

#### 別添 4

厚生労働科学研究費補助金 ((化学物質リスク研究事業)

毒物又は劇物の指定等に係る急性吸入毒性試験の代替法の開発及び

その精緻化に関する研究

令和4年度 分担研究報告書

ラットを用いたTIPS法による気管内投与急性吸入毒性試験及び呼吸器の毒性評価並びに全身諸臓器の毒性評価による吸入毒性機序解析に関する研究

研究分担者 高須伸二 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
赤根弘敏 国立医薬品食品衛生研究所 主任研究官  
小川久美子 国立医薬品食品衛生研究所 病理部長

#### 研究要旨

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD<sub>50</sub>・LC<sub>50</sub> 値から判定されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。しかし、全身吸入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるなどの困難があるため、吸入毒性情報は限定的である。本研究では、汎用性の高い経気管肺内噴霧投与方法 (Trans-tracheal intrapulmonary spraying ; TIPS 法) による気管内投与毒性試験の急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的に、被験物質 6 剤 (N,N-ジメチルアセタミド, N,N-ジメチルホルムアミド, *tert*-ブチルアルコール, アクリル酸, 2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピン) について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施し、TIPS 法で得られた LD<sub>50</sub> 値と全身吸入暴露における LC<sub>50</sub> 値を比較した。その結果、N,N-ジメチルアセタミド及び N,N-ジメチルホルムアミドの LD<sub>50</sub> 値と全身吸入暴露における LC<sub>50</sub> 値の差異は 4 倍以内であった。*tert*-ブチルアルコールの差異は 0.18~0.36 倍であったが、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは 4 分の 1 (0.25 倍) を超える差異が認められた。今後、新たに 6~10 物質について気管内投与急性毒性試験を実施して LD<sub>50</sub> 値の判定及び毒性影響の検討を実施するとともに、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

#### A. 研究目的

毒物又は劇物は、原則、動物を用いた急性毒性試験における LD<sub>50</sub>・LC<sub>50</sub> 値から判定

されており、投与方法には経口、経皮及び吸入が想定されている。特にヒトへの吸入暴露が想定される化合物については吸入による評価が必要である。しかし、全身吸

入暴露法は大規模な暴露装置が必要となるため、実施可能な施設はわずかであり、頭部／鼻部暴露法は拘束ストレスが影響する。そうした背景から国際的にも、化学品の分類および表示に関する世界調和システム（GSH）における吸入毒性情報は限定的である。

津田研究分担者等は、これまでにラットを用いた被験物質の経気管肺内噴霧投与方法（Trans-tracheal intrapulmonary spraying；TIPS法）による汎用性の高い吸入暴露評価法を開発し、多種の多層カーボンナノチューブ（MWCNT-7等）の肺又は胸膜中皮に対する発がん性を報告した<sup>1)</sup>。また、急性吸入毒性試験の代替法開発に関する先行科研費研究では、TIPS法によるLD<sub>50</sub>の暴露量と全身吸入暴露法によるLC<sub>50</sub>から求められる暴露量との差は、施設間最大許容差異の4倍以内とその有用性が示された<sup>2)</sup>。しかし、吸入暴露試験の代替法として確立するには更なる検証が必要である。

そこで、本研究課題では津田らにより検討されてきたTIPS法による気管内投与毒性試験の急性吸入毒性試験の代替法としての有用性をより堅固なものにすることを目的に、本年度は6化合物についてTIPS法による気管内投与急性毒性試験を実施し、TIPS法で得られたLD<sub>50</sub>値を全身吸入暴露におけるLC<sub>50</sub>値と比較した。

## B. 研究方法

### B.1. 被験物質及び動物

*N,N*-ジメチルアセタミド（純度：99.9%）、*N,N*-ジメチルホルムアミド（100.0%）、*tert*-ブチルアルコール（100.0%）、アクリル酸（99.8%）、2-ジメチルアミノエタノール（100.0%）及びヘキサヒドロ-1*H*-アゼピン

（99.9%）は富士フイルム和光純薬株式会社から購入した。生理食塩液は株式会社大塚製薬工場から購入した。動物は10から11週齢の雄性F344ラットをジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社から購入し、1週間以上の馴化後、実験に供した。動物の飼育は、温度24 ± 1℃、湿度55 ± 5%、換気回数18回/時（オールフレッシュ）、12時間蛍光灯照明/12時間消灯の環境下でバリエーションシステムの動物室にて行った。動物は透明なポリカーボネート製箱型ケージに3匹ずつ収容し、床敷は三共ラボサービス社のソフトチップを用い、週2回交換を行った。

