

試験報告書

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0749

2010年 1月19日

日本バイオアッセイ研究センター

表題

ビス(2・メルホリノエチル)＝エーテルのラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験目的

ビス(2・メルホリノエチル)＝エーテルを雌のラットに 1 回、強制経口投与し、急性毒性に関する情報を得ることを目的とした。

試験法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン 423「Acute Oral Toxicity—Acute Toxic Class Method」(1996 年 3 月 22 日採択、2001 年 12 月 17 日改訂) に基づいて実施した。

GLP 対応

本試験は、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997) を適用した。

動物福祉

本試験は、平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」及び平成 18 年 11 月 27 日付け、日本バイオアッセイ研究センター制定「動物実験に関する指針」を遵守した。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で承認された。

試験委託者

経済産業省製造産業局化学物質管理課
東京都千代田区霞ヶ関 1-3-1

試験施設及び運営管理者

日本バイオアッセイ研究センター
[REDACTED]
神奈川県秦野市平沢 2445

試験日程

試験開始日		2009年9月24日
動物導入日		2009年9月29日
被験物質投与日	第1段階	2009年10月6日
	第2段階	2009年10月10日
	第3段階	2009年10月14日
解剖終了日	第1段階	2009年10月20日
	第2段階	2009年10月24日
	第3段階	2009年10月16日
試験終了日		2010年1月19日

試験関係者一覧

試験責任者	:	██████████ (試験管理部)
報告書案作成者	:	██████████ (試験管理部)
被験物質の管理・分析	:	██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
被験物質投与液の 調製・投与	:	██████████ (試験管理部)
動物管理	:	██████████ (試験管理部)
		██████████ (試験管理部)
病理検査	:	██████████ (病理検査部)
		██████████ (病理検査部)
		██████████ (病理検査部)
試験情報管理	:	██████████ (企画調整部)
		██████████ (企画調整部)

試資料の保管

試験計画書、標本、生データ、被験物質、記録文書、最終報告書、信頼性保証証明書、その他本試験に係る資料は、試資料保管施設に保管する。なお、被験物質は 50g を保管した。

保管期間は、最終報告書提出後、原則として 10 年間とする。ただし、この期間にあっても被験物質及び標本については品質が評価に耐え得る期間の保管とする。

試験責任者（最終報告書作成者）の署名、捺印及び日付

試験管理部



2010年 1月 19日

陳 述 書

試験名：ビス(2-メルホリノエチル)エーテルのラットを用いた急性経口投与毒性試験

本試験は、試験計画書に基づき、また、平成 15 年 11 月 21 日付け、薬食発第 1121003 号、平成 15・11・17 製局第 3 号、環保企発第 031121004 号、厚生労働省医薬食品局長、経済産業省製造産業局長、環境省総合環境政策局長連名通知「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用して実施された。

本報告書はその試験結果に基づいてまとめられたものに相違ありません。

日本バイオアッセイ研究センター

試験責任者

2010 年 1 月 19 日

運営管理者

2010 年 1 月 19 日

目 次

	頁
本文	
I 要約	2
II 材料・方法	3
1. 被験物質及び媒体	3
1.1 被験物質の名称等	3
1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量	3
1.3 被験物質の物理化学的性状等	3
1.4 被験物質の使用ロット等	3
1.5 被験物質の同一性	4
1.6 被験物質の安定性	4
1.7 媒体	4
2. 投与	4
2.1 投与方法	4
2.2 投与用量及び投与液量	4
2.3 被験物質投与液の調製方法	5
2.4 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性	5
3. 動物	5
3.1 試験動物	5
3.2 群の構成と動物数	6
3.3 群分け方法	6
3.4 動物の個体識別	6
3.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別	6
3.6 投与时週齢	6
3.7 飼育条件	7
1) 飼育環境	7
2) 飼料	7
3) 飲水	7
4. 観察・検査	7
4.1 一般状態の観察	7
4.2 体重測定	8
4.3 剖検	8
4.4 臓器の採取、保存	8
4.5 投与未実施動物	8
5. 試験成績の信頼性への影響	8

III 試験成績	9
1. 死亡状況	9
2. 一般状態	9
3. 体重	9
4. 剖検	9
IV 考察	10
V 文献	11

FIGURE & TABLES

Figure 1	The flow chart of test procedure and GHS category	13
Table 1	Mortality of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in acute oral toxicity test - acute toxic class method	14
Table 2	Clinical signs of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in acute oral toxicity test - acute toxic class method	15
Table 3	Body weight changes of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in acute oral toxicity test - acute toxic class method	16
Table 4	Necropsy findings of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether in acute oral toxicity test - acute toxic class method	17

APPENDICES

Appendix 1	Identity of bis(2-morpholinoethyl)ether	19
Appendix 2	Stability of bis(2-morpholinoethyl)ether	21
Appendix 3	Concentration of test sample (bis(2-morpholinoethyl)ether)	23
Appendix 4	Homogeneity of test sample (bis(2-morpholinoethyl)ether)	25
Appendix 5	Clinical signs (Individual)	27
Appendix 6	Body weights (Individual)	34
Appendix 7	Necropsy findings (Individual)	38

