

2-Mercaptobenzothiazole

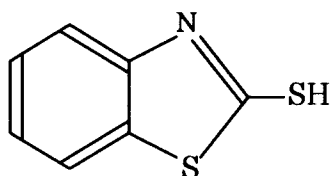
2-メルカプトベンゾチアゾール

[CAS No. 149-30-4]

2-Benzothiazolethiol

Molecular formula: C₇H₅NS₂

Molecular weight: 167.25



ABSTRACT

1. Material and method

Purity	: 99.0%
Test species/strain	: Rat/Crl:CD(SD)
Test method	: OECD Test Guideline 422
Route	: Oral (gavage)
Dosages	: 0, 40, 200, 1000 mg/kg
Dosages for recovery	: 0, 1000 mg/kg
Number of animals/group	: Males, 12 (5 for recovery) ; females, 12; satellite females, 5
Vehicle	: Olive oil
Administration period	: Males, 42 days Females, from 14 days before mating to day 4 of lactation Females (satellite), 42 days
Recovery period	: Males, 14 days Females (satellite), 14 days
Terminal killing	: Males, day 43 of treatment and 15 of recovery Females, day 5 of lactation Females (satellite), day 15 of recovery Offspring, day 4 after birth
GLP	: Yes

2. Results

Repeated dose toxicity

Decrease in locomotor activity with ptosis was only observed in the day 1 of administration of both sexes given 1000 mg/kg. Tendency of suppression of body weight gain was observed in the males, and body weight gain before mating was decreased in the females given 1000 mg/kg. Food consumption in the day 1 of administration was decreased in the males given 1000 mg/kg.

Urinalysis revealed increased specific gravity in the males given 1000 mg/kg. This change disappeared in the recovery group of males given 1000 mg/kg.

Blood biochemical examination revealed increased LDH in the males and decreased calcium in the females given 200 mg/kg, and revealed increased LDH in the males and γ -GTP of both sexes, and decreased calcium in the females given 1000 mg/kg. No significant change in LDH in the males, in calcium in the females and in γ -GTP of both sexes was noted in the recovery group given 1000 mg/kg.

Relative liver weight was increased and absolute thymus weight was decreased in the males given 1000 mg/kg. No increase in the liver weight and decrease in the thymus weight were observed in the recovery group of males given 1000 mg/kg. No significant change in the organ weight was noted in any dosed females at the terminal necropsy.

Histopathological examination revealed centrilobular hepatocellular hypertrophy in the liver, hyaline droplet of proximal tubular epithelium in the kidney and cortical atrophy in the thymus in the males given 1000 mg/kg. These changes disappeared in the recovery group of males given 1000 mg/kg. No treatment-related changes in the histopathological examination were observed in any dosed females.

No adverse effect of the compound was shown in clinical signs in detailed observation, sensory reactivity to stimuli, grip strength, motor activity, hematological examination in any dosed group of either sex.

Reproductive and developmental toxicity

No adverse effect of the compound was observed at any dose level on the reproductive performances, such as the estrous cycle, copulation index, fertility index and pairing days until copulation.

No significant changes were observed in gestation length, delivery or lactation. No adverse effect of the compound was observed on the developmental performances, such as the number of corpora lutea and implantations, implantation index, number of pups born and live pups, pups weights, delivery index, birth index, live birth index and sex ratio on day 0 and 4 of lactation, and viability index on day 4 of lactation. Neither external abnormality nor macroscopic finding was detected in any pups at the necropsy.

3. Evaluation

It was concluded from the above results that no observed effect dose level (NOEL) for the repeated dose toxicity of 2-mercaptobenzothiazole was below 40 mg/kg/day for males because of the changes of the blood biochemical changes in the 40 mg/kg group, and NOEL for females was 40 mg/kg/day because of the blood biochemical changes in the 200 mg/kg group, that no observed adverse effect dose level (NOAEL) for the repeated dose toxicity was 40 mg/kg/day for both sexes because of the blood biochemical changes in the 200 mg/kg group, and that the NOEL and NOAEL for the reproductive/developmental toxicity were 1000 mg/kg/day because of no treatment-related changes on reproductive/developmental parameter in any groups.

2-メルカプトベンゾチアゾールのラットを用いる

反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of 2-Mercaptobenzothiazole by Oral Administration in Rats

要約

既存化学物質の2-メルカプトベンゾチアゾールについて、反復投与毒性および生殖発生毒性を調べるため、0, 40, 200 および 1000 mg/kg/day で、1 群雌雄各 12 匹の SD 系ラットに、交配開始前から、雄は 42 日間、雌は分娩後哺育 4 日まで経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討した。また、雄については対照群および 1000 mg/kg 群の各 12 匹からそれぞれ 5 匹を選別し、雌についてはサテライト群として別に 1 群 5 匹の対照群および 1000 mg/kg 群を設け、投与終了後 14 日間の回復期間による変化の可逆性についても併せて検討した。

1. 反復投与毒性

1000 mg/kg 群で雌雄に、眼瞼下垂を伴った軽度自発運動低下が投与 1 日の投与後認められた。投与 2 日以降は、雌の 1 匹で投与 5 日に自発運動低下を認めた以外、このような変化は認められなかった。また、同群で雄に体重増加の抑制傾向および投与開始日の摂餌量の低値、雌に交配前投与期間の体重増加量の低値が認められた。雄の尿検査では、1000 mg/kg 群で尿比重の高値が認められた。血液生化学検査では、被験物質投与各群の雄および 200 mg/kg 以上の群の雌で、毒性学的意義はないと考えられる血清 ALT の低値が認められた。また、200 mg/kg 以上の群で雄に LDH の有意な高値、雌にカルシウムの有意な低値、1000 mg/kg 群ではさらに雌雄に γ -GTP の高値あるいは高値傾向が認められた。器官重量では、1000 mg/kg 群で雄に胸腺絶対重量の低値および肝臓相対重量の高値が認められた。病理組織学検査では、1000 mg/kg 群で雄に肝臓の小葉中心性肝細胞肥大、腎臓の近位尿細管上皮硝子滴の増加および胸腺の皮質萎縮が認められた。回復期間終了時屠殺動物では、このような変化は認められず、可逆性変化であることが示唆された。また、詳細な臨床観察、感覚反射機能検査、前後肢握力、自発運動量および血液学検査では変化は認められなかった。

以上の結果から、雄親動物の NOEL は、40 mg/kg 群で血清 ALT の低値が認められたことから、40 mg/kg/day 未満、NOAEL は、200 mg/kg 群で LDH の高値が認められたことから、40 mg/kg/day、雌親動物の NOEL および NOAEL は、200 mg/kg 群で ALT およびカルシウムの低値が認められたことから、いずれも 40 mg/kg/day と推定された。

2. 生殖発生毒性

親動物の性周期（雌）、交尾成立期間、交尾率、受胎率、妊娠期間、黄体数、着床数、着床率、出産率、分娩率、分娩および哺育状態に変化は認められなかった。児動物に対しても、総出産児数、新生児数、性比、出生率、体重、形態および哺育 4 日生存率に、被験物質の投与に起因する変化は認められなかった。

したがって、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対する NOEL 並びに NOAEL は、いずれも 1000 mg/kg/day と推定された。

方法

1. 被験物質

2-メルカプトベンゾチアゾールは、水に不溶、アセトンおよび酢酸に易溶な白色～黄色の刺激臭を有する粉末物質である。試験には、財団法人化学物質評価研究機構（東京）からロット番号 FHI01（純度 99.0%）の被験物質 [REDACTED] を入手し、冷暗（2～6℃）条件下で保管し、使用した。被験物質の投与液は、局方オリーブ油（宮澤薬品）を溶媒として、所定の投与用量となる濃度の懸濁液に調製し、使用時まで冷所（2～6℃）遮光下で密栓保管し、調製後 7 日以内に使用した。保管条件下および投与形態での被験物質は安定であることを確認した。

2. 供試動物および飼育条件

動物は、SD 系 [CrI : CD (SD)] ラットを、日本チャールス・リバーより搬入し、雌雄とも 7 日間検疫を兼ねて試験環境に馴化させ、9 週齢で試験に供した。1 群の動物数は雌雄各 12 匹とし、雌についてはさらに対照群と高用量群の回復群として各 5 匹からなる 2 群のサテライト群を設け、雄については、対照群と高用量群の中からそれぞれ 5 匹を選別して回復群とし、14 日間の回復期間を設けた。群分けおよび雄の回復群用動物の選別は、無作為抽出法により行った。雌のサテライト群については交配を行わなかった。

実験開始時（群分け直後）の平均体重（体重範囲）は、雄 341（327～359）g、雌 228（217～240）g であった。ラットは、温度 21.0～22.8℃、湿度 52～62% に制御した飼育室で、金網ケージに個体別に収容し、固型飼料（ラボ MR ストック、日本農産工業）および水を自由に摂取させて飼育した。ただし、交尾確認後の雌は、巣作り材料（ホワイトフレック、日本チャールス・リバー）を入れたポリカーボネート製ケージに収容した。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量設定試験として、1 群雌雄各 4 匹のラットに、被験物質を 0（溶媒対照）、30、100、300 および 1000 mg/kg/day で 14 日間経口投与し、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定、尿検査、血液学検査、血液生化学検査、剖検、器官重量の測定を行った。

その結果、300 および 1000 mg/kg 群で自発運動低下、眼瞼下垂或いは流涎等の一般状態の変化、さらに 1000 mg/kg 群で肝臓重量の高値傾向が認められた。また、血清 ALT 活性の用量依存的な低値が認められた。従って、本試験における投与量は、1000 mg/kg/day を高用量とし、以下 200 および 40 mg/kg/day の 3 用量および対照を設定した。

投与方法は、投与液量を体重 1kg 当たり 5 mL とし、テフロン製胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1 日 1 回（午前中）、交配開始 14 日前から、雌は分娩後の哺育 4 日まで、雄と雌のサテライト群は 42 日間、経口投与した。対照群には、局方オリーブ油を同様に投与した。

4. 観察および検査

1) 親動物に関する項目

(1) 一般状態

投与期間およびそれに続く 14 日間の回復期間を通じて、動物の生死、外観、行動などを毎日観察した。

(2) 詳細な臨床観察

投与開始前日およびその後は週 1 回、雌は分娩後 1 回、全例について、動物をケージから取り出す時およびケージ外のアルミ製オープンフィールド（370W×560D×40H mm）で、ケージからの出し易さ、ケージから出す時の扱い易さ、体躯緊張（弛緩～強直）、皮膚（色）、毛並み、立毛、眼分泌物、眼瞼閉鎖状態、眼球突出、流涎、口鼻分泌物（汚れ）、流涎、下腹部被毛の尿による汚れ、肛門周囲の便による汚れ、発声、呼吸、姿勢、痙攣、振戦、探索行動（覚醒度）、警戒性、自発運動（活動性）、歩行（よろめき）、異常行動（自咬、後ろ向き歩行など）、常同行動（過度の毛繕い、反復旋回運動など）、意識不全（混迷、カタレプシー、昏睡）、四肢筋緊張度、排尿および排糞の 29 項目について観察した。なお、投与最終週の検査で異常は認められなかったので、回復 2 週での検査は実施しなかった。

