

考 察

DCBS を 0、80、600 および 4500 ppm (F0 雄 ; 0、5.2、39、291 mg/kg/day : F0 雌 ; 0、7.2、54、416 mg/kg/day : F1 雄 ; 0、5.9、44、331 mg/kg/day : F1 雌 ; 0、7.4、55、417 mg/kg/day 相当) の濃度で基礎飼料に混合して、1 群当たり雌雄各 24 匹の Cr1:CD(SD) ラットに 2 世代にわたって摂取させ、親動物の繁殖能力と児動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。

1. 親動物について

一般状態では、600 および 4500 ppm 群の F0 雌で脱毛がみられたが、自然発生する種類の変化であり発生頻度も低かったことから、DCBS 投与に関連する変化とは考えられなかった。また、投与期間中、対照群を含む各群の F0 および F1 雌雄に不正咬合、切歯破折、顔面の変形、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染、外尿道口周囲被毛汚染などのケージ内事故に起因する所見がみられ、このうち 80 ppm 群の F0 雄 1 例は予後不良のため安楽死させた。そのほか、対照群で F1 雌 1 例が哺育 5 日に死亡しているのが発見されたが、剖検では異常はみられず偶発的な死亡と考えられた。

体重および体重増加量については、4500 ppm 群の F0 世代において、雄では投与期間を通じて、雌では投与開始直後および妊娠期間中または哺育期間中に有意な低値がみられ、DCBS 投与に関連する変化と考えられた。また、F0 世代の雌では、哺育 0-21 日の体重増加量に有意な高値がみられたが、この変化は哺育 0 日の体重が対照群より著しく低い値であったのに対し、哺育 21 日に対照群との差が縮まったことによるものと考えられた。このほか、80 および 600 ppm 群の F0 世代の雌で一時的に有意な高値がみられたが、用量相関性を欠き、また F1 世代で同様の変化がみられないことから毒性学的な意味はないと考えられた。

摂餌量については、4500 ppm 群の雄の F0 世代でほぼ投与期間を通じて、F1 世代で投与第 4 週に、雌の F0 世代で投与第 1 週および哺育 14-21 日に有意な低値がみられ、DCBS 投与に関連する変化と考えられた。このほか、80 および 600 ppm 群の F1 世代の雄に有意な低値がみられたが、一過性且つ用量相関性がみられないことから、偶発的な変動と考えられた。

親動物の繁殖能力に関する指標では、4500 ppm 群の F1 世代において精子頭部の振幅に有意な低値がみられたが、精子数・形態等の他の指標に変化がみられないことや繁殖成績に影響がないことから、この変化の毒性学的意義は不明であった。その他の項目には、F0 および F1 世代のいずれの被験物質投与群においても、DCBS 投与に関連する変化は認められなかった。

F1 世代の性成熟のうち雄の包皮分離については、4500 ppm 群で分化完了の平均日齢に有意な延長がみられたが、完了日の体重に対照群との間に有意差がなかったことから身体発育の抑制に伴う変化と考えられた。一方、雌の膈開口については、600 および 4500 ppm 群で分化完了の平均日齢の有意な延長がみられたことに加えて、完了日の体重にも有意な高値がみられた。こ

の遅延は DCBS 投与に関連する変化と考えられ、身体発育の抑制以外の作用機構があるものと推察された。さらに離乳児の子宮重量に、F1 児で 4500 ppm 群の絶対重量、F2 児で 600 および 4500 ppm 群の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。未成熟ラットの膣開口はエストロゲンの投与によって早まることから、そのプロセスにはエストロゲンが関与していると考えられており⁸⁾、またエストロゲンは未成熟ラットの子宮重量を増加させる作用を有するが、同時にエストロゲンアンタゴニストを投与するとその作用が抑制されることが知られている⁹⁾。従って、本試験における膣開口の遅延および離乳児の子宮重量の低値は DCBS の抗エストロゲン作用を示唆するものと考えられた。しかし、F0 および F1 親動物の血清中の性腺刺激ホルモンおよび性ホルモン濃度に影響はみられず、繁殖能力あるいは卵巣および子宮重量に変化がみられなかったため、その作用は軽微なものであると考えられた。

F1 雌雄の自発運動量には、被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。水迷路試験では、雌の 600 および 4500 ppm 群で試行 2 日目 (T 型水迷路 1 日目) の目標地点への到達時間の有意な高値および 4500 ppm 群で同日の過誤回数の有意な高値がみられた。しかし、試行 3 日目 (T 型水迷路 2 日目) 以降ではこれらの項目に対照群と有意な差がないことから、600 および 4500 ppm 群の雌の水迷路試験における影響は軽微なものであると考えられた。

血液学的検査では、F0 雄の 4500 ppm 群および F1 雌の 600 ppm 群のリンパ球の割合が有意に増加したが、世代間の一貫性または用量相関性に欠けることから DCBS 投与と関連のない変化と考えられた。

