フタルイミドのラットにおける
急性経口投与毒性試験
最終報告書

株式会社 化合物安全性研究所

目　次

頁

表題、試験番号 …… 1

要　　約 …… 2

緒　　言 …… 3

材料および方法 …… 3

成　　績 …… 7

考　　察 …… 8

参 考 文 献 …… 8

Figures …… 添付

1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Tables …… 添付

1. Experimental design for acute oral toxicity test of PHI in rats (SR-9772)
2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)
7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

要　約

フタルイミド（CAS No. 85-41-6）の 2000 mg/kg を５週齢の Crj:CD (SD) IGS 系雌雄ラットに単回経口投与した結果、以下の知見が得られた。

1．死亡例は雌雄のいずれにも認められず、LD_{50} 値は 2000 mg/kg を超えると推察された。

2．一般状態、体重推移、剖検および病理組織学的検査では、フタルイミド投与による影響は認められなかった。

緒　言

フタルイミド（CAS No.85-41-6）は染料、薬品およびゴムなどの原料であり、thalidomide、その他、殺菌剤である captan、captafol および folpet と類似の化学構造をもつ[1)]。今回、OECD 既存化学物質の安全性点検事業の一環として、フタルイミドをラットに単回経口投与し、死亡状況、一般状態などを観察し、その毒性を検討した。

なお、本試験は「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第 4 条に規定する試験施設に関する基準」（昭和 59 年 3 月 31 日環保業第 39 号環境庁企画調整局長・薬発第 229 号厚生省薬務局長・59 基局第 85 号通商産業省基礎産業局長連名通知および昭和 63 年 11 月 18 日同改正通知）に従い、試験方法は OECD 試験法ガイドライン「OECD Guideline for Testing of Chemicals ; Acute Oral Toxicity (401)」(1987)に準拠した。

材料および方法

1．被験物質

被験物質は、フタルイミド（Phthalimide、以下 PHI と略す、CAS No.85-41-6、ロット番号：　　純度：99.9%）で、白色～うすい黄色の結晶性粉末である。PHI は遮光気密容器に入れ、冷蔵庫内（4～8℃）に保存した（Appendix 1～3）。なお、投与終了後の被験物質の安定性を製造業者が分析し、投与期間中の被験物質の安定性を確認した（Appendix 4）。

2．投与量の設定

本試験の投与量設定のために実施した予備試験の成績をもとに設定した。すなわち、マウスにおける経口投与による LD_{50} 値が 5000 mg/kg（REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES, 1981-1982、Appendix 1 より）であることから、予備試験では急性経口投与毒性試験の限界試験における最高投与量である 2000 mg/kg ならびに媒体である１％カルメロースナトリウム水溶液（以下、１％CMC-Na と略す）を投与する対照群の計２群を設定し、１群あたり雌雄各５匹のラットに投与した。その結果、投与後７日間の観察において、死亡例は認められず、一般状態、体重推移および剖検で異常は認められなかった。したがって、限界試験として 2000 mg/kg の１用量を投与する群と、媒体である１％CMC-Na を投与する対照群の計２群を設定した（Table 1）。

3．被験物質の調製

使用当日に、被験物質を精秤し、200 mg/ml の濃度となるように１％CMC-Na に懸濁した。200 mg/ml の PHI 調製液は規定の濃度であることが財団法人日本食品分析センターにより確認された。また、財団法人日本食品分析センターによる被験物質調製液の安定性試験の結果、１および 200 mg/ml の調製液について室温保存で調製後 3 時間、冷蔵（約 5℃）保存で調製後 7 日間の安定性が確認された（Appendix 5）。

4．対照物質

CMC-Na（日本薬局方、ロット番号：5516、丸石製薬株式会社）を精秤し、１％(W/V)の濃度となるように日本薬局方精製水（ロット番号：72V1、ヤクハン製薬株式会社）に溶解した。

5．試験系

生後４週齢の Crj:CD（SD）IGS 系の SPF ラット（雄：13 匹、体重範囲 78～84 g、雌：13 匹、体重範囲 73～82g）を、日本チャールス・リバー株式会社より受け入れ、8 日間の馴化飼育を行った。検疫および馴化期間中、一般状態観察を１日１回、体重測定を３回（馴化１、５および８日）実施し、異常がなく、順調な発育を示した動物を試験に用いた。

