

最終報告書

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンのラットを用いた
経口投与による急性毒性試験

(試験番号：B041797)

2007年1月23日

株式会社三菱化学安全科学研究所

2. 目次

2. 目次	3
-------------	---

5. 要約	11
6. 緒言	11
7. 材料および方法	12
7.1 被験物質	12
7.1.1 名称	12
7.1.2 CAS 番号	12
7.1.3 物理化学的性状	12
7.1.4 入手先（製造元）	12
7.1.5 入手日	12
7.1.6 ロット番号	12
7.1.7 純度	12
7.1.8 保存条件	12
7.1.9 保管場所	12
7.1.10 安定性の確認	12
7.1.11 取扱上の注意	13
7.1.12 実験終了後の被験物質の取扱い	13
7.2 媒体	13

7.3	試験動物	13
7.3.1	動物種	13
7.3.2	系統	13
7.3.3	系統選択理由	13
7.3.4	微生物レベル	13
7.3.5	購入先	13
7.3.6	購入動物数	13
7.3.7	性別選択理由	14
7.3.8	検疫・馴化	14
7.3.9	投与時週齢	14
7.3.10	投与時体重	14
7.3.11	群分け	14
7.3.12	動物の識別	14
7.3.13	余剰動物の措置	14
7.4	動物飼育	14
7.4.1	飼育室	14
7.4.2	飼育環境	15
7.4.2.1	温度	15
7.4.2.2	相対湿度	15
7.4.2.3	換気	15
7.4.2.4	照明時間	15
7.4.3	飼育器材	15
7.4.3.1	ケージ	15
7.4.3.2	給餌器	15
7.4.3.3	給水瓶	15
7.4.3.4	架台	15
7.4.4	床敷	15
7.4.4.1	種類	15
7.4.4.2	汚染物質の確認	15
7.4.5	飼料	16
7.4.5.1	種類	16
7.4.5.2	給餌法	16
7.4.5.3	汚染物質の確認	16
7.4.6	飲用水	16
7.4.6.1	種類	16
7.4.6.2	給水法	16
7.4.6.3	分析	16
7.4.7	収容動物数	16

7.5	投与	16
7.5.1	経路・方法	16
7.5.2	回数	16
7.5.3	投与液量	17
7.6	使用動物数と用量	17
7.7	投与液の調製	18
7.7.1	方法・頻度	18
7.7.2	安定性の確認	18
7.7.3	濃度の確認	18
7.8	投与液の分析方法	18
7.8.1	GC 操作条件	18
7.8.2	標準溶液の調製	19
7.8.3	試料溶液の調製	19
7.8.4	GC 測定	19
7.9	群構成	20
7.10	観察・測定項目	20
7.10.1	一般状態の観察	20
7.10.2	体重測定	20
7.10.3	病理学検査	20
7.11	コンピュータシステムの使用	20
8.	結果, 考察および結論	21
8.1	一般状態	21
8.2	体重および体重増加量	21
8.3	剖検	21
8.4	考察および結論	21
9.	参考文献	22

5. 要約

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンを OECD テストガイドライン (TG) 423 に従って 8~9 週齢の SD 系雌ラット (CrI:CD(SD)) に強制経口投与し, その急性経口毒性を検討した. 投与用量は第 1 回および 2 回投与を 300 mg/kg, 第 3 回投与を 2000 mg/kg とした. 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンを精製水で溶解調製し, 投与前日の夕方から絶食したラットに 10 mL/kg の液量で投与した.

第 3 回投与群の 2000 mg/kg で, 自発運動低下, 眼瞼下垂, 体温低下, 呼吸不整, 緩徐呼吸, 姿勢の異常 (腹臥位, 背臥位, うずくまり) がみられ投与第 2 日までに全例が死亡した. 剖検の結果, 前胃および腺胃の赤色化ならびに水腫, 胃および腸管に異常内容物の貯留が認められた. 第 1 回および 2 回投与群の 300 mg/kg では死亡例はなく, 一般状態, 体重および剖検のいずれも被験物質に起因する変化は認められなかった.

本試験条件下における 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの Globally Harmonized Classification System (GHS) は Category 4 (>300-2000 mg/kg b.w.) に分類された.

6. 緒言

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの毒性情報としては, ラット LD₅₀ 値が 700 mg/kg で, 強い刺激性を有することが報告[1]されている. 今回, OECD による既存化学物質の安全性点検に係わる毒性調査事業の一環として, OECD TG423 に従いラットの急性毒性試験を行ったので報告する.

