
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

経口投与による簡易生殖毒性試験

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 11

緒言 13

方法

 1.被験物質および媒体 13

 2.投与検体および濃度確認 13

 3.使用動物および飼育条件 14

 4.投与経路，投与方法，群構成，投与量および投与期間..... 15

 5.観察および検査項目 16

 6.統計解析 19

結果

 I.反復投与毒性 20

 1.一般状態 20

 2.体重 20

 3.摂餌量 20

 4.剖検 21

 5.器官重量 21

 6.精子検査 21

 7.病理組織学検査 21

 II.生殖発生毒性 21

 1.親動物の生殖発生 21

 2.児動物(F₁) 22

考察 23

文献 24

Attachment, Table, Fig.および Appendix の目次

Table 1-1 ~ 1-4	General signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2- (morpholinodithio)- by oral administration	 28~ 31
Table 2-1 ~ 2-2	General signs of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2- (morpholinodithio)- by oral administration	 32~ 33
Table 3-1 ~ 3-2	General signs of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 34~ 35
Table 4	General signs of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 36
Table 5	Body weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2- (morpholinodithio)- by oral administration	 37
Table 6	Body weights of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2- (morpholinodithio)- by oral administration	 38
Table 7	Body weights of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 39
Table 8	Body weights of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 40
Table 9	Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2- (morpholinodithio)- by oral administration	 41
Table 10	Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 42
Table 11	Food consumption of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 43

Table 12	Food consumption of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 44
Table 13	Necropsy findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 45
Table 14	Necropsy findings of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 46
Table 15	Organ weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 47
Table 16	Organ weights of dams in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 48
Table 17	Sperm analysis of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 49
Table 18	Histopathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 50
Table 19	Histopathological findings of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 51
Table 20	Histopathological findings of non-pregnant female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 52
Table 21	Reproductive performance of male rats and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 53
Table 22	Observation of pups (F ₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 54
Table 23	General signs of pups (F ₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 55
Table 24	Body weights of pups (F ₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 56
Table 25	Necropsy findings of pups (F ₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 57

Fig. 1	Chemical structure of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	 58
Fig. 2	Body weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 59
Fig. 3	Body weights of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 60
Fig. 4	Body weights of dams during pregnancy and lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 61
Fig. 5	Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 62
Fig. 6	Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 63
Fig. 7	Food consumption of dams during pregnancy and lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration	 64

要約

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経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kg を高用量とし、以下 300 および 100 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 12 例とした。

I. 反復投与毒性

1. 一般状態および死亡状況

死亡および瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。一般状態観察において、いずれの群にも異常はみられなかった。

2. 体重および摂餌量

体重は、1000 mg/kg 群の雄で低値、雌で妊娠中に低値がみられた。

摂餌量は、交配前に 300 mg/kg 群の雌雄および 1000 mg/kg 群の雄で一過性の低値、1000 mg/kg 群の雌で低値がみられた。

3. 剖検所見および器官重量

剖検および器官重量において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

4. 精子検査および病理組織学検査

精子検査および病理組織学検査において、投与に起因する変化はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生に及ぼす影響

精子検査成績ならびに精巣、精巣上体および卵巣の病理組織学検査成績には、投与に起因する変化はみられなかった。

発情回数、交尾率および交尾所要日数には、投与に起因する変化はみられなかった。

受胎雌数、妊娠期間、分娩状態および哺育状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

受胎率には、投与に起因する変化はみられなかった。

妊娠黄体数、着床数および着床率には、投与に起因する変化はみられなかった。

出産率には、投与に起因する変化はみられなかった。

2. 児動物(F₁)に及ぼす影響

総出産児数、死産児数、哺育 0 日の新生児数、哺育 0 日の性比、分娩率、児の産出率、出生率には、投与に起因する変化はみられなかった。

一般状態には、投与に起因する変化はみられなかった。

哺育4日の生存児数、哺育4日の性比および哺育4日の生存率には、投与に起因する変化はみられなかった。

外表観察において、投与に起因する変化はみられなかった。

体重には、投与に起因する変化はみられなかった。

剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの無影響量は、雌雄とも 300 mg/kg 投与により摂餌量の一過性の低値が認められたことから雌雄とも 100 mg/kg/day と考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも 1000 mg/kg 投与しても交尾能、受胎能などに影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。児動物への無影響量は、1000 mg/kg 投与しても生存性および体重などに影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。

緒言

2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールが経口的に継続して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 Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (421)に基づいて、2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールを雄ラットに1日1回、50～52日間および雌ラットに1日1回、41～49日間投与した簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物に対する性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。

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、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に返却し、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.1E97, 株式会社大塚製薬工場, 使用期限:2006年5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、調製後10日以内に使用した。

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。60および20 mg/mL懸濁液は、0.5%CMC-Naで段階希釈して調製した。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、週1回以上の頻度で調製し、調製後7日以内に使用した。投与後の残余投与検体は廃棄した。

雄投与開始日および雄投与終了日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97.6～104.2%、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 および 3)。

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 8 月 21 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 8 週齢で雌雄各 62 匹を入手した。入手後 1 日の体重範囲は、雄が 277~304 g, 雌が 200~227 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 7 日間の馴化期間を設けた。この間に、体重測定を 3 回、一般状態の観察を毎日行い、さらに雌は馴化期間中に性周期観察を 10 日間行った。一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物(発情期が認められ、4 日あるいは 5 日周期と考えられた動物)を群分けした。

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開始日に行った。群分け後の残余動物のうち、検疫・馴化動物番号の若い順に雄 2 例を選び、飼育期間終了日の微生物モニタリング検査に用いた。その他の残余雄および残余雌は、投与開始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、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用いて行った。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、動物番号、交尾成立日(雌のみ)および分娩日(雌のみ)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: 21~23 °C)、湿度 40~70%(実測値: 40~60%)、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 10 号室)で飼育した。

検疫・馴化期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。ただし、交配はステンレス製懸垂式ケージ内で行った。母動物は、妊娠 18 日以降オートクレーブ処理した床敷(サンフレーク, 日本チャールス・リバー株式会社)を入れたプラスチック製ケージ(W: 310×D: 360×H: 175 mm)で個別飼育し、自然分娩および哺育させた。ケージの受け皿、給水瓶およびプラスチック製ケージの交換は 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および給餌器の交換は 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)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。

飼育期間終了日に採血したモニタリング動物の血清検査において、感染を示唆するような異

常はみられなかった。

床敷の微量金属および汚染物質の分析結果は、ほぼ6ヵ月ごとに財団法人日本食品分析センターで実施した成績を日本チャールス・リバー株式会社から入手した。その分析結果は、試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

3.4. 飼料および飲料水

飼料は、製造後5ヵ月以内の固型飼料(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。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およびオリエンタル酵母工業株式会社から入手した。

飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。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、投与量および投与期間

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、継続して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、雄では投与日あるいは投与日には最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kg で算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中には妊娠 0, 7, 14 および 21 日の体重を、授乳期間中には哺育 0 日の体重を基準とし、5 mL/kg で算出した。投与時刻は午前8時54分～午後1時45分の間で、投与回数は1日1回とした。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が351～387 g、雌が235～259 gであった。

4.2. 群構成および投与量

群構成は、以下に示したように被験物質投与群として3群を設定し、その他に対照群を設けた。各群の動物数は、雌雄各12例とした。

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)	12 (M01101～M01112)	12 (F01151～F01162)
第2群	2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール	100 mg/kg (20 mg/mL)	12 (M02201～M02212)	12 (F02251～F02262)
第3群	2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール	300 mg/kg (60 mg/mL)	12 (M03301～M03312)	12 (F03351～F03362)
第4群	2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾール	1000 mg/kg (200 mg/mL)	12 (M04401～M04412)	12 (F04451～F04462)

投与量は、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28日間反復経口投与毒性試験および14日間回復試験の予備試験¹⁾(投与段階：0, 250, 500 および 1000 mg/kg, 各群雄5例)の結果により決定した。すなわち、1000 mg/kg 投与により体重の低値傾向および摂餌量の低値がみられた。そこで、当試験の投与量は、1000 mg/kg を高用量とし、以下公比約3により300 および 100 mg/kg とした。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。

