

既存化学物質の人健康影響に関する情報(第一種特定化学物質審議関係)

(平成 20 年 10 月 24 日)

No.24 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 p.1

表題：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

試験番号：SR05241

試験目的：この試験は、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の繁殖能力に及ぼす影響の有無を2世代にわたって評価するために行われた。

試験実施基準 (GLP) および試験法ガイドライン

試験実施基準 (GLP)：「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」
(平成15年11月21日薬食発第1121003号・平成15・11・17製局第3号・
環境企発第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) および『「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」の一部改正について』
(平成17年4月1日 薬食発第0401003号・平成17・03・04製局第1号・
環境企発第050401003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)。

試験法ガイドライン：経済協力開発機構の「OECD Guideline for Testing of Chemicals;
Two-Generation Reproduction Toxicity Study (416)」(22nd January
2001)。

試験委託者

名称：国立医薬品食品衛生研究所
所在地：東京都世田谷区上用賀1-18-1 (〒158-8501)
委託責任者：江馬 眞

試験施設

名称：株式会社 化合物安全性研究所
所在地：札幌市清田区真栄363番24 (〒004-0839)
運営管理者：一花 次夫 (2006年4月19日まで)
木口 雅夫 (2006年4月20日以降)

要 約

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 (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。

親動物に対する被験物質投与の一般毒性的影響については、80 ppm 群では一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、自発運動量、水迷路試験、血液学的検査、血液化学的検査、ホルモンレベル、剖検および器官重量のいずれの検査項目においても認められなかった。

600 ppm 群では、水迷路試験において F1 雌の T 型水迷路 1 日目の目標地点への到達時間に有意な高値がみられた以外に変化はみられなかった。

4500 ppm 群では、いずれの世代においても一般状態に DCBS 投与に関連する変化はみられなかったが、体重および体重増加量に 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た。一方、雌の哺育 0-21 日の体重増加量に有意な高値がみられた。F1 世代では雌雄とも有意な差はみられなかった。摂餌量については雄の 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た。器官重量では肝臓の絶対重量に F1 雌雄で、相対重量に F0 雄および F1 雌雄で、副腎の絶対および相対重量に雌の両世代で、腎臓の相対重量に F0 および F1 雌雄で有意な高値または高値傾向がみられたが、これらの器官の病理組織学的検査では変化はみられなかった。F1 雌の原始卵胞数には対照群との間に有意差はみられなかった。また、水迷路試験において F1 雌の T 型水迷路 1 日目の目標地点への到達時間および過誤回数の有意な高値がみられた。

親動物の繁殖能力に対する影響は、80 ppm 群では認められなかった。600 および 4500 ppm 群では、F1 雌の膈開口の分化完了の有意な遅延および完了日の体重の有意な増加がみられ、離乳児の子宮重量に有意な低値がみられたことから抗エストロゲン作用の可能性が示唆された。F1 雄では、4500 ppm 群で包皮分離の分化完了に有意な遅延がみられたが、完了日の体重に有意な差は認められなかった。しかし、親動物の繁殖成績、ホルモンレベルあるいは雌雄の生殖器官の重量には影響はみられなかった。また、精子検査で 4500 ppm 群の F1 雄の精子頭部の振幅に有意な低値がみられたが、他の指標に変化はみられなかった。

児動物に対する被験物質投与の影響は、80 ppm 群では一般状態、生存率、産児数、性比、肛門生殖突起間距離、体重、発育分化、反射反応性検査、剖検および器官重量のいずれの検査項目においても認められなかった。

