

最 終 報 告 書

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
ラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 93-051)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

目 次

要約	1
試験目的	2
試験材料および方法	
1. 被験物質	2
2. 供試動物および飼育条件	2
3. 群分けおよび個体識別	3
4. 試験群の構成、投与量の設定および投与方法	3
5. 観察および検査	
1) 親動物に関する項目	
(1) 一般状態観察	3
(2) 体重および摂餌量測定	3
(3) 交配および分娩状態観察	4
(4) 臨床病理学的検査	4
(5) 病理学的検査	5
2) 新生児に関する項目	
(1) 産児数および性比の観察	6
(2) 外表異常および一般状態の観察	6
(3) 体重測定	6
(4) 病理学的検査	6
6. 統計処理	7
試験結果	
1. 反復投与毒性	
1) 死亡動物	8
2) 一般状態	8
3) 体重	8
4) 摂餌量	8
5) 雄の尿所見	8
6) 雄の血液学的所見	9
7) 雄の血液生化学的所見	9
8) 剖検所見	9
9) 臓器重量	9
10) 病理組織学的所見	9

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響

(1) 交尾率および受胎率	1 0
(2) 黄体数、着床痕数および着床率	1 0
(3) 出産率および妊娠期間	1 1
(4) 分娩および哺育状態	1 1

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性	1 1
(2) 体重	1 1
(3) 形態	1 2

考察および結論

1. 反復投与毒性	1 2
2. 生殖発生毒性	1 3

参考文献	1 4
------------	-----

添付資料

A. 図・群別平均値表

Figures 1, 2	体重
Figures 3, 4	摂餌量
Tables 1, 2	死亡率
Tables 3, 4	一般状態
Tables 5, 6	体重
Tables 7, 8	摂餌量
Table 9	尿所見
Table 10	血液学的所見
Table 11	血液生化学的所見
Tables 12, 13	剖検所見
Tables 14, 15	臓器重量
Tables 16, 17	病理組織学的所見
Table 18	生殖に及ぼす影響
Table 19	新生児に及ぼす影響
Table 20	新生児の外表所見
Table 21	新生児の内臓所見

要約

高生産量既存化学物質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毒性を検討するため、SD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを用いて、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験を実施した。ラットは1群雌雄各10匹とし、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0（溶媒投与の対照）、6、25、100および400 mg/kg/day用量を、交配開始14日前から、雄は44日間、雌は分娩後哺育3日（40～51日間）まで、毎日経口投与した。

1. 反復投与毒性

雄親においては、100 mg/kg以上の群で腎臓の近位尿細管上皮に硝子滴の出現が認められ、400mg/kg群で投与開始後短期間における摂餌量の減少、投与期間を通じての体重増加抑制、尿中ケトン体および血清無機リンの増加、血清GPTおよび塩素の減少、胸腺の萎縮ならびに盲腸の拡張が認められた。

一方、雌親においても、100mg/kg以上の群で腎臓に対する影響が発現したが、雄親とは異なり近位尿細管上皮に脂肪変性が認められた。また、自発運動低下、下腹部被毛の尿による汚染、紅涙などの一般状態の変化ならびに副腎皮質細胞の空胞化および脾臓の萎縮が認められた。さらに400mg/kg群では、交配前および妊娠期間中の摂餌量減少、妊娠末期での体重増加抑制ならびに胸腺の萎縮が認められ、3匹が分娩予定日あるいはその翌日に死亡した。

2. 生殖発生毒性

雄親の生殖について、影響は認められなかった。雌親の生殖および児動物の発生については、400mg/kg群で影響が認められ、黄体数の減少ならびにそれにともなう着床痕数や総出産児数の減少が認められた。また、分娩中死亡の1例や明らかな分娩遅延の1例が発現した。さらに、出産した各雌親の全児あるいはその約半数は分娩確認時に死亡しており、雌親はその後も哺育行動を取らず、生存した新生児も哺育2日までに全例が死亡した。したがって、出産率、新生児数、出生率および新生児の哺育4日生存率は減少した。交尾や受胎能ならびに新生児の形態に対する影響は認められなかった。

以上の結果から、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への投与により、腎臓、胸腺、副腎および脾臓に対する毒性影響が認められ、一般毒性学的無影響量は、雄親、雌親とも25mg/kgと推定された。一方、生殖毒性については、雄親の生殖能には影響が認められず、無影響量は400mg/kg以上と推定された。雌親の生殖能および児動物の発生に関しては、排卵、分娩、哺育および新生児の生存性に対する影響を示唆する変化が発現し、いずれも無影響量は100mg/kgと推定された。

試験目的

この試験は、OECDにおける高生産量既存化学物質の安全性点検プログラムの一環として実施したものであり、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を雌雄ラットに反復経口投与し、投与期間中に交配、妊娠および分娩させ、本物質の反復投与毒性ならびに生殖発生毒性を、スクリーニング的に検討するために行った。

試験材料および方法

1. 被験物質 (Appendices 1~4)

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 (CAS No. 4979-32-2) は、

から提供されたもの (ロット番号

純度 99.2%) を用いた。本物質の詳細は、Appendix 1に示した。用いた被験物質を投与終了後に分析し、使用期間中安定であったことを確認した (Appendix 2)。本物質は油溶性であるため、溶媒として局方ゴマ油 (宮澤薬品株式会社、ロット番号 AI13) を用いて所定の投与用量になるような濃度の溶液あるいは懸濁液 (高用量群) として調製し、使用時まで冷暗所 (4℃) に保管した。投与液中の被験物質は、均一、かつ、冷暗条件下で少なくとも7日間は安定であることが確認されている (Appendix 3) ので、週1回調製し、調製後7日以内に使用した。また、初回と最後に調製したものについて分析し、所定濃度で調製されていることを確認した (Appendix 4)。被験物質の分析は、いずれも に依託して実施した。

2. 供試動物および飼育条件 (Appendices 5~8)

動物は、SD系 [Crj:CD(SD)] のSPFラットを用いた。ラットは、日本チャールス・リバー株式会社 (神奈川県厚木市下古沢795番地) から、雄は7週齢、雌は6週齢で購入 (雄 62 匹、雌 62 匹) し、12日間試験環境に馴化させ、その間に検疫を行い、発育が順調で一般健康状態の良好な雌雄各 50 匹を、雄は9週齢、雌は8週齢で試験に供した。投与開始時の平均体重 (体重範囲) は、雄 338 (326~351)g、雌 208 (194~225)g であった。

ラットは、馴化および投与期間を通じて、温度 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ (温湿度の測定結果: Appendix 5)、換気回数10回以上/時 (オールフレッシュエアー方式)、照明 12 時間 (午前6時点灯、午後6時消灯) に設定したバリアーシステム動物室で、個体別にステンレス製金網ケージ [276 W × 426 D × 200 H (mm)] に収容し、これをステンレス製5段のラックに配して飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料 [日本チャールス・リバー株式会社、ホワイトフレーク (ロット番号 4-1-24、4-8-6)、汚染物質の分析結果: Appendix 6) を入れたポリカーボネート製ケージ [265 W × 426 D × 200 H (mm)] に収容した。飼料 (日本クレア株式会社、固型飼料CE-2、ロット番号 E2083、E2093、汚染物質の分析結果: Appendix 7) と水

(神奈川県営水道水を1 μ mカートリッジフィルター濾過後紫外線照射して使用、汚染物質の分析結果：Appendix 8)は、それぞれ給餌器および自動給水装置または給水瓶（ポリカーボネート製ケージの場合）により自由摂取させた。飼育室の環境条件ならびに給与した飼料、水および巣作り材料には試験の評価に影響する可能性が考えられる変化や汚染物質の混在は認められなかった。

3. 群分けおよび個体識別

各群の動物数は、雌雄各10匹とし、各群への動物の割り付けは、投与開始日（投与前）の体重に基づく層化無作為抽出法を用いて行った。

群分け後の動物の個体識別は耳介パンチ法により行い、ラックおよびケージには標識札を貼付した。

4. 試験群の構成、投与量の設定（参考資料）および投与方法

投与量は、投与量設定試験の結果（参考資料）に基づいて設定した。投与量設定試験は、雄9週齢、雌8週齢のSD系〔Crj:CD(SD)〕ラットを1群雌雄各4匹とし、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0、3、10、30、100および300 mg/kg/日用量投与の6群を設け、14日間の反復経口投与により実施した。その結果、300 mg/kg群で体重増加の抑制傾向が雌雄に、腎臓および副腎重量の増加傾向が雄に認められた。そこで、本試験における投与量は、より明らかな毒性の発現が予想される400mg/kg/日を高用量とし、以下100、25および6 mg/kg/日の4用量を設定した。

試験群の構成は、①溶媒投与群(以下、対照群)、②被験物質6 mg/kg/日投与群(6 mg/kg群)、同25 mg/kg/日投与群(25 mg/kg群)、④同100 mg/kg/日投与群(100 mg/kg群)、⑤同400 mg/kg/日投与群(400 mg/kg群)の5群とした。

投与方法は、投与液量を体重1 kg当たり5 mlとし、胃ゾンデを装着した注射筒を用いて被験物質の0.12 w/v%液(6 mg/kg群)、0.5 w/v%液(25 mg/kg群)、2 w/v%液(100 mg/kg群)あるいは8 w/v%液(400 mg/kg群)を、雌雄とも交配開始14日前から、雄は44日間、雌は分娩後の哺育3日(40～51日間)まで、1日1回(午前中)、経口投与した。対照群には、溶媒を同様に投与した。

5. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態観察

投与期間中毎日、動物の生死、外観、行動等について観察した。

(2) 体重および摂餌量測定

体重の測定は、個体ごとに投与開始日(投与開始直前)およびその後は7日間隔で行い、さら

に最終投与日と屠殺日あるいは死亡発見日に測定した。ただし、雌の妊娠後は、妊娠0、7、14 および 20日と哺育0日および4日に測定した。摂餌量は、体重測定日に合わせて、ケージごとに翌朝までの24時間の飼料消費量を測定した。雌の摂餌量の最終測定は、哺育3日に行った。交配期間中は、摂餌量を測定しなかった。これらの測定には、電子上皿天秤(エー・アンド・デー社製、FY-3000)を用いた。