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0749

本文

I 要約

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの急性経口毒性を検討するために、OECD化学品テストガイドライン 423「Acute Oral Toxicity－Acute Toxic Class Method」¹⁾に基づき、試験を実施した。

動物は CrI:CD(SD)ラットの 8 週齢または 9 週齢の雌を使用した。投与は 1 投与段階 (1 群) につき 3 匹を用いて、300 mg/kg の投与量で 2 段階、2000 mg/kg の投与量で 1 段階実施した。

第 1 段階及び第 2 段階の 300 mg/kg の投与による死亡はなく、第 3 段階の 2000 mg/kg の投与で 3 例全てが死亡した。300 mg/kg では一般状態、体重推移及び剖検での異常は認められなかった。2000 mg/kg では投与約 5 時間後から接触時の過敏 (硬直、発声) 等の異常が観察され、1 例は投与翌日に、2 例は投与 2 日後に死亡した。死亡時の剖検では 3 例の肺に赤色斑が認められた。

300 mg/kg の投与量では死亡がなく、2000 mg/kg の投与量では 3 例全てに死亡がみられたことから、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルは、GHS (Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures) における急性毒性の等級として Category 4 (>300-2000 mg/kg)に分類される。

II 材料・方法

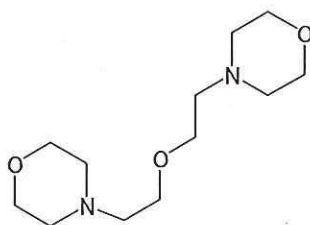
1. 被験物質及び媒体

1.1 被験物質の名称等

名 称 : ビス(2・モルホリノエチル)＝エーテル
Bis(2-morpholinoethyl)ether
別 名 : ビス[2・(N・モルホリノ)エチル]エーテル
CAS No. : 6425-39-4

1.2 被験物質の構造式、分子式及び分子量

構 造 式 :



分 子 式 : $C_{12}H_{24}N_2O_3$

分 子 量 : 244.33

1.3 被験物質の物理化学的性状等²⁾

性 状 : 無色透明の液体

沸 点 : 309℃

融 点 : -28℃

溶 解 性 : 水に可溶

保管条件 : 室温かつ遮光

1.4 被験物質の使用ロット等

使用ロット番号 : [REDACTED]

製 造 元 : [REDACTED]

純 度 : 94.8% ([REDACTED] 検査成績書データ)

1.5 被験物質の同一性 (Appendix 1)

被験物質の同一性は、赤外分光光度計 (Shimadzu FTIR-8200PC) を用いて測定した赤外吸収スペクトルを文献値³⁾と比較することで確認した。

その結果、被験物質の赤外吸収スペクトルが文献値と同じ波数にピークを示したことから、被験物質はビス(2-モルホリノエチル)エーテルであると判断した。

1.6 被験物質の安定性 (Appendix 2)

被験物質の安定性は、使用開始前（投与開始前）と使用終了後（投与動物の飼育観察終了後）に、高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて測定したクロマトグラムを比較することで確認した。

その結果、使用開始前と使用終了後のクロマトグラムに差がみられなかったことから、被験物質はこの期間において安定していたと判断した。

1.7 媒体

名 称： 注射用水（日本薬局方）
製 造 元： 株式会社 大塚製薬工場
ロット番号： 9G70N
保 管 条 件： 室温かつ遮光

2. 投与

2.1 投与方法

投与経路は経口とした。午前 9 時から 12 時の時間帯に胃ゾンデとシリンジを用いて 1 回の強制経口投与を実施した。

投与動物は、投与前日の 16 時以降から投与後約 3 時間まで絶食させた。

2.2 投与用量及び投与液量

被験物質の急性毒性に関する情報が得られなかったため、第 1 段階の投与用量を OECD 化学品テストガイドライン 423 ¹⁾ で推奨されている 300 mg/kg とした。第 2 段階以降の投与用量は、前投与段階の投与 3 日後までの生死状況をもとに、Figure 1 に示したフローチャートに従い決定した。

第 1 段階の 300 mg/kg で投与 3 日後までに死亡が認められなかったため、第 2 段階の投与用量も 300 mg/kg とした。第 2 段階の投与でも死亡がみられなかったため、第 3 段階の

投与用量を 2000 mg/kg とした。2000 mg/kg の投与で 3 匹全てに死亡が認められたため、第 4 段階は実施しなかった。

投与液量は体重 1kg 当り 5 mL とし、投与日の投与直前に測定した体重をもとに個体別に算出した。

2.3 被験物質投与液の調製方法

秤量した被験物質に注射用水を加えて攪拌し、第 1 段階及び第 2 段階では 60 mg/mL、第 3 段階では 400 mg/mL の濃度 (wt/vol) になるように調製した。被験物質は注射用水に溶解した。投与液は投与日の投与前に調製した。

2.4 被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性 (Appendix 3, 4)