血液化学的検査の結果には、被験物質投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

ホルモンレベルについては、F1 雄の 80 ppm 群でテストステロンに対照群と比較して有意な高値が、600 ppm 群で LH 濃度に有意な高値がみられたが、用量相関性に欠けることからいずれも DCBS 投与と関連のない変化と考えられた。

剖検では、不正咬合、腎盂拡張、回腸の憩室等の所見が散見されたが、いずれも発生頻度が低く DCBS 投与との関連性はないと考えられた。また、F0 雌の 80 および 600 ppm 群で異常所見の総発生頻度の有意な低値がみられたが、低値であることから毒性学的意味はないと考えられた。

器官重量については、4500 ppm 群で肝臓の絶対重量に F1 雌雄で、相対重量に F0 雄および F1 雌雄で有意な高値または高値傾向がみられた。肝臓重量の高値は用量設定試験⁶⁾においても雌では 6000 ppm 以上の用量で、雄では 10000 ppm 群でみられており、DCBS 投与に関連した変化と考えられたが、病理組織学的検査では変化がみられなかったことから影響は組織学的変化を起こさない程度の軽微なものであったと考えられた。また、4500 ppm 群の腎臓の相対重量に F0 および F1 雌雄で、副腎の絶対および相対重量に雌の両世代で有意な高値または高値傾向がみられた。腎臓および副腎については、用量設定試験⁶⁾において雌雄の腎臓および雌の副腎重量の高値が 10000 ppm 群でみられており、また反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験⁵⁾の病理組

組織学的検査において雄の腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴および雌の腎臓の近位尿細管上皮の脂肪変性の発生頻度の増加が100 mg/kg/day以上の用量で、雌の副腎の皮質細胞空胞化の発生頻度の増加が400 mg/kg/dayの用量で報告されている。しかし、本試験では4500 ppm群の雌雄とも副腎の組織に異常はみられず、腎臓では同様の所見が雄で観察されたが、その出現頻度に対照群と4500 ppm群との間で有意差は認められなかったことから、重量変化の毒性学的意義は不明であった。このほか、精嚢の絶対および相対重量に4500 ppm群のF1雄で有意な低値（絶対重量2.07g；相対重量0.333%）がみられたが、病理組織学的検査で異常がみられなかったことに加えて、当試験機関における背景データ（絶対重量1.90～2.40g；相対重量0.319～0.427%）の範囲内に含まれていることからDCBS投与との関連性はないと考えられた。80 ppm群のF1雄で胸腺の絶対および相対重量に、80または600 ppm群のF0またはF1雌で脳、下垂体および脾臓の絶対または相対重量に変動がみられたが、いずれも用量相関性に欠けるためDCBS投与との関連性はないと考えられた。4500 ppm群ではF1雄で脳の絶対重量に有意な低値（2.21g）がみられたが、相対重量に低値がみられないことと、当試験機関における背景データ（2.18～2.28g）の範囲内に含まれていることから毒性学的に意味のない変化と考えられた。また、同群のF0雌または雄で脳、甲状腺および精巣の相対重量の有意な高値、脾臓および副腎の絶対重量の有意な低値がみられたが、これらは剖検時の体重の低値に起因する二次的変化と考えられた。

病理組織学的検査では、いずれの器官にもDCBS投与に関連すると考えられる異常所見の増加はみられなかった。

4500 ppm群のF1雌の原始卵胞数では、DCBS投与に関連した変化は認められなかった。

2. 児動物について

一般状態では、生後0日の死亡の発生頻度がF2雄の4500 ppm群で有意に増加したが、雌雄合計した全児の生後0日の生存率は対照群との間で有意差がなかったことから死亡が偶然雄に偏ったものと考えられた。また、F2雌の80 ppm群で生後0日の死亡の発生頻度が有意に低下したが、低下であることから毒性学的に意味のない変化と考えられた。その他に被験物質投与群で痂皮あるいは小眼球がみられたが、いずれも発生頻度が低いことからDCBS投与との関連性はないと考えられた。

F1およびF2児の産児数、性比、生存率、肛門生殖突起間距離および反射反応性検査では、いずれの被験物質投与群においても対照群との間で有意な差はみられなかった。

児動物の体重では、4500 ppm群において生後0日にはF1およびF2雌雄とも対照群の値とほぼ同じであったが、生後4日以降にDCBS投与に関連すると考えられる体重増加抑制が認められ、F1雌雄で生後4、7、14および21日に、F2雄で生後7、14および21日に、F2雌で生後14および21日に、ならびにF1およびF2雌雄の剖検日（生後26日）に有意な低値がみられた。

哺育児の発育分化では、耳介開展の完成率および眼瞼開裂の平均完成日齢にはDCBS投与の影

響はみられなかったが、切歯萌出の平均完成日齢に4500 ppm群のF2雌雄で有意な高値が認められ、体重増加抑制に起因する遅延と考えられた。このほか、80 ppm群のF1およびF2児の雌雄で切歯萌出の平均完成日齢に有意な高値がみられたが、用量相関性に欠けることからDCBS投与とは関連のない変化と考えられた。

