1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチル－のラットにおける単回投与毒性試験

－最終報告書－

試験実施施設　：株式会社パナファーム・ラボラトリーズ　安全性研究所

目　　次

頁

要　約 ---------- 1

緒　言 ---------- 2

試験材料及び方法 ---------- 2

試験成績 ---------- 5

考　察 ---------- 6

Figure

1 Mean body weight changes in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 8

Tables

1 Mortality and LD_{50} values in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 9

2 Clinical signs in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 10

3 Body weights in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 11

4 Necropsy findings in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 12

5 Histopathological findings in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione ---------- 13

要　　約

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として，１，３－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチル－の０(対照)，500，1000及び2000mg/kgを１群雌雄各５匹のCrj:CD(SD系)ラットに単回経口投与する毒性試験を実施し，以下の結果を得た。

１．死亡はいずれの投与群にも認められず，LD_{50}値は雌雄とも2000mg/kgを上回るものと推定された。

２．一般状態の観察では，投与当日(１日目)に活動性の低下，緩徐呼吸及び腹臥姿勢が2000mg/kg群の雌雄に観察されたが，これらの症状は投与翌日(２日目)あるいは３日目までに回復した。

３．体重では，投与翌日に体重減少あるいは増加抑制が2000mg/kg群の雌雄に認められたが，その後の体重は観察期間終了時まで対照群とほぼ同様な増加を示した。

４．観察期間終了後の剖検では，前胃の肥厚が1000mg/kg群以上の雌雄にみられ，2000mg/kg群の雌では前胃と肝臓との癒着もみられた。前胃の病理組織学的検査では，肥厚部位に扁平上皮の過形成及び粘膜下の肉芽腫性炎症が認められたほか，前胃と肝臓との癒着部位では異物肉芽腫が観察された。

緒　　言

1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルーは，主に電子部品などの絶縁体の材料となるエポキシ樹脂の硬化剤として使用されている化学物質である。

今回，OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として，1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルーを雌雄ラットに単回経口投与し，その急性期の毒性徴候及びＬＤ$_{50}$値について検討したので報告する。

試験材料及び方法

1．被験物質

より提供された1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルー(純度99.97%，Lot No.　　)を試験に使用した。本被験物質は，水に難溶(0.1g/H_2O 100g以下)でアセトン及びジメチルスルホキシドには易溶の淡黄色透明の液体である(添付資料1－1)。また，投与終了後，上記の供給源にて分析を行い，試験期間中の被験物質の安定性について確認した(添付資料1－2)。媒体にはコーンオイル(ナカライテスク株式会社，Lot No. V5P5523)を使用した。被験物質は室温，遮光下で，コーンオイルは室温で，それぞれ被験物質室の保管庫に保管した。

2．使用動物及び飼育条件

5週齢のCrj:CD(SD系)ラット(日本チャールス・リバー株式会社)を雌雄各26匹購入し，7日間の検疫馴化を行った。この間に，全例について一般状態の観察及び体重測定を実施するとともに，雌雄各3匹を抜粋して剖検し，異常がないことを確認したのち，雌雄各20匹を選んで6週齢で試験に使用した。投与日の体重は，雄が172.1～193.1g，雌が125.4～139.9gであった。動物は，温度24±2℃(許容範囲18～28℃)，湿度55±10%(許容範囲30～70%)，照明12時間(午前7時～午後7時)及び換気回数13回/時に設定したバリアーシステム飼育室(93番)で床敷(ホワイトフレーク，日本チャールス・リバー株式会社)を入れたポリカーボネイト製ケージ(W265×H185×D425mm)に，1ケージ当たり2～3匹ずつ収容して飼育した。なお，試験期間中の温度の実測値は最高24℃，最低22℃，

