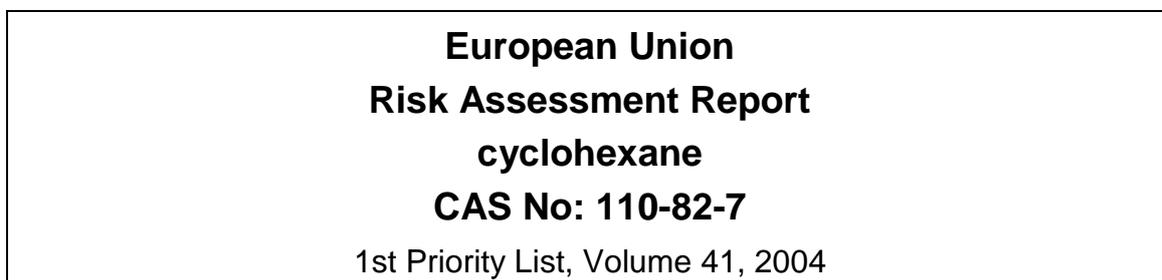
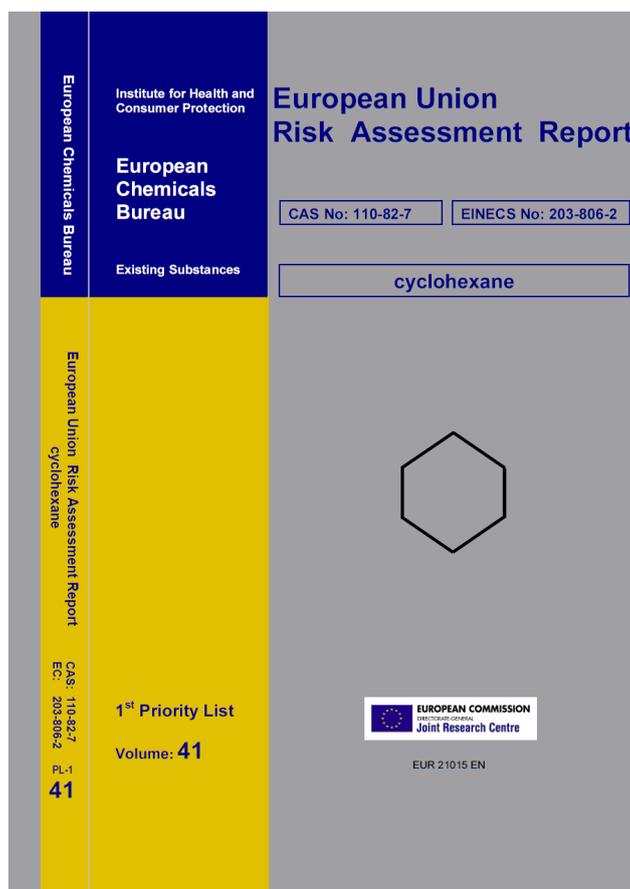


部分翻訳



欧州連合
リスク評価書 (Volume 41, 2004)
シクロヘキサン



国立医薬品食品衛生研究所 安全情報部
2012年3月

本部分訳文書は、cyclohexane に関する EU Risk Assessment Report の第 4 章「ヒト健康」のうち、第 4.1.2 項「影響評価：有害性の特定および用量反応関係」を翻訳したものである。原文（評価書全文）は、
http://esis.jrc.ec.europa.eu/doc/existing-chemicals/risk_assessment/REPORT/cyclohexanereport03_1.pdf
を参照のこと。

4.1.2 影響評価：有害性の特定および用量反応関係

すべての試験について、試験実施適正基準（GLP）に関する陳述書を確認した。可能な場合はその情報を提示し、その他の場合にはコメントしていない。

4.1.2.1 トキシコキネティクス、代謝、および分布

4.1.2.1.1 経口投与

シクロヘキサンのトキシコキネティクスについてはラットとウサギを用いて検討されている。

シクロヘキサンの吸収、分布、代謝、および排泄は、 $[^{14}\text{C}]$ 標識シクロヘキサンを用いて Fisher 344 ラットで検討されている（Research Triangle Institute, 1984）。静脈内投与の場合は投与したシクロヘキサンの 54% が 24 時間以内に呼気から排出された。72 時間後には 83% が呼気から排出され、14% が尿中に排泄された。経口投与（100～2,000 mg/kg）でも同様の排泄パターンであった。この場合、シクロヘキサンの用量が高いほど肺からの排出の量が多かった（63～78%）。それ以外の主要な排泄経路は尿中であり（12～29%）、糞中排泄はほとんど認められなかった。このことは、シクロヘキサンを経口投与した場合は消化管からの吸収が速やかであることを示している。

この試験では、排出された標識物質は、呼気中では大部分（93～99%）が、尿中では 0.1% 未満がシクロヘキサンであった。少量はシクロヘキサノンおよびヘキサノールとして呼気または尿中に排出された。その他の代謝物については明確にはされていないものの、HPLC では抱合物の領域に溶出されることが確認されている。

$[^{14}\text{C}]$ で標識したシクロヘキサンを経口投与した場合、投与後 6、24 および 72 時間後でも、血中の 16 倍もの量の放射活性が脂肪組織で検出された。その結果、放射活性の血中および組

織（脂肪組織も含む）中半減期はおおよそ10～15時間であった。少量のシクロヘキサンおよびシクロヘキサノールがすべての組織中で認められた。

ウサギに100～390 mg/kgの ^{14}C 標識シクロヘキサンを経口投与し、投与後2日間呼気を、2～6日間尿および糞を検査した（Elliot et al., 1959）。この場合、呼気中および尿中排泄の比率は同等であり（それぞれ35～47%および46～55%）、少量の放射活性が糞中に検出された（0～0.2%）。また、少量の放射活性が2～6日後に組織中で検出された。シクロヘキサノールおよびシクロヘキサノンのグルクロン酸抱合体が尿中の主要代謝物として認められ、シクロヘキサン-1,2-ジオールのグルクロン酸抱合体も検出された。しかし、著者はシクロヘキサンの抱合体は分析上のアーチファクトであろうと述べている。

ラットの場合のように、呼気中に排出された放射活性はほとんどが未変化のシクロヘキサンであり（投与量の25～38%）、一部が ^{14}C O_2 であった。

低用量（0.3 mg/kg）の投与では、4日間の主要排泄経路は尿中（87%）であり、5.5%が ^{14}C O_2 として呼気から排出された。シクロヘキサンの未変化体は検出されなかった。

4.1.2.1.2 経皮投与

RTI（1996）はシクロヘキサンの経皮吸収について検討するために、Fischer F344ラットを用いて2つの試験を3セット実施した。各セットにおける第1試験では、 ^{14}C 標識シクロヘキサンの排泄経路と排泄率並びに代謝物について検討し、試験終了時には総放射活性の体内残存量を測定した。各セットの第2試験では、シクロヘキサンと代謝物（総放射活性）の血中濃度を経時的に測定した。最初のセットでは、ラット（雌雄各6匹/群）を ^{14}C 標識シクロヘキサンに1 mg/cm²（皮膚面積）の用量（主に気体状態のシクロヘキサン）で6時間経皮曝露（閉塞）させた。2番目のセットではラット（雌雄各6匹/群）を100 mg/cm²の用量（主に液体状態のシクロヘキサン）で同条件で曝露させた。3番目セットはベースラインの情報が得られるようにデザインしたものであり、10 mg/kgのシクロヘキサンを1群5匹のラットに静脈内投与した（この用量では1 mg/cm²を経皮投与したときと同じ血中放射活性が得られることが期待された）。

1 mg/cm²のシクロヘキサンの経皮投与では、平均吸収速度は雄および雌でそれぞれ0.06および0.1 mg/cm²/hであった。この場合、塗布した量のおおよそ40～60%が吸収されたことになる。この用量では、主に気体状態のシクロヘキサンへの曝露であった。100 mg/cm²の用量では、雌雄間に明らかな違いはみられなかった。平均吸収速度は0.65 mg/cm²/hであり、吸収量は総投与量のおおよそ4%であった。この用量では、主に液体状態のシクロヘキサンへの曝露であった。代謝物については検討されなかった。経皮および静脈内投与されたシクロヘキサン

の排泄は速やかであった。72時間後では体内蓄積はほとんどなく、100 mg/cm²での曝露の場合のカーカス中残存量は0.1%以下、1 mg/cm²での曝露の場合は0.4%以下であった。経皮および静脈内投与後のシクロヘキサンの主な排泄経路は、肺を経由するものであった。静脈内投与の場合は呼気中におよそ70%の放射活性が排出され、1および100 mg/cm²の経皮投与の場合はそれぞれおよそ78% および57%が排出された。放射活性の尿中排泄は静脈内投与の場合はおよそ29%、1および100 mg/cm²の経皮投与の場合はそれぞれおよそ20% および40%であった。

測定値からは、シクロヘキサンの用量が小さい場合は、吸収に性差があるように思われたが、個別データの解析では、雌雄各1匹に異常な吸収値がみられた。気体状態の有機化合物の経皮吸収に関する研究 (Mc Dougal et al., 1990) ではラットの個体間で大きな差があることが示唆されている。上記の試験では1群の動物数が少ないためにそのデータを考慮すべきか否かを判定することはできず、そのためにリスクアセスメントという目的から最も慎重を期した値を選択することにした。

Iyadomi et al. (1998) は、シクロヘキサンを含む4種類の溶剤について、炎症誘発能の比較を行った。ヘアレスラットの腹部皮膚 (曝露皮膚の表面積は3.14 cm²) にチャンバーを接着し、その中に1 mLの純粋な溶剤を注入した。ヘアレスラットを使用した理由は、剃毛の必要がなく、皮膚バリアーにとって最も重要な角質層に傷をつけることがないためである。溶剤の血中濃度を、4時点 (10、30、60および240分、各時点につき2匹) で測定した。シクロヘキサンの場合、血中濃度は1時間は増加して行き (最大値はおよそ0.24 mmol/L)、その後は曝露終了まで減少した。トルエンとシクロヘキサンの処置では、核周囲浮腫、核濃縮、海綿状態、表皮内小胞および顕著な表皮-真皮剥離などの組織学的変化が認められた。液体シクロヘキサン処置による皮膚の変化については、知られるようになって数十年が経過している (Brown and Box, 1971)。この報告書から、シクロヘキサンがラットの皮膚から速やかに吸収されること、および著しい皮膚炎症性を有することが確認できる。このデータは皮膚透過速度を推算するには不十分である。またこのデータは、RTI (1996) の試験結果とは質的に異なっている。それは漏れや蒸発によってシクロヘキサンの失われたことによるのかもしれないし、または代謝物も含められる総放射活性ではなく、シクロヘキサンのみが、ガスクロマトグラフィーで測定されていたのではないかと考えられる。

4.1.2.1.3 吸入曝露

動物における試験

オランダ応用科学研究機構 (TNO) (1998a) が行った試験では、ラットにおけるシクロヘ

キサンの代謝速度定数、 V_{max} および K_m を算出した。その後、それらの数値は、異種間外挿のための生理学的薬物動力学 (PbPk) シミュレーションモデルで比較された。本試験の結果はリスク特性化には使用されていないが、その情報をAnnex 1に掲載した。

ヒトにおける試験

シクロヘキサンの吸収、代謝、および排泄に関して多くの報告書が公表されており、その多くは、1970年代後半のイタリアの靴工場における、溶剤として使用されたシクロヘキサンへの曝露を話題の中心にしている。

Mutti et al. (1981) が行った試験では、5人の労働者および3人のボランティアにシクロヘキサンを肺吸入させ、吸入されたシクロヘキサンのおよそ23%が肺から取り込まれることを認めた。大量の場合は40%が呼気中に未変化体のまま排出され、10%が二酸化炭素として排出された。用量が極めて少量の場合は、吸収されたシクロヘキサンのわずか10%が未変化体で排出され、5%が代謝された二酸化炭素であった。代謝物 (主にシクロヘキサノール) の尿排泄は吸収量の1%にすぎなかった。

Perbellini and Brugnone (1980) が実施した同様の試験では、靴工場の労働者について、労働環境空気中、肺胞の空気中、血中および尿中のシクロヘキサンを測定した。労働環境空気中の濃度は $17\sim 2,484\text{ mg/m}^3$ であった。労働者22人から採取した59検体の肺胞中のシクロヘキサン濃度は $16\sim 1,929\text{ mg/m}^3$ あり、労働環境空気中の濃度を明確に反映するものであった。平均肺胞中シクロヘキサン濃度は労働環境空気中濃度の78%に相当した。曝露後4時間の血中シクロヘキサン濃度は $29\sim 367\text{ }\mu\text{g/L}$ であり、これは肺胞中濃度の53~78%に相当する。この試験では、吸収されたシクロヘキサンの0.1~0.2%に相当するシクロヘキサノールが尿中に検出された。シクロヘキサンの代謝物の排泄は、わずかではあったがシクロヘキサンの血中濃度に相関するものであった。

