厚生省生活衛生局　殿

試　験　報　告　書

N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide のラットを用いた
経口投与による単回投与毒性試験

（試験番号：１Ｌ４０６）

株式会社三菱化成安全科学研究所

目 次

頁

1 要約 …… 1

2 材料と方法

2.1 被験物質 …… 2

2.2 試験動物 …… 2

2.3 動物飼育 …… 2

2.4 投与液の調製 …… 3

2.5 投与用量および投与液量 …… 3

2.6 投与方法 …… 3

2.7 一般状態観察 …… 3

2.8 体重測定 …… 3

2.9 剖検 …… 4

2.10 病理組織学的検査 …… 4

2.11 LD_{50}値の算出 …… 4

3 結果および結論

3.1 死亡動物 …… 5

3.2 一般状態 …… 5

3.3 体重 …… 5

3.4 剖検 …… 5

3.5 結論 …… 6

図表

Fig. 1 Body weight …… 7

Table 1 Mortality …… 8

Table 2 Clinical signs …… 9

Table 3 Mean body weight …… 13

Table 4 Autopsy findings …… 14

1　要　約

(1)　N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide をＳＤ系(Crj:CD)ラット(SPF)の雌雄に単回経口投与した時の毒性について検討した。

(2)　雄は700 、1000、1400および2000mg/kgの４用量、雌は500 、700 、1000、1400、2000mg/kgの５用量を設定し、１群各５匹に投与した。溶媒にはオリーブ油を使用した。投与液量は５ml/kgとした。

(3)　死亡動物は雌雄とも1000mg/kg 以上の群で認められ、雌の2000mg/kg の群では全例が死亡した。死亡の発現は投与後30分から２日以内であった。

(4)　一般状態の観察では、雌雄とも700mg/kg以上の群で自発運動量減少、つま先立ち歩行、うずくまり、横たわり、不整呼吸、呼吸緩徐、あえぎ、流涎、軟便および腹部膨満が観察された。これらの症状は投与後９日までに消失した。

(5)　体重では、雄の2000mg/kg 群で投与後７日に増加抑制が認められたが、以後は順調な増加を示した。雌では、ほぼ順調な増加が認められた。

(6)　死亡動物の剖検では、心房拡張、肺の鬱血／水腫・出血、気管内粘液貯留、胃の出血・びらん／潰瘍・膨満、小腸の出血・鬱血・拡張、肝臓の黄白色化／白色点、膀胱に暗赤色尿貯留が認められた。

　生存動物の観察期間終了後の剖検では、前胃部の肥厚、胃と腹腔内臓器の癒着がほぼ全例に認められた。

(7)　以上の結果よりN,N'-Dicyclohexylcarbodiimide のLD_{50}値は、雄は1110mg/kg(95%信頼限界：832 ～1480mg/kg)、雌は1110mg/kg(95%信頼限界：877 ～1404mg/kg)と結論した。

2　材料と方法

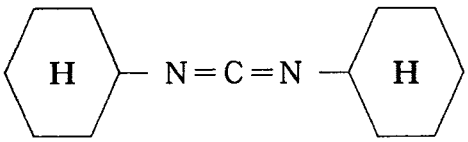
2.1　被験物質

より提供されたN,N'-Dicyclohexylcarbodiimide(

ﾛｯﾄ番号：　　純度99.7%，略称：ＤＣＣ）を使用した。被験物質は下記の構造を有する白色の結晶塊である。なお、本ロットについては投与開始前および投与終了後に分析し、安定であることが確認された。

化学名：N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide

構造式：



分子量：206.3

2.2　試験動物

日本チャールス・リバー株式会社より1991年９月４日に購入したＳＤ系(Crj:CD)ラット(SPF）の雌雄を６～７日間馴化し、健康な動物を試験に使用した。１用量群の動物数は５匹とし、投与前日に各群の平均体重がほぼ均一になるように体重別層化無作為抽出法により群分けした。投与時の週齢は５～６週齢、体重範囲は雄で154g～171g、雌で112g～132gであった。