600 ppm 群では、肝臓の相対重量に F1 雄および F2 雄雌で有意な高値、子宮の絶対および相対重量に F2 雌で有意な低値がみられた。

4500 ppm 群では、F1 雌雄の生後 4 日以降、F2 雄の生後 7、14 および 21 日、F2 雌の生後 14 および 21 日の体重ならびに F1 および F2 雌雄の剖検日（生後 26 日）の体重に有意な低値がみられた。切歯萌出の平均完成日齢に F2 雌雄で有意な高値が認められた。離乳児の器官重量については、肝臓の相対重量に F1 および F2 雌雄で有意な高値、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に F1 および F2 雌雄で有意な低値または低値傾向が見られたが、これらの器官の病理組織学的検査では変化はみられなかった。また、子宮の絶対または相対重量に F1 および F2 雌で有意な低値がみられた。

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。

成績

1. F0 および F1 親動物に対する影響

(1) 一般状態 (Table 1 および 2; INDIVIDUAL DATA 1-1-1~1-4-4)

雄では、対照群の動物に異常所見は観察されなかった。80 および 600 ppm 群の F0 世代の各 1 例および 4500 ppm 群の F1 世代の 1 例では、ケージ内事故に起因する不正咬合、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染がみられた。このうち 80 ppm 群の 1 例は、流涎、顔面の変形および腹部膨満もみられ衰弱が著しかったため投与 11 週に安楽死させた。

雌では、対照群の F0 世代で哺育期間に胸部の皮下腫瘍が 2 例に、ケージ内事故に起因する不正咬合、切歯破折、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染が 3 例にみられた。80 ppm 群では、異常所見は観察されなかった。600 ppm 群では、F0 世代で妊娠および哺育期間に脱毛が 1 例にみられた。4500 ppm 群では、F0 世代で妊娠または哺育期間に脱毛が 2 例に、F1 世代でケージ内事故に起因する不正咬合、外尿道口周囲被毛汚染、眼周囲または鼻部周囲被毛汚染が 3 例にみられた以外に異常は観察されなかった。

対照群の F1 世代の雌の 1 例が哺育 5 日に死亡しているのが発見された。この動物では、死亡前に一般状態の変化は認められず、剖検でも異常はみられなかった。その他に死亡した動物はみられなかった。

被験物質投与群でみられた各所見の発生頻度では、80 ppm 群の F0 雌で哺育期間における異常所見の総発生頻度が有意な低値であった以外に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

(2) 体重 (Figure 2~5; Table 3 および 4; INDIVIDUAL DATA 2-1-1~2-4-4)

雄の体重は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週から剖検日まで有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

雌の体重は、80 および 600 ppm 群では、600 ppm 群の F0 世代の妊娠 7 日に対照群と比較して有意な高値がみられた以外に、いずれの世代にも有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週および妊娠 7 日から剖検日に有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(3) 体重増加量 (Table 5 および 6; INDIVIDUAL DATA 3-1-1~3-4-4)

雄の体重増加量は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代において投与 0-1 週から剖検日まで有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

雌の体重増加量は、80 および 600 ppm 群では、F0 世代の 80 ppm 群の投与 0-2 週および 600 ppm 群の妊娠 0-7 日に対照群と比較して有意な高値がみられた以外に、いずれの世代にも有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与 0-1 週、妊娠 0-7、0-14、0-20 日および投与 0 週-剖検日に有意な低値がみられ、一方哺育 0-21 日に有意な高値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(4) 摂餌量 (Figure 6~9; Table 7 および 8; INDIVIDUAL DATA 4-1-1~4-4-4)

雄の摂餌量は、80 ppm 群では F1 世代の投与第 4 から 7 週、600 ppm 群では F1 世代の投与第 6 週に有意な低値がみられた以外に、対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 から 8 週まで、第 13 および 14 週に、F1 世代の投与第 4 週に有意な低値がみられた。

雌の摂餌量は、80 および 600 ppm 群では、F0 および F1 世代とも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代の投与第 1 週および、哺育 14-21 日に有意な低値がみられた。F1 世代では有意な差はみられなかった。

(5) 被験物質摂取量 (Table 9 および 10)