4.3. 投与期間

投与期間は、OECD Guideline for Testing of Chemicals for Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test (421)に基づいて、雄では交配前14日間とその後36～38日間の合計50～52日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長9日間)、妊娠期間中および哺育3日までの合計41～49日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

5. 観察および検査項目

5.1. 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回(ただし、剖検日は剖検前1回)観察した。

5.2. 体重測定

雄の体重は、1週間に2回測定した(測定日：投与1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25, 29, 32, 36, 39, 43, 46, 50日および剖検日)。

雌の体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回(測定日：投与1, 4, 8, 11, 15, 18 および 22 日)、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14 および 21 日に、哺育期間中は哺育0 および 4 日にそれぞれ測定した。

5.3. 摂餌量測定

雄の摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後から1週間に2回測定した(残量測定日:投与2, 5, 9, 12, 30, 33, 37, 40, 44および47日)。

雌の摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回測定した(残量測定日:投与2, 5, 9および12日)。また、妊娠期間中は妊娠1, 8, 15および20日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

5.4. 雄の剖検および器官重量測定

雄は、最終投与の翌日(投与51~53日)に各群の各4例(動物番号の若い順)を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。精巣、精巣上体および精巣上体尾部は重量を測定した。なお、各器官重量(精巣上体尾部を除く)を最終体重で除して相対重量も算出した。精巣および精巣上体は、ブアン液に2~3時間固定後、10%中性緩衝ホルマリンで再固定した。精嚢および前立腺は、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。

5.5. 精子検査

5.5.1. 精子原液の調製

右精巣上体の尾部は、37℃に加温した精子培養液(0.5%牛血清アルブミン加Mediumu 199)中で分割し、約5分間静置後、精子原液を作製した。この精子原液を用いて精子の活動性、精子の生存性および精子の形態の各検査を実施した。なお、これらの検査終了後、精子原液は廃棄した。

5.5.2. 精子の活動性

精子原液を精子培養液で希釈し、約30分間培養(炭酸ガス培養器:BNA-121D, タバイエスベック株式会社, 培養条件:37℃, 5%炭酸ガス, 95%空気)後に精子希釈液をサンプルチャンバー(MICROSLIDES, #HTR1099, VitroCom, Inc.)に入れ、TOX IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて、運動精子率(Motile sperm rate), 前進精子率(Progressive sperm rate), 基準点移動速度(Path velocity), 最短距離移動速度(Straight line velocity), 総移動速度(Curvilinear velocity), 精子頭部の振幅(Amplitude of lateral head displacement)および精子頭部の横切り回数(Beat cross frequency)を算出した。

5.5.3 精子の生存性

精子原液をCalcein acetoxy methyl esterとEthidium homodimer-1で二重染色(炭酸ガス培養器内で約2時間培養)後、蛍光顕微鏡下で精子を生存精子, 培養途中死亡精子および死滅精子とに分類し¹⁾, 生存精子率(Viability)および生き残り精子率(Survivability)を求めた。

5.5.4. 精子の形態

精子原液をスライドガラスに塗抹し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、1%エオジン染色液で染色した。顕微鏡下で精子の形態を観察し、総奇形精子率, 頭部の奇形精子率および尾部の奇

形精子率を求めた。

5.5.5. 精子数

精子数は、左精巣上体尾部を凍結(-80℃設定)保存後、0.1%Triton X-100中でホモジナイズ(Ultra-Turrax T25 basic IKA®-Labortechnik)して作製した精子懸濁液をTOX IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて算出した。なお、左精巣上体尾部1 g当たりの精子数も算出した。

5.6. 性周期

雌の性周期は、投与開始日から交尾確認日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回と計数した。

5.7. 交配

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝ほぼ一定時刻に行い、腔垢内に精子または腔栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

5.8. 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

5.9. 妊娠25日の午前10時までに分娩しなかった雌

分娩しなかった雌は、交尾後25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剖検し、着床の有無により妊娠の成否を確認した。卵巣、子宮および腔は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

5.10. 哺育状態の観察

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察した。

5.11. 母動物の剖検および器官重量測定

母動物は、哺育4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剖検し、妊娠黄体数および着床数を算定した。卵巣および子宮は重量を測定した。なお、各器官重量を最終体重で除して相対重量も算出した。卵巣、子宮および腔は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

5.12. 病理組織学検査

各群の雄について、精巣および精巣上体の頭部はパラフィン包埋した。対照群および1000 mg/kg群の雄について、精巣および精巣上体の頭部のHE染色組織標本作製し、病理組織学検査

を実施した。なお、精巣については、PAS-ヘマトキシリン染色標本も作製したが、これらの標本について鏡検の必要を認めなかった。

各群の雌について、卵巣はパラフィン包埋した。対照群および 1000 mg/kg 群の雌について、卵巣の HE 染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

5.13. 児動物(F₁)

5.13.1. 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。死産児は、20%中性緩衝ホルマリンで固定し、10%中性緩衝ホルマリンに保存した。

5.13.2. 児動物の観察

児動物は、一般状態および死亡の有無を毎日 1 回観察した。死亡児は、剖検後 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、保存した。

5.13.3. 体重測定

体重は、哺育 0 日(出生日)および 4 日に測定した。

5.13.4. 剖検

生存児は、哺育 4 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剖検した。

6. 統計解析

有意差検定は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、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。児動物の体重は一腹の平均値と合計値も算出した。不受胎雌の交尾後の一般状態、体重および摂餌量は集計から除外した。

〈検定方法〉

体重(親動物、児動物)、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、精子検査成績、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間[分娩日(哺育 0 日)－交尾確認日]、妊娠黄体数、着床数、着床率[(着床数/妊娠黄体数)× 100]、総出産児数(新生児数+死産児数)、新生児数、死産児数、分娩率[(総出産児数/着床数)× 100]、児の産出率[(哺育 0 日の新生児数/着床数)× 100]、出生率[(哺育 0 日の新生児数/総出産児数)× 100]、哺育 4 日の生存児数、哺育 4 日の生存率[(哺育 4 日の生存児数/哺育 0 日の新生児数)× 100]、外表異常の出現率[(外表異常児数/新生児数)× 100]および性比(雄/雌)は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett 法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には Dunnett 法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した Dunnett 型の検定法により行った。

交尾率[(交尾成立動物数/同居動物数)× 100]、受胎率[(受胎雌数/交尾成立動物数)× 100]および出産率[(新生児出産雌数/受胎雌数)× 100]は、 χ^2 検定により行った。

結果

I. 反復投与毒性

1. 一般状態

1.1. 雄(Table 1-1~1-4, Appendix 1-1~1-4)

死亡および瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

一般状態観察において、いずれの群にも異常はみられなかった。

1.2. 雌(Table 2-1 および 2-2, 3-1 および 3-2, 4, Appendix 2-1~2-4, 3-1~3-4 および 4-1~4-4)

死亡および瀕死例は、いずれの群にも認められなかった。

一般状態観察において、いずれの群にも異常はみられなかった。

2. 体重

2.1. 雄(Table 5, Fig.2, Appendix 5-1~5-4)

100 および 300 mg/kg 群では、対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

1000 mg/kg 群では、対照群と比べて投与期間を通して体重は低値で推移し、投与 8 日に有意な低値がみられた。

2.2. 雌(Table 6~8, Fig.3 および 4, Appendix 6-1~6-4, 7-1~7-4 および 8-1~8-4)

交配開始前および交配期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

妊娠期間中には、100 および 300 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて妊娠 14 および 21 日に体重の有意な低値がみられた。

哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の体重に有意差はみられなかった。

3. 摂餌量

3.1. 雄(Table 9, Fig.5, Appendix 9-1~9-4)

100 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 9 日に摂餌量の有意な高値がみられたが、投与量に関連した変化ではなかった。300 および 1000 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 2 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

