B041793

最終報告書

クロロ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：B041793）

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

7.2.1 使用方法 13
7.2.2 保管条件 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 14
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 15
7.4.1 飼育室 15
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 16
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 17
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　結論 21
9. 参考文献 22

群別表および個体別表（頁 1 – 20）

5. 要約

クロロシクロヘキサンを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（Crl: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回および4回投与を2000 mg/kgとした．クロロシクロヘキサンをオリブ油で溶解調製し，投与前日の夕方から絶食したラットに5 mL/kgの液量で投与した．

第1回～4回投与群の300および2000 mg/kgの用量いずれにも，死亡例はなく，一般状態および剖検に異常は認められなかった．2000 mg/kgでは体重増加の抑制や減少がみられたが投与第8日には回復した．

本試験条件下におけるクロロシクロヘキサンの概略の半数致死量は，2000 mg/kg以上，Globally Harmonized Classification System（GHS）はCategory 5（>2000-5000 mg/kg b.w.）に分類された．

6. 緒言

クロロシクロヘキサンはシクロヘキサンの水素1個がクロールに置換された構造を有し脂環式炭化水素に属する化学物質で，農薬原料，ゴム薬原料等に用いられている[1],[2]．毒性情報としては，ラットLD_{50}値が3 g/kgとの報告がある[3]．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

クロロシクロヘキサン（略称；CCH）
（英名；Chlorocyclohexane）

7.1.2 CAS 番号

542-18-7

7.1.3 物理化学的性状

蒸気密度4.12(空気=1), 沸点142℃, 融点－44℃, 引火点29℃, 比重1.004(20/4℃), 溶解度は水に不溶, アルコール, エーテル等各種有機溶媒と混和. 特異臭を有し, 無色～わずかにうすい黄色の液体である.

7.1.4 入手先（製造元）

7.1.5 入手日

2005 年 3 月 16 日

7.1.6 ロット番号

7.1.7 純度

99.7%

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，密閉

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.
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試験（反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験，試験番号：B041794）で使用（移管）した.

7.2 媒体
オリブ油（日本薬局方，オリエンタル薬品工業株式会社，ロット番号 50209）

7.2.1 使用方法
そのまま用いた.

7.2.2 保管条件
室温（許容範囲：10～30℃，投与液の初回調製から最終調製までの温度実測値：18.8～25.7℃）

7.3 試験動物
7.3.1 動物種
ラット

7.3.2 系統
Crl: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および4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±20%以内，第2回以降の平均体重は第1回投与時に対して±20%以内であることを確認した．
第1回～4回までの動物の体重範囲：178～201 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．

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

49.9～66.2%（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 回および第 4 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浄剤（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，当研究所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： 050201, 050401）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に実施し，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ポーザ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.

