

ジフェニルジスルフィドのラットを用いる単回経口投与毒性試験

Single Dose Oral Toxicity Test of Diphenyl disulfide in Rats

要約

ジフェニルジスルフィドを OECD Test Guideline 423; Acute oral toxicity test に従って 8~8.5 週齢の Crj:CD(SD)IGS 系雌ラットに強制経口投与し、その急性毒性を検討した。投与用量は第一回投与用量を 300 mg/kg とし、第二回、第三回および第四回投与用量はそれぞれ 300, 2000 および 2000 mg/kg とした。ジフェニルジスルフィドは 0.5 w/v% トラガントゴム水溶液に懸濁調製し、投与前日の夕方から絶食したラットに 10 mL/kg の投与容量で投与した。

300 mg/kg 群では、死亡・瀕死期解剖動物は認められず、一般状態、体重および剖検で異常は認められなかった。

2000 mg/kg 群では、第 4 日以降に消瘦、横臥位、円背位、自発運動の低下、緩徐呼吸あるいは体温低下が認められた。また、第 1 日から第 8 日に体重減少が認められた。その結果、第 8 日から第 10 日にかけて同群の 1 例が死亡し、2 例を瀕死期解剖した。死亡・瀕死期解剖動物の剖検では、腺胃の出血、前胃の隆起巣と壁の肥厚、胸腺の小型化、脾臓の小型化と暗赤色化、結腸の膨満、副腎の腫大、空腸の異常内容物および膀胱の着色尿(黄色)貯留が認められた。第 15 日まで生存した動物では、異常症状は第 14 日までに消失し、体重は第 8 日以降増加した。また、生存動物の剖検では、前胃の隆起巣および胸腺の小型化が認められた。

以上、ジフェニルジスルフィドを雌ラットに単回経口投与した結果、2000 mg/kg 群で 1/6 例が死亡し、2/6 例を瀕死期解剖した。従って、本試験条件下におけるジフェニルジスルフィドは GHS (Globally Harmonized Classification System) の基準で Category 4 (>300-2000 mg/kg) と分類された。

方法

1. 被験物質

Aldrich Chemical (USA) から提供されたジフェニルジスルフィド(純度:99.8%, ロット番号: 15322AB)を冷蔵、暗所、気密条件下で保存し、使用した。

被験物質を 0.5 w/v% トラガントゴム水溶液(トラガントゴム; 和光純薬工業)に懸濁して投与液を用時調製した。

2. 試験動物および飼育条件

日本チャールス・リバーから Crj:CD(SD)IGS ラット (SPF) を入手後、5 日間検疫・馴化し、その後投与日まで馴化した。各投与につき、動物数は雌 3 匹とし、投与前日に無作為に抽出・選抜した。投与日の週齢は 8~8.5 週齢、体重範囲は 186~210 g であった。

検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度 19.0~25.0°C (許容範囲)、相対湿度 35.0~75.0% (許容範囲)、換気 6~20 回/時(オールフレッシュエアー供給)、照明 12 時間/日 (7:00-19:00) に自動調節した飼育室を使用した。

動物は、実験動物用床敷(ベータチップ、日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージに、動物選抜前は 1 ケージあたり 4 匹以下、動物選抜後は 1 ケージあたり 3 匹収容し、飼育した。

動物には、実験動物用固型飼料(MF, オリエンタル酵母工業)と、5 μm のフィルター濾過後、紫外線照射した水道水をそれぞれ自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

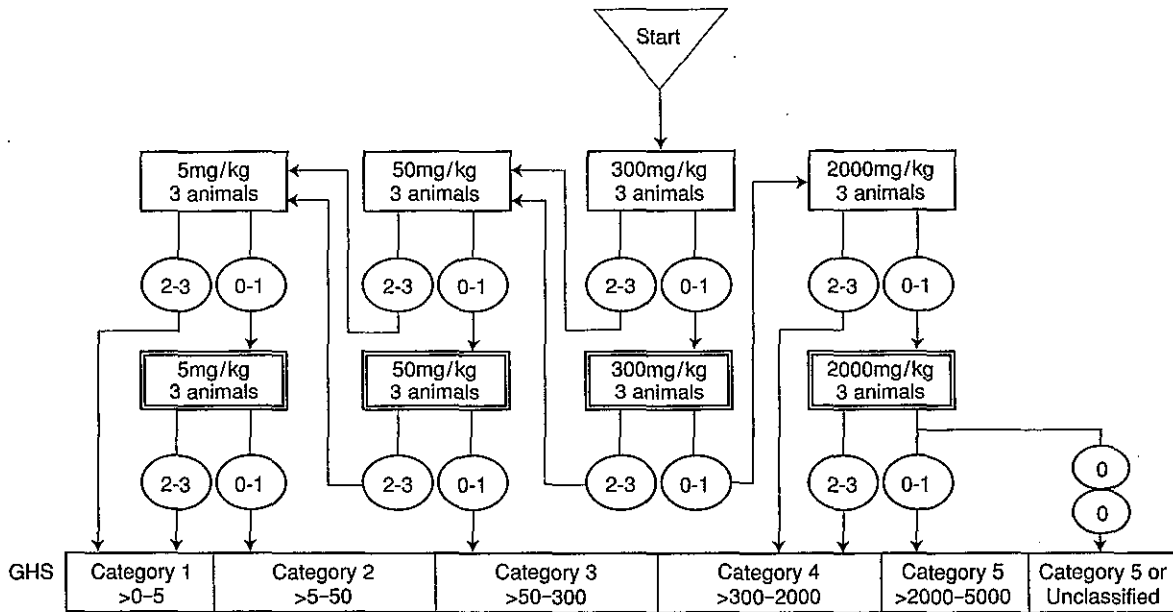
被験物質製造者(Aldrich Chemical, USA)の MSDS (Material Safety Data Sheet) にマウスの LD₅₀(腹腔内投与)が 100 mg/kg とのデータがある。よって、本試験の第一回投与用量は 300 mg/kg とし、下図のフローチャートに従って試験を開始した。