3.2. 雌(Table 10~12, Fig.6 および 7, Appendix 10-1~10-4, 11-1~11-4 および 12-1~12-4)

交配開始前には、100 mg/kg 群では対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。300 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 2 日に摂餌量の有意な低値がみられた。1000 mg/kg 群では、対照群と比べて投与 2, 5 および 9 日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中および哺育期間中には、各投与群とも対照群と比べて各測定日の摂餌量に有意差はみられなかった。

4. 剖検

4.1. 雄(Table 13, Appendix 13-1~13-4)

対照群, 100 および 300 mg/kg 群では、異常はみられなかった。1000 mg/kg 群では、精巢上体(左)に黄白色結節が1例にみられたが、偶発所見と考えられる。

4.2. 雌(Table 14, Appendix 14-1~14-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

5. 器官重量

5.1. 雄(Table 15, Appendix 15-1~15-4)

剖検日の体重において、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べて各器官の絶対重量および相対重量に有意差はみられなかった。

5.2. 雌(Table 16, Appendix 16-1~16-4)

剖検日の体重において、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

器官重量において、各投与群とも対照群と比べて各器官の絶対重量および相対重量に有意差はみられなかった。

6. 精子検査(Table 17, Appendix 17-1~17-4)

各投与群とも、対照群と比べて各検査項目に有意差はみられなかった。

7. 病理組織学検査

7.1. 雄(Table 18, Appendix 18-1 および 18-2)

精巢：対照群では、Stage 9-11 の精細管での精子細胞(Step 19)の残留が1例にみられた。1000 mg/kg 群では、異常はみられなかった。

精巢上体：対照群および1000 mg/kg 群とも、異常はみられなかった。

7.2. 雌(Table 19 および 20, Appendix 19-1, 19-2 および 20)

対照群および1000 mg/kg 群では、卵巣に異常はみられなかった。

II. 生殖発生毒性

1. 親動物の生殖発生

1.1. 発情回数(Table 21, Appendix 21-1~21-4)

交配開始前の投与期間(14 日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられ

なかった。

1.2. 交尾所要日数, 交尾率, 受胎雌数および受胎率(Table 21, Appendix 21-1~21-4)

交尾率は, いずれの群とも 100%であった。交尾所要日数は, 各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は, 300 mg/kg 群で 1 例と 1000 mg/kg 群で 2 例にみられた。受胎率は, 各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。

1.3. 妊娠期間および分娩状態(Table 22, Appendix 22-1~22-4)

妊娠期間は, 各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

分娩状態において, いずれの群とも母動物に異常はみられなかった。

1.4. 妊娠黄体数, 着床数および着床率(Table 22, Appendix 22-1~22-4)

100 および 300 mg/kg 群では, 対照群と比べて妊娠黄体数, 着床数および着床率に有意差はみられなかった。1000 mg/kg 群では, 対照群と比べて着床数の有意な低値がみられたが, 妊娠黄体数および着床率に有意差は認められなかった。なお, 1000 mg/kg 群の着床数は, 当試験施設の背景データ(妊娠雌数:286, 妊娠黄体数:14.2-16.7, 着床数:13.2-15.8, 着床率:88.9-97.5%)の範囲内にあること, ならびに当試験における対照群の妊娠黄体数が若干多かったため, それに伴い着床数が多かったことにより生じた変化と考えられ, 投与に基づくものではないと判断される。

1.5. 出産率および哺育状態(Table 22, Appendix 22-1~22-4)

出産率は, いずれの群とも 100%であった。

哺育状態において, いずれの群とも異常はみられなかった。

2. 児動物(F_1)

2.1. 総出産児数, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 哺育 0 日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率(Table 22, Appendix 22-1~22-4)

100 および 1000 mg/kg 群では, 対照群と比べて総出産児数, 死産児数, 哺育 0 日の新生児数, 哺育 0 日の性比, 分娩率, 児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。300 mg/kg 群では, 対照群と比べて分娩率および児の産出率の有意な低値がみられたが, 投与量に関連した変化ではなかった。

2.2. 児動物の一般状態, 哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の性比, 哺育 4 日の生存率および外表異常(Table 22 および 23, Appendix 22-1~22-4 および 23-1~23-4)

各投与群とも, 対照群と比べて哺育 4 日の生存児数, 哺育 4 日の性比および哺育 4 日の生存率に有意差はみられなかった。

新生児の外表観察においては, いずれの群とも異常はみられなかった。

児動物の一般状態において, いずれの群とも異常はみられなかった。

2.3. 児動物の体重(Table 24, Appendix 24-1~24-4)

各投与群とも、対照群と比べて哺育0および4日の雌雄平均体重、哺育0および4日の一腹平均体重、哺育0および4日の一腹合計体重に有意差はみられなかった。

2.4. 生存児の剖検(Table 25, Appendix 25-1~25-4)

いずれの群とも、異常はみられなかった。

2.5. 死亡児の剖検

いずれの群とも、異常はみられなかった。

考察

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経口投与による簡易生殖毒性試験を行い、雌雄動物に対する毒性影響を検討するとともに、性腺機能、交尾行動、受胎および分娩などの生殖行動に及ぼす影響について検討した。投与量は、1000 mg/kgを高用量とし、以下300および100 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。

死亡および瀕死例は、雌雄ともいずれの群にも認められなかった。一般状態観察において、雌雄ともいずれの群にも異常はみられなかった。

体重は、1000 mg/kg群の雄でほぼ投与期間を通して低値、雌で妊娠中に低値がみられた。

摂餌量は、交配前に300 mg/kg群の雌雄および1000 mg/kg群の雄で一過性の低値、1000 mg/kg群の雌で低値がみられた。

剖検および器官重量において、雌雄とも投与に起因する変化はみられなかった。

精子検査および病理組織学検査において、投与に起因する変化はみられなかった。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように1000 mg/kg群でも精子検査成績に変化はみられず、また、精巣、精巣上体および卵巣に病理組織学変化は認められなかった。また、発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、出産率、分娩状態、哺育状態、妊娠黄体数、着床数、着床率および妊娠期間にも、投与に起因する変化はみられなかった。

児動物に対しては、総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、哺育0日の性比、分娩率、児の産出率、出生率には、投与に起因する変化はみられなかった。一般状態には、投与に起因する変化はみられなかった。哺育4日の生存児数、哺育4日の性比および哺育4日の生存率には、投与に起因する変化はみられなかった。外表観察において、投与に起因する変化はみられなかった。体重には、投与に起因する変化はみられなかった。剖検において、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、2-(モルホリノジチオ)ベンゾチアゾールの無影響量は、雌雄とも300 mg/kg投与により摂餌量の一過性の低値が認められたことから雌雄とも100 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雌雄とも1000 mg/kg投与しても交尾能、受胎能などに

影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。児動物への無影響量は、1000 mg/kg 投与しても生存性および体重などに影響が認められなかったことから 1000 mg/kg/day と考えられる。

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) 古橋忠和ほか：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 28 日間反復経口投与毒性試験および 14 日間回復試験の予備試験(試験番号：501021P)(株式会社日本バイオリサーチセンター 羽島研究所)
- 3) Kato,M., et al., Congenital Anomalies 35:394, 1995.

Table 1-1 General signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-2 General signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			14		15		16		17		18		19		20		21		22		23		24		25		26	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-3 General signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																									
			27		28		29		30		31		32		33		34		35		36		37		38		39	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 1-4 General signs of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of males and general signs	Days of administration																											
			40		41		42		43		44		45		46		47		48		49		50		51		52		53	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post		
Control	0	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4		
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	
	300	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	
	1000	Number of males Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	8	8	4	4	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-1 General signs of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																											
			1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13		14	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	1000	Number of females Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 2-2 General signs of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of females and general signs	Days of administration																	
			15*		16		17		18		19		20		21		22		23	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of females Normal	12	12	10	10	8	8	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			12	12	10	10	8	8	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of females Normal	12	12	12	12	10	10	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			12	12	12	12	10	10	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	300	Number of females Normal	12	12	10	10	6	6	3	3	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
			12	12	10	10	6	6	3	3	1	1	1	1	-	-	-	-	-	-
	1000	Number of females Normal	12	12	7	7	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			12	12	7	7	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pre: Before administration, Post: after administration.