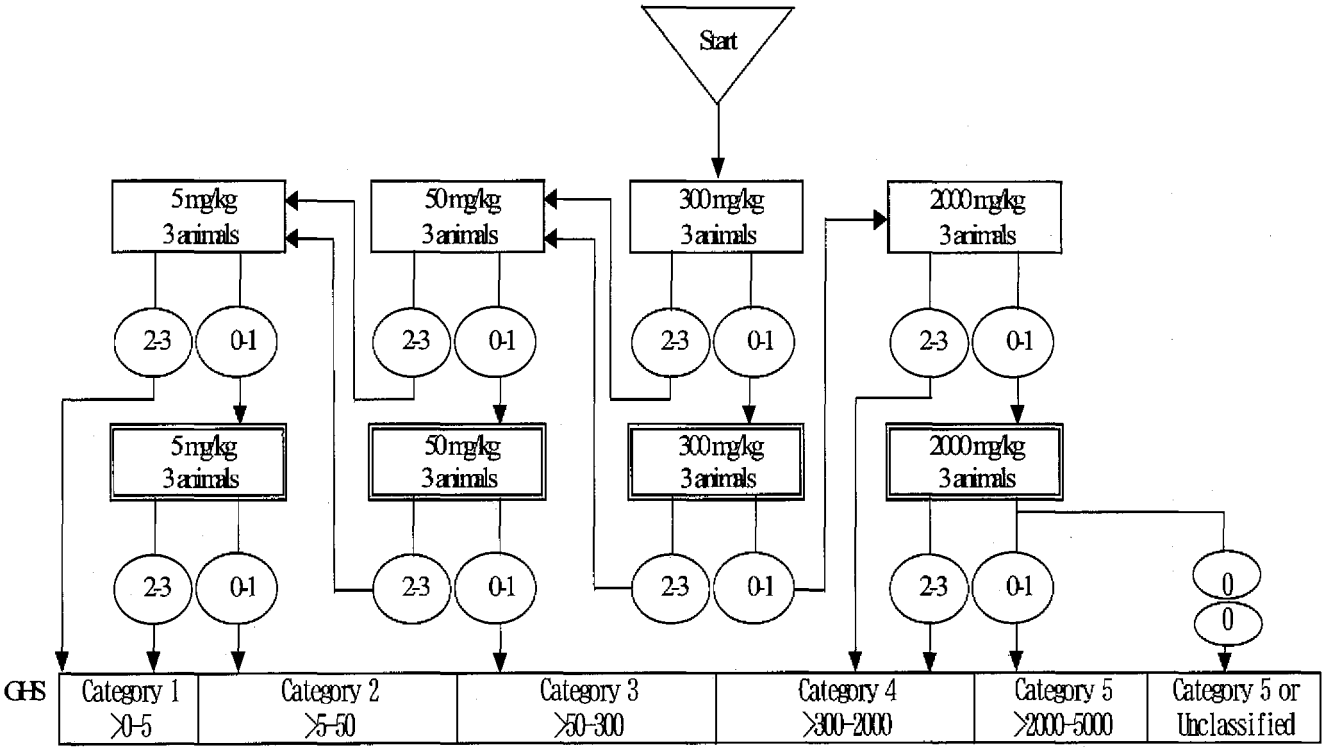
7.5.3 投与液量

5 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．被験物質の毒性に関する情報が乏しいことから，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，2000 mg/kg の第 3 回および 4 回投与動物とも死亡は認められなかった．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（オリブ油）を加え溶解し，60 および 400 mg/mL の濃度を調製した．各濃度とも初回の投与前日にまとめて調製した．投与に供するまで室温（許容範囲：10～30℃，温度実測値：17.2～24.4℃）・暗所で保存し，調製後 5 日以内に使用した．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：B050605）で，室温・暗所保存条件下で 5 日間の安定性が，2 および 400 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 60 mg/mL が 98.2%，400 mg/mL が 101.5%であった（添付資料 11.3）．

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：B050278，表題：Validation of the Analytical Method for CCH 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 50°C
カラムオーブン：	50°C (6 min) → 30°C/min → 320°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-20, ST-40 および ST-80）を調製した.

溶液略号	調製方法			濃度 (μg/mL)
SS	CCH，約 50 mg	→	50 mL/ アセトン	1000
ST-20	SS，1 mL	→	50 mL/ アセトン	20
ST-40	SS，2 mL	→	50 mL/ アセトン	40
ST-80	SS，4 mL	→	50 mL/ アセトン	80

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 (μg/mL)
60	①	投与液 1 mL	→	50 mL/ アセトン	1200
	②	①，1 mL	→	25 mL/ アセトン	48
400	①，	投与液 1 mL	→	100 mL/ アセトン	4000
	②，	①，1 mL	→	100 mL/ アセトン	40

7.8.4 GC 測定

標準溶液（ST-20, ST-40 および ST-80）および試料溶液を条件設定した GC に注入して，クロマトグラム上の CCH 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 CCH の濃度を求め，試料溶液の希釈倍率から投与液中の CCH 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 4 回投与群 2000 mg/kg	雌 3	80101-80103

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. 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, 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.

7.11 コンピュータシステムの使用

一般状態および体重データの収集, 群分けおよび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B041793(_は空白),

その後の投与段階には第 2 回投与を B041793A，第 3 回投与を B041793B，第 4 回投与を B041793C とした.

8. 結果および結論

8.1 一般状態（Table 1, Appendix 1）

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg とも死亡はなく，一般状態にも変化は認められなかった.

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.
第 3 回および 4 回投与群の 2000 mg/kg では，投与第 4 日に体重増加の抑制あるいは減少が認められたが，第 8 日には回復し，第 15 日には 300 mg/kg と同等となった.

8.3 剖検（Table 4, Appendix 4）

第 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg とも異常は認められなかった.

8.4 結論

クロロシクロヘキサンを 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 1 回～4 回投与群の 300 および 2000 mg/kg の用量いずれにも，死亡例はなく，一般状態および剖検に異常は認められなかった. 2000 mg/kg では体重増加の抑制や減少がみられたが投与第 8 日には回復した.

本試験条件下におけるクロロシクロヘキサンの概略の半数致死量は，2000 mg/kg 以上，GHS は Category 5（>2000-5000 mg/kg b.w.）に分類された.

9. 参考文献

[1] 有機化合物辞典，株式会社講談社，東京，1985, p 285.

[2] 化学物質毒性ハンドブック第Ⅱ巻，丸善株式会社，東京，1999, p 140-153.

[3] 製品安全データシート，クロロシクロヘキサン，純正株式会社，2005.

Table 1 Clinical Sign - Summary Female

Test Substance Dose	Findings	Day Time	1 10	20	30	40	50	60	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
CCH 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
CCH 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
CCH 2000 mg/kg (Third)	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
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	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

+ , 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

Unit : g

Test Substance Dose	Day	1	4	8	15
CCH 300 mg/kg (First)	Mean	188.0	212.3	221.0	248.0
	S.D.	5.6	8.4	7.8	17.4
	n	3	3	3	3
CCH 300 mg/kg (Second)	Mean	194.0	220.7	229.0	241.3
	S.D.	5.3	3.5	1.7	7.6
	n	3	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Third)	Mean	182.7	182.7	211.0	235.0
	S.D.	4.5	4.2	6.0	10.5
	n	3	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	Mean	196.0	184.7	221.3	255.0
	S.D.	4.4	5.7	12.3	19.1
	n	3	3	3	3

Table 3 Body Weight Gain - Summary Female

Unit : g

Test Substance Dose	Day	1-4	4-8	8-15
CCH 300 mg/kg (First)	Mean	24.3	8.7	27.0
	S.D.	4.0	1.2	9.6
	n	3	3	3
CCH 300 mg/kg (Second)	Mean	26.7	8.3	12.3
	S.D.	2.1	2.1	6.7
	n	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Third)	Mean	0.0	28.3	24.0
	S.D.	1.0	9.5	8.7
	n	3	3	3
CCH 2000 mg/kg (Fourth)	Mean	-11.3	36.7	33.7
	S.D.	2.3	8.1	12.6
	n	3	3	3

Table 4 Necropsy Findings - Summary Scheduled Sacrifice (Day 15)

	Sex :	Female			
	Test Substance :	CCH (First)	CCH (Second)	CCH (Third)	CCH (Fourth)
Organ	Dose (mg/kg) :	300	300	2000	2000
Findings	Number of Animals :	3	3	3	3
	Number of Animals Examined :	<3>	<3>	<3>	<3>
	No abnormality	3	3	3	3