
ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルのラットを用いる単回経口投与毒性試験

最 終 報 告 書

作成日 2004年10月22日

株式会社日本バイオリサーチセンター
羽島研究所

目次

要約	8
緒言	9
方法	9
1. 被験物質及び媒体	9
2. 投与検体及び濃度確認	9
3. 使用動物及び飼育条件	10
4. 投与経路, 投与方法, 群構成及び投与量	11
5. 観察及び検査項目	12
6. 統計解析	12
結果	12
1. 死亡状況, LD ₅₀ 値及び一般状態	12
2. 体重	12
3. 剖検	13
考察	13
文献	13

Table, Fig の目次

Table 1	Mortality and LD ₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	29
Table 2	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	30
Table 3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	31
Table 4	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	32
Fig.1	Chemical structure of phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	33

要約

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルを雌ラットに 1 回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、第 1 回試験は 2000 mg/kg、第 2 回試験は 300 mg/kg、第 3 回試験は 300 mg/kg とした。媒体には 1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v% カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。各群の使用動物数は各 3 例とした。

1. 死亡状況及び一般状態

死亡例は、2000 mg/kg 投与で投与後 1 日までに 3 例全例に認められた。

一般状態において、2000 mg/kg 投与で流涎、自発運動の低下、腹臥位、チアノーゼ及び緩徐呼吸がみられた。300 mg/kg 投与では、投与直後に流涎がみられた。

2. 体重

300 mg/kg 投与では、体重推移に異常はみられなかった。

3. 剖検

2000 mg/kg 投与で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚及び腹水貯留がみられた。300 mg/kg 投与では、異常はみられなかった。

以上の結果から、ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルの LD₅₀ 値は、300 mg/kg と 2000 mg/kg の間にあると推定される。

緒言

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチル(CAS No. 298-06-6)が人に摂取された場合の健康への影響を推定するために、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)に従って、ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルを雌ラットに1回経口投与して、その毒性について検討した。

方法

1. 被験物質及び媒体

被験物質のジチオリン酸 *O,O'*-ジエチル(CAS No. 298-06-6)は、Fig.1 に示す化学構造を有し、分子量:186.24, 暗青色のメルカプタン臭を有する強酸の液体であり、ほとんどの有機溶剤に可溶、水にもわずかに可溶である。当試験には、 から入手したものをを用いた[製造元: , Lot No. , 純度:98.9%, 密度:1.180 g/mL(20 °C)]。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷蔵(設定:4°C, 実測値:2.4~4.5 °C)・遮光の条件下で保管した。なお、当試験の投与終了後に当ロットについて で再分析した結果、純度は 98.9%であり、使用期間中の安定性が確認された。

媒体として、1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を用いた。

2. 投与検体及び濃度確認

1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(以下、1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液)は、カルボキシメチルセルロースナトリウム[局方, Lot No. 2115, 丸石製薬株式会社, 使用期限:2005年1月, 保管条件:室温(設定:23°C, 実測値:21.5~24.1 °C), 保管場所:被験物質保管室の保管庫]と Tween 80[ナカライテスク一級, Lot No. M1B5954, ナカライテスク株式会社, 使用期限:2006年4月15日, 保管条件:室温(設定:23°C, 実測値:21.5~24.1 °C), 保管場所:被験物質保管室の保管庫]を注射用水[局方, Lot No. 2G86N, 株式会社大塚製薬工場, 使用期限:2007年7月, 保管条件:室温(設定:23°C, 実測値:21.5~24.1 °C), 保管場所:被験物質保管室]に所定濃度となるように溶解し、調製した。

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルは、1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液で所定濃度となるように、懸濁して調製した。なお、被験物質の調製に際して、純度による換算を実施した。

1 及び 200 mg/mL の調製液は、調製後、冷蔵、遮光及び気密の条件下で7日間保管後、さらに室温、遮光及び気密の条件下で24時間保管しても安定性に問題のないことが確認されている¹⁾(Attachment 1)。投与検体は、用時調製とし、調製後6時間以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。

投与に使用した投与検体中の被験物質濃度を財団法人食品農医薬品安全性評価センターでLC/MS/MS法により測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の99.0及び106.9%と目標

