

Fig.1 Growth inhibition of CHL/IU cells treated with pentaerythritol

7. 実験群の設定

細胞増殖抑制試験の結果より、染色体異常試験で用いる被験物質の高濃度群を、連続処理、短時間処理とも1.4 mg/ml (10 mM相当)とし、それぞれ高濃度群の1/2の濃度を中濃度、1/4の濃度を低濃度とした。陽性対照物質として用いたマイトマイシンC(MC, 協和醗酵工業(株))およびシクロホスファミド(CPA, Sigma Chemical Co.)は、注射用水((株)大塚製薬工場)に溶解して調製した。それぞれ染色体異常を誘発することが知られている濃度を適用した。

8. 染色体標本作製法

培養終了の2時間前に、コルセミドを最終濃度が約0.1 µg/mlになるように培養液に加えた。染色体標本の作製は常法に従って行った。スライド標本は各シャーレにつき6枚作製した。作製した標本を3%ギムザ溶液で染色した。

9. 染色体分析

作製したスライド標本のうち、1つのディッシュから得られた異なるスライドを、4名の観察者がそれぞれ処理条件が分からないようにコード化した状態で分析した。染色体の分析は、日本環境変異原学会、哺乳動物試験(MMS)分科会¹⁾による分類法に基づいて行い、染色体型あるいは染色分体型のギャップ、切断、交換などの構造異常の有無と倍数性細胞 (polyploid) の有無について観察した。また構造異常については1群200個、倍数性細胞については1群800個の分裂中期細胞を分析した。

10. 記録と判定

無処理対照、陰性および陽性対照群と被験物質処理群についての分析結果は、観察した細胞数、構造異常の種類と数、倍数性細胞の数について集計し、各群の値を記録用紙に記入した。染色体異常を有する細胞の出現頻度について、フィッシャーのexact probability test法により、陰性対照群と被験物質処理群間および陰性対照群と陽性

対照群の有意差検定 ($p < 0.05$) を行った。被験物質の染色体異常誘発性についての判定は、石館ら²⁾の判定基準に従い、染色体異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性とした。

結果および考察

連続処理による染色体分析の結果をTable 1に示した。ベンタエリスリトールを加えて24時間および48時間連続処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

短時間処理による染色体分析の結果をTable 2に示した。

ベンタエリスリトールを加えてS9 mix存在下および非存在下で6時間処理したいずれの処理群においても、染色体の構造異常および倍数性細胞の誘発は認められなかった。

従って、ベンタエリスリトールは、上記の試験条件下で、試験管内のCHL/IU細胞に染色体異常を誘発しないと結論した。

文献

- 1) 日本環境変異原学会・哺乳動物試験分科会編, "化学物質による染色体異常アトラス," 朝倉書店, 1988.
- 2) 石館 基 監修, "〈改訂〉染色体異常試験データ集," エル・アイ・シー社, 1987.

連絡先

試験責任者: 田中憲徳
 試験担当者: 山影康次, 若栗 忍, 中川ゆづき,
 日下部博一, 橋本恵子
 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所
 〒257 神奈川県秦野市落合729-5
 Tel. 0463-82-4751 Fax 0463-82-9627

Correspondence

Authors: Noriho Tanaka (Study director)
 Kohji Yamakage, Shinobu Wakuri,
 Yuzuki Nakagawa, Hirokazu Kusakabe,
 Keiko Hashimoto
 Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center
 729-5 Ochiai, Hadano, Kanagawa, 257, Japan
 Tel. +81-463-82-4751 Fax +81-463-82-9627

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with pentaerythritol(PE)** without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁵⁾	
				gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾			200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.25		
Solvent	0	24	200	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0.63		
PE	0.4	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.13	-	-
PE	0.7	24	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.00	-	-
PE	1.4	24	200	1	0	1	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	-	-
MC	0.00005	24	200	9	55	99	1	2	1	0	167	2	97 *(48.5)	94 *(47.0)	0.25	+	-
Solvent ¹⁾	0	48	200	1	1	0	2	0	0	0	4	0	3 (1.5)	2 (1.0)	0.38		
PE	0.4	48	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
PE	0.7	48	200	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.38	-	-
PE	1.4	48	200	3	1	0	0	0	0	0	4	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
MC	0.00005	48	200	24	24	83	0	1	3	30	165	4	82 *(41.0)	72 *(36.0)	0.13	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, MC : mitomycin C. 1) Water for injection was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 92.7%, bispentaerythritol(4.9%) and dipentaerythritol(2.2%) were contained as impurities.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster cells (CHL/IU) treated with pentaerythritol(PE)** with and without S9 mix