(3) 機能検査

雄は各群の動物番号の小さい順に 5 匹、雌は分娩動物のうち分娩日の近い 5 匹を選び、雌のサテライト群は全例を検査の対象とした。

① 感覚反射機能検査

雄は投与 37 日，雌は哺育 4 日および雌のサテライト群は投与 40 日に，聴覚反応，視覚反応，触覚反応，痛覚反応，瞳孔反射および正向反射を調べた．これらの検査の結果，異常が認められなかったので，回復 2 週での検査は実施しなかった．

② 前後肢の握力および自発運動量

雄は投与 37 日，雌は哺育 4 日および雌のサテライト群は投与 40 日に，雄は 30 分間および 60 分間，雌は 30 分間の自発運動量（自発運動量測定装置，SUPERMEX，室町機械，動物が発する遠赤外線をセンサーが感知し，測定装置内の区画間における移動回数を測定）並びに前肢および後肢の握力（ラット・マウス用握力測定装置，MK-380R/FR，室町機械）を測定した．雌のサテライト群の自発運動量は，60 分間測定した．これらの検査で異常が認められなかったので，回復 2 週での検査は実施しなかった．

(4) 体重および摂餌量

体重は，雄については投与 1（投与開始日，投与直前），4，7，14，21，28，35，42 日および解剖日（搬出時，絶食状態）並びに回復 1，4，7，14 日および解剖日（搬出時，絶食状態），雌は投与 1，4，7 および 14 日，妊娠 0，7，14 および 20 日並びに哺育 0 および 4 日と解剖日（搬出時，絶食状態）に，また，雌のサテライト群は，雄と同じ日に測定した．摂餌量は，体重測定日に合わせて，ケージごとに翌日までの 24 時間飼料消費量を測定した．ただし，摂餌量の最終測定日は，雄では投与 41 日，雌では哺育 3 日，回復群では回復 13 日とした．

(5) 雌の性周期検査

雌について，投与開始日から交尾が確認されるまで，Giemsa 染色による膣垢塗抹標本を作製し，鏡検により性周期段階の判定を行った．また，投与開始日から交配開始日までの性周期段階の判定から性周期を算出した．1 性周期は，発情後期 I（Ⅲ）期像が認められた日から次のⅢ期像が認められた前日までとし，Ⅲ期像が連続した場合は，最初のⅢ期像が認められた日から起算した．

(6) 交配および分娩状態観察

投与 15 日の午後に雌雄を同一群内で 1 対 1 の組み合わせを作り，2 週間を限度として交尾が確認されるまで連続同居させた．交尾の確認は毎朝一定時刻に行い，膣栓形成または膣垢中の精子の有無により確認し，確認された日を妊娠 0 日とした．交尾率（％）

[$(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$]を算出した。分娩状態の観察も同じ時刻に行い、一腹ごとに分娩の完了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、受胎率(%) [$(\text{受胎雌数} / \text{交尾成立雌数}) \times 100$]、妊娠期間(妊娠0日から分娩の完了が確認された日までの日数) および出産率(%) [$(\text{生児出産雌数} / \text{妊娠雌数}) \times 100$]を算出した。

(7) 雄の尿検査

雄について、各群の動物番号の小さい順に5匹を選び、投与40日に動物を約3時間代謝ケージに収容し、得られた尿について、色調および濁度の観察、試験紙法(マルティスティックス、バイエル・三共)によるpH、潜血、タンパクおよび糖の定性的検査並びに沈渣の検査(URI-CELL 液、ケンブリッジケミカルプロダクト、で染色して鏡検)を行った。さらに、18時間収容して得られた尿について、尿量および比重(屈折計、エルマ光学)を測定した。1000 mg/kg 群で比重の高値が認められたので、回復群について回復12日より18時間尿を採取し、尿量および比重の測定を行った。

(8) 血液学検査

最終投与の翌日あるいは回復期間終了の翌日の解剖直前に、エーテル麻酔下で開腹して腹大動脈より採血した。動物は前日の午後5時より除餌し、水のみを給与した。雄は各群の動物番号の小さい順に5匹、雌は分娩動物のうち分娩日の近い5匹を選び、回復群は雌雄とも全例を検査の対象とした。

採取した血液は3分割し、その一部はEDTA-2Kで凝固阻止処理し、多項目自動血球分析装置(XT-2000iV, シスメックス)により、赤血球数(電気抵抗検出法)、血色素量(ラウリル硫酸ナトリウム・ヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(赤血球パルス波高値検出法)、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度(以上、計算値)、白血球数(フローサイトメトリー法)、血小板数(電気抵抗検出法)、網状赤血球数および白血球百分率(以上、フローサイトメトリー法)を測定した。また、血液の一部を3.8%クエン酸ナトリウム液で凝固阻止処理して血漿を得、血液凝固自動測定装置(KC-10A, 米国アメルング)により、プロトロンビン時間(Quick 一段法)および活性化部分トロンボプラスチン時間(エラヂン酸活性化法)を測定した。

(9) 血液生化学検査

採取した血液の一部から血清を分離し、生化学自動分析装置(JCA-BM8 型クリナラ

イザー、日本電子)により、総タンパク(ビューレット法)、アルブミン(BCG法)、A/G比(計算値)、血糖、総コレステロール、トリグリセライド(以上、酵素法)、総ビリルビン(ジアゾ法)、尿素窒素(ウレアーゼ・UV法)、クレアチニン(Jaffe法)、AST、ALT、ALP(以上、JSCC法)、 γ -GTP(SSCC法)、LDH(SFBC法)、カルシウム(OCPC法)および無機リン(酵素法)を、また電解質自動分析装置(NAKL-132, 東亜電波工業)により、ナトリウム、カリウムおよび塩素(以上、イオン電極法)を測定した。

(10) 病理学検査

雄の計画屠殺動物は投与42日の翌日、雌は哺育5日、また、回復群については回復14日の翌日に、それぞれエーテル麻酔下で放血屠殺し、体表、開口部粘膜および内部諸器官を肉眼的に観察した。雄は各群の動物番号の小さい順に5匹、雌は分娩動物のうち分娩日の近い5匹を選び、回復群は雌雄の全例について、脳、胸腺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、精巣および精巣上体を秤量(絶対重量)し、屠殺日の体重に基づいて対体重比(相対重量)を算出した。雌については、卵巣の黄体数および子宮の着床数を調べ、着床率(%) $[(\text{着床数}/\text{黄体数}) \times 100]$ を算出した。

全例について脳、下垂体、甲状腺、胸腺、気管・肺(固定液を注入後浸漬)、胃、腸、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、精巣上体、前立腺、精囊、卵巣、子宮、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経、骨髓(大腿骨)、リンパ節(頸部リンパ節、腸間膜リンパ節)を採取し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液(精巣、精巣上体はブアン液で前固定)で固定し、保存した。病理組織学検査は、対照群および1000 mg/kg群の雌雄各5匹(雄は各群の動物番号の小さい順に5匹、雌は分娩動物のうち分娩日の近い5匹)のこれら保存器官について実施した。その結果、被験物質の投与による影響が雄で肝臓、腎臓および胸腺に認められたので、回復群を含むその他の群については、各雄5匹の肝臓、腎臓および胸腺について検査した。検査は、常法に従ってパラフィン切片を作製し、H-E染色を施して鏡検した。

2) 新生児に関する項目

(1) 産児数、性比および外表観察

分娩完了の確認後、各腹の産児数(出生児と死亡児の合計)を調べ、分娩率(%)

$[(\text{総出産児数} / \text{着床数}) \times 100]$ を、また肛門と生殖突起間距離の長短により性別を判定し、哺育 0 日の出産児の性比（雄出産児数/総出産児数）および出產生児の性比（雄出產生児数/総出產生児数）並びに哺育 4 日の生存児の性比（雄生存児数/総生存児数）を算出した。さらに、新生児について、口腔内を含む外表の異常を観察した。

(2) 一般状態

生後 4 日の屠殺日まで毎日、一般状態および生死を確認し、出生率（%） $[(\text{出產生児数} / \text{総出産児数}) \times 100]$ および哺育 4 日生存率（%） $[(\text{哺育 4 日生存児数} / \text{出產生児数}) \times 100]$ を算出した。

(3) 体重

生児について、哺育 0（出生日）および哺育 4 日（屠殺日）に、雌雄別に腹ごとの体重を測定し、1 匹当たりの平均体重を算出した。

(4) 病理学検査

死亡例はその都度、生存例は哺育 4 日にエーテル麻酔下で安楽死させ、胸部および腹部における主要器官について、肉眼的に観察した。

5. 統計解析

得られた平均値あるいは頻度について、対照群との有意差（危険率 5%以下）を、定量的データおよびパラメトリックデータについて、試験群が 3 群以上の場合、Bartlett の分散検定を行い、分散が一樣な場合は一元配置の分散分析を行った。分散が一樣でない場合およびノンパラメトリックデータは、Kruskal-Wallis 検定を行った。それらの結果有意差を認めた場合、Dunnett ないし Dunnett 型の検定法による多重比較を行った。試験群が 2 群間の場合は、パラメトリックデータについて F 検定を行い、その結果分散が一樣な場合は Student の t 検定を、分散が一樣でない場合は Aspin-Welch の t 検定を行った。また、ノンパラメトリックデータは、Mann-Whitney の U 検定を行った。カテゴリカルデータについては、Fisher の直接確率法を用いて検定した。ただし、病理組織学検査における異常例の発現率については、Mann-Whitney の U 検定を用いた。なお、出産児に関するデータは、1 腹を 1 標本とした。

結果

1. 反復投与毒性

1) 一般状態 (Table 1, 2) および死亡

1000 mg/kg 群で、投与 1 日の投与後、眼瞼下垂を伴った軽度自発運動低下が、各 12 匹中雄の 7 匹および雌の 5 匹に認められ、これらの発現率には有意差が認められた。また、雌のサテライト群においても同様の症状が 5 匹中 2 匹に認められた。投与 2 日以降は、雌の 1 匹で投与 5 日に自発運動低下を認めた以外、このような変化は認められなかった。自発運動低下とは別に、1000 mg/kg 群で流涎が、投与 13 日以降、多くは 35 日以降、雄の 8 匹およびサテライト群を含む雌の全例に認められ、雌雄の流涎の発現率にも有意差が認められた。流涎は、口周囲を湿らす程度の軽度、かつ、投与直後から 30 分までの間に一過性に認められた。

2) 詳細な臨床観察

投与期間中の観察において、被験物質投与各群の雌雄および雌のサテライト群とも、対照群と比べて有意な変化は認められなかった。

3) 機能検査

(1) 感覚反射機能検査

投与最終週の検査において、被験物質投与各群の雌雄およびサテライト群の雌に変化は認められなかった。

(2) 前後肢の握力および自発運動量

投与最終週の検査において、被験物質投与各群の雌雄およびサテライト群の雌に変化は認められなかった。

4) 体重 (Fig. 1, 2)

1000 mg/kg 群で、雌の交配前投与期間の体重増加量に有意な低値が認められた。各測定時点の体重に有意差は認められなかった。同群の雄および雌のサテライト群の体重も対照群を僅かに下回って推移する傾向にあったが、各測定時点の体重並びに投与期間中および回復期間中の体重増加量に有意差は認められなかった。