値の範囲内(100±10%)であった。また、均一性は、CV 値が 10%以下であった。従って、各投与検体中の含量及び均一性に問題はなかった²⁾(Attachment 2-1~2-14)。

3. 使用動物及び飼育条件

3.1. 動物種及び系統

試験には、毒性試験に一般的に用いられている動物種で、その系統維持が明らかである Crj : CD(SD)IGS 雌ラット(SPF)を用いた。動物は、日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から 7 週齢で 2004 年 2 月 4 日(第 1 回試験用)、2004 年 2 月 18 日(第 2 回試験用)及び 2004 年 3 月 3 日(第 3 回試験用)に各 5 匹を入手した。入手後 1 日の体重範囲は、170~188 g であった。

3.2. 検疫及び馴化、群分け法並びに個体識別法

入手した動物は、第 1 回試験、第 2 回試験及び第 3 回試験とも 5 日間の検疫期間及びその後 2 日間の馴化期間を設けた。この間に、体重測定を 4 回と一般状態の観察を毎日行って検疫・馴化とし、一般状態及び体重推移に異常の認められなかった動物を群分け後、試験に用いた。

群分けは、第 1 回試験、第 2 回試験及び第 3 回試験とも投与日にコンピュータを用いて無作為抽出法により試験に用いる各 3 例に動物番号を割り当てた。群分け後の残余動物は、投与日にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に廃棄処分した。

動物の個体識別は、検疫・馴化期間中は入手日に油性インクによる記入法及び油性インクによる色素塗布法を、群分け後は油性インクによる色素塗布法及び耳パンチ法を併用して行った。さらに、検疫・馴化期間中の各ケージには試験番号、入手年月日及び検疫・馴化動物番号を記入したラベルを、群分け後の各ケージには試験番号、投与量及び動物番号を記入し、群ごとに色分けしたラベルを取り付けた。

3.3. 環境条件及び飼育管理

動物は、室温 20~26 °C(実測値 : 21~24 °C)、湿度 40~70%(実測値 : 32~61%)、明暗各 12 時間(照明 : 午前 6 時~午後 6 時)、換気回数 12 回/時(フィルターにより除菌した新鮮空気)に維持された飼育室(E 棟 5 号室、ただし、検疫期間中は E 棟 7 号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中及び群分け後とも、ステンレス製五連ケージ(W:755×D:210×H:170 mm)を用いて個別飼育した。ケージの受け皿及び給水瓶の交換は 1 週間に 2 回以上、ケージ及び給餌器の交換は 2 週間に 1 回以上行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)及び 0.02% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液での床のモップ拭きによる消毒は毎日行った。

3.4. 飼料及び飲料水

飼料は、製造後 5 か月以内の固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻(午後 3 時 30 分~4 時 00 分)から投与までの約 19 時間と投与後約 6 時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。使用した飼料と同一ロットの飼料の分析結果は、財団法人日本食品分析センター及びオリエンタル酵母工業株式会社

で実施した成績を入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。ただし、群分け時から投与後約6時間までは絶水させ、その後に飲料水を与えた。飲料水の水質検査結果は、ほぼ6か月ごとに東西化学産業株式会社 東日本分析センターで実施した成績を入手した。

飼料及び飲料水の分析結果は、いずれも試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

4. 投与経路、投与方法、群構成及び投与量

4.1. 投与経路及び投与方法

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルは、経口的に人に摂取される可能性が考えられるため、投与経路として経口投与を選択した。

投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスポーザブル注射筒(テルモ株式会社)を用いて、強制経口投与した。投与液量は、投与直前に測定した体重を基準として10 mL/kgで算出した。投与時刻は午前10時10分～10時47分の間で、投与回数は1回とした。

投与日の週齢は8週齢であり、体重範囲は169～179 gであった。

4.2. 群構成及び投与量

群構成は、下記のように設定し、各試験の動物数は、3例とした。

<第1回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
ジチオリン酸 <i>O,O'</i> -ジエチル	2000 mg/kg(200 mg/mL)	3(F01151～F01153)