投与前日の夕方から約 18 時間絶食させたラットに胃ゾンデを装着したディスプレイシリンジを用いて投与した。投与終了後約 3 時間は飼料を与えなかった。投与液量は 10 mL/kg とし、投与直前に測定した体重に基づいて算出した。

第一回投与用量である 300 mg/kg の投与の結果、死亡は認められなかった。そのため、第二回投与用量を 300 mg/kg とした。第二回投与の結果、死亡は認められなかった。そのため、第三回投与用量は 2000 mg/kg とした。第三回投与の第 3 日まで(第 4 日までの死亡・瀕死期解剖動物の有無で第四回投与の投与量を判断した)、死亡・瀕死期解剖動物が認められなかったため、第四回投与用量は 2000 mg/kg とした。なお、第三回投与の結果、第 8 日に 1 例を瀕死期解剖、第 9 日に 1 例が死亡した。以下に実際の流れを示した。

4. 観察・測定項目

生死および一般状態を投与日には投与後 10 分、30 分、



※楕円の中の数字は死亡動物数を示す(死亡動物数には瀕死のため屠殺した動物を含む)。

GHS: Globally Harmonized Classification System (mg/kg b.w.)

1, 3および6時間の5回, その後は1日1回, 14日間観察した。体重は, 全生存動物について投与直前, 第4, 8および15日に測定した。また, 各測定日間の増加量を算出した。死亡動物は発見時に剖検した。瀕死期解剖および生存動物は, それぞれ瀕死期解剖決定時および観察終了時(第15日)にチオペンタールナトリウム麻酔下で放血し, 安楽死させた後剖検した。

結果

1. 死亡状況 (Table 1)

300 mg/kg群では死亡は認められなかった。2000 mg/kg群では, 第三回投与の第8日に1例を瀕死期解剖, 第9日に1例が死亡し, 第四回投与の第10日に1例を瀕死期解剖した。

2. 一般状態

2000 mg/kg群では, 削瘦, 横臥位, 円背位, 自発運

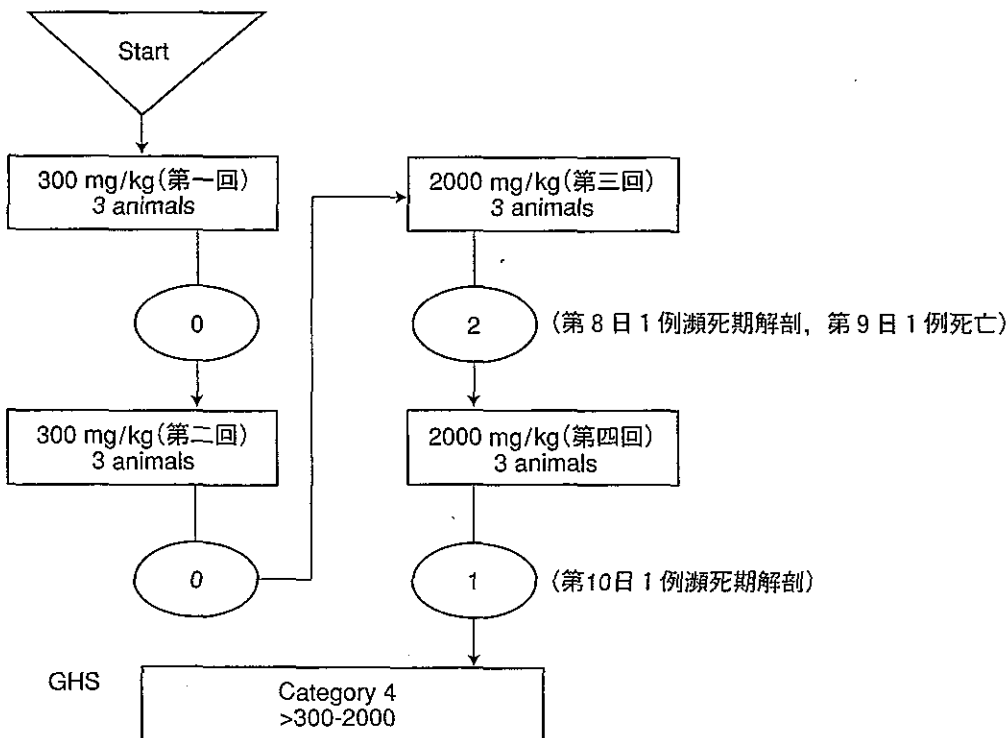


Table 1 Mortality in rats after single dose oral toxicity test of diphenyl disulfide

