
2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾー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 2003年9月11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	
1.被験物質および媒体	9
2.投与検体および濃度確認	9
3.使用動物および飼育条件	10
4.投与経路, 投与方法, 群構成および投与量	11
5.観察および検査項目	11
6.統計解析	12
結果および考察	
1.死亡状況および一般状態	12
2.体重	12
3.剖検	12
文献	13

Attachment, Table, Fig. および Appendix の目次

Table 1	Mortality and LD ₅₀ value of rats in single dose oral Toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 16
Table 2	General signs of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 17
Table 3	General signs of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 18
Table 4	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 19
Table 5	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 20
Table 6	Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 21
Table 7	Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 22
Fig.1	Chemical structure of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 23
Fig.2	Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 24
Fig.3	Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- 25

要約

2-(ホルホリノジチオ)ベンゾチアゾールをラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は、2000 mg/kg とした。対照として媒体(0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液)投与群を設けた。なお、各群の使用動物数は雌雄各5例とした。

1. 死亡状況および一般状態

死亡例は、いずれの群の雌雄にも認められなかった。

一般状態の観察において、いずれの群の雌雄にも異常はみられなかった。

2. 体重

2000 mg/kg 群の雄では、体重推移に異常はみられなかった。2000 mg/kg 群の雌では、投与後1日に体重の低値がみられた。

3. 剖検

いずれの群の雌雄にも異常はみられなかった。

以上の結果から、2-(ホルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの LD₅₀ 値は、雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される。

緒言

2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール(CAS No.95-32-9)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-Fixed Dose Procedure(Revised Guideline 420)に従って、2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールを雌雄ラットに1回経口投与して、その毒性について検討した。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール(CAS No.95-32-9)は、Fig.1に示す化学構造を有し、分子量:284.43, 融点(とけ始め):131.9℃, 比重:1.50~1.52であり、水に0.006 g/100 mL(20.8℃), メタノールに0.39 g/100 mL(23.2℃), アセトンに1.93 g/100 mL(25.5℃), トルエンに3.90 g/100 mL(21.0℃)溶解する淡黄白色ペレット状物質である。当試験には、厚生労働省 医薬局審査管理課 化学物質安全対策室から提供されたものを用いた[製造元: , Lot No , 純度:98.4 wt%]。入手後は、試験施設の被験物質保管室の保管庫に室温・遮光・気密条件下で保管した。なお、反復投与毒性試験の投与期間終了後に当試験施設での保存分を除いた残余被験物質を返却し、その一部について分析した結果、純度は98.6 wt%であり、使用期間中の安定性が確認された。

媒体として、0.5%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. 投与検体および濃度確認

0.5%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(以下、0.5%CMC-Na)は、カルボキシメチルセルロースナトリウム(Lot No.SEL1569, 和光純薬工業株式会社, 使用期限:2005年11月19日)を注射用水(Lot No.OH93N, 株式会社大塚製薬工場, 使用期限:2005年8月)に溶解して調製した。0.5%CMC-Naは、試験施設の被験物質保管室の保管庫に冷所(1~10℃)保管した。

2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールは、0.5%CMC-Naで200 mg/mL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。

2~200 mg/mLの調製液は、冷蔵・遮光条件下で7日間保管後、さらに室温・遮光条件下で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)。調製液は、用時調製とし、調製後30分以内に使用した。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試験施設内でHPLC法により測定した。その結果、被験物質濃度は表示濃度の101.0%、均一性はCV値が5%以下であり、濃度および均一性に問題はなかった(Attachment 2)。

3. 使用動物および飼育条件

3.1. 動物種および系統

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 Sprague-Dawley 系雌雄ラット[Crj: CD(SD)IGS, SPF]を用いた。動物は、2002 年 5 月 29 日に日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター)から 4 週齢で雌雄各 21 匹を入手した。入手後 1 日の体重範囲は、雄が 75~88 g, 雌が 69~79 g であった。