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルのラット経口投与によるLD₅₀値は4510 mg/kgとの情報がある³⁾。従って、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method (Revised Guideline 423)で最高用量とされている2000 mg/kgを第1回試験の投与量とした。

<第2回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
ジチオリン酸 <i>O,O'</i> -ジエチル	300 mg/kg(30 mg/mL)	3(F01251～F01253)

第1回試験の2000 mg/kg投与で3例全例が死亡したため、300 mg/kgを第2回試験の投与量とした。

<第3回試験>

試験群	投与量(濃度)	動物数(動物番号)
ジチオリン酸 <i>O,O'</i> -ジエチル	300 mg/kg(30 mg/mL)	3(F01351～F01353)

第2回試験の300 mg/kg投与で死亡例が認められなかったため、300 mg/kgを第3回試験の投与量とした。

5. 観察及び検査項目

5.1. 観察期間

投与後 14 日間とした。

5.2. 一般状態

投与日は投与後 6 時間(投与直後～投与後 30 分, 投与後 2, 4 及び 6 時間)まで, 投与翌日からの観察期間中は 1 日 1 回, 一般状態及び死亡の有無を観察した。

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)並びに投与後 1, 3, 7, 10 及び 14 日に測定した。

5.4. 剖検

死亡動物は, 速やかに剖検した。剖検で異常が認められた器官・組織は, 20 vol%中性緩衝ホルマリンで固定後, 10 vol%中性緩衝ホルマリンに保存した。

生存動物は, 観察期間終了時にジエチルエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

6. 統計解析

LD₅₀ 値は概略の範囲を推定した。

体重は, 各群で平均値及び標準偏差を算出した。

結果

1. 死亡状況, LD₅₀ 値及び一般状態(Table 1~2, Appendix 1-1~1-3)

死亡例は, 第 1 回試験の 2000 mg/kg 投与で投与後 6 時間に 2 例と投与後 1 日に 1 例の全例に認められた。第 2 回試験及び第 3 回試験の 300 mg/kg 投与では, 死亡例は認められなかった。以上の結果から, ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルの LD₅₀ 値は, 300 mg/kg と 2000 mg/kg の間にあると推定される。

一般状態において, 第 1 回試験の 2000 mg/kg 投与で投与直後に流涎が 2 例, 投与後約 5 分に自発運動の低下及び腹臥位が各 1 例, 投与後 2 時間に腹臥位が 2 例と自発運動の低下が 1 例, 投与後 4 時間に緩徐呼吸が 3 例, 腹臥位及びチアノーゼが各 2 例と自発運動の低下が 1 例, 投与後 6 時間に腹臥位及び緩徐呼吸が 1 例にみられた。第 2 回試験の 300 mg/kg 投与では, 異常はみられなかった。第 3 回試験の 300 mg/kg 投与では, 投与直後に流涎が 1 例にみられたが, 投与 2 時間以降に異常は認められなかった。

2. 体重(Table 3, Appendix 2-1~2-3)

第 2 回試験及び第 3 回試験の 300 mg/kg 投与では, 体重は順調に推移した。

3. 剖検(Table 4, Appendix 3-1~3-3)

第1回試験の2000 mg/kg投与による死亡例では、腺胃粘膜肥厚が3例、胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑及び腹水貯留が各2例と前胃粘膜肥厚が1例にみられた。

第2回試験及び第3回試験の300 mg/kg投与による生存例では、異常はみられなかった。

考察

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルの LD₅₀ 値は、300 mg/kg と 2000 mg/kg の間と考えられる。

ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルの 2000 mg/kg 投与により、流涎、自発運動の低下、腹臥、緩徐呼吸及びチアノーゼ、剖検で胃穿孔、腺胃粘膜暗赤色斑、腺胃粘膜肥厚、前胃粘膜肥厚及び腹水貯留が認められたことから、ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルは消化管粘膜に対して直接的な刺激作用を有し、この作用に基づく消化管障害により死に至ったと考えられる。