同じ著者がシクロヘキサンの尿中代謝物を測定し、同定している。主要代謝物はシクロヘキサノールであった。このことからシクロヘキサンはヒトでは主に水酸化によって代謝されること、また、シクロヘキサノールがシクロヘキサン曝露のマーカーとして使用され得ることが示唆された (Perbellini et al., 1980; 1981)。

Ghittoni et al. (1987) は、プラスチックボート、化学物質、プラスチックボタン、塗料、および靴の工場で働く659人の男性労働者の9種類の溶剤への曝露について調査した。43人の労働者のグループについてはシクロヘキサンに特化してモニターしている。作業開始から4時間の曝露期間後に尿を採取し、尿中溶剤濃度 (Cu) をガスクロマトマトグラフィーで測定した。その4時間の曝露が行われた作業区域の空気中加重濃度 (Ci) を携帯型受動型曝

露量計（personal passive dosimeter）で測定した。

全体としてCu値はCi値と直線関係を示した。回帰方程式、相関係数、時間荷重平均曝露限界値（TLV-TWA）に対応する4時間曝露Cu値（平均）、およびシクロヘキサンの濃度（ $\mu\text{g/L}$ ）としてのBEEL（Biological Equivalent Exposure Limits、生物学的等価曝露限界）提唱値をTable 4.9に示した。

Table 4.9 Relationship between urinary solvent concentration and solvent exposure

Regression equation between urinary solvent concentration and solvent exposure	Correlation coefficient	Urinary solvent concentration (corresponding to TVL-TWA)	Proposed BEEL
$Y=0.05X + 8.26$	0.89	65 $\mu\text{g/L}$	57 $\mu\text{g/L}$

Yasugi et al. (1994) は、接着剤（“ほとんど唯一の溶剤成分”としてシクロヘキサンを含む）の塗布作業をしていたかまたはその塗布作業の近くで働いていた33人の女性に関して調査した。空気中のシクロヘキサンの幾何平均濃度および最高濃度はそれぞれ27および274 ppm（93および943 mg/m^3 ）であった。勤務時間の終わりの時点で行った定量的な推算では、ほんの一部のシクロヘキサン（<1%）がシクロヘキサノール（ほとんどがグルクロン酸抱合体）として尿中に排泄されることが示された。この調査では、生物学的半減期は5時間と推定されている。

Mraz et al. (1998) は、ヒトにおいて、OEL（Occupational Exposure Limit、職業曝露限度）付近の用量のシクロヘキサン、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサノン吸入した場合の代謝経路を比較するために、一連の調査を行った。生物学的マーカー（シクロヘキサノール、1,2-シクロヘキサンジオールおよび1,4-シクロヘキサンジオール）の排泄機構についても、血中たんぱくとの結合を見るテストおよび男性で検出された2種類の主要代謝物（1,2-および1,4-シクロヘキサンジオール）の経口投与で検討した。

男性および女性各4人の被験者（31-55歳）を、それぞれ294 \pm 10 ppm（1,010 \pm 35 mg/m^3 ）および69 \pm 0.6 ppm（236 \pm 2 mg/m^3 ）のシクロヘキサンおよびシクロヘキサノールに、閉鎖した曝露チャンバー内で8時間曝露した。シクロヘキサノンを用いた別の試験（Mraz et al., 1994a）のデータを取り入れて、上記3種類の化合物の比較を行っている。毎分呼吸量および気道における平均滞留時間（mean retention）を算出した。232.2 mgに相当する2 mmolのシクロヘキサンジオール（1,2-および1,4-シクロヘキサンジオール）を水に溶解・混合してボランティアに経口投与した。尿を72時間採取し、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサンジオール濃度をガスクロマトマトグラフィーで測定した。代謝物の抱合型／非抱合型の比率を求めるために酸加水分解も行った。シクロヘキサンジオールのシス型およびトランス型異性体の分離は行わなかったが、トランス型異性体が優位であることが知られている（Flek,

1989; Mills, 1990)。結合試験では、シクロヘキサンジオール（それぞれのアイソマー2または10 μmol ）を含む0.15 Mリン酸緩衝液（30 mL）に浸した透析ケーシングにヒト血漿（20 mL）を入れた。1つの系にはシクロヘキサノールを入れず、陰性対象とした。透析系を37°Cで18時間放置し、外側の緩衝液中のシクロヘキサンジオールを分析した。

以前の試験（Mraz et al., 1994b）で示されているが、シクロヘキサンは、シクロヘキサノール、1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールに代謝された（ほとんどが後二者であり、吸収されたシクロヘキサンのわずか1%がシクロヘキサノールとして排泄）。シクロヘキサノールのピークは曝露直後にみられ、排泄半減期は1.5時間と算出された。シクロヘキサンジオールの排泄は曝露後数時間で最大となり、排泄半減期は1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールでそれぞれ 17 ± 5.2 および 16.1 ± 3.9 時間であった。代謝物の排泄曲線は、被験者がCH（シクロヘキサン）、CH-ol（シクロヘキサノール）またはCH-one（シクロヘキサノン）のいずれに曝露されても、類似のものが得られた。曝露化合物の違いは、1,4-および1,2-シクロヘキサンジオールの代謝物の産生比率に影響しなかった。代謝物量および代謝物の排泄半減期に性差は認められなかった。CH-ol、CHおよびCH-oneの曝露では、尿中にCH-oneは認められなかった。しかし、Yasugi et al.（1994）はもっと高感度の方法を用いて、職業的なシクロヘキサン曝露によって生じた極めて低濃度のCH-oneを検出している。

代謝物の半減期から、代謝物の排泄が極めて遅いこと、そしてそれがその3種類の代謝物の全体的な排泄における共通の律速段階であることが示唆された。その遅い排泄速度は、その代謝物の血中たんぱくとの特異的な非共有結合によるものと考えられ、この仮説を証明するために結合テストが行われた。その結果、シクロヘキサンジオールと血漿の結合はほんのわずかであることが示された。グルクロン酸抱合体（1,2-diol）のような極性の抱合体の排泄は非抱合化合物（1,4-diol）よりも明らかに早いことが予想されるために、著者はこのことは非常に驚くべきことであると述べている。

経口投与の場合は4時間以内に排泄のピークに達した。排泄半減期は他の試験で記載されているものと同様であった（シクロヘキサン、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサノンの代謝産物）。1,2-diolおよび1,4-diolの投与で投与量のそれぞれ57%および76%が72時間で排泄された。これらの化合物の半減期を考慮すると、総回収量がそれぞれ60%および80%を超えることは期待できず、この結果に対して著者はシクロヘキサンジオールがさらに代謝されると結論している。1,2-diolは尿中でグルクロン酸抱合体（> 95%）として検出されたが、1,4-diolは抱合されずに排泄された。CH-olの酸化速度の比はヒトと動物は明らかに異なると考えられている（Mraz, 1994）。

Perico et al.（1999）は、労働者で得られた結果を用いて、PBPKモデルから推定される尿中1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールの動態プロフィールを比較した。156人の労働者（19

の靴および皮革工場)の個別の曝露状態を知るために、尿中の1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールを測定した。異なる労働日に試料を採取した。すなわち、29人の労働者からの尿試料は月曜日の作業開始前に、47人の労働者からの尿試料は木曜日の作業終了時および金曜日の朝に、86人の労働者からは月曜日または木曜日の作業終了時のみに採取した。PBPKモデルはPerbellini et al. (1988-1990)が述べているモデルに基づいた。1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールの K_m 、 V_m および半減期は先の代謝試験で得られた値を使用した。

それぞれの労働者の曝露は2~179 ppm [7~617 mg/m³ (平均は60 mg/m³)]であった。尿中1,2-シクロヘキサンジオール濃度は月曜日(作業前および作業後)、木曜日(作業後)および金曜日(作業前)でそれぞれ3.1、7.6、13.2および6.3 mg/gクレアチンであった。1,4-シクロヘキサンジオールについては同様に2.8、5.1、7.8および3.7 mg/gクレアチンであった。環境におけるシクロヘキサン曝露と月曜日の作業後の尿中1,2-シクロヘキサンジオール濃度に密接な相関性が認められた。木曜日および金曜日に得られたデータでは、曝露との相関性は乏しかった。1,4-シクロヘキサンジオールについては、月曜日および金曜日の朝に採取した試料中の濃度は、曝露されていないヒトと統計学的な差はなかった。月曜日および木曜日の作業終了時に採取した試料のデータのみが、その他の試料よりも統計学的に高かった。1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールの両代謝物の尿中排泄半減期はそれぞれ16および18時間であり(Mraz et al., 1994も測定している)、労働によって週末に向かって蓄積していくことになる。同様の結果がPBPKモデルによる比較で得られた。

Mraz et al. (1999)は別の試験で、シクロヘキサン、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサノンに曝露した時の、シクロヘキサノールおよびシクロヘキサンジオールの排泄に及ぼすエタノールの同時処置の影響を検討している。5人のボランティアを300 ppm (1,032 mg/m³)のシクロヘキサンに8時間曝露し、4.14gのエタノールを所定の時間に与えた。尿を72時間採取した(1ボランティアあたり18試料)。シクロヘキサノールおよびシクロヘキサンジオール濃度をガスクロマトマトグラフィーで測定した。先の試験の8人のボランティアを陰性対照とした(Mraz, 1998)。エタノール処置被験者と対照群との違いは、尿中シクロヘキサノール濃度が増加したこと(シクロヘキサンおよびシクロヘキサノールの場合6倍、シクロヘキサノンの場合11倍)のみであった。エタノール処置被験者と対照群の尿中1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールの濃度には差は認められなかった。シクロヘキサン、シクロヘキサノンおよびシクロヘキサノール曝露のモニターでは、シクロヘキサンジオールがシクロヘキサノールよりも適切な指標であると著者は結論している。

Research Triangle Instituteの試験(1980)では、アメリカ合衆国の様々な州の様々な都市で母親から母乳試料を採取し、揮発性(除去可能な)および半揮発性(抽出可能な)有機物(シクロヘキサンを含む)を、ガラス毛細管ガスクロマトマトグラフィー/質量分析/コンピュータを用いて解析した。検出限界はおおよそ20-100 ng/mL母乳であった。測定した8試料中6試料

でシクロヘキサンが検出され、シクロヘキサンが母乳中に排泄されることが確認された。

4.1.2.1.4 追加データ：酵素誘導

Espinosa-Aguirre et al. (1996; 1997) は、ラットを用いて一連の試験を行い、シクロヘキサノール処置によりチトクロームP450 (CYP450) 酵素誘導が生じること、ならびにどのアイソザイムが関与しているかを解明した。シクロヘキサノールについては、*in vivo*および*in vitro*におけるN-ニトロソジメチルアミン (NDMA) およびN-ニトロソジエチルアミン (NDEA) 処置に対して抗変異原性作用を持っていることがすでに知られている (Espinosa-Aguirre et al., 1993)。この作用はシクロヘキサノールの競合的なニトロソアミン代謝阻害によるものであると考えられている。この機構と同時に、シクロヘキサノールは、CYP450を誘導すると考えられていた。これらの知見を確認する試験手順は、シクロヘキサノール前処理もしくは無処置代謝活性化系 (S9) を用いた*Salmonella typhimurium* TA100株でのプレインキュベーション変異原性試験に基づくものであった。S9画分はシクロヘキサノール処置雄Wisterラット (2.5%含有飲料水の5日間自由摂取) から調製した。どの種のアイソザイムが関与しているかを検討するために、モノクロナール抗体を用いたイムノブロット解析を行った。アイソザイムとしてCYP1A1/A2 - CYP2B1/2B2およびCYP2E1について検討した。

その結果、CYP2E1およびCYP2B1/B2の誘導が認められたが、CYP1A1/A2の誘導は認められなかった。

4.1.2.1.5 トキシコキネティクス、代謝および分布のまとめ

実験動物において、シクロヘキサンは経口投与および吸入曝露でほとんど完全に吸収された。経皮においては、低濃度の投与 (蒸気) の場合は50%が吸収されると考えられたが、液体で直接接触投与する場合は、わずか5%であると考えられた。

シクロヘキサンはすべての組織に、とくに脂肪組織に多く分布した (脂肪組織中のシクロヘキサンの濃度は血中濃度の16倍) が、蓄積する傾向は認められなかった。特別な試験を行ったわけではないが、シクロヘキサンは低分子であり、脂溶性であり、すべての試験で神経症状が認められているために、シクロヘキサンが血液-脳関門を透過する可能性が考えられる。また、低分子であり、その他の化合物とのSAR (構造活性相関) から、シクロヘキサンが胎盤関門を透過する可能性も考えられる。

シクロヘキサンは肝臓で速やかに代謝される。用量および動物種によって異なるが、一連の水酸化と酸化によって様々な量のシクロヘキサノール、シクロヘキサノン、1,2-シクロヘ

