BOZO RESEARCH CENTER INC.

最 終 報 告 書

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）のラットを用いた
経口投与による急性毒性試験

B-5074

2004年10月29日

株式会社ボゾリサーチセンター

東京本部 〒151-0065 東京都渋谷区大山町36－7
本社・東京研究所 〒156-0042 東京都世田谷区羽根木1－3－11
御殿場研究所 〒412-0039 静岡県御殿場市かまど1284
函南研究所 〒419-0101 静岡県田方郡函南町桑原三本松1308-125

目　次

頁

目　次 ……1

要　約 ……7

緒　言 ……8

試験材料及び方法 ……9

1. 被験物質及び媒体 ……9

1) 被験物質 ……9

2) 媒体 ……9

2. 投与液の調製 ……10

1) 媒体の調製 ……10

2) 被験液の調製 ……10

3) 被験液の保存方法 ……10

4) 被験液の安定性 ……10

5) 被験液の濃度・均一性確認 ……10

3. 試験動物 ……10

4. 試験動物種及び系統の選択理由 ……11

5. 飼育条件 ……11

6. 飼料及び飲料水中の混入物質 ……11

7. 動物の識別 ……11

8. 動物の選抜 ……12

9. 投与経路の選択理由、投与方法及び観察期間 ……12

10. 投与方法及び観察期間 ……12

頁

11. 投与量及び動物数 ……12
12. 観察及び検査の方法 ……12
1) 一般状態及び生死の観察 ……12
2) 体重測定 ……13
3) 病理学検査 ……13
13. 統計解析 ……13
1) 致死量 ……13
2) 体重 ……13

試験結果 ……14
1. 致死量 ……14
2. 一般状態 ……14
3. 体重 ……14
4. 剖検 ……14

考　察 ……16

図

Fig. 1　体重

表

Table 1 死亡状況及び致死量
Table 2 一般状態
Table 3 体重
Table 4 剖検所見

要　約

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）の急性経口毒性を 11 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF ラット〔Crj:CD(SD)IGS〕を用いて検討した。投与量は 300 及び 2000 mg/kg とし、動物数は 1 群雌各 6 匹とした。

1.　致死量

2000 mg/kg 投与群で 1/6 例が死亡したことから、致死量は 2000mg/kg であった。

2.　一般状態

300 mg/kg 投与群では、投与翌日に耳介及び四肢の暗調化が 1 例に認められたが、投与後 2 日には消失した。

2000 mg/kg 投与群では、投与後 30 分以降、耳介及び四肢の暗調化、飲水行動の亢進、自発運動の減少、呼吸数の減少及び異常歩行（失調性歩行）がみられ、1 例では呼吸深大及び粗毛を伴って投与後 2 日に死亡した。その他の動物は、いずれも投与後 2 日に正常状態となった。

3.　体重

300 及び 2000 mg/kg 投与群ともに投与後 3 日まで減少又は増加抑制傾向がみられた。

4.　剖検

死亡動物で粗毛、肝臓の白色巣、副腎の暗赤色（両側性）、胃の暗赤色巣及び空腸から回腸の暗赤色の内容物が認められた。生存動物では、いずれの動物にも肉眼的異常は認められなかった。

緒　言

厚生労働省医薬局審査管理課　化学物質安全対策室の依頼により、4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）の安全性評価の一環として、ラットを用いた急性経口毒性試験を実施したので、その成績を報告する。なお、遵守した基準及び準拠したガイドラインなどは以下の通りである。

試験材料及び方法

1. 被験物質及び媒体

1) 被験物質

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）は　　から提供された（添付資料 1）。なお、2003 年 2 月 14 日に投与前の被験液の濃度確認を実施したところ、被験物質を入手した当初のクロマトグラムと異なったため、被験物質を　　に返却した。その後、　　で被験物質を確認したところ、特に品質に問題はなかった。改めて、株式会社ボゾリサーチセンターで入手し、分析した結果、クロマトグラムの異常は確認できず、本品を動物試験に使用した。使用した被験物質のロット番号及び純度などを以下に示した。

