最 終 報 告 書

シクロヘキセンのラットを用いる急性経口毒性試験

試験番号：4798（ 115－140 ）

平成13年6月6日

試験委託者
厚生労働省　医薬局

財団法人
食品農医薬品安全性評価センター

目　次

1.　要約 2
2.　表題 3
3.　試験目的 3

12.　被験物質 5
13.　試験材料および方法 7
14.　試験結果 10
15.　考察および結論 11
16.　資料の保管 11

Tables		T-01~26
Table 1	Mortality	T-01
Table 2	Clinical observation	T-02
Table 3	Body weight	T-10
Table 4	Gross finding	T-18
Table 5	Histopathological finding	T-26

1. 要約

1群につき雌雄各5匹のCrj: CD(SD)IGSラットを用いてシクロヘキセンの急性経口毒性試験を実施した.

シクロヘキセンはコーンオイルに溶解し，雌雄ともに 500，1000 および 2000 mg/kg を単回強制経口投与した．また，媒体対照としてコーンオイルのみを投与した群も設定した.

観察期間は 14 日間とし，生死，中毒症状および発現時期，体重推移について観察し，病理学的検査を実施した．その結果は次の通り要約される.

1.1. 死亡率および LD_{50} 値

死亡動物は，雌雄ともに 2000 mg/kg で 5 例中 3 例に認められ，LD_{50} 値は雌雄ともに 1000～2000 mg/kg の間にあると推定された.

1.2. 一般状態

雌雄ともに自発運動低下，流涙がみられ，死亡動物では歩行異常，腹臥位，流涎，立毛および振戦が認められた.

1.3. 体重

雌雄ともに 1000 および 2000 mg/kg で投与後 1 日の測定で体重減少が認められたが，その後，生存動物は順調な体重増加を示した.

1.4. 病理学的検査

途中死亡例では肉眼観察で肺のびまん性赤色化，脾臓の淡色化および腺胃の黒色斑点が観察され，病理組織学的検査で肺にうっ血および浮腫，脾臓に濾胞萎縮，腺胃に出血が認められた.

2. 表題

シクロヘキセンのラットを用いる急性経口毒性試験

3. 試験目的

既存化学物質の安全性評価の一環として, ラットを用いる急性毒性試験を実施した.

12. 被験物質

被験物質の試験成績書を『Reference data 1』に示した.

12.1. 被験物質名

シクロヘキセン

12.2. CAS No.

110-83-8

12.3. ロット番号

12.4. 純度

98.6 wt%

12.5. 提供元

12.6. 保管条件

密閉，冷暗所，火気厳禁

12.7. 保管場所

安評センター被験物質保管庫

12.8. 化学名

Cyclohexene

12.9. 化学構造

12.10. 分子式

C_6H_{10}

12.11. 分子量

82.14

12.12. 性状

無色液体

12.13. 沸点

83.3℃

12.14. 融点

-103.7℃

12.15. 溶解性

水：不溶

アセトン：溶

12.16. 安定性

酸化防止剤として BHT(2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol)を 0.01％含有しているので常温，常圧で安定.

12.17. 取り扱い上の注意

吸入，皮膚への直接接触を避けるため取り扱い時には，マスクおよびゴム手袋を着用し，できるだけ風上から作業した．蒸気の発散はできるだけ抑え，作業環境を許容濃度以下に保つよう努めた．火気を避け，静電気防止処置をとること.

12.18. 被験物質保管および残余被験物質の処理

投与終了後，残りは ReproTox 毒性試験に使用する.

13. 試験材料および方法

13.1. 供試動物

供試したCrj: CD(SD)IGSラット[SPF]は日本チャールス・リバー株式会社（神奈川県横浜市）から5週齢で雌雄各24匹搬入した.

動物は検収後，試験環境に馴化し，6週齢で投与した.

動物はあらかじめ体重によって層別化し，無作為抽出法により各試験群を構成するように群分けした.

動物の識別は，耳介入墨法により行うとともに，ケージに動物標識番号（Animal ID-No.）を付けて行った.

投与時の体重は，雄で161～181 g，雌で122～140 gであった.

13.2. 試験系の選択理由

げっ歯類の種は試験ガイドラインで推奨されているラットを選択した.系統は背景データ，感染性疾患に対する抵抗性および遺伝的安定性などを考慮して選択した.

13.3. 飼育管理

動物は202号飼育室（W 3.6×D 10.0×H 2.5 m，90 m^3）で飼育し，環境調節の基準値は温度23±3℃，相対湿度55±20%，換気回数1時間20回，照明12時間（午前7時点灯，午後7時消灯）とした．なお，動物飼育期間中の温湿度の実測値は23.2～24.4℃および50～64%であり，動物の馴化期間を含め観察期間中データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった.