Sex	Step	Dose (mg/kg)	Number of animals	Number of dead animals											Mortality ^{a)}
				Day:	1-7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Female	1st	300	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	2nd	300	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0/3
	3rd	2000	3		0	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2/3
	4th	2000	3		0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1/3

a) number of dead animals / number of animals examined

動の低下(第三および第四回投与で共通), 緩徐呼吸(第三回投与)および体温低下(第四回投与)が認められた。これらの症状は第4日以降に発現した。これらの症状が発現した後, 上記の通り同群の1例が第9日(第三回投与)に死亡し, 2例(第三回および第四回投与の各1例)を第8および10日に瀕死期解剖した。第15日まで生存した3例(第三回投与1例, 第四回投与2例)の症状は, 第14日までに消失した。

300 mg/kg群では, 被験物質に起因した異常は認められなかった。

3. 体重

2000 mg/kg群の体重および体重増加量は, 第1~4日および第4~8日に体重減少または増加抑制を示した。第15日まで生存した動物は, 第8日まで体重減少を示したが, 第8日以降体重は増加し, 第8~15日の体重増加量は300 mg/kg群よりも高値を示した。

300 mg/kg群の体重は順調に増加した。

4. 剖検所見

死亡・瀕死期解剖例(死亡1例, 瀕死期解剖2例)では, 胸腺および脾臓の小型化が全例, 脾臓の暗赤色化が1例, 腺胃の限局性出血が全例, 前胃の隆起巣が2例, 前胃の壁の肥厚, 結腸の膨満, 空腸の異常内容物(タール様), 膀胱の着色尿(黄色)貯留がそれぞれ1例, 副腎の腫大(両側)が2例に認められた。

2000 mg/kg群の生存例(3例)では, 胸腺の小型化が1例, 前胃の隆起巣が全例に認められた。

300 mg/kg群では, 異常は認められなかった。

考察

ジフェニルジスルフィドを300または2000 mg/kgの用量で雌ラットに単回経口投与した。

その結果, 2000 mg/kg群で第4日以降に削瘦, 横臥位等の諸症状が発現し, 体重が減少した。第8日から第10日にかけて同群の1例が死亡し, 2例を瀕死期解剖した。死亡・瀕死期解剖動物の剖検では, 全例で腺胃の出血, 前胃の隆起巣あるいは肥厚が認められ, 被験物質の胃粘膜への刺激性が示唆された。これらの胃の傷害性変化が, 死亡あるいは衰弱の原因と考えられた。死亡・瀕死期解剖動物では, 胃の変化の他に衰弱あるいはストレスに起

因すると考えられる胸腺および脾臓の小型化あるいは副腎の肥大等の変化が認められた。第15日まで生存した動物では, 上記の症状の発現および体重減少が認められたが, 症状は第14日までに消失し, 第8日以降体重は増加した。生存動物の剖検では, 前胃の隆起巣および胸腺の小型化が認められた。

以上, ジフェニルジスルフィドを雌ラットに単回経口投与した結果, 2000 mg/kg群で1/6例が死亡し, 2/6例を瀕死期解剖した。従って, 本試験条件下におけるジフェニルジスルフィドはGHSの基準でCategory 4(>300-2000 mg/kg)と分類された。

連絡先

試験責任者: 平塚秀明

試験担当者: 大塚直美, 松本和代

(株)三菱化学安全科学研究所鹿島研究所

〒314-0255 茨城県鹿島郡波崎町砂山14

Tel 0479-46-2871 Fax 0479-46-2874

Correspondence

Authors: Hideaki Hiratsuka (Study director)

Naomi Outsuka, Kazuyo Matsumoto

Kashima Laboratory, Mitsubishi Chemical Safety Institute Ltd.

14 Sunayama, Hasaki-machi, Kashima-gun, Ibaraki, 314-0255, Japan

Tel +81-479-46-2871 Fax +81-479-46-2874

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test
of Diphenyl disulfide by Oral Administration in Rats

要約

ジフェニルジスルフィドはスルフェニル化試薬として、またシクロヘキサン類の脱水素芳香族化試薬として用いられている¹⁾。毒性情報としては、OECD TG423で実施した経口投与による急性毒性試験ではCategory 4(>300-2000)に分類された²⁾。しかし、反復投与および生殖発生毒性についての知見はない。ジフェニルジスルフィドを1, 6および30 mg/kg/dayの用量でSD系ラット(1群雌雄各12匹、雌はサテライト動物として対照群および30 mg/kg群に各5匹を追加)に交配前14日から交配を経て雄は42日間、雌は妊娠、分娩を経て哺育4日、雌サテライト動物は雄と同様に42日間までそれぞれ経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。

1. 反復投与毒性

脾臓および大腿骨骨髓に対する影響として、30 mg/kg群で脾臓重量の増加が雌雄、脾臓の腫大と暗赤色化が雌、病理組織検査では脾臓のヘモジデリン沈着および赤血球系髄外造血の増強が雌雄でみられ、大腿骨骨髓の赤血球系造血細胞の増加が6 mg/kg以上の群の雌で認められた。造血系に関連すると考えられる血液学変化として、30 mg/kg群の雌雄で赤血球数の低値、雄でヘモグロビン濃度の低値、網赤血球数の高値など貧血を示唆する変化が認められた。