キサンジオールおよび1,4-シクロヘキサンジオールが産生される。代謝物がグルクロン酸抱合体として排泄されることもあり、その程度は動物種による。

ヒトでは主要な代謝経路により、1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールが生成され、1,4-シクロヘキサンジオールはそのまま、1,2-シクロヘキサンジオールはグルクロン酸抱合体として排泄される。1,2-シクロヘキサンジオール対1,4-シクロヘキサンジオールの比率は用量にも性にも依存しない。ヒトと動物の主な違いは代謝物がシクロヘキサノール（動物で主要）かシクロヘキサンジオール（ヒトで主要）かである。シクロヘキサノンへの代謝はすべての種でわずかであった。

ラットではCYP 2E1およびCYP 2B1/B2の誘導が認められたが、CYP 1A1/A2の誘導は認められなかった。

肺からの排出が主要な排泄経路であり（シクロヘキサンの用量が高いほど）、未変化体のシクロヘキサンまたはCO₂として排出される。

代謝物の尿排泄は非常に遅く（ヒトにおける1,2-および1,4-シクロヘキサンジオールの排泄半減期はそれぞれ16および18時間）、職業的には週の経過に伴って蓄積されていく。ヒトではこの段階がシクロヘキサンの全体の排泄の律速段階である。生物学的半減期はラットの経口投与では10～15時間、ヒトの吸入では5時間と推定された。

母乳を介した排泄の可能性も示された。

4.1.2.2 急性毒性

4.1.2.2.1 経口投与

ラットにおけるシクロヘキサンの経口投与によるLD₅₀として、> 5,000 mg/kg、29,800 mg/kg および8,000～39,000 mg/kgという値が報告されている（それぞれPhillips Petroleum Company, 1982a; Deichmann and Le Blanc, 1943; Kimura et al., 1971.）。

Kimura et al.は、経口投与によるLD₅₀は、動物の年齢に依存すると報告している。14日齢のラット、若年成熟ラットおよび老齢ラットでのLD₅₀は、それぞれ8.0、39.0および16.5 mL/kg（6,240、30,420 および12,870 mg/kg）であった。中枢神経系の抑制、流涎および軟便が認められた。

別の試験では、ウサギへの経口投与による最低致死量は6 g/kgと報告されている。症状とし

て、重篤な下痢、体重の大幅な減少および呼吸数の増加が認められたが、著者は中枢神経系の急性所見（昏睡や痙攣）はないと報告している（Treon et al., 1943a）。

4.1.2.2.2 経皮曝露

ウサギを用いたシクロヘキサンの経皮曝露による急性毒性が報告されており（Phillips Petroleum Company, 1982c）、LD₅₀は2,000 mg/kg以上とされている。全身症状も死亡も認められず、軽度な紅斑および浮腫が数例に認められている。

4.1.2.2.3 吸入曝露

ウサギを気体のシクロヘキサンに1時間吸入曝露した場合、痙攣、振戦、活動亢進、多呼吸、チアノーゼおよび下痢を含む中枢神経に及ぼす影響が曝露量に依存して認められ、26,000 ppm（89.6 mg/L）に曝露された動物すべてが死亡した（Treon et al., 1943b）。ラットにおける4時間曝露のLC₅₀は> 9,500 ppm（32.88 mg/L）であり、この濃度では死亡はなかった。振戦、活動亢進、多呼吸および活動抑制が、曝露量に依存して認められた（Phillips Petroleum Company, 1982b）。

急性神経毒性

動物試験

シクロヘキサンの急性曝露による神経毒性が、スケジュール制御オペラント行動（schedule-controlled operant behaviour, SCOB）で検討されている（Haskell, 1996c）。雄ラット（10匹/群）に制限食を与え、レバー押しで飼料が得られるように訓練した。徐々に多重定率-定間隔（multiple fixed ratio fixed interval, FR20-FI120秒）強化スケジュールにした。ラットの訓練はシクロヘキサンの曝露前に週に5日、5～6週間行った。曝露前のベースラインの反応は安定していた。4群を設け、0、500、2,000および7,000 ppm（0、1,720、6,880 および24,080 mg/m³）のシクロヘキサンに曝露した（曝露チャンバー内での全身曝露）。オペラントテストは6時間曝露後およそ30分に開始した。測定したパラメータは次のものであった。

- ・ 定率スケジュールでの反応率（fixed ratio response rate）
- ・ 定率スケジュールでの休止時間（fixed ratio pause duration）
- ・ 定間隔スケジュールでの反応率（fixed interval response rate）
- ・ 定間隔スケジュールでの曲率指数（fixed interval index of curvature）

この試験は同じ手順で行った二つの陽性対照試験と組み合わせており、その一方にはクロルプロマジン、他方にはアンフェタミンを用いて処置した。これらの試験はEPAおよびOECD GLPに従って実施した。

観察された変化は、7,000 ppm曝露群にみられた曝露後30分における定率スケジュールでの反応率のわずかな減少（11%）のみであった（この変化は軽度な鎮静作用によるものと思われた）。曝露後2週間まで観察したが、それ以上の変化は認められなかった。この試験では、シクロヘキサンへの急性曝露後のSCOBの変化から、NOAELは2,000 ppm (6,880 mg/m³)と推定された。

1998年に行われたTNOの試験（TNO, 1998b）では、シクロヘキサンに曝露したときの動物の行動に及ぼす効果を検討し、作用が認められた曝露下での体内濃度を測定した。この試験は吸入性溶剤に関するTNOの広範囲なプログラムの一部であり、動物で得られた神経毒性データに基づいてヒトにおける神経行動学的作用を予測するために、ラットおよびヒトにおける生理学的薬物動力学（PBPK）モデルの有効性を確立することを目的とした試験であった。

この試験は3種の実験から構成されている。

- ・ 実験I：ラットをシクロヘキサンに吸入曝露し、標準化された観察測定項目と自発運動に基づいて、その作用を評価するもの
- ・ 実験II：分離試行視覚弁別課題において、スピードと精度を評価するもの
- ・ 実験III：シクロヘキサン処置したラットの血液中および脳中濃度を、群毎に測定するもの

WAG/Rij Crl BR雄ラット（実験Iで32匹、実験IIで36匹、実験IIIで95匹）に対し、シクロヘキサン（純度> 99%）の8時間曝露を、様々な濃度で1または3回行った。曝露濃度は、400 ppm (1,400 mg/m³)、2,000 ppm (8,000 mg/m³) および8,000 ppm (28,000 mg/m³) であった。実験III（薬動力学試験）では、2時間曝露後、4時間曝露後、および8時間曝露（1回または3回）直後、並びに8時間曝露を終えてから0.5、1、2、4および8時間後にと殺した。血液および脳の試料をそれぞれの時点で採取した。

実験Iでは次のパラメータを測定した。

- ・ 神経筋：歩行、前・後肢の握力、着地開脚幅
- ・ 知覚：テールピッチ、音、接触に対する反応および視覚的物体の接近に対する反応
- ・ 痙攣：間代性および強直性の反応
- ・ 興奮：覚醒

- ・ 活動：自発運動

試験開始前6日および1回目および3回目の曝露後直ちにFOBを実施した。

実験IIでは、安定したベースライン反応を得るために、飲水制限した動物を分離試行二者択一弁別課題（水による強化）で4週間訓練した。テスト時間は、100試行が為されるまで、または60分間までの、いずれか短い方とした。試行は、左または右の刺激光（S+）の点灯を信号とし、ラットのタスクは、点灯しているライトの下のレバーを押して水の報酬を得るというものであった。ラットが正しいレバーを押したとき（S+反応）刺激光が消え、報酬として水が与えられる（SR+）。試行の最初の反応として正しくないレバーが押された場合（S-反応）でも、刺激光が点灯しているライトの下のレバーを押し直せば良いこととした。正しいレバーを押すまでを1試行とした。試行と試行の間隔（ITI）は10秒とした。ITIの間に反応した場合はITIタイマーをリセットし、次の試行を開始するまで10分間の間隔をおいた。ラットのテストは、曝露時間終了後直ちに行った。

各試行の最初の反応の正誤を、ラットごとに記録した。最初の反応が正しかった場合（S+）は、レバー押しまでの時間（S+反応潜時）も記録した。最初の反応が正しくなかった場合（S-反応）は、正しいレバーが押されるまでの、正しくないレバーを押した回数を記録した。正しいレバー押し反応があった場合に給水器が上がって来るようにした。ラットが報酬である水を得るために給水装置に覆いかぶさったかどうかを装置が計測し、獲得された強化数の尺度とした。さらに、それぞれの試行で強化が得られるまでの時間（SR+潜時）も記録した。ITIの期間中のレバー押し回数を計数し、1回または数回のレバー押しが行われたITI期間の数およびITIレバー押しが繰り返された回数を求めた。

Table 4.10 Summary of dependent variables of the two-choice visual discrimination task

General measures of responding	
Total trials responded to	the total number of trial completed during each session. maximum = 100.
% Reinforcement obtained	the number of reinforcements obtained divided by the number of reinforcement delivered · 100: a measure of motivation.
Measures of stimulus control	
Discrimination ratio	the number of initial correct trial responses divided by the total trial responded to.
% ITI periods responded to	the number of ITI periods in which one or more lever responses was made divided by the total number of ITI periods · 100.
Measures of distribution	
Repetitive errors	the total number of incorrect trial responses which followed an initial incorrect response.
Repetitive ITI responses	the total number of ITI responses which followed an initial ITI response.
Measures of psychomotor speed	
S+ response latency	the latency in ms to make a correct initial trial response. Parameters examined include the overall S+ response latency (mean) for each rat, the variability (S.D.) for each rat, and the distribution of responses at different time intervals, i.e., S+ response occurring > 1s (very short), > 2s (short) and > 6s (pauses) after trial onset.
SR+ response Latency	the mean (\pm S.D.) latency in ms to obtain reinforcement for each rat.

一結果

FOBおよび自発運動については、影響はほとんど認められなかった：

- 8,000 ppm群の8匹中1匹に、最初の8時間曝露の終了時に軽度な運動失調様行動が認められた。この群では1回の8時間曝露後に、8匹中1匹に軽度な振戦も認められている。
- 知覚行動の検査については、8,000 ppm群で最初の8時間曝露後に側腹部へのタッチに対する反応に明らかな影響がみられた（多重比較では有意差なし）。3回目の曝露後には視覚的物体の接近への対応にも明らかな影響がみられた。この反応の多重比較では、この最高濃度曝露群の反応の平均値は対照群よりも有意に高いものであった。
- 8,000 ppm群では体温の低下が認められた（最初の8時間曝露では有意だったが、3回目の曝露後では有意ではなかった）。
- すべての群で自発運動に影響は認められなかった。

実験II:

- 2,000 ppm群でエラー繰り返し数に曝露と時間の明らかな相互作用が認められた（2回目の8時間曝露後のエラー繰り返し数が比較的多かった数匹のデータの影響が大きいため）。
- 精神運動速度の測定において多少の影響が認められた。曝露期間中の短い反応潜時 (<2秒)の平均値が群間で異なった。2,000 ppm群で短いS+反応潜時の平均値が有意に低く、8,000 ppm群でもかろうじて有意に低かった。それらの所見に対して反復ANOVA検定を

行い、予備試験日での観察数の差で表した。それによると、8,000 ppm群においてのみ有意と認められた。8,000 ppmおよび2,000 ppm群で長いS+反応潜時の明らかな増加も認められたが、ANOVAで統計学的に有意だったのは8,000 ppm群のみであった。

実験III：高濃度のシクロヘキサンが、脂溶性の脳分画に認められた。シクロヘキサンが取り込まれている期間の脳中濃度は血中濃度のおよそ10倍であった。本試験で用いた曝露量は、おそらくシクロヘキサン代謝を飽和させる量であったと思われるが、蓄積はなく、排泄は迅速であり、曝露と曝露の間（3回・8時間）に完全排泄されたと結論される。この結果は、その他の薬動学的試験の結果と整合する。シクロヘキサンの血中および脳中濃度のまとめをTable 4.11に示した。

Table 4.11 Blood and brain cyclohexane concentration following inhalation administration of 400–2,000 and 8,000 ppm in rats

Sampling time	Exposure level (ppm)	Cyclohexane concentration in blood (ng/ml)	Cyclohexane concentration in brain (ng/g)
Samples taken immediately after exposure			
2 hr	400	593	7,067
	2,000	3,433	34,000
	8,000	12,533	126,667
4 hr	400	540	6,250
	2,000	3,767	37,333
	8,000	14,333	153,333
1・8 hr	400	462	5,638
	2,000	3,300	36,250
	8,000	13,300	125,000
3・8 hr	400	452	5,600
	2,000	2,550	29,500
	8,000	14,875	143,750
Samples taken at different time points after a single 8-hour exposure			
0.5 hr	400	247	2,217
	2,000	1,550	15,667
	8,000	5,100	39,000
1 hr	400	141	942
	2,000	1,040	8,683
	8,000	4,633	32,333
2 hr	400	74	462
	2,000	537	4,067
	8,000	3,067	22,833
4 hr	400	43	278
	2,000	320	2,050
	8,000	1,630	12,000
8 hr	400	< 30	< 150
	2,000	90	583
	8,000	697	3,933