株式会社東京技研サービス（東京都府中市）製の水洗式飼育機（W 745.0×D 50.0×H 182.0 cm）を使用し，ステンレス製網目飼育ケージ（W 21.5×D 27.5×H 19.5 cm，飼育ケージ・スペース 11529 cm^3）に動物を5匹ずつ収容した.

飼育ケージおよび給餌器は週1回取り換えた.

飼料はオリエンタル酵母工業株式会社（東京都中央区）製造の固型飼料MF（ロット番号：000112，000308）を使用し，飼育期間中，自由に摂取させた．使用した飼料の夾雑物の分析を，オリエンタル酵母工業株式会社が，財団法人日本食品分析センター（東京都渋谷区）に依頼し実施した.

その結果を『Reference data 2』に示した.

また，動物には水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた．水道法に基づく水道水の分析を株式会社エコプロ・リサーチ（静岡県清水市）に依頼し，実施した．その分析結果を『Reference data 3』に示した.

13.4. 試験群の構成

試験群の構成は，次表に示した．

試験群	用量(mg/kg)	性	動物数	動物番号
1	0	雄	5	1001～1005
2	500	雄	5	1101～1105
3	1000	雄	5	1201～1205
4	2000	雄	5	1301～1305
5	0	雌	5	2001～2005
6	500	雌	5	2101～2105
7	1000	雌	5	2201～2205
8	2000	雌	5	2301～2305

[用量設定理由]

本試験に先立って実施した予備試験（投与量：500, 1000 および 2000 mg/kg, 媒体：コーンオイル，投与液量：0.5 mL/100 g BW）の結果，2000 mg/kg 群の雌で 3 例中 1 例が死亡した．その他の投与群では異常は観察されなかった．以上の結果から本試験の用量は雌雄ともに OECD ガイドライン「急性経口」で上限用量として指定されている 2000 mg/kg を最高用量とし，以下公比 2 で除して 1000 および 500 mg/kg を設定し，さらに雌雄それぞれに媒体対照群を設置した．

13.5. 投与液の調製

被験物質を必要量秤量し，100，200 および 400 mg/mL の濃度となるようコーンオイル（ナカライテスク株式会社, 京都府京都市, Lot No. V7B5849）に溶解した．調製は用時に行った．

13.6. 投与液中の被験物質の安定性および濃度分析

投与液中の調製後室温（約 25℃）保存下 24 時間および冷蔵（約 4℃）保存下 7 日間の安定性（30 および 2000 mg/kg；投与液濃度として 6 および 400 mg/mL：n=3）を，投与開始前に当センター代謝分析室において測定した．

また，投与液中の被験物質濃度（全濃度：n=3）を，調製後速やかに当センター代謝分析室において測定した結果, 適切に調製されていたことが確認された『Reference data 4』.

13.7. 投与経路の選択理由および投与方法

投与経路は OECD ガイドライン「急性経口」で指示されている強制経口投与経路とした．

投与容量は体重 100 g あたり 0.5 mL とし，個体別に測定した体重に基づいて投与量を算出した．

投与回数は 1 回とし，投与前 16 時間絶食させた動物に胃ゾンデを用いて 10:23 から 11:00 の間に強制経口投与した．なお，媒体対照群にはコーンオイルのみを投与した．給餌は，被験物質投与後 3 時間に行った．

13.8. 一般状態の観察

中毒症状および生死の観察は，投与後 6 時間までは 1 時間間隔，投与翌日からは 1 日 2 回実施した．観察された中毒症状は，観察所見記録用紙に記録した．なお，観察期間は被験物質投与後 14 日間とした．

13.9. 体重

体重は投与直前，投与後 1，3，7 および 14 日に電子天秤 PM 4800（メトラー・トレド社，スイス）を用いて測定した．また，死亡動物については発見時に測定した．

13.10. 病理学的検査

観察期間中の死亡例は死亡発見時に，生存動物は観察終了時にエーテル麻酔後放血安楽死させ解剖し，肉眼的病理所見を病理解剖所見記録用紙に記録した．

なお，異常の認められた器官，組織については，10%中性緩衝ホルマリン液に保存し，さらに被験物質によると思われる異常病変については代表例の病理組織学的検査を実施し，観察された所見およびその程度を記録した．

13.11. 統計解析

統計学的手法を用いた検定は実施しなかった．

13.12. 余剰動物の処分

余剰動物は炭酸ガスにより安楽死させた．

14. 試験結果

試験結果は，Table 1 に観察期間中の経日死亡状況および LD_{50} 値を，Table 2 に中毒症状およびその発現時期を示した．また，Table 3 に体重推移，Table 4 に剖検所見，Table 5 に病理組織所見を示した．