被験物質調製液中の被験物質の濃度及び均一性は、第 1 段階の投与前に上記調製方法で作製した調製液を用いて確認した。OECD 化学品テストガイドライン 423¹⁾で規定されている 5 mg/kg、50 mg/kg、300 mg/kg 及び 2000 mg/kg の投与用量、すなわち濃度 (wt/vol) に換算して 1 mg/mL、10 mg/mL、60 mg/mL 及び 400 mg/mL の被験物質調製液を作製し、濃度毎に調製容器内の調製液を 7 点サンプリングし、それぞれの被験物質濃度を高速液体クロマトグラフ (Agilent Technologies 1090) を用いて測定した。

その結果、被験物質調製液における 7 点の平均濃度は各設定濃度に対して 103~106% の範囲にあり、7 点における濃度のばらつきは変動係数 0.38~1.23% の範囲にあった。

3. 動物

3.1 試験動物

動物は日本チャールス・リバー(株) (神奈川県横浜市港北区新横浜 3-17-6) 筑波飼育センター生産の CrI:CD(SD)ラット (SPF) の雌を使用した。

この動物を選出した理由は、毒性試験で一般的に使用され背景データが豊富な動物種及び系統であること、また OECD 化学品テストガイドライン 423¹⁾で雌動物が推奨されていることによる。

雌 23 匹を 7 週齢で導入し、導入日を含む 7 日間を検疫と馴化を兼ねて飼育した。一般状態を毎日観察し、導入日と検疫・馴化終了日 (群分け日) には体重を測定した。

検疫・馴化期間中に一般状態や体重の推移に異常がみられなかった動物の中から、体重の中央値に近い雌 18 匹を試験動物として選定した (群分け時体重範囲、206~230g)。

選定されなかった雌 5 匹は群分け後に安楽死させた。

3.2 群の構成と動物数

群の構成は6群（6投与段階）とし、1群当たり3匹の動物数とした。

群名称（投与段階）	投与用量	動物数（動物番号）
第1段階	300 mg/kg	3匹（2001～2003）
第2段階	300 mg/kg	3匹（2101～2103）
第3段階	2000 mg/kg	3匹（2201～2203）
第4段階	投与未実施 ^{a)}	3匹（2301～2303）
第5段階	投与未実施 ^{a)}	3匹（2401～2403）
第6段階	投与未実施 ^{a)}	3匹（2501～2503）

^{a)} 第3段階までの投与でGHSに定められた急性毒性の等級が決定したため、第4段階以降の投与は実施しなかった。

3.3 群分け方法

群分けは、第1段階の投与前日に群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）⁴⁾で行った。18匹の試験動物のうち、初めに体重値の大きい動物から順に各群に1匹ずつ無作為に割り当て、二巡目以降は各群の動物の合計体重を比較し、値の小さい群から順に体重値の大きい動物を割り当てた。

3.4 動物の個体識別

動物の個体識別は尾に油性マーカーで色素塗布する方法で行った。ケージには個体識別番号を記したラベルを付した。

3.5 使用飼育室及び他試験・異種動物との区別

動物はバリア区域内の独立した飼育室（714室）に収容し、室入口の扉に試験番号、動物種及び動物番号を表示し、他試験及び異種動物と区別した。

3.6 投与時週齢

投与時の週齢は第1段階及び第2段階では8週齢、第3段階では9週齢であった。

3.7 飼育条件

1) 飼育環境

飼育室の環境条件及び使用したケージ等を以下に示した。飼育室の温度と湿度は実測値の範囲を＜＞内に示した。

温度：23±2℃ ＜23.0－23.3℃＞

湿度：55±15% ＜50－54%＞

明暗サイクル：12 時間点灯(8:00～20:00)／12 時間消灯(20:00～8:00)

換気回数：15～17 回／時

ケージへの動物の収容方法：単飼

ケージの材質・形状・寸法：

ステンレス製 2 連網ケージ (170(W)×294(D)×176(H) mm／匹)

飼育器材の滅菌方法：

飼育器材（ラック・ケージ・餌箱・給水ノズル・作業台車・トレイ等）は、オートクレーブを用いて滅菌（約 120℃、15 分以上）した。

2) 飼料

飼料は、オリエンタル酵母工業(株)（東京都板橋区小豆沢 3-6-10）千葉工場生産の CRF-1 固型飼料（30KGγ-γ線照射滅菌飼料、Lot No.090805）を使用し、固型飼料給餌器により自由摂取させた。ただし、投与前日の 16 時以降、投与後約 3 時間まで絶食させた。

使用した飼料の栄養成分と夾雑物の分析データは、オリエンタル酵母工業(株)から入手し保管した。夾雑物の分析結果については、試験計画書に規定した許容基準と照合して異常のないことを確認した。

3) 飲水

飲水は市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

飲水の水質は、試験施設として実施している飲水の定期サンプリングによる水質検査結果を、水道法を参考にして試験計画書で規定した項目及び許容基準と照合して、異常のないことを確認した。水質検査は、(財)食品薬品安全センター秦野研究所（神奈川県秦野市落合 729-5）に依頼し、その結果は保管した。