3.2. 検疫および馴化, 群分け法ならびに個体識別法

入手した動物は、5 日間の検疫期間およびその後 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、一般状態および体重推移に異常の認められなかった動物を群分けして試験に用いた。

群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与日に行った。また、個々の動物の体重が平均体重の±20%を越えていないことを確認した。群分け後の残余動物は、投与翌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およ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およ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、入手年月日および検疫・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、投与量およ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. 環境条件および飼育管理

動物は、室温 20~26 °C(実測値: 20~24 °C), 湿度 40~70%(実測値: 40~63%), 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)に維持されている飼育室(E 棟 7 号室)で飼育した。

検疫・馴化期間中および群分け前の絶食時間中は、ステンレス製懸垂式ケージ(W: 240×D: 380×H: 200 mm)を用いて 1 ケージ当たり 5 匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後は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。ケージの受け皿および給水瓶の交換は 1 週間に 2 回以上、ステンレス製懸垂式ケージ、ステンレス製五連ケージならびに給餌器の交換は 1 週間に 1 回行った。なお、動物飼育室の清掃(床の掃き掃除)および 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. 飼料および飲料水

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 4 時)から投与までの約 18 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およ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ヵ月ごとに財団法人岐阜県公衆衛生検査センターで実施した成績を入手した。

飼料およ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、群構成および投与量

4.1. 投与経路および投与方法

2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールは、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。なお、投与操作時には、投与検体の懸濁状態を維持するためスターラーで攪拌した。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04分～10時15分の間で、投与回数は1回とした。

投与日の週齢は5週齢であり、体重範囲は雄が107～110 g、雌が93～96 gであった。

4.2. 群構成および投与量

群構成は、下記のように被験物質投与群として1群を設定し、その他に対照群を設けた。1群の動物数は、雌雄各5匹とした。

群	試験群	投与量 (濃度)	動物数(動物番号)	
			雄	雌
第1群	対照(0.5%CMC-Na)	0 mg/kg (0 mg/mL)	5(M01101～M01105)	5(F01151～F01155)
第2群	2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール	2000 mg/kg (200 mg/mL)	5(M02201～M02205)	5(F02251～F02255)

2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールのラット経口投与によるLD₅₀値は10000 mg/kg、マウス経口投与によるLD₅₀値は3000 mg/kgとの情報がある³⁾。当試験では、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure(Revised Guideline 420)で最高用量とされている2000 mg/kg群を設定した。また、対照として媒体(0.5%CMC-Na)のみを同容量投与する群を設けた。

5. 観察および検査項目

5.1. 観察期間

投与後14日間とした。

5.2. 一般状態

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

5.3. 体重測定

投与日(投与直前)および投与後 1, 3, 7, 10 ならびに 14 日に測定した。

5.4. 剖検

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

雌雄とも、死亡例が認められなかったため、LD₅₀値は推定した。

有意差検定は下記のように、対照群と投与群の間で行い、危険率を 5%とし、5%未満(p<0.05)と 1%未満(p<0.01)とに分けて表示した。

〈検定方法〉

体重は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、F 検定による等分散性の検定を行い、等分散であったため Student の t 検定により行った。

結果および考察

1. 死亡状況および一般状態(Table 1~3, Appendix 1-1~1-2 および 2-1~2-2)

いずれの群の雌雄とも、死亡例は認められなかった。2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの LD₅₀値は、雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される。

一般状態の観察において、いずれの群の雌雄とも異常はみられなかった。

2. 体重(Table 4 および 5, Fig.2 および 3, Appendix 3-1~3-2 および 4-1~4-2)

2000 mg/kg 群の雄では、対照群と比べて体重に有意差はみられなかった。2000 mg/kg 群の雌では、投与後 1 日に体重の有意な低値がみられたが、その後は順調に推移した。

3. 剖検(Table 6 および 7, Appendix 5-1~5-2 および 6-1~6-2)