(3) 交配および分娩状態観察

投与14日の午後に、雄のケージに同一群内の雌を入れて1対1の組み合わせを作り、交尾が確認されるまで(14日間で全例の交尾を確認)、連続同居させた。交尾の確認は毎朝一定時刻(9:30分頃)に行い、膣栓形成あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠0日とした。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、1腹ごとに全例の出産が確認された日を哺育0日とした。交配および分娩の観察結果から、各群について交尾率〔(交尾成立動物数/同居動物数)×100〕、受胎率〔(受胎雌数/交尾成立雌数)×100〕および出産率〔(生児出産雌数/生存妊娠雌数)×100〕ならびに分娩の確認された全例について妊娠期間(妊娠0日から分娩が確認された朝の前日までの期間)を算定した。

(4) 臨床病理学的検査

雄について、以下の検査を実施した。

- a. 尿検査：投与42日に、腰背部を圧迫刺激して新鮮尿を採取し、試験紙法(マイルス・三共株式会社、マルティスティックス®)により、pH、潜血、タンパク、糖、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンを定性的に検査した。
- b. 血液学的検査：供試血液の採取は、投与期間終了翌日(投与開始45日)の解剖直前に行った。計画屠殺動物の採血に当たっては、動物を前日の午後5時より除餌し水のみを与えた。採血はエーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より行い、採取した血液は2分割し、その一部をEDTA-2Kで凝固阻止処理して、次の項目を測定した。

項目(略号)	測定法	測定機器
①赤血球数(RBC)	電気抵抗検出方式	多項目自動血球計数装置[E-4000:東亜医用電子(株)]
②血色素量(Hb)	ラウリル硫酸ナトリウム-ヘモグロビン法	
③ヘマトクリット値(Ht)	パルス検出方式	
④平均赤血球容積(MCV)	計算値	
⑤平均赤血球血色素量(MCH)	計算値	
⑥平均赤血球血色素濃度(MCHC)	計算値	
⑦白血球数(WBC)	電気抵抗検出方式	
⑧血小板数(Plat.)	電気抵抗検出方式	

なお、網状赤血球数および白血球百分率算定用に血液塗抹標本を作製したが、赤血球関連項目や白血球数に変化が認められなかったため、観察は実施しなかった。

c. 血液生化学的検査：採取した血液の一部から血清を分離し、次の項目を測定した。

項目 (略号)	測定法	測定機器
① 総タンパク (T.P.)	Biuret 法	生化学自動分析 装置 [JCA-VX- 1000 型クリナ ライザー：日本 電子(株)]
② アルブミン (Alb.)	BCG 法	
③ A/G 比 (A/G)	計算値	
④ 血糖 (Glu.)	酵素法 (GK ¹⁾ -G6PDH ²⁾ -UV 系)	
⑤ トリグリセライド (T.G.)	酵素法 (LPL ³⁾ -GPO ⁴⁾ -POD ⁵⁾ 系)	
⑥ 総コレステロール (T-Cho.)	酵素法 (CES ⁶⁾ -COD ⁷⁾ -POD 系)	
⑦ 総ビリルビン (T-Bil.)	Jendrassik 法	
⑧ 尿素窒素 (BUN)	Urease-UV 法	
⑨ クレアチニン (Crea.)	Jaffé法	
⑩ GOT (GOT)	SSCC ⁸⁾ 法	
⑪ GPT (GPT)	SSCC 法	
⑫ γ -GTP (γ -GTP)	SSCC 法	
⑬ ALP (ALP)	GSCC ⁹⁾ 法	
⑭ カルシウム (Ca)	OCPC 法	
⑮ 無機リン (P)	酵素法 (PNP ¹⁰⁾ -XOD ¹¹⁾ -POD系)	
⑯ ナトリウム (Na)	イオン電極法	電解質自動分析 装置 [NAKL-1: 東亜電波工業(株)]
⑰ カリウム (K)	イオン電極法	
⑱ 塩素 (Cl)	イオン電極法	

1) グルコキナーゼ、2) グルコース 6 リン酸脱水素酵素、3) リボプロテイン
リパーゼ、4) グリセロリン酸酸化酵素、5) ペルオキシダーゼ、6) コレステ
ロールエステラーゼ、7) コレステロールオキシダーゼ、8) スカンジナビア臨
床化学会、9) ドイツ臨床化学会、10) プリンヌクレオシドホスフォリラーゼ、
11) キサンチンオキシダーゼ

(5) 病理学的検査

死亡動物は発見後速やかに、雄の計画屠殺動物は採血に続いて、また雌の計画屠殺動物は哺
育 4 日の観察終了後にエーテル麻醉下で、いずれも放血屠殺し、次の項目を検査した。分娩異
常あるいは分娩後の異常により出産児の全例が死亡した雌は死亡が確認された日に、分娩予定
日を過ぎても分娩が認められない雌については分娩予定の 4 日後（妊娠 25 日）にそれぞれ屠殺
し、検査に供した。

a. 剖検：全身臓器を肉眼的に観察した。さらに、雌については、卵巣の黄体数および子宮の
着床痕の数を調べ、着床率〔(着床痕数/黄体数)×100〕を算定した。

b. 臓器重量測定：電子上皿天秤(メトラー社、AT 200)を用いて、雌雄の肝臓、腎臓、胸腺な
らびに雄の精巣、精巣上体を秤量(絶対重量)し、対体重比(相対重量)を算出した。腎臓、精

巢および精巢上体は、左右を一括して秤量した。

c. 組織学的検査：次の臓器を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巢および精巢上体のみブアン液)で固定した。

脳、下垂体、眼球、ハーダー腺、甲状腺(上皮小体含む)、唾液腺、胸腺、肺(気管含む)、心臓、舌、食道、胃、腸、肝臓、脾臓、膵臓、副腎、腎臓、膀胱、精巢、精巢上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、膣、大動脈(胸部)、脊髓(頸膨大部、腰膨大部)、坐骨神経、骨・骨髓(胸骨、大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)、骨格筋(下腿三頭筋)、皮膚(背部)、乳腺(腹部)、肉眼的異常部位

組織学的検査は、対照群と高用量 400 mg/kg群の脳、心臓、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巢、卵巣について行った。さらに、剖検で異常の認められた盲腸、胸腺ならびに哺育行動を取らない雌がみられたので、雌については乳腺も検査した。6、25および100mg/kg群では、高用量群で変化の認められた雌雄の腎臓、胸腺、雌の肝臓、脾臓、副腎を検査した。さらに、不妊の対ならびに全児が死亡した雌では、対照群と高用量群で検査した臓器に加えて下垂体、精巢上体、精囊、前立腺、子宮、膣も検査した。組織標本の作製は、株式会社組織科学研究所(東京都青梅市黒沢2丁目984-1)に委託して実施し、常法に従いパラフィン切片を作製し、H-E染色を施した。また、沈着物を同定するため、一部の例の肝臓と腎臓については脂肪染色(ズダンⅢ)、腎臓についてはPAS染色も行った。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数および性比の観察

分娩完了の確認後各腹の産児数(生存児と死亡児の合計)を調べ、分娩率〔(総出産児数/着床痕数)×100〕を算定した。また、性を肛門と生殖突起の距離の長短により判定し、群ごとの性比を算出した。

(2) 外表異常および一般状態の観察

分娩完了後、口腔内を含む外表の異常を観察した。また、毎日一般状態および生死を確認し、出生率〔(出産確認時生児数/総出産児数)×100〕および新生児生存率〔(哺育4日生児数/出産確認時生児数)×100〕を求めた。

(3) 体重測定

新生児について哺育0日及び4日に、雌雄別に各腹ごとの総体重を測定し、1匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学的検査

死亡例はその都度、生存例は雌親の解剖時(哺育4日)にエーテル・クロロホルムで麻酔死さ

せ、胸腹部における主要臓器を肉眼的に観察した。

6. 統計処理

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との間の有意差（危険率5%以下）を次の方法で検定した。

体重、摂餌量、血液学のおよび血液生化学的データ、臓器重量、黄体数、着床痕数、妊娠期間、産児数などのパラメトリックデータは、Bartlettの分散検定を行った。分散が一様な場合は一元配置の分散分析を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。分散が一様でない場合、ならびに着床率、出生率、分娩率、新生児生存率、尿検査の定性的データなどのノンパラメトリックデータはKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果有意差を認めた場合、Dunnett法またはScheffé法（群の大きさが異なる場合）により対照群に対する各群の比較検定を行った。親動物の生存率、交尾率、受胎率、出産率、出産児の性比、病理学的検査等における異常例の出現率などのカテゴリカルデータは、 χ^2 検定を行った。

試験結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡動物 (Tables 1, 2, Appendices 9, 10)

400mg/kg群において、雌の3匹が死亡し、死亡率は30%であった。これらの死亡は、いずれも分娩予定日（妊娠22日）あるいはその翌日に発現した。なお、雌において、分娩異常あるいは分娩後の異常により、出産児の全例が死亡する例が、100mg/kg群に1匹、400mg/kg群に5匹認められたので、これらについては原因を明らかにするため、全児の死亡が確認された時点で屠殺し、病理学的検査に供した。

2) 一般状態 (Tables 3, 4, Appendices 11, 12)

雄において、投与39日以降に流涎が400mg/kg群の2匹に認められた。雌において、いずれも受胎前の投与5～16日および妊娠末期から哺育期にかけての投与39日以降に、消瘦（100mg/kg群の1匹、400mg/kg群の2匹）、自発運動低下（100mg/kg群の1匹、400mg/kg群の5匹）、下腹部被毛の尿による汚染（100mg/kg群の1匹、400mg/kg群の6匹）および紅涙による口・鼻周囲被毛の赤色汚染（400mg/kg群の5匹）が認められた。これらの症状を呈した動物は、下腹部被毛の尿による汚染を示した400mg/kg群の1例が不妊であったことを除いて、いずれも死亡あるいは分娩異常や分娩後の異常により全児が死亡した例であった。また、頸部、胸部あるいは腹部に脱毛が100mg/kg群の1匹と400mg/kg群の3匹に認められたが、400 mg/kg群の2匹は投与期間中に回復した。