*: Commencement of pairing.

Table 3-1 General signs of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																											
			0		1		2		3		4		5		6		7		8		9		10		11		12		13	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	
	300	Number of dams Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
			11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	
	1000	Number of dams Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 3-2 General signs of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of pregnancy																	
			14		15		16		17		18		19		20		21		22	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	2	2
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	6	6	
	300	Number of dams Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	4	
			11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11	4	4	
	1000	Number of dams Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	6	
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	6	6	

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 4 General signs of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of dams and general signs	Days of lactation									
			0		1		2		3		4	
			Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post	Pre	Post
Control	0	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of dams Normal	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
			12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	300	Number of dams Normal	11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
			11	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	1000	Number of dams Normal	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
			10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

Pre: Before administration, Post: after administration.

Table 5 Body weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100	300	1000	
Number of males	12		12	12	12	
Days of administration						
1	369 ±	9	368 ±	11	368 ±	9
4	378 ±	12	378 ±	10	374 ±	11
8	396 ±	13	396 ±	13	390 ±	13
11	406 ±	16	408 ±	14	400 ±	15
15	419 ±	18	424 ±	18	414 ±	15
18	427 ±	17	431 ±	19	421 ±	15
22	442 ±	20	448 ±	19	433 ±	16
25	451 ±	20	457 ±	21	442 ±	18
29	461 ±	19	469 ±	24	452 ±	21
32	469 ±	20	476 ±	27	460 ±	22
36	480 ±	21	489 ±	29	473 ±	23
39	487 ±	23	499 ±	33	481 ±	24
43	494 ±	24	506 ±	35	486 ±	27
46	500 ±	23	512 ±	37	493 ±	27
50	508 ±	26	521 ±	36	502 ±	27
					488 ±	25

Each value shows mean (g) ± S.D.
Significantly different from control group (*: P<0.05).

Table 6 Body weights of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100		300	1000
Number of females	12		12		12	12
Days of administration						
1	247 ±	7	247 ±	8	246 ±	7
4	248 ±	11	251 ±	9	248 ±	9
8	258 ±	15	258 ±	11	256 ±	8
11	262 ±	14	264 ±	10	260 ±	9
15	269 ±	17	271 ±	13	268 ±	10
18	279 ±	9 (4)	282 ±	20 (3)	276 ±	12 (3)
22	-		276	(1)	-	-

Each value shows mean (g) ± S.D.

Figures in parentheses indicate number of females.

Table 7 Body weights of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100	300	1000	
Number of dams	12		12	11	10	
Days of pregnancy						
0	275 ±	16	279 ±	14	272 ±	12
7	312 ±	18	316 ±	15	306 ±	14
14	348 ±	19	347 ±	18	341 ±	14
21	446 ±	24	442 ±	23	436 ±	16
					266 ±	10
					297 ±	12
					328 ±	13 *
					411 ±	24 **

Each value shows mean (g) ± S.D.
Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 8 Body weights of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg	0	100	300	1000
Number of dams	12	12	11	10
Days of lactation				
0	324 ± 26	325 ± 23	318 ± 17	307 ± 17
4	345 ± 23	350 ± 18	346 ± 21	336 ± 20

Each value shows mean (g) ± S.D.

Table 9 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100	300	1000	
Number of males	12		12	12	12	
Days of administration						
2	23 ±	3	22 ±	3	19 ±	4 **
5	26 ±	3	27 ±	3	25 ±	3
9	24 ±	2	27 ±	3 *	25 ±	2
12	25 ±	3	26 ±	3	24 ±	2
30	23 ±	1	23 ±	3	23 ±	2
33	26 ±	3	27 ±	3	23 ±	2
37	24 ±	3	24 ±	2	26 ±	3
40	24 ±	2	25 ±	2	23 ±	3
44	24 ±	3	25 ±	2	24 ±	3
47	22 ±	2	23 ±	2	24 ±	2

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 10 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100	300	1000	
Number of females	12		12	12	12	
Days of administration						
2	16 ±	2	15 ±	2	14 ±	2 *
5	19 ±	2	19 ±	2	18 ±	3
9	19 ±	2	19 ±	3	18 ±	3
12	18 ±	3	19 ±	3	18 ±	3
					18 ±	2

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

Table 11 Food consumption of dams during pregnancy in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100		300	1000
Number of dams	12		12		11	10
Days of pregnancy						
1	20 ±	2	22 ±	2	20 ±	3
8	25 ±	3	24 ±	3	24 ±	2
15	24 ±	2	23 ±	3	22 ±	3
20	23 ±	2	22 ±	3	22 ±	3
						23 ± 4

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 12 Food consumption of dams during lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg	0	100	300	1000
Number of dams	12	12	11	10
Days of lactation	4	33 ± 3	33 ± 4	35 ± 5
				34 ± 4

Each value shows mean (g/day) ± S.D.

Table 13 Necropsy findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test
of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg	0	100	300	1000
Number of males	12	12	12	12
Findings				
Normal	12	12	12	11
Epididymis				
Yellowish white nodule, left cauda	0	0	0	1

Table 14 Necropsy findings of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg	0	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12
Findings				
Normal	12	12	12	12

Table 15 Organ weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group		Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg		0	100	300	1000
Number of males		12	12	12	12
Body weight	(g)	511 ± 26	525 ± 35	507 ± 28	491 ± 26
Testes	(g)	3.39 ± 0.30	3.43 ± 0.30	3.42 ± 0.29	3.33 ± 0.23
	(g%)	0.66 ± 0.05	0.65 ± 0.07	0.68 ± 0.07	0.68 ± 0.07
Epididymides	(g)	1.22 ± 0.10	1.24 ± 0.06	1.24 ± 0.09	1.23 ± 0.06
	(g%)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.02

Each value shows mean ± S.D.

Table 16 Organ weights of dams in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group		Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg		0	100	300	1000
Number of dams		12	12	11	10
Body weight	(g)	345 ± 23	350 ± 18	346 ± 21	336 ± 20
Ovaries	(mg)	111 ± 15	114 ± 18	111 ± 6	102 ± 12
	(mg%)	32 ± 4	33 ± 5	32 ± 2	30 ± 4
Uterus	(g)	0.64 ± 0.08	0.66 ± 0.08	0.67 ± 0.10	0.59 ± 0.06
	(g%)	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.18 ± 0.02

Each value shows mean ± S.D.

Table 17 Sperm analysis of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control		benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0		100	300	1000	
Number of males	12		12	12	12	
Sperm motility						
Motile sperm rate (%)	81.6 ± 8.3		81.8 ± 5.0	83.8 ± 5.6	83.3 ± 5.0	
Progressive sperm rate (%)	35.0 ± 10.4		37.7 ± 5.5	37.0 ± 10.8	41.8 ± 11.2	
Path velocity (μm/s)	150.3 ± 8.0		153.0 ± 2.4	152.2 ± 10.0	155.6 ± 10.7	
Straight line velocity (μm/s)	104.4 ± 8.7		106.9 ± 4.8	104.8 ± 7.7	109.1 ± 9.6	
Curvilinear velocity (μm/s)	344.0 ± 17.7		347.0 ± 11.4	342.4 ± 25.6	346.2 ± 27.1	
Amplitude of lateral head displacement (μm)	20.7 ± 0.4		20.5 ± 0.6	20.6 ± 0.8	20.4 ± 0.8	
Beat cross frequency (Hz)	29.2 ± 1.4		28.8 ± 1.1	28.5 ± 1.0	28.6 ± 1.2	
Viability rate (%) ^{a)}	97.4 ± 3.5		97.6 ± 3.0	95.7 ± 6.6	97.4 ± 3.7	
Survivability rate (%) ^{b)}	80.7 ± 7.1		77.7 ± 5.8	78.3 ± 9.9	78.1 ± 6.1	
Sperm morphology						
Sperm abnormal rate (%) ^{c)}	3.1 ± 2.2		5.9 ± 9.1	4.3 ± 3.8	3.8 ± 1.7	
Head abnormal rate (%) ^{c)}	2.9 ± 2.1		5.6 ± 8.7	4.1 ± 3.8	3.8 ± 1.7	
Tail abnormal rate (%) ^{c)}	0.1 ± 0.2		0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.3	0.0 ± 0.1	
Number of sperms in left cauda epididymis (×10 ⁶)	284.5 ± 58.0		305.1 ± 41.6	322.4 ± 79.9	324.2 ± 87.7	
Number of sperms/g weight of left cauda epididymis (×10 ⁶)	979.4 ± 161.0		1039.0 ± 109.6	1074.0 ± 226.0	1111.6 ± 210.8	

Each value shows mean ± S.D.
a): ((Number of live sperms+number of sperms which died during incubation)/number of sperms examined)×100.
b): (Number of live sperms/number of sperms examined)×100.
c): (Number of abnormal sperms/number of sperms examined)×100.