被験物質名　：　4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）
　　4,4'-Methylenebis (2-chlorobenzenamine)
CAS 番号　：　101-14-4
ロット番号　：
純　　度　：　99.76%
性　　状　：　白色針状粉末結晶
分 子 量　：　267.16
融　　点　：　110.5～111.0℃
安 定 性　：　動物試験終了後の残余被験物質を　　で分析した結果、品質に問題はなく、動物試験期間中安定であった（添付資料 2）。
保存方法　：　冷暗所（実測値：1～7℃）、遮光、密閉
保存場所　：　御殿場研究所　被験物質保存室及び第 2 研究棟 4 階被験物質調製室
返　　却　：　動物試験終了後の残量は本被験物質を使用する関連試験が全て終了した後、全て　　に返却した。

2) 媒体

名　　称　：　カルメロースナトリウム（カルボキシメチルセルロース：CMC-Na）
ロット番号　：　2925
規　　格　：　日本薬局方
メーカー　：　丸石製薬株式会社
保存方法　：　室温（実測値：2～7℃）

保 存 場 所　：　御殿場研究所　第2研究棟4階被験物質調製室

2. 投与液の調製

1) 媒体の調製

必要量のCMC-Naを秤量し、注射用水（株式会社大塚製薬工場、ロット番号：2I86）に溶解して0.5 w/v%CMC-Na水溶液とした。なお、調製は被験物質調製の前日に実施し、使用まで冷蔵保存した。

2) 被験液の調製

各濃度ごとに被験物質を秤量し、メノウ乳鉢を用いて0.5 w/v%CMC-Na水溶液に懸濁して規定量に調製した。なお、2003年2月14日に調製した被験液の濃度・均一性確認を行ったところ、被験物質を入手した当初のクロマトグラムと異なったため、全て廃棄した。新たに被験物質を入手し2003年3月7日に調製した被験液を用いて濃度・均一性確認を行った。なお、0.5及び5 mg/mL液については、投与に使用しなかったため、全て廃棄した。

3) 被験液の保存方法

冷蔵（実測値：2～7℃）、遮光保存

4) 被験液の安定性

0.5及び200 mg/mL濃度の0.5 w/v%CMC-Na水溶液懸濁液は、調製後7日間冷蔵保存した後、更に24時間室温保存した時、安定かつ均一である（添付資料3、試験番号：A-1482、株式会社ボゾリサーチセンター）。

5) 被験液の濃度・均一性確認

投与前（2003年3月7日調製）に各濃度液について株式会社ボゾリサーチセンターでHPLC法により分析した。その結果、各濃度液ともに表示値に対する割合は93.8～102.0%、均一性（C.V.）は0.2～1.7%であり、いずれも許容範囲内であった（添付資料4）。

3. 試験動物

Sprague-Dawley系SPFラット〔Crj:CD(SD)IGS、日本チャールス・リバー株式会社、厚木飼育センター〕の雌21匹[注)]を7週齢で入手し、当所で4週間以上検疫・馴化飼育した。試験動物は検疫・馴化期間中の飼育観察の結果から、健康と思われる動物を無作為に選抜し11週齢で試験に供した。投与時の体重範囲は212～282 gであり、平均値±20%以内〔平均値：239 g（191～287 g）〕であった。

動物の選抜後の余剰動物はエーテル深麻酔により安楽死させた。

注) ：注文匹数は雌 20 匹であったが、実際には雌 21 匹が納入された。

4. 試験動物種及び系統の選択理由

毒性試験ガイドラインによりラットのデータが必要とされている。この試験に使用される系統のラットは特性がよく知られ、背景資料が豊富であることから選択した。

5. 飼育条件

動物は、温度 23±3℃、相対湿度 50±20%、換気回数 1 時間当たり 10～15 回、照明 1 日 12 時間（07：00～19：00）となるように設定した飼育室（飼育室番号：909 号室）でブラケット式金属製網ケージ（W 410× D 350× H 170 mm：リードエンジニアリング株式会社）に個別収容し、固形飼料 CRF-1（オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号：021202、030110）及び飲料水（御殿場市営水道水：自動給水装置使用）を自由に摂取させ飼育した。なお、飼育期間中の飼育室の実際の温度は 21～25℃、相対湿度は 28～52%〔相対湿度の下限を 1 回瞬時に逸脱（28%）、その他は 30%以上を推移〕であった。