肝臓に対する影響として、30 mg/kg群の雌雄で重量の増加、腫大および小葉中心性肝細胞肥大がみられ、組織変化は6 mg/kg群の雄でも認められた。血液生化学変化として、30 mg/kg群の雄で総コレステロールの高値、グルコースの低値、雌で総コレステロール、総蛋白およびアルブミンの高値が認められた。

腎臓に対する影響として、腎臓重量の増加が6 および30 mg/kg群の雄、30 mg/kg群の雌で、腎臓の腫大が1 mg/kg以上の群の雄で認められ、組織学的には雄で近位尿細管上皮における硝子滴の発現、好塩基性近位尿細管の発現、雌で尿細管上皮のリポフスチン沈着が認められた。

甲状腺に対する影響として、濾胞上皮の肥大が30 mg/kg群の雄に認められた。

投与終了後検査で認められたこれらの病理組織学変化は、2週間の回復期間により消失するか、変化がみられても発現頻度および病変程度が明らかに軽減していることから、回復傾向を示しているものと判断された。

2. 生殖発生毒性

親動物の生殖機能検査において性周期、交尾率、受胎率、分娩率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩および哺育行動のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。新生児の検査において出産児数、出生児数、性比、出生率、新生児の4日生存率、外表、一般状態、体重および剖検のいずれにも被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上の結果から、ジフェニルジスルフィドの本試験条件下における反復投与毒性に関する無影響量は雄で1 mg/kg/day未満、雌で1 mg/kg/day、生殖発生毒性に関する無影響量は雌雄の親動物ならびに児動物のいずれも30 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質

ジフェニルジスルフィド(Aldrich Chemical(米国)、ロット番号15322AB、純度99.8%)は、キシレンに3%の溶解性を有する白色の粉末である。被験物質は冷蔵、暗所、気密容器にて保存し、試験期間中安定であることを確認した。投与液の調製には、被験物質を各用量ごとに秤量し、媒体(0.5%トラガントゴム水溶液、和光純薬工業)に懸濁した。投与液中の被験物質の安定性を投与開始前に調製後8日間安定であることを確認した。投与液は投与に供するまで冷蔵・遮光下で保存し、調製後7日以内に使用した。また、初回および最終調製時に投与液中の被験物質濃度が設定濃度±10%以内であることを確認した。

2. 試験動物

日本チャールス・リバー(厚木生産所)から入手した雌雄のSD系ラット(Crj:CD(SD)IGS,SPF)を5日間検疫・馴化した。その後も馴化を継続し雌雄の一般状態、さらに雌は性周期を7日間観察し、異常のない動物を試験に供した。投与開始前日に体重層別化無作為抽出法により、1群あたり雌雄各12匹に振り分けた。さらに、雌サテライト動物(回復動物)として対照群および30 mg/kg群に各5匹の雌を追加した。投与開始時の週齢は雌雄とも9週齢、体重範囲は雄327~385 g、雌が208~258 gであった。検疫・馴化期間を含む全飼育期間を通じて、温度22±2°C、相対湿度55±15%、換気約12回/時、照明12時間/日(7:00-19:00)に自動調節した飼育室を使用した。

動物飼育には、妊娠・哺育期間を除く期間はステンレス製つり下げ式金網製ケージを、妊娠・哺育期間は実験動物用床敷(ベータチップ, 日本チャールス・リバー)を敷いたポリカーボネート製ケージを使用した。交配期間は雌雄各1匹, 哺育期間は1腹, 検疫・馴化期間を含むその他の期間は1匹ずつ収容した。動物には、オートクレーブ滅菌した実験動物用固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業)と、孔径5 μm のフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させた。

3. 投与量および投与方法

投与用量は用量設定試験の結果を参考に決定した。すなわち被験物質を0, 30, 100, 300および1000 mg/kgの用量で、1群雌雄各3匹のSD系ラットに14日間反復経口投与した結果、300 mg/kg以上の群で死亡あるいは瀕死が雌雄全例に認められた。100 mg/kg群では一般状態、体重、摂餌量、血液学検査、血液生化学検査、器官重量、剖検の検査項目のすべてに被験物質に起因する変化が認められた。30 mg/kg群でも血液学検査、血液生化学検査に変化がみられ、器官重量では肝臓、脾臓および腎臓重量の高値、剖検では脾臓の暗赤色化および腫大、前胃の壁の肥厚が認められた。これらの結果および本試験の投与期間を考慮し、本試験の高用量は明らかな毒性発現が予想される30 mg/kgとし、以下公比約5で中用量は6 mg/kg、低用量は1 mg/kgの3用量を設定した。また、媒体(0.5%トラガントゴム水溶液)のみを投与する対照群を設けた。