この実験で得られたシクロヘキサンの血中および脳中濃度を、他の情報とともに、シクロヘキサンのPBPKモデルの開発と検証のために使用する。

本試験（実験IおよびII）をまとめると、NOAELは分離試行二者択一弁別課題でみられた反応潜時の増加に基づき、400 ppmと推定できる。ANOVA解析の結果が8,000 ppm群のみで有意であったことから、これは非常に慎重を期した判断ということになる。しかし、評価した影響は非常に感知しやすいものであり、かつ変動が大きいものであるために、2,000 ppm群で認められた影響は行動毒性の出始めと考えられる。この試験について著者は、「400 ppmまたは2,000 ppmのシクロヘキサン曝露では群としての解析で神経行動学的影響は認められなかった」と結論しているが、2,000 ppm群では統計学的には有意ではないがわずかな反応潜時の変化と個体差がみられている。このために、非常に慎重な判断から400 ppm (1,400 mg/m³) をNOAELとした。

ヒトにおける試験

TNOが1998年に行った試験（TNO, 1998c）では、ヒトに対する神経行動学的影響を検討するために、ボランティアを4時間250 ppm (860 mg/m³) のシクロヘキサンにまたはプラセボ：25 ppm (86 mg/m³) に曝露している。被験者は12人の男性ボランティア（20～39歳）であり、二重盲検・双方向クロスオーバーの条件で曝露を実施した。2回の曝露を7日間の間隔で実施した。曝露前、曝露開始後45および165分、曝露終了後60分に、自動化された神経行動テスト（automated neurobehavioral tests）および問診票を用いて被験者を検査した。

シクロヘキサンの体内濃度測定は、曝露期間の終了10分前に静脈から採血して実施した。

認知機能を、神経行動評価システム（Neurobehavioral Evaluation System）から選択したテストで評価した。それには次のテストが含まれている。

- ・ 注意力：単純反応時間テスト、ストループ・カラーワードテスト（color word vigilance test）、注意切り替えテスト（switching attention test）
- ・ 学習および記憶：数列記銘テスト、空間記銘テスト、パターン記憶テスト、言語記憶テスト
- ・ 精神運動スキル：手-眼協調運動テスト、手指タッピングテスト
- ・ 知覚的符号化：符合-数字対応テスト、パターン比較テスト

さらに、気分や感情の変化を評価するようにデザインされた、コンピュータで提示されるアンケートも含めた。

このテストはECのGCP基準に従って実施した。

一結果

シクロヘキサンの平均血中濃度は、25 ppmの曝露では55 ng/mL、250 ppmの曝露では618 ng/mLであった。

観察された影響は、両曝露条件下で初回テスト日にみられた顕著な成績向上だけで、手一眼協調運動テスト：湾曲図柄の指なぞり状況（sinus condition）、カラーワードテストおよび数列記銘テストにおいて認められた。リスクアセスメントにこれらのパラメータを使用することの妥当性には疑問があり、そのためにこれらの影響はNOAELの推定では考慮しなかった。曝露に関連した所見は、250 ppmのシクロヘキサンの曝露中および曝露後に頻発（プラセボに比較して）した頭痛および眼や喉への刺激を訴えるといった、“主観的な”パラメータのみであった。

この試験では、ヒトに対する神経毒性のNOAELが250 ppm（860 mg/m³）と推定された。この用量で主観的な所見（頭痛および眼および喉への刺激の兆候）が25 ppmよりも頻繁に観察されたことが注目される。

TNOの試験（1998a;b;c）に基づき、Hissink et al.（1999）は、検証されたヒトでのPBPKモデルを用いてヒトに神経行動学的作用を惹起する曝露量の算出が可能であると結論している。その量は3,900 ppmであり、それからNOAELが1,200 ppmと導かれる。これらの値はモデルから求められたものである（実際の試験で得られた値ではない）ために、リスクの特性化で動物実験データの代わりにこれを採用することには難があると思われる。

4.1.2.2.4 その他の情報

67/548/EEC指令のAnnex VIに従えば、シクロヘキサンは、Xn、R65（有害性：飲み込むと肺損傷を引き起こすおそれがある）の分類基準を満たす。シクロヘキサンの動粘性率は $1.259 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2/\text{s}$ であり、表面張力は20°Cで25.3 mN/mである。

4.1.2.2.5 急性毒性のまとめ（急性神経毒性を除く）

ほとんどのLD₅₀試験は古いものであり、GLP資料の確認はとれないが、プロトコールと結果は報告書または論文に正確に記載されているので、信頼できると思われる。それらの報告全てにおいて、シクロヘキサンの経口、吸入または経皮投与による急性毒性は低いことが

示されている。シクロヘキサンの粘度が低いことが、Xn、R65への分類の根拠となっている。

4.1.2.2.6 急性神経毒性のまとめ

ラットを用いて行われた自発運動および行動の評価において、高用量（8,000 ppm）で急性の行動変化が認められたが、2,000 ppmではほとんど認められなかった。TNOの試験によれば、神経毒性に関するNOAELは、400 ppm（1,400 mg/m³）でとすることができる（感知しやすい方法が採られたためかなり慎重な判断）。

吸入による急性神経毒性は、ヒト（ボランティア）で検討されており、最高用量の250 ppmの4時間曝露（860 mg/m³）でも影響は認められなかった。

4.1.2.3 刺激性

4.1.2.3.1 動物における試験

皮膚刺激性

ウサギを用いた皮膚刺激性試験について2件が報告されており（Phillips Petroleum Company, 1982d; Jacobs and Martens, 1987）、両者とも83/467/EEC指令に従って行われている。1件目の試験は、半閉塞包帯下で行われており、一次刺激性のスコアは24および72時間後で0であった。2件目の試験は、同じ半閉塞条件下ではあるがチャンバー内で実施されており、処置後24～72時間にかけての紅斑の平均スコアは、皮膚刺激性有りとされる域値よりも低く算出された（1.93）。しかしながら、本試験の考察では、紅斑性反応は、処置後5日に最大の状態に至ったと述べられている（平均スコア2.56）。その期間、皮膚反応は徐々に強まり、それは、さらなる144時間の観察中も続いた（2.83）。全体としては、刺激反応が重要な所見であり、試験終了時でも消失しなかった。さらに、シクロヘキサンは溶剤であることから、脱脂肪作用も予想される。そのためにXi、R38に分類された。

さらに、ウサギを用いた反復皮膚処置試験が行われている（Treon et al., 1943a）。希釈していないシクロヘキサンの閉塞せずに皮膚を14日間毎日処置した場合、最初には紅斑がみられ、処置を継続することでしだいに皮膚の硬化、亀裂、出血がみられた。この障害は、シクロヘキサン処置の中止後1週間以内に治癒したと報告されている。

眼刺激性

ウサギを用いた眼一次刺激性試験が行われており、処置後に眼を洗浄した場合と洗浄しない場合が検討されている（Phillips Petroleum Company, 1982e; 1982f）。非洗浄の場合、処置後1時間で角膜の25%にまで広がる混濁が1羽のウサギに認められ、別のウサギで虹彩炎が認められた。結膜の充血が5羽のウサギに認められ、1羽には結膜浮腫も認められた。眼のすべての障害は24時間以内に消失し、6羽のウサギのいずれにも結膜からの滲出物は認められなかった。

呼吸器刺激性

マウスに32.88 mg/Lのシクロヘキサン（空气中、予定濃度）を吸入させて急性の変化を検討した試験では、上気道への刺激性は認められなかった（Phillips Petroleum Company, 1982i）。この試験では、1群4匹からなるcd-1雄マウスの2群を、シクロヘキサン（気体）に曝露した。曝露は1分間とし、これを10分の間隔で2回行った。2回の試験で認められた変化は、1匹のマウス（4匹中）の呼吸数のわずかな減少（11.2%および5.8%）のみであった。このマウスには、上気道が刺激を受けたことによると考えられる、軽度な呼吸休止も認められた。ボランティアでの試験（TNO, 1998c）で、250 ppm（860 mg/m³）の曝露で25 ppm（86 mg/m³）よりも高頻度で喉および眼の軽度な刺激性が認められており、それと同様にこの試験は、シクロヘキサンが呼吸器に軽度な刺激性を有することを示しているが、この評価項目に関する分類の必要性までは示していない。

4.1.2.3.2 ヒトにおける試験

シクロヘキサンのヒトに対する刺激性作用に関する報告はほとんど得られていない。以下の情報が、シクロヘキサンについてのUK HSE review（英国安全衛生庁審査報告書）に記載されている。

皮膚刺激性

希釈していない液体のシクロヘキサンをヒトの皮膚に1分間塗布した時、紅斑とみみず腫れが認められた。

眼刺激性

ボランティアで実施した自己評価による眼刺激性の試験で、 17.5 mg/m^3 (5 ppm) の気体シクロヘキサンへの90秒曝露では、ほとんどの被験者は眼に対する作用を訴えなかった。数人の被験者は非常に軽度な眼刺激性を訴えた様だが、その詳細については不明である (HSE, 1991)。TNOの試験 (1998c) では、250 ppm (875 mg/m^3) のシクロヘキサンに曝露されたボランティアが、25 ppm (87.5 mg/m^3) 曝露のボランティアよりも高頻度で眼と喉への刺激性を訴えている。

4.1.2.3.3 刺激性のまとめ

動物における試験のデータから、シクロヘキサンには皮膚刺激性があると考えられる。規制に関しては、分類基準に少し満たないという結果であるが、シクロヘキサンの刺激性の発現は遅く、観察期間終了 (16日間) まで持続することが示されている。また、脱脂作用もあると思われるため、シクロヘキサンはXn、R38に分類される。シクロヘキサンは、動物およびヒトの両方において、眼に対する刺激性を有する。シクロヘキサンはまたマウスおよびヒトの呼吸器に対しても刺激性を示したが、その作用は軽度であるために分類に関して重要な所見とは考えられなかった。

4.1.2.4 腐食性

セクション4.1.2.3に示した試験から、シクロヘキサンに腐食性はないと結論される。

4.1.2.5 感作性

4.1.2.5.1 皮膚感作性

動物における試験

White Eagle Toxicology Laboratories (1996) は、シクロヘキサンの感作性について、ビューラー試験の変法を用いて検討した (B6 annexe Vの方法、ECおよびOECDのGLPに準拠)。20匹のモルモット (雄9匹、雌11匹) を用いて、シクロヘキサン (純度99.98%) のエタノールを溶媒とした10%溶液で感作し、アセトン溶媒とした10%溶液で惹起した。同時に陰性対照 (シクロヘキサン処置なし) および陽性対照 (DNCB処置、感作濃度は0.1%、溶媒は50%エタノール、惹起濃度は0.07%、溶媒はアセトン) も設けた。溶媒は皮内投与での認

容性が非常に低いため、マキシミゼーションテストは求められないことに留意されたい。感作時の反応は、発赤なし（14/20）から極軽度な発赤（6/20に軽度な反応）までのものであった。惹起24時間後には極軽度な発赤反応が1/20の動物にみられ、この群のその他の動物および陰性対照群には変化は認められなかった。シクロヘキサンで感作しチャレンジさせた動物での感作率は、0/20であった。DNCBで感作し惹起した動物での感作率は、8/10であった。

惹起濃度をもっと高くすることができた（アセトンを溶媒とする15%溶液でも皮膚刺激はみられなかった）こと、感作時に皮膚反応を示した動物はほんの数例であったことから、この試験の意義は低いものとなっている。

ヒトにおける試験

シクロヘキサンがこれほど広範囲に大量に使用されているにもかかわらず、ヒトに対する皮膚感作性の報告はない。そのために、もしシクロヘキサンに感作性があるとしてもそれは非常に弱いものであると思われる。

4.1.2.5.2 呼吸器感作性

シクロヘキサン曝露による気道に対するアレルギー反応に関連する報告は得られていない。

4.1.2.5.3 感作性のまとめ

皮膚感作性については、動物における試験データ（ECおよびOECDのGLPに従って実施されたビューラー試験）から、シクロヘキサンは強い皮膚感作性物質ではないと結論できる。さらに、広範囲に大量に使用されている物質であるにもかかわらずヒトの皮膚感作性の報告はないことは、この結論の信頼性を高めるものである。