### B.2. TIPS法による気管内投与急性毒性試験

津田らの先行研究と異なる実験施設及び器具で実施することから、被験物質を用いた本試験を実施するのに先立ち投与条件の確認を行った。12～14週齢のF344ラットを用いて、イソフルラン吸入麻酔下で生理食塩液を1日4回（1時間間隔）投与した。投与はラット用金属製気管内噴霧スプレー（針長80mm、内径0.8mm、外径1.0mm）（夏目製作所）を用いて一回当たり0.2～2.0mL/kg体重の容量で実施し、気管内の挿入はラット用喉頭鏡（夏目製作所）を用いて素早く実施した。投与後は呼吸異常等の有無など一般状態を確認した。また、生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与し投与液の肺内の分散状態を目視で確認した。

次に、被験物質6剤についてTIPS法による気管内投与急性毒性試験を実施した。12週齢の雄性F344ラットにイソフルラン吸入麻酔下で各被験物質投与液（媒体：生

理食塩液) を 2.0 mL/kg の容量で 1 日 4 回 (1 時間間隔) 投与した。被験物質の投与量は全身吸入暴露法の LC<sub>50</sub> 値等を参考に既報のラット呼吸量<sup>3)</sup>を用いて換算した LD<sub>50</sub> 値をもとに設定した (Table 1, 2)。投与直後から投与後 14 日まで一般状態観察を行った。途中死亡・瀕死動物及び投与後 14 日の生存動物は全例とも解剖に供した。

(倫理面の配慮)

動物を用いた実験は国立医薬品食品衛生研究所実験動物倫理委員会の承認を得た上で、関係法令を遵守して実施した。動物の飼育・処置に当たっては、動物愛護の精神に則るとともに倫理規定に十分配慮し、気管内投与は麻酔下で実施し、解剖時には麻酔下での安楽死を施すなど、苦痛軽減に努めた。

### C. 研究結果

気管内投与の技術及び投与条件確認のため、一回当たり 0.2~2.0 mL/kg 体重の生理食塩液を投与した結果、一般状態の異常及び死亡例は見られなかった。生理食塩液で希釈した墨汁を同様の方法で投与した結果、1.0 mL/kg 体重以上の投与群で投与液が肺全葉に拡散するのが確認された。

被験物質 6 剤の TIPS 法で得られた LD<sub>50</sub> 値 (LD<sub>50</sub> (TIPS)) 及び全身吸入暴露における LC<sub>50</sub> 値 (LC<sub>50</sub> (inhalation)) を比較した結果を Table 2 に示す。N,N-ジメチルアセタミド及び N,N-ジメチルホルムアミドの LD<sub>50</sub> (TIPS) と LC<sub>50</sub> (inhalation) の差異は 4 倍以内であった。また、tert-ブチルアルコールの差異は 0.18~0.36 倍であった。一方、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンでは 0.04

~0.17 倍と何れも 4 分の 1 (0.25 倍) を超える差異が認められた。

### D. 考察

気管内投与の技術及び投与条件確認の結果、生理食塩液を最大 2.0 mL/kg 体重の容量での 4 回投与まで一般状態の異常及び死亡例が見られなかったことから、本条件で TIPS 法を実施することは可能であると確認された。また、墨汁の投与により 0.5 mL/kg より少ない容量では投与液の肺への拡散に偏りがみられたことから、TIPS 法による気管内投与急性毒性試験は 2.0 mL/kg の容量で実施することとした。

被験物質 6 剤について TIPS 法による気管内投与急性毒性試験を実施した結果、N,N-ジメチルアセタミド及び N,N-ジメチルホルムアミドの LD<sub>50</sub> (TIPS) と LC<sub>50</sub> (inhalation) の差異は 4 倍以内であった。この 2 剤は津田らの先行研究においても検討されており、今回得られた結果と先行研究結果との間に差異は認められず<sup>2)</sup>、良好な施設間の再現性が確認された。

一方、tert-ブチルアルコールの LD<sub>50</sub> (TIPS) と LC<sub>50</sub> (inhalation) の差異は 0.18~0.36 倍であったが、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンではより大きな差異が認められた。津田らの先行研究では LD<sub>50</sub> (TIPS) と LC<sub>50</sub> (inhalation) の差は概ね 4 倍以内であったことから、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1H-アゼピンの 3 剤については、全身吸入暴露法に比べて TIPS 法を用いて実施した本実験条件の方がより毒性が強く表れている可能性が考えられた。今後、新たに 6~10 物質について気管内投与急性毒性試験を実施して