7. 材料および方法

7.1 被験物質

7.1.1 名称

1,3-ビス（アミノメチル）シクロヘキサン（略称；1,3-BAC）

英名称は次の2つを併記する（いずれも同一物質）。

① 1,3-Cyclohexanedimethanamine, ② 1,3-Bis (aminomethyl) cyclohexane

7.1.2 CAS 番号

2579-20-6

7.1.3 物理化学的性状

沸点 244℃, 融点/凝固点 -70℃以下, 引火点 113℃, 比重 0.940~0.950 (20℃), 溶解性は水, アルコール, nヘキサン等に可溶. アミン臭を有する無色の液体である.

7.1.4 入手先（製造元）

7.1.5 入手日

2005年3月22日

7.1.6 ロット番号

7.1.7 純度

99.98%

7.1.8 保存条件

冷蔵（許容範囲：1~10℃, 温度実測値：2.8~8.4℃）, 暗所, 窒素封入
（窒素封入：窒素を容器内へ送り込むことにより, 容器中の炭酸ガスを窒素で置換した.）

7.1.9 保管場所

被験物質保管場所（42）

7.1.10 安定性の確認

当研究所において, 第1回投与前と最終投与後に赤外吸収スペクトル法（IR法）で赤外吸収スペクトルを測定し, 試験に使用した被験物質の特性に変化がないこ

とを確認した（添付資料 11.1）。

測定機器：島津フーリエ変換赤外分光光度計（FTIR-8300, 株式会社島津製作所）

方法：

- (1) セル板（KBr）の上に被験物質を一滴たらした。
- (2) (1)の上にもう一枚のセル板（KBr）を密着させた。
- (3) 分光光度計にセットし、IR スペクトルを測定した。

7.1.11 取扱上の注意

保護具（ゴム手袋，マスク，眼鏡）を着用した。

7.1.12 実験終了後の被験物質の取扱い

実験終了後の被験物質は当研究所で実施する他試験で使用（移管）した。

7.2 媒体

精製水（超純水製造装置 MILLIPORE Simpli Lab：日本ミリポア株式会社を用いて精製した水道水を用いた）

7.3 試験動物

7.3.1 動物種

ラット

7.3.2 系統

CrI:CD(SD)

7.3.3 系統選択理由

げっ歯類を用いた毒性試験に広く使用され、背景データが豊富であり、多数の個体の入手が可能である。

7.3.4 微生物レベル

SPF

7.3.5 購入先

日本チャールス・リバー株式会社（厚木生産所）

7.3.6 購入動物数

入荷1回あたり雌8匹，合計で雌16匹とした。

第1回入荷動物は第1および2回投与に用いた。第2回入荷動物は第3回投与に用いた。

7.3.7 性別選択理由

OECD テストガイドライン No.423 に基づき、雌を選択した。

7.3.8 検疫・馴化

検疫として一般状態を5日間1日1回観察し、健康状態が良好であることを確認した。また、動物入荷時および検疫終了時に体重を測定し、体重増加が認められることを確認した。検疫終了後も投与日まで1日1回一般状態を観察し、馴化を継続した。

7.3.9 投与時週齢

8～9週齢

7.3.10 投与時体重

動物の体重範囲は、各投与日の平均体重 $\pm 20\%$ 以内、第2回以降の平均体重は第1回投与時に対して $\pm 20\%$ 以内であることを確認した。

第1回～3回までの動物の体重範囲：179～199 g

7.3.11 群分け

検疫終了時に体重層別化無作為抽出法により、同日入荷動物の平均体重がほぼ均一になるように群分けした。

7.3.12 動物の識別

油性ペンで尾にマーキングを行い、個体識別した。ケージには検疫・馴化期間（動物選抜前）は試験番号、ケージ番号、検疫・馴化期間中の動物番号、動物種、系統および性別を記載したラベルを、群分け後は新たに尾にマーキングを行い、試験番号、被験物質名、群名（用量）、性別、動物種、系統および動物番号を記載したラベルを付けた。

7.3.13 余剰動物の措置

余剰動物は同日入荷動物の投与がすべて終了した後、麻酔下で腹大動脈を切断・放血し安楽死処分した。なお、第3回投与の2000 mg/kgにおいて全例が死亡したため、試験フローに従い投与は第3回までとし、以後の投与は行わなかった。よって、第4回投与用動物は余剰動物と同様に処理した。