湿度の実測値は最高58％，最低51％であった。飼料は高圧蒸気滅菌処理した固型飼料(MF，オリエンタル酵母工業株式会社)を，飲水は次亜塩素酸ナトリウムを添加(約２ppm)した井水を給水瓶によりそれぞれ自由に摂取させた。飼料については財団法人 日本食品分析センターにて，また，飲水については株式会社鶴城 南九科研センターにて分析を行い，いずれも許容基準に適合していることを確認した。飼育器材は高圧蒸気滅菌したものを使用し，ケージは週２回，ケージ蓋及びラックは群分け時に１回交換するとともに，飼育室は毎日清掃し，消毒薬を浸したモップで清拭した。

３．試験群構成，投与量設定の根拠及び群分け

試験群構成を下表に示した。

試験群	投与量 (mg/kg)	投与液濃度 (％)	投与容量 (ml/kg)	性別	使用動物数	動物番号
対照群	0	0	10	♂	5	1～ 5
				♀	5	101～105
低用量群	500	5	10	♂	5	6～ 10
				♀	5	106～110
中間用量群	1000	10	10	♂	5	11～ 15
				♀	5	111～115
高用量群	2000	20	10	♂	5	16～ 20
				♀	5	116～120

投与量は，先に当研究所で実施した単回投与毒性予備試験(投与量：500，1000及び2000mg/kg)の結果から設定した。すなわち，当該試験において，いずれの用量でも死亡の発生はなかった。また，一般状態では1000mg/kg以上の用量で活動性の低下，緩徐呼吸などが投与日にみられた。体重では2000mg/kgの用量で投与翌日に体重減少又は体重増加抑制がみられた。以上より，本試験での投与量は，高用量をOECD毒性試験ガイドラインに従い2000mg/kgとし，以下公比２で除した1000及び500mg/kgの計３用量を設定した。

試験群は，上記３用量に対照を加え計４群とした。１群当たりの動物数は，各群とも

雌雄各５匹を設けた。

群分けは，投与前日に当日の体重を基に層別連続無作為化法で行い，群分け後の動物には油性フェルトペンによる尾の番号付け及び耳パンチにより個体識別した。また，各ケージには試験番号，動物番号，投与量及び性別を表示したラベルを付けて識別した。

４．投与経路及び投与方法

投与経路は，OECD毒性試験ガイドラインで指定されていること，また，予想されるヒトへの曝露経路の一つであることから，経口投与とした。投与は，約16時間絶食させたのちに，胃管を用いて１回強制経口投与した。投与容量は10ml/kgとし，個体ごとの投与液量は投与日の体重を基に算出した。対照群にはコーンオイルを同様に投与した。

５．被験物質と媒体との混合物調製法

被験物質を各濃度ごとに必要量(純度換算せず)秤量し，コーンオイルに溶解して，５，10及び20W/V%溶液を調製した。調製は投与の２日前に行い，調製した各溶液は投与まで被験物質室の冷蔵庫内にて遮光下(褐色瓶)に保管した。また，調製した各濃度の溶液について被験物質の濃度確認を実施し，設定濃度の許容範囲(±５％以内)にあることを確認した(添付資料２)。なお，本調製法による0.1，10及び20W/V%溶液は，冷蔵，遮光下(褐色瓶)で８日間保存後，更に室温で６時間安定であることが確認されている(添付資料３)。

６．観察及び検査

1)　一般状態及び体重測定

観察期間は投与後14日間とし，この間に一般状態及び死亡の有無を投与日(１日目)は投与後６時間まで経時的に，２日目から14日目は毎日午前及び午後の１日２回，15日目は午前中に１回観察するとともに，体重を投与日の投与前，並びに２，４，６，８，11及び15日目に測定した。

2)　病理学的検査

観察期間終了後，すべての動物はエーテル麻酔下に放血致死させたのち剖検した。その結果，1000及び2000mg/kg群で胃(前胃)に肉眼的な変化がみられたことから，摘

出して10％中性緩衝ホルマリン溶液に固定した。また，変化のみられた代表例について，胃を常法に従ってパラフィン切片とし，ヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織学的検査を実施した。なお，対照とするため対照群の代表例についても胃を摘出して，病理組織学的検査を実施した。