LD<sub>50</sub> 値の判定及び毒性影響の検討を実施するとともに、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

## E. 結論

TIPS 法の投与条件を確認し、TIPS 法で得られた LD<sub>50</sub> 値を全身吸入暴露における LC<sub>50</sub> 値と比較した結果、*N,N*-ジメチルアセタミド及び *N,N*-ジメチルホルムアミドの差異は 4 倍以内であった。一方、アクリル酸、2-ジメチルアミノエタノール及びヘキサヒドロ-1*H*-アゼピンではより大きな差異が認められた。今後、投与液の物理化学的性状の検討や肺、気管などの呼吸器を含む諸臓器の病理組織学的検査を実施し、今回認められた TIPS 法と全身吸入暴露法の差異の要因を検討する予定である。

## F. 研究発表

### F.1. 論文発表

1. Takasu S., Ishii Y., Namiki M., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Nohmi T., Ogawa K. Comprehensive analysis of the general toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 3-acethyl-2,5-dimethylfuran in male *gpt delta* rats. *Food Chem. Toxicol.* 2023, 172, doi: 10.1016/j.fct.2022.113544.
2. Kuroda K., Ishii Y., Takasu S., Matsushita K., Kijima A., Nohmi T., Umemura T. Toxicity, genotoxicity, and carcinogenicity of 2-methylfuran in a 90-day comprehensive toxicity study in *gpt delta* rats. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 168, doi: 10.1016/j.fct.2022.113365.

3. Ishii Y., Nakamura K., Mitsumoto T., Takimoto N., Namiki M., Takasu S., Ogawa K. Visualization of the distribution of anthraquinone components from madder roots in rat kidneys by desorption electrospray ionization-time-of-flight mass spectrometry imaging. *Food Chem. Toxicol.* 2022, 161, doi: 10.1016/j.fct.2022.112851.
4. Akane H., Toyoda T., Mizuta Y., Cho YM., Ide T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Histopathological and immunohistochemical evaluation for detecting changes in blood hormone levels caused by endocrine disruptors in a 28-day repeated-dose study in rats. *J Appl Toxicol.* 2022, 42, 1603-17.
5. Toyoda T., Kobayashi T., Miyoshi N., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Toxicological effects of two metabolites derived from *o*-toluidine and *o*-anisidine after 28-day oral administration to rats. *J Toxicol Sci.* 2022, 47, 457-66.
6. Yamada T., Toyoda T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Cho YM., Ogawa K. Persistent  $\gamma$ -H2AX formation and expression of stem cell markers in *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats. *Toxicol Sci.* 2022, 189, 51-61.

### F.2. 学会発表

1. 瀧本憲史, 石井雄二, 中村賢志, 並木萌香, 高須伸二, 満元達也, 渋谷 淳, 小川久美子, アセトアミドのラット肝発がん機序における chromoanagenesis の関与の可能性, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
2. 高須伸二, 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 相馬明玲, 能美健彦, 小川久美子,

- gpt delta* ラットを用いた肝中期試験法による6-methoxyquinolineの*in vivo*遺伝毒性・発がん性の評価, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
3. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 並木萌香, 高須伸二, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, *gpt delta* ラットを用いた包括的毒性試験による2-isopropyl-N-2,3-trimethyl buthylamide (ITB)の評価, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
  4. 石井雄二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, Acetamide投与ラットの肝臓に生じる大型小核の形成機序, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
  5. 石井雄二, 中村賢志, 高須伸二, 瀧本憲史, 満元達也, 並木萌香, 小川久美子, 全ゲノム解析から明らかになったacetamideのラット肝腫瘍形成におけるがん遺伝子*c-Myc*の関与, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
  6. 瀧本 憲史, 石井 雄二, 満元 達也, 並木 萌香, 高須 伸二, 渋谷 淳, 小川 久美子, ラット肝細胞におけるAcetamideの大型小核誘発機序に関する研究, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
  7. 満元達也, 石井雄二, 瀧本憲史, 高須伸二, 並木萌香, 梅村隆志, 能美健彦, 小川久美子, アカネ色素のラット腎臓における部位特異的な腫瘍形成の機序, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
  8. 日比大介, 高須伸二, 石井雄二, 梅村隆志, フランのラット肝発がん葉特異性に着目した変異原性評価, 第51回日本環境変異原ゲノム学会2022年11月, 広島
  9. 石井雄二, 瀧本憲史, 河上強志, 田原麻衣子, 中村賢志, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 小川久美子, Acetamideの肝発がん機序に関する検討: 血液及び肝臓中動態のラット系統差の比較, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
  10. 瀧本憲史, 石井雄二, 満元達也, 並木萌香, 高須伸二, 渋谷淳, 小川久美子, Acetamideが誘発するラット肝細胞における大型小核の形成機序, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
  11. Akane H., Toyoda T., Matsushita K., Morikawa T., Kosaka T., Tajima H., Aoyama H., Ogawa K. Comparison of sensitivity between histopathological and immunohistochemical analyses and blood hormone levels for early detection of antithyroid effects in rats treated with thyroid peroxidase inhibitors and promoters of thyroid hormone metabolism. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
  12. Toyoda T., Yamada T., Matsushita K., Akane H., Morikawa T., Ogawa K. Early detection of urinary bladder carcinogens in rats by immunohistochemistry for  $\gamma$ -H2AX. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
  13. Ogawa K., Akagi J., Mizuta Y., Akane H., Toyoda T. Oral toxicological study of titanium dioxide nanoparticles with a crystallite diameter of 6 nm in rats. 62nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2023.3, Nashville
  14. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, 結晶子径6 nmの超微小