呼吸器感作性に関するデータは得られておらず、シクロヘキサンが呼吸器系感作性を有する物質であるとの指摘もない。

まとめとして、EUの基準によれば、シクロヘキサンを感作性物質に分類する妥当性はない。

4.1.2.6 反復投与毒性

4.1.2.6.1 動物における試験

経口投与

報告は得られていない。

吸入曝露

ラット

シクロヘキサンがn-ヘキサン型神経障害を惹起するか否かを検討することを企図した、ラットを用いた試験（神経筋機能の評価：32 cmの高さから落下させ、着地開脚幅を測定）では、1,500 ppm (5,250 mg/m³) または2,500 ppm (8,750 mg/m³) の気体シクロヘキサンに、1日9-10時間、1週5-6日間、30週間曝露したが、神経障害の外観的な兆候も、体重増加に及ぼす影響も、また神経組織の組織学的変化も認められなかった (Frontali et al., 1981)。

無毒性量 (NOAEL) は、ラットにおいては2,500 ppm (8,750 mg/m³) であった。

TNOが1998年に行った試験では、ラットを様々な濃度のシクロヘキサンに3日間曝露している（試験デザインや条件はセクション4.1.2.2を参照のこと）。

この試験の結果は、急性毒性の項（セクション4.1.2.2）に記載している。

300、1,000または2,000 ppm (1,050、3,500または7,000 mg/m³) の気体シクロヘキサンへの1日6時間、週5日、2週間の曝露でも、毒性徴候は認められなかった。僅かな種類の酵素活性について、大脳半球のホモジネートで測定した結果、全てのシクロヘキサン曝露群で、アゾ還元酵素活性に低下が認められたが、その意義は不明である (Savolainen and Pfäffli, 1980)。

2週間の吸入による用量設定試験 (Haskell Laboratory, 1995a) では、Crl CD.BRラット（雌雄各5匹/群）を0、3,000、6,000および9,000 ppm (0、10,500、21,000および31,500 mg/m³) のシクロヘキサン（純度99.97%）に曝露した（曝露チャンバーを用いた全身曝露）。1回6時間の曝露を合計9回行った。曝露前に体重を測定し、曝露前、曝露中および曝露後に一般状態を観察し、実験終了時には通常の生化学的検査および組織学的検査を行った。神経障害を評価するために、標準聴覚刺激に対する反応の変化の観察を、各曝露期間中に少なくとも3回行った。試験の4および11日目には、曝露の前後に簡易化した機能観察総合評価 (FOB) も実施した。この評価は曝露開始前にも行い、ベースラインの状態を確認した。FOBでは、

次のパラメータについて検査した：

- ・ ホームケージ内：姿勢および眼瞼閉鎖状態
- ・ オープンフィールド：正向反射、痙攣、歩行状態、異常発声、努力性呼吸、神経-筋協調性、覚醒度および眼瞼閉鎖状態
- ・ 用手的取扱い：接近物および接触に対する反応、聴覚反応（クリック音）およびテールピンチテストにおける反応

この試験は、EPAのガイドラインおよびEPAおよびOECDのGLPに従って行われた。

9,000 ppm群の雄ラットにわずかだが有意な体重増加抑制が認められた。6,000 ppm以上の群の雄および9,000 ppm群の雌の肝細胞で、わずかな分裂指数の増加がみられた以外は、全身毒性を示唆する所見はなかった。とくにこの試験では、肝臓の絶対および相対重量には変化は認められなかった。これらの結果から、全身毒性に関するNO(A)ELは、3,000 ppm (10,320 mg/m³) と推定された。神経毒性に関しては、刺激に対する反応の低下が、9,000 ppm群では試験2日目から、6,000 ppm群では7回目の曝露から認められた。FOBでは変化は認められなかった。ラットにおける神経毒性作用に関するNOAELは、3,000 ppm (10,320 mg/m³) とすることができる。この試験は、90日吸入毒性試験のための用量設定試験として行われた。上記の変化は極めて小さいものであり、適応性の発現とも考えられるため、上記の無毒性量は、非常に慎重な値であると捉えるべきである。このことは、リスク特性化で考慮される。

90日間吸入毒性試験（Haskell laboratory, 1996a）では、0、500、2,000 および7,000 ppm（0、1,750、7,000および24,500 mg/m³）のシクロヘキサン（純度> 99.98 %）に、CD BRラット（対照群および高用量群は雌雄各20匹/群、低および中用量群は雌雄各10匹/群）を曝露した。曝露は、1日6時間、週5日間で90日間（66回の曝露）、チャンバー内で行った（全身曝露）。対照群および7,000 ppm群の雌雄各10匹には、1か月の回復期間を設けた。1日の曝露時間中に、標準警告音刺激に対する反応を、定期的に評価して記録した。曝露開始前および試験終了直近には、検眼鏡検査を行った。45および90日目の曝露後には、血液および尿を採取して、臨床病理学的項目を評価した。試験終了時には、毒性試験で一般的に行われている、肉眼所見の観察、臓器重量測定、肉眼的および顕微鏡的組織検査を行った。

この試験は、EPAのガイドライン、およびEPA並びにOECDのGLPに従って行われた。

体重、体重増加量、摂餌量、尿検査および一般所見に曝露に関連した変化は認められなかった。7,000および2,000 ppm群の雌雄において両試料採取時点で、ソルビトール脱水素酵素（SDH）および乳酸脱水素酵素（LDH）の軽度な低下が認められたが、毒性学的に重要な

所見とは考えられなかった。回復期間終了時に、7,000 ppm群の雄において副腎重量の軽度な増加が認められた。この変化は90日間の曝露終了時にはみられなかったことから、偶発的な変化と考えられた。7,000 ppm群の雄（10/10）において、肝肥大を伴う統計学的に有意な相対肝重量の増加（体重に対する割合で対照の3.64%に対し4.001%）がみられ、同時に雌雄（雄9/10、雌5/10）において、小葉中心性肝細胞肥大も認められた。この所見は1か月の回復試験である程度回復した（雄の4/10のみに肝臓の腫大残り、小葉中心性肝細胞肥大は消失した）が、慎重な判断を行っていく立場をここでも尊重して、この変化が毒性学的に全く意味を持たないとは考えられないものとした。神経毒性学的な変化としては、聴覚刺激に対する反応の低下または消失が、500 ppm群から用量依存的に認められた。500 ppm群では、反応の低下が実験61、66、67および68日にみられた（曝露66回中4回）。2,000ppm群では、反応の低下が16回の曝露で、反応の消失が50回の曝露で認められた。7,000ppm群では、反応の低下が1回の曝露で、反応の消失が残り65回の曝露で認められた。この変化は、一過性のものであり、また神経機能の障害を示唆する様な一般状態の変化が観察されなかったことから、シクロヘキサンによる可逆的な鎮静作用によるものと考えられた。

神経毒性学的なNOAELは、2,000ppm以上の用量でみられた鎮静作用に基づき、500 ppm（1,720 mg/m³）と推定された（500 ppm群でみられたその他の変化は軽度なものであり、試験終了時に数例のみに認められたに過ぎない）。肝臓に及ぼす影響に関するNOAELは、7,000 ppm（24,080 mg/m³）群の雄でみられたある程度可逆的な変化に基づき、2週間の用量設定試験と同様に判断して、2,000 ppm（6,880 mg/m³）と推定された。これらの肝臓の変化は軽度であり、適応性の発現と考えられた。

シクロヘキサンの神経毒性を機能観察総合評価（FOB）、自発運動（MA）および神経病理学的（NP）テストで検討するために、別の群（雌雄ラット各12匹/群）を設け、先の試験と並行して処置を行った（Haskell 1996d）。試験条件は、特殊な神経毒性学的検査以外は同じであった。神経行動学的検査は、曝露前および試験4、8および13週に行った。それぞれの検査時期においてMAテストに先立ってFOBを行った。FOBは次のパラメータについて実施した。

- ・ ホームケージ内：姿勢、眼瞼閉鎖状態、ライジング反応、回転行動、噛みつき行動
- ・ ケージからの搬出および取扱い検査：ケージからの搬出の容易性、取扱いの容易性、筋緊張性、異常発声、立毛、尾および/または手足の噛み跡、眼瞼閉鎖状態、毛の状態、流涙、流涎、眼球突出
- ・ オープンフィールド内：正向反射、努力性呼吸、痙攣/振戦、神経-筋協調性、グルーミング、歩行、運動、覚醒度、異常発声、眼瞼閉鎖状態、排便および排尿
- ・ オープンフィールドにおける用手的取扱：接近物および接触に対する反応、聴覚反応、テールピンチテストにおける反応、前肢の握力、後肢の握力、着地開脚幅

- ・ 自発運動のパラメータ：排便、排尿、瞳孔反射

自発運動については、60分間の観察期間を連続する10分間ずつの6ブロックに分けて、運動の持続時間と回数を評価した。

試験終了時、対照群および7,000 ppm群の雌雄各6匹について所定の臓器で神経病理学的検査を行い、中用量群の臓器は保存した。脳（前脳、大脳、中脳、橋、延髄および小脳）、脊髄（頸部および腰部）、坐骨神経、ガッセル神経節、頸部背根線維並びに神経節（DRF & G）、頸部および腰部腹根線維（VRF）、および腓腹筋を採取して包埋し、切片を作成して、あらゆる神経学的病変を捉えるべく様々な手法を用いて染色し鏡検した。

他の試験群（亜慢性試験および発生毒性試験）と同様、2,000 ppm以上の群で鎮静作用が認められ、警告音刺激に対する反応の低下が特徴的であった（最高用量では無反応まで低下）。この作用は一過性のものであり、動物を曝露チャンバーから取り出した直後には消失した。FOBおよびMAの評価では、変化は認められなかった。病理組織学的検査では、対照群で認められたものと同様の病変が同程度で認められたのみで、曝露に関連した所見は認められなかった。それらの病変については、ラットで自然発生的に生ずることがすでに報告されている。この試験におけるNOAELは500 ppm (1,720 mg/m³) であり、それは2,000 ppm (6,880 mg/m³) 以上の群でみられた一過性の鎮静作用に基づくものであった。

マウス

CrI CD1 (ICR) BRマウスを用いた2週間のラットとの比較試験が、Haskell laboratory (1995a) で行われた（試験条件はラットでの試験を参照のこと）。

9,000 ppm群の雄で、肺重量のわずかな増加が認められた。6,000 ppm以上の群の雌雄で、肝臓の絶対および相対重量の増加が認められた。この変化は、雄の9,000 ppm群および雌の全曝露群にみられた軽度な小葉中心性肝細胞肥大および分裂中期細胞の増加と関連するものであった。マウスでは全身毒性に対するNOAELは求めることができなかった。LOAELは3,000 ppm (10,500 mg/m³) であったが、この値はこの変化が適応性の発現と考えられるため、非常に慎重を期したものといえる。ラットと同様、刺激に対する反応の低下が、9,000 ppm群では2日目から、6,000 ppm群では7回目の曝露からみられ、それは、ジャンプやゆっくりとした回転行動のような行動の変化と関連するものであった。FOBでは変化は認められなかった。マウスにおける神経毒性学的なNOAELは、この試験によれば3,000 ppm (10,320 mg/m³) であった。この試験は、マウスにおける90日吸入毒性試験の用量設定試験として行われたものである。

2週間の用量設定試験に基づいて、90日間の吸入毒性試験（Haskell Laboratory, 1996b）が行

われた。試験条件は、ラットを用いた試験と同じであった（Haskell Laboratory, 1996aを参照のこと）。

刺激に対する反応は、500 ppm群の動物では、対照群と同じであった。2,000 ppm群では、3回目以降の曝露から反応の低下または消失が認められ、時間とともに顕著になった（曝露回数の増加にともなって無反応動物が増加）。7,000 ppm群では、反応の低下または消失および過活動状態の出現頻度が、試験4日から試験30日にかけて増加した。試験30日から試験終了までは、動物が過活動状態にあったため、刺激に対する反応を測定することができなかった。これらの症状は曝露直後にみられたものであり、次の曝露までには回復するものであった。最も高頻度に記録された症状は、歩行や運動の異常、過度な毛繕い、過度な運動、過度な反応、攣縮、攻撃性、運動抑制および被毛の逆立ちであった。

500 ppm群以上の群の雄で、血液学的検査の異常（RBC、HbおよびHtの増加、血小板の減少）がみられたが、それらは必ずしも統計学的に有意ではなく、必ずしも用量と関連するものでもなかった。雌では7,000 ppm群のみに、RBC、HbおよびHtの増加が認められた。7,000 ppm群のすべての動物で血液学的パラメータの変動がみられたが、その原因を脱水症の全身的な所見がないこととの関係において説明することはできなかった。これらの症状は、毒性的に重要なものとは考えられなかった。

7,000 ppm群の雄に、肝臓の絶対および相対重量の増加が認められた（絶対重量：1.275 gに対して1.504 g）。雌では相対重量のみの増加であった。これに関連した病理組織学的変化は認められなかった。これらの変化は、2週間の用量設定試験の結果（雄では9,000 ppm群、雌では3,000 ppmおよびそれ以上で病理組織学的所見有り）と整合していないが、NOELの推定に影響することはなかった。