4. 観察・検査

4.1 一般状態の観察

投与前の動物については、毎日 1 回、一般状態の観察を行った。

投与した動物については、投与日（観察 1 日）は投与後約 1 時間継続して観察し、その

後は約 1 時間ごとに投与後約 6 時間まで観察した。観察 2 日以降の 14 日間は、毎日 1 回または 2 回の観察を行った。

4.2 体重測定

投与した動物については、投与日の投与直前、その後は観察 2、4、8、11 及び 15 日に体重を測定した。死亡した動物は搬出時にも体重を測定した。

4.3 剖検

投与した全ての動物を剖検し、肉眼による観察を行った。死亡した動物は搬出後に速やかに、生存した動物は観察 15 日に剖検した。生存した動物はエーテル麻酔下で開腹後、腹大動脈切断により放血・致死させてから肉眼による観察を行った。

4.4 臓器の採取、保存

剖検した動物については、下記に示した臓器・組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺（左肺に固定液を注入した）、骨髓（大腿骨）、リンパ節（腋窩・鼠径等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、卵巣、子宮、膣、乳腺、脳、脊髓、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）

4.5 投与未実施動物

投与に使用しなかった第 4 段階以降の動物は、第 2 段階の動物の搬出（投与した全ての動物の飼育観察終了）後、実験動物技術研修用として有効利用した。

5. 試験成績の信頼性への影響

試験計画書と実施内容に不整合は認められなかった。また、試験成績の信頼性に影響を及ぼすような飼育環境等の異常は認められなかった。

Ⅲ 試験成績

1. 死亡状況 (Table 1) (Appendix 5)

300 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物計 6 例に死亡は認められなかった。

2000 mg/kg を投与した第 3 段階の動物 3 例のうち、1 例は観察 2 日（投与翌日）に、2 例は観察 3 日に死亡が認められた。

2. 一般状態 (Table 1, 2) (Appendix 5)

300 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に一般状態の異常は認められなかった。

2000 mg/kg を投与した第 3 段階の動物 3 例には投与約 5 時間後から一般状態の異常が観察された。3 例に共通した所見は、接触時の過敏（硬直、発声）、眼血性分泌物、鼻血性分泌物及び無糞であった。3 例の死亡までの経過を下記に示した。

動物番号 2201：投与約 5 時間後から接触時の過敏（硬直、発声）、眼血性分泌物及び鼻血性分泌物が観察され、投与約 6 時間後には不整呼吸も認められた。翌日の観察でも接触時の過敏（硬直、発声）、鼻血性分泌物及び不整呼吸は継続してみられ、その他に流涎及び自発運動減少も認められた。また、糞尿受けトレイ上には糞粒が認められなかった。本例は観察 3 日の朝に死亡が確認された。死体には流涎と鼻血性分泌物の痕跡が認められた。

動物番号 2202：投与約 5 時間後から接触時の過敏（硬直、発声）が観察された。翌日の観察でも接触時の過敏（硬直、発声）は継続してみられ、その他に眼血性分泌物、不整呼吸及び自発運動減少が認められた。また、糞尿受けトレイ上には糞粒が認められなかった。本例は観察 3 日の朝に死亡が確認された。死体には鼻血性分泌物の痕跡が認められた。

動物番号 2203：投与約 5 時間後から接触時の過敏（硬直、発声）、眼血性分泌物、挙尾及び流涎がみられ、投与約 6 時間後には挙尾を除く所見が観察された。本例は観察 2 日の朝に死亡が確認された。糞尿受けトレイ上には糞粒が認められなかった。死体には眼血性分泌物、流涎及び鼻血性分泌物の痕跡が認められた。

3. 体重 (Table 3) (Appendix 6)

300 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に体重推移の異常は認められなかった。

2000 mg/kg を投与した第 3 段階の動物は、3 例ともに投与翌日（観察 2 日）に体重減少が認められた。

4. 剖検 (Table 4) (Appendix 7)

300 mg/kg を投与した第 1 段階と第 2 段階の動物に異常は認められなかった。

2000 mg/kg を投与して死亡した第 3 段階の 3 例には、肺に赤色斑が認められた。

IV 考察

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルは工業用中間体であり、発泡剤などとして使用されている⁵⁾。本化合物の急性毒性に関する情報は得られていない。

本試験の結果、第1段階及び第2段階の300 mg/kgの投与による死亡はなく、第3段階の2000 mg/kgの投与で3例全てが死亡した。300 mg/kgでは一般状態、体重推移及び剖検での異常は認められなかった。2000 mg/kgでは投与約5時間後から接触時の過敏（硬直、発声）等の異常が観察され、体重は減少し、1例は投与翌日に、2例は投与2日後に死亡した。死亡時の剖検では3例の肺に赤色斑が観察された。

以上のことから、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルのラットのLD₅₀値は300 mg/kg以上、2000 mg/kg未満であると推定される。

ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの類縁物質である4-エチルモルホリンのラットを用いた急性毒性試験報告⁶⁾では、4-エチルモルホリンの500、1000、1500及び2000 mg/kgをラットに強制経口投与した結果、500 mg/kgの投与量では死亡や一般状態の異常はみられなかったが、1000 mg/kg以上の投与量で投与直後に間代性ないし強直性痙攣が観察され、雄は1500 mg/kg以上、雌は1000 mg/kgと2000 mg/kgの投与量で死亡が認められた。また、死亡例の剖検では腺胃粘膜の浮腫様肥厚や赤色部が観察されている。ラットのLD₅₀値は、雄では1500～2000 mg/kg、雌では2000 mg/kg付近と推定されている。

このようにビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルの致死量は4-エチルモルホリンの値に類似していたが、一般状態所見や剖検所見には違いがみられた。ただし、4-エチルモルホリンの28日間反復経口投与毒性試験⁷⁾では、800 mg/kgを投与したラットは接触に対する反応がやや過敏となり、ハンドリング時に発声する個体が増加したと報告されている。反復投与でみられたこれらの異常は本試験の死亡例にみられた異常に類似していた。

300 mg/kgの投与量では死亡がなく、2000 mg/kgの投与量では3例全てに死亡がみられたことから、ビス(2-モルホリノエチル)＝エーテルは、GHSにおける急性毒性の等級としてCategory 4 (>300-2000 mg/kg)に分類される。

V 文献

- 1) OECD. 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals 423 “Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method” , Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development.
- 2) 東京化成工業株式会社. 2009. 「製品安全データシート」. ビス[2-(N-モルホリノ)エチル]エーテル.
- 3) 東京化成工業株式会社. 2009. 赤外吸収スペクトル. ビス[2-(N-モルホリノ)エチル]エーテル.
- 4) 阿部正信. 1986. 長期毒性試験に用いるラット, マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. 薬理と治療 **14** : 7285 - 7302.
- 5) 独立行政法人 製品評価技術基盤機構 提供資料.
- 6) 太田 亮. 2004. 4-エチルモルホリンのラットを用いる単回経口投与毒性試験. 化学物質毒性試験報告. **11** : 247- 250.
- 7) 森村智美. 2004. 4-エチルモルホリンのラットを用いる 28 日間反復経口投与毒性試験. 化学物質毒性試験報告. **11** : 251- 266.