Table 18 Histopathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control						benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-					
mg/kg	0						1000					
Incidence and grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings												
Testis	[12]						[12]					
Retention, step 19 spermatid, stage 9-11	11	1	0	1	0	0	12	0				

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

^{a)} No abnormality detected.

^{b)} Abnormality detected.

Numeral in brackets is number of animals examined.

Examined only for the testis and epididymis in the control and 1000 mg/kg groups.

No remarkable changes were seen in epididymis.

Table 19 Histopathological findings of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control						benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-					
mg/kg	0						1000					
Incidence and grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings												
Ovary	[12] 12 0						[10] 10 0					

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

^{a)} No abnormality detected.

^{b)} Abnormality detected.

Numeral in brackets is number of animals examined.

Examined only for the ovary in the control and 1000 mg/kg groups.

Table 20 Histopathological findings of non-pregnant female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-					
mg/kg	1000					
Incidence and grade	N ^{a)}	A ^{b)}	±	+	2+	3+
Findings						
Ovary	[2]					
	2	0				

Grade of histopathological findings: ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

^{a)} No abnormality detected.

^{b)} Abnormality detected.

Numeral in brackets is number of animals examined.

Examined only for the ovary in the non-pregnant females.

Table 21 Reproductive performance of male rats and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-		
mg/kg	0	100	300	1000
Number of females	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)				
Mean±S.D.	3.3 ± 0.5	3.5 ± 0.7	3.7 ± 0.5	3.7 ± 0.5
Number of pairs	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	12	12	12	12
Copulation index (%) ^{a)}	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days				
Mean±S.D.	2.8 ± 1.1	3.5 ± 1.8	2.8 ± 1.4	1.9 ± 0.9
Conceiving days 1-5	12	11	11	12
Conceiving days ≥ 6	0	1	1	0
Number of pregnant females	12	12	11	10
Fertility index (%) ^{b)}	100.0	100.0	91.7	83.3
Number of dead pregnant females during pregnancy	0	0	0	0
Number of pregnant females at delivery	12	12	11	10
Number of pregnant females with live pups	12	12	11	10

a): (Number of pairs with successful copulation / number of pairs)×100.
b): (Number of pregnant females / number of pairs with successful copulation)×100.

Table 22 Observation of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0	100	300	1000	
Number of dams	12	12	11	10	
Length of gestation (days)	22.2 ± 0.4	22.5 ± 0.5	22.4 ± 0.5	22.6 ± 0.5	
Pregnancy days ≤ 21	0	0	0	0	
Pregnancy days = 22	10	6	7	4	
Pregnancy days ≥ 23	2	6	4	6	
Corpora lutea	16.6 ± 1.4	16.3 ± 1.1	17.9 ± 1.8	15.8 ± 1.8	
Implantation scars	16.0 ± 1.3	15.4 ± 1.3	16.6 ± 1.0	14.4 ± 1.6 *	
Implantation index (%) ^{a)}	96.5 ± 4.0	94.9 ± 7.2	93.2 ± 5.7	91.4 ± 5.7	
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	
Pups born	14.9 ± 2.4	15.0 ± 1.5	14.3 ± 1.5	13.6 ± 2.0	
Stillbirths	0.3 ± 0.5	0.3 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.3	
Live pups born	14.7 ± 2.3	14.8 ± 1.6	14.1 ± 1.4	13.5 ± 2.1	
Sex ratio at birth ^{c)}	1.26 ± 0.54	1.37 ± 0.87	1.05 ± 0.49	1.46 ± 0.70	
(Total male/total female)	95/81	95/82	75/80	76/59	
Delivery index (%) ^{d)}	93.0 ± 11.4	97.3 ± 3.3	85.8 ± 7.1 **	94.2 ± 5.3	
Birth index (%) ^{e)}	91.5 ± 11.1	95.8 ± 4.8	84.7 ± 7.6 *	93.5 ± 6.1	
Live birth index (%) ^{f)}	98.4 ± 2.9	98.3 ± 3.2	98.8 ± 2.6	99.2 ± 2.5	
Live pups on day 4 of lactation	14.3 ± 2.1	14.4 ± 1.6	13.8 ± 1.6	13.1 ± 1.7	
Sex ratio on day 4 of lactation ^{c)}	1.28 ± 0.56	1.44 ± 0.94	1.10 ± 0.50	1.56 ± 0.91	
(Total male/total female)	93/79	94/79	75/77	75/56	
Viability index (%) ^{g)}	98.2 ± 6.4	97.8 ± 3.4	98.1 ± 4.5	97.5 ± 5.9	
External abnormalities (%) ^{h)}	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	

Each value shows mean ± S.D. per dam.

a): (Number of implantation scars / number of corpora lutea)×100.

c): Number of male pups / number of female pups.

e): (Number of live pups born / number of implantation scars)×100.

g): (Number of live pups on day 4 / number of live pups born)×100.

Significantly different from control group (*: P<0.05, **: P<0.01).

b): (Number of dams with live pups / number of pregnant dams)×100.

d): (Number of pups born / number of implantation scars)×100.

f): (Number of live pups born / number of pups born)×100.

h): (Number of pups with external abnormalities / number of live pups)×100.

Table 23 General signs of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	mg/kg	Number of pups and general signs	Days of lactation				
			0	1	2	3	4
Control	0	Number of pups	179	176	172	172	172
		Normal	176	172	172	172	172
		Death	3	4	0	0	0
benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-	100	Number of pups	180	177	174	173	173
		Normal	177	174	173	173	173
		Death	3	3	1	0	0
	300	Number of pups	157	155	153	153	153
		Normal	155	153	153	153	152
		Death	2	2	0	0	1
	1000	Number of pups	136	135	133	132	132
		Normal	135	133	132	132	131
		Death	1	2	1	0	1

Table 24 Body weights of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-
by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0	100	300	1000	
Number of dams	12	12	11	10	
Male weight					
Days of lactation					
0	6.7 ± 0.4	7.0 ± 0.7	6.8 ± 0.7	7.0 ± 0.8	
4	10.9 ± 0.9	11.1 ± 1.4	11.0 ± 1.2	10.8 ± 1.6	
Female weight					
Days of lactation					
0	6.2 ± 0.5	6.5 ± 0.6	6.4 ± 0.7	6.7 ± 0.7	
4	10.3 ± 1.0	10.5 ± 1.3	10.5 ± 1.2	10.6 ± 1.6	
Mean pup weight					
Days of lactation					
0	6.5 ± 0.4	6.8 ± 0.6	6.6 ± 0.7	6.9 ± 0.7	
4	10.6 ± 0.9	10.8 ± 1.3	10.8 ± 1.2	10.8 ± 1.6	
Litter weight					
Days of lactation					
0	94.4 ± 13.3	98.6 ± 7.1	91.9 ± 8.5	92.4 ± 10.8	
4	150.6 ± 15.7	154.7 ± 12.4	147.6 ± 14.3	139.7 ± 16.8	

Each value shows mean (g) ± S.D. per dam.