6．飼育環境条件

動物は、バリアシステム内で温度 22～24℃、湿度 RH 42～62%、換気回数 10～15 回／時間および照明時間 12 時間（午前８時から午後８時まで点灯）の飼育室 310 号室において、ブラケット式金属製金網床ケージ（260W×380D×180H, mm）を用いて行った。ケージあたりの収容匹数は、群分け前は５匹以内、群分け後は１匹とした。ケージの交換は群分け時に１回行った。

飼育室内の清掃および床の清拭消毒は１日１回行った。なお、消毒には塩素系消毒薬（ヤクラックス、ヤクハン製薬株式会社）およびヨウ素系消毒薬（ダイヤザン、伊勢化学工業株式会社）を１週間単位で交互に使用した。

飼料はγ線照射固型飼料（CRF-1、Lot No.971112、オリエンタル酵母工業株式会社）を金属製給餌器を用いて、飲料水は水道水（札幌市水道水）を自動給水装置を用いて、それぞれ自由に摂取させた。給餌器の交換は群分け時に１回、自動給水装置の水抜きは週１回の頻度で実施した。

飼料の分析および検査は財団法人日本食品分析センター（Appendix 6）およびオリエンタル酵母工業株式会社（Appendix 7）で実施し、混入物質について試験施設の SOP の許容範囲内であることを確認した。飲料水の水質検査は日本衛生株式会社（Appendix 8）で実施し、試験施設の SOP の水質基準の範囲内であることを確認した。

7．群分けおよび個体識別

群分けは、馴化期間の最終日（投与前日）に各群の体重が均一になるように体重層別化無作為抽出法により行った。

動物の識別は、受け入れ時および群分け時に尾部に油性フェルトペンを用いて行い、性別毎に色分けしたカードに試験番号、試験群および動物番号を明記し、ケージに標示した。

8．投与方法

投与経路は、被験物質が人体に経口的に曝露される可能性があることから、経口投与とした。投与は、動物を約 16～18 時間絶食させた後、胃ゾンデを用いて強制的に胃内に１回行った。投与容量は、体重 1 kg あたり 10 ml として投与日に測定した体重に基づいて算出した。

投与時の週齢は雌雄ともに５週齢で、その平均体重（体重範囲）は雄で 130.2g（127～135g）、雌で 107.8g（105～111g）であった。投与時刻は午前９時から午後２時の間とした。

9．観察、測定および検査項目

(1) 一般状態観察

全例について、投与日は投与後６時間までは継続して、投与後１日以降は１日１回の頻度で投与後 14 日の剖検日まで観察した。各群の雌雄毎に投与後 14 日までの死亡率（死亡例数／群あたり動物数）を算出した。

(2) 体重測定

全例について、投与日を０日と起算し、0、1、3、5、7、10 および 14 日に電子天秤（ザルトリウス 1401 B MP7-2 および 1407 MP8-1、カールツァイス株式会社）を用いて測定した。得られた測定値から、体重増加量［14 日体重－0 日体重］および体重増加率［（体重増加量／0 日体重）×100］を算出した。

(3) 剖検

全例について、投与後 14 日に体外表を観察した後、エーテル麻酔下で放血致死させ、全身の器官・組織を肉眼的に観察した。その後、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、脳（大脳・小脳）、胃（前胃・腺胃・幽門部）、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸および卵巣を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定、保存し、精巣および精巣上体はブアン液で固定し、70 %エタノールで保存した。

(4) 病理組織学的検査

対照群および PHI 投与群の雌雄各２例の摘出器官をパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、病理組織学的検査を行った。

10. 統計学的評価

体重値、体重増加量および体重増加率について、Bartlett の検定法により等分散性を検定し、その結果、等分散（$p > 0.05$）の場合は一元配置分散分析法で解析し、有意な場合（$p \leqq 0.10$）、Dunnett の検定法（各試料の大きさが違う場合は有効反復数を用いた）で対照群と PHI 投与群との比較を行った。一方、不等分散（$p \leqq 0.05$）を示した場合は Kruskal-Wallis 法を用いて解析し、有意な場合（$p \leqq 0.10$）、Mann-Whitney のU-検定法で対照群と PHI 投与群との比較を行った。