投与期間中の各投与群の平均被験物質摂取量 (mg/kg/day) は、F0 雄、F1 雄、F0 雌および F1 雌の順にそれぞれ次のような結果であった。80 ppm 群で 5.2、5.9、7.2 および 7.4、600 ppm 群で 39、44、54 および 55、4500 ppm 群で 291、331、416 および 417 であった。

(6) 繁殖能力

1) 性周期 (Table 11; INDIVIDUAL DATA 5-1-1~5-2-4)

雌の正常性周期出現率および発情期間隔には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

2) 交尾率、受胎率、出産率、着床数および分娩率 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

雌雄の交尾率および受胎率ならびに雌の出産率、着床数および分娩率には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

3) 交尾までの所要日数 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

交尾までの所要日数には、いずれの世代においても被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

4) 妊娠期間 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

雌の妊娠期間には、いずれの世代においても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。

(7) 精巣の精子頭部数、精巣上体の精子の数、運動能および形態 (Table 13 および 14;

INDIVIDUAL DATA 7-1-1~7-2-4 および 8-1-1~8-2-4)

精巣の精子頭部数、精巣上体の精子数、精子運動率、良好精子率、遊泳速度、精子の遊泳パターンならびに精巣上体における異常形態精子率には、4500 ppm 群で F1 世代の精子頭部の振幅 (ALH) に有意な低値がみられた以外に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。

(8) 性成熟 (Table 15; INDIVIDUAL DATA 9-1~9-4)

F1 世代の雄の包皮分離完了の平均日齢および完了日の体重には、80 および 600 ppm 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では完了の平均日齢に有意な延長がみられたが、完了日の体重には有意な差はみられなかった。

F1 世代の雌の膈開口完了の平均日齢および完了日の体重には、80 ppm 群では対照群と比較して有意な差はみられなかった。600 および 4500 ppm 群では、完了の平均日齢の有意な延長および完了日の体重の有意な高値がみられた。

(9) 自発運動量 (Table 16 および 17; INDIVIDUAL DATA 10-1-1~10-2-4)

F1 世代の雌雄とも、いずれのデータの収集間隔においても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。

(10) 水迷路試験 (Table 18 および 19; INDIVIDUAL DATA 11-1-1~11-2-8)

F1 世代の雄では、いずれの項目にも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。

F1 世代の雌の 80 ppm 群では、いずれの項目にも対照群との間に有意な差はみられなかった。600 および 4500 ppm 群では、試行 2 日目 (T型水迷路 1 日目) の目標地点への到達時間に対照群と比較して有意な高値がみられ、このうち 4500 ppm 群では同日の過誤回数にも有意な高値がみられた。しかし、試行 3 および 4 日目には、いずれの項目にも有意な差はみられなかった。

(11) 血液学的検査 (Table 20 および 21; INDIVIDUAL DATA 12-1-1~12-4-4)

雄の 80 および 600 ppm 群では、検査した項目に F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm 群では、F0 世代のリンパ球の割合に有意な増

加がみられた。

雌の 80 ppm 群では、F0 および F1 のいずれの世代にも対照群と比較して有意な差はみられなかった。600 ppm 群では F1 世代のリンパ球の割合に有意な増加がみられたが、4500 ppm 群ではいずれの項目にも有意な差はみられなかった。

(12) 血液化学的検査 (Table 22 および 23; INDIVIDUAL DATA 13-1-1~13-4-4)

F0 および F1 世代の雄雌とも、いずれの項目にも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(13) ホルモンレベル (Table 24 および 25; INDIVIDUAL DATA 14-1-1~14-4-4)

雄の 80 ppm 群では F1 世代においてテストステロンに対照群と比較して有意な高値、600 ppm 群では F1 世代において LH 濃度に有意な高値がみられたが、4500 ppm 群ではいずれの項目にも変化はみられなかった。

雌では、F0 および F1 世代ともいずれの項目にも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(14) 病理学的検査成績

1) 剖検所見 (Table 26 および 27; INDIVIDUAL DATA 15-1-1~15-4-4)