文献

- 1) 試験成績要約書：投与液中の被験物質の安定性(財団法人食品農医薬品安全性評価センター)
- 2) 分析試験報告書：ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルのラットを用いる単回経口投与毒性試験(試験番号：401522A)における投与検体中ジチオリン酸 *O,O'*-ジエチルの濃度均一性分析(分析試験番号：8030(430-001))(財団法人食品農医薬品安全性評価センター)
- 3) 和光純薬工業株式会社，MSDS

Table 1 Mortality and LD₅₀ value of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester

Group	mg/kg	Number of females	Number of deaths																Total number of deaths	LD ₅₀ (mg/kg)		
			Hours after administration				Days after administration															
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			13	14
Test group 1 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	2000	3	0	0	0	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	>300 <2000	
Test group 2 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0
Test group 3 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0

Table 2 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Hours after administration				Days after administration														
			0~0.5	2	4	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
Test group 1 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	2000	Number of females	3	3	3	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Normal	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Salivation	2	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Decrease in locomotor activity	1	1	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Prone position	1	2	2	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Cyanosis	0	0	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Bradypnea	0	0	3	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Death	0	0	0	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Test group 2 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	300	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Normal	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Test group 3 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	300	Number of females	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Normal	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
		Salivation	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Table 3. Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester

Group	Test group 1 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	Test group 2 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	Test group 3 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester
mg/kg	2000	300	300
Number of females	3	3	3
Days after administration			
0	174 ± 5	170 ± 1	175 ± 3
1	-	190 ± 6	189 ± 2
3	-	196 ± 6	192 ± 8
7	-	204 ± 3	196 ± 3
10	-	209 ± 6	206 ± 8
14	-	220 ± 9	215 ± 10

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 4. Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester

Group	Test group 1 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	Test group 2 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester	Test group 3 phosphorodithioic acid, <i>O,O'</i> -diethyl ester
mg/kg	2000	300	300
Number of surviving females	0	3	3
Findings			
Normal	-	3	3
Number of dead females	3	0	0
Findings			
Stomach			
Perforation	2	-	-
Dark red spot, glandular mucosa	2	-	-
Thickening, glandular mucosa	3	-	-
Thickening, forestomach	1	-	-
Abdominal cavity			
Ascites retention	2	-	-

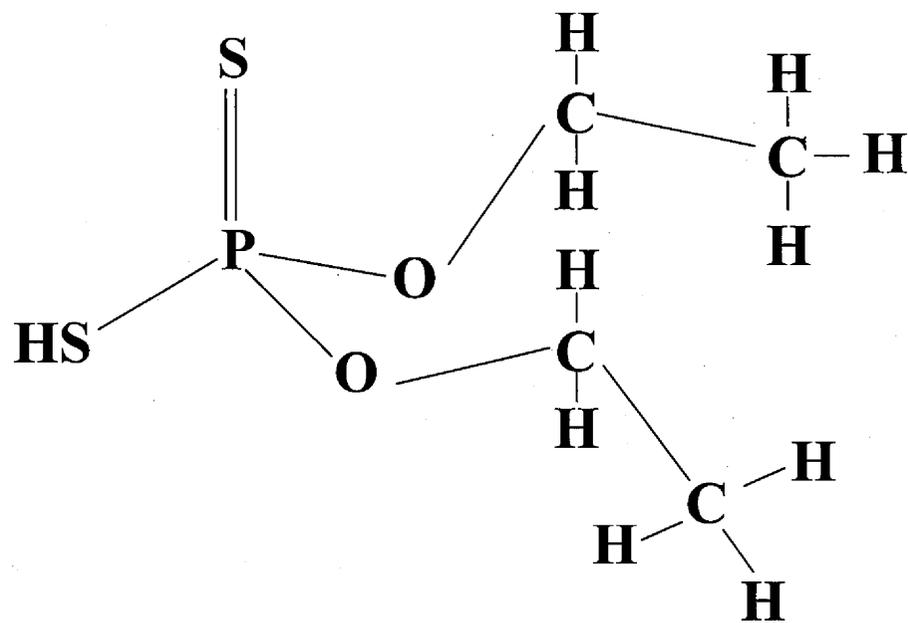


Fig. 1 Chemical structure of phosphorodithioic acid, *O,O'*-diethyl ester