7.4 動物飼育

7.4.1 飼育室

ラット・マウス飼育室（検疫期間：4125室、検疫終了後：2124室）

7.4.2 飼育環境

7.4.2.1 温度

21.0～22.6℃（許容範囲 19.0～25.0℃）

7.4.2.2 相対湿度

51.5～66.5%（許容範囲 35.0～75.0%）

7.4.2.3 換気

6～20 回/時，オールフレッシュエアー供給

7.4.2.4 照明時間

12 時間/日（7:00～19:00）

7.4.3 飼育器材

7.4.3.1 ケージ

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200H mm，トキワ科学器械株式会社）を使用し，群分け時および第 8 日に交換した．第 2 回投与動物は投与前日にも交換した．

7.4.3.2 給餌器

オートクレーブ滅菌した固型用ステンレス製給餌器（トキワ科学器械株式会社）を使用し，ケージ交換時に交換した．

7.4.3.3 給水瓶

オートクレーブ滅菌したポリカーボネート製給水瓶（700 mL，トキワ科学器械株式会社）を使用し，ケージ交換時に交換した．

7.4.3.4 架台

ベンザルコニウム系特殊洗剤（マイクロカット，エコラボ株式会社）の希釈液で消毒したスチール製架台（トキワ科学器械株式会社）を使用した．

7.4.4 床敷

7.4.4.1 種類

オートクレーブ滅菌した実験動物用床敷（ベータチップ，日本チャールス・リバー株式会社）を使用し，ケージ交換時に交換した．

7.4.4.2 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を供給者から入手し，残留農

薬等の汚染物質が、試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

7.4.5 飼料

7.4.5.1 種類

実験動物用固型飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株式会社)

7.4.5.2 給餌法

自由摂取とし、給餌器交換時に交換した。なお、投与前日の夕方（投与の約 17 時間前）から投与後 3 時間までは絶食させた。

7.4.5.3 汚染物質の確認

財団法人日本食品分析センターで実施した分析結果を供給者から入手し、使用したロット（ロット番号：050401, 050510）の残留農薬等の汚染物質濃度が、試験施設の標準操作手順書の基準に適合していることを確認した。

7.4.6 飲用水

7.4.6.1 種類

5 μm フィルター濾過後、紫外線照射した水道水

7.4.6.2 給水法

自由摂取とし、給水瓶交換時に交換した。

7.4.6.3 分析

株式会社ダイヤ分析センターで水質検査を定期的実施し、得られた分析値が試験施設の標準操作手順書の基準に適合することを確認した。

7.4.7 収容動物数

群分け前は 1 ケージ当たり 4 匹、群分け後は 3 匹とした。

7.5 投与

7.5.1 経路・方法

経口（強制経口投与）。投与前日の夕方から約 17 時間絶食させたラットに胃ゾンデを装着したディスプレイブル注射筒を用いて投与した。投与後約 3 時間は飼料を与えなかった。