6. 飼料及び飲料水中の混入物質

下記の分析報告書を入手し、試験成績に影響のないことを確認して、当該報告書を生データ中に保存した。

供試飼料ロットについての分析報告書（財団法人　日本食品分析センター、供試全ロット）

水道法に準拠する水質の分析報告書（財団法人　静岡県生活科学検査センター、年 4 回）

7. 動物の識別

動物の個体識別は入荷時に小動物用耳標を付けて行った。動物選抜後は、投与量及び投与日（投与を行った順）ごとに 4 桁の番号を付けた。この場合、1000 の位は投与量（300 mg/kg 投与群を 3、2000 mg/kg 投与群を 4 とした）、100 の位は投与順（第 1 回目は 1、2 回目は 2、以降順次 3、4 とした）、10 と 1 の位は個体番号とした。また、補助識別として動物の尾に油性インクを塗布した。各飼育ケージには、投与日ごとに色分けしたケージラベルに試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び投与日を明記し表示した。

8. 動物の選抜

3.試験動物に示した手順で選択した個体を投与前日に無作為抽出法で3匹選抜した。

9. 投与経路の選択理由、投与方法及び観察期間

投与経路は毒性試験ガイドラインに準じ、経口を選択した。

10. 投与方法及び観察期間

投与容量は10mL/kg体重とし、投与前(約16時間)絶食させたラットに胃ゾンデを用いて、所定量の被験液を1回強制経口投与した。絶食後の再給餌は投与4時間後の一般状態の観察終了後に行った。また、観察期間は投与後14日間とした。

11. 投与量及び動物数

本被験物質のラットでの致死量に関する情報がないことから、毒性試験ガイドラインに従って投与開始用量は300 mg/kgとした。300 mg/kg投与で死亡がみられなかったことから、その翌日に300 mg/kgの第2回目投与を行った。300 mg/kgの第2回投与でも死亡がみられなかったことから、更にその翌日に2000 mg/kgの投与を行った。2000 mg/kg投与では投与2日後に1/3例が死亡したため、その翌日に2000 mg/kgの第2回投与を行った。1回投与当たりの動物数は雌3匹とした。群構成を次に示す。

投与群	投与量 (mg/kg)	被験物質濃度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg体重)	性	動物数	動物番号
第1回	300	30	10	雌	3	3101～3103
第2回	300	30	10	雌	3	3201～3203
第3回	2000	200	10	雌	3	4301～4303
第4回	2000	200	10	雌	3	4401～4403

12. 観察及び検査の方法

1) 一般状態及び生死の観察

投与6時間後までは頻繁(投与直後～投与5分後、～15分後、～30分後、～1時間後、～2時間後、～4時間後、～6時間後)に、その後は1日1回(08:25～10:35)14日間、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物の異常などの一般状態を観察した。

2) 体重測定

投与日の投与直前（08：47～09：09）に体重を測定し、これを投与液量算出の基準にした。更に、投与後 1、2、3、7、10 及び 14 日の午前中（08：35～10：32）に体重を測定した。

3) 病理学検査

死亡動物は発見後速やかに剖検を実施した。その際、肝臓、胃、空腸から回腸及び副腎に被験物質投与に起因すると思われる変化がみられたため、リン酸緩衝 10％ホルマリン液に固定・保存した。

生存動物は 14 日間の観察期間終了後にエーテル麻酔下で放血致死させ、体外表並びに頭部、胸部及び腹部の器官・組織を肉眼的に観察した。なお、被験物質投与に起因すると考えられる異常は認められなかったため、器官/組織の保存は行わなかった。