2.3　動物飼育

2.3.1　飼育管理

馴化・検疫期間を含めた全飼育期間中、温度20～25℃、湿度40～70%R.H.、換気約12回／時、照明12時間／日（7:00～19:00)に自動調節された飼育室を使用した。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）を敷いたポリカーボネート製ケージ(265W×426D×200Hmm：トキワ科学器械株式会社）に１ケージ当り５匹収容し、スチール製架台（４段：トキワ科学器械株式会社）上で飼育した。ステンレス製の固型飼料用給餌器（トキワ科学器械株式会社）およびポリカーボネート製の給水瓶(700㎖：トキワ科学器械株式会社）を用いた。ケージ（含床敷）、

給餌器および給水瓶は、週１回の頻度でオートクレーブ滅菌したものと交換した。

2.3.2　飼料

実験動物用固型飼料（MF：オリエンタル酵母工業株式会社）を自由摂取させた。飼料は週１回の頻度で交換した。なお飼料については残留農薬等汚染物質の分析値が当社のSOPで定めた濃度以下であることが保証されたものを使用した。

2.3.3　飲水

５μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由摂取させた。飲水は週１回の頻度で交換した。なお水道法に準拠した水質検査を定期的に行い、厚生省令56の別表に定める基準範囲内であることを確認している。

2.4　投与液の調製

秤量した被験物質にオリーブ油を加え、40℃以下で加温し溶解調製した。

2.5　投与用量および投与液量

予備試験の結果を参考に、雄は700 、1000、1400、2000mg/kgの４用量、雌は500、700、1000、1400、2000mg/kgの５用量（公比約$\sqrt{2}$）を投与した。投与液量は５㎖/kgとした。

2.6　投与方法

投与前日の夕方から絶食させ、胃ゾンデを用いて、胃内に１回強制経口投与した。投与後約３時間は飼料を与えなかった。

2.7　一般状態観察

投与当日は投与後15、30分、１、２、４、６、７および８時間、以後１日１回、14日間にわたって各動物の生死および一般状態を観察した。

2.8　体重測定

投与日を０日として、投与直前、投与後７および14日に体重を測定した。測定には上皿電子天秤（EB-5000: 株式会社島津製作所）を使用した。

2.9 剖検

死亡動物については、発見後速やかに剖検した。生存動物については観察終了後（投与後14日）にペントバルビタール・ナトリウム（ネンブタール注射液：ダイナボット株式会社）麻酔下で腹大動脈を切断し、放血致死させ剖検した。

2.10 病理組織学的検査

死亡動物の剖検時に異常の認められた肝臓および腎臓については、代表的な標本（雄の1000mg/kg および1400mg/kg 群の各１例、雌の1000mg/kg および2000mg/kg 群の各１例）を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液にて固定後、常法によりパラフィン包埋、薄切およびヘマトキシリン・エオジン(H.E.)染色を施し鏡検した。

2.11 LD_{50}値の算出

各用量群における投与後14日の死亡率をもとにVan der Waerden 法によりLD_{50}値を算出した。

3　結果および結論

3.1　死亡動物（表１）

雌雄とも1000mg/kg 以上の群で死亡が認められ、雌の2000mg/kg群で全例が死亡した。死亡の発現は投与後30分～２日以内であった。

3.2　一般状態（表２）

投与当日に雌雄とも700mg/kg以上の群で自発運動量減少、つま先立ち歩行、うずくまり、横たわり、不整呼吸、呼吸緩徐、あえぎ、流涎、軟便が観察された。投与１日以降も1000mg/kg 以上の群で自発運動量減少、呼吸緩徐が雌雄とも観察された他、雄では肛門周囲の汚れ、腹部膨満、雌ではつま先立ち歩行が観察された。これらの症状は投与後９日までに消失した。