3) 体重 (Figures 1, 2, Tables 5, 6, Appendices 13, 14)

400mg/kg群において、雄は投与期間を通じて有意な体重増加の抑制が認められ、投与の反復につれて対照群との差が拡大する傾向にあった。雌の体重も、投与期間を通じて対照群をやや下回って推移したが、統計学的には妊娠20日の体重にのみ有意差が認められた。なお、400mg/kg群の雌の哺育4日における体重あるいは摂餌量のデータは、それまでに妊娠した雌の全例が死亡あるいは出産した全児の死亡により屠殺剖検したため、得られなかった。

4) 摂餌量 (Figures 3, 4, Tables 7, 8, Appendices 15, 16)

400mg/kg群において、雄は投与1日、雌は交配前と妊娠0および20日の摂餌量が対照群に比べて有意に少なかった。また、統計学的有意差は認められなかったが、雄の投与8日と雌の妊娠7および14日の摂餌量も減少傾向を示した。

5) 雄の尿所見 (Table 9, Appendix 17)

400mg/kg群において、ケトン体の有意な増加が認められた。

6) 雄の血液学的所見 (Table 10, Appendix 18, 基礎データ : Appendix 30)

各検査項目に、被験物質投与の影響がうかがわれる変化は認められなかった。6 mg/kg群の血小板数は対照群に比べて有意な低値を示したが、用量依存的な変化ではなかった。

7) 雄の血液生化学的所見 (Table 11, Appendix 19, 基礎データ : Appendix 30)

400mg/kg群において、いずれも有意な無機リン量の増加ならびにGPT活性および塩素量の減少が認められた。総コレステロール量は25および100mg/kg群で有意な増加を、ナトリウム量は6および400mg/kg群で有意な減少を示したが、総コレステロールおよびナトリウムの変化は軽度、かつ、用量依存的ではなかった。

8) 剖検所見 (Tables 12, 13, Appendices 20, 21)

雄においては、盲腸の拡張が400mg/kg群で5匹に認められた。また、胸腺の萎縮は、100mg/kg以下の群では0～1匹の発現であったのに対し、400mg/kg群では4匹に認められた。雌においては、腎臓の腫大・退色が100mg/kg群の1匹（全児死亡例）と400mg/kg群の3匹（死亡の2例と全児死亡の1例）に、副腎の肥大・退色が100mg/kg群の1匹（全児死亡例）と400mg/kg群の7匹（死亡の3例と全児死亡の4例）に認められた。また、胸腺の萎縮が対照群を含む100mg/kg以下の群では2～3匹にみられたのに対し、400mg/kg群では7匹（死亡の3例と全児死亡の4例）と増加し、また脾臓も400mg/kg群の5匹（死亡の3例と全児死亡の2例）で萎縮していた。さらに、盲腸の拡張が400mg/kg群の1匹（不妊例）に認められた。

9) 臓器重量 (Tables 14, 15, Appendices 22～25)

雄においては、400mg/kg群で、絶対および相対重量に共通して腎臓重量は増加傾向を、胸腺重量は減少傾向を示し、統計学的には対照群と比べて胸腺の絶対重量と腎臓の相対重量に有意差が認められた。また、精巣は相対重量のみ有意な増加を示した。25、100および400mg/kg群の肝臓相対重量は、有意に大きかったが、用量依存的な変化ではなかった。雌においては、400mg/kg群で全児死亡により屠殺剖検した例は、計画屠殺した対照群に比べて胸腺の絶対および相対重量が小さく、絶対重量に有意差が認められた。肝臓は絶対重量がやや小さく、相対重量は有意に大きかった。

10) 病理組織学的所見 (Tables 16, 17, Photos 1～12, Appendices 20, 21)

被験物質投与との関連性がみられる変化は、次のとおりであった。

肝臓：小葉中間ないし周辺部肝細胞の脂肪化が、雌においていずれも全児死亡の100および400mg/kg群の各1匹に認められた。400mg/kg群の死亡した3匹には、うっ血が認められた。

腎臓：近位尿細管上皮において、雄では PAS陽性硝子滴の出現が100mg/kg群の 4 匹と400mg/kg群の 8 匹に、雌では脂肪変性が100mg/kg群の 3 匹（全児死亡の 1 例含む）と400mg/kg群の 4 匹（全児死亡の 1 例と死亡の 3 例）に認められ、変化の程度も用量依存的に増強する傾向がみられた。死亡例にはうっ血が認められた。

副腎：皮質細胞の空胞化が、いずれも雌の100mg/kg群の 1 匹（全児死亡例）と400mg/kg群の 9 匹（不妊の 1 例、全児死亡の 5 例、死亡の 3 例）に認められた。

胸腺：リンパ球が減少し皮髄境界がやや不明瞭な軽度萎縮が、対照群の雌 2 匹、6 mg/kg群の雄 1 匹と雌 2 匹、25mg/kg群の雄 1 匹と雌 3 匹、100mg/kg群の雌 2 匹および400mg/kg群の雄 4 匹と雌 1 匹（全児死亡例）に、中等度ないし高度萎縮がいずれも雌で100mg/kg群の 1 匹（全児死亡例）と400mg/kg群の 6 匹（全児死亡の 4 例、死亡の 2 例）に認められた。

脾臓：雌において、100mg/kg群の 1 匹（全児死亡例）と400mg/kg群の 5 匹（全児死亡の 2 例、死亡の 3 例）の脾臓は萎縮し、死亡の 1 例の変化は高度であった。

その他の臓器：対照群および400mg/kg群について、心臓、精巣、卵巣、脳、盲腸および雌の乳腺を検査したが、異常は認められなかった。また、分娩あるいは分娩後の異常により全児が死亡した雌や不妊の対の下垂体、精巣上体、精嚢、前立腺、子宮、膣についても、異常は認められなかった。

なお、以上の変化の他にも腎臓や下垂体に変化が認められたが、発現率や変化の程度に用量依存性傾向はなく、偶発的と判断される所見であった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 18、Appendix 26)

(1) 交尾率および受胎率

交尾は、対照群および被験物質投与各群の全例に成立した。400mg/kg群で、交尾に 7 日、11 日および14日を要する 3 対があったが、対照群に比べ交尾に要する平均日数に有意差は認められなかった。また、受胎率は、対照群ならびに 5 および25mg/kg群の100%に対し、100mg/kg群 90%、400mg/kg群80%と低下傾向を示したが、有意な変化ではなかった。

(2) 黄体数、着床痕数および着床率

対照群の黄体数19.7、着床痕数18.8に対し、100mg/kg以下の群ではそれぞれ17.6～18.5および16.9～17.4で、有意差は認められなかった。400mg/kg群では、黄体数16.3、着床痕数15.3といずれも有意に減少した。着床率は、対照群の95.9%に対し、被験物質投与各群とも類似した値を示し、有意な変化は認められなかった。

(3) 出産率および妊娠期間

出産率は対照群ならびに100mg/kg以下の群では100%であった。400mg/kg群では、生存した5匹の妊娠雌のうち生児出産は3匹で、出産率は60.0%と減少した。妊娠期間は、対照群の21.2日に対し被験物質投与各群は21.2～22.0の範囲にあり、有意な変化は認められなかった。

(4) 分娩および哺育状態

400mg/kg群において、妊娠した8匹（Nos. 541～543、545、547～550）のうち、3匹は分娩予定日（妊娠22日、No. 548）あるいはその翌日（Nos. 541、549）に死後発見された。これらの例では、いずれもほぼ正常に発育した14～16匹の胎児が確認され、また1匹は児が臍に下降していた。残りの5匹について、No. 543は分娩が遅延し妊娠25日、No. 547は妊娠23日に分娩が確認されたが、いずれも全児が死亡していた。また、Nos. 542、545および550は、分娩確認時にいずれも出産児の約半数は死亡しており、その後雌親は哺育行動を取らず、全児が哺育1～2日までに死亡した。100mg/kg群においても、1匹（No. 531）は死亡児1匹と14匹の生児出産が確認されたが、その後自発運動が低下し、哺育行動を取らず、哺育3日に全児が死亡した。

2) 新生児に及ぼす影響

(1) 生存性 (Table 19、Appendix 27)

対照群の1腹当たり総出産児数は17.0匹、哺育0日の新生児数は16.8匹（雄7.8匹、雌9.0匹）、哺育4日の新生児数は16.3匹（雄7.7、雌8.6匹）で、出生率は98.8%、哺育4日生存率は97.1%であった。100mg/kg以下の群ではこれらの指標に有意な変化は認められなかった。400mg/kg群では、対照群に比べて総出産児数は12.0匹と有意に少なく、また死亡児が多かったため哺育0日の新生児数は4.0匹（雄2.2匹、雌1.8匹）、出生率は31.4%といずれも有意に減少した。さらに、400mg/kg群では哺育2日までに全腹の全児が死亡し、哺育4日の生存率は0%となった。分娩率や新生児の性比には有意な変化は認められなかった。また、生残した新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 体重 (Table 19、Appendix 27)

哺育0日における新生児体重は、対照群の雄6.4g、雌6.0gに対し100mg/kg以下の群では6.5～6.7gおよび6.2～6.4gで有意な変化は認められなかった。400mg/kg群では、雄5.6g、雌5.3gとやや体重が小さかった。しかし、対照群と比べて有意差は認められなかった。哺育4日の体重については、100mg/kg以下の群において対照群と有意差は認められなかった。

(3) 形態 (Tables 20、21、Appendices 28、29)

被験物質投与と関連すると考えられる外表および内臓の異常は認められなかった。外表異常については、6 mg/kg群に左後肢の第3、4、5指欠損および短肢の重複異常が1匹(0.7%)、100mg/kg群で短尾が1匹(0.7%)および400mg/kg群で口蓋裂が5匹(14.3%、1腹)認められた。内臓異常については、一側性の腎臓欠損が6 mg/kg群の1匹(0.7%)に認められた。内臓変異については、胸腺の頸部残留、左臍動脈遺残あるいは腎盂拡張が総計対照群で1匹(0.6%)、6mg/kg群で6匹(3.7%)、25mg/kg群で2匹(1.3%)、100mg/kg群で4匹(2.6%)、400 mg/kgで1匹(1.7%)認められた。しかし、これらの発現率には群間に有意差は認められなかった。