いずれの群の雌雄とも、異常はみられなかった。

以上のように、2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの雌雄ラットへの 1 回経口投与により、雌雄とも 2000 mg/kg 投与しても死亡例が認められず、一般状態および剖検所見に異常はみられなかった。なお、2000 mg/kg 群の雌では、体重の一過性の低値がみられた。2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの LD₅₀値は、雌雄とも 2000 mg/kg を上回ると推定される。

文献

- 1) 渡邊ゆかりほか：2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール調製液の安定性確認試験(試験番号：401921P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 2) 大内新興化学工業株式会社，製品安全データシート

Table 2 General signs of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Group	mg/kg	Number of males 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
Control	0	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	2000	Number of males	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 3 General signs of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

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
Control	0	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	2000	Number of females	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
		Normal	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Table 4. Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
mg/kg	0	2000
Number of males	5	5
Days after administration		
0	108 ± 1	108 ± 1
1	125 ± 3	121 ± 6
3	147 ± 3	144 ± 2
7	181 ± 6	177 ± 4
10	204 ± 11	199 ± 6
14	236 ± 13	231 ± 10

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 5. Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
mg/kg	0	2000
Number of females	5	5
Days after administration		
0	94 ± 1	94 ± 1
1	109 ± 3	103 ± 3 *
3	127 ± 3	125 ± 1
7	145 ± 4	144 ± 3
10	156 ± 6	154 ± 4
14	169 ± 8	167 ± 4

Each value shows mean (g) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 6. Necropsy findings of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
mg/kg	0	2000
Number of males	5	5
Findings		
Normal	5	5

Table 7. Necropsy findings of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- mg/kg
Number of females	5	5
Findings		
Normal	5	5

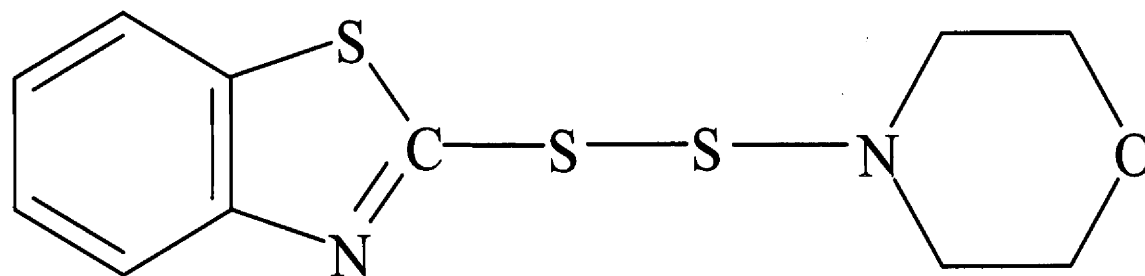


Fig. 1 Chemical structure of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Study No. 401921