交尾不成立または交配相手雌が妊娠不成立であった雄では、対照群の F1 世代において 1 例に腎盂拡張、80 ppm 群の F0 世代において投与 11 週に安楽死させた 1 例に切歯不正咬合、鼻骨の骨折および胃~盲腸のガス貯留が観察された。

妊性の確認された雄では、F0 または F1 世代の対照群を含む各群で、切歯不正咬合、回腸の憩室、回腸の漿膜面白色腫瘍、回腸の粘膜肥厚、腸間膜リンパ節の腫大、腎盂拡張、腎盂内微細白色顆粒、精巣および精巣上体の萎縮、あるいは精囊の小型が 1~3 例に観察された。

被験物質投与群におけるこれらの所見の発生頻度では、いずれにも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

妊娠不成立、生存児を出産しなかった雌または哺育途中で全哺育児の死亡がみられた雌では、対照群の F0 世代において子宮角部黄白色粘液貯留、回腸の憩室、膈の閉鎖が 1~2 例に、4500 ppm 群の F1 世代において大脳の脳室拡張が 1 例に観察された。

離乳児の得られた雌では、F0 または F1 世代の対照群を含む各群で、皮下黄白色または灰白色腫瘍、甲状腺の無形成 (片側性)、胸腺の萎縮、腎盂拡張、尿管拡張、切歯破折または不正咬合、あるいは鼻骨変形が 1~3 例に観察された。

試験途中 (哺育期間) に死亡した対照群の 1 例では異常はみられなかった。

被験物質投与群における異常所見の総発生頻度に、F0 世代の 80 および 600 ppm 群で有意

な低値およびF1世代の4500 ppm群で有意な高値がみられたが、個々の所見の発生頻度ではいずれも対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2) 器官重量 (Table 28 および 29; INDIVIDUAL DATA 16-1-1~16-4-4)

雄の80および600 ppm群では、80 ppm群のF1世代で胸腺の絶対および相対重量に偶発的と考えられる有意な低値がみられた以外に、測定したいずれの器官にも有意な変化は認められなかった。一方、4500 ppm群では、肝臓でF0世代の相対重量、F1世代の絶対および相対重量に有意な高値がみられた。腎臓は両世代で相対重量に有意な高値がみられた。同群ではそのほかF0世代で剖検時の体重の有意な低値、脳、甲状腺および精巣の相対重量に有意な高値、脾臓および副腎の絶対重量に有意な低値がみられた。F1世代では脳の絶対重量および精囊の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。

雌の80および600 ppm群では、用量相関性の認められない変動として、F0およびF1世代で脳の絶対重量の有意な高値、F0世代で脾臓の相対重量の有意な低値がみられた。加えて80 ppm群のF0世代では下垂体の絶対重量にも有意な高値がみられた。一方、4500 ppm群では、肝臓でF1世代の絶対および相対重量に有意な高値または高値傾向がみられた。腎臓は両世代で相対重量に有意な高値がみられた。また、副腎では両世代で絶対および相対重量に有意な高値または高値傾向がみられた。同群ではそのほかF0世代で剖検時の体重の有意な低値、脳の相対重量に有意な高値、脾臓の絶対重量に有意な低値がみられた。その他の測定した器官には変化はみられなかった。

3) 病理組織学的検査 (Table 30 および 31; INDIVIDUAL DATA 17-1-1~17-4-4)

対照群および4500 ppm群の雄全例の検査では、肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、尿細管上皮の再生、硝子円柱および前立腺の炎症性細胞浸潤が、F0およびF1世代においてそれぞれ5~8例、14~24例、14~24例、1~8例、2~5例および12~17例に観察された。その他に、F0またはF1世代において、対照群で腎盂粘膜の炎症性細胞浸潤、腎臓の嚢胞、腎盂拡張、精巣の精細管の萎縮、精巣上体の精子減少および管腔内細胞残屑、下垂体前葉の嚢胞、下垂体中間葉の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、4500 ppm群で腎臓の嚢胞、腎臓乳頭部鉍質沈着、腎盂拡張、精巣の精細管の萎縮、精巣上体の精子減少および管腔内細胞残屑、下垂体前葉の嚢胞、あるいは下垂体中間葉の管状過形成が1~2例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と4500 ppm群の間で有意な差は認められなかった。