Table 25 Necropsy findings of pups (F₁) in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Group	Control	benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-			
mg/kg	0	100	300	1000	
Number of dams	12	12	11	10	
Number of male pups	93	94	75	75	
Normal	93	94	75	75	
Abnormal					
Total	0	0	0	0	
Number of dams	12	12	11	10	
Number of female pups	79	79	77	56	
Normal	79	79	77	56	
Abnormal					
Total	0	0	0	0	

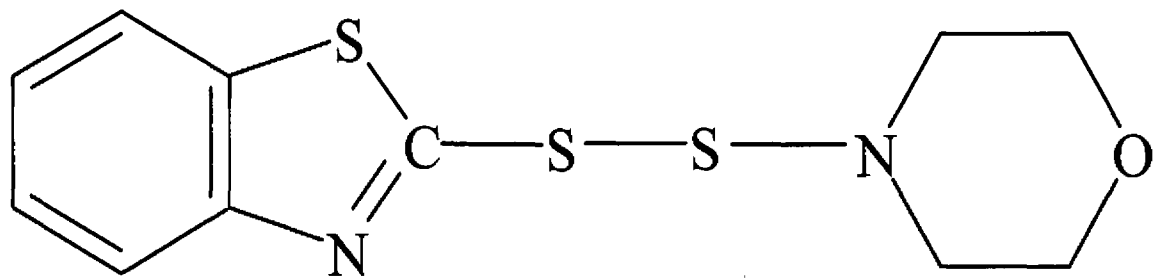


Fig. 1 Chemical structure of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)-