7．統計学的処理

体重について，各群ごとに平均値と標準偏差を求めた。

試　験　成　績

1．死亡の発生状況及びＬＤ$_{50}$値

死亡の発生状況及びＬＤ$_{50}$値をTable 1に示した。

死亡はいずれの投与群にも認められず，ＬＤ$_{50}$値は雌雄とも2000mg/kgを上回るものと推定された。

2．一般状態

一般状態の観察結果をTable 2及びAppendix 1，2に示した。

対照群，500及び1000mg/kg群では，雌雄とも変化はみられなかった。

2000mg/kg群では，投与後15ないし30分から活動性の低下，緩徐呼吸及び腹臥姿勢が雌雄にみられ始め，投与後45分までに緩徐呼吸が雌雄全例，活動性の低下が雄１例及び雌３例並びに腹臥姿勢を示すものが雄４例及び雌２例に観察された。これらの症状は，経過とともに徐々に回復し，腹臥姿勢は投与後３時間までにすべての動物で回復した。活動性の低下及び緩徐呼吸については，雄１例を除くすべての動物で投与の翌日（２日目）に回復し，以後の観察期間においても変化はみられなかった。また，残りの雄１例についても，３日目には回復し，以後は他の動物と同様に変化は観察されなかった。

3．体重

体重の推移をFig. 1，Table 3及びAppendix 3，4に示した。

500及び1000mg/kg群では，雌雄とも対照群とほぼ同様に順調な体重増加が認められた。

2000mg/kg群では，2日目に雄で体重減少，雌で体重増加抑制が認められたが，4日目から雌雄とも対照群とほぼ同様な体重増加が認められた。

4．病理学的検査

検査結果をTable 4，5，Appendix 5，6及びPhotograph 1，2に示した。

対照群及び500mg/kg群では，雌雄とも肉眼的な変化はみられなかった。

1000mg/kg群では，前胃粘膜の肥厚が雄2例及び雌1例に認められた。

2000mg/kg群では，前胃粘膜の肥厚が雌雄全例にみられ，更に雌1例では前胃と肝臓との癒着も認められた。

前胃で肥厚がみられた1000及び2000mg/kg群の代表例(各群とも雌雄各1例)で実施した病理組織学的検査では，肥厚部位に扁平上皮の過形成及び粘膜下の肉芽腫性炎症が認められた。更に，前胃と肝臓との癒着部位では異物肉芽腫が認められた。

考　　察

OECD既存化学物質安全性点検に係わる毒性調査の一環として，1，3－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチル－の0(対照)，500，1000及び2000mg/kgを雌雄ラットに単回経口投与する毒性試験を実施した。

いずれの投与群の雌雄にも観察期間を通じて死亡例は認められなかった。

一般状態では，2000mg/kg群の雌雄に活動性の低下，緩徐呼吸及び腹臥姿勢が投与当日に観察されたが，これらの症状は投与翌日あるいは3日目までに回復し，その後の一般状態には変化はみられなかった。また，体重では2000mg/kg群の雌雄で投与翌日に一過性の体重減少あるいは増加抑制が認められたが，その後の体重は観察期間終了時まで対照群とほぼ同様な増加を示した。

観察期間終了後の剖検では，1000mg/kg群以上の雌雄に前胃粘膜の肥厚がみられ，病理組織学的には扁平上皮の過形成及び粘膜下の肉芽腫性炎症が認められた。更に，前胃と肝

臓との癒着がみられる例もあった。これらの変化は，前胃粘膜の傷害に対する上皮の反応性の増殖像及び粘膜下組織の修復像と考えられ，投与後の初期に受けた被験物質の直接刺激に起因したものと考えられた。

このように，本被験物質の単回投与毒性試験では，死亡の発現はなく，一般状態及び体重においても一過性の変化で，回復は速やかであった。また，病理学的検査では被験物質の局所刺激作用によると考えられる所見のほかには本被験物質に関連した変化は認められなかった。以上の結果より，ラットにおける１，３－イソベンゾフランジオン，テトラヒドロメチルーの単回経口投与によるLD_{50}値は雌雄とも2000mg/kgを上回るものと推定された。