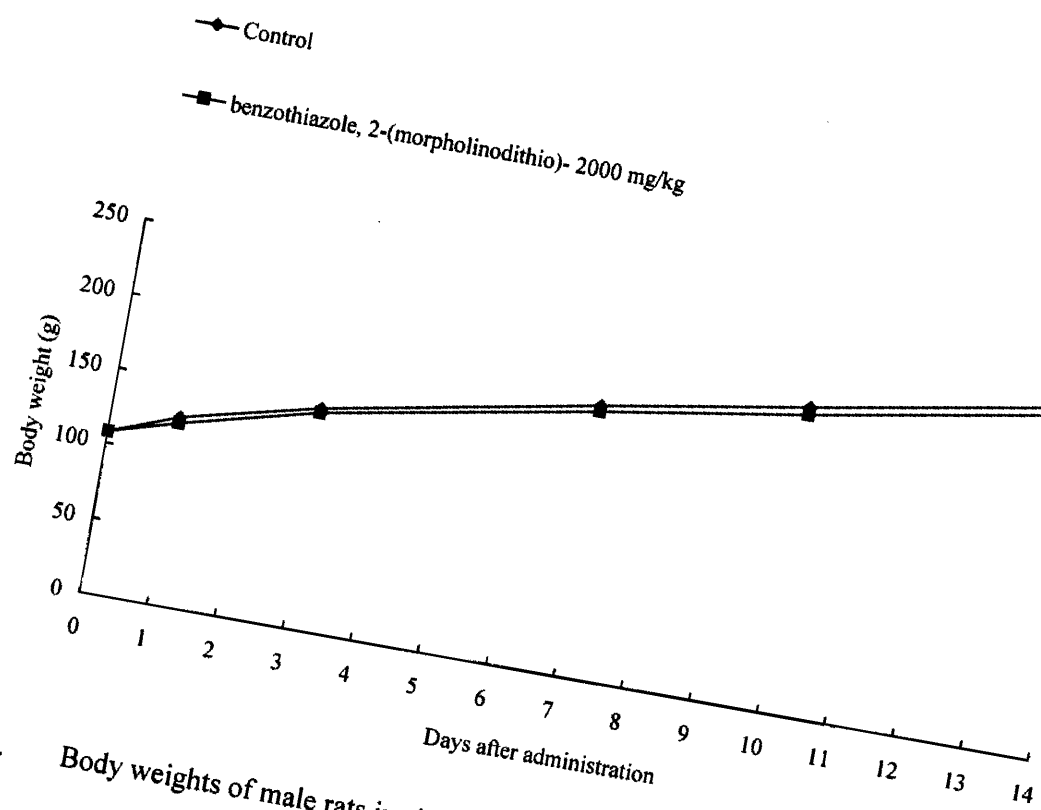


Fig.2. Body weights of male rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

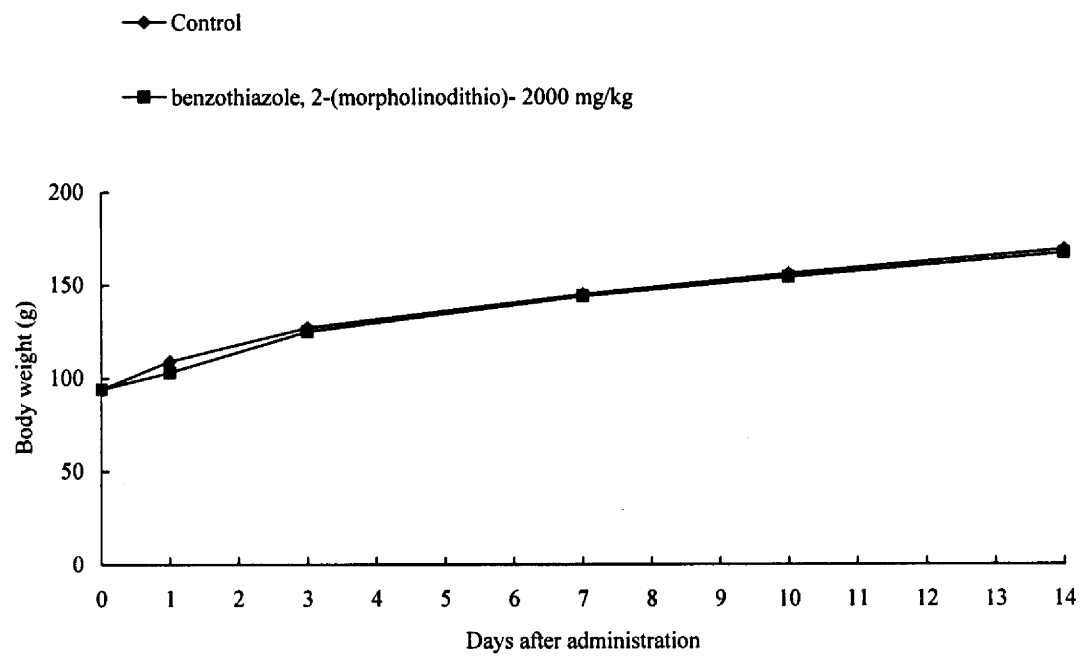


Fig.3. Body weights of female rats in single dose oral toxicity test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-