対照群との検定に際しては、有意水準を５％とした。

成　　績

1．死亡状況およびLD_{50}値

死亡状況およびLD_{50}値を Table 2 に示す。

雌雄ともに、いずれの群においても死亡は認められなかった。

2．一般状態

一般状態の成績を Table 3、INDIVIDUAL DATA 1-1-1～1-2-2 に示す。

いずれの例にも異常は認められなかった。

3．体重推移

体重推移を Figure 1、2、Table 4、5、INDIVIDUAL DATA 2-1-1～2-2-2 に示す。

雌雄の 2000 mg/kg 群に、対照群と比較して有意差は認められず、体重推移に異常は認められなかった。

4．剖検

剖検の成績を Table 6、INDIVIDUAL DATA 3-1-1～3-2-2 に示す。

2000 mg/kg 群の雌 1 例の右卵管に嚢胞が認められた。

その他の例に異常は認められなかった。

5．病理組織学的検査

病理組織学的検査の成績を Table 7、INDIVIDUAL DATA 4-1-1～4-2-2 に示す。

雌では、剖検で卵管に嚢胞が認められた 2000 mg/kg 群の 1 例で卵管の軽度の嚢胞状拡張が認められた。

雄では、2000 mg/kg 群の 1 例で腎臓に尿細管上皮の軽度の限局性再生が認められた。

その他に、検査を実施した各群の雌雄各 2 例に異常は認められなかった。

考　察

PHI の 2000 mg/kg を５週齢の Crj:CD (SD) IGS 系雌雄ラットに単回経口投与し、その毒性を検討した。

死亡例は雌雄のいずれにも認められず、LD_{50} 値は 2000 mg/kg を超えると推察された。

一般状態、体重推移、剖検および病理組織学的検査で PHI 投与による影響は認められなかった。

2000 mg/kg 群で雄 1 例に腎臓の尿細管上皮の限局性再生、雌 1 例に卵管の嚢胞状拡張が認められた。これらはいずれも自然発生的にも認められる所見であること、卵管の嚢胞状拡張についてはその他の内分泌器官および生殖器官に異常が認められないことから、PHI の単回経口投与による影響とは考えられなかった。

参考文献

1）寺本昭二：フタルイミド系殺菌剤，白須泰彦 編，“毒性試験講座 17　農薬、動物用医薬品”，p 44-46，株式会社地人書館，1991.