なお、200 mg/kg 群で雌の哺育 0 日の体重に有意な低値が認められたが、変化に用量相関性は認められず、また、その他の測定時点の体重に低値傾向が認められないことから、被験物質の投与とは無関係な偶発的な変化と判断した。

5) 摂餌量 (Fig. 3, 4)

1000 mg/kg 群で、雄の投与 1 日の摂餌量に有意な低値が認められた。サテライト群を含め、雌の摂餌量に変化は認められなかった。

6) 雄の尿検査 (Table 3)

1000 mg/kg 群で、尿比重に有意な高値が認められた。回復期間終了時の検査では尿比重に変化は認められなかった。

7) 血液学検査 (Table 4)

投与期間終了時および回復期間終了時検査とも、変化は認められなかった。

8) 血液生化学検査 (Table 5)

被験物質投与各群の雄および 200 mg/kg 以上の 群の雌で、用量相関的、かつ、有意な ALT の低値が認められた。さらに、200 mg/kg 以上の群で雄に LDH の有意な高値、雌にカルシウムの有意な低値、1000 mg/kg 群で雌に γ -GTP の有意な高値、雄にも高値傾向が認められた。

40 mg/kg 群の雄のカリウムが対照群の 4.89 mEq/L に対して 4.47 mEq/L と有意な低値を示したが、変化に用量相関性は認められず、また、その個体値は、いずれも当研究所の背景データにおける正常範囲 (4.08~5.34 mEq/L) 内の値であった。したがって、カリウムの変化は、被験物質の投与とは無関係な偶発的所見と判断した。

回復期間終了時の検査では、雄の ALT に有意差が残るものの変化の程度は軽減し、雄の LDH、雌の ALT、 γ -GTP およびカルシウムには変化は認められなかった。

回復期間終了時の検査では、雄の γ -GTP は対照群の 0.43 IU/L に対して 0.86 IU/L で有意な高値を示したが、その個体値は、5 例中 1 例 (1.31 IU/L) で背景データにおける正常範囲 (0.23~0.92 IU/L) を上回ったものの、他の 4 例は正常範囲内の値で、

投与終了時の検査値（1.46 IU/L）と比べても低い値であったことから、対照群が低値であったための有意差と考えられた。また、雄の総ビリルビンは対照群の 0.27 mg/dL に対して 0.23 mg/dL と有意な低値を示したが、投与終了時の検査では認められなかった変化であり、また、その個体値は、5 例中 1 例（0.19 mg/dL）で背景データにおける正常範囲（0.20～0.41 mg/dL）を僅かに下回ったが、他の 4 例は正常範囲内の値であったことなどから、被験物質の投与とは無関係な偶発的所見と判断した。

血液生化学検査背景値(15～16 週齢、投与期間終了時)

項目	性	n	平均	Mean－2S.D.	Mean＋2S.D.
カリウム(mEq/L)	雄	64	4.71	4.08	5.34

血液生化学検査背景値（17～18 週齢、回復期間終了時）

項目	性	n	平均	Mean－2S.D.	Mean＋2S.D.
γ -GTP (IU/L)	雄	64	0.57	0.23	0.92
総ビリルビン(mg/dL)	雄	64	0.30	0.20	0.41

9) 剖検

1000 mg/kg 群で、雄の 2 匹に胸腺の小型化が認められた。雄の回復群およびサテライト群を含む雌に、変化は認められなかった。

10) 器官重量 (Table 6)

1000 mg/kg 群で雄に胸腺の絶対重量、心臓の絶対および相対重量のいずれも有意な低値、肝臓の相対重量の有意な高値が認められた。回復期間終了時屠殺動物においては、投与期間終了時屠殺動物に認められたこれらの変化は認められなかった。なお、回復期間終了時屠殺動物においては、雄に腎臓の相対重量における有意な高値が認められた。

11) 病理組織学検査 (Table 7, 8)

被験物質に起因する変化が、1000 mg/kg 群で雄の肝臓、腎臓および胸腺に認められた。肝臓では、軽度な小葉中心性肝細胞肥大が 5 匹中 3 匹に認められ、うち 1 匹は小葉中心性の肝細胞脂肪変性を伴っていた。腎臓では、近位尿細管上皮硝子滴の増加が認められた。雄の腎臓の近位尿細管上皮には硝子滴がエオシン好性の小滴として観察され、多くの例では少数のネフロンにのみ認められる軽度な所見であったが、概ね 1/3 程度のネフロンに、しかも上皮細胞当たりの数および大きさも増加する傾向にある中等度変化例も認められた。この中等度例は対照群で 1 匹、40 および 200 mg/kg 群においてもそれぞれ 1 および 2 匹であったのに対して、1000 mg/kg 群では 5 匹全例が中等度で、対照群と比較し有意差が認められた。胸腺では、軽度な皮質の萎縮が 2 匹に認められた。回復期間終了時屠殺動物では、このような変化は認められず、回復していた。また、雌では被験物質に起因する変化は認められなかった。

被験物質の投与とは無関係に、対照群にのみ、あるいは対照群と被験物質投与群に共通して少数に、肺の血管周囲性好中球浸潤および泡沫細胞集簇、心臓の心筋変性・線維化、肝臓の巣状壊死および微小肉芽腫、腎臓の好塩基性尿細管、孤立性嚢胞および線維化（いずれも片側性）並びに前立腺の間質リンパ球浸潤が少数に認められた。また、脾臓の髄外造血および褐色色素沈着は対照群および 1000 mg/kg 群の全例に認められたが、変化の程度において差は認められなかった。腎臓の硝子円柱が、雄で 40 および 1000 mg/kg 群並びに同群の回復群で各 1 匹に認められたが、片側性の変化で、発現に用量相関性も認められず、また、下垂体のラトケ嚢遺残が 1000 mg/kg 群の雌の 1 匹に認められたが、先天性の変化であり、これらはいずれも自然発生病変と判断した。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物に及ぼす影響 (Table 9)

(1) 性周期検査

群分けの翌日から交配前までにおいて、全例が 4～5.5 日の性周期を示し、被験物質投与群に有意な変化は認められなかった。

(2) 交尾率および受胎率

交尾不成立および妊娠不成立の例は認められず、交尾成立までに要する日数、交尾率および受胎率にも有意な変化は認められなかった。

(3) 黄体数、着床数および着床率

黄体数、着床数および着床率に有意な変化は認められなかった。

(4) 出産率および妊娠期間

出産率および妊娠期間に有意な変化は認められなかった。

(5) 分娩および哺育状態

分娩および哺育状態に異常は認められなかった。

2) 新生児に及ぼす影響 (Table 10)

(1) 生存性および体重

一腹当たりの総出産児数、分娩率、哺育 0 日および 4 日の新生児数および体重、出生率、性比並びに哺育 4 日の生存率に有意な変化は認められず、新生児の一般状態にも異常は認められなかった。

(2) 外表検査

対照群、40, 200 および 1000 mg/kg 群で、それぞれ 192, 174, 185 および 170 匹の児動物を検査した結果、外表に異常は認められなかった。

考察

1. 反復投与毒性について

一般状態の変化について、1000 mg/kg 群で雌雄に、投与 1 日の投与後、眼瞼下垂を伴った軽度自発運動低下が認められ、本物質の急性毒性的影響が発現したものと考えられる。このような症状は、殆どの例で投与 2 日以降は認められなかった。同群の雌雄に認められた流涎については、投与直後の変化で、詳細な臨床観察や機能検査で神経毒性を示唆する変化が認められていないことから、被験物質の毒性影響ではなく、投与液に対する忌避反応と解せられる。

体重について、1000 mg/kg 群で、雌の交配前投与期間の体重増加量に低値が認められ、同群の雄および雌のサテライト群の体重も対照群を僅かに下回って推移する傾向にあり、被験物質の投与による軽度な影響が認められた。また、1000 mg/kg 群の雄の投

与 1 日の摂餌量に低値が認められた。

器官に対する影響については、肝臓、胸腺および腎臓等に変化が認められた。

1000 mg/kg 群で雄に肝臓の相対重量の高値が認められた。関連する変化として、病理組織学検査で、肝臓に小葉中心性肝細胞肥大が認められ、小葉中心性に肝細胞の脂肪変性を伴う例もみられ、肝臓に対する影響が確認された。

血液生化学検査で、200 mg/kg 以上の群の雄に認められた LDH の高値も肝臓に対する影響と関連する所見と考えられる。雌には肝臓重量の有意な変化や病理組織学的変化は認められなかったが、1000 mg/kg 群の雌雄に認められた γ -GTP の高値傾向も、肝臓に対する影響と関連する変化である可能性が考えられる。

また、200 mg/kg 以上の群の雌に認められた血清カルシウムの低値（200 mg/kg 群：9.7 mg/dL, 1000 mg/kg 群：9.5 mg/dL）についても、その個体値は両群とも 5 例中 3 例が当研究所の背景データにおける正常範囲（9.6～11.7 mg/dL）を下回り、被験物質の投与による軽度な毒性影響を示す変化と考えられる。

被験物質投与各群の雄および 200 mg/kg 以上の群の雌で、血清 ALT の低値が認められた。雄は対照群の 36 IU/L に対して 40, 200 および 1000 mg/kg 群でそれぞれ 26, 19 および 13 IU/L, 雌は対照群の 62 IU/L に対して、48, 27 および 16 IU/L と、雌雄とも用量相関的な変化傾向を示し、しかも、200 mg/kg 以上の群の雌雄の個体値は、いずれも背景データの正常範囲（雄 26～48 IU/L, 雌 42～87 IU/L）を下回り、被験物質の投与による変化と考えられる。

本物質による ALT 低下のメカニズムは不明であるが、肝細胞の障害等のマーカーとしての増加性の変化とは異なり、減少性の変化であることから、毒性学的意義はないものと考えられる。

腎臓に対する影響について、1000 mg/kg 群の雄で病理組織学的に近位尿細管上皮の硝子滴の増加が認められ、被験物質の投与による変化と考えられた。硝子滴は尿細管上皮における蛋白の再吸収像で、雄ラットでは対照群にも認められ、糸球体からのタンパクの漏出が増加した場合等に発現することが知られている¹⁾。本試験で認められた硝子滴は、これの過剰沈着に伴う上皮細胞の傷害やその再生像と考えられる変化を伴っておらず、硝子滴の増加の程度は比較的軽度なものであった。

回復群の雄で腎臓相対重量の高値が認められたが、病理組織学検査で被験物質に起因

する変化は認められず、また、投与期間終了時屠殺動物では腎臓重量に変化が認められていないことから、偶発的な変化と判断された。

雄の尿検査で 1000 mg/kg 群に認められた尿比重の高値について、尿量の減少や尿中蛋白濃度の増加等、関連する変化を伴っていないことから、その毒性学的意義を明らかにすることは困難であったが、変化は軽度なものであった。

1000 mg/kg 群で雄に胸腺の絶対重量の低値が認められ、胸腺の病理組織学検査では、皮質の軽度萎縮例が認められた。この胸腺の絶対重量の低値は、胸腺皮質の萎縮例のほかに、最終体重がやや低値であったことによるものと考えられる。