考察および結論

1. 反復投与毒性

雄親について、400mg/kg群で投与開始後短期間摂餌量が減少し、体重増加は投与期間を通じて抑制された。しかし、一般状態の変化は、流涎が2匹に認められた以外、特に認められなかった。

病理組織学的検査において、腎臓の近位尿細管上皮にPAS陽性の硝子滴が100mg/kg以上の群に用量依存的に出現し、400mg/kg群の腎臓相対重量は増加した。血液生化学的検査で認められた400mg/kg群の血清塩素量の減少や無機リン量の増加も、腎機能に対する影響を示唆する変化と解せられる。

尿細管上皮の硝子滴は、無鉛ガソリン¹⁾、1,4-ジクロロベンゼン²⁾、その他の多くの化学物質³⁾の雄ラットへの投与により出現する事が知られており、 $\alpha_2\mu$ -グロブリンの沈着像で、近位尿細管上皮におけるタンパクの再吸収あるいはその代謝過程に対する何らかの傷害によるものと考えられている³⁾。

盲腸の拡張が400mg/kg群に認められた。盲腸の拡張は抗菌性物質投与時にしばしば認められ、腸内細菌叢の変化によるものと考えられている⁴⁾。本被験物質による発現機序は不明であるが、拡張の程度は軽度で、盲腸には病理組織学的に異常は認められず、糞便性状の変化も認められなかった。

以上の変化に加えて、胸腺の萎縮や尿中ケトン体の増加および血清GPT活性の減少が400 mg/kg群に認められた。尿中ケトン体の増加については、脂質や糖質の代謝異常を示唆する所見は認められておらず、またその他の変化も軽度なものであった。

なお、臓器重量において、25mg/kg以上の群の肝臓ならびに400mg/kg群の精巣は相対重量のみの増加を示した。しかしながら、肝臓では用量の増加に伴って変化が増強する傾向は認められず、また肝臓および精巣とも病理組織学的には異常が認められなかったことから、いずれも毒性影響を示唆する変化ではないと判断された。

一方、雌親については、400mg/kg群で、自発運動低下、下腹部被毛の尿による汚染、紅涙などの一般状態の変化が受胎前と妊娠末期から哺育期にかけて認められ、交配前および妊娠期間中の摂餌量は対照群に比べて少なく、特に妊娠末期では体重増加が抑制され、妊娠雌8匹中3匹は分娩予定日あるいはその翌日に死亡した。100mg/kg群においても、400mg/kg群と同様の一般状態の変化が1匹に認められた。

腎臓においては、雄に認められた硝子滴は認められなかったが、近位尿細管上皮の脂肪変性が100mg/kg以上の群で認められ、腎臓は肉眼的に退色していた。本被験物質による変化と類似の雌雄で異なる腎臓の形態的变化は、1,2-ジクロロベンゼンのラットへの投与により発現することが知られている⁶⁾。

また、400mg/kg群で副腎の皮質細胞空胞化や胸腺および脾臓の萎縮が認められ、100mg/kg群においても一般状態の変化の認められた1匹の副腎や脾臓に同様の所見が認められた。

なお、肝細胞の脂肪化が100および400mg/kg群に認められたが、各10匹中いずれも1匹と発現率は低かった。

以上の結果から、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投与により、腎臓、胸腺、副腎および脾臓に対する毒性影響が認められ、無影響量は雌雄とも25 mg/kg/dayと推定された。

2. 生殖発生毒性

雌雄の交尾能および雄の受胎能や雌の受胎能に対しては、交尾率および受胎率に変化は認められず、影響はないものと判断された。

黄体数および着床痕数は、400mg/kg群で減少し、着床率には変化が認められなかったことから、排卵に対する影響が示唆された。総出産児数の減少も、分娩率に明かな変化がなかったことから、主に排卵数（黄体数）の減少によるものと推察される。なお、卵巢や下垂体には、病理組織学的に異常は認められなかった。

分娩については、分娩率や妊娠期間に明かな変化が認められなかったが、400mg/kg群で妊娠雌8匹中3匹が分娩予定日あるいはその翌日に死亡し、そのうちの1匹は分娩中の死亡であった。さらに、分娩が明らかに遅延する例も認められ、分娩に対する影響がうかがわれた。さらに、生存した5匹の妊娠雌の全例において、分娩確認時に各腹の全児あるいはその約半数が死亡しており、出産後も哺育行動を取らず、哺育2日までに全ての雌親の全児が死亡した。したがって、出産率、出生率、新生児数および新生児の哺育4日生存率は減少した。

分娩および哺育の異常については、下垂体および生殖器系臓器に異常は認められず、腎臓、胸腺、副腎、脾臓などに病理学的変化が認められたことから、一般毒性学的な影響が大きいものと考えられた。

新生児の外表や内臓には、被験物質投与の影響が示唆される異常は認められず、新生児の体

重も、哺育0日で400mg/kg群に減少傾向がみられたが有意な変化ではなかった。

100mg/kg群においても、400mg/kg群と同様の各臓器における病理学的変化を示す1匹がみられ、この例では分娩後自発運動が低下し、哺育行動を取らず全児が死亡した。しかし、その他の雌親には異常は認められず、生殖発生に関する各指標に有意な変化は認められなかった。

100mg/kg群に1対、400mg/kg群に2対の不妊が認められたが、いずれも生殖器系臓器に異常は認められず、発現率も低いことから、偶発的なものと判断された。

400mg/kg群の1腹の5匹に口蓋裂が認められた。この母動物は、妊娠期間中の体重増加が著しく抑制され、妊娠末期には自発運動低下、口・鼻周囲被毛の赤色汚染、消瘦等の症状を呈し、分娩は遅延して妊娠25日に分娩が確認されたが全児が死亡していた例であった。口蓋裂は、ラットに自然発生的にも認められ⁶⁾、また、その発現には母動物の栄養状態の影響が大きいことが報告されている^{7, 8)}。いずれにしても、本試験で認められた口蓋裂の発現は1腹のみで、統計学的に有意な増加ではなく、被験物質の催奇形性を示唆する変化ではないと判断される。

以上のように、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投与において、雄親の生殖能に対しては、400mg/kg群においても明らかな影響は認められず、無影響量は400mg/kg以上と推定された。雌親の生殖および児動物の発生に関しては、死亡の発現する400mg/kg群で雌親の排卵、分娩、哺育ならびに新生児の生存性に対する影響を示唆する変化が認められ、いずれも無影響量は100mg/kgと推定された。

参考文献

- 1) C.A. Halder, C.E. Holdsworth, B.Y. Cockrell and V.J. Piccirillo, *Toxicol. Indust. Health*, 1, 67(1985)
- 2) M. Charbonneau, J. Strasser, E.A. Lock, M.J. Tumer and J.A. Swenberg, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 99, 122(1989)
- 3) S.J. Broghoff, B.G. Shrt and J.A. Swenberg, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 30, 349 (1990)
- 4) 福田英臣、秋元健、坂口孝編、“毒性試験講座15-医薬品”、地人書館、37(1990)
- 5) “化学物質毒性試験報告書”、1, 317(1994)
- 6) H. Morita, F. Ariyuki, N. Inomata, K. Nishimura, Y. Hasegawa, M. Miyamoto and T. Watanabe, *Cong. Anom.*, 27, 147(1987)
- 7) A. Noda, M. Ito, N. Kon, S. Aoyama, Y. Yamamoto, Y. Ito, T. Hayama, M. Asada and K. Kadowaki, *Cong. Anom.*, 33, 304(1993)
- 8) F.C. Fraser : Some Genetic Aspects of Teratology ; in *Teratology, Principles and Techniques*, Edited by J.G. Wilson and J. Warkany, PP21, Univ. of Chicago Press, Chicago & London(1965)

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
ラットを用いた経口投与による反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験
(試験番号 93-051)

最終報告書 添付資料 A

(図・群別平均値表)