80および600 ppm群の交尾不成立または交配相手雌が妊娠不成立であったF1雄の検査では、80 ppm群で肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、前立腺の炎症性細胞浸潤、600 ppm群で肝臓の小肉芽腫、腎臓の近位尿細管上皮の硝

子滴、近位尿細管上皮の好酸性小体、尿細管上皮の再生、前立腺の炎症性細胞浸潤、下垂体前葉の嚢胞が1~3例に観察された。

雄の肉眼的異常部位の検査では、600 ppm 群の F0 世代で回腸の扁平上皮嚢胞、回腸の炎症性細胞浸潤および腸間膜リンパ節のリンパ球過形成が観察された。

対照群および 4500 ppm 群の雌全例の検査では、肝臓の小肉芽腫が F0 および F1 世代においてそれぞれ 5~12 例に観察された。その他に、F0 または F1 世代において、対照群で尿細管上皮の再生、腎盂粘膜の炎症性細胞浸潤、腎盂粘膜の鉍質沈着、子宮角部の炎症性細胞浸潤、膣の閉鎖、下垂体中間葉の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、乳腺の腺癌、4500 ppm 群で尿細管上皮の再生、腎臓皮質の炎症性細胞浸潤、腎臓皮質の鉍質沈着、腎臓皮髄境界部の鉍質沈着、尿細管の拡張、硝子円柱、腎臓の嚢胞、下垂体中間葉の管状過形成、乳腺の腺癌、あるいは胸腺皮質の萎縮が 1~2 例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と 4500 ppm 群の間に有意な差は認められなかった。

80 および 600 ppm 群において妊娠不成立、生存児を出産しなかった雌または性周期に異常のみられた F1 雌の検査では、80 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、600 ppm 群で肝臓の小肉芽腫、尿細管上皮の再生、腎盂拡張および下垂体中間葉の嚢胞が観察された。

対照群の哺育 5 日に死亡した雌では、異常は観察されなかった。

雌の肉眼的異常部位の検査では、4500 ppm 群の F1 世代で脳室拡張が観察された。

4) 原始卵胞数 (Table 32; INDIVIDUAL DATA 18-1~18-2)

4500 ppm 群における F1 世代の雌の原始卵胞数に、対照群と比較して有意な差は認められなかった。

2. F1 および F2 児動物に対する影響

(1) 一般状態 (Table 33 および 34; INDIVIDUAL DATA 19-1-1~19-4-4)

生後 0 日の観察では、F1 および F2 児の死亡が対照群を含む各群で 0.00~4.67% の発生頻度でみられ、その値は F2 雌の 80 ppm 群で有意に低下し、F2 雄の 4500 ppm 群で有意に増加した。その他に一般状態の変化はみられなかった。

生後 1-4 日の観察では、死亡 (母動物に食べられたためと思われる児の消失を含む) が、F1 および F2 児において、対照群を含む各群で 0.91~12.56% の発生頻度でみられた。その他に、対照群の F1 雌で前肢の創傷および痂皮、80 ppm 群の F2 雌で後肢の痂皮、600 ppm 群の F2 雄で耳介の痂皮が各 1 例にみられた。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と被験物質投与群の間に有意な差は認められなかった。

生後 5-21 日の観察では、死亡 (母動物に食べられたためと思われる児の消失を含む) が対照群を含む各群で 0.00~4.17% の発生頻度でみられた。その他に、80 ppm 群の F2 雄で小眼球