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0749

FIGURE
&
TABLES

Figure 1 The flow chart of test procedure and GHS category

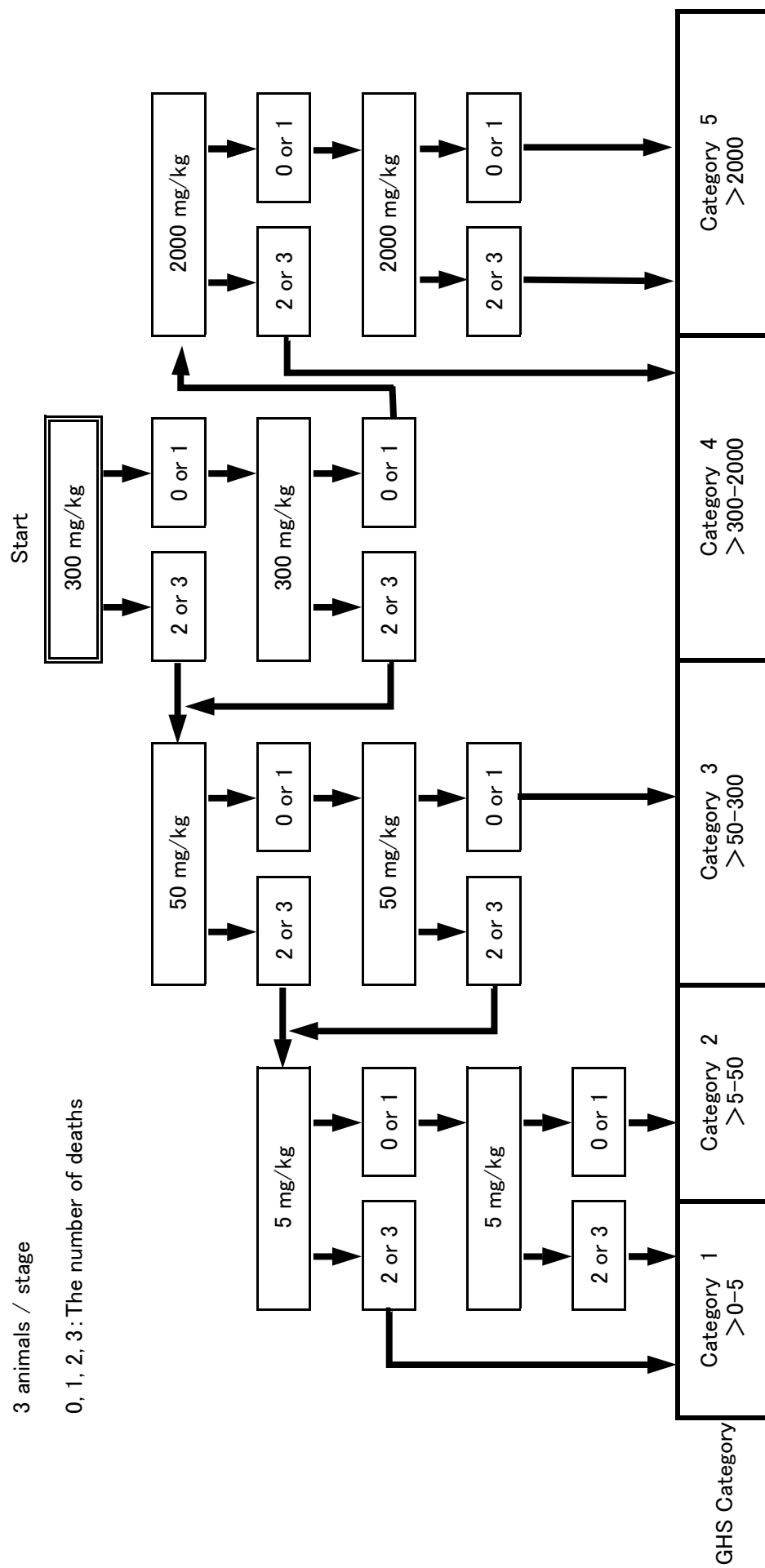


Table 1 Mortality of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether
in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of deaths				
			Day 1	Day 2	Day 3	Days 4 to 14	for 14 days
1st	300	3	0	0	0	0	0
2nd	300	3	0	0	0	0	0
3rd	2000	3	0	1	2	0	3

Table 2 Clinical signs of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether
in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Clinical signs
1st	300	3	No abnormalities detected (3)
2nd	300	3	No abnormalities detected (3)
3rd	2000	3	Increased irritability of touch response; vocalization, rigidity (3) Reddish tear (3) Nasal hemorrhagic discharge (3) No-feces (3) Irregular respiration (2) Decreased locomotor activity (2) Salivation (2) Straub tail (1) Death (3)

Parentheses represent the number of animals.

Table 3 Body weight changes of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether
in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Days	Body weights (g)					
				1	2	4	8	11	15
1st	300	3		194 ± 10	215 ± 6	222 ± 13	236 ± 17	243 ± 17	250 ± 21
2nd	300	3		207 ± 8	226 ± 7	235 ± 9	248 ± 10	260 ± 14	276 ± 14
3rd	2000	3		217 ± 13	211 ± 13 ^{a)}	—	—	—	—

Data represent mean ± S.D.

^{a)} including a dead animal

Table 4 Necropsy findings of female rats treated orally with bis(2-morpholinoethyl)ether
in acute oral toxicity test - acute toxic class method

Administration stage	Dose (mg/kg)	Number of animals	Necropsy findings
1st	300	3	No abnormalities detected (3)
2nd	300	3	No abnormalities detected (3)
3rd	2000	3	Lung : red zone (3)

Parentheses indicate the number of animals.

ビス(2-メルホリノエチル)＝エーテルの
ラットを用いた急性経口投与毒性試験

試験番号：0749

APPENDICES

Appendix 1

Identity of
bis(2-morpholinoethyl)ether

IDENTITY OF BIS(2-MORPHOLINOETHYL)ETHER

Test Substance : Bis(2-morpholinoethyl)ether

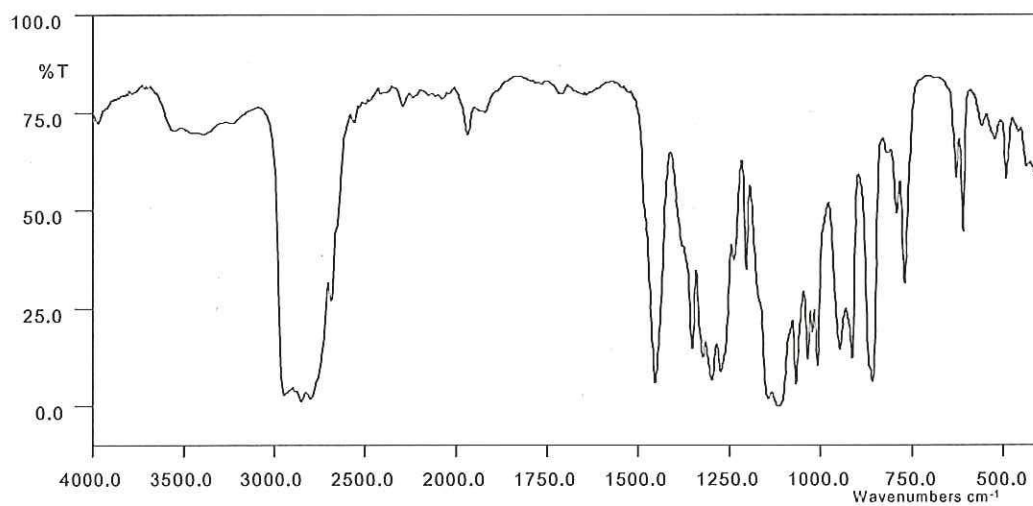
Lot No. :