投与経路は経口とした。投与期間は、雄は交配前14日間および交配期間を経て剖検前日までの計42日間、雌は交配前14日間、交配期間、妊娠期間および分娩を経て哺育4日までとした。交尾しなかった雌および分娩しなかった雌は剖検前日までの計42日間投与した。また、対照群と30 mg/kg群の雄各5匹および同群の雌サテライト動物各5匹については、投与期間終了後14日間の回復期間を設けた。

投与の際はテフロン製胃ゾンデを用いて1日1回、午前中に強制経口投与した。投与液量は5 mL/kgとし、至近日に測定した体重に基づいて算出した。

4. 反復投与毒性に関する観察・検査項目

1) 一般状態

全例について、生死、外観、行動等を投与前および投与後に毎日観察した。回復動物は1日1回午前中に観察した。

2) 行動検査

雌雄全例について、詳細な症状観察(ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールドでの観察)を、投与開始前日に1回、投与期間中は1回/週、いずれも午後に行った。雌雄とも各群5匹を選抜し、機能検査(刺激に対する反応性、握力)および自発運動の測定を、第6週の午後に1回行った。握力はデジタルフォースゲージ

(DPS-5)、自発運動量にはSUPERMEX(室町機械)を用いて測定した。投与期間中の検査で被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため、回復期間の検査は行わなかった。

3) 体重および摂餌量

雄では第1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日、さらに雄回復動物では第50および56日に測定した。雌サテライト動物は雄と同様の頻度で測定した。雌では第1, 4, 8および15日、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日、分娩した雌は哺育0および4日に測定した。摂餌量は、交配期間を除き体重測定日に測定し、各測定日間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。

4) 血液学検査

雄では第42日、雄回復動物および雌サテライト動物では第56日、雌では哺育4日に、全生存動物を午後4時頃より絶食させた。測定対象動物(採血動物)は雄は5例、雄回復動物および雌サテライト動物は全例、雌は分娩日が早く動物番号の小さい順に5例とした。これらの動物は、チオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で、後大静脈より採血した。採取した血液を用いて以下に示す項目を測定した。

EDTA-2 Kにより抗凝固処理し、赤血球数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、ヘモグロビン濃度(シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(球状化処理二次元レーザーFCM法)、網赤血球数(RNA染色によるレーザーFCM法)、血小板数(球状化処理二次元レーザーFCM法)、白血球数(酸性界面活性剤によるレーザーFCM法)を多項目自動血球分析装置(ADVIA120, バイエルメディカル)、白血球百分率(Wright染色塗抹標本)を血液細胞自動分析装置(MICROX HEG-50, HEG-50VFオムロン)を用いて測定した。また、検査結果から平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球血色素量(MCH)、平均赤血球血色素濃度(MCHC)を算出した。血液の一部を3.2 w/v%クエン酸三ナトリウム水溶液で抗凝固処理し、遠心分離して得られた血漿を用いてプロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)(光散乱検出方式)を血液凝固自動分析装置(CA-510, シスメックス)を用いて測定した。

5) 血液生化学検査

計画解剖日に採取した血液の一部を室温で約30分間静置後遠心分離し、得られた血清を用いて以下の項目を測定した。

GOTおよびGPT(UV-rate法(JSCC改良法)), γ -GT(γ -グルタミン-p-ニトロアニリド基質法(SSCC改良法)), ALP(p-ニトロフェニルリン酸基質法(JSCC改良法)), 総ビリルビン(酵素法(BOD法)), 尿素窒素(酵素-UV法(Urease-LEDH法)), クレアチニン(酵素法(Creatininase-POD法)), グルコース(酵素-UV法(HK-G6PDH法)), 総コレステロール(酵素法(CO-HDAOS法)), トリグリセライド(酵素法(GPO-HDAOS法), グ

リセリン消去法)), 総蛋白(Biuret法), アルブミン(BCG法), A/G比(総蛋白およびアルブミンより算出), カルシウム(OCPC法), 無機リン(酵素法(PNP-XOD-POD法)), ナトリウム, カリウムおよびクロール(イオン選択電極法)を自動分析装置(TBA-200FR, 東芝)を用いて測定した。

6) 雄の尿検査

雄について, 第38日の投与前に各用量群5匹の新鮮尿を採取し, pH, 蛋白, グルコース, ケトン体, ビリルビン, 潜血およびウロビリノーゲン(試験紙法, マルティスティックス:バイエルメディカル)を自動尿分析器(クリニテック100, バイエルメディカル)により測定した。被験物質の影響が疑われる変化が認められなかったため, 尿沈渣, 蓄積尿を用いた検査, 回復動物の尿検査は行わなかった。