財団法人 畜産生物科学安全研究所

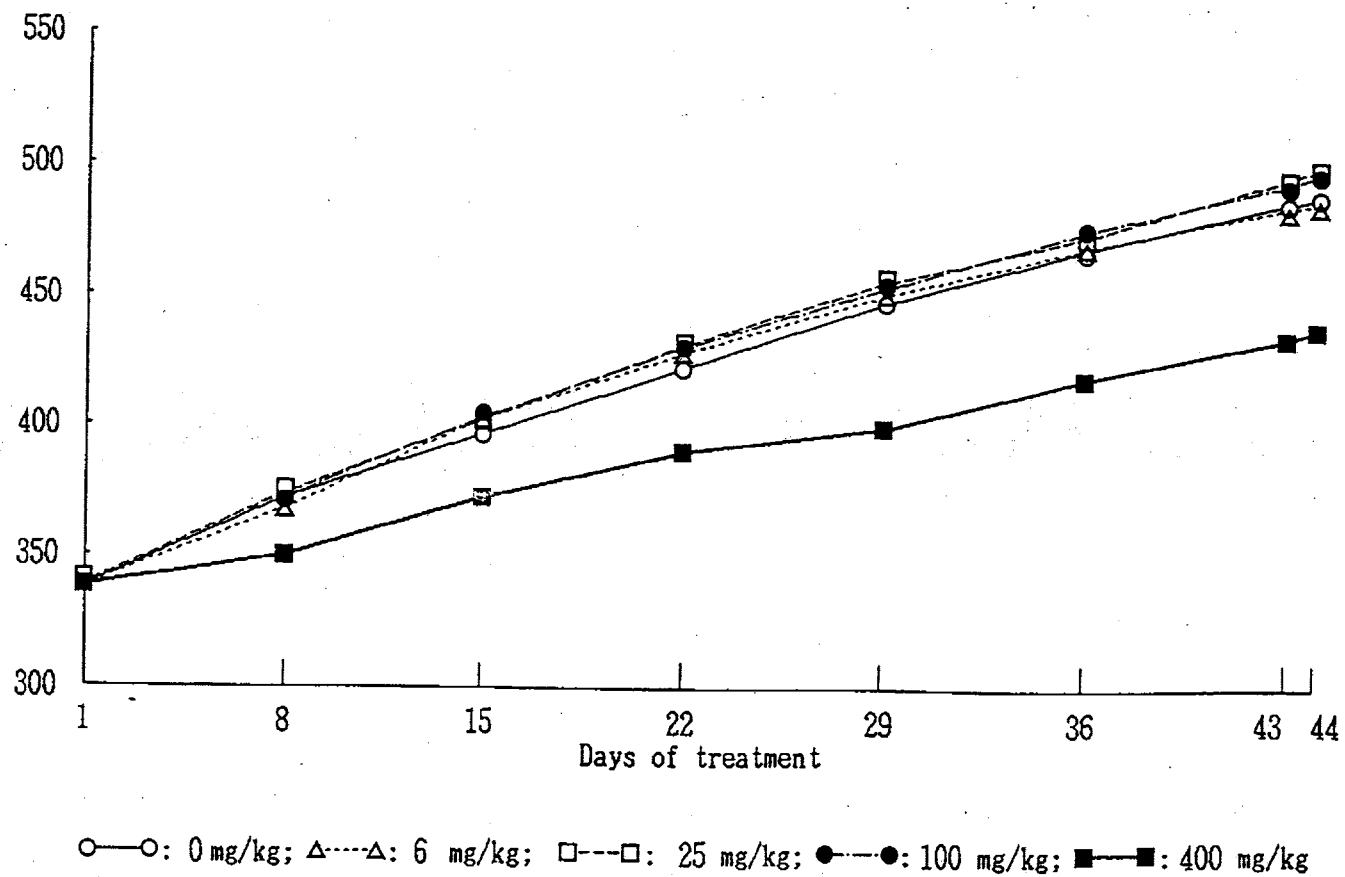


Fig. 1 Body weights of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

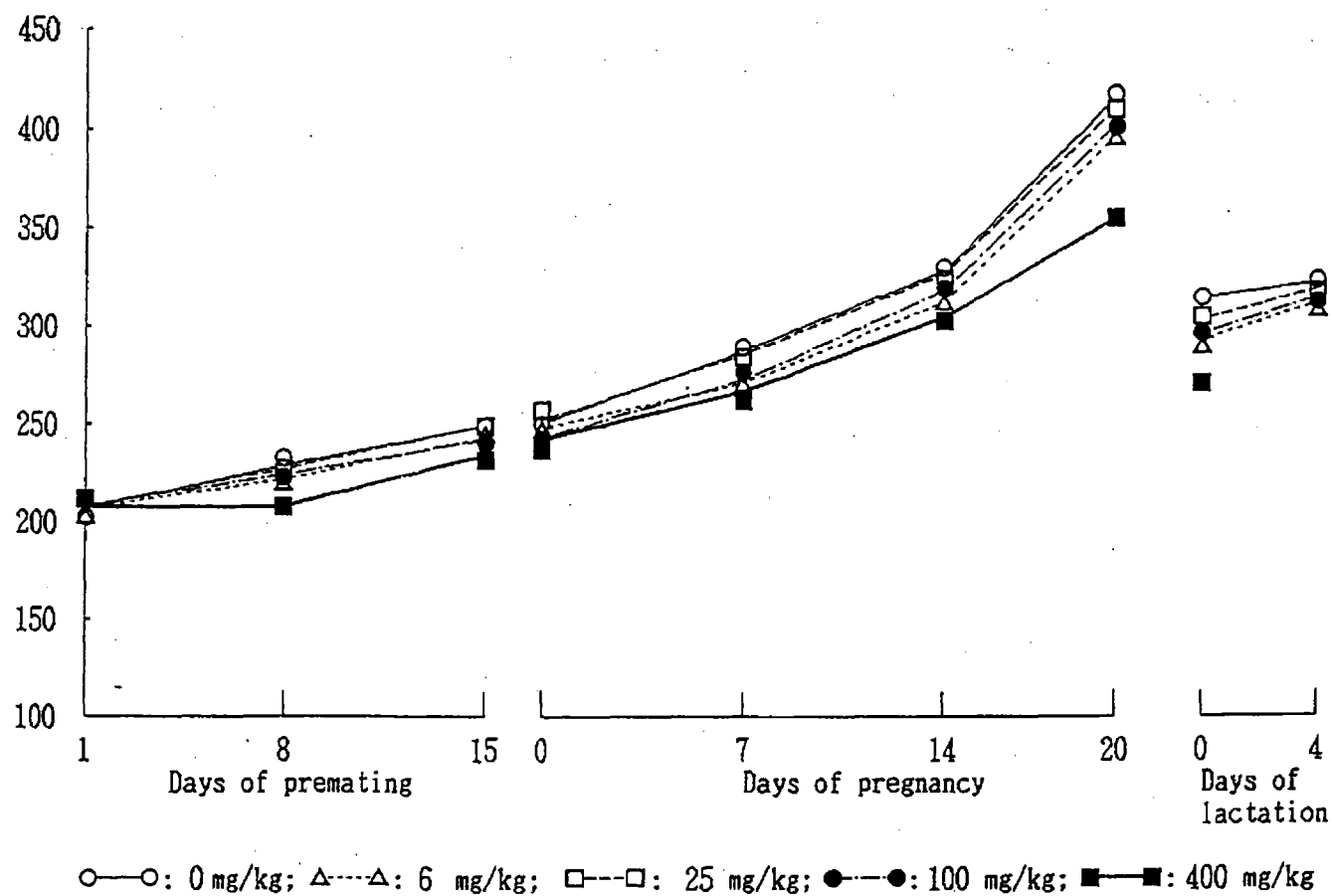


Fig. 2 Body weights of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

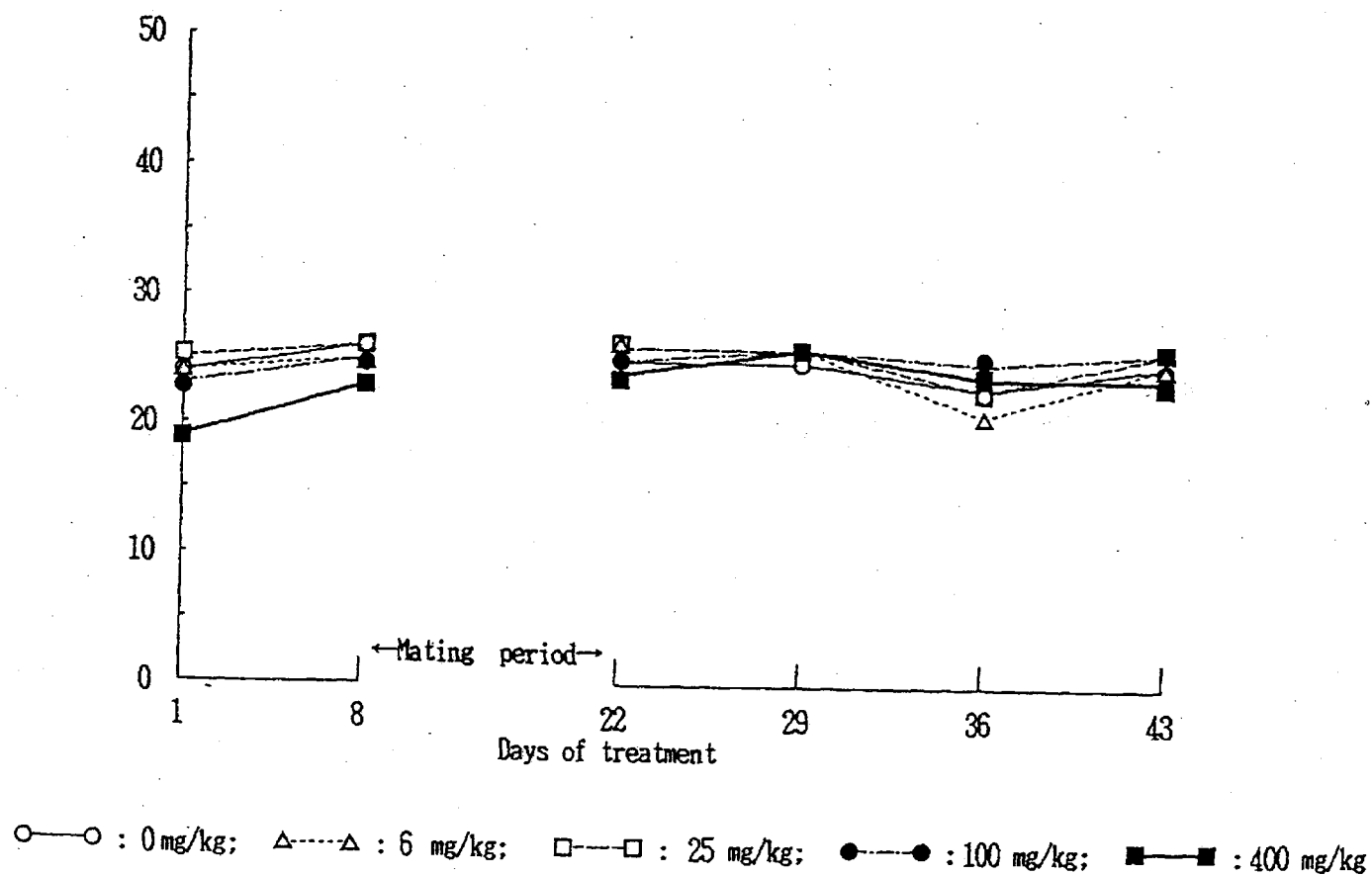


Fig. 3 Food consumption of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

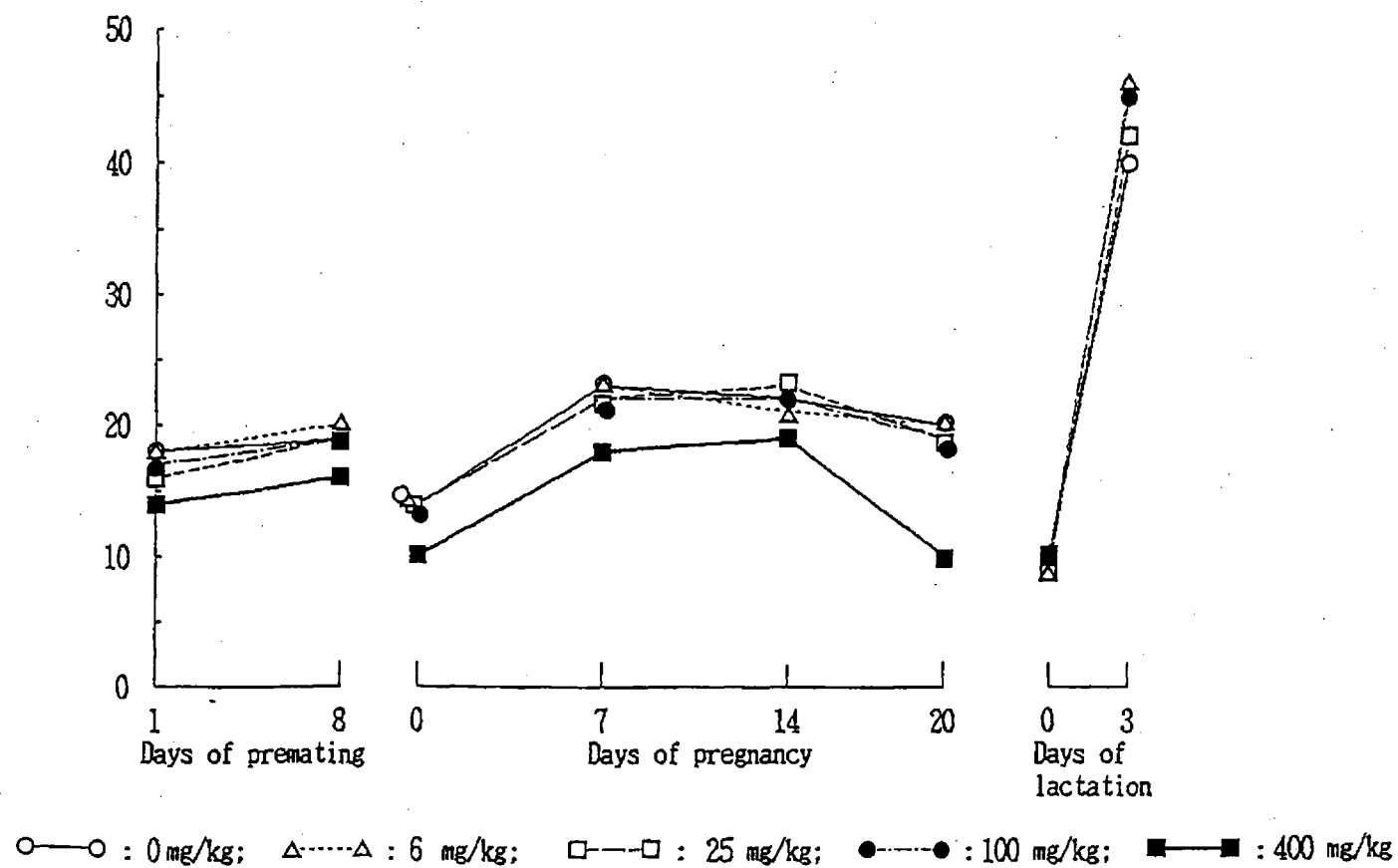


Fig. 4 Food consumption of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Table 1 Mortality rate of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of dead animals	0	0	0	0	0
Mortality (%)	0	0	0	0	0

Table 2 Mortality rate of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
No. of animals	10	10	10	10	10
No. of dead animals	0	0	0	0	3
Mortality (%)	0	0	0	0	30

One female in 100mg/kg group and 5 females in 400mg/kg group were killed before termination of the study for pathological examination because they lost their litters at delivery or by day 3 of lactation.

Table 3 Incidence of clinical signs of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0	6	25	100	400
	Fate	TK	TK	TK	TK	TK
	No. of animals	10	10	10	10	10
Salivation		0	0	0	0	2

TK : Terminal kill

Table 4 Incidence of clinical signs of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Clinical sign	Dose(mg/kg)	0	6	25	100			400			
	Fate	TK	TK	TK	TK	NP	KL	(Total)	NP	KL/KD	FD (Total)
	No. of animals	10	10	10	8	1	1	(10)	2	5	3 (10)
Emaciation		0	0	0	0	0	1	(1)	0	1	1 (2)
Decreased locomotor activity		0	0	0	0	0	1	(1)	0	2	3 (5)**
Blotted fur on lower abdomen		0	0	0	0	0	1	(1)	1	2	3 (6)**
Chromodacryorrhea		0	0	0	0	0	0	(0)	0	2	3 (5)**
Hair loss region(s)		0	0	0	1	0	0	(1)	0	2	1 (3)

TK : Terminal kill on day 4 of lactation

NP : Non-pregnant(killed on 25 days after copulation)

FD : Found dead

KL : Killed because all pups died after delivery

KD : Killed due to delivery disorder

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 5

Body weights of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Day 1	8	15	22	29	36	43	44
0	338 ± 6 (10)	372 ± 12 (10)	396 ± 17 (10)	422 ± 22 (10)	447 ± 28 (10)	469 ± 31 (10)	487 ± 33 (10)	489 ± 31 (10)
6	338 ± 7 (10)	368 ± 14 (10)	402 ± 19 (10)	428 ± 19 (10)	450 ± 24 (10)	470 ± 30 (10)	485 ± 34 (10)	487 ± 34 (10)
25	339 ± 7 (10)	374 ± 7 (10)	402 ± 12 (10)	431 ± 13 (10)	455 ± 15 (10)	474 ± 20 (10)	496 ± 20 (10)	500 ± 20 (10)
100	338 ± 7 (10)	372 ± 6 (10)	403 ± 10 (10)	430 ± 13 (10)	453 ± 18 (10)	476 ± 24 (10)	494 ± 28 (10)	498 ± 29 (10)
400	338 ± 7 (10)	350** ± 10 (10)	372** ± 10 (10)	390** ± 12 (10)	399** ± 12 (10)	419** ± 14 (10)	434** ± 16 (10)	438** ± 18 (10)