1. Spectral Data

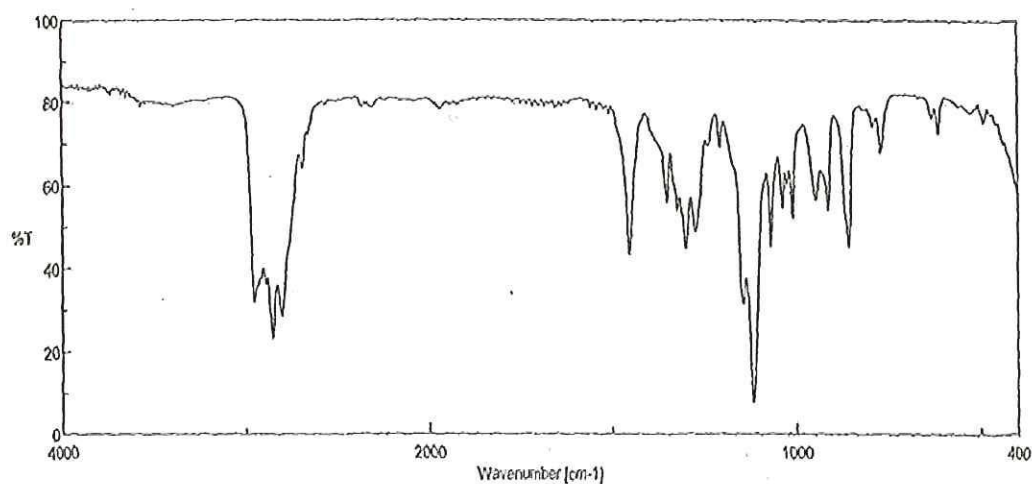
Infrared Spectrometry

Instrument : Shimadzu FTIR-8200PC Infrared Spectrometer

Cell : KBr Liquid Cell

Resolution : 4 cm^{-1} 

Infrared Spectrum of Test Substance



Infrared Spectrum of Literature Data*

Result: The infrared spectrum was consistent with literature spectrum.

2. Conclusion: The test substance was identified as bis(2-morpholinoethyl)ether by infrared spectrum.

Appendix 2

Stability of bis(2-morpholinoethyl)ether

STABILITY OF BIS(2-MORPHOLINOETHYL)ETHER

Test Substance : Bis(2-morpholinoethyl)ether

Lot No. :

1. High Performance Liquid Chromatography

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 90 : 10

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (200 nm)

Injection Volume : 10 μ L

Date Analyzed	Peak No.	Retention Time (min)	Area (%)
2009.10.02	1	1.755	100
2009.10.27	1	1.755	100

Result: High performance liquid chromatography indicated one major peak (peak No.1) analyzed on 2009.10.2 and one major peak (peak No.1) analyzed on 2009.10.27. No new trace impurity peak in the test substance analyzed on 2009.10.27 was detected.

2. Conclusion: The test substance was stable for the period that the test substance had been used for the study.

Appendix 3

Concentration of test sample
(bis(2-morpholinoethyl)ether)

CONCENTRATION OF TEST SAMPLE (BIS(2-MORPHOLINOETHYL)ETHER)

Analytical Method : The samples were analyzed by high performance liquid chromatography.

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 90 : 10

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (200 nm)

Injection Volume : 10 μ L

Date Analyzed	Target Concentration			
	1000 ^a	10000	60000	400000
2009.09.29	1030 ^b (103) ^c	10400 (104)	63600 (106)	414000 (104)

^a μ g/mL^b μ g/mL (Mean measured concentration.)^c % (Mean measured concentration/target concentration \times 100.)

Appendix 4

Homogeneity of test sample
(bis(2-morpholinoethyl)ether)

HOMOGENEITY OF TEST SAMPLE (BIS(2-MORPHOLINOETHYL)ETHER)

Analytical Method : The samples were analyzed by high performance liquid chromatography.

Instrument : Agilent Technologies 1090 High Performance Liquid Chromatograph

Column : L-column ODS (4.6 mm ϕ \times 15 cm)

Column Temperature: 40 °C

Mobile Phase : Acetonitrile : Distilled water = 90 : 10

Flow Rate : 1 mL/min

Detector : UV (200 nm)

Injection Volume : 10 μ L

	Target Concentration			
	1000 ^a	10000	60000	400000
Coefficient of Variation	0.95 ^b	0.73	0.38	1.23

^a μ g/mL^b % (n=7)

Appendix 5

Clinical signs (Individual)

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 1 (Administration day)

Clinical signs (Individual)
1st Stage (300 mg/kg)

PAGE: 1

Approximate time after administration	Animal ID-No. 2001	2002	2003
10 min	NAD	NAD	NAD
20 min	NAD	NAD	NAD
30 min	NAD	NAD	NAD
40 min	NAD	NAD	NAD
50 min	NAD	NAD	NAD
60 min	NAD	NAD	NAD
2 hr	NAD	NAD	NAD
3 hr	NAD	NAD	NAD
4 hr	NAD	NAD	NAD
5 hr	NAD	NAD	NAD
6 hr	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 1 (Administration day)

Clinical signs (Individual)

2nd Stage (300 mg/kg)