3.3　体重（図１、表３、付表１）

雄の2000mg/kg 群で投与後７日に増加抑制が認められたが、以後は順調な増加を示した。雌では、ほぼ順調な増加が認められた。

3.4　剖検（表４）

死亡動物の剖検では、心房拡張、肺の鬱血／水腫・出血、気管内粘液貯留、胃の出血・びらん／潰瘍・膨満、小腸の出血・鬱血・拡張、肝臓の黄白色化／白色点、膀胱に暗赤色尿貯留が認められた。肝臓の黄白色化／白色点、膀胱に暗赤色尿貯留が認められた動物の肝臓および腎臓を組織学的検査を実施した結果、肝臓では小葉辺縁性の肝細胞の空胞化、壊死およびグリソン鞘結合織内の出血が認められた。腎臓では尿細管上皮細胞の硝子滴変性が認められた他、暗赤色尿貯留を示した動物には腎乳頭管内にヘモグロビン円柱が認められた。

生存動物の観察期間終了後の剖検では、前胃部の肥厚、胃と腹腔内臓器の癒着がほぼ全例に認められた。また、腎盂拡張が雄の1000mg/kg 群および雌の700mg/kg群の各１例に認められた。

3.5　結論

以上の結果よりN,N'-Dicyclohexylcarbodiimide のLD$_{50}$値は、雄で1110mg/kg(95%信頼限界：832 ～1480mg/kg)、雌で1110mg/kg(95%信頼限界：877 ～1404mg/kg)と結論した。