Group	Concentration (mg/ml)	S9 mix	Time of exposure (hr)	No. of cells analysed	No. of structural aberrations								Others ³⁾	No. of cells with aberrations		Polyploid (%)	Judgement ⁵⁾	
					gap	ctb	cte	csb	cse	f	mul ²⁾	total		TAG (%)	TA (%)		SA	NA
Control ¹⁾				200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0.50			
Solvent	0	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.13		
PE	0.4	-	6-(18)	200	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	0 (0.0)	0.38	-	-
PE	0.7	-	6-(18)	200	0	0	3	0	0	0	0	3	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.63	-	-
PE	1.4	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.25	-	-
CPA	0.005	-	6-(18)	200	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
Solvent ¹⁾	0	+	6-(18)	200	0	0	1	0	0	0	10	11	0	2 (1.0)	2 (1.0)	0.25		
PE	0.4	+	6-(18)	200	2	1	0	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	1 (0.5)	0.38	-	-
PE	0.7	+	6-(18)	200	1	1	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	1 (0.5)	0.38	-	-
PE	1.4	+	6-(18)	200	3	1	5	0	0	0	0	9	0	5 (2.5)	2 (1.0)	0.63	-	-
CPA	0.005	+	6-(18)	200	9	85	203	0	1	13	190	501	0	140 *(70.0)	139 *(69.5)	0.00	+	-

Abbreviations : gap : chromatid gap and chromosome gap, ctb : chromatid break, cte: chromatid exchange, csb : chromosome break, cse : chromosome exchange (dicentric and ring etc.), f : acentric fragment (chromatid type), mul : multiple aberrations, TAG : total no. of cells with aberrations, TA : total no. of cells with aberrations except gap, SA : structural aberration, NA : numerical aberration, CPA : cyclophosphamide. 1) Water for injection was used as solvent. 2) More than ten aberrations in a cell were scored as 10. 3) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the no. of structural aberrations. 4) Eight hundred cells were analysed in each group. 5) Judgement was done on the basis of the criteria of Ishidate et al. (1987). * : Significantly different from solvent control at p<0.05. ** : Purity was 92.7%, bispentaerythritol(4.9%) and dipentaerythritol(2.2%) were contained as impurities.

2-メルカプトベンツイミダゾールのラットを用いる単回経口投与毒性

Single Dose Oral Toxicity Test of 2-Mercaptobenzimidazole in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するために、2-メルカプトベンツイミダゾールを雌雄ラットに1回経口投与し、その毒性について検討した。投与量は600 mg/kgを最高用量とし、以下公比約1.5により400, 267, 178, 119 および79 mg/kgとした。対照として、媒体(0.5% CMC)投与群を設けた。

一般状態の観察では、79 mg/kg群の雌雄で投与後2時間以降に流涎が、119 mg/kg群の雌で投与後2時間以降に流涎および自発運動の低下がみられた。178 mg/kg以上の群の雌雄では、投与後20分あるいは2時間以降に自発運動の低下、よろめき歩行、腹臥、流涎、表皮温下降、呼吸緩徐、鼻・口周囲の被毛汚染がみられ、投与後1日には前記症状に加えて流涎がみられた。投与後1~2日には178 mg/kg群の雌雄各1例、267 mg/kg群の雄4例と雌5例、400 mg/kg以上の群の雌雄各5例が死亡した。

LD₅₀値は、雄で218(166~287)mg/kg、雌で208mg/kgであった。

体重は、267 mg/kg以上の群の雌雄で投与後1日には投与前に比して減少し、雄では各群ともに対照群に比して有意差が認められた。178 mg/kg以下の群の雌雄では投与後1~7日頃までは増加抑制傾向であったが、剖検時には対照群とほぼ同程度の体重を示した。