7.5.2 回数

各動物あたり 1 回、午前中に投与した。

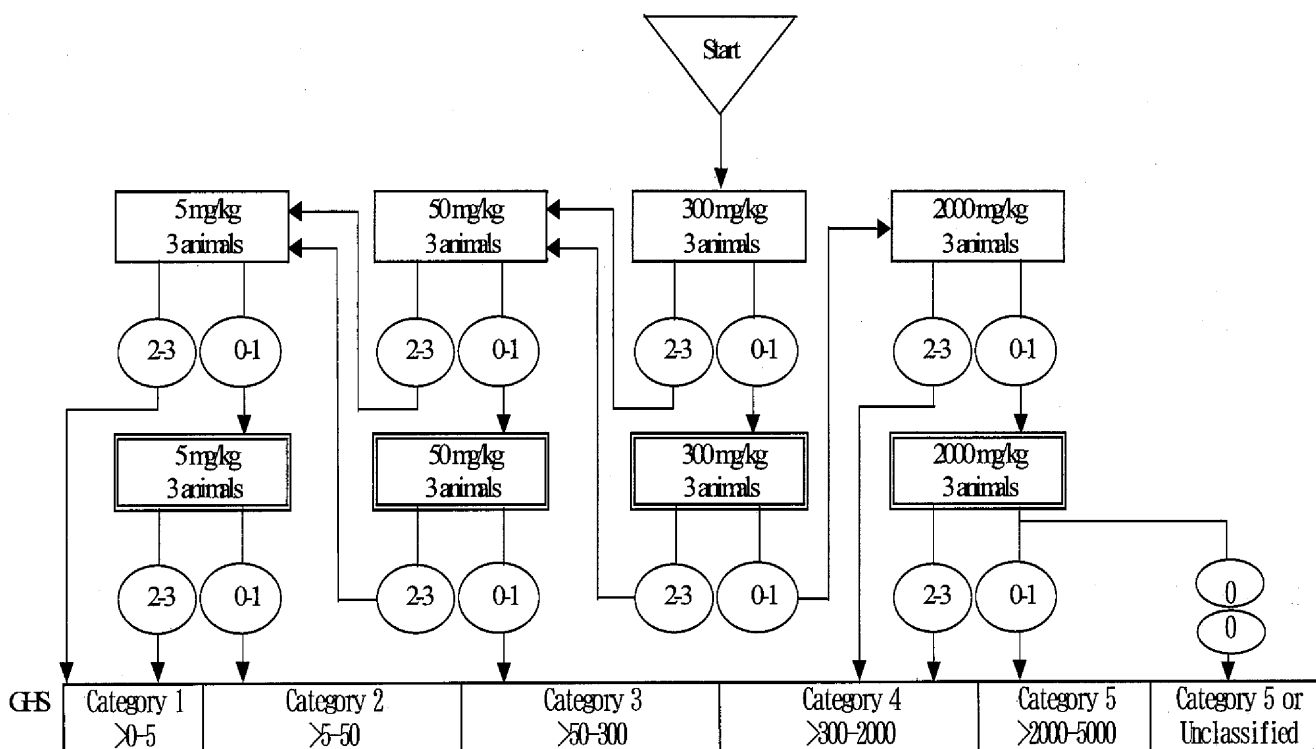
7.5.3 投与液量

10 mL/kg とし、投与直前に測定した体重に基づいて算出した。

7.6 使用動物数と用量

各投与段階につき雌 3 匹を使用した。被験物質提供者（製造元）の MSDS シートから、経口投与による雄ラットの LD₅₀ が 700 mg/kg との情報 [1] がある。このことから、試験の開始投与用量は 300 mg/kg とし、下記のフローチャートに従って試験を行った。

※ 楕円の中の数字は死亡動物数を示す（死亡動物数には瀕死のため屠殺した動物を含む）。



GHS : Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w.)

300 mg/kg の第 1 回および 2 回投与では死亡がなく、2000 mg/kg の第 3 回投与では全例が死亡したため、第 4 回投与は実施しなかった。動物の死亡状況からフローチャートに従い GHS の分類を行った。

7.7 投与液の調製

7.7.1 方法・頻度

被験物質を所定量秤量し、媒体（精製水）を加え溶解し、30 および 200 mg/mL の濃度を調製した。各濃度とも投与前（1～7日前）に調製した。投与に供するまで冷蔵（許容範囲：1～10℃，温度実測値：2.9～7.5℃）・暗所で保存し、調製後 7 日以内に使用した。調製はイエローランプ照明下の調剤室にて実施した。

7.7.2 安定性の確認

当研究所で実施された投与液の安定性試験（試験番号：B050280）で、冷蔵・暗所保存条件下で 8 日間の安定性が、2 および 200 mg/mL の濃度で GC 法により確認されている（添付資料 11.2）。

7.7.3 濃度の確認

調製した投与液を GC 法により分析し、各濃度の平均値が設定濃度±10%以内であることを確認した。各投与液の対設定濃度は 30 mg/mL が 103.0%，200 mg/mL が 103.5%であった（添付資料 11.3）。なお、200 mg/mL 投与液の分析の結果、測定値の対設定濃度が許容基準を満たさなかったため、再調剤し分析した。

7.8 投与液の分析方法

当研究所で実施された投与液の分析バリデーション（試験番号：B050280，表題：Validation of the Analytical Method for 1,3-BAC Concentration in Preparation）の方法に従って実施した。分析法を以下に示す。

7.8.1 GC 操作条件

GC システム： HP6890 (HEWLETT PACKARD)
カラム： HP-1, 0.25 mm I.D. × 30 m, 0.25 μm, Agilent
キャリアガス： Helium at 30 cm/sec, measured at 80°C
カラムオープン： 80°C (0 min) → 30°C/min → 290°C (3 min)
注入口： Splitless, 300°C
注入量： 1 μL
検出器： FID, 325°C
H₂ (40 mL/min), Air (450 mL/min), Makeup gas: He, 25 mL/min