Figures

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

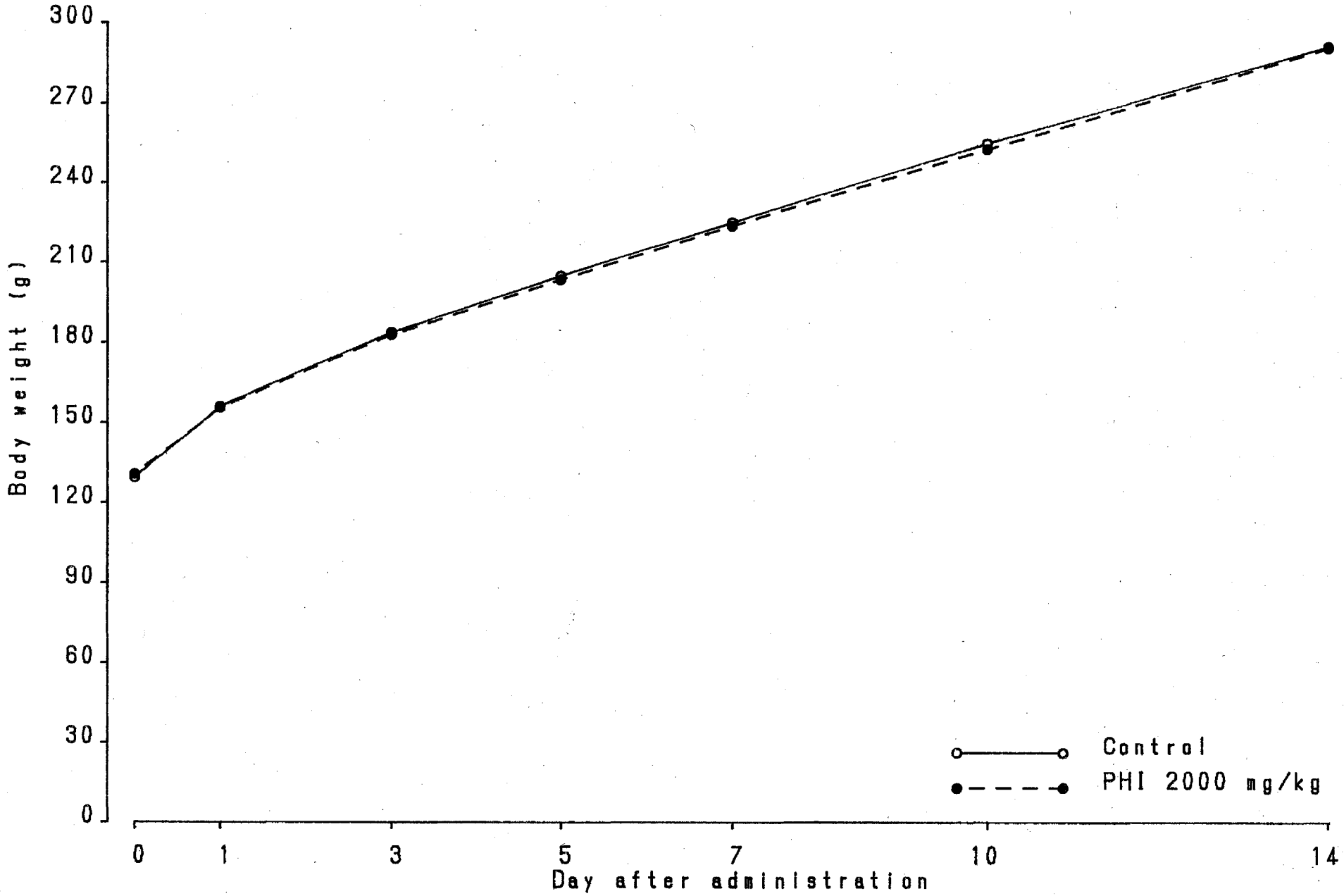

Figure 1. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

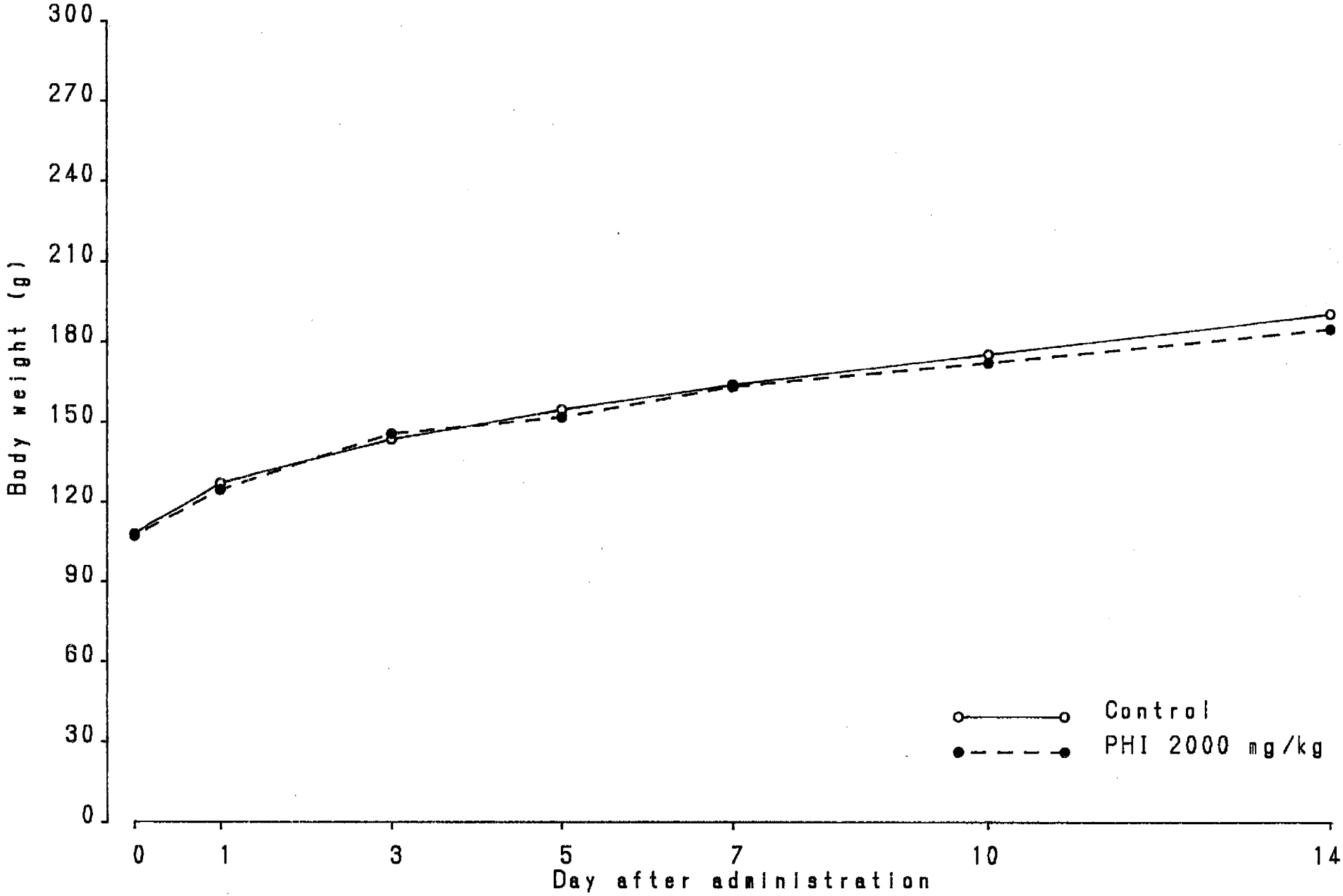

Figure 2. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Tables

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of PHI in rats (SR-9772)

Table 2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Table 1. Experimental design for acute oral toxicity test of PHI in rats (SR-9772)

Sex	Group	Concentration of PHI mg/ml	Volume ml/kg	No. of animals[a]
Male	Control[b]	0	10	5
	PHI 2000 mg/kg[c]	200	10	5
Female	Control	0	10	5
	PHI 2000 mg/kg	200	10	5

a: Crj:CD(SD)IGS rats were dosed orally at the age of 5 weeks.
b: Control was dosed with 1%CMC-Na.
c: PHI (Phthalimide) was suspended in 1%CMC-Na.

Table 2. Mortality and LD50 values of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Sex	Group	Distribution of dead animals			Mortality[b]	LD50 value (mg/kg)
		0	1	2-14[a]		
Male	Control	0	0	0	0/5	>2000
	PHI 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	
Female	Control	0	0	0	0/5	>2000
	PHI 2000 mg/kg	0	0	0	0/5	

a: Day after administration.
b: No. of dead animals / no. of animals dosed.

Table 3. General appearance of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Item	Male		Female	
	Control	PHI 2000 mg/kg	Control	PHI 2000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Abnormal findings	0[a]	0	0	0

a: Values are no. of animals with findings.

Table 4. Body weight changes of male rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	% a
Control	5	b 129.6 2.4	156.2 2.7	184.0 4.2	205.0 4.7	225.2 6.6	255.2 9.1	291.4 12.4	161.800 12.598	124.902 10.262