Study No. 100121

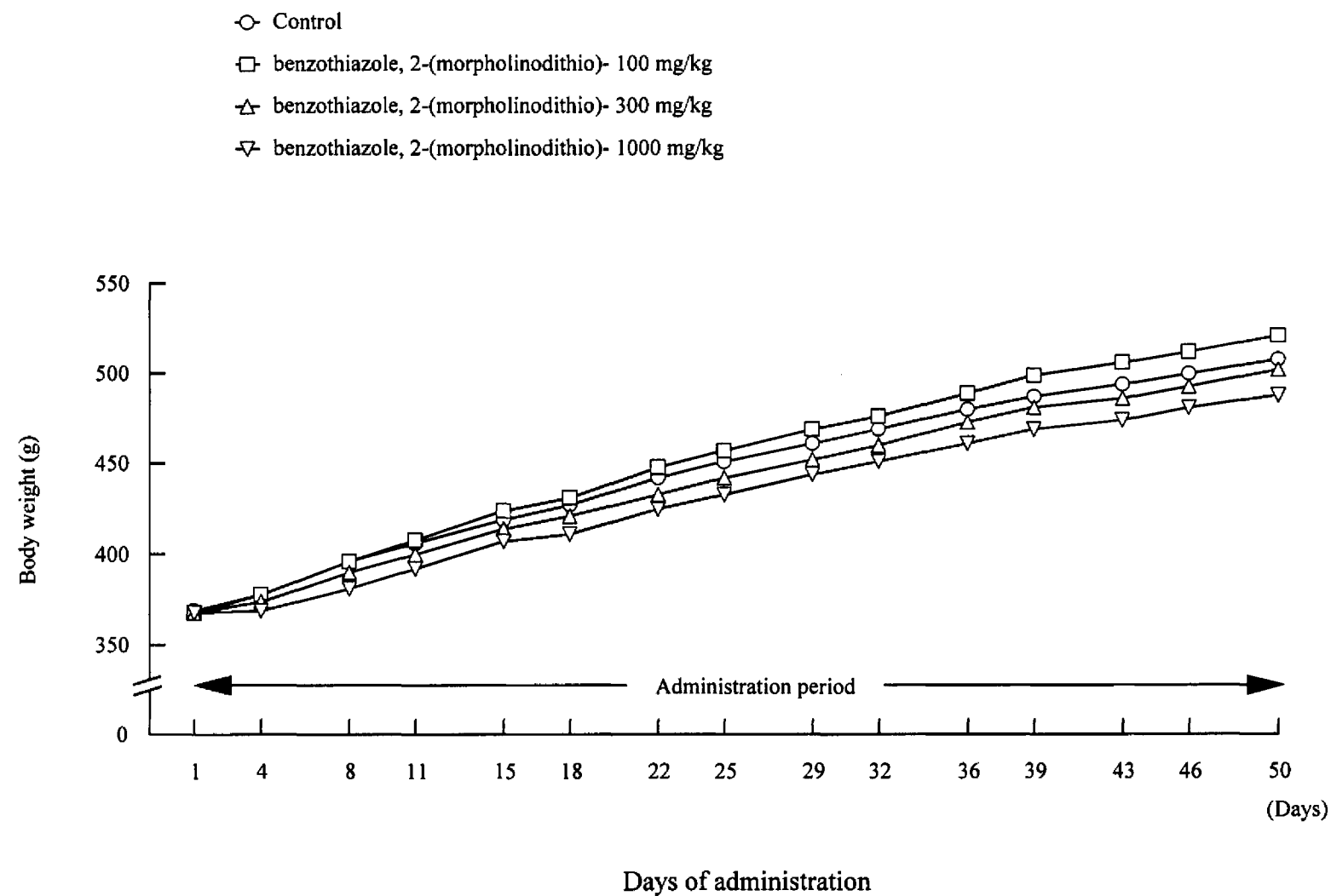


Fig. 2 Body weights of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

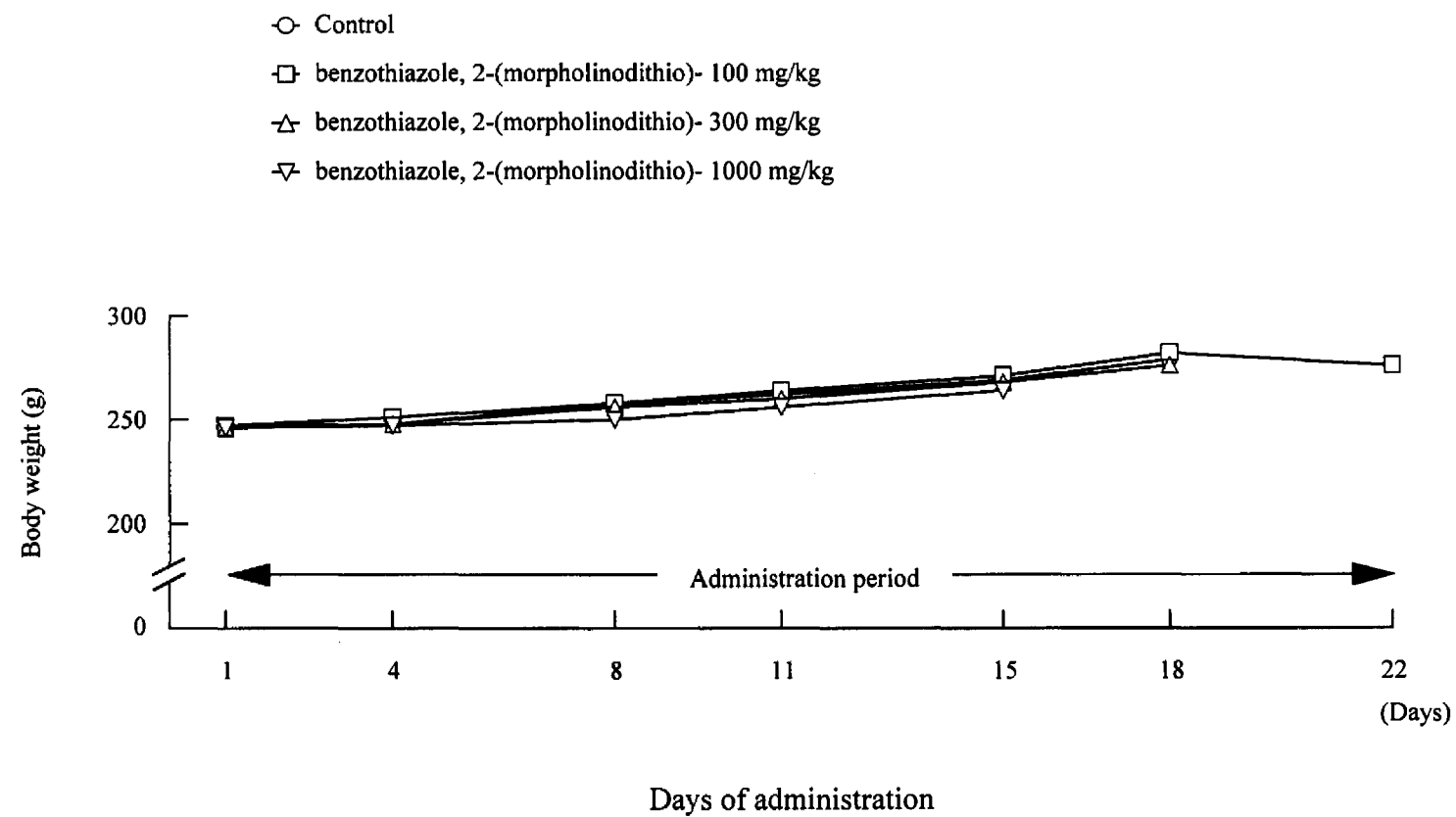


Fig. 3 Body weights of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

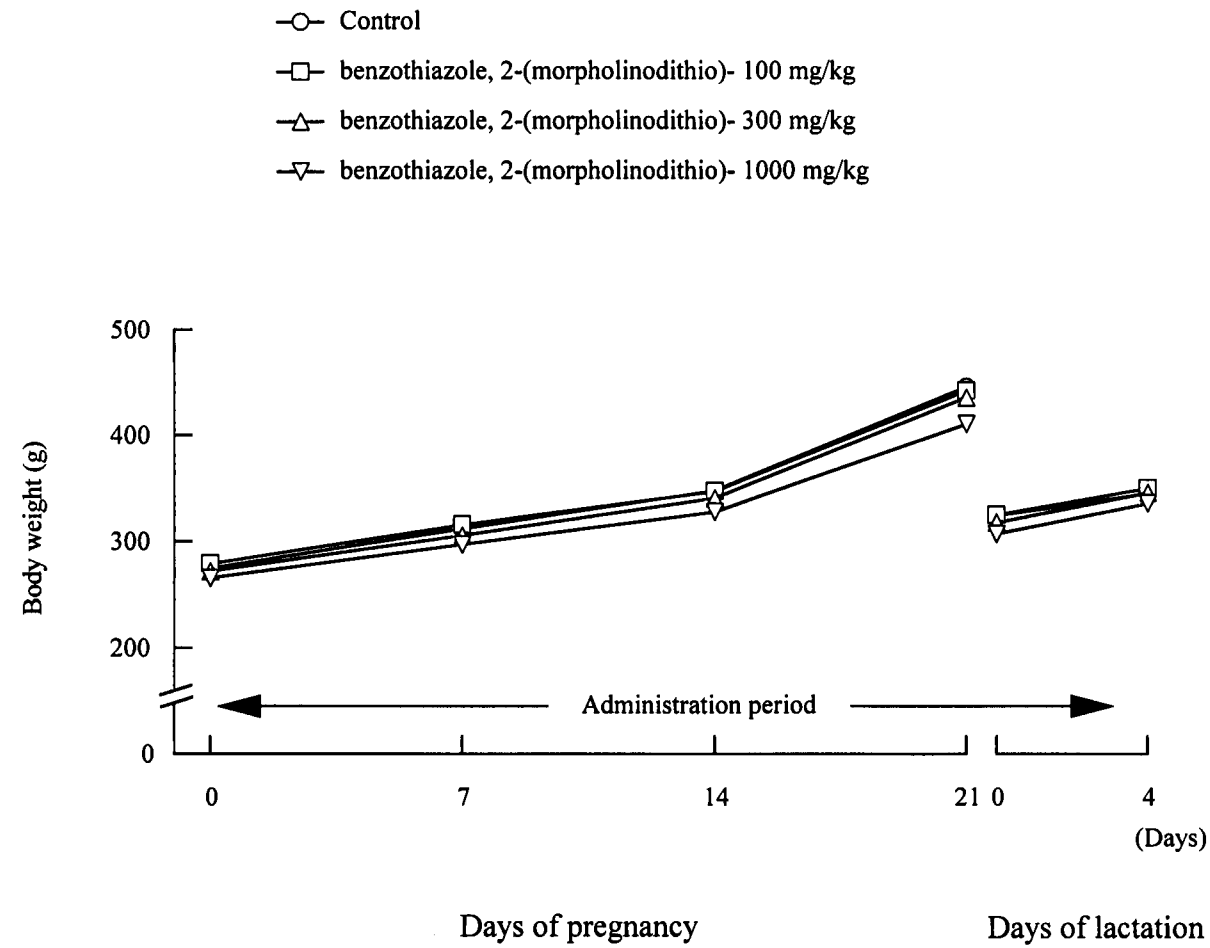


Fig. 4 Body weights of dams during pregnancy and lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