7.8.2 標準溶液の調製

下表に従い標準溶液 (ST-2, ST-4, ST-8) を調製した。

溶液略号	調製方法		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
SS-1	1,3-BAC, 約 50 mg	→ 50 mL/ アセトン	1000
SS-2	SS-1, 1 mL	→ 20 mL/ アセトン	50
ST-2	SS-2, 1 mL	→ 25 mL/ アセトン	2
ST-4	SS-2, 2 mL	→ 25 mL/ アセトン	4
ST-8	SS-2, 4 mL	→ 25 mL/ アセトン	8

7.8.3 試料溶液の調製

下表に従い試料溶液を調製した。

濃度 (mg/mL)	調製方法		濃度 ($\mu\text{g/mL}$)
30	①	投与液 1 mL → 100 mL/ アセトン	300
	②	①, 1 mL → 50 mL/ アセトン	6
200	①,	投与液 1 mL → 100 mL/ アセトン	2000
	②,	①, 1 mL → 25 mL/ アセトン	80
	③,	②, 1 mL → 20 mL/ アセトン	4

7.8.4 GC 測定

標準溶液 (ST-2, ST-4 および ST-8) および試料溶液 (n=2) を条件設定した GC に注入して、クロマトグラム上の 1,3-BAC のピーク面積を測定した。測定した標準溶液の濃度およびそのピーク面積から検量線の一次式を求めた。検量線の一次式および試料溶液測定から得られたピーク面積を用いて、試料溶液中の 1,3-BAC の濃度を求め、試料溶液の希釈倍率から投与液中の 1,3-BAC の濃度を算出した。

7.9 群構成

投与群の構成を以下に示す。

用量*	動物数 (匹)	動物番号
第1回投与群 300 mg/kg	雌 3	50101-50103
第2回投与群 300 mg/kg	雌 3	60101-60103
第3回投与群 2000 mg/kg	雌 3	70101-70103

*、第2回以降の用量は7.6項のフローチャートに従って選択した。

7.10 観察・測定項目

以下に示す項目を観察・測定した。なお、日の表記は投与日を第1日とした。

7.10.1 一般状態の観察

各動物の生死、一般状態を投与日には投与前、投与後10分、30分、1、3、6時間の6回、その後は1日1回、14日間にわたって観察した。

7.10.2 体重測定

全生存動物について投与直前、第4、8および15日に電子天秤（EB-6200S、株式会社島津製作所）を用いて測定した。死亡動物は死亡発見時にも測定した。なお、各測定日間の増加量を算出した。

7.10.3 病理学検査

第15日に生存動物全例について、ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液、大日本製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。死亡動物は発見後速やかに剖検した。なお、第3回投与群の2000 mg/kgで胃および腸管に異常が認められたため、当該器官・組織を10v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。

7.11 コンピュータシステムの使用

群分け、一般状態および体重データの収集、投与液量の算出には安全性試験システム（MiTOX、三井造船システム技研株式会社）を使用した。当該システムのコンピュータプロトコールにはデータ収集範囲、データ収集の日程を登録した。コ

ンピュータシステムのプロトコール番号は第1回投与用に B041797_(_は空白), その後の投与段階には第2回投与を B041797A, 第3回投与を B041797B とした.

8. 結果, 考察および結論

8.1 一般状態 (Table 1, Appendix 1)

第1回および第2回投与群の 300 mg/kg では死亡はなく, 一般状態にも変化は認められなかった.

第3回投与群の 2000 mg/kg では投与日(第1日)に1例, 第2日に2例が死亡した. 一般状態の変化として, 投与後10分より自発運動低下および呼吸不整が全例, 30分ではこれに加え眼瞼下垂, 腹臥位あるいは背臥位が全例に認められた. 投与後1および3時間では中等度の自発運動低下, 眼瞼下垂, 緩徐呼吸およびうずくまりが全例で認められた. 投与後6時間では1例(動物番号 70102)が死亡し, 残り2例は体温低下を示し翌日に死亡した.

8.2 体重および体重増加量 (Tables 2 and 3, Appendix 2 and 3)

第1回および2回投与群の 300 mg/kg では, 体重は順調に増加した.

8.3 剖検 (Table 4, Appendix 4)

第1回および2回投与群の 300 mg/kg では異常は認められなかった.