剖検では、死亡例で胸腺の暗赤色斑散在、腺胃粘膜の暗赤色化、膀胱内に緑色液体貯留、膀胱粘膜の暗赤色化、赤褐色腹水貯留がみられた。

病理組織学的検査では、死亡例で胸腺(皮質および髄質)の出血、膀胱粘膜および粘膜下組織の出血がみられた。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質の2-メルカプトベンツイミダゾールは、分子量: 150.21, 融点: 約304°Cで水にほとんど溶けない淡黄白色粉末である(Lot No. 30807, 製造元: 住友化学工業(株), 純度: 98.5%)。投与終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.5%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% CMC水溶液を用いた。

投与検体液は、被験物質を0.5% CMC水溶液に用時懸濁して調製した。投与検体液中の被験物質濃度を、試験施設内で滴定法により測定した。その結果、被験物質濃度は適正範囲内の値を示した。

2. 使用動物および飼育条件

4週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット[Crj: CD(SD), (SPF)]を日本チャールス・リバー(株)日野飼育センターから購入した。5日間の検疫期間およびその後5日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない雌雄各35匹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。

動物は、室温20~24°C, 湿度40~70%, 明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中および絶食期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は、固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を給餌器に入れ、自由に摂取させた。ただし、投与前日の夕刻から投与までの約19時間と投与後約6時間まで絶食させ、その後に飼料を与えた。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時間までは絶食させ、その後に飲料水を与えた。飼料および飲料水の分析の結果、いずれも検査成績は試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

3. 投与経路、投与方法、群構成および投与量

2-メルカプトベンツイミダ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。投与回数は1回とした。投与時の週齢は約5週齢、体重範囲は雄が124~141 g、雌が102~112 gであった。

群構成は、以下の如くとした。1群の動物数は、雌雄各5匹とした。

群	試験群	投与量	雄	雌
第1群	対照(0.5% CMC)	0 mg/kg	5	5
第2群	2-Mercaptobenzimidazole	79 mg/kg	5	5
第3群	2-Mercaptobenzimidazole	119 mg/kg	5	5
第4群	2-Mercaptobenzimidazole	178 mg/kg	5	5
第5群	2-Mercaptobenzimidazole	267 mg/kg	5	5
第6群	2-Mercaptobenzimidazole	400 mg/kg	5	5
第7群	2-Mercaptobenzimidazole	600 mg/kg	5	5

投与量設定の理由：雄ラットを用いた投与量設定のための予備試験(投与量：0, 2, 20, 200, 2000 mg/kg, 1群3匹)の結果, 最高用量の2000 mg/kgでは投与後2日までに全例が死亡した。200 mg/kgでは投与後1日に有意な体重増加抑制が認められたものの, 20 mg/kg以下の群と同様に死亡例はみられなかった。また, 雌雄ラットを用いた予備試験(II)(投与量：0, 191, 305, 488, 781, 1250, 2000 mg/kg, 1群5匹)では, 雌は191 mg/kg以上の全例が死亡し, 雄は191 mg/kg群および305 mg/kg群の各2例と488 mg/kg以上の全例が死亡した。

これらの結果を考慮して, 今回の試験では600 mg/kgを最高用量とし, 以下公比約1.5により400, 267, 178, 119および79 mg/kg群を設定した。対照として, 同一液量の媒体投与群を設けた。

4. 観察および検査項目

観察期間：観察期間は, 投与後14日間とした。

一般状態：投与日は投与前および投与後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。

体重測定：投与日および投与後1, 3, 7, 10ならびに14日の午前中に体重を測定した。

剖検：死亡動物は発見後速やかに剖検した。生存動物は観察期間終了時にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に器官・組織の肉眼的観察を行った。剖検で異常の認められた器官・組織, およびその比較対照となる同部位の器官・組織(対照群の代表例)は, 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し, 保存した。