が1例に観察された。しかし、いずれの所見の発生頻度にも対照群と被験物質投与群の間で有意な差は認められなかった。

生後22-26日には、80 ppm群のF2雄で小眼球が1例、F1雌で死亡が2例観察されたが、いずれの所見の発生頻度にも対照群との間で有意な差は認められなかった。その他の動物には、一般状態の変化はみられなかった。

(2) 産児数 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2児の産児数には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(3) 性比 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2出産児の性比には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(4) 生存率 (Table 12; INDIVIDUAL DATA 6-1-1~6-2-4)

F1およびF2児の生後0、4および21日の生存率には、被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(5) 体重 (Figure 10および11; Table 35、43および44; INDIVIDUAL DATA 20-1-1~20-2-4
および26-1-1~26-4-4)

F1およびF2児の哺育期間の体重は、80および600 ppm群では雌雄とも対照群と比較して有意な差はみられなかった。4500 ppm群では、生後0日には雌雄とも対照群の値とほぼ同じであったが、生後4日以降体重増加の抑制がみられ、F1雌雄で生後4日以降に、F2雄で生後7、14および21日に、F2雌で生後14および21日に対照群と比較して有意な低値であった。さらに、4500 ppm群では、剖検日(生後26日)の体重にF1およびF2雌雄とも有意な低値がみられた。

(6) 肛門生殖突起間距離 (Table 36; INDIVIDUAL DATA 21-1-1~21-2-4)

F1およびF2児の生後4日における肛門生殖突起間距離には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(7) 発育分化 (Table 37; INDIVIDUAL DATA 22-1-1~22-2-4)

F1およびF2児の耳介開展の同腹哺育児の完成率および眼瞼開裂の同腹哺育児の平均完成日齢には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

切歯萌出の同腹哺育児の平均完成日齢では、80 ppm群のF1およびF2児の雌雄で有意な高値がみられたが、600 ppm群では有意な差はみられなかった。4500 ppm群ではF2児の雌雄において有意な高値がみられた。

(8) 反射反応性検査 (Table 38; INDIVIDUAL DATA 23-1-1~23-4-4)

F1 および F2 児の正向反射の成功率と反応時間、背地走性の達成率と反応時間および空中正向反射の成功率には、雌雄とも被験物質投与群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

(9) 病理学的検査成績

1) 剖検所見 (Table 39~42; INDIVIDUAL DATA 24-1-1~24-4-4 および 25-1-1~25-4-4)

生後 4 日に選抜されなかった哺育児あるいは生後 0-4 日の間に死亡した児の剖検の結果、F1 および F2 雄または雌において、対照群で肝臓黄白色化、消化管ガス貯留、腎盂拡張、尿管拡張、前肢の痲皮、前肢の欠指、80 ppm 群で肝臓黄白色化、消化管ガス貯留、後肢の痲皮、600 ppm 群で消化管暗赤色内容物、耳介の痲皮、4500 ppm 群で消化管ガス貯留、腎盂拡張がそれぞれ 1~2 例に観察された。被験物質投与群におけるこれらの所見の発生頻度には対照群と比較して有意な差は認められなかった。

離乳児 (生後 26 日) あるいは生後 5-26 日の間に死亡した児動物の剖検の結果、F1 および F2 雄または雌において、対照群で回腸の憩室、腎盂拡張、精巣および精巣上体の小型、80 ppm 群で小眼球、腺胃の多巣性粘膜微細暗赤色斑、回腸の憩室、腎盂拡張、膀胱の暗赤色内容物、600 ppm 群で回腸の憩室、腎盂拡張、4500 ppm 群で大脳の脳室拡張、消化管ガス貯留、腎盂拡張、精巣および精巣上体の小型がそれぞれ 1~6 例に観察された。これらの所見のうち、600 ppm 群の F2 雄で腎盂拡張の発生頻度および F2 雌で異常所見の総発生頻度が有意に増加したが、4500 ppm 群ではいずれの所見の発生頻度にも有意な差はみられなかった。