2,000 ppm（6,880 mg/m³）群で鎮静兆候がみられていることから、神経毒性学的NOAELは、500 ppm（1,720 mg/m³）と推定された。全身毒性のNOAELは、7,000 ppm群で肝臓への作用がみられたことから、2,000 ppm（6,880 mg/m³）と推定された。

ウサギ

ウサギを用いた吸入毒性については、1943年に10試験が報告されている。曝露濃度と曝露時間の範囲は、435 ppm（1.47 mg/L）の1,040時間から、26,572 ppm（89.6 mg/L）の1時間までであり、シクロヘキサンは気体で吸入させた。435、786または3,330 ppmの1日6時間、1週間に5日で10週間の曝露でも、435 ppmの1日8時間、1週間に5日で26週間の曝露でも、毒性徴候は認められなかった。7,444～18,565 ppm（25～63 mg/L）を1日6時間、1週間に5日で2～5週間曝露した場合は、数例の死亡が認められ、また多数の臨床所見が濃度に依存す

る重篤度で認められた。臨床所見は、鼻こすり、結膜充血、体重減少、流涎、下痢、嗜眠、昏睡、神経-筋協調性の消失、一過性の下肢麻痺、振戦、呼吸速拍並びに努力性呼吸、およびチアノーゼであった。すべての動物で毎週行った血液学的検査では、シクロヘキサン処置による影響は認められなかった。435 ppmに1日6時間、1週間に5日で10週間曝露されたウサギにおいて、病理組織学的変化は認められなかった。786 ppmの曝露で、肝臓と腎臓にわずかな病理組織学的変化が認められた。より高濃度では、全身的な血管内皮損傷、および広範な組織の炎症並びに退行性変化が認められた。この試験では、生化学的検査は行われなかった (Treon et al., 1943b)。

ウサギでのNOAEL=435 ppm (1,500 mg/m³、1日8時間、1週間に5日で26週間)、
ウサギでのLOAEL=786 ppm (2,700 mg/m³、1日6時間、1週間に5日で10週間)

サル

上記のウサギを用いた一連の試験と同時に、サルを1,243 ppm (4.19 mg/L) の気体シクロヘキサンに1日6時間、1週間に5日で10週間曝露した試験が行われている (Treon et al., 1943b)。使用したサルは1匹であった。体重の減少以外には、毒性学的または病理組織学的変化は認められなかった。

経皮投与

ウサギ

1943年、希釈されていないシクロヘキサンを、1匹のウサギの皮膚に14日間毎日反復塗布 (開放状態) した試験が行われており、その総投与量は180.2 g/kgであった (Treon et al., 1943a)。皮膚における刺激性および肥厚がみられたが、死亡は認められなかった。また、試験期間中、昏睡や痙攣は認められなかったが、塗布期間中および塗布終了後1週間において体重減少がみられたことが報告されている。病理組織学的検査で内部臓器に広範な血管損傷、組織の炎症および変性が認められているが、検査の実施時期は記載されていない。

この乏しい試験データからは、NOAELを得ることはできなかった。

その他の投与経路

ラット

Bernard et al. (1989) は、シクロヘキサンの腎毒性を、雌ラットを用いて検討している。この試験では、動物に0.375、0.75および1.5 g/kgのシクロヘキサンを、1週間に5回、2週間腹腔内投与した。β2-ミクログロブリン尿症の増進が、用量および時間に依存して認められた。腎臓の濃縮能の低下が最高用量群のみでみられた。同じ腎毒性が、0.4 g/kgのシクロヘキサノール投与でもみられていることから、著者はシクロヘキサンの腎毒性はシクロヘキサノールによるものと推察している。

4.1.2.6.2 ヒトにおける試験

1993年に発表されたひとつの報告書では、シクロヘキサンへの曝露〔幾何平均27 ppm (94.5 mg/m³)、観察された最高濃度は274 ppm (959 mg/m³)〕は、自覚症状の発生率や肝臓および腎臓機能に関する血液学的または血清生化学的パラメータに有意な増加を引き起こさないと結論付けている。この報告書の著者は、曝露量が低く、1993年当時の職業曝露限度よりもはるかに低かったと述べている (Yasugi et al., 1994)。

シクロヘキサンに関する1991年のHSEレビューでは、シクロヘキサンを主成分とする溶剤および接着剤を頻繁に使用するイタリアの靴工場、印刷工場および塗装労働者でみられた末梢神経障害について、シクロヘキサンの関与を他の化学物質とも関連させながら指摘する研究者がいると述べている (De Rosa et al., 1985; Mutti et al., 1982; Franco et al., 1979)。しかし、このHSEレビューは、そのような労働者はn-ヘキサンを含む様々な溶剤に混合曝露されていたことを指摘し、実験的証拠からは神経障害はそれらの工場で使用されていた溶剤および接着剤の成分であるn-ヘキサンによるものであることが示唆されると結論付けている (HSE, 1991)。

Yuasa et al. (1996) は靴工場でひとつの調査を行った。その目的は、シクロヘキサンの職業的曝露における神経毒性を検討することであった。18人の女性 (18～56歳) が、シクロヘキサンを75.6%、トルエンを12%、n-ヘキサンを0.9%含む接着剤に1日8時間曝露されていた。そのうち12人は、n-ヘキサンを用いる仕事に0.3～20年間従事していたが、最初の調査の0.7～2.6年前には、その種の仕事をしていなかった。n-ヘキサン曝露による影響を除くために、別の9人の労働者の群についてこの最初の調査の1年後に追跡調査を行った。曝露されていない18人を、医学部の女子学生および女性事務職員から選抜し、対照群とした。曝露の評価として、曝露後8時間に採取した尿中のシクロヘキサノール濃度を、Yuasa の方法 (1994) により測定した。それ以前およびその時の曝露状況に応じて、その労働者を高曝露群 (7人)

と低曝露群（11人）に分類し、それぞれの群の神経伝導速度（NCV）を比較した。高曝露群と低曝露群のシクロヘキサン濃度の境界は、100 ppmとした。

次の神経学的指標を測定した。

- ・ MNCV：手首と肘の間の尺骨神経および膝と足首の間の総腓骨神経の、運動線維の最大神経伝導速度
- ・ MLD：尺骨神経および総腓骨神経の運動神経遠位潜時
- ・ SNCVp：手首と肘の間の尺骨神経の知覚線維における近位神経伝導速度
- ・ SNCVd：手首と第五中手指節関節の間の尺骨神経およびふくらはぎと足の間の腓腹神経の知覚線維における遠位神経伝導速度
- ・ 振幅：尺骨神経および腓腹神経の最大知覚神経活動電位の振幅

これらの変数を、利き腕およびそれと同じ側の足で、標準的な（筋電図を用いる）方法により測定した。0.1（運動神経）または0.2 ms（知覚神経）の単一パルスで周波数を2 Hzとして、神経に最大上刺激を与えた。被験者の外部曝露濃度は、5～211 ppm（17.2～725 mg/m³）の範囲で、平均28 ppm（96 mg/m³）であった。尿中ヘキサノール濃度は、0.12～8.23 mg/Lの範囲であり、平均は0.55 mg/Lであった。自覚症状を訴える割合には、有意ではない非常にわずかな差異がみられた。すなわち、倦怠感については、曝露群で9/18であったのに対して、非曝露群では4/15であった。また、頭痛は、曝露群で10/18、非曝露群では7/15であった。さらに、目まいおよび不安感は、曝露群でそれぞれ7/18および8/18、非曝露群ではそれぞれ4/15および5/15であった。神経学的指標については、MNCVやSNCVの値に差異は認められなかった。最初の調査では、尺骨神経および総腓骨神経のMDLにおいて、わずかな違いが認められた（労働者の方が対照群より短かった）。しかし、2回目の調査では、神経学的指標について差は認められなかった。そのために、最初の調査でみられたわずかな差は、おそらく以前にn-ヘキサンへの曝露があったためであると見なせた。全般的に、比較的短期間の低濃度〔米国における時間加重平均限界値（150 ppm）以下〕の曝露では、神経毒性学的な影響は認められなかった。

4.1.2.6.3 反復投与毒性試験のまとめ

マウスおよびラットをシクロヘキサンに吸入曝露させた最近の試験では、亜急性および亜慢性曝露において、肝臓に対するわずかな影響が認められている。ラットおよびマウスの両者において、中期分裂像の増加、肝臓の絶対並びに相対重量の増加、および小葉中心性肝細胞肥大が、6,000～7,000 ppm（それぞれ28および90日間曝露試験）の曝露濃度で認められた。肝臓への影響に関するNOAELは、2,000 ppm（6,880 mg/m³）と判断された。6,000 ppm

以上の曝露でみられた肝臓への影響は、適応性の発現と思われるため、この値は非常に慎重な考え方に基づくものである。

神経毒性学的には、同じ試験で麻酔作用および自発運動の変化が検討されている。マウスおよびラットで、刺激に対する反応において可逆的な変化（反応の低下および消失）が、28日曝露では6,000 ppmで、90日間曝露では2,000 ppmでみられている。この作用は急性のものと思われ、NOAELは500 ppm (1,720 mg/m³) であると判断された。急性神経毒性のリスク特性化では、この値を考慮することになる。

ウサギを用いた古い試験データでは、肝臓および腎臓への影響が、およそ800 ppmの曝露で認められ、NOAELをおよそ500 ppmとしている。それらの試験では情報が限定的であるため、リスク特性化においてこれらの影響は考慮されないが、これらはラットおよびマウスを用いた最近の試験データと同程度のものではあった。

ヒトにおける最近の試験では、27~274 ppmの濃度において、影響は認められなかった。

労働者における末梢性神経障害の原因のひとつとして、シクロヘキサン曝露が疑われているが、すべてのデータが、神経毒性物質としてよく知られているn-ヘキサンも含む混合曝露によるものである。シクロヘキサンの代謝経路は、n-ヘキサンのそれとは明らかに異なるものであり（とくに2,5-ヘキサジオンが生成されない）、シクロヘキサンそのものには末梢神経系に対する神経毒性はないといえることができる。

ある種の溶剤が慢性脳症（“器質性脳症候群”とも呼ばれている）の原因と推定されていて、この懸念がシクロヘキサンでも持ち上がっている。この作用については、実験的にも疫学的にもまだ検討されていない。しかし、シクロヘキサンがこの作用を惹起し得るといふ報告もない。

EUの分類および表示の基準によれば、シクロヘキサンはその麻酔作用により、R67に分類される。

Table 4.12 Summary of repeated dose toxicity studies

Systemic (with or without neurotoxicity assessment)			
Species	Administration protocol	Objectives of the tests	NOAEL
Rat	inh. 30 weeks, 9-10 h/d, 5-6 d/w	ability of cyclohexane to produce neuropathy	2,500 ppm (8,600 mg/m ³)
Rat	inh. 2 weeks, 6 h/d, 5 d/w	effect of cyclohexane on cerebral enzyme activity	2,000 ppm (6,880 mg/m ³)
Rat	inh. 2 weeks, 6 h/d, total 9 exposures	neurotoxicity assessment, behaviour, functional observational battery (FOB).	3,000 ppm (10,320 mg/m ³)
		systemic toxicity (biochemical and histological toxicity).	3,000 ppm (10,320 mg/m ³)
Rat	inh. 90 d, 6 h/d, 5 d/w	systemic toxicity : clinical, haematology, biochemical and histology	2,000 ppm (6,880 mg/m ³)
		neurobehavioral effects	500 ppm (1,720 mg/m ³) (acute effect)
Rat	inh. 90 d, 6 h/d, 5 d/w	FOB, motor activity and neuropathology	500 ppm (1,720 mg/m ³) (acute effect)
Mouse	inh. 2 weeks, 6 h/d, total 9 exposures	neurotoxicity assessment, behaviour, functional observational battery (FOB)	3,000 ppm (10,320 mg/m ³)
		systemic toxicity (biochemical and histological toxicity)	< 3,000 ppm (< 10,320 mg/m ³)
Mouse	inh. 90 d, 6 h/d, 5 d/w	systemic toxicity: clinical, haematology, biochemical and histology	2,000 ppm (6,880 mg/m ³)
		neurobehavioral effects	500 ppm (1,720 mg/m ³) (acute effect)
Rabbit	26 weeks, 8 h/d, 5 d/w	systemic toxicity (no biochemical investigation)	435 ppm (1,500 mg/m ³)
Neurotoxicity			
Species	administration protocol	objectives of the tests	NOAEL
Rat	1) inh. 3·8 h/exposure	neuromuscular, sensor motor, convulsive, excitability and activity	2,000 ppm (6,880 mg/m ³)
	2) inh. 3·8 h/exposure	discriminative task	400 ppm (≈1,400 mg/m ³)
Rat	inh. 6 h	schedule-controlled operant behaviour	2,000 ppm (6,880 mg/m ³)