7) 病理学検査

雌雄全例について, 解剖日にチオペンタールナトリウムの腹腔内投与による麻醉下で, 腹大動脈の切断・放血により安楽死させて解剖した。計画解剖動物のうち, 血液学検査の対象動物と同じ雌雄各5匹(回復動物は全例)の脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 副腎, 胸腺, 脾臓, 精巣および精巣上体の重量を測定した。ただし, 精巣および精巣上体は雄全例について測定した。また, 解剖日の体重を基に相対重量(対体重比)を算出した。さらに, 雌雄全例については上記の器官に加えて, 下垂体, リンパ節(下顎・腸間膜), 気管, 肺, 胃, 腸管(十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸), 甲状腺・上皮小体, 膀胱, 精のう, 前立腺腺葉, 卵巣, 子宮, 陰, 骨髄(大腿骨), 坐骨神経, 脊髄および肉眼的異常部位を採取し, 10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定して保存した。ただし, 精巣および精巣上体はブアン液で固定後, 保存した。病理組織学検査は, 対照群と30 mg/kg群の投与後解剖動物のうち, 雌雄各5例(血液学検査および器官重量測定対象動物と同様)の上記器官, 瀕死期解剖動物の上記器官ならびに乳腺, 対照群を含む全動物の肉眼的異常部位および非妊娠雌1例の卵巣について, 常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し, 鏡検した。この結果, 被験物質に起因すると思われる変化が雌雄の肝臓, 脾臓, 腎臓および雄の甲状腺と雌の大腿骨骨髄に認められた。このため, 1および6 mg/kg群の投与後解剖動物の各5例と回復後解剖動物の雌雄全例の当該器官・組織(甲状腺は雄のみ, 大腿骨骨髄は雌のみ)についても検査を行った。さらに, 雌の腎臓にみられた黄褐色色素の性質を確認し, その程度を比較するためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った雌全例の腎臓についてシェモール反応を, 雄の脾臓にみられた黄褐色色素の性質を確認するために, 対照群の雄2例, 30 mg/kg群の雄5例の脾臓についてベルリンブルー染色を実施した。

5. 生殖発生毒性に関する観察・検査

1) 生殖機能検査

投与開始日から交配開始日まで雌の臍垢を毎日午前中に採取, 性周期を検査し, 平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。交配前の投与期間終了後, 各群内で雄1雌1の交配对を設けて最長14日間昼夜同居させた。交尾確認は毎日午前中に行い, 臍栓形成あるいは臍垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立とし, その日を妊娠0日とした。交配した対は雌雄を分離し, 以後の検査に供した。これらの結果から, 交尾所要日数(交配開始後, 交尾成立までに要した日数), 交尾成立までに逸した発情期の回数, 交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100], 受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]を算出した。

2) 分娩・哺育状態

交尾が確認された雌は全例を自然分娩させ, 分娩状態を観察した。午前9時の時点で分娩が完了している動物を当該日分娩とし, その日を哺育0日とした。交尾確認後25日を経ても分娩しない場合は, 非分娩雌とした。分娩した動物は新生児を生後4日(哺育4日)まで哺育させ, 授乳, 営巣, 食殺の有無等の哺育状態を毎日観察した。母動物は剖検時に卵巣および子宮を摘出し, 黄体数および着床数を検査した。これらの結果から, 妊娠期間(妊娠0日から分娩完了日までの期間), 出産率[(生児出産雌数/受胎雌数)×100], 着床率[(着床数/黄体数)×100], 分娩率[(総出産児数/着床数)×100]を算出した。

3) 新生児の観察・検査

(1) 新生児の観察

哺育0日に出産児数(出生産児数, 死産児数), 性別および外表異常の有無を検査した。その後は, 一般状態, 死亡の有無を哺育4日まで毎日観察した。哺育0および4日の生存児数から出生率[(出生産児数/総出産児数)×100], 新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出生産児数)×100]を算出した。

(2) 体重

生後0および4日に全生存児を個体ごとに測定した。

(3) 剖検

生後4日に全生存児の口腔を含む外表を検査した後, 親動物と同様に安楽死させ, 剖検した。死亡動物については10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に浸漬, 固定した後, 実体顕微鏡下で剖検した。

6. 統計解析

計量データについては, パラメトリックデータはBartlett法による等分散性の検定を行い, 分散が等しい場合は一元配置分散分析を行った。分散が等しくない場合およびノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの検定を行った。群間に有意差が認められた場合はDunnett法またはDunnett型の多重比較を行った。計数データのうち尿検査および病理組織所見はa×bの χ^2 検定を行い, 有意差が認められた場合はArmitageの χ^2 検定

により対照群と各被験物質投与群間の比較を行った。その他の計数データはFisherの直接確率法により検定した。各検定の有意水準は5%とした。新生児に関するデータは各母動物ごとに算出した平均値を標本単位とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態

死亡例は雌雄ともいずれの投与群においても認められなかった。

投与期間および回復期間の雌雄とも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

なお、30 mg/kg群の1例は分娩開始から完了まで約1.5日を要し、哺育0日(分娩完了日)には耳介、眼球等が蒼白化を示し貧血様の症状を呈し、翌日には全出生児が死亡したため瀕死期解剖とした。本動物は分娩困難な状態が継続した影響で貧血様を示し、その延長で正常な哺育行動を示すことができず、全出生児が死亡したものと考えられる。

2) 行動検査

詳細な症状観察、機能検査および自発運動量測定の内いずれも被験物質の影響と考えられる変化は認められなかった。

3) 体重(Fig. 1, 2)

30 mg/kg群の雌で体重増加量が第4および15日に有意に低下した。雌サテライト動物では同群の体重は第22, 29, 36および56日、体重増加量では第29および36

日に対照群と比べ有意に低下した。なお、母動物では妊娠および哺育期間とも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