14.1. 死亡率および LD_{50} 値（Table 1）

死亡動物は，雌雄の 2000 mg/kg で投与後 3 日までに 5 例中 3 例認められた．死亡率は 0，500，1000 および 2000 mg/kg の各群で雌雄ともに 0，0，0 および 60％であり，LD_{50} 値は雌雄ともに 1000～2000 mg/kg の間にあると推定された．

14.2. 一般状態（Table 2）

雌雄ともにすべての被験物質投与群で投与直後から自発運動低下が認められ，さらに雌雄の 1000 および 2000 mg/kg で投与直後に流涙が観察された．雌雄の 2000 mg/kg では 5 例中 3 例が投与後 2 日から歩行異常，腹臥位，流涎，立毛，振戦などの症状を示して死亡したが，生存した雌雄各 2 例ではこれらの症状は観察されなかった．

なお，媒体対照群においては雌雄ともに異常は認められなかった．

14.3. 体重（Table 3）

雌雄の 0 および 500 mg/kg ではすべての動物が順調な体重増加を示したが，1000 および 2000 mg/kg では投与後 1 日の測定で体重減少が認められた．その後，生存動物は順調な体重増加を示した．

14.4. 病理学的検査（Table 4，5）

途中死亡例では肉眼観察で肺のびまん性赤色化，脾臓の淡色化および腺胃の黒色斑点が観察され，代表例の病理組織学的検査で肺に中等度のうっ血および浮腫，脾臓に中等度の濾胞萎縮，腺胃に軽度の出血が認められた．観察期間終了時の解剖ではいずれの動物にも異常は認められなかった．

15. 考察および結論

シクロヘキセンについてラットを用いる急性経口毒性試験を実施した．その結果，雌雄ともに 2000 mg/kg で約半数の動物が投与後 2 から 3 日の間に死亡したことから，LD_{50} 値は雌雄ともに 1000～2000 mg/kg の間にあると推定された．中毒症状として，雌雄ともに自発運動低下，流涙がみられ，死亡動物では歩行異常，腹臥位，流涎，立毛，振戦が認められた．剖検では死亡動物に肺のびまん性赤色化，脾臓の淡色化および腺胃の黒色斑点が観察されたが，生存動物に異常は認められなかった．死亡動物に異常のみられた器官について病理組織学的検査を実施した結果，腺胃に軽度な出血，肺にうっ血と浮腫が認められた．なお，脾臓に濾胞萎縮が認められたが被験物質との因果関係は明らかでなかった．

Table 1. Mortality

Sex	Group	Dose level (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths on the day														Mortality (%)
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Male	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	2000	5	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60
Female	5	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	500	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	7	1000	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	2000	5	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60

LD_{50} value

Male : 1000-2000 mg/kg

Female : 1000-2000 mg/kg

Table 2. Clinical observation

Sex : Male Dose level : 0 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dead																				

Number of affected animals : 0 Number of recovered animals : 0 Mortality : 0 / 5

T-02

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 500 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity	5	5																		
Dead																				

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 5 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 1000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity	5	5	5	5	5	5														
General condition																				
lacrimation	1	1																		
Dead																				

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 5 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Male Dose level : 2000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Movement																				
abnormal gait								1												
hypoactivity	5	5	5	5	5	5	5	4	2											
Posture																				
prone position								1												
General condition																				
salivation								2												
lacrimation	2	2																		
piloerection								1												
tremor								2												
Dead								3												

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 2 Mortality : 3 / 5

T-05

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 0 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Dead																				

Number of affected animals : 0 Number of recovered animals : 0 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 500 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity	5	5																		
Dead																				

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 5 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 1000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Movement																				
hypoactivity	5	5	5	5	5	5														
General condition																				
lacrimation	1	1																		
Dead																				

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 5 Mortality : 0 / 5

Table 2. -continued Clinical observation

Sex : Female Dose level : 2000 mg/kg Number of animals : 5

Signs	Hours							Days												
	1	2	3	4	5	6	24	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Movement																				
abnormal gait								3	1											
hypoactivity	5	5	5	5	5	5	5	5	3											
Posture																				
prone position								2	1											
General condition																				
salivation								3	1											
lacrimation	2	2	1																	
tremor								2	1											
Dead								2	1											

Number of affected animals : 5 Number of recovered animals : 2 Mortality : 3 / 5

Table 3. Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
1	0	1001	161	172	196	233	284
		1002	163	170	192	230	287
		1003	171	184	212	252	312
		1004	173	186	208	239	296
		1005	180	194	225	270	356
		Mean ± S.D.	170 ± 8	181 ± 10	207 ± 13	245 ± 16	307 ± 29