死亡動物の剖検では, 前胃および腺胃の赤色化, 水腫, 異常内容物貯留, 腸管に異常内容物貯留が全例に認められた. また, 投与日に死亡した1例は赤色の腹水が認められた.

8.4 考察および結論

1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンを 300 および 2000 mg/kg の用量で雌ラットに単回経口投与し, その急性毒性変化を検討した.

第3回投与群の 2000 mg/kg で, 自発運動低下, 眼瞼下垂, 体温低下, 呼吸および姿勢の異常がみられ投与第2日までに全例が死亡し, 剖検では胃および腸管に異常所見が認められた. 胃・腸管の変化は被験物質が有する刺激性に起因するものと考えられる [1]. 第1回および2回投与群の 300 mg/kg では死亡例はなく, 一般状態, 体重および剖検のいずれも被験物質に起因する変化は認められなかった.

本試験条件下における 1,3-ビス(アミノメチル)シクロヘキサンの GHS は Category 4 (>300-2000 mg/kg b.w.) に分類された.

9. 参考文献

- [1] 製品安全データシート, 1, 3-ビス (アミノメチル) シクロヘキサン, 三菱ガス化学株式会社, 2003.

群別表および個体別表
目次

Table 1	一般状態	1
Table 2	体重	2
Table 3	体重増加量	3
Table 4	剖検所見	4

Table 1 Clinical Sign - Summary

Test Substance Dose	Findings	Day Time	Female																			
			1 10	20	30	40	50	60	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Number of Animals		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
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Number of Animals		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
1, 3-BAC 2000 mg/kg (Third)	Number of Animals		3	3	3	3	3	3	2													
	No Abnormality		3	0	0	0	0	0	0													
	Death	+	0	0	0	0	0	1	2													
	Prone position	+	0	0	2	0	0	0	0													
	Supine position	+	0	0	1	0	0	0	0													
	Crouching position	+	0	0	0	3	3	2	0													
	Decrease in locomotor activity	1	0	3	0	0	0	0	0													
		2	0	0	3	3	3	0	0													
		3	0	0	0	0	0	2	0													
	Irregular respiration	+	0	3	3	0	0	0	0													
Bradypnea	+	0	0	0	3	3	2	0														
Hypothermia	+	0	0	0	0	0	2	0														
Ptosis	1	0	0	3	3	3	2	0														

+, Present; 1, Slight; 2, Moderate; 3, Severe;

Time 10, Before dosing; Time 20, 10 min. after dosing; Time 30, 30 min. after dosing; Time 40, 1 hr. after dosing; Time 50, 3 hr. after dosing;

Time 60, 6 hr. after dosing;

Table 2 Body Weight - Summary

Female

Test Substance Dose	Day	1	4	8	15	Unit : g
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Mean	191.0	215.3	223.0	241.7	
	S. D.	1.0	0.6	5.6	7.0	
	n	3	3	3	3	
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Mean	196.7	221.7	236.3	244.7	
	S. D.	2.1	7.5	12.5	18.8	
	n	3	3	3	3	
1, 3-BAC 2000 mg/kg (Third)	Mean	180.7				
	S. D.	1.5				
	n	3				

Table 3 Body Weight Gain - Summary

Female

Test Substance Dose	Day	1-4	4-8	8-15
1, 3-BAC 300 mg/kg (First)	Mean	24.3	7.7	18.7
	S. D.	1.2	5.0	5.1
	n	3	3	3
1, 3-BAC 300 mg/kg (Second)	Mean	25.0	14.7	8.3
	S. D.	6.2	5.0	6.7
	n	3	3	3

Unit : g

Table 4 Necropsy Findings - Summary

Scheduled Sacrifice (Day 15)

Organ	Sex	:	Female	
			1, 3-BAC (First)	1, 3-BAC (Second)
	Test Substance	:		
	Dose (mg/kg)	:	300	300
Findings	Number of Animals	:	3	3
	Number of Animals Examined	:	<3>	<3>
	No abnormality		3	3

Table 4 Necropsy Findings - Summary

Death

Organ Findings	Sex	Test Substance	Dose (mg/kg)	Number of Animals	Number of Animals Examined	Death
	Female	1, 3-BAC (Third)	2000	3	<3>	
Stomach						
Abnormal contents, tar						3
Edema						3
Reddish change, (forestomach, glandular stomach)						3
Duodenum						
Abnormal contents, tar						3
Jejunum						
Abnormal contents, tar						3
Ileum						
Abnormal contents, tar						3
Abdominal cavity						
Ascites						1