Each value is expressed as mean±SD.

(n): No. of animals

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 6

Body weights of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g)

Dose (mg/kg)	Days of premating				Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	15	22	0	7	14	20	0	4
0	207	229	249	---	250	288	329	419	315	323
	± 8	± 13	± 15	---	± 17	± 18	± 22	± 29	± 33	± 26
	(10)	(10)	(10)	---	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
6	207	222	243	---	248	271	313	399	293	313
	± 8	± 12	± 14	---	± 13	± 20	± 22	± 26	± 25	± 23
	(10)	(10)	(10)	---	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
25	208	227	249	---	252	286	327	412	304	320
	± 9	± 10	± 13	---	± 12	± 19	± 22	± 30	± 36	± 23
	(10)	(10)	(10)	---	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)	(10)
100	208	224	242	---	243	273	319	405	297	316
	± 9	± 10	± 11	---	± 14	± 22	± 17	± 21	± 27	± 14
	(10)	(10)	(10)	---	(9)	(9)	(9)	(9)	(9)	(8)
400	208	208	234	269	242	267	305	356**	273	---
	± 9	± 27	± 17	± 6	± 22	± 22	± 29	± 38	± 54	---
	(10)	(10)	(10)	(2)	(8)	(8)	(8)	(8)	(5)	---

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D. and (number of animals available).

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 7

Food consumption of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)

Dose (mg/kg)	No. of cages	Day 1	8	15	22	29	36	43
0	10	24 ± 1 (10)	26 ± 3 (10)	24 ± 2 (4)	25 ± 3 (10)	25 ± 3 (10)	23 ± 3 (10)	25 ± 2 (10)
6	10	24 ± 3 (10)	25 ± 3 (10)	25 ± 4 (2)	26 ± 2 (10)	26 ± 3 (10)	21 ± 3 (10)	25 ± 2 (10)
25	10	25 ± 2 (10)	26 ± 2 (10)	24 ± 1 (2)	26 ± 2 (10)	26 ± 3 (10)	23 ± 4 (10)	26 ± 2 (10)
100	10	23 ± 3 (10)	25 ± 1 (10)	23 ± 3 (4)	25 ± 3 (10)	26 ± 2 (10)	25 ± 3 (10)	26 ± 2 (10)
400	10	19** ± 4 (10)	23 ± 3 (10)	--- --- ---	24 ± 3 (8)	26 ± 4 (10)	24 ± 4 (10)	24 ± 3 (10)

Each value is expressed as mean±SD.

(n): No. of animals

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 8

Food consumption of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

(g/rat/day)								
Dose (mg/kg)	Days of premating		Days of pregnancy				Days of lactation	
	1	8	0	7	14	20	0	3
0	18 ± 4 (10)	19 ± 3 (10)	14 ± 2 (10)	23 ± 3 (10)	22 ± 4 (10)	20 ± 3 (10)	10 ± 5 (10)	40 ± 8 (10)
6	18 ± 2 (10)	20 ± 3 (10)	14 ± 2 (10)	23 ± 6 (10)	21 ± 2 (10)	20 ± 3 (10)	9 ± 7 (10)	46 ± 6 (10)
25	16 ± 3 (10)	19 ± 2 (10)	14 ± 1 (10)	22 ± 5 (10)	23 ± 4 (10)	19 ± 5 (10)	9 ± 7 (10)	42 ± 6 (10)
100	17 ± 2 (10)	19 ± 2 (10)	14 ± 3 (9)	22 ± 4 (9)	22 ± 2 (9)	19 ± 5 (9)	10 ± 7 (9)	45 ± 8 (8)
400	14* ± 3 (10)	16* ± 3 (10)	10** ± 2 (8)	18 ± 4 (8)	19 ± 8 (8)	10** ± 5 (8)	10 ± 8 (3)	--- --- ---

Each value is expressed as mean±S.D. and (number of animals available).