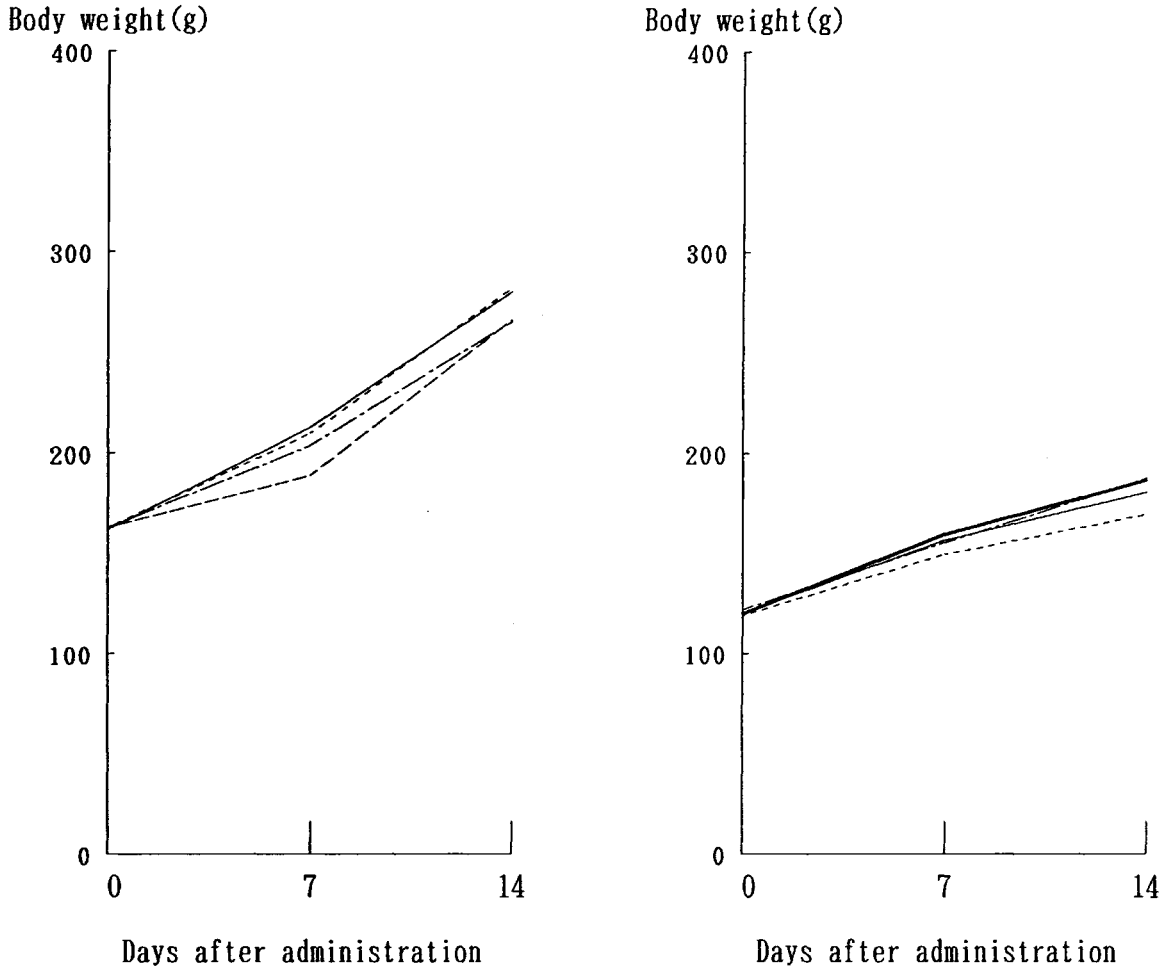


Fig. 1 Body weight (left : Male, right : Female)

—: 500mg/kg
—: 700mg/kg
···: 1000mg/kg
---: 1400mg/kg
--: 2000mg/kg

Table 1 Mortality 1L406

(Cumulative mortality / No. of test animals)

Sex	Dose (mg/kg)	Time after administration 15m	30m	1h	2h	4h	6h	7h	8h	Days after administration 1	2	3	4 ・・・ 14d	Mortality rate (%)
Male	700	0/5	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→ 0/5	0
	1000	0/5	1/5	→	→	→	→	→	→	2/5	3/5	→	→ 3/5	60
	1400	0/5	→	→	→	→	→	→	→	2/5	3/5	→	→ 3/5	60
	2000	0/5	→	→	→	→	→	1/5	→	3/5	→	→	→ 3/5	60
Female	500	0/5	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→ 0/5	0
	700	0/5	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→ 0/5	0
	1000	0/5	→	→	→	→	→	→	→	2/5	3/5	→	→ 3/5	60
	1400	0/5	→	→	→	→	→	→	→	3/5	→	→	→ 3/5	60
	2000	0/5	→	→	3/5	→	→	→	→	5/5	→	→	→ 5/5	100

m : minutes, h : hour(s), d : days.

(No. of animals with findings / No. of surviving animals)

Dose (mg/kg)	Clinical signs		Time after administration 15m	30m	1h	2h	4h	6h	7h	8h
700	Loose stool					2/5				
	Normal		5/5	5/5	5/5	3/5	5/5	5/5	5/5	5/5
1000	Decrease of locomotor activity	+	1/5	1/4	2/4		4/4	4/4	4/4	4/4
	Hypopnoea		1/5	1/4	2/4					
	Salivation	+	4/5	3/4						
	Loose stool				1/4	1/4	1/4		1/4	1/4
	Normal		1/5	1/4	0/4	3/4	0/4	0/4	0/4	0/4
1400	Decrease of locomotor activity	+		4/5	3/5	1/5	4/5	4/5	3/5	3/5
		++		1/5			1/5	1/5		
		+++							1/5	1/5
	Hypopnoea			3/5	1/5		1/5	2/5	2/5	1/5
	Salivation	+	2/5							
	Loose stool				2/5	3/5	2/5		1/5	2/5
	Tiptoe gait							1/5		
	Crouching								1/5	
	Prone position									1/5
	Normal		3/5	0/5	1/5	2/5	0/5	0/5	1/5	1/5
2000	Decrease of locomotor activity	+		3/5	5/5	2/5	3/5	3/5	2/4	3/4
		++				1/5	2/5	2/5	1/4	
		+++							1/4	1/4
	Hypopnoea			2/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/4	1/4
	Salivation	+	1/5	1/5						
	Loose stool				1/5	3/5	3/5		3/4	3/4
	Crouching								1/4	1/4
	Normal		4/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/4	0/4

m : minutes, h : hour(s), + : slight, ++ : moderate, +++ : severe.