哺育途中または離乳後生後26日（剖検日）までに死亡した児、生後4日に選抜されなかった児および離乳児の剖検では、600 ppm群のF2離乳児で雄の腎盂拡張の発生頻度および雌の異常所見の総発生頻度が有意に増加したが、用量相関性がみられないことから毒性学的な意味はないと考えられた。その他の所見は、いずれも発生頻度が低くDCBS投与との関連性はないと考えられた。

離乳児の器官重量については、肝臓の相対重量に600および4500 ppm群のF1およびF2児の雄または雌で有意な高値、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に4500 ppm群のF1およびF2児の雌雄で有意な低値または低値傾向がみられた。しかし、病理組織学的検査においてこれらの器官に異常が全く観察されなかったことから、重量変化の毒性学的な意義は不明であった。このほか、F1またはF2児の80 ppm群の雄または雌で腎臓、胸腺および脾臓の重量に変動がみられたが、いずれも用量相関性がないことからDCBS投与との関連性はないと考えられた。また、600 ppm群でF1児の雌の卵巣の絶対重量に有意な低値、F2児の雌雄の腎臓の相対重量に有意な高値がみられたが、絶対または相対重量のみの変化であり世代間の一貫性もみられないことから偶発的な変動と考えられた。4500 ppm群では、F1またはF2離乳児の雄または雌で脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣上体、前立腺、卵巣の絶対重量の有意な低値、脳、腎臓、精巣の相対重量の有意な高値がみられたが、いずれも体重の低値に起因する二次的変化と考えられた。

以上の結果から、DCBS投与のF0およびF1親動物に対する一般毒性的影響に関して、600 ppm以上の用量でF1雌の水迷路試験における影響、4500 ppmで雌雄の体重の増加抑制および摂餌量の抑制、雌雄の肝臓および腎臓重量ならびに雌の副腎重量の高値がみられた。繁殖能力については、600 ppm以上の用量でF1雌、4500 ppmのF1雄の性成熟を遅らせたが、成熟後の繁殖能力には4500 ppmの用量まで影響を及ぼさなかった。一方、F1およびF2児動物に対しては、600 ppm以上の用量で雌雄の肝臓重量の高値および雌の子宮重量の低値、加えて4500 ppmでは哺育期間中の児動物の体重増加抑制ならびに胸腺および脾臓重量の低値がみられた。

したがって、DCBSを2世代にわたってラットに投与した場合、親動物に対する一般毒性的影響に関しての無毒性量、親動物の繁殖能力に対する無毒性量および児動物に対する無毒性量はいずれも80 ppm (5.2 mg/kg/day相当) であると結論される。

参考文献

- 1) 平成10年度 既存化学物質の製造・輸入量に関する実態調査, 通商産業省, 1999.
- 2) IUCLID (International Uniform Chemical Information Data Base) Data Set, EU, 2000.
- 3) 環境省環境保健部環境安全課監修, 化学物質と環境, 2001.
- 4) Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie, Toxikologische Bewertung Heidelberg. *N,N*-Dicyclohexyl-2-Benzothiazolsulfenamid. 242. 1994.
- 5) 厚生省生活衛生局企画課生活化学安全対策室 化学物質点検推進連絡協議会, 化学物質毒性試験報告 3:435-462. 1996.
- 6) *N,N*-ジシクロヘキシル-2-ベンゾチアゾールスルフェンアミドのラットにおける2世代繁殖毒性試験: 用量設定試験 (試験番号 SR05241P)、最終報告書、株式会社化合物安全性研究所、2006年.
- 7) Biel WC. Early age differences in maze performance in the albino rat. *J Genet Psychol.* 56:439-453. 1940.
- 8) Critchlow V and Bar-Sela M. Control of the onset of puberty. *In: Martini L, Ganong WF(eds.), Neuroendocrinology II.* New York, Academic Press, pp.101-162. 1967.
- 9) Geiser AG, Hummel CW, Draper MW, Henck JW, Cohen IR, Rudmann DG, Donnelly KB, Adrian MD, Shepherd TA, Wallace OB, McCann DJ, Oldham SW, Bryant HU, Sato M and Dodge JA. A new selective estrogen receptor modulator with potent uterine antagonist activity, agonist activity in bone, and minimal ovarian stimulation. *Endocrinology* 146:4524-4535. 2005.

Two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (SR05241)

Figures

- 1 Outline of the two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 2 Body weights of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 3 Body weights of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 4 Body weights of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 5 Body weights of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 6 Food consumption of F0 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 7 Food consumption of F1 parental male rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 8 Food consumption of F0 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 9 Food consumption of F1 parental female rats in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 10 Body weights of F1 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)
- 11 Body weights of F2 rat pups in the two-generation reproductive toxicity study with N,N-Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)