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 9 Urinary findings of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	pH						Protein						Glucose				Ketone body			
		6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	-	±	+	++	+++	++++	-	±	+	++	-	±	+	++
0	10	1	5	4					4	6				10				10			
6	10	2	3	5					4	6				10				10			
25	10	2	4	4					3	7				10				10			
100	10	1	5	2	2			1	3	6				10				10			
400	10	1	4	2	2	1		1	5	4				10				3	7**		

Dose (mg/kg)	No. of animals	Occult blood					Urobilinogen				Bilirubin			
		-	±	+	++	+++	0.1	1	2	4	-	+	++	+++
0	10	10					10				10			
6	10	9	1				10				10			
25	10	9	1				10				10			
100	10	9		1			10				10			
400	10	10					10				10			

Protein : -(negligible), ±(15~30mg/dl), +(30mg/dl), ++(100mg/dl), +++(300mg/dl), ++++(1000mg/dl)

Glucose : -(negligible), ±(0.1g/dl), +(0.25g/dl), ++(0.5g/dl)

Ketone body : -(negligible), ±(5mg/dl), +(15mg/dl), ++(40mg/dl)

Occult blood : -(negligible), ±(trace), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

Urobilinogen : Ehrlich unit/dl

Bilirubin : -(negligible), +(slight), ++(moderate), +++(marked)

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 10

Hematological findings of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	WBC ($10^2/\mu\text{l}$)	RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	Hb (g/dl)	Ht (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (%)	Plat. ($10^4/\mu\text{l}$)
0	10	75 $\pm$ 21	819 $\pm$ 35	15.1 $\pm$ 0.7	43.4 $\pm$ 1.5	53 $\pm$ 1	18.4 $\pm$ 0.5	34.8 $\pm$ 0.6	133 $\pm$ 15
6	10	67 $\pm$ 14	830 $\pm$ 31	15.2 $\pm$ 0.5	43.3 $\pm$ 1.0	52 $\pm$ 1	18.3 $\pm$ 0.5	35.1 $\pm$ 0.5	114* $\pm$ 15
25	10	72 $\pm$ 23	805 $\pm$ 28	14.8 $\pm$ 0.3	42.3 $\pm$ 1.0	53 $\pm$ 1	18.4 $\pm$ 0.5	34.9 $\pm$ 0.5	128 $\pm$ 13
100	10	79 $\pm$ 22	802 $\pm$ 43	14.9 $\pm$ 0.4	42.2 $\pm$ 1.2	53 $\pm$ 1	18.5 $\pm$ 0.6	35.2 $\pm$ 0.2	130 $\pm$ 16
400	10	73 $\pm$ 27	828 $\pm$ 29	15.1 $\pm$ 0.4	43.0 $\pm$ 1.1	52 $\pm$ 1	18.2 $\pm$ 0.3	35.0 $\pm$ 0.6	137 $\pm$ 13

Each value is expressed as mean $\pm$ S. D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 11

Biochemical findings of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	No. of animals	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	γ -GTP (IU/l)	T.P. (g/dl)	Alb. (g/dl)	A/G	T-Chol. (mg/dl)	T.G. (mg/dl)
0	10	61 $\pm$ 10	28 $\pm$ 5	245 $\pm$ 66	0.38 $\pm$ 0.32	6.53 $\pm$ 0.17	3.14 $\pm$ 0.14	0.93 $\pm$ 0.08	66 $\pm$ 12	62 $\pm$ 20
6	10	57 $\pm$ 8	29 $\pm$ 6	261 $\pm$ 73	0.37 $\pm$ 0.23	6.49 $\pm$ 0.18	3.17 $\pm$ 0.17	0.95 $\pm$ 0.07	65 $\pm$ 9	58 $\pm$ 27
25	10	56 $\pm$ 7	26 $\pm$ 5	253 $\pm$ 49	0.36 $\pm$ 0.17	6.60 $\pm$ 0.19	3.19 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.10	84** $\pm$ 9	63 $\pm$ 13
100	10	62 $\pm$ 14	24 $\pm$ 8	233 $\pm$ 58	0.34 $\pm$ 0.22	6.70 $\pm$ 0.26	3.17 $\pm$ 0.16	0.90 $\pm$ 0.08	82* $\pm$ 16	76 $\pm$ 26
400	10	57 $\pm$ 7	17** $\pm$ 5	265 $\pm$ 72	0.45 $\pm$ 0.36	6.60 $\pm$ 0.18	3.27 $\pm$ 0.14	0.99 $\pm$ 0.09	77 $\pm$ 10	43 $\pm$ 13
Dose (mg/kg)	No. of animals	Glu. (mg/dl)	T-Bil. (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Crea. (mg/dl)	Ca (mg/dl)	P (mg/dl)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)
0	10	146 $\pm$ 14	0.41 $\pm$ 0.05	14.2 $\pm$ 1.5	0.54 $\pm$ 0.05	10.2 $\pm$ 0.2	6.7 $\pm$ 0.4	141.8 $\pm$ 0.4	4.21 $\pm$ 0.18	103 $\pm$ 1
6	10	150 $\pm$ 13	0.43 $\pm$ 0.04	16.2 $\pm$ 2.4	0.59 $\pm$ 0.06	10.0 $\pm$ 0.2	6.3 $\pm$ 0.7	140.5* $\pm$ 0.8	4.17 $\pm$ 0.20	103 $\pm$ 1
25	10	153 $\pm$ 13	0.42 $\pm$ 0.06	14.7 $\pm$ 1.4	0.57 $\pm$ 0.04	10.3 $\pm$ 0.2	6.5 $\pm$ 0.6	141.4 $\pm$ 1.0	4.23 $\pm$ 0.25	103 $\pm$ 1
100	10	146 $\pm$ 13	0.42 $\pm$ 0.03	15.2 $\pm$ 0.9	0.56 $\pm$ 0.04	10.3 $\pm$ 0.4	6.4 $\pm$ 0.7	140.7 $\pm$ 1.4	4.23 $\pm$ 0.30	102 $\pm$ 1
400	10	134 $\pm$ 15	0.44 $\pm$ 0.04	15.5 $\pm$ 2.2	0.54 $\pm$ 0.05	10.3 $\pm$ 0.2	7.6** $\pm$ 0.5	140.5* $\pm$ 0.8	4.43 $\pm$ 0.14	101** $\pm$ 1

Each value is expressed as mean $\pm$ S.D.

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 12 Incidence of necropsy findings of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg)	0	6	25	100			400		
Organs	: Findings	Fate No. of animals	TK 10	TK 10	TK 10	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 2	(T) (10)
Cecum	: Dilatation +		0	0	0	0	0	(0)	5	0	(5)**
Thymus	: Atrophy +		0	1	1	0	0	(0)	4	0	(4)*

+ : Slight

TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy; T : Total

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 13 Incidence of necropsy findings of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

		Dose (mg/kg)	0	6	25	100				400			
Organs	: Findings	Fate No. of animals	TK 10	TK 10	TK 10	TK 8	NP 1	KL 1	(T) (10)	NP 2	KD/KL 5	FD 3	(T) (10)
Cecum	: Dilatation	+	0	0	0	0	0	0	(0)	1	0	0	(1)
Kidney	: Enlargement and/or discoloration	+	0	0	0	0	0	1	(1)	0	1	2	(3)
Adrenal	: Hypertrophy and/or discoloration	+	0	0	0	0	0	1	(1)	0	4	3	(7)**
Thymus	: Atrophy	+	2	3	2	1	0	1	(2)	0	1	1	(2)
		++	0	0	0	0	0	0	(0)	0	3	2	(5)
		Total	2	3	2	1	0	1	(2)	0	4	3	(7)
Spleen	: Atrophy	+	0	0	0	0	0	0	(0)	0	2	2	(4)
		++	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
		Total	0	0	0	0	0	0	(0)	0	2	3	(5)**

+ : Slight; ++ : Moderate

TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant; KD/KL : Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery;

FD : Found dead; T : Total

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 14

Absolute and relative organ weights of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B.W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)	Testis (g)	Epidid. (g)
Absolute	0	10	467 ± 30	13.63 ± 1.27	3.06 ± 0.27	0.43 ± 0.07	3.30 ± 0.24	1.42 ± 0.09
	6	10	469 ± 33	14.00 ± 1.96	2.98 ± 0.30	0.37 ± 0.08	3.25 ± 0.21	1.36 ± 0.16
	25	10	478 ± 17	15.09 ± 0.92	3.09 ± 0.19	0.36 ± 0.08	3.27 ± 0.23	1.35 ± 0.09
	100	10	476 ± 27	15.01 ± 1.88	3.14 ± 0.15	0.40 ± 0.10	3.25 ± 0.20	1.35 ± 0.13
	400	10	411** ± 18	12.99 ± 1.19	3.19 ± 0.19	0.31* ± 0.09	3.25 ± 0.15	1.28 ± 0.11
Relative@	0	10	467 ± 30	2.92 ± 0.11	0.66 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.71 ± 0.07	0.30 ± 0.03
	6	10	469 ± 33	2.97 ± 0.22	0.64 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.70 ± 0.06	0.29 ± 0.03
	25	10	478 ± 17	3.16* ± 0.14	0.65 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.69 ± 0.06	0.28 ± 0.03
	100	10	476 ± 27	3.14* ± 0.23	0.66 ± 0.04	0.08 ± 0.02	0.68 ± 0.05	0.28 ± 0.04
	400	10	411** ± 18	3.16* ± 0.20	0.78** ± 0.04	0.07 ± 0.02	0.80** ± 0.05	0.31 ± 0.03

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100g body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

Table 15 Absolute and relative organ weights of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

	Dose (mg/kg)	No. of animals	B. W. (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Thymus (g)
Absolute	0	10	323 ± 26	13.16 ± 1.18	1.98 ± 0.14	0.22 ± 0.07
	6	10	313 ± 23	13.72 ± 1.26	1.89 ± 0.16	0.21 ± 0.07
	25	10	320 ± 23	12.88 ± 0.95	1.94 ± 0.20	0.21 ± 0.08
	100	9	308 ± 26	13.14 ± 1.51	2.01 ± 0.19	0.18 ± 0.05
	400	5	263* ± 59	12.48 ± 3.38	1.96 ± 0.22	0.10* ± 0.04
Relative@	0	10	323 ± 26	4.08 ± 0.32	0.62 ± 0.06	0.07 ± 0.02
	6	10	313 ± 23	4.38 ± 0.30	0.60 ± 0.03	0.07 ± 0.02
	25	10	320 ± 23	4.03 ± 0.24	0.61 ± 0.05	0.06 ± 0.02
	100	9	308 ± 26	4.26 ± 0.36	0.66 ± 0.11	0.06 ± 0.01
	400	5	263* ± 59	4.72* ± 0.35	0.77 ± 0.17	0.04 ± 0.01

Each value is expressed as mean ± S.D.