13. 統計解析

1) 致死量

投与量ごとの死亡動物数から概略の致死量を推定した。

2) 体重

投与日ごとに平均体重及び標準偏差を算出した。ただし、動物数が 2 例以下の場合には標準偏差を算出しなかった。

試験結果

1. 致死量

死亡状況及び致死量を Table 1 に示した。

300 及び 2000 mg/kg を 3 匹ずつ 2 回に分けて計 6 匹に投与した結果、2000 mg/kg で 1 例が死亡したことから、致死量は 2000 mg/kg と推定された。

2. 一般状態

一般状態を Table 2、Appendix 1～4 に示した。

300 mg/kg 投与群の第 1 回投与では、一般状態の異常は観察されなかった。

300 mg/kg 投与群の第 2 回投与では、投与翌日に 1/3 例で耳介及び四肢の暗調化がみられた。しかし、投与後 2 日には消失し、その後の一般状態に異常は観察されなかった。

2000 mg/kg 投与群の第 1 回投与では、投与 30 分後から 1 時間後にかけて耳介及び四肢の暗調化及び飲水行動の亢進がみられ、1/3 例では自発運動の減少及び呼吸数の減少も認められた。その後、飲水行動の亢進は観察されなくなったが、自発運動の減少及び呼吸数の減少、更には、異常歩行（失調性歩行）がみられ、1 例は、投与翌日に呼吸深大及び粗毛を伴って投与後 2 日に死亡した。生存動物では、投与翌日に耳介及び四肢の暗調化のみとなり、投与後 2 日にはいずれも消失し、その後の一般状態に異常は観察されなかった。

2000 mg/kg 投与群の第 2 回投与では、投与 1 時間後に耳介及び四肢の暗調化と飲水行動の亢進がみられた。飲水行動の亢進はその後みられなくなったが、2 例に自発運動の減少、呼吸数の減少、異常歩行（失調性歩行）がみられ、1 例には投与 6 時間後に異常歩行（失調性歩行）がみられた。投与翌日には耳介及び四肢の暗調化のみとなり、投与後 2 日にはいずれも消失し、その後の一般状態に異常は観察されなかった。

3. 体重

体重変化を Fig. 1、Table 3、Appendix 5～8 に示した。

300 及び 2000 mg/kg 投与群ともに、投与後 3 日まで減少又は増加抑制傾向がみられたが、投与後 7 日以降は観察期間を通してほぼ順調な増加が認められた。

4. 剖検

剖検所見を Table 4、Appendix 9～12 に示した。

死亡した 2000 mg/kg 投与群の 1 例に粗毛、肝臓の白色巣、副腎の暗赤色（両側性）、前胃及び腺胃の暗赤色巣及び空腸から回腸の暗赤色の内容物がみられた。生存動物では、体外表並びに頭部、胸部及び腹部の器官・組織に異常は認められなかった。

考　察

4,4'-メチレンビス（2-クロロベンゼナミン）の急性経口毒性を 11 週齢の Sprague-Dawley 系 SPF 雌ラット〔Crj:CD(SD)IGS〕を用いて検討した。投与量は 300 及び 2000 mg/kg とし、動物数は 1 群各 6 匹とした。

300 及び 2000 mg/kg を 3 匹ずつ 2 回に分けて計 6 匹に投与した結果、2000 mg/kg 投与群の 1 例が死亡した。したがって、致死量は 2000 mg/kg であった。

一般状態では、300 mg/kg 投与群で 1 例に投与後 1 日に耳介及び四肢の暗調化がみられたが、投与後 2 日には消失した。

2000 mg/kg 投与群では投与後 30 分以降順次耳介及び四肢の暗調化、飲水行動の亢進、自発運動の減少、呼吸数の減少、異常歩行（失調性歩行）がみられ、1 例は投与翌日に呼吸深大及び粗毛を伴って、投与後 2 日に死亡した。生存動物は、投与翌日には耳介及び四肢の暗調化のみとなり、投与後 2 日には全例が正常状態となった。

