g	48.0±3.6	47.5±5.4	48.2±5.0
	肝臓	g%	4.86±0.42	4.88±0.61	4.74±0.43
	腎臓	g%	1.89±0.23	2.07±0.44	1.88±0.27
	脾臓	g%	0.343±0.070	0.307±0.048	0.316±0.069
	心臓	g%	0.471±0.043	0.474±0.082	0.449±0.039
	肺	g%	0.547±0.041	0.559±0.065	0.535±0.069
	胸腺	g%	0.0644±0.0144	0.0553±0.0250	0.0647±0.0181
	脳	g%	1.15±0.11	1.20±0.15	1.18±0.16
	精巣	g%	0.652±0.093	0.634±0.105	0.640±0.102
	精巣上体	g%	0.290±0.035	0.277±0.036	0.272±0.030
	精囊	g%	1.019±0.224	0.963±0.157	0.960±0.150
	前立腺	g%	0.0834±0.0328	0.0760±0.0208	0.0803±0.0306
	副腎	g%	0.0122±0.0016	0.0121±0.0025	0.0106±0.0026
雌	体重	g	36.6±7.2	36.6±5.4	37.1±5.8
	肝臓	g%	4.55±0.39	4.72±0.31	4.62±0.44
	腎臓	g%	1.60±0.25	1.66±0.25	1.56±0.28
	脾臓	g%	0.423±0.088	0.429±0.084	0.413±0.100
	心臓	g%	0.458±0.070	0.481±0.055	0.443±0.077
	肺	g%	0.665±0.139	0.706±0.058	0.651±0.087
	胸腺	g%	0.115±0.031	0.108±0.032	0.118±0.034
	脳	g%	1.63±0.33	1.60±0.23	1.58±0.24
	子宮	g%	0.573±0.291	0.598±0.429	0.514±0.215
	卵巣	g%	0.122±0.041	0.115±0.024	0.111±0.027
	副腎	g%	0.0358±0.0098	0.0331±0.0086	0.0376±0.0096

平均値±標準偏差値を示す。

4-6.考察

今回行った ICR マウスを用いた 13 週間反復投与毒性試験において、試験物質である MSM を飲料水に添加して投与した。1.0%MSM 水を投与した高用量群の概算摂取量は、雄で約 2.3g/kg-BW/day, 雌で約 2.6g/kg-BW/day であった。この投与量は、体重 50kg のヒトの 1 日摂取目安量(3g/50kg-BW/day=0.06g/kg-BW/day)の 30 倍以上に当たる。また、低用量群は 10 倍量に当たる。いずれの投与濃度でも雄雌共に一般状態、体重や摂餌量、臓器重量に何ら影響を及ぼさなかった。試験物質投与の影響があったと考えられる項目は、雄の摂水量の増加および雌の血漿尿素窒素 (BUN) 値の低下であった。摂水量の増加は、飲水に MSM が溶解していることが影響したと考えられる。また、血漿尿素窒素 (BUN) 値の低下は血漿

蛋白値や肝機能に全く問題がないことより、毒性学的に重要な意義はないと考えられる。従って、試験物質に有害作用を示す物質は含まれないものと推察された。