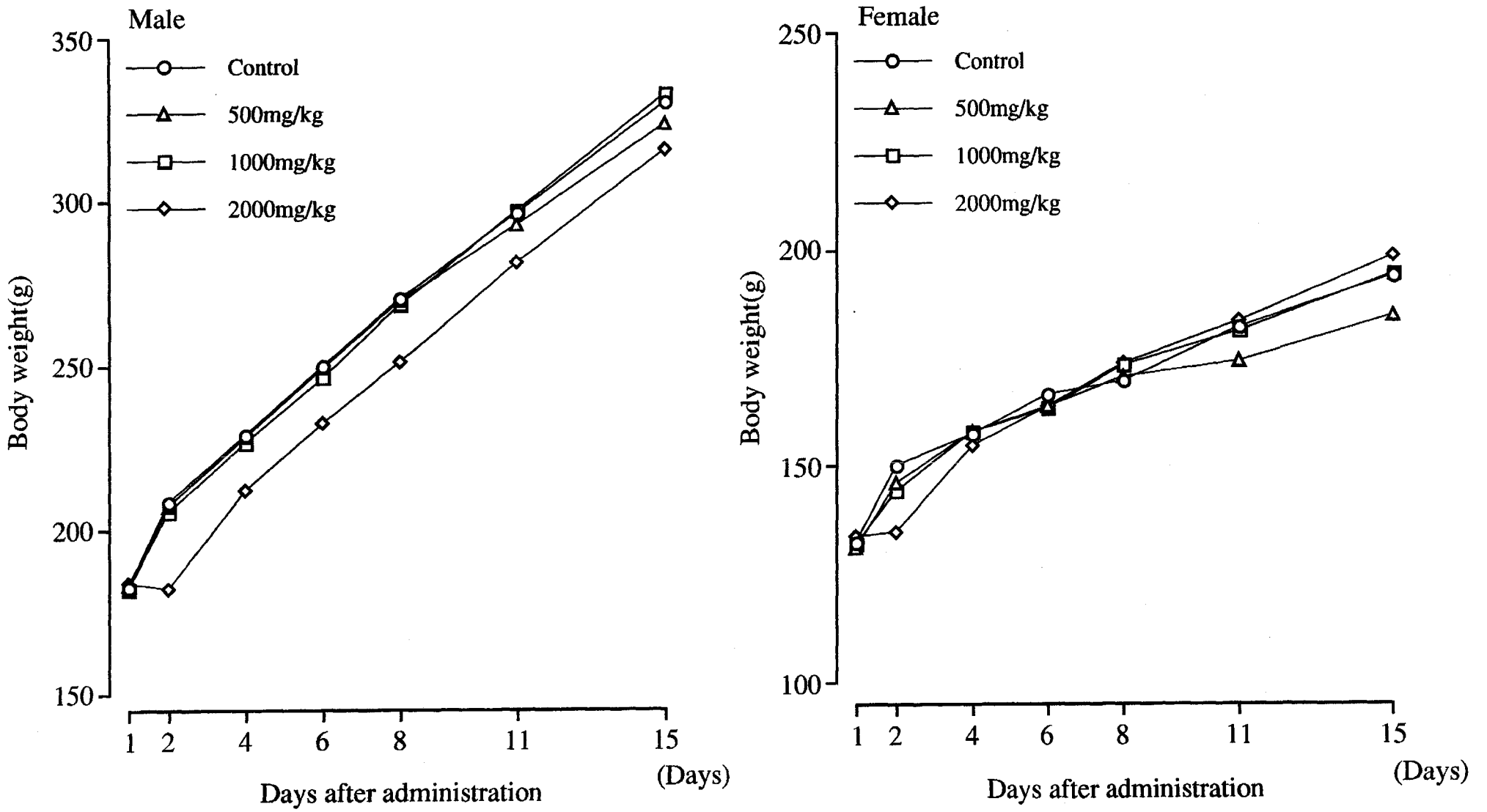

Fig.1 Mean body weight changes in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione.