体重では、300 及び 2000 mg/kg 投与群ともに、投与後 3 日まで減少又は増加抑制傾向がみられたが、その後はほぼ順調に増加した。

剖検では、死亡動物で粗毛、肝臓の白色巣、副腎の暗赤色（両側性）、胃の暗赤色巣及び空腸から回腸の暗赤色の内容物が認められた。一方、生存動物では、いずれの動物にも肉眼的異常は認められなかった。

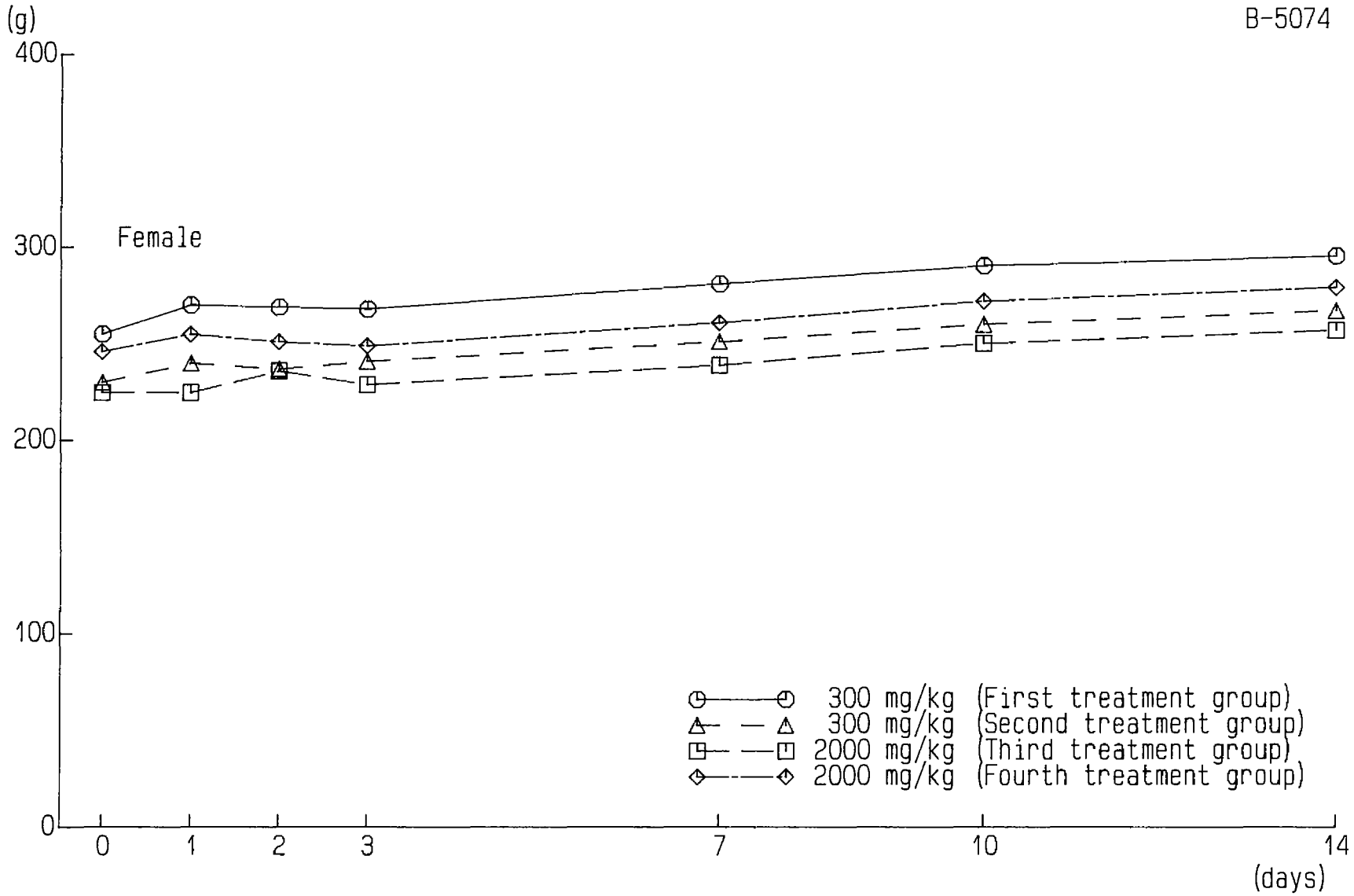

Fig.1 Body weight oral acute toxicity study of 4,4'-Methylenebis(2-chlorobenzenamine) in rats