1000 mg/kg 群で雄に認められた心臓の絶対および相対重量の低値については、病理組織学検査で変化が認められなかったことから、心臓に対する毒性影響を示すものではなく、同群の体重が低値傾向にあったことに伴う二次的な変化と判断された。

このような投与期間中あるいは投与期間終了時に認められた変化は回復群では、雄の ALT に有意差が残るものの変化の程度は軽減し、その他の変化はいずれも回復していた。したがって、本被験物質の毒性変化は可逆的と判断された。また、遅発的な毒性影響を示唆する変化も認められなかった。

以上の結果から、40 mg/kg 群では毒性影響は認められなかった。200 mg/kg 群では、血液生化学検査で、雄に LDH の高値、雌にカルシウムの低値が認められた。1000 mg/kg 群では、雌雄に眼瞼下垂を伴った自発運動低下、体重増加の抑制傾向、血清 γ -GTP の高値傾向、さらに雄に一過性の摂餌量の低値、肝臓における相対重量の高値および小葉中心性肝細胞肥大、胸腺における絶対重量低値および皮質の萎縮、腎臓の近位尿細管上皮硝子滴の増加並びに尿比重の高値が認められた。

血液生化学検査背景値(15～16 週齢、投与期間終了時)

項目	性	n	平均	Mean-2S.D.	Mean+2S.D.
カルシウム(mg/dL)	雌	61	10.6	9.6	11.7
ALT(IU/L)	雄	65	37	26	48
ALT(IU/L)	雌	63	64	42	87

2．生殖発生毒性について

雌雄親動物の生殖能に対する影響について、観察した各指標とも対照群と比べて有意な変化は認められず、雌雄の生殖器官にも病理学的変化は認められなかった。

児動物に対しては、発生に関する各指標において被験物質の投与による影響は認められなかった。

以上の結果から、2-メルカプトベンゾチアゾールの反復投与における雄親動物の NOEL は、40 mg/kg 群で毒性学的意義はないと考えられる ALT の低値が認められたことから、40 mg/kg/day 未満、NOAEL は 200 mg/kg 群で LDH の高値が認められたことから、40 mg/kg/day、雌親動物の NOEL 並びに NOAEL は、200 mg/kg 群で ALT およびカルシウムの低値が認められたことから、いずれも 40 mg/kg/day と推定された。また、生殖発生毒性に関する NOEL 並びに NOAEL については、雌雄親動物の生殖能および児動物の発生に対して変化は認められなかったことから、いずれも 1000 mg/kg/day と推定された。

文献

1) Greaves P : Urinary system. Kidney, Hyaline droplets, *In* “Histopathology of preclinical toxicity studies. 2nd. ed” P. Greaves editor, Amsterdam, Elsevier(2000) pp.575-579.

本報告書は、平成 19 年度ハザードデータ評価委員会（独立行政法人製品評価技術基盤機構）で評価後、修正・加筆された。

連絡先

(財) 畜産生物科学安全研究所

〒229-1132 神奈川県相模原市橋本台 3-7-11

Tel 042-762-2775 Fax 042-762-7979

Correspondence

Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology

3-7-11 Hashimotodai, Sagamihara-shi, Kanagawa, 229-1132, Japan

Tel +81-42-762-2775 Fax +81-42-762-7979

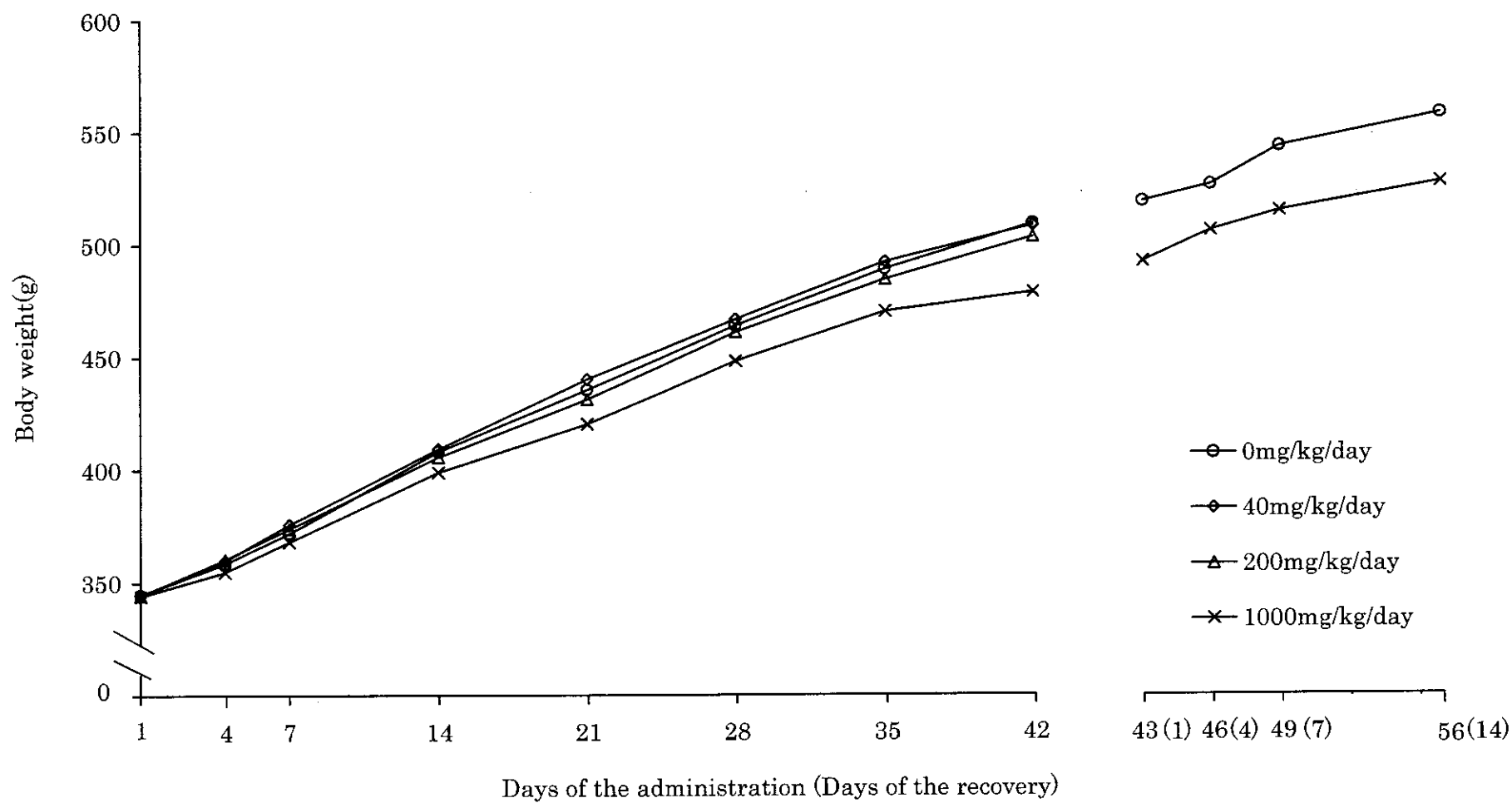


Fig. 1 Body weight changes of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

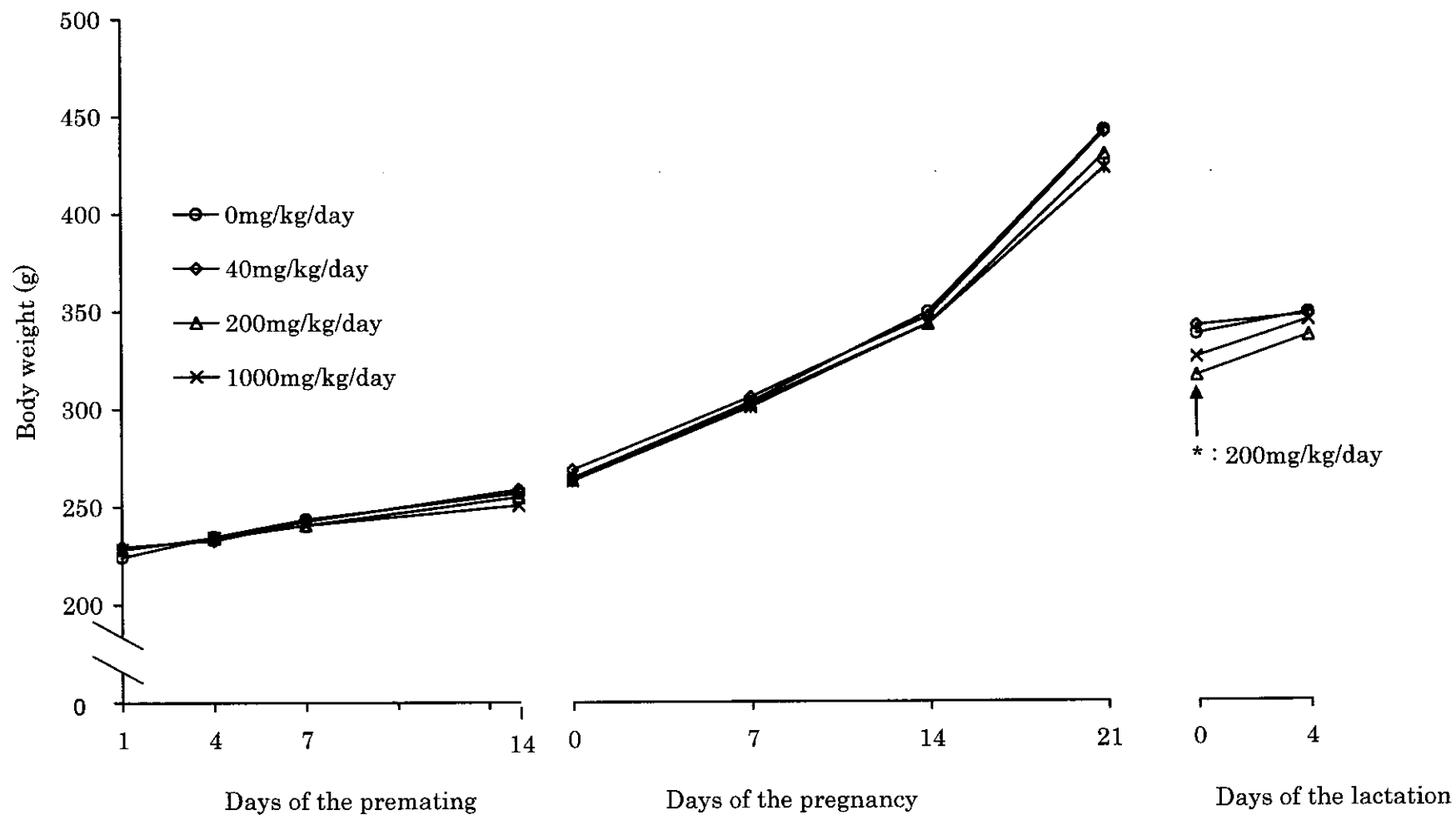


Fig. 2-1 Body weight changes of female rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Significantly different from control (* $p < 0.05$).

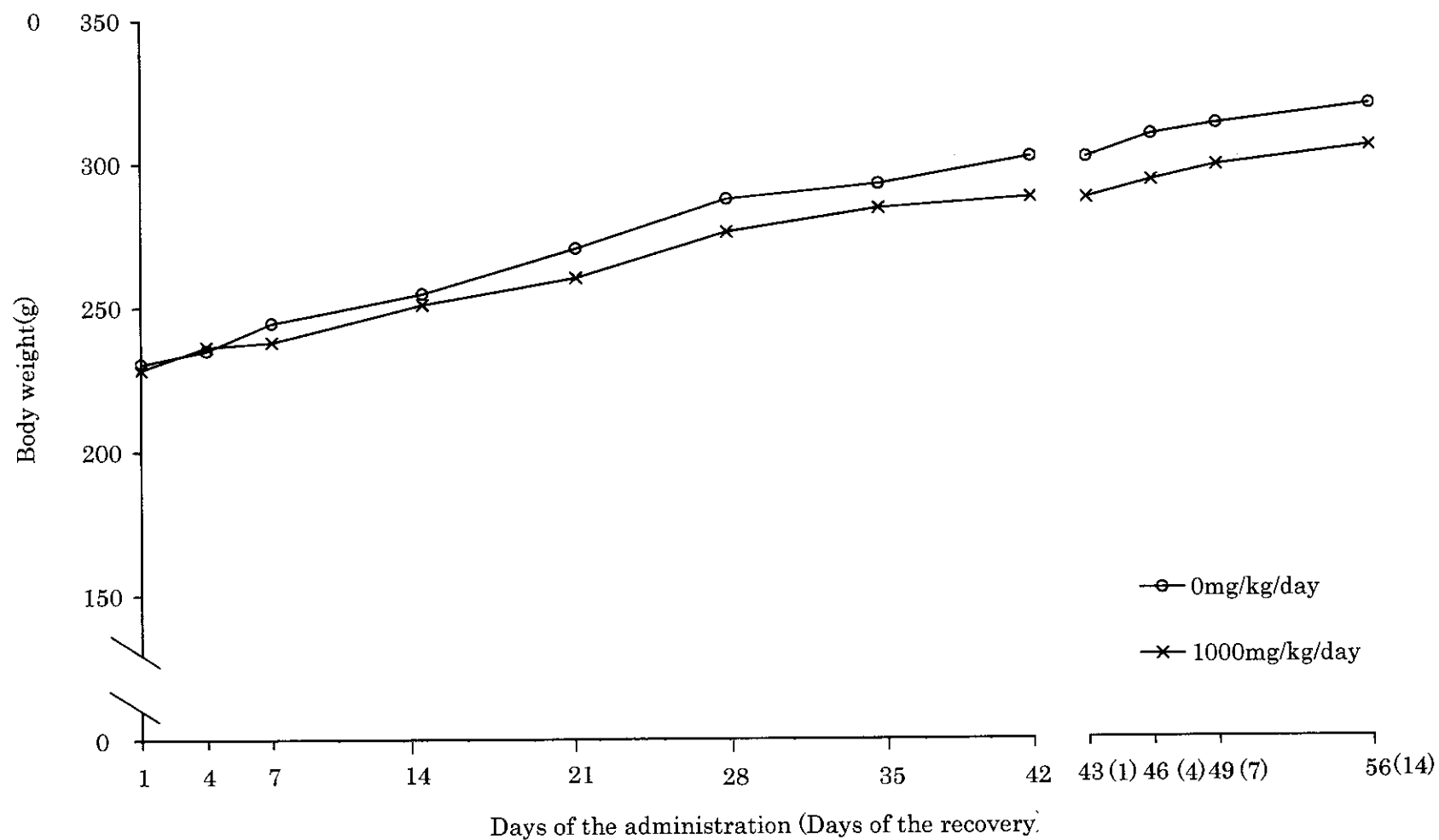


Fig. 2-2 Body weight changes of female rats of the satellite group treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

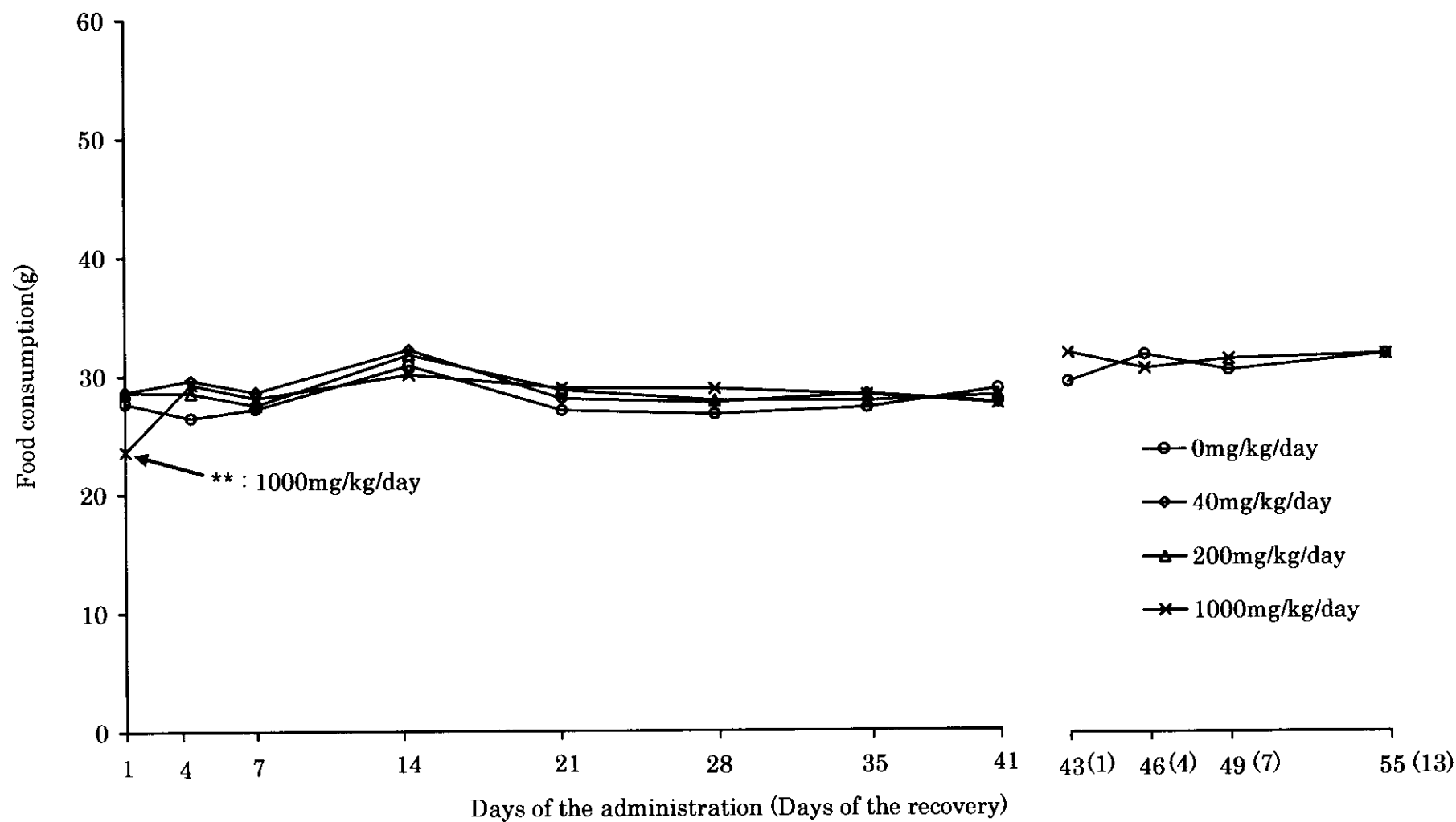


Fig.3 Food consumption changes of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Significantly different from control (** : $p < 0.01$)

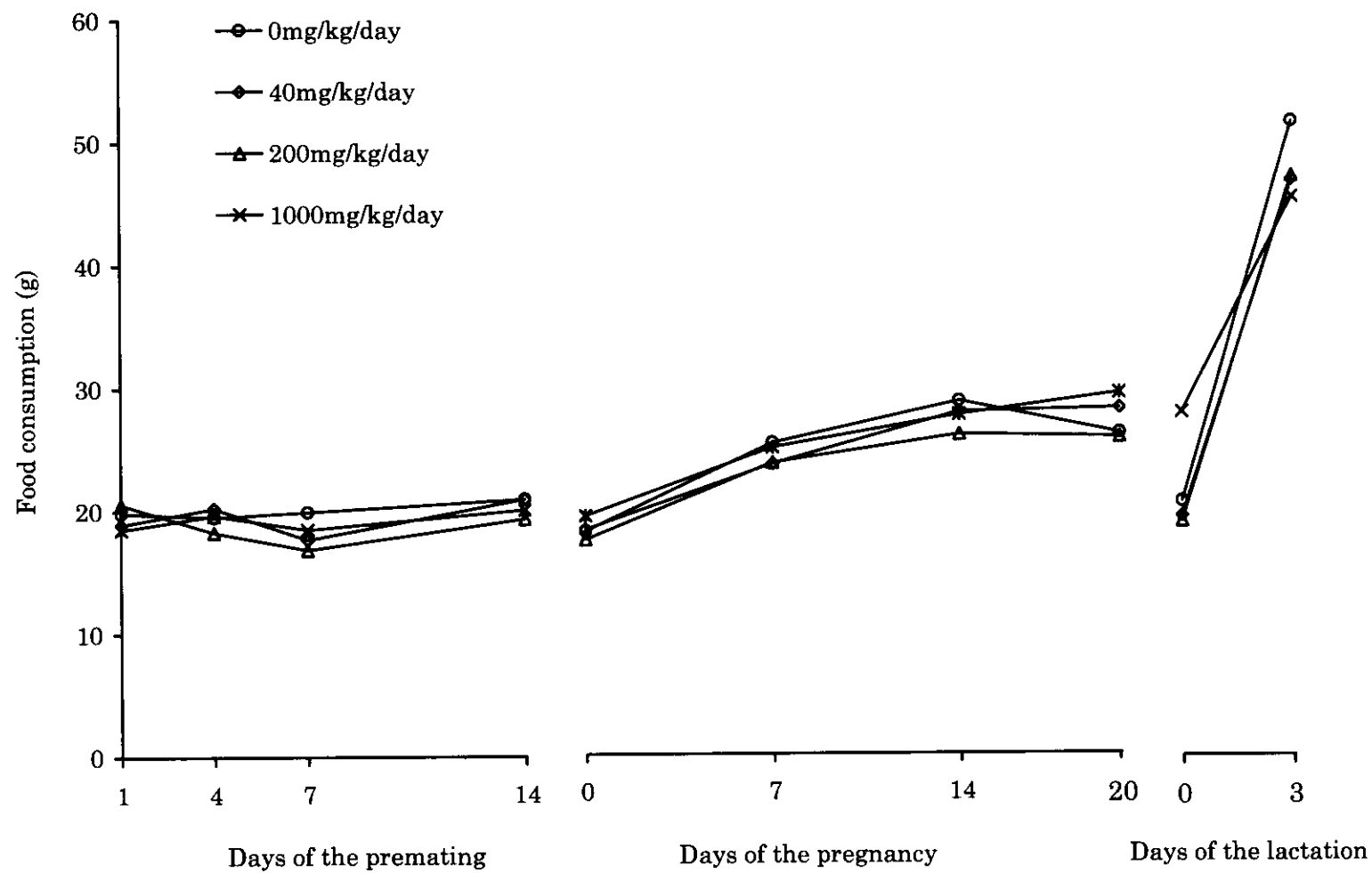


Fig. 4-1 Food consumption changes of female rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

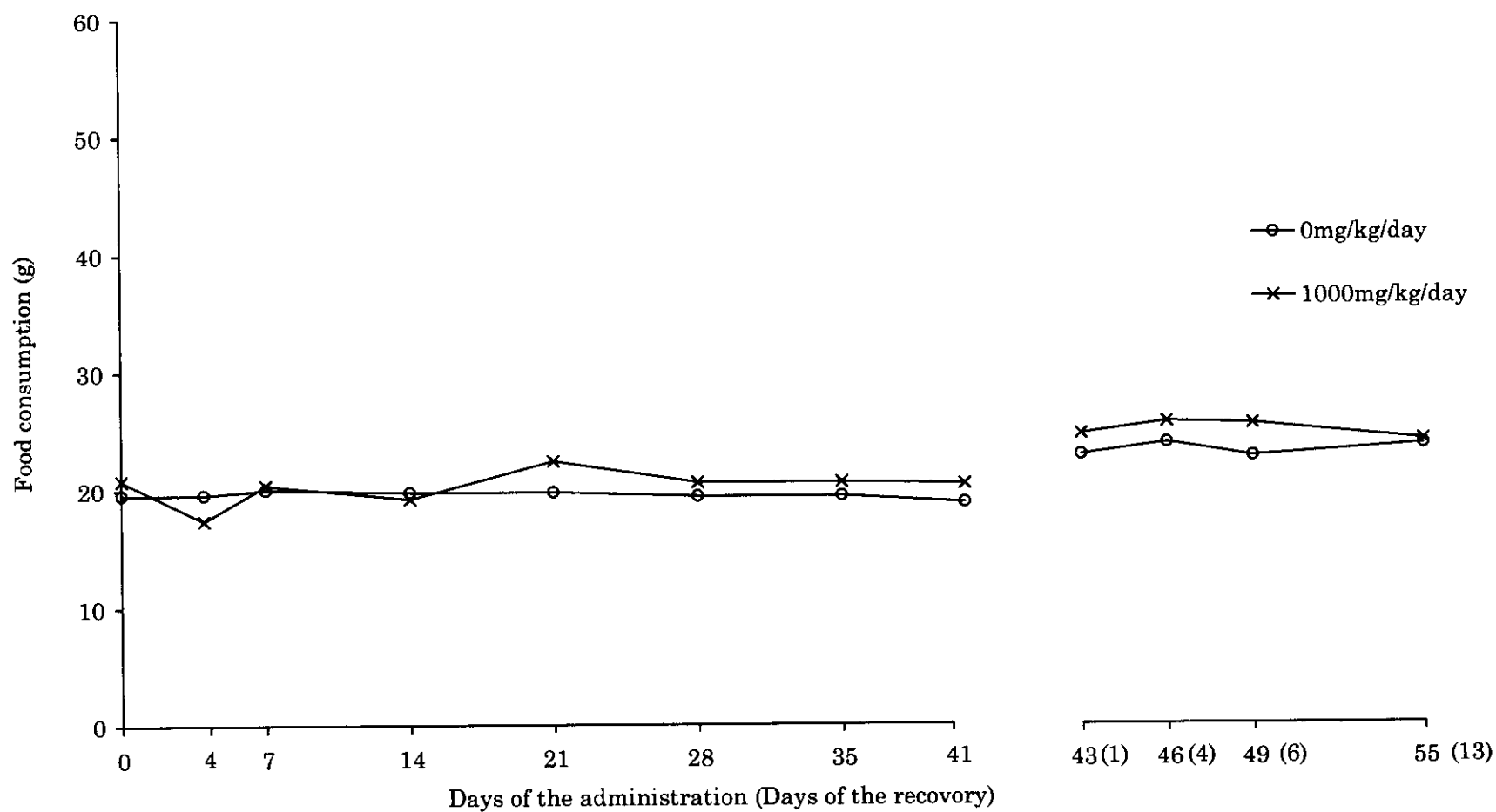


Fig. 4-2 Food consumption changes of female rats of the satellite group treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Table 1 Clinical signs of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions (Clinical signs)	Grade	Dose (mg/kg/day) No. of animals	In the administration period				In the recovery period	
			0	40	200	1000	0	1000
			12	12	12	12	5	5
Decrease in locomotor activity	-		12	12	12	5	5	5
	+		0	0	0	7 **	0	0
Ptosis	-		12	12	12	5	5	5
	+		0	0	0	7 **	0	0
Salivation	-		12	12	12	4	5	5
	+		0	0	0	8 **	0	0

- : Negative. + : Slight.

Significantly different from control (**p<0.01).

Table 2-1 Clinical signs of female rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions (Clinical signs)	Grade	Dose (mg/kg/day) No. of animals	In the administration period			
			0 12	40 12	200 12	1000 12
Decrease in locomotor activity	-		12	12	12	7
	+		0	0	0	5 **
Ptosis	-		12	12	12	7
	+		0	0	0	5 **
Salivation	-		12	12	12	0
	+		0	0	0	12 **

- : Negative. + : Slight.

Significantly different from control (**p<0.01).

Table 2-2 Clinical signs of female rats of the satellite group treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

General conditions (Clinical signs)	Grade	Dose (mg/kg/day) No. of animals	In the administration period		In the recovery period	
			0	1000	0	1000
			5	5	5	5
Decrease in locomotor activity	-		5	3	5	5
	+		0	2	0	0
Ptosis	-		5	3	5	5
	+		0	2	0	0
Salivation	-		5	0	5	5
	+		0	5	0	0

- : Negative. + : Slight.

Table 3-1 Urinary findings of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	40	200	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Color PY	5	5	5	5	5	5
Cloudy -	5	5	5	5	5	5
(mL/18hr)						
Volume ^{a)} (mL/18hr)	10.8 ± 3.7	8.6 ± 3.9	11.8 ± 5.3	12.2 ± 2.6	11.3 ± 2.1	10.6 ± 1.7
Specific gravity ^{a)}	1.059 ± 0.011	1.066 ± 0.012	1.064 ± 0.013	1.090 ± 0.014**	1.063 ± 0.008	1.065 ± 0.006
pH	6.5					
	7.0			1		
	7.5					
	8.0		3	1		2
	8.5	5	2	3	5	3
Protein -						1
	+	2	1	1	2	3
	++	2	3	4	3	1
	++	1	1			
Glucose -	5	5	5	5	5	5
Occult blood -	5	5	5	5	5	5

a) : Mean ± S.D. Significantly different from control (** p<0.01) .

Color : C(colorless), PY(pale yellow), Y(yellow), PB(pale brown).

Cloudy : - (negligible).

Protein : - (negligible), ± (15~30mg/dL), + (30mg/dL), ++ (100mg/dL).

Glucose : - (negligible), ± (0.1g/dL).

Occult blood : - (negligible), ± (trace).

Table 3-2 Urinary findings of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole
in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
	0	40	200	1000	0	1000
No. of animals	5	5	5	5	5	5
Erythrocytes	-	5	5	5	5	5
	+					
Leukocytes	-	5	5	5	5	5
	+					
Crystals						
Mg	-	3	2	2	4	3
	+	2	1	2		1
	++		2	3		1
	+++			1	1	
Ca	-	5	5	5	5	5
Ams	-	5	5	5	5	5
Epithelial cells						
Sq	-	3	2	3	1	1
	+	2	3	2	4	4
R	-	5	5	5	5	5
S	-	5	5	5	5	5
Casts						
G	-	5	5	5	5	5
H	-	5	5	5	5	5
W	-	5	5	5	5	5
Fat globules	-	5	5	5	5	5

- : Not observed. + : A few in some fields. ++ : A few in all fields. +++ : Many in all fields.

Crystals

Mg(ammonium magnesium phosphate)

Ca(calcium carbonate)

Ams(amorphous)

Epithelial cells

Sq(squamous)

R(round)

S(spindle)

Casts

G(granule)

H(hyaline)

W(waxy)

Table 4 Hematological findings of rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

		At the end of administration period				At the end of recovery period	
Sex	Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000	0	1000
Male							
No. of animals		5	5	5	5	5	5
RBC	(10 ⁶ /μ L)	812 ± 44	850 ± 36	832 ± 30	825 ± 50	865 ± 24	857 ± 23
Hemoglobin	(g/dL)	14.8 ± 0.4	15.3 ± 0.5	15.1 ± 0.6	14.6 ± 0.4	15.6 ± 0.5	15.4 ± 0.7
Hematocrit	(%)	44.8 ± 1.2	45.9 ± 1.4	45.2 ± 1.4	43.9 ± 0.7	46.8 ± 1.5	46.0 ± 1.8
MCV	(fL)	55 ± 2	54 ± 2	54 ± 1	54 ± 3	54 ± 2	54 ± 2
MCH	(pg)	18.3 ± 0.7	18.0 ± 0.4	18.1 ± 0.4	17.7 ± 0.8	18.0 ± 0.7	18.0 ± 0.7
MCHC	(%)	33.0 ± 0.3	33.3 ± 0.3	33.3 ± 0.3	33.2 ± 0.6	33.3 ± 0.3	33.5 ± 0.4
Reticulocyte	(‰)	19.7 ± 1.7	19.9 ± 3.2	22.2 ± 3.9	24.1 ± 4.0	21.1 ± 2.8	20.0 ± 4.4
Platelet	(10 ³ /μ L)	129 ± 11	121 ± 15	137 ± 23	133 ± 10	110 ± 10	124 ± 13
PT	(sec)	12.8 ± 0.5	12.7 ± 0.3	13.2 ± 0.5	13.1 ± 0.4	13.5 ± 0.5	13.4 ± 0.4
APTT	(sec)	22.8 ± 1.2	23.0 ± 2.4	23.0 ± 2.0	21.7 ± 1.1	21.3 ± 1.3	20.9 ± 1.1
WBC	(10 ³ /μ L)	61 ± 18	71 ± 20	65 ± 20	63 ± 16	88 ± 10	80 ± 23
Differential leukocyte counts (%)							
Basophil		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil		1.2 ± 0.4	0.9 ± 0.3	1.3 ± 0.7	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.3	1.0 ± 0.5
Neutrophil							
Segmented		15.3 ± 4.2	15.0 ± 3.4	17.3 ± 3.4	15.3 ± 3.1	24.0 ± 6.6	18.8 ± 5.6
Lymphocyte		80.5 ± 5.2	81.6 ± 3.8	79.0 ± 4.3	81.0 ± 3.0	72.1 ± 6.9	77.0 ± 6.2
Monocyte		3.0 ± 1.0	2.6 ± 1.0	2.4 ± 0.6	2.7 ± 0.7	2.9 ± 0.7	3.2 ± 1.0
Female							
No. of animals		5	5	5	5	5	5
RBC	(10 ⁶ /μ L)	668 ± 16	670 ± 62	678 ± 11	671 ± 34	815 ± 34	784 ± 56
Hemoglobin	(g/dL)	12.7 ± 0.3	13.0 ± 0.8	12.9 ± 0.4	12.9 ± 0.5	15.1 ± 0.7	15.0 ± 0.5
Hematocrit	(%)	39.0 ± 1.0	40.0 ± 1.9	39.6 ± 1.5	40.4 ± 1.2	44.5 ± 2.1	44.5 ± 0.8
MCV	(fL)	58 ± 1	60 ± 3	59 ± 2	60 ± 2	55 ± 1	57 ± 3
MCH	(pg)	19.0 ± 0.3	19.5 ± 0.8	19.0 ± 0.5	19.3 ± 0.4	18.5 ± 0.4	19.2 ± 0.9
MCHC	(%)	32.6 ± 0.3	32.5 ± 0.5	32.6 ± 0.3	32.0 ± 0.6	33.9 ± 0.3	33.7 ± 0.5
Reticulocyte	(‰)	55.0 ± 11.6	57.0 ± 24.8	51.3 ± 9.3	73.1 ± 33.0	21.0 ± 2.2	24.8 ± 4.1
Platelet	(10 ³ /μ L)	160 ± 36	133 ± 29	133 ± 6	146 ± 15	122 ± 17	114 ± 17
PT	(sec)	13.2 ± 0.5	13.3 ± 0.3	13.2 ± 0.3	13.5 ± 0.3	13.8 ± 0.5	13.6 ± 0.3
APTT	(sec)	19.3 ± 1.1	20.0 ± 2.3	19.3 ± 1.0	19.8 ± 2.2	18.0 ± 1.7	18.0 ± 1.6
WBC	(10 ³ /μ L)	66 ± 24	56 ± 8	63 ± 12	59 ± 29	40 ± 8	34 ± 9
Differential leukocyte counts (%)							
Basophil		0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Eosinophil		0.7 ± 0.3	1.2 ± 1.2	1.0 ± 0.6	1.0 ± 0.3	1.5 ± 0.4	1.7 ± 0.6
Neutrophil							
Segmented		27.5 ± 5.3	31.2 ± 4.4	28.0 ± 4.4	28.7 ± 2.7	22.8 ± 4.6	20.0 ± 5.3
Lymphocyte		67.9 ± 5.2	64.3 ± 3.7	66.9 ± 3.8	67.3 ± 2.3	73.2 ± 4.8	76.3 ± 5.0
Monocyte		3.9 ± 0.9	3.3 ± 1.5	4.1 ± 0.8	3.0 ± 1.1	2.4 ± 0.9	2.0 ± 0.4

Each value is expressed as mean ± S.D.

Table 5 Blood biochemical findings of rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Sex	Dose (mg/kg/day)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
		0	40	200	1000	0	1000
Male							
No. of animals		5	5	5	5	5	5
LDH (IU/L)		147 ± 37	234 ± 80	252 ± 70 *	256 ± 53*	266 ± 101	242 ± 58
AST (IU/L)		59 ± 5	66 ± 6	70 ± 7	71 ± 18	73 ± 11	68 ± 8
ALT (IU/L)		36 ± 3	26 ± 4 **	19 ± 4 **	13 ± 5 **	41 ± 8	31 ± 5 *
ALP (IU/L)		482 ± 183	424 ± 111	382 ± 78	435 ± 29	343 ± 43	293 ± 54
γ-GTP (IU/L)		0.64 ± 0.24	0.58 ± 0.24	0.85 ± 0.36	1.46 ± 0.83	0.43 ± 0.08	0.86 ± 0.27 *
T.protein (g/dL)		5.68 ± 0.16	5.74 ± 0.28	5.72 ± 0.27	5.77 ± 0.22	5.88 ± 0.17	5.80 ± 0.14
Albumin (g/dL)		2.76 ± 0.19	2.71 ± 0.24	2.72 ± 0.37	2.79 ± 0.12	2.92 ± 0.14	2.80 ± 0.10
A/G ratio		0.96 ± 0.11	0.90 ± 0.08	0.91 ± 0.16	0.93 ± 0.02	0.98 ± 0.07	0.93 ± 0.07
T.cholesterol (mg/dL)		53 ± 6	53 ± 10	65 ± 12	60 ± 17	59 ± 14	72 ± 21
Triglyceride (mg/dL)		59 ± 21	45 ± 17	39 ± 23	37 ± 16	54 ± 28	46 ± 13
Glucose (mg/dL)		149 ± 16	150 ± 14	146 ± 12	142 ± 13	153 ± 11	151 ± 14
BUN (mg/dL)		14.0 ± 1.5	12.0 ± 1.6	12.5 ± 3.2	12.5 ± 1.6	13.7 ± 1.3	14.7 ± 1.2
Creatinine (mg/dL)		0.40 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.48 ± 0.06	0.42 ± 0.08
T.bilirubin (mg/dL)		0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.04	0.27 ± 0.03	0.23 ± 0.03 *
Ca (mg/dL)		9.6 ± 0.3	9.5 ± 0.3	9.5 ± 0.4	9.4 ± 0.3	9.9 ± 0.2	9.7 ± 0.2
I.phosphorus (mg/dL)		7.1 ± 0.6	6.9 ± 0.4	6.9 ± 0.2	6.7 ± 0.7	6.8 ± 0.3	6.7 ± 0.3
Na (mEq/L)		145 ± 1	146 ± 1	145 ± 1	146 ± 1	146 ± 2	146 ± 2
K (mEq/L)		4.89 ± 0.22	4.47 ± 0.23 *	4.87 ± 0.18	4.85 ± 0.22	4.83 ± 0.10	4.91 ± 0.38
Cl (mEq/L)		106 ± 2	105 ± 1	104 ± 1	106 ± 2	105 ± 2	106 ± 2
Female							
No. of animals		5	5	5	5	5	5
LDH (IU/L)		210 ± 66	216 ± 79	199 ± 47	306 ± 83	288 ± 117	214 ± 54
AST (IU/L)		79 ± 11	70 ± 11	76 ± 6	79 ± 8	69 ± 13	70 ± 11
ALT (IU/L)		62 ± 10	48 ± 5	27 ± 8 *	16 ± 2 **	32 ± 5	26 ± 4
ALP (IU/L)		402 ± 164	441 ± 189	383 ± 91	388 ± 96	137 ± 23	154 ± 44
γ-GTP (IU/L)		0.70 ± 0.33	0.86 ± 0.11	0.98 ± 0.23	1.38 ± 0.39 **	0.98 ± 0.45	1.14 ± 0.37
T.protein (g/dL)		6.29 ± 0.14	6.36 ± 0.40	5.97 ± 0.36	5.93 ± 0.23	6.51 ± 0.23	6.35 ± 0.17
Albumin (g/dL)		3.49 ± 0.22	3.36 ± 0.41	3.19 ± 0.40	3.24 ± 0.21	3.72 ± 0.16	3.49 ± 0.21
A/G ratio		1.25 ± 0.13	1.12 ± 0.14	1.15 ± 0.16	1.21 ± 0.09	1.33 ± 0.04	1.23 ± 0.13
T.cholesterol (mg/dL)		71 ± 12	67 ± 9	82 ± 18	78 ± 18	76 ± 5	79 ± 8
Triglyceride (mg/dL)		151 ± 128	125 ± 79	82 ± 45	88 ± 45	29 ± 11	18 ± 5
Glucose (mg/dL)		145 ± 7	150 ± 12	139 ± 5	135 ± 10	136 ± 9	128 ± 11
BUN (mg/dL)		21.4 ± 2.3	20.1 ± 4.7	18.5 ± 5.4	18.0 ± 2.5	15.9 ± 2.1	16.2 ± 0.7
Creatinine (mg/dL)		0.46 ± 0.04	0.50 ± 0.15	0.49 ± 0.07	0.47 ± 0.05	0.47 ± 0.07	0.47 ± 0.04
T.bilirubin (mg/dL)		0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.21 ± 0.02	0.18 ± 0.03
Ca (mg/dL)		10.4 ± 0.2	10.2 ± 0.4	9.7 ± 0.6 *	9.5 ± 0.3 **	10.1 ± 0.2	9.7 ± 0.5
I.phosphorus (mg/dL)		8.9 ± 0.9	8.8 ± 1.1	8.4 ± 1.5	8.1 ± 0.8	5.6 ± 0.4	5.7 ± 0.8
Na (mEq/L)		144 ± 2	144 ± 1	144 ± 2	144 ± 1	147 ± 1	146 ± 1
K (mEq/L)		5.01 ± 0.47	4.94 ± 0.31	4.79 ± 0.35	5.51 ± 0.33	4.80 ± 0.23	4.66 ± 0.26
Cl (mEq/L)		101 ± 2	101 ± 1	102 ± 2	102 ± 1	108 ± 1	109 ± 2

Each value is expressed as mean ± S.D.

Significantly different from control (* p<0.05, ** p<0.01).

Table 6 Absolute and relative organ weights of rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Sex	Item	Dose (mg/kg/day)	At the end of administration period				At the end of recovery period	
			0	40	200	1000	0	1000
Male	No. of animals available		5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)		461 ± 25	457 ± 19	457 ± 16	433 ± 12	507 ± 43	478 ± 29
	Absolute weight							
	Brain(g)		2.05 ± 0.08	1.97 ± 0.06	2.04 ± 0.09	2.01 ± 0.03	2.00 ± 0.05	2.02 ± 0.08
	Liver(g)		11.78 ± 1.06	11.64 ± 0.80	12.44 ± 1.14	13.13 ± 0.90	12.14 ± 0.94	12.11 ± 1.47
	Kidneys(g)		3.03 ± 0.15	3.04 ± 0.44	3.28 ± 0.55	3.40 ± 0.27	2.97 ± 0.20	3.34 ± 0.34
	Spleen(g)		0.72 ± 0.13	0.74 ± 0.06	0.72 ± 0.12	0.69 ± 0.07	0.85 ± 0.10	0.71 ± 0.13
	Heart(g)		1.40 ± 0.04	1.35 ± 0.09	1.32 ± 0.08	1.20 ± 0.03**	1.40 ± 0.13	1.32 ± 0.12
	Thymus(g)		0.33 ± 0.05	0.34 ± 0.58	0.30 ± 0.06	0.22 ± 0.07*	0.36 ± 0.10	0.30 ± 0.06
	Adrenal(mg)		68.7 ± 6.7	63.8 ± 13.3	64.4 ± 5.9	55.0 ± 7.3	64.5 ± 12.7	61.6 ± 7.5
	Testes(g)		3.43 ± 0.28	3.40 ± 0.25	3.34 ± 0.19	3.43 ± 0.36	3.58 ± 0.40	3.28 ± 0.25
	Epididymides(g)		1.30 ± 0.11	1.32 ± 0.12	1.41 ± 0.13	1.31 ± 0.10	1.44 ± 0.07	1.36 ± 0.07
	Relative weight							
	Brain(g%)		0.45 ± 0.03	0.43 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.40 ± 0.03	0.42 ± 0.01
	Liver(g%)		2.55 ± 0.16	2.55 ± 0.17	2.72 ± 0.16	3.03 ± 0.16**	2.40 ± 0.13	2.53 ± 0.22
	Kidneys(g%)		0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.10	0.71 ± 0.10	0.78 ± 0.06	0.59 ± 0.06	0.70 ± 0.07*
	Spleen(g%)		0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.15 ± 0.02
	Heart(g%)		0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.01*	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.02
	Thymus(g%)		0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02
	Adrenal(mg%)		14.9 ± 1.5	13.9 ± 2.8	14.1 ± 1.5	12.7 ± 1.8	12.7 ± 1.7	12.9 ± 1.4
	Testes(g%)		0.75 ± 0.08	0.75 ± 0.07	0.73 ± 0.05	0.79 ± 0.08	0.71 ± 0.09	0.69 ± 0.08
	Epididymides(g%)		0.28 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
Female	No. of animals available		5	5	5	5	5	5
	Body weight (g)		321 ± 24	318 ± 11	319 ± 7	321 ± 14	292 ± 13	277 ± 15
	Absolute weight							
	Brain(g)		1.90 ± 0.07	1.86 ± 0.04	1.88 ± 0.03	1.89 ± 0.08	1.90 ± 0.06	1.92 ± 0.07
	Liver(g)		10.97 ± 1.16	10.66 ± 0.87	10.77 ± 0.62	11.38 ± 0.96	7.20 ± 0.47	7.02 ± 0.62
	Kidneys(g)		1.96 ± 0.20	1.95 ± 0.11	1.97 ± 0.13	2.09 ± 0.17	1.90 ± 0.09	1.78 ± 0.09
	Spleen(g)		0.65 ± 0.05	0.62 ± 0.08	0.66 ± 0.10	0.69 ± 0.15	0.53 ± 0.06	0.51 ± 0.07
	Heart(g)		1.00 ± 0.12	1.01 ± 0.09	1.00 ± 0.07	1.01 ± 0.06	0.89 ± 0.05	0.87 ± 0.03
	Thymus(g)		0.23 ± 0.06	0.27 ± 0.09	0.27 ± 0.03	0.21 ± 0.06	0.30 ± 0.05	0.30 ± 0.10
	Adrenal(mg)		74.2 ± 6.4	72.5 ± 8.1	77.9 ± 8.4	67.8 ± 7.4	70.7 ± 5.1	67.5 ± 7.7
	Relative weight							
	Brain(g%)		0.59 ± 0.05	0.59 ± 0.02	0.59 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.65 ± 0.04	0.69 ± 0.06
	Liver(g%)		3.41 ± 0.16	3.36 ± 0.24	3.38 ± 0.19	3.54 ± 0.16	2.47 ± 0.08	2.54 ± 0.17
	Kidneys(g%)		0.61 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.62 ± 0.04	0.65 ± 0.04	0.65 ± 0.05	0.64 ± 0.03
	Spleen(g%)		0.20 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.21 ± 0.04	0.21 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.03
	Heart(g%)		0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.02	0.32 ± 0.02
	Thymus(g%)		0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.11 ± 0.03
	Adrenal(mg%)		23.3 ± 3.1	22.8 ± 2.5	24.4 ± 2.3	21.1 ± 2.5	24.3 ± 1.9	24.5 ± 4.1

Each value is expressed as Mean ± S.D.

Significantly different from control (* p<0.05, ** p<0.01).

Table 7 Incidence of histopathological findings of male rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	Findings	Grade	Dose(mg/kg/day) No. of animals	At the end of administration period				At the end of recovery period	
				0	40	200	1000	0	1000
				5	5	5	5	5	5
Lung	: Accumulation, foam cell	-		4	#	#	5	#	#
		+		1	#	#	0	#	#
Heart	: Myocardial degeneration/fibrosis	-		2	#	#	5	#	#
		+		3	#	#	0	#	#
Liver	: Necrosis, focal	-		4	5	5	5	5	4
		+		1	0	0	0	0	1
	Microgranuloma	-		5	4	5	4	4	5
		+		0	1	0	1	1	0
	Hypertrophy, hepatocyte, centrilobular	-		5	5	5	2	5	5
		+		0	0	0	3	0	0
	Degeneration, fatty, hepatocyte, centrilobular	-		5	5	5	4	5	5
		+		0	0	0	1	0	0
Kidney	: Hyaline droplet, proximal tubular epithelium	-		1	2	0	0	0	0
		+		3	2	3	0	3	3
		++		1	1	2	5*	2	2
	Basophilic tubule, unilateral	-		4	4	5	4	4	4
		+		1	1	0	1	1	1
	Cast, hyaline, unilateral	-		5	4	5	4	5	4
		+		0	1	0	1	0	1
	Cyst, solitary, unilateral	-		5	5	5	5	5	4
		+		0	0	0	0	0	1
Thymus	: Atrophy, cortical	-		5	5	5	3	5	5
		+		0	0	0	2	0	0
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	-		0	#	#	0	#	#
		+		5	#	#	5	#	#
	Deposit, pigment, brown	-		0	#	#	0	#	#
		+		5	#	#	5	#	#
Prostate	: Cellular infiltration, lymphocyte interstitium	-		4	#	#	5	#	#
		+		1	#	#	0	#	#

- : Negative. + : Slight. ++ : Moderate. # : Not examined.

Significantly different from control (*p<0.05).

Table 8 Incidence of histopathological findings of female rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Organ	: Findings	Grade	At the end of administration period				At the end of recovery period		
			Dose (mg/kg/day)	0	40	200	1000	0	1000
			No. of animals	5	5	5	5	5	5
Lung	: Cellular infiltration, neutrophilic perivascular	-	4	#	#	5	#	#	
		+	1	#	#	0	#	#	
	Accumulation, foam cell	-	5	#	#	4	#	#	
		+	0	#	#	1	#	#	
Liver	: Microgranuloma	-	4	#	#	5	#	#	
		+	1	#	#	0	#	#	
	Necrosis, focal	-	4	#	#	5	#	#	
		+	1	#	#	0	#	#	
Kidney	: Basophilic tubule, unilateral	-	4	#	#	5	#	#	
		+	1	#	#	0	#	#	
	Cyst, solitary, unilateral	-	4	#	#	5	#	#	
		+	1	#	#	0	#	#	
	Fibrosis, unilateral	-	4	#	#	4	#	#	
		+	1	#	#	1	#	#	
Spleen	: Hematopoiesis, extramedullary	-	0	#	#	0	#	#	
		+	5	#	#	4	#	#	
		++	0	#	#	1	#	#	
	Deposit, pigment, brown	-	0	#	#	0	#	#	
		+	5	#	#	5	#	#	
	Pituitary	: Remnant, Rathke's pouch	-	5	#	#	4	#	#
+			0	#	#	1	#	#	

- : Negative. + : Slight. ++ : Moderate. # : Not examined.

Table 9 Reproduction results of rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose (mg/kg/day)	0			40			200			1000		
Estrous cycle (days, Mean \pm S.D.)	4.3	\pm 0.5	(0/17) ^a	4.1	\pm 0.3	(0/12) ^a	4.1	\pm 0.2	(0/12) ^a	4.0	\pm 0.1	(0/17) ^a
No. of pairs mated	12			12			12			12		
No. of pairs with successful copulation	12			12			12			12		
Copulation index (%)	100			100			100			100		
Pairing days until copulation (days, Mean \pm S.D.)	2.3	\pm 0.8		2.0	\pm 1.0		2.3	\pm 1.2		2.5	\pm 1.1	
No. of pregnant females	12			12			12			12		
Fertility index (%)	100			100			100			100		
No. of corpora lutea (Mean \pm S.D.)	18.1	\pm 1.7		16.7	\pm 1.4		16.9	\pm 1.6		16.4	\pm 2.0	
No. of implantation sites (Mean \pm S.D.)	17.0	\pm 1.5		15.5	\pm 2.0		15.9	\pm 1.7		15.4	\pm 1.6	
Implantation index (%; Mean \pm S.D.)	94.2	\pm 6.1		93.3	\pm 12.1		94.3	\pm 7.2		94.2	\pm 5.3	
No. of pregnant females with parturition	12			12			12			12		
Gestation length (days, Mean \pm S.D.)	22.3	\pm 0.5		22.3	\pm 0.5		22.6	\pm 0.5		22.6	\pm 0.5	
No. of pregnant females with live pups	12			12			12			12		
Gestation index (%)	100			100			100			100		
No. of pregnant females with live pups on day 4	12			12			12			12		

Estrous cycle : Mean days from metaestrus I (III) to next III.

a : (No. of females with abnormal estrus cycle/No. of females).

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

Fertility index = (No. of pregnant females/No. of pairs with successful copulation) \times 100.

Gestation index = (No. of females with live pups/No. of pregnant females) \times 100.

Table 10 Litter results of rats treated orally with 2-mercaptobenzothiazole in the combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test

Dose(mg/kg/day)	0	40	200	1000
No. of pups born	16.0 ± 1.8	14.5 ± 2.2	15.4 ± 1.9	14.2 ± 2.2
Delivery index (%)	93.6 ± 6.4	93.4 ± 5.5	96.8 ± 4.6	91.9 ± 10.4
No. of pups alive on day 0 of lactation				
Total	16.0 ± 1.8	14.3 ± 2.1	15.3 ± 2.1	13.9 ± 2.5
Male	8.3 ± 2.1	7.0 ± 2.0	6.9 ± 1.6	7.3 ± 2.6
Female	7.7 ± 1.7	7.3 ± 2.6	8.3 ± 1.5	6.7 ± 2.1
Live birth index (%)	100.0 ± 0.0	99.0 ± 3.6	98.8 ± 2.7	98.0 ± 3.7
Sex ratio(Male/Male + Female) of pups on day 0 of lactation	0.52±0.10(100/192)	0.50±0.14(85/174)	0.45±0.08(84/185)	0.52±0.15(88/170)
of live pups on day 0 of lactation	0.52±0.10(100/192)	0.50±0.14(84/172)	0.45±0.08(83/183)	0.52±0.15(87/167)
of live pups on day 4 of lactation	0.51±0.10(99/191)	0.50±0.14(84/172)	0.45±0.10(52/180)	0.52±0.15(86/166)
No. of pups alive on day 4 of lactation				
Total	15.9 ± 2.0	14.3 ± 2.1	15.0 ± 2.3	13.8 ± 2.4
Male	8.3 ± 2.3	7.0 ± 2.0	6.8 ± 1.8	7.2 ± 2.4
Female	7.7 ± 1.7	7.3 ± 2.6	8.2 ± 1.7	6.7 ± 2.1
Viability index (%)	99.3 ± 2.4	100.0 ± 0.0	98.2 ± 3.4	99.5 ± 1.6
Body weight of live pups (g) on day 0				
Male	6.8 ± 0.7	7.0 ± 0.6	7.0 ± 0.5	6.9 ± 0.5
Female	6.3 ± 0.8	6.7 ± 0.7	6.6 ± 0.4	6.5 ± 0.5
on day 4				
Male	11.0 ± 1.0	11.5 ± 1.2	10.9 ± 0.9	11.2 ± 1.2
Female	10.5 ± 0.9	11.1 ± 1.5	10.4 ± 1.0	10.6 ± 1.2

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 number of male pups/Total number of male and female pups).

Each value is expressed as Mean±S.D.