- 粒子径アナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の反復経口投与毒性, 日本薬学会第143年会 2023年3月, 札幌
15. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 渡邊正悟, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 単環芳香族アミンの新規尿中代謝物はラット膀胱上皮におけるALDH1A1の発現を誘導する, 日本農芸化学会2023年度大会 2023年3月, Web開催
  16. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, ヨウ素取込み阻害剤によるラット抗甲状腺作用の検出指標としての病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値の比較, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
  17. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子,  $\gamma$ -H2AX免疫染色を指標とした腎発がん性の短期評価法開発, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
  18. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 腎線維化における部分的上皮間葉転換の生じた尿細管の役割とCD44との関連, 第39回日本毒性病理学会総会及び学術集会 2023年1月, 東京
  19. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 薬剤性腎障害の慢性化病変におけるCD44陽性尿細管の病態生理学的意義, 第5回医薬品毒性機序研究会 2022年12月, 東京
  20. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介, コーティング型マイクロニードルアレイにおける高極性薬剤の皮膚透過性の評価 第44回日本バイオマテリアル学会, 2022年11月, 東京都
  21. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ナノサイズ二酸化チタンの90日間反復経口投与毒性, 第59回全国衛生化学技術協議会年会 2022年11月, 川崎
  22. 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ラットを用いた病理組織学的及び免疫組織化学的手法による抗甲状腺物質の検出, 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
  23. 豊田武士, 赤根弘敏, 小川久美子, 化学物質誘発ラット膀胱腫瘍の発生過程における $\gamma$ -H2AXの役割, 第81回日本癌学会学術総会 2022年9月, 横浜
  24. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, 薬剤性腎障害から慢性腎臓病への移行を予測するバイオマーカーの探索, 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
  25. 岡本悠佑, 福井千恵, 赤根弘敏, 豊田武士, 梶山健次, 権英淑, 神山文男, 小川久美子, 伊豆津健一, 山本栄一, 野村祐介, コーティング型マイクロニードルアレイにおける穿刺性及び薬剤透過性の評価, 第8回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム 2022年8月, 東京
  26. 小林琢磨, 豊田武士, 吉岡泰淳, 岸本真治, 松下幸平, 赤根弘敏, 小川久美子, 渡辺賢二, 高村岳樹, 戸塚ゆ加里, 若林敬二, 三好規之, 細胞毒性を有するo-Toluidineとo-anisidineの尿中代謝物はラット膀胱上皮でALDH1A1を誘導する, 第29回日本がん予防学会総会 2022年7月, 京都

27. 赤根弘敏, 豊田武士, 松下幸平, 森川朋美, 小坂忠司, 田島均, 青山博昭, 小川久美子, 甲状腺ホルモン代謝促進物質投与ラットにおける抗甲状腺作用の検出に対する病理組織学的及び免疫組織化学的解析と血中ホルモン値との比較, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
28. 豊田武士, 松下幸平, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子,  $\gamma$ -H2AXを指標とした化学物質の腎発がん性早期検出系の開発, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
29. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, アロプリノール誘発腎線維化モデルラットを用いたCD44の腎線維化バイオマーカーとしての有用性の検証, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
30. 赤木純一, 水田保子, 赤根弘敏, 豊田武士, 小川久美子, ナノサイズ酸化チタン(IV)の毒性研究, 第49回日本毒性学会学術集会 2022年6月, 札幌
31. 松下幸平, 豊田武士, 赤根弘敏, 森川朋美, 小川久美子, AKIからCKDへの移行におけるCD44の役割とバイオマーカーとしての応用, 第65回日本腎臓学会学術総会 2022年6月, 神戸
32. 森川朋美, 豊田武士, 赤根弘敏, 松下幸平, 小川久美子, ラットを用いたオリゴガラクチュロン酸の90日間亜慢性反復経口投与毒性試験, 日本食品化学学会第28回総会・学術大会 2022年5月, 東京