Table 2-1-2 Clinical signs (Male) 1L406

(No. of animals with findings / No. of surviving animals)

Dose (mg/kg)	Clinical signs		Days after administration 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	−14d
700	Normal		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	−5/5
1000	Decrease of locomotor activity	+	2/3	1/2	1/2	1/2			1/2	1/2			
		++	1/3										
	Hypopnoea		2/3						1/2	1/2			
	Soiled perineal region		1/3										
	Normal		0/3	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2	2/2	2/2	−2/2
1400	Decrease of locomotor activity	+	2/3										
		++	1/3										
	Hypopnoea		1/3		1/2								
	Normal		0/3	2/2	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	−2/2
2000	Decrease of locomotor activity	+	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2			
	Hypopnoea			1/2	2/2	2/2							
	Soiled perineal region		2/2	2/2	1/2	1/2							
	Abdominal distention			2/2									
	Normal		0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2	2/2	2/2	−2/2

d : days, + : slight, ++ : moderate.

(No. of animals with findings / No. of surviving animals)

Dose (mg/kg)	Clinical signs		Time afer administration 15m	30m	1h	2h	4h	6h	7h	8h
500	Normal		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
700	Loose stool					2/5	3/5			
	Normal		5/5	5/5	5/5	3/5	2/5	5/5	5/5	5/5
1000	Decrease of locomotor activity	+	2/5	4/5		1/5	3/5	4/5	4/5	3/5
		++	1/5	1/5						1/5
	Hypopnoea					1/5	1/5	1/5	1/5	1/5
	Irregular respiration		1/5							
	Salivation	+	2/5	1/5		1/5				
		++		1/5	1/5					
	Crouching		1/5							
	Normal		2/5	0/5	4/5	4/5	2/5	1/5	1/5	1/5
1400	Decrease of locomotor activity	+			1/5	2/5	2/5	2/5	2/5	2/5
		++	2/5	3/5			1/5	2/5	2/5	2/5
	Hypopnoea			2/5			2/5	2/5	2/5	2/5
	Salivation	+	1/5	3/5						
	Crouching		2/5	2/5				1/5	1/5	1/5
	Normal		3/5	1/5	4/5	3/5	2/5	1/5	1/5	1/5
2000	Decrease of locomotor activity	+	2/5	2/5	2/5	1/2	2/2	2/2	1/2	1/2
		++	1/5	2/5		1/2			1/2	1/2
		+++		1/5	2/5					
	Hypopnoea		4/5	4/5	3/5	1/2	2/2	2/2	2/2	1/2
	Gasping				1/5					
	Salivation	+	4/5	4/5	1/5					
	Tiptoe gait									1/2
	Crouching									1/2
	Prone position			1/5						
	Loose stool					1/2	1/2			1/2
	Normal		1/5	0/5	0/5	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2

m : minutes, h : hour(s), + : slight, ++ : moderate, +++ : severe.

(No. of animals with findings / No. of surviving animals)

Dose (mg/kg)	Clinical signs		Days after administration 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	−14d
500	Normal		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	−5/5
700	Normal		5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	−5/5
1000	Decrease of locomotor activity	+	2/3	1/2									
		++	1/3										
	Hypopnoea		2/3										
	Normal		0/3	1/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	2/2	−2/2
1400	Decrease of locomotor activity	+	2/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2			
	Hypopnoea		2/2	1/2	2/2								
	Tiptoe gait		1/2										
	Normal		0/2	1/2	0/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	2/2	2/2	−2/2
2000			AD										

d : days, + : slight, ++ : moderate, +++ : severe, AD : all animals were dead.