Table 1 Mortality and Lethal dose oral acute toxicity study of 4,4'-Methylenebis (2-chlorobenzenamine) in rats

Female

Dose	Number of	Distribution of death																					Mortality	Lethal dose
		minutes			hours				days															
mg/kg	animals	i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14		mg/kg
300 (1)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	
300 (2)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	2000
2000 (3)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1/3	
2000 (4)	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3	

(1): First treatment group
(2): Second treatment group
(3): Third treatment group
(4): Fourth treatment group
i : Immediately after dosing

Table 2 Clinical signs oral acute toxicity study of 4,4'-Methylenebis(2-chlorobenzenamine) in rats

Female

Dose mg/kg	Findings	minutes			hours				days													
		i~5	~15	~30	~1	~2	~4	~6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
300 (First treatment group)	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No abnormality	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
300 (Second treatment group)	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No abnormality	3	3	3	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Dark red discoloration, ear auricle and limbs	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000 (Third treatment group)	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	No abnormality	3	3	2	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	Decrease, spontaneous movement	0	0	0	1(1)	2(1)	2(1)	2(1)	1(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abnormal gait	0	0	0	0	0	3(1)	3(1)	1(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	1(1)	2(1)	2(1)	2(1)	1(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Deep breathing	0	0	0	0	0	0	0	1(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Unkempt fur	0	0	0	0	0	0	0	1(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark red discoloration, ear auricle and limbs	0	0	1	3(1)	3(1)	3(1)	3(1)	3(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Increase, water intake activity	0	0	0	3(1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Died	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2000 (Fourth treatment group)	No. of animals	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	No abnormality	3	3	3	0	0	0	0	0	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	Decrease, spontaneous movement	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Abnormal gait	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Bradypnea	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Dark red discoloration, ear auricle and limbs	0	0	0	3	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Increase, water intake activity	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

i : Immediately after dosing
Number in parenthesis indicates the number of dead animals that showed the respective clinical sign.

Table 3 Body weight oral acute toxicity study of 4,4'-Methylenebis(2-chlorobenzenamine) in rats

Female

Dose mg/kg		Day after administration 0	1	2	3	7	10	14	Gain 0-14
300 (First treatment group)	No.	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mean	255	270	269	268	281	290	295	40
	S.D.	30	36	36	31	33	38	40	10
300 (Second treatment group)	No.	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mean	230	240	237	241	251	260	267	37
	S.D.	13	14	15	13	15	21	23	10
2000 (Third treatment group)	No.	3	3	2	2	2	2	2	2
	Mean	225	225	236	229	239	250	257	28
	S.D.	19	25						
2000 (Fourth treatment group)	No.	3	3	3	3	3	3	3	3
	Mean	246	255	251	249	261	272	279	33
	S.D.	17	19	17	25	21	16	18	3

Unit : g

Table 4 Gross pathological findings oral acute toxicity study of 4,4'-Methylenebis (2-chlorobenzenamine) in rats

Female

Organs	Findings	Dose (mg/kg)	300 (First treatment group)	300 (Second treatment group)	2000 (Third treatment group)	2000 (Fourth treatment group)
		No. of animals	3[a](0)[b]	3[a](0)[b]	2[a](1)[b]	3[a](0)[b]
External appearance	Unkempt fur		0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
Liver	Focus, white		0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
Adrenal	Dark red, bilateral		0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
Stomach	Focus, dark red		0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)
Small intestine	Contents, dark red, jejunum～ileum		0 (0)	0 (0)	0 (1)	0 (0)

a : Survived
b : Died