対照群では第1日(投与開始前)より体重の重い動物が雌サテライト動物に偏った。また、雌サテライト動物の各測定日間の体重増加量をみると、30 mg/kg群の第4日に有意な低値、第50日に有意な高値を示したが、投与期間および回復期間を通して対照群と同程度の体重増加が認められた。これらのことから、30 mg/kg群で体重増加抑制を疑う変化がみられたが、投与開始前の体重の偏りによる差に起因するものと考えられ、被験物質の影響を示すものではないと判断した。

4) 摂餌量

被験物質の影響と考えられる変化は雌雄とも認められなかった。

30 mg/kg群の雄で第29日の摂餌量が有意に増加したが、一過性の変化でわずかな増加であることから毒性的に意義のない変化と考えられる。回復期間では変化は認められなかった。雌では、投与、妊娠および哺育期間ならびに回復期間のいずれにも変化は認められず、対照群と同様に推移した。

5) 血液学検査(Table 1)

被験物質の影響と考えられる変化が、30 mg/kg群の雄では投与および回復終了後検査で、赤血球数およびヘモグロビン濃度の低値あるいは低値傾向、網赤血球数の高値が認められた。30 mg/kg群の雌では投与および回復終了後検査で、赤血球数の低値あるいは低値傾向、投与終了後検査で網赤血球数の高値傾向が認められた。なお、30 mg/kg群の雄では、回復終了後検査で平均赤血球色素濃度の低値がみられたが、投与終了後検査では