Table 3. -continued Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
2	500	1101	163	172	195	240	302
		1102	164	175	194	235	302
		1103	168	180	206	248	321
		1104	170	181	212	249	320
		1105	181	195	228	270	350
		Mean ± S.D.	169 ± 7	181 ± 9	207 ± 14	248 ± 13	319 ± 20

Table 3. -continued Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
3	1000	1201	163	158	178	218	264
		1202	166	156	185	223	283
		1203	173	162	180	231	296
		1204	170	180	198	240	303
		1205	176	182	196	236	289
		Mean ± S.D.	170 ± 5	168 ± 12	187 ± 9	230 ± 9	287 ± 15

Table 3. -continued Body weight

Sex : Male (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
4	2000	1301	168	148	(146)	-	-
		1302	168	145	(137)	-	-
		1303	170	148	(147)	-	-
		1304	170	162	180	223	285
		1305	179	152	176	213	280
		Mean ± S.D.	171 ± 5	151 ± 7	178 ± 3	218 ± 7	283 ± 4

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
5	0	2001	128	136	152	170	185
		2002	130	138	155	175	194
		2003	131	140	156	178	205
		2004	131	138	152	176	220
		2005	139	145	162	185	202
		Mean ± S.D.	132 ± 4	139 ± 3	155 ± 4	177 ± 5	201 ± 13

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
6	500	2101	123	129	137	160	189
		2102	124	131	145	169	201
		2103	133	140	149	178	219
		2104	130	138	145	174	201
		2105	140	148	160	182	229
		Mean ± S.D.	130 ± 7	137 ± 8	147 ± 8	173 ± 9	208 ± 16

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
7	1000	2201	123	129	141	164	203
		2202	125	132	148	171	206
		2203	127	125	137	165	197
		2204	134	130	143	170	202
		2205	139	130	142	169	196
		Mean ± S.D.	130 ± 7	129 ± 3	142 ± 4	168 ± 3	201 ± 4

Table 3. -continued Body weight

Sex : Female (unit : g)

Group	Dose level (mg/kg)	Animal ID-No.	Days after administration 0	1	3	7	14
8	2000	2301	122	102	(92)	-	-
		2302	127	112	125	159	183
		2303	132	136	148	170	197
		2304	125	108	(102)	-	-
		2305	136	122	(111)	-	-
		Mean ± S.D.	128 ± 6	116 ± 13	137 ± 16	165 ± 8	190 ± 10

( ):Body weight at death; Not included in calculation of mean body weight.

Table 4. Gross finding

Sex : Male Dose level : 0 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1001	Sacrificed	14		Normal
1002	Sacrificed	14		Normal
1003	Sacrificed	14		Normal
1004	Sacrificed	14		Normal
1005	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 500 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1101	Sacrificed	14		Normal
1102	Sacrificed	14		Normal
1103	Sacrificed	14		Normal
1104	Sacrificed	14		Normal
1105	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 1000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1201	Sacrificed	14		Normal
1202	Sacrificed	14		Normal
1203	Sacrificed	14		Normal
1204	Sacrificed	14		Normal
1205	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Male Dose level : 2000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1301	Dead	2	Spleen	Pale
			Glandular stomach	Black patch/zone, multiple
			Lung	Redness, diffuse
1302	Dead	2		Autolysis
1303	Dead	2		Normal
1304	Sacrificed	14		Normal
1305	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 0 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2001	Sacrificed	14		Normal
2002	Sacrificed	14		Normal
2003	Sacrificed	14		Normal
2004	Sacrificed	14		Normal
2005	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 500 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2101	Sacrificed	14		Normal
2102	Sacrificed	14		Normal
2103	Sacrificed	14		Normal
2104	Sacrificed	14		Normal
2105	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 1000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2201	Sacrificed	14		Normal
2202	Sacrificed	14		Normal
2203	Sacrificed	14		Normal
2204	Sacrificed	14		Normal
2205	Sacrificed	14		Normal

Table 4. -continued Gross finding

Sex : Female Dose level : 2000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
2301	Dead	3		Autolysis
			Spleen	Pale
2302	Sacrificed	14		Normal
2303	Sacrificed	14		Normal
2304	Dead	2		Autolysis
			Spleen	Pale
			Lung	Redness, diffuse
2305	Dead	2		Autolysis
			Spleen	Pale
			Lung	Redness, diffuse
			Glandular stomach	Black patch/zone, multiple

Table 5. Histopathological finding

Sex : Male Dose level : 2000 mg/kg

Animal ID-No.	Classification	Days after administration	Organ	Findings and comments
1301	Dead	2	Lung	Edema, moderate
				Congestion, moderate
			Glandular stomach	Hemorrhage, slight
			Spleen	Follicular atrophy, moderate