2) 器官重量 (Table 43 および 44; INDIVIDUAL DATA 26-1-1~26-4-4)

雄の 80 ppm 群では、用量相関性の認められない変動として、F1 児で腎臓の相対重量に有意な高値、F2 児で脾臓の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。600 および 4500 ppm 群では、肝臓の相対重量に F1 および F2 児とも有意な高値がみられ、腎臓の相対重量に F2 児で有意な高値がみられた。4500 ppm 群ではさらに、F1 および F2 児とも胸腺および脾臓の絶対および相対重量に有意な低値または低値傾向がみられた。同群ではこのほか、F1 および F2 児の剖検時の体重の有意な低値、F1 児で脳、肝臓、腎臓、副腎、精巣上体および前立腺の絶対重量に有意な低値、脳および精巣の相対重量に有意な高値、F2 児で副腎の絶対重量に有意な低値、脳の相対重量に有意な高値がみられた。

雌の 80 ppm 群では、用量相関性の認められない変動として、F1 児で腎臓の相対重量に有意な高値、F2 児で胸腺の相対重量に有意な低値がみられた。600 ppm 群では、F1 児で卵巣の絶対重量に有意な低値、F2 児で肝臓および腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。子宮では F2 児の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。4500 ppm 群では、F1 および F2 児とも肝臓の相対重量に有意な高値がみられ、胸腺および脾臓の絶対および相対重量に有意な

低値または低値傾向がみられた。子宮ではF1児の絶対重量およびF2児の絶対および相対重量に有意な低値がみられた。同群ではこのほか、F1およびF2児の剖検時の体重の有意な低値、F1児で脳、肝臓、腎臓、副腎および卵巣の絶対重量に有意な低値、脳の相対重量に有意な高値、F2児で脳の絶対重量に有意な低値、脳、腎臓の相対重量に有意な高値がみられた。

3) 病理組織学的検査 (Table 45; INDIVIDUAL DATA 27-1-1~27-4-2)

対照群および4500 ppm群のF1およびF2離乳児について検査した肝臓、脾臓および胸腺ではいずれの動物にも変化はみられなかった。

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で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で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、精囊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

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)

F0 generation		F1 generation	
Treatment week		Treatment week	
	Quarantine and acclimatization		Selection for F1 parental animals: 24 males and 24 females per dose level
	Assignment for F0 parental animals: 24 males and 24 females per dose level		
1	F0 dosing begins	1	F1 dosing begins
	Pre-mating growth period		Pre-mating growth period
9	Determination of estrous cycles		Sexual development
11	F0 breeding begins		Locomotor activity count
	Mating		Learning tests
	Gestation	9	Determination of estrous cycles
	Parturition	11	F1 breeding begins
	Lactation		Mating
	Physical and functional development of F1 pups		Gestation
	Standardization of litter sizes		Parturition
	Measurement of anogenital distance		Lactation
15	F0 male dosing end		Physical and functional development of F2 pups
	Serum hormone concentrations		Standardization of litter sizes
	Hematological and blood chemical examination		Measurement of anogenital distance
	Sperm motility, count and morphology	15	F1 male dosing end
	Gross necropsy		Serum hormone concentrations
	Organ weight, Histopathology		Hematological and blood chemical examination
17	Weaning of F1 offspring		Sperm motility, count and morphology
	Gross necropsy, Organ weight		Gross necropsy
	Histopathology		Organ weight, Histopathology
	F0 female dosing end	17	Weaning of F2 offspring
	Serum hormone concentrations		Gross necropsy, Organ weight
	Hematological and blood chemical examination		Histopathology
	Gross necropsy		F1 female dosing end
	Organ weight, Histopathology		Serum hormone concentrations
			Hematological and blood chemical examination
			Gross necropsy
			Organ weight, Histopathology

Figure 1 Outline of the two-generation reproductive toxicity study in rats with N,N- Dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) (SR05241)