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む.)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

参考文献

- 1) Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. *Cancer Sci.* 110(8):2485-2492. 2019.
- 2) 津田 洋幸. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書 化学物質リスク研究事業 「気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究：迅速化かつ国際化に向けてに関する研究」平成 31 年度～令和 3 年度総合研究報告書. 2022.
- 3) Bide RW, Armour SJ, Yee E. Allometric respiration/body mass data for animals to be used for estimates of inhalation toxicity to young adult humans. *J Appl Toxicol.* 20(4):273-90. 2000.

Table 1. LC50 and calculated LD50 of test substances in acute inhalation toxicity tests.

Test substance	CAS No.	LC50 (m g/L) <sup>a</sup>	LC50 (ppm) <sup>a</sup>	LD50 (m g/kg) <sup>b</sup>	Reference
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	127-19-5	4.41 (R) <sup>c</sup>	-	643	OECD, SDS Initial Assessment Report, <i>N,N</i> -Dimethylacetamide (DMAC), 2001.
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	68-12-2	4.7 (M)	-	1097	Hazardous Substances Data Bank, 2005.
<i>tert</i> -Butyl alcohol	75-65-0	-	> 2500 – 5020 (R)	1089 – 2187	NITE, Hazard Assessment Report, No.8, 2005.
		-	> 10000 (R)	> 4417	NITE, Hazard Assessment Report, No.217, 2007.
Acrylic acid	79-10-7	3.6 (R)	-	525	Patty's Toxicology, 6th Edition, 2012.
		-	> 14100 (R)	> 6228	PCS, Environmental health criteria (EHC), 191, 1997.
2-Dimethylaminoethanol	108-01-0	-	1641 (R)	872	Klönne DR <i>et al.</i> , <i>Fundam Appl Toxicol</i> 9(3):512-21, 1987.
Hexahydro-1H-azepine	111-49-9	2.45 (R)	-	357	Hazardous Substances Data Bank (HSDB), 2003.

<sup>a</sup> LC50 (m g/L or ppm) is referenced to acute inhalation toxicity data (4-hour exposure). (R), rat; (M), mouse

<sup>b</sup> LD50 (m g/kg) is calculated from LC50 (m g/L or ppm) using 0.051 m<sup>3</sup> of total respiration for 4 hours in a 350 g rat, based on the study by RW Bide *et al.* (*J Appl Toxicol* 2000 Jul-Aug;20(4):273-90.)

<sup>c</sup> This value was calculated from LD50 (m g/kg) of an hour exposure test

OECD, Organisation for Economic Co-operation and Development; NITE, National Institute of Technology and Evaluation; PCS, International Programme on Chemical Safety

Table 2. LD50 in acute toxicity study by TIPS in rats.

Test substance	Dose (m g/kg)	Mortality (No. Dead/No. Treated)	LD50 (m g/kg)	LD50 (TIPS) / LD50 (Inhalation)
<i>N,N</i> -Dimethylacetamide	320, 640, 1280, 2560	0/6, 0/6, 0/6, 6/6	1280 – 2560	2.0 – 4.0
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	500, 1000, 2000, 4000	1/6, 0/6, 6/6, 6/6	1000 – 2000	0.9 – 1.8
<i>tert</i> -Butyl alcohol	200, 400, 800, 1600	0/6, 1/6, 1/6, 3/3	800 – 1600	0.18 – 0.36
Acrylic acid	16, 31, 63, 125, 250	0/6, 3/6, 6/6, 6/6, 3/3	16 – 31	0.03 – 0.06
2-Dimethylaminoethanol	19, 75, 150, 300	0/6, 0/6, 6/6, 6/6	75 – 150	0.09 – 0.17
Hexahydro-1H-azepine	8, 16, 31, 63, 125	2/6, 0/6, 6/6, 6/6, 6/6	16 – 31	0.04 – 0.09