Table 1 Mortality and LD50 values in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione

Sex	Group and dose	Mortality [a)]	LD50 value (mg/kg)
Male	Control	0/5	>2000
	500mg/kg	0/5	
	1000mg/kg	0/5	
	2000mg/kg	0/5	
Female	Control	0/5	>2000
	500mg/kg	0/5	
	1000mg/kg	0/5	
	2000mg/kg	0/5	

a) : No. of dead animals/no. of animals dosed.

Table 2 Clinical signs in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione

Sex	Group and dose	Clinical signs	Minutes				Hours						Days													
			0	15	30	45	1	2	3	4	5	6	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Male	Control	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Hypoactivity	0	2	3	1	1	1	5	5	5	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	5	5	5	5	5	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	2	4	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Female	Control	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	500mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	1000mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	2000mg/kg	Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		No abnormality	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Hypoactivity	0	5	3	3	3	3	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Bradypnea	0	0	2	5	5	5	5	5	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Prone position	0	0	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3 Body weights in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione

Sex	Group and dose		Body weight (g) on day 1	2	4	6	8	11	15
Male	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	182.7	208.2	229.1	249.9	270.7	296.4	330.3
		S.D.	±8.2	±9.0	±11.4	±13.0	±13.9	±18.3	±20.6
	500mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	183.0	207.0	228.5	249.6	269.7	292.6	323.3
		S.D.	±6.8	±9.2	±9.7	±9.6	±10.9	±14.1	±13.8
	1000mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	182.1	205.2	226.2	246.1	268.8	296.8	332.7
		S.D.	±8.2	±10.3	±11.7	±14.7	±18.1	±23.6	±25.2
	2000mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	183.6	182.0	212.2	232.3	251.2	281.2	315.7
		S.D.	±5.6	±12.3	±13.9	±12.5	±12.4	±11.7	±15.6
Female	Control	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	132.4	150.4	157.5	166.7	169.8	182.0	193.9
		S.D.	±4.2	±7.4	±4.9	±7.7	±5.8	±7.0	±9.8
	500mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	130.9	146.3	157.9	164.1	170.7	174.4	184.7
		S.D.	±4.8	±4.4	±5.7	±6.1	±9.2	±8.6	±9.2
	1000mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	132.0	144.2	157.8	163.6	173.4	181.4	194.5
		S.D.	±4.4	±6.2	±6.2	±5.9	±5.8	±9.1	±10.7
	2000mg/kg	N	5	5	5	5	5	5	5
		Mean	133.6	134.6	154.7	163.9	173.7	183.5	198.4
		S.D.	±4.0	±4.5	±8.9	±8.2	±9.6	±12.1	±15.7

Study No.19527

Table 4 Necropsy findings in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione

Sex	Male				Female			
Group and dose	Control	500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg	Control	500mg/kg	1000mg/kg	2000mg/kg
Organs and findings / Number of animals	5	5	5	5	5	5	5	5
Digestive system								
Stomach								
Thickening, mucosa, forestomach	0	0	2	5	0	0	1	5
Adhesion, liver	0	0	0	0	0	0	0	1

No appreciable changes in all other organs and tissues.

Table 5 Histopathological findings in rats after a single oral administration of tetrahydromethyl-1,3-isobenzofuranedione

Organs and findings	Sex	Male			Female		
	Group and dose	Control	1000mg/kg	2000mg/kg	Control	1000mg/kg	2000mg/kg
	Animal No.	1	13	16	101	113	119
Digestive system							
Forestomach							
Squamous hyperplasia		-	+	+	-	+	+
Inflammation, granulomatous, submucosa		-	+	++	-	+	+
Granuloma, foreign body, adhesion area		-	-	-	-	-	+

Grade sign: -, none; +, mild; ++, moderate; +++, marked.