4.1.2.7 変異原性

4.1.2.7.1 *In vitro*試験

シクロヘキサン (純度>99%) を、標準Amesテストの変法であるプレインキュベーション法で検定した (Mortlemans et al., 1986)。代謝活性化系有りおよび無しの条件下で、*Salmonella typhimurium* (TA1535、TA1537、TA98およびTA100株) をDMSO中でインキュベートした。代謝活性化系としては、SDラットの肝臓を用いたものとSyrianハムスターの肝臓を用いたものとの2種類を使用した。シクロヘキサンの用量は、0~10,000 µg/plateであった。

結果：細胞毒性が、TA1537およびTA98株に対して3,333 µg/plate以上、TA100およびTA1535株に対して10,000 µg/plateでみられた。代謝活性化系有りおよび無しの条件下でいずれの濃

度でも、復帰突然変異の所見は認められなかった。

—標準Amesテストでシクロヘキサンに変異原性が認められないことを、Mc Cann et al.が1975年に報告している。しかし、この報告書には一つの結果の表があるだけで、毒性や使用した方法、および濃度範囲に関する記載はない。

—脱イオン水に溶解したシクロヘキサンについて、濃度範囲を313～10,000 nL/mL (250 ～ 7,800 µg/mL) としたマウスリンフォーマアッセイが行われている (API, 1986)。試験方法は、ガイドラインに記載のものと同様であった。

結果：細胞毒性が、代謝活性化系有りおよび無しの条件下で、10,000 nL/mL (7,800 µg/mL) において認められた。代謝活性化系無しの場合の相対増殖率は39～59 %であったが、用量相関はなかった。いずれの濃度でも前進突然変異は認められなかった。代謝活性化系有りの条件下での相対増殖率は、46～64 %であり、用量相関はなかった。4濃度で突然変異の頻度にわずかな増加がみられたが用量相関はないことから、追加試験で確認することにした。追加試験での濃度は、3,000～8,000 nL/mL (2,340～6,240 µg/mL) とした〔細胞毒性が9,000 nL/mL (7,020 µg/mL) で認められたため〕。相対増殖率は、23～69%であった。この試験の結果は明らかな陰性であった。以上の試験結果から、代謝活性化系の有無にかかわらず、陰性と結論された。

—別のマウスリンフォーマアッセイでは、シクロヘキサン（純度100%）をDMSOに溶解して、8～100 µg/mLの濃度で実施した (Phillips, 1982g)。試験方法は、ガイドラインに記載のものと同様であった。

結果：この試験の結果については一つの表しかない。代謝活性化系無しの場合、いずれの濃度でも生存率は90～140%で細胞毒性はなく、前進突然変異の増加は認められなかった。代謝活性化系有りの場合は、最高濃度（100 µg/mL）で65%の成長阻害がみられたが、変異の頻度に影響はみられなかった。この試験で設定された範囲の濃度では、変異原性は陰性と判断された。

—*In vitro*姉妹染色分体交換試験では、CHO細胞を代謝活性化系有りおよび無しの条件下で、DMSOに溶解した様々な濃度のシクロヘキサン（0.25～25µg/mL）とインキュベーションした (Phillips, 1982h)。試験はガイドラインに準拠して行われ、最高濃度は、細胞培養において生育を完全に阻害する濃度に相当するものであった（25 µg/mL）。検討した濃度範囲で作用は認められず、結果は陰性と判断された。

—DMSOに溶解した 10^{-2} 、 10^{-3} および 10^{-4} Mのシクロヘキサン（純度99.8%）について不定期DNA合成試験が行われている (Perocco, 1982)。ヒトリンパ球を、シクロヘキサン存在下お

よび非存在下（対照）で4時間培養した。DNA合成に及ぼす影響を、細胞の $[^3\text{H}]\text{TdR}$ 取り込み量で測定した。短期毒性（4時間の培養）を、トリパンブルー染色法で調べた。試験は、ラット肝臓の代謝活性化系（S9 mix）有りおよび無しの条件下で行われた。

結果：S9 mixを添加しない条件下で $[^3\text{H}]\text{TdR}$ の取り込みが顕著に阻害されたが、細胞の生存能には影響はみられなかった。代謝活性化系を添加した場合には全く影響は認められなかった。著者は、これらのデータにより、シクロヘキサンはただちに細胞死を導かない細胞毒性作用を発揮するが、おそらくそれはDNA合成のある段階を阻害ないしはチミジンの取り込み過程を抑制するためであることが示唆されたとしている。

なお、代謝活性化系が無い条件下でみられた作用は用量に相関せず、溶媒対照および陰性対照のデータは大きくばらついていて、最高濃度での取り込みの低下は対照の値の範囲内であった。試験方法には、陽性または陰性の判定基準が示されていない。これらの問題点のためにこの試験の信頼性が損なわれている。このデータから結論は導くことはできない。

シクロヘキサンについて10および100 μM の濃度で、DNA-細胞結合アッセイ〔DNA cell binding (DCB) assay〕が行われている（Kubinsky et al., 1981）。シクロヘキサン単独、リゾチームとの混合、肝臓抽出物との混合、およびリゾチーム並びに肝臓抽出物との混合の条件で検討されている。陽性対照にはメタンスルホン酸メチル（MMS）を用い、陰性対照は培地のみとした。結果は“結合率”で表した。結合率が> 1%の場合はその物質は陽性と判断した。

結果：シクロヘキサンは単独、肝臓抽出物との混合、およびリゾチーム並びに肝臓抽出物との混合の条件では陰性であった。一方、リゾチームとの混合では、最高濃度（100 μM ）で陽性（わずか1.6%）であった。しかし、その増加は極めてわずかであり、しかもリゾチーム並びに肝臓抽出物との混合ではみられなかったために、この結果には疑問が残る。

Table 4.13 *In vitro* genotoxicity data on cyclohexane

Assay	Strains/type	Metabolic activation	Result	Comment	Reference
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA1535, TA1537, TA97, TA98, TA100	with and without Aroclor induced rat and hamster liver S-9	negative	a pre-incubation assay was also negative	Mortlemans et al. (1986)
<i>Salmonella typhimurium</i>	TA1537, TA1535, TA98, TA100	with and without Aroclor induced rat liver S-9	negative	brief report	McCann et al. (1975)
Mouse lymphoma assay	L5178Y (TK locus)	with and without Aroclor induced rat liver S-9	negative	comprehensive report	API (1986)
Mouse lymphoma assay	L5178Y (TK locus)	with and without Aroclor induced rat liver S-9	negative	summary report	Phillips (1982g)
Sister chromatid exchange assay	CH0	none	negative	full report not seen	Phillips (1982h)
Unscheduled DNA synthesis	human lymphocytes	with and without phenobarbitone induced rat liver S-9	negative	lymphocytes exposed to 0.1-10 mM cyclohexane for 4 h	Perocco (1983)
DNA binding to E Coli		E Coli Q3 cells none	doubtful	non standard test protocol; negligible activity detected for DNA pre-treated with 10 or 100 μ M cyclohexane except in the group treated	Kubinski et al. (1981)

4.1.2.7.2 *In vivo*試験

シクロヘキサンについて、げっ歯類の骨髄を用いた*in vivo*細胞遺伝学的試験が行われている (American Petroleum Institute, 1982)。1群雌雄各10匹のSprague Dawleyラットを0、97、307 および1,042 ppmのシクロヘキサンに1日6時間、5日間吸入曝露させた (350、1,050、3,650 mg/m³)。最終曝露後6時間に骨髄試料を採取して、細胞遺伝学的分析を行った。陽性対象として用いたトリエチレンアミンでは、構造異常の明らかな増加が認められた。シクロヘキサンについては、低および中濃度群の雌および低濃度群の雌雄を合わせたデータにおいて、わずかではあるが統計学的に有意な数的異常の増加が認められた。一般毒性に関する情報はなく、いずれの濃度でも分裂指数の減少はみられなかった。しかし、この数的異常の増加には用量相関性がないために、生物学的意義が低いと著者は結論している。さらに、この試験施設では、数的異常のパラメータはしばしば大きくばらつき、陽性対照でも統計学的に有意ではなかった (数値データは示されていない)。この試験条件ではシクロヘキサンは染色体異常を惹起しないと結論される。

ショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験では陰性の結果であった (Shetty and Ragaswamy, 1984)。

4.1.2.7.3 変異原性のまとめ

評価可能な*in vitro*変異原性試験からは、シクロヘキサンの変異原性は示されなかった。*In vivo*のショウジョウバエを用いる伴性劣性致死試験でも陰性の結果であった。小核試験では用量に依存しないわずかな変化がみられたが、その生物学的意義は低いと思われた。

4.1.2.8 がん原性

シクロヘキサンのがん原性に関する報告は1報のみあり、マウスの皮膚で、イニシエーション-プロモーション多段階発がん試験が行われている (Gupta et al., 1990)。

この試験の最初の部分では、100 µLのシクロヘキサン (純度99.5%) を単回または反復 (24時間ごと、3週間) 塗布することにより、細胞増殖のマーカであるオルニチンデカルボキシラーゼ活性が誘導されることが認められた。

2番目の部分では1群20匹のマウスをジメチルベンゾアントラセン (DMBA) でイニシエートし、7日後に酢酸テトラデカノイルホルボール (TPA) およびシクロヘキサン [100 µL (78 µg)] (a)、またはシクロヘキサン単独 (b) を皮膚に反復塗布してプロモートした。局所の腫瘍が (a) では45%、(b) では10%にみられた (Table 4.14)。

Table 4.14 Tumour promoting potential of cyclohexane according to the initiation-promotion protocol

Group	Initiation	Promotion	Cumulative no. of tumour	% Tumour bearing animals
1	DMBA	TPA+ Cyclohexane	21	45
2	DMBA	cyclohexane	2	10
3	DMBA	TPA	80	100
4	acetone	TPA	∅	∅
5	none	none	∅	∅
6	DMBA	TPA	∅	∅
7	DMBA	acetone	∅	∅

第1、第2および第3群のマウスに、0.2 mLのアセトンに溶解した0.2 µmol (51.2 µg) のDMBAを塗布してイニシエートした。その7日後に、第1群のマウスは、0.2 mLのアセトンに溶解した5 µg TPAで1週間に3回2週間、次いで100 µLのシクロヘキサンのみで1週間に3回プロモートした；第2群のマウスは、100 µLのシクロヘキサンのみで1週間に3回プロモートした；第3群のマウスは、0.2 mLのアセトンに溶解した5 µg TPAで1週間に3回プロモートした；第7群のマウスは、0.2 µLのアセトンで1週間に3回プロモートした。第4群は、常法通りにアセトンで

イニシエートし、TPAでプロモートした。第5群は、無処置対照とした。第6群は、DMBAでイニシエートし、第1群と同様、ただしTPAでの2週間だけのプロモートを施した。各群のマウスは20匹であった。試験は45週間にわたった。死亡は非常に少なく、各群で1～3匹であった。

DMBAに次いでTPAを塗布したこの試験の陽性対照群では、全例に局所の腫瘍が認められた。第3群の結果は、第1群の結果との比較で興味のあるものであった（シクロヘキサンの有無の違い以外は同じ処置）。シクロヘキサンのみ塗布した群（プロモーション無し）を設けなかったことが悔やまれる。残念なことに、オルニチンデカルボキシラーゼ活性は、シクロヘキサンの処置動物のみで測定されていた；これはすべての処置群で測定すべきであった。

著者はこの試験から、シクロヘキサンは弱い発がんプロモーター、とくにステージII発がんプロモーターとして作用すると結論している。しかし、この試験の結果および方法が不明確であることを考えると、この試験の意義に疑問が残る。

62～1,000 µg/mLの範囲のシクロヘキサンについて実施した、SA7/SHE系を用いる細胞形質転換テストの結果は陰性であった（Heidelberger et al., 1983）。いずれの濃度でも細胞形質転換は認められなかった。

がん原性のまとめ

シクロヘキサンの遺伝毒性を示唆するデータはなかった。シクロヘキサンに弱いプロモーション活性があるような報告もあるが、それは疑問の残る報告であった。通常の2年間のがん原性試験はないが、シクロヘキサンにはがん原性はないと考えられる。

4.1.2.9 生殖毒性

4.1.2.9.1 二世世代生殖毒性試験（ラット）

ラットにおける二世世代生殖毒性試験が、90日間吸入毒性試験と同じ手順で行われている（Haskell Laboratory, 1997e）。1群雌雄各30匹のラットを、交配10週間前から妊娠期間を経て授乳期間終了までの間、1日6時間、1週間に5日間、0、500、2,000および7,000 ppm（0、1,720、6,880および24,080 mg/m³）のシクロヘキサンにチャンバー内で曝露した。曝露開始時のラットの日齢は、P1世代でおおよそ56日、F1で26～28日であった。曝露期間は、P1では交配10週間前からと殺までの間、F1では交配11週間前からと殺までの間であった。妊娠した雌については、妊娠21日から授乳4日までの間は曝露しなかった。授乳5日から離乳までの新生仔は、母乳を介してのみ曝露され得る状態にあった。分娩後（PP）25日に、1群雌雄