PHI 2000 mg/kg	5	130.8 2.6	155.8 3.4	183.2 7.1	203.6 6.9	224.0 9.3	253.0 10.5	290.8 13.0	160.000 11.489	122.294 7.843

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 5. Body weight changes of female rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Group	No. of animals	Day after administration							Body weight gain	
		0	1	3	5	7	10	14	Day 0-14	% a
Control	5	108.2 b 2.4	127.2 3.1	143.6 4.5	154.8 5.4	164.0 6.5	175.4 5.2	190.4 7.5	82.200 7.981	76.048 8.236
PHI 2000 mg/kg	5	107.4 2.9	124.8 2.9	145.8 4.3	152.0 5.3	163.4 6.7	172.2 12.1	184.8 13.4	77.400 12.422	72.054 11.261

a: (Body weight gain / body weight on day 0) x 100.
b: Values are means and S.D. thereunder, and expressed in gram.

Table 6. Gross findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Item	Male		Female	
	Control	PHI 2000 mg/kg	Control	PHI 2000 mg/kg
No. of animals examined	5	5	5	5
Organ : Findings				
Oviduct : Cyst, unilateral	a -	-	b 0	1

a: - = blank value.
b: Values are no. of animals with findings.

Table 7. Histopathological findings of rats in acute oral toxicity test of PHI (SR-9772)

Item		Male		Female	
		Control	PHI 2000 mg/kg	Control	PHI 2000 mg/kg
No. of animals examined		2	2	2	2
Organ : Findings[a]	Grade[b]				
Kidney : Regeneration, tubular epithelium, focal	+	0[c]	1	0	0
Oviduct : Dilatation, cystic	+	-[d]	-	-	1(1)[e]

a: There were no abnormal findings in the lung, forestomach, glandular stomach, duodenum, jejunum, ileum, cecum, colon, rectum, liver, heart, testis, epididymis, ovary, cerebrum, cerebellum or spleen.
b: + = slight change.
c: Values are no. of animals with findings.
d: - = blank value.
e: Values in parentheses are no. of animals examined.