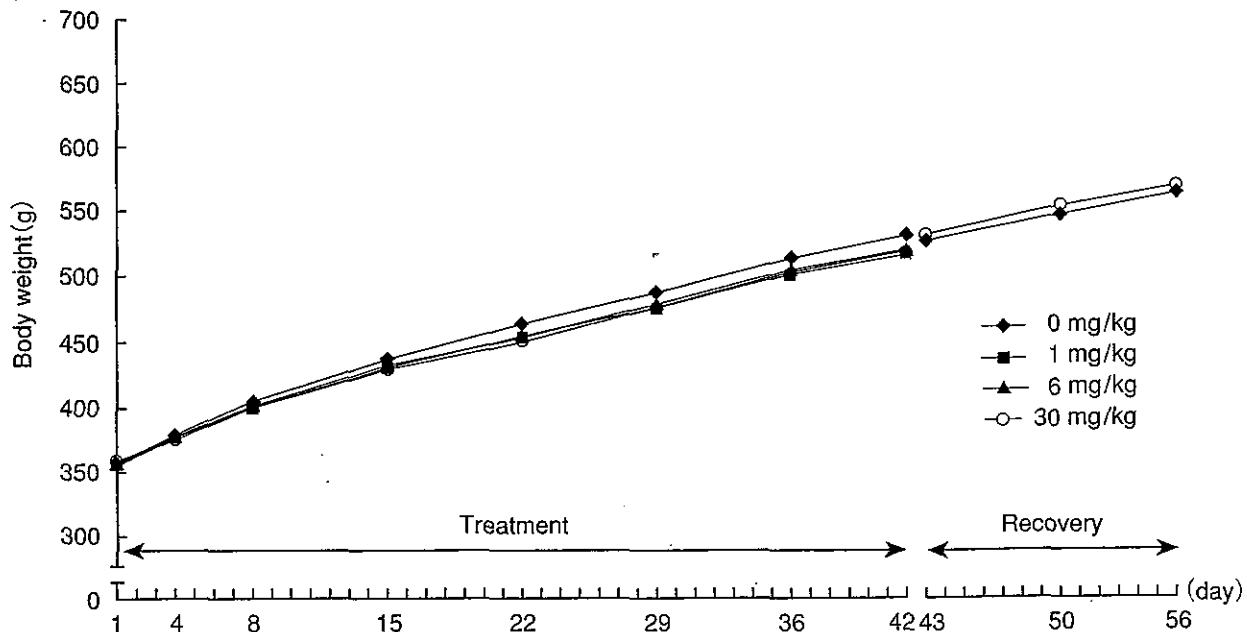


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

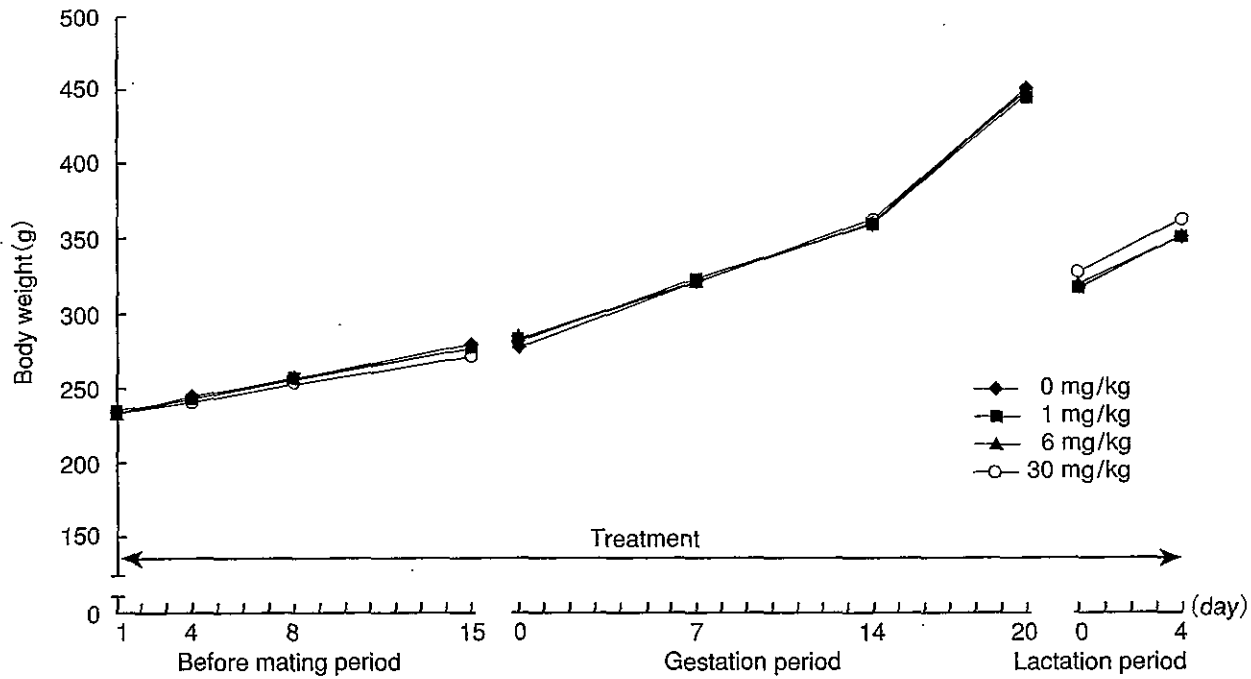


Fig. 2-1 Body weight changes of female rats treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

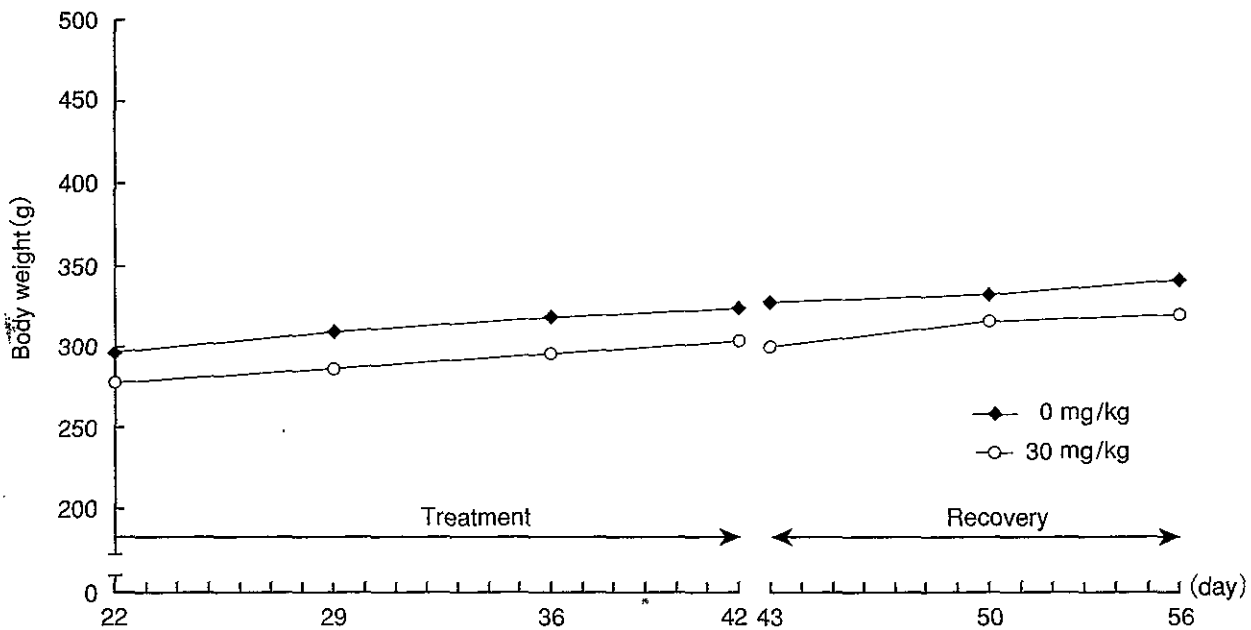


Fig. 2-2 Body weight changes of female rats (satellite animal) treated orally with diphenyl disulfide in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test

変化はなかった。

1および6 mg/kg群の雌雄とも対照群との間に有意な差は認められなかった。

6) 血液生化学検査 (Table 2)

被験物質の影響と考えられる変化が、30 mg/kg群の雄では投与終了後検査で総コレステロールの高値、グルコースの低値、さらに、回復終了後検査でも総コレステ

ロールの高値が認められた。30 mg/kg群の雌では投与終了後検査で総コレステロール、総蛋白およびアルブミンの高値が認められた。

また、30 mg/kg群の雄の回復終了後検査でALPの低値、同群の雌の投与終了後検査でGOTの低値が認められたが、これらの変化は減少方向であることから、毒性的意義に乏しい変化と考えられる。その他、1 mg/kg群の雄の投与終了後検査で総蛋白およびアルブミンの低