各30匹のF1を選択して次世代の繁殖用とし、交配前11週間および妊娠期間中曝露を行った。受胎能に関するパラメータを算出した。各曝露濃度群雌雄各20匹のF1およびF2離乳仔を選択し、肉眼的剖検に供した。すべての親動物は出産後に肉眼的病理学的剖検に供して、雄では精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、凝固腺および下垂体、雌では卵巣、子宮、子宮頸部、膈および下垂体を採取した。7,000 ppm群から採った組織については病理組織学的検査を実施し、さらに全群の成熟動物で肉眼的病変および標的臓器の病理組織学的検査を行った。この試験はEPAおよびOECDのGLPに従って行われた。

500 ppm以上の群で、曝露期間中に刺激に対して反応が低下する例が増加し、この変化は2,000 ppm以上の曝露群で有意であった（500 ppm群では235日間の処置中、反応の低下が7回観察されたのみ）。7,000 ppm群では主要な影響が、体重、体重増加率および飼料効率に認められた。すなわち：

- ・ F1の雄における平均体重の減少；
- ・ F1の雄における試験1～120日の全期間の平均体重増加率の減少；
- ・ P1およびF1の雌の交配前の期間（その期間の終了時に）における体重減少；
- ・ P1およびF1の雌の交配前の期間（試験1～71日の全期間）および妊娠期間における平均体重増加率の減少；
- ・ 7,000 ppm群のP1雌の妊娠期間を通じての平均体重の統計学的に有意な減少。しかし、この群では妊娠期間全体の平均体重増加率に統計学的な有意差はなく、この妊娠期間の体重減少は、交配前期間に生じた低体重によるものと思われた（Table 4.15参照）。同じ所見がF1でも認められている（Table 4.16参照）；
- ・ P1およびF1の雌の授乳期間中の平均飼料効率の低下；
- ・ P1の雌の授乳期間中の摂餌量の減少；
- ・ F1の雌の授乳期間中の平均体重の減少。

生殖機能への影響は、7,000 ppm群のF1およびF2でみられた平均体重の減少のみであった。この所見は分娩後7～25日において統計学的に有意であった。この期間中仔動物は母乳のみを摂取しており（曝露は分娩5日から離乳まで）、そのためこの影響は授乳を介したシクロヘキサン曝露によるものと考えられた。7,000 ppm群のP1およびF1の成熟動物で前立腺の炎症がわずかに増加したが、その程度は軽度であり、この系統では一般的に認められるとの報告もあるため、偶発的な変化と思われた。また、7,000 ppm群のF1で、生存仔数の割合についてわずかではあるが有意な減少がみられた。しかし、その値が背景データの範囲内であること、また用量相関がみられないことを考慮すると、この変化も偶発的な変化と考えられた（Table 4.17）。

Table 4.15 Mean body weights and mean body weight gains (g) of P1 female rats during gestation

Concentration	0	500	2,000	7,000
Gestation days	Mean body weight			
0	288.4 (27.4)	288.2 (24.3)	286.3 (23)	268.6 (24.2) *
7	308.7 (29.9)	310.8 (22.6)	307 (23)	285.2 (24.5) *
14	333.6 (31.7)	334.6 (23.4)	329.6 (24.7)	307.9 (27.8) *
21	418.4 (42.7)	421.6 (25.9)	415.8 (28.8)	391.1 (31.2) *
Gestation days	Mean body weight gain			
0-7	20.3 (5.9)	22.6 (6.6)	20.7 (7.4)	16.6 (6.9)
7-14	24.9 (5.9)	23.9 (5.2)	22.6 (5)	22.7 (6.9)
14-21	84.9 (18.9)	86.9 (12.3)	86.2 (17.1)	83.1 (10.2)
0-21	130.0 (23.9)	133.4 (14.3)	129.5 (21.6)	122.5 (13.9)

Standard deviation is reported in parentheses

* Statistically significant difference from control ($p \leq 0.05$) by one-way analysis of variance and Dunnett's test

Table 4.16 Mean body weights and mean body weight gains (g) of F1 female rats during gestation

Concentration	0	500	2,000	7,000
Gestation days	Mean body weight			
0	301.5 (28.4)	300.5 (30.3)	310 (33.3)	277.7 (27.6) *
7	328.3 (31.9)	325.7 (31.7)	333.7 (35)	299.3 (26.5) *
14	355.2 (33.8)	354.5 (32.8)	363.3 (36.4)	328 (25.2) *
21	445.2 (34.7)	439.6 (35.7)	460.5 (42.1)	415.6 (32.8) *
Gestation days	Mean body weight gain			
0-7	26.8 (5.3)	25.3 (5.8)	23.8 (6.9)	21.6 (5.2) *
7-14	26.8 (9.5)	28.8 (6.2)	31.3 (4.6)	28.7 (4.7)
14-21	90.1 (15.2)	85 (21.7)	96.7 (16.2)	87.6 (16.2)
0-21	143.7 (19.8)	139.1 (24.4)	150.5 (21)	137.9 (17.3)

Standard deviation is reported in parentheses

* Statistically significant difference from control ($p \leq 0.05$) by one-way analysis of variance and Dunnett's test

Table 4.17 Mean pup numbers and survival : F1 generation

Concentration (ppm)	0	500	2,000	7,000
Survival (%)				
Sex ratio (males)	0.5	0.55	0.46	0.5
Gestation index ^{a)}	100	96.3	100	96.4
Mean % born alive	100	96.3	99	98.1 *
0-4 Day viability	97.9	99.2	99.3	99.3
Lactation index ^{b)}	100	99.5	100	99.5
Litter survival ^{c)}	100	100	100	100

a) Percentage litters delivered having at least one live pup

b) Mean percent survival from day 4 post culling to day 25

c) Percentage litters born with at least one pup alive on day 25

* Statistically significant difference from control ($p \leq 0.05$) by Jonckheere's test

No statistically significant differences from control in gestation index or litter survival ($p \leq 0.05$) by Cochran-Armitage test

この試験においては、全身毒性についてのNOAELは、500 ppm (1,720 mg/m³) と推算された (2,000 ppm以上でみられた鎮静作用に基づく)。生殖毒性についてのNOAELとしては、7,000 ppm群でみられた仔動物の体重減少に基づき (同時に親動物への毒性が認められている)、2,000 ppm (6,880 mg/m³) という値が得られた。

4.1.2.9.2 発生毒性試験

ラット

シクロヘキサンを吸入曝露した際の発生毒性を検討するための予備試験が、ラットを用いて行われている (Haskell, 1997c)。1群8匹とした妊娠CrI:CD BRラットの4群を設け、妊娠7～16日に0、3,000、6,000および9,000 ppm (0、10,320、20,640および30,960 mg/m³) のシクロヘキサンに全身曝露した (妊娠1日は交尾確認日)。母動物を妊娠22日にと殺して剖検し、着床数および吸収数を計数し、その相対的位置を記録した。また、胎仔の重量を測定し、外表検査を行った。この試験は、EPAおよびOECDのGLPに従って行われた。

母動物に対する影響は、6,000 ppm以上の群でみられた曝露期間中の全体的な体重増加量および摂餌量の減少、音刺激に対する反応の低下のみであった。胎仔に影響は認められなかった。本試験では、母動物に対するNOAELは3,000 ppm (10,320 mg/m³) であり、胎仔に対するNOAELは9,000 ppm (30,960 mg/m³) であると推定された。

この試験は、より完備した試験を実施するための用量設定試験であった (本試験は同じ曝露手順による90日間吸入毒性試験で行われている)。本試験では、1群25匹の妊娠CrI:CD BRラットを、妊娠7～16日 (妊娠1日は交尾確認日) に0、500、2,000および7,000 ppm (0、1,720、

6,880および24,080 mg/m³) のシクロヘキサンに全身曝露した (Haskell Laboratory 1997d) 。母動物を妊娠22日にと殺して剖検し、着床を状態別に計数してその相対的位置を記録した。生存胎仔について、体重測定、性別確認、外観、内臓および骨格検査を行った。

シクロヘキサンの影響は母動物のみに認められ、それは以下に示すものであった：

- ・ 対照と比較して黄体数の変化を伴わない着床数のわずかな、しかし有意な減少。この所見は着床前死亡のわずかな増加と整合するものであり、着床前の時期には曝露は行っていないために、シクロヘキサンの曝露に関連するものではないと考えられる。さらに、この影響は同じ用量で行ったラットにおける二世代試験ではみられていない；
- ・ 曝露期間を通じての全体的な体重増加量および摂餌量の統計学的に有意な減少；
- ・ 2,000 ppm以上の群における、曝露中、すなわち曝露チャンバー内での音刺激に対する反応の減少または消失。

この試験における母動物に対するNOAELは、500 ppm (1,720 mg/m³) であり、胎仔に対するNOAELは、毒性がみられなかったことから7,000 ppm (24,080 mg/m³) であると推定された。

ウサギ

ウサギに対するシクロヘキサンの吸入曝露による発生毒性の予備試験が行われている (Haskell, 1997a) 。1群8匹からなる妊娠New Zealand Whiteウサギの4群を設け、妊娠7～19日 (妊娠0日は交尾確認日) に0、500、2,000および7,000 ppm (0、1,720、6,880および24,080 mg/m³) のシクロヘキサンに全身曝露させた。母動物を妊娠29日にと殺して剖検し、着床数および吸収数を計数し、その相対的位置を記録した。また、胎仔の重量を測定し、外表検査を行った。この試験は、EPAおよびOECDのGLPに従って行われた。

認められた影響は、7,000 ppm群にみられた早期吸収のわずかだが有意な増加のみであった。しかし、この増加は背景データの範囲内のものであり、しかもこの試験の対照群の値は非常に低いものであり、また、本試験ではこの変化はみられていない (下記) 。したがって、この変化は生物学的変動によるものと考えられる (これについては他の試験やより完備した試験と比較する必要がある) 。

上記のは予備試験であり、より多項目に及ぶ試験 (Haskell Laboratory, 1997b) がこれと同じ曝露手順で行われた。本試験では、1群20匹からなる妊娠ウサギの4群を、妊娠6～18日 (妊娠0日は交尾確認日) に、上記と同濃度 [0、500、2,000および7,000 ppm (0、1,720、6,880および24,080 mg/m³)] で全身曝露させた。母動物を妊娠29日にと殺して剖検した。着床を

状態別（生存/死亡胎仔、吸収胚）に計数し、その相対的位置を記録した。生存胎仔について、体重測定、性別確認、外表、内臓および骨格検査を行った。

母動物に対する影響は、2,000および7,000 ppm群でみられた黄体数のわずかな減少のみであった。しかし、その変動は、背景データの範囲内であった。しかも、この変化は曝露以前に生じたものであるために、シクロヘキサンへの曝露とは関連付けることができなかった。シクロヘキサン曝露による全身毒性は認められなかった。胎仔にも影響は認められなかった。この試験においては、母動物および胎仔の両方に対するNOAELは、7,000 ppm (24,080 mg/m³) と推定された。

4.1.2.9.3 生殖発生毒性のまとめ

二世世代試験では、生殖に関連するパラメータに変化は認められなかった。7,000 ppm 群で仔動物の体重に減少がみられたが、これは母動物に対する軽度の毒性が反映されたものであった。仔動物に対する NOAEL は 2,000 ppm (6,880 mg/m³) であり、母動物に対する NOAEL は 500 ppm (1,720 mg/m³) であると判断された。

ラットおよびウサギを用いた 2 件の発生毒性試験では、いずれも胎仔に対する毒性は示されなかった。毒性は母動物においてみられ、それは他の試験で認められたもの（催眠作用）と同じであった。これらの試験で設定された最高用量 [7,000 ppm (24,080 mg/m³)] が胎仔に対する NOAEL であり、500 ppm (1,720 mg/m³) が母動物に対する NOAEL であると考えられた。

Table 4.18 Summary of reproductive toxicity studies

Fertility			
Species	Administration protocol	Objectives of the tests	NOAEL
Rat	inh. 90 d	two-generation study	dams: 500 ppm (1,720 mg/m ³) pups: 2,000 ppm (6,880 mg/m ³)
Developmental toxicity study			
Species	Administration protocol	Objectives of the tests	NOAEL
Rat	inh. gestational day 7-16		dams: 3,000 ppm (10,320 mg/m ³) pups: > 3,000 ppm (10,320 mg/m ³)
Rat	inh. gestational day 7-16		dams: 500 ppm (1,720 mg/m ³) pups: > 7,000 ppm (24,080 mg/m ³)
Rabbit	inh. gestational day 7-19		dams: 7,000 ppm (24,080 mg/m ³) pups: > 7,000 ppm (24,080 mg/m ³)