@ : Relative organ weight per 100 body weight

* : Significantly different from control at 5% level of probability

Table 16 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ : Findings	Dose (mg/kg)	Fate No. of animals	0	6	25	100			400		
			TK 10	TK 10	TK 10	TK 9	FP 1	(T) (10)	TK 8	FP 2	(T) (10)
Kidney : Eosinophilic bodies in proximal tubule	+		3	2	2	1	1	(2)	0	1	(1)
Focal tubular basophilic change	+		3	1	3	3	0	(3)	2	0	(2)
Distal tubular dilatation	+		1	0	0	0	0	(0)	0	0	(0)
Focal tubular dilatation with or without hyaline casts	+		2	1	1	2	0	(2)	1	0	(1)
Hyaline droplets	+		0	0	0	3	1	(4)	5	1	(6)
in proximal tubular epithelium	++		0	0	0	0	0	(0)	2	0	(2)
	Total		0	0	0	3	1	(4)*	7	1	(8)**
Cyst	+		0	0	0	0	0	(0)	0	1	(1)
Pituitary : Cyst in anterior lobe	+		-	-	-	-	1		-	0	
Thymus : Atrophy	+		0	1	1	0	0	(0)	4	0	(4)
	++		0	0	0	0	0	(0)	0	0	(0)
	Total		0	1	1	0	0	(0)	4	0	(4)*

+ : Slight; ++ : Moderate

TK : Terminal kill; FP : Failed to cause pregnancy; T : Total; - : Not examined

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

No abnormalities detected in the Heart, Liver, Cecum, Testis, Adrenal, Spleen, and Brain from animals of the control and 400 mg /kg groups, and in the Epididymis, Seminal vesicle and Prostate in addition to those organs from animals failed to cause pregnancy.

Table 17 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Organ : Findings	Fate No. of animals	Dose(mg/kg)										
		0	6	25	100				400			
		TK 10	TK 10	TK 10	TK 8	NP 1	KL 1	(T) (10)	NP 2	KD/KL 5	FD 3	(T) (10)
Liver : Congestion	+	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	3	(3)
Hepatocellular fatty change	+	0	0	0	0	0	0	(0)	0	1	0	(1)
	++	0	0	0	0	0	1	(1)	0	0	0	(0)
Total		0	0	0	0	0	1	(1)	0	1	0	(1)
Kidney : Congestion	+	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	2	(2)
Focal tubular basophilic change	+	3	0	1	2	0	0	(2)	1	0	0	(1)
Focal tubular dilatation with hyaline casts	+	1	0	1	0	0	0	(0)	0	0	0	(0)
Fatty degeneration of proximal tubular epithelium	+	0	0	0	2	0	0	(2)	0	0	1	(1)
	++	0	0	0	0	0	1	(1)	0	1	2	(3)
Total		0	0	0	2	0	1	(3)	0	1	3	(4)*
Adrenal : Congestion	+	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Cortical cell vacuolization	+	0	0	0	0	0	0	(0)	1	2	0	(3)
	++	0	0	0	0	0	1	(1)	0	3	3	(6)
Total		0	0	0	0	0	1	(1)	1	5	3	(9)**
Thymus : Atrophy	+	2	2	3	2	0	0	(2)	0	1	0	(1)
	++	0	0	0	0	0	1	(1)	0	4	0	(4)
	+++	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	2	(2)
Total		2	2	3	2	0	1	(3)	0	5	2	(7)
Spleen : Atrophy	+	0	0	0	0	0	1	(1)	0	1	0	(1)
	++	0	0	0	0	0	0	(0)	0	1	2	(3)
	+++	0	0	0	0	0	0	(0)	0	0	1	(1)
Total		0	0	0	0	0	1	(1)	0	2	3	(5)**

+ : Slight; ++ : Moderate; +++ : Marked; TK : Terminal kill; NP : Non-pregnant; KD/KL : Killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery; FD : Found dead; T : Total

* : Significantly different from control at 5% level of probability

** : Significantly different from control at 1% level of probability

No abnormalities detected in the Heart, Cecum, Ovary, Brain and Mammary gland from animals of the control and 400 mg/kg groups, and in the Uterus, Vagina and Pituitary in addition to those organs from non-pregnant animals and animals killed due to delivery disorder or killed because all pups died after delivery.

Table 18

Reproduction results of rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
No. of pairs mated	10	10	10	10	10
No. of pairs with successful copulation	10	10	10	10	10
Copulation index (%)	100	100	100	100	100
No. of pregnant females	10	10	10	9	8
No. of living pregnant females	10	10	10	9	5
Fertility index (%)	100	100	100	90	80
No. of corpora lutea (Mean±S.D.)	19.7±2.0	18.0±2.3	18.5±2.4	17.6±1.3	16.3±1.2*
No. of implantation sites (Mean±S.D.)	18.8±1.4	16.9±2.3	17.4±1.8	17.4±1.4	15.3±1.7**
Implantation index (%; Mean±S.D.)	95.9±6.8	94.0±7.1	94.8±9.4	99.3±2.0	93.7±5.0
No. of pregnant females with parturition	10	10	10	9	5*
Gestation length (days, Mean±S.D.)	21.2±0.4	21.4±0.5	21.5±0.5	21.2±0.4	22.0±1.2
No. of pregnant females with live pups	10	10	10	9	3*
Gestation index (%)	100	100	100	100	60
No. of pregnant killed ^a	0	0	0	1	5**
No. of pregnant females survived	10	10	10	8	0**

Copulation index = (No. of pairs with successful copulation/No. of pairs mated) × 100

Fertility index = (No. of pregnant animals/No. of pairs with successful copulation) × 100

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of living pregnant females) × 100

a : Abnormal pregnancies, delivery disorder or all pups died after delivery, killed during the study for pathological examination.

* : Significantly different from control at 5 % level of probability

** : Significantly different from control at 1 % level of probability

Table 1 9

Litter results of rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide
in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
No. of pups born ^a	17.0±2.9	15.8±1.9	15.5±1.7	16.1±1.9	12.0±3.1 **
Delivery index (%)	90.0±11.9	93.9±6.6	89.4±9.0	92.3±5.7	82.2±23.3
No. of pups alive on day 0 of lactation					
Total	16.8±2.9	15.4±1.6	14.5±2.0	15.4±1.9	4.0±3.8 **
Male	7.8±2.1	6.6±1.5	7.5±2.2	7.0±2.1	2.2±2.0 **
Female	9.0±3.4	8.8±2.3	7.0±1.7	8.4±2.4	1.8±2.0 **
Live birth index (%)	98.8±2.6	97.7±4.0	94.0±11.7	95.9±4.3	31.4±29.4*
Sex ratio (Male/Female)	0.89 (80/90)	0.78 (69/89)	0.99 (77/78)	0.84 (66/79)	1.00 (30/30)
No. of pups alive on day 4 of lactation					
Total	16.3±2.9	15.3±1.6	13.8±3.8	13.9±5.5	0 *
Male	7.7±2.1	6.6±1.5	7.3±2.5	6.3±3.2	0
Female	8.6±3.6	8.7±2.5	6.5±2.5	7.6±3.7	0
Viability index (%)	97.1±4.8	99.3±2.1	93.6±20.1	88.9±33.3	0
Body weight of live pups (g)					
On day 0					
Male	6.4±0.5	6.5±0.5	6.7±0.5	6.5±0.2	5.6±0.4
Female	6.0±0.5	6.2±0.4	6.4±0.6	6.2±0.2	5.3±0.3
On day 4					
Male	10.2±1.5	10.4±1.2	10.9±1.1	10.3±0.6	—
Female	9.5±1.3	10.0±1.0	10.6±1.2	10.0±0.8	—

a : Examined on day 0 of lactation

Delivery index = (No. of pups born/No. of implantation sites)×100

Live birth index = (No. of live pups on day 0/No. of pups born)×100

Viability index = (No. of live pups on day 4/No. of live pups on day 0) ×100

Sex ratio = Total No. of female pups/Total no. of male pups

Each value is expressed as Mean ± S.D., except for sex ratio

* : Significantly different from control at 5 % level of probability

** : Significantly different from control at 1 % level of probability

Table 20 External findings of rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
External	No. of pups examined	170	158	154	145	58
	No. of pups with external anomalies ^a	0 (0)	1 (0.7±2.2)	0 (0)	1 (0.7±2.1)	5 (14.3±31.9)
	External anomalies ^a					
	Multiple anomaly ^b	0 (0)	1 (0.7±2.2)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Short tail	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (0.7±2.1)	0 (0)
	Cleft palate	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (14.3±31.9)

a : No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)

b : Short left hindlimb without the third, fourth and fifth fingers

Table 21 Visceral findings of rats treated orally with N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in the combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test

Findings	Dose (mg/kg)	0	6	25	100	400
Visceral	No. of pups examined	169	157	151	138	57
	No. of pups with visceral anomalies ^a	0 (0)	1 (0.7±2.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Absence of kidney(unilateral)	0 (0)	1 (0.7±2.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	No. of pups with visceral variations ^a	1 (0.6±1.9)	6 (3.7±5.4)	2 (1.3±4.2)	4 (2.6±5.2)	1 (1.7±3.7)
	Visceral variations ^a					
	Thymic remnant in neck	1 (0.6±1.9)	3 (1.7±2.7)	2 (1.3±4.2)	1 (0.6±1.7)	0 (0)
	Persistent left umbilical artery	0 (0)	3 (2.0±4.7)	0 (0)	1 (0.6±1.7)	0 (0)
	Dilatation of renal pelvis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1.5±4.4)	1 (1.7±3.7)

a : No. of pups (Mean ± S.D. of individual litter percentages)