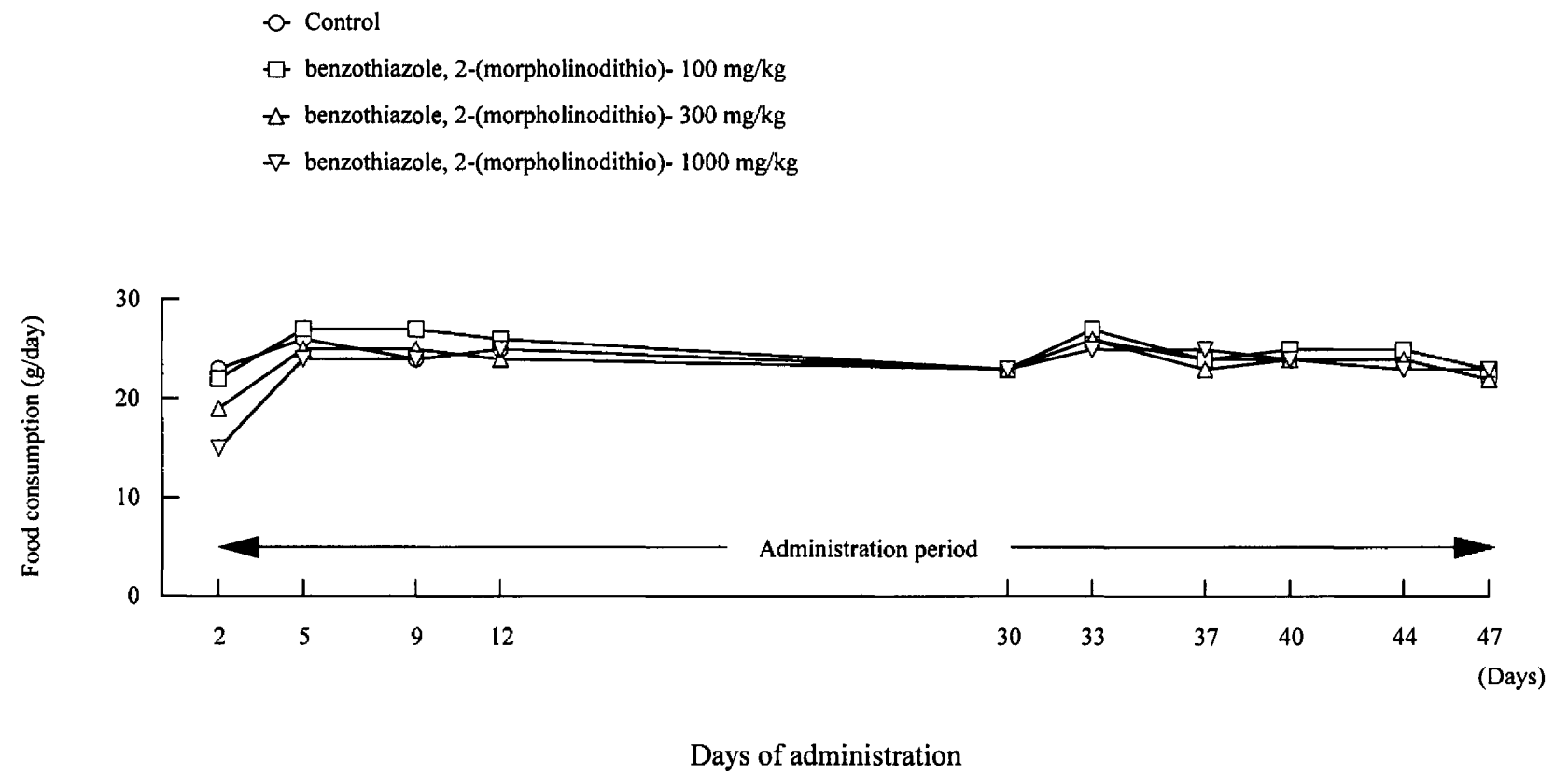


Fig. 5 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

Study No. 100121

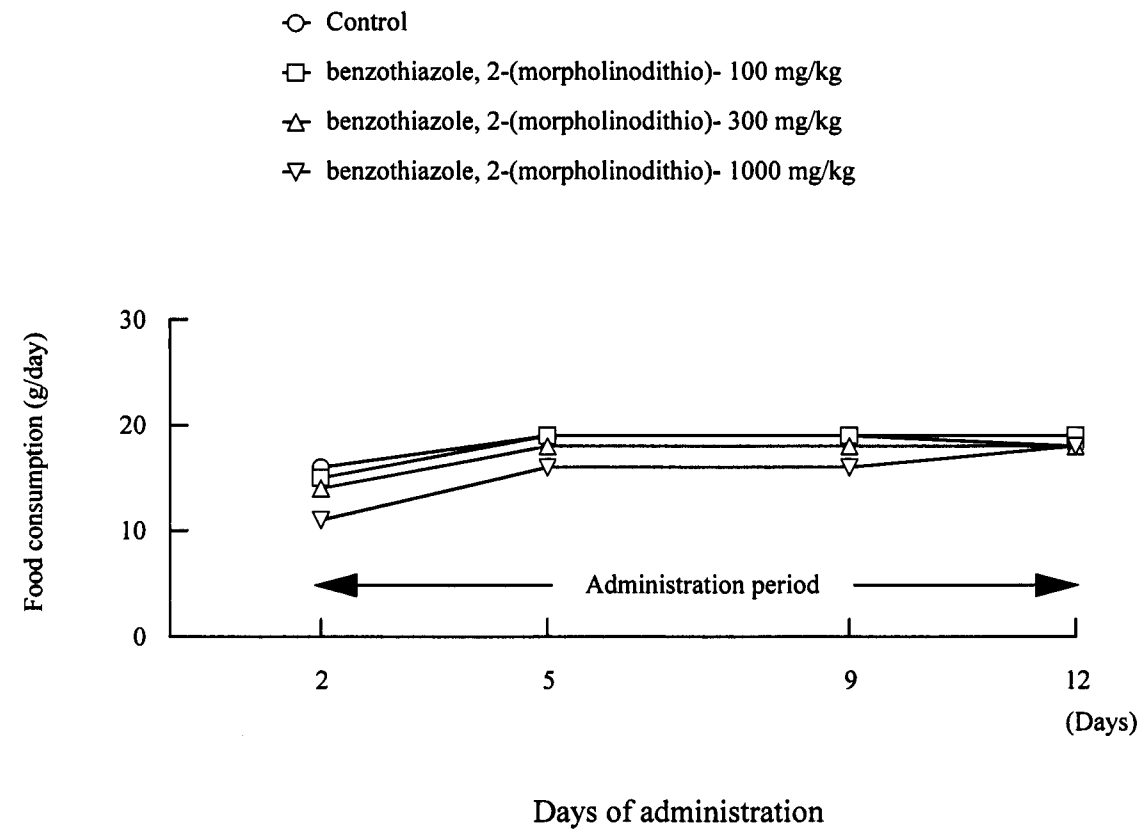


Fig. 6 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration

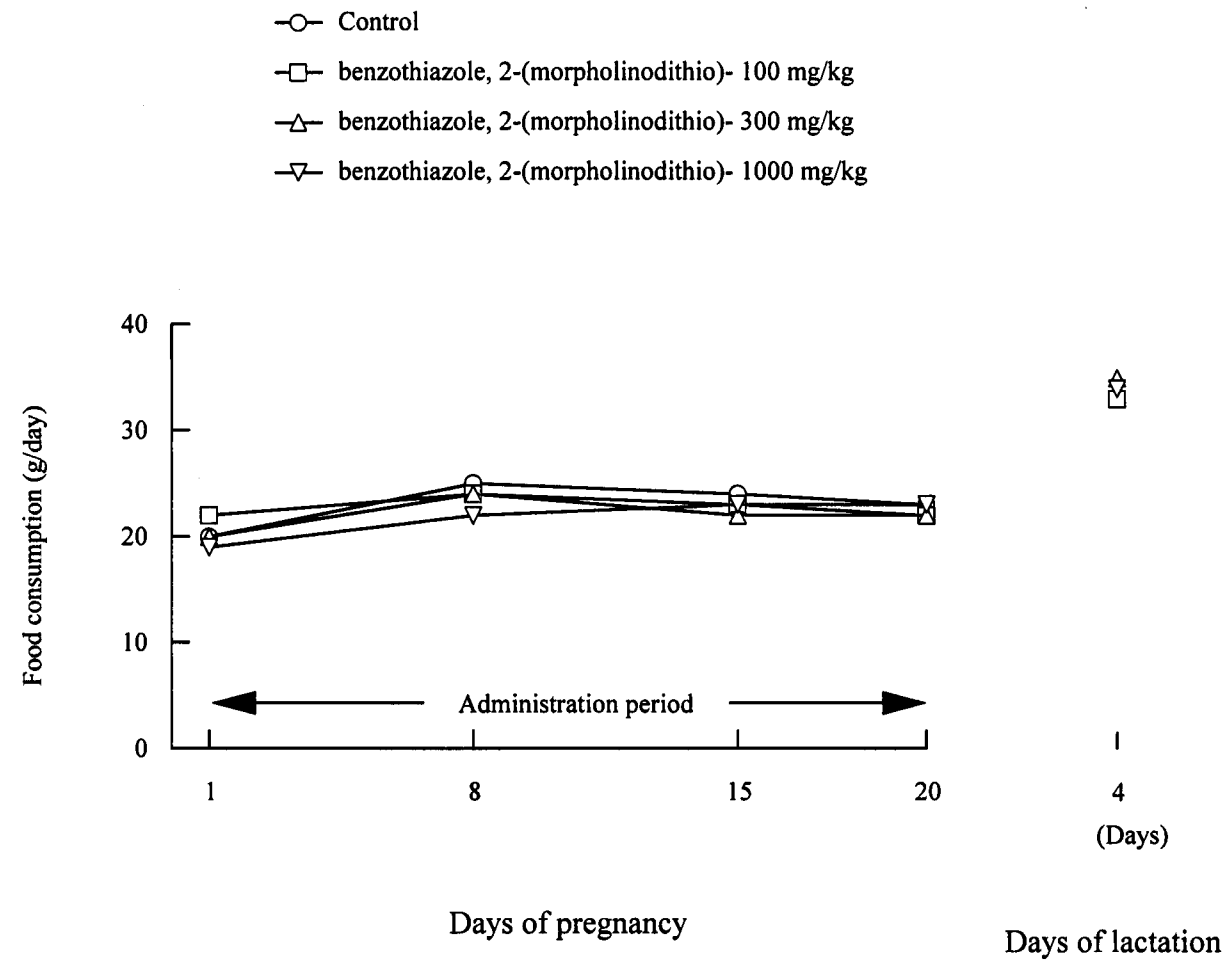


Fig. 7 Food consumption of dams during pregnancy and lactation in preliminary reproduction toxicity screening test of benzothiazole, 2-(morpholinodithio)- by oral administration