PAGE: 3

Approximate time after administration	Animal ID-No. 2101	2102	2103
10 min	NAD	NAD	NAD
20 min	NAD	NAD	NAD
30 min	NAD	NAD	NAD
40 min	NAD	NAD	NAD
50 min	NAD	NAD	NAD
60 min	NAD	NAD	NAD
2 hr	NAD	NAD	NAD
3 hr	NAD	NAD	NAD
4 hr	NAD	NAD	NAD
5 hr	NAD	NAD	NAD
6 hr	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 1 (Administration day)

Clinical signs (Individual)

3rd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 5

Approximate time after administration	Animal ID-No. 2201	2202	2203
10 min	NAD	NAD	NAD
20 min	NAD	NAD	NAD
30 min	NAD	NAD	NAD
40 min	NAD	NAD	NAD
50 min	NAD	NAD	NAD
60 min	NAD	NAD	NAD
2 hr	NAD	NAD	NAD
3 hr	NAD	NAD	NAD
4 hr	NAD	NAD	NAD
5 hr	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, Nasal hemorrhagic discharge	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, Salivation	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, Salivation
6 hr	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, Nasal hemorrhagic discharge, Irregular respiration	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity)	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, Salivation

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749
ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)
SEX : Female
DAY : 2 to 15 days

Clinical signs (Individual)
1st Stage (300 mg/kg)

Observation days	Animal ID-No. 2001	2002	2003
2	NAD	NAD	NAD
3	NAD	NAD	NAD
4	NAD	NAD	NAD
5	NAD	NAD	NAD
6	NAD	NAD	NAD
7	NAD	NAD	NAD
8	NAD	NAD	NAD
9	NAD	NAD	NAD
10	NAD	NAD	NAD
11	NAD	NAD	NAD
12	NAD	NAD	NAD
13	NAD	NAD	NAD
14	NAD	NAD	NAD
15	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749
ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)
SEX : Female
DAY : 2 to 15 days

Clinical signs (Individual)
2nd Stage (300 mg/kg)

Observation days	Animal ID-No. 2101	2102	2103
2	NAD	NAD	NAD
3	NAD	NAD	NAD
4	NAD	NAD	NAD
5	NAD	NAD	NAD
6	NAD	NAD	NAD
7	NAD	NAD	NAD
8	NAD	NAD	NAD
9	NAD	NAD	NAD
10	NAD	NAD	NAD
11	NAD	NAD	NAD
12	NAD	NAD	NAD
13	NAD	NAD	NAD
14	NAD	NAD	NAD
15	NAD	NAD	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

DAY : 2 to 15 days

Clinical signs (Individual)

3rd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 6

Observation days	Animal ID-No. 2201	2202	2203
2	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Nasal hemorrhagic discharge, No-feces, Irregular respiration, Decreased locomotor activity, Salivation	Increased irritability of touch response (vocalization, rigidity), Reddish tear, No-feces, Irregular respiration, Decreased locomotor activity	Death (no-feces, traces of nasal hemorrhagic discharge, reddish tear and salivation)
3	Death (traces of nasal hemorrhagic discharge and salivation)	Death (traces of nasal hemorrhagic discharge)	—
4	—	—	—
5	—	—	—
6	—	—	—
7	—	—	—
8	—	—	—
9	—	—	—
10	—	—	—
11	—	—	—
12	—	—	—
13	—	—	—
14	—	—	—
15	—	—	—

Appendix 6

Body weights (Individual)

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI-CD(SD)

SEX : Female

Body weights (Individual)

1st Stage (300 mg/kg)

PAGE: 1

Observation days	Animal ID-No. 2001	2002		2003	
		Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)
1	205	186		190	
2	221	216	16	209	19
4	237	215	32	215	25
8	256	228	51	225	35
11	262	236	57	231	41
15	275	238	70	238	48

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Body weights (Individual)

2nd Stage (300 mg/kg)

PAGE: 2

Observation days	Animal ID-No. 2101	2102				2103			
		Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)
1	213			210		198			
2	231		18	228	18	218		20	
4	239		26	241	31	225		27	
8	250		37	257	47	237		39	
11	267		54	269	59	243		45	
15	282		69	286	76	260		62	

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Body weights (Individual)

3rd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 3

Observation days	Animal ID-No. 2201	2202		2203	
		Body weight (g)	Body weight gain (g)	Body weight (g)	Body weight gain (g)
1	204			229	
2	196		- 8	215	- 2
< 3 >	194 (Death)		- 10	213 (Death)	- 4
4	-			-	
8	-			-	
11	-			-	
15	-			-	

Appendix 7

Necropsy findings (Individual)

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Necropsy findings (Individual)

1st Stage (300 mg/kg)

PAGE: 1

Animal ID-No.	Findings
2001	NAD
2002	NAD
2003	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Necropsy findings (Individual)

2nd Stage (300 mg/kg)

PAGE: 2

Animal ID-No.	Findings
2101	NAD
2102	NAD
2103	NAD

NAD: No abnormalities detected

STUDY NO. : 0749

ANIMAL : Rat CrI:CD(SD)

SEX : Female

Necropsy findings (Individual)

3rd Stage (2000 mg/kg)

PAGE: 3

Animal ID-No.	Findings
2201	Lung : red zone
2202	Lung : red zone
2203	Lung : red zone