Table 3 Mean body weight 1L406

Unit : g

Sex	Dose (mg/kg)		Days after administration 0	7	14
Male	700	Mean	162	213	280
		S. D.	3.6	4.2	10.4
		Number	5	5	5
	1000	Mean	163	210	282
		S. D.	6.5	31.8	26.2
		Number	5	2	2
	1400	Mean	163	204	265
		S. D.	1.3	0.7	9.2
		Number	5	2	2
	2000	Mean	163	189	266
		S. D.	5.8	14.8	15.6
		Number	5	2	2
Female	500	Mean	120	160	187
		S. D.	4.7	8.6	14.7
		Number	5	5	5
	700	Mean	120	157	181
		S. D.	6.6	10.2	13.0
		Number	5	5	5
	1000	Mean	119	150	170
		S. D.	4.3	5.7	6.4
		Number	5	2	2
	1400	Mean	122	156	188
		S. D.	6.9	19.1	17.7
		Number	5	2	2
	2000	Mean	126		
		S. D.	4.7	AD	
		Number	5		

AD : all animals were dead.

Table 4-1 Autopsy findings (Male) 1L406

(No. of animals with findings / No. of animals examined)

	Organ : findings	Dose (mg/kg) :	700	1000	1400	2000
Dead animals	Heart :	dilatation of atrium	–	1/3	0/3	3/3
	Lung :	congestion/edema	–	1/3	0/3	2/3
	Trachea :	mucus stagnation	–	1/3	0/3	0/3
	Stomach :	focal hemorrhage (glandular area)	–	1/3	1/3	2/3
		erosion/ulcer (glandular area)	–	2/3	2/3	1/3
		dilatation	–	1/3	2/3	1/3
	Small intestine :	focal hemorrage	–	1/3	0/3	0/3
		congestion	–	1/3	0/3	0/3
		dilatation	–	1/3	0/3	0/3
	Liver :	yellowish change/whitish dot	–	0/3	1/3	0/3
	Urinary bladder :	dark-red urine	–	1/3	0/3	0/3
	Normal		–	0/3	0/3	0/3
Surviving animals	Stomach :	focal thickening of mucosa (non-glandular area)	5/5	2/2	2/2	2/2
		adhesion(stomach and other abdominal organs)	4/5	2/2	2/2	2/2
	Kidney :	dilatation of the renal pelvis	0/5	1/2	0/2	0/2
	Normal		0/5	0/2	0/2	0/2

Table 4-2 Autopsy findings (Female) 1L406

(No. of animals with findings / No. of animals examined)

	Organ : findings	Dose (mg/kg) :	500	700	1000	1400	2000
Dead animals	Heart :	dilatation of atrium	–	–	0/3	1/3	3/5
	Lung :	focal hemorrage	–	–	0/3	0/3	1/5
	Trachea :	mucus stagnation	–	–	0/3	0/3	1/5
	Stomach :	focal hemorrhage (glandular area)	–	–	2/3	1/3	3/5
		focal hemorrhage (non-glandular area)	–	–	1/3	0/3	0/5
		erosion/ulcer (glandular area)	–	–	0/3	3/3	1/5
		dilatation	–	–	1/3	1/3	1/5
	Small intestine :	congestion	–	–	1/3	2/3	0/5
		dilatation	–	–	0/3	0/3	1/5
	Liver :	yellowish change/whitish dot	–	–	1/3	1/3	1/5
	Normal		–	–	0/3	0/3	0/5
Surviving animals	Stomach :	focal thickening of mucosa (non-glandular area)	5/5	5/5	2/2	2/2	–
		adhesion(stomach and other abdominal organs)	4/5	4/5	2/2	2/2	–
	Kidney :	dilatation of the renal pelvis	0/5	1/5	0/2	0/2	–
	Normal		0/5	0/5	0/2	0/2	–