病理組織学的検査：

投与後24時間以上生存した動物の内, 剖検で異常が認められた器官・組織(胃, 胸腺および膀胱)の代表例および対照群の同一部位の代表例につき, 常法に従ってパラフィン包埋後にH-E染色組織標本作製し, 病理組織学的検査を行った。

5. 統計学的方法

LD₅₀値：観察期間中の死亡率から, Probit法あるいはBehrens-Karber法によりLD₅₀値を算出した。

体重：体重は, 各群で平均値および標準偏差を算出した。有意差検定は対照群と被験物質各投与群の間で多重比較検定を用いて行い, 危険率5%未満を有意とした。すなわち, Bartlett法による等分散性の検定を行い, 等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い, 有意ならば対照群との群間比較をDunnnett法(例数が等しい場合)またはScheffé法(例数が等しくない場合)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一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い, 有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnnett法またはScheffé法を用いて行った。

結果

1. 一般状態および死亡状況

対照群では, 雌雄とも一般状態の観察で異常はみられなかった。

267 mg/kg以下の群では, 雌雄とも投与後30分以内には異常症状は観察されなかった。79 mg/kg群の雌雄では投与後2時間以降に流涎が各1例にみられたが, 雄では投与後6時間には消失し, 雌では投与後1日には消失していた。119 mg/kg群では, 雌で投与後2時間以降に流涎および自発運動の低下が2~3例にみられ, 自発運動の低下は投与後1日にも1例にみられたが, 投与後2日以降には異常症状は観察されなかった。178 mg/kg群および267 mg/kg群の雌雄では, 投与後2時間以降に自発運動の低下, 腹臥, 流涎, 表皮温下降, 呼吸緩徐などの症状が1~5例にみられた。両群の雌雄では投与後1日には自発運動の低下, 腹臥, 表皮温下降, 呼吸緩徐などの症状に加えて流涎が1~5例に, さらに178 mg/kgおよび267 mg/kg群の雄では鼻・口周囲の被毛汚染が1~2例にみられた。178 mg/kg群の雄1例は投与後1日の午後に, 雌の1例は投与後2日に死亡した。また, 267 mg/kg群の雄1例は投与後1日の午後に死亡し, 投与後2日にも腹臥, 表皮温下降, 呼吸緩徐を示した1例を含む3例は同日の午後に死亡した。267 mg/kg群の雌では, 投与後2日に5例が死亡した。

400 mg/kg以上の群の雌雄では, 投与後20分以降に自発運動の低下, よろめき歩行, 腹臥, 流涎, 表皮温下降, 呼吸緩徐, 鼻・口周囲の被毛汚染, 流涎などの症状が1~5例にみられ, 投与後1日には600 mg/kg群の雌1例が死亡した。投与後1日には, 両群の雌雄で腹臥, 鼻・口周囲の被毛汚染, 表皮温下降, 呼吸緩徐, 流涎などの症状が1~5例にみられ, 400 mg/kg群および600 mg/kg群の雌雄各1例が同日の午後に死亡した。投与後2日には, 400 mg/kg以上の群の雌雄の残る全例が死亡した。

死亡経過およびLD₅₀値をTable 1に示した。

178 mg/kg群では, 雄は投与後1日に, 雌は投与後2日に各1例が死亡した。267 mg/kg群では, 雄は投与後1日に1例, 投与後2日に3例が, 雌は投与後2日に5例が死亡した。400 mg/kg以上の群では, 雌雄とも投与後2日までに全例が死亡した。死亡例は, 投与後1日より投与後2日に多くみられた。

LD₅₀値は, 雄で218(95%信頼限界：166~287)mg/kg, 雌で208 mg/kgであった。

2. 体重推移

267 mg/kg以上の群では, 雌雄とも投与後1日の体重は投与前に比して減少し, 雄では各群ともに対照群に比して有意差が認められた。178 mg/kg以下の群では, 雌雄とも投与後1~7日頃までは増加抑制傾向であったが有意差は認められず, 剖検時には対照群とはほぼ同程度の値を示した。

2-メルカプトベンツイミダゾールのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験

Twenty-eight-day Repeat Dose Oral Toxicity Test of 2-Mercaptobenzimidazole in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するために、ゴムの加硫促進剤あるいは老化防止剤としてゴム業界において広く使用されている、2-メルカプトベンツイミダゾールを雌雄ラットに1日1回、28日間経口投与し、その毒性について検討した。なお、一部の動物については14日間の回復期間を設けた。投与量は1.2, 4, 12および40 mg/kgとし、対照として媒体(0.5%CMC)投与群を設けた。

40 mg/kg群の雌では、投与18日以降～回復8日まで少数例で被毛光沢不良がみられた。当群では、投与24日に1例が死亡した。

12 mg/kg群の雄は投与18日から、40 mg/kg群の雄は投与11日から、雌は投与15日から、いずれも最終投与日まで有意な体重増加抑制が認められた。回復期間中は、40 mg/kg群の雌雄とも体重の有意な低値が継続して認められた。

12 mg/kg群の雄は投与2週から、40 mg/kg群の雌雄は投与1週から、いずれも投与4週まで摂餌量の有意な低値が認められた。回復期間中は、40 mg/kg群の雌雄とも摂餌量の有意な低値が継続して認められた。

40 mg/kg群の雄で尿量に有意な高値を、12 mg/kg以上の群の雄で尿比重に有意な低値を示した。当変動は、回復期間終了前には消失した。

血小板数および網状赤血球数の低値ならびにMCHCの高値が12 mg/kg以上の群の雄と40 mg/kg群の雌で、MCVの低値が12 mg/kg以上の群の雄で、赤血球数の低値が12 mg/kg以上の群の雌で、HCTの低値、PTの延長が40 mg/kg群の雌雄で、APTTの延長が40 mg/kg群の雄で、白血球数の低値が40 mg/kg群の雌で認められた。回復期間終了時には、40 mg/kg群の雌雄でHCT、雌で赤血球数の低値が継続して認められた他に、雄で赤血球数の低値、雌雄でHGBの低値、雄で白血球数の低値が新たに認められた。

Kの低値が4 mg/kg以上の群の雌雄で、Caの低値が4 mg/kg以上の群の雄で、ClおよびGOTの低値が12 mg/kg以上の群の雌雄で、総蛋白、尿素窒素、クレアチニン、総コレステロールの高値が12 mg/kg以上の群の雄と40 mg/kg群の雌で、 γ -GTP、アルブミン量の高値が40 mg/kg群の雌雄で、 α 2-グロブリン比、 β -グロブリン比、トリグリセライド、無機リンの低値が12 mg/kg以上の群の雄で、アルブミン比、A/G比、総ビリルビンの高値が40 mg/kg群の雌で、ブドウ糖の高値が40 mg/kg群の雌で、Naの高値が12 mg/kg以上の群の雌で認められた。回復期間終了時には、

40 mg/kg群の雄でGOT、 β -グロブリン比の低値が継続して認められた他に、雄でNaの高値が新たに認められた。

4 mg/kg以上の群の雌雄で、甲状腺の大型化がみられた。回復期間終了時にも、40 mg/kg群の雌雄で同様の所見が得られた。

4 mg/kg以上の群の雄および12 mg/kg以上の群の雌で、甲状腺絶対重量および相対重量がともに有意な高値を示した。回復期間終了時には変動の程度はやや弱くなったものの、40 mg/kg群の雌雄で甲状腺重量の有意な高値が継続して認められた。

甲状腺で、濾胞細胞の過形成および肥大が1.2 mg/kg以上の群の雌雄でみられた。副腎では、皮質細胞の空胞化が40 mg/kg群の雌雄でみられた。回復期間終了時には、40 mg/kg群の雌雄ともに甲状腺および副腎の組織変化の程度が弱くなったものの、同様の変化が継続してみられた。

以上により、2-メルカプトベンツイミダゾールは造血機能、甲状腺、肝機能および腎機能などに影響を及ぼすことが推察された。当試験条件下における28日間反復経口投与による毒性学的無影響量は、1.2 mg/kg未満と考えられた。

方法

1. 被験物質、媒体および投与検体液

被験物質の2-メルカプトベンツイミダゾールは、分子量：150.21、融点：約304°Cで水にほとんど溶けない淡黄白色粉末である(Lot No. 30807、製造元：住友化学工業(株)、純度：98.5%)。投与終了後に残余被験物質の一部を製造元に送付して分析した結果、純度は98.5%であり、使用期間中の安定性が確認された。

投与検体液は、被験物質を0.5%CMC水溶液に懸濁して調製した。投与開始時および投与期間終了時の2回、試験施設内で滴定法により各投与検体液中の被験物質濃度を測定した。その結果、被験物質濃度は適正範囲内の値を示した。0.5%CMC水溶液中の0.6, 10および40 mg/ml濃度の被験物質は、調製後冷蔵・遮光下で7日間、さらに室温・遮光下で4時間の保存条件で安定であることが確認された。そこで、当濃度範囲内の投与検体液の調製は1週間に1回以上とし、1日分毎に分割して冷蔵・遮光下で保存し、用時室温に戻して投与に用いた。当濃度範囲外の投与検体液は用時調製とし、調製後は速やかに投与に用いた。

2. 使用動物および飼育方法

Sprague-Dawley 系の雄(4週齢)および雌(3週齢)ラット [Crj: CD(SD), (SPF)] を、日本チャールス・リバー(株) 日野飼育センターから購入した。5日間の検疫期間およびその後、雄は7日間、雌は14日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常の認められない雌雄各60匹の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、投与開始日の前日に行った。

動物は、室温20~24°C、湿度40~70%、明暗各12時間、換気回数12回/時に設定した飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製懸垂式ケージを用いて1ケージあたり5匹までの群飼育とし、群分け後はステンレス製五連ケージを用いて個別飼育した。

飼料は固型飼料(CRF-1, オリエンタル酵母工業(株))を給餌器に入れ、自由に摂取させた。飲料水は、水道水を給水瓶を用いて自由に摂取させた。飼料および飲料水の分析の結果、いずれも検査成績は試験施設で定めた基準値の範囲内であった。

3. 投与経路、投与方法および群構成

2-メルカプトベンツイミダ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。投与液量は投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 ml/kgで算出した。投与開始時の週齢は約6週齢、体重範囲は雄が167~195 g、雌が139~164 gであった。

群構成は、以下の如くとした。すなわち、被験物質投与群として雌雄各4群を設定し、その他に对照群を設けた。1群の動物数は、对照群および最高用量群は投与期間終了時剖検例10匹と回復期間終了時剖検例5匹の合計15匹とした。また、被験物質の低用量、中用量および高用量群は、投与期間終了時剖検例10匹とした。

群	試験群	投与量	雄	雌
第1群	対照(0.5% CMC)	0 mg/kg	10*+5#	10*+5#
第2群	2-Mercaptobenzimidazole	1.2 mg/kg	10*	10*
第3群	2-Mercaptobenzimidazole	4 mg/kg	10*	10*
第4群	2-Mercaptobenzimidazole	12 mg/kg	10*	10*
第5群	2-Mercaptobenzimidazole	40 mg/kg	10*+5#	10*+5#

*: 投与期間終了時剖検例数、

#: 回復期間終了時剖検例数

投与量設定の理由:

雌雄ラットを用いた2週間投与による予備試験(投与量: 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 および200 mg/kg, 一群5例)の結果、200 mg/kg群では雌雄とも投与5日までに全例が、100 mg/kg群では投与13日までに雄4例と雌の全例が死亡した。50 mg/kg以下の投与群では、一般状態に異常はみられなかった。一方、25 mg/kg以上の投与群では雌雄とも体重は増加抑制傾向であり、雄では25 mg/kg群

は投与開始15日に、50 mg/kg群は投与11日および投与開始15日に有意差が認められた。

そこで、当試験では投与期間を考慮して、25 mg/kgと50 mg/kgの間の用量の40 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により12, 4 および1.2 mg/kgを設定した。対照として、被験物質と同一液量の媒体投与群を設けた。

投与期間は、1日1回で28日間反復投与とした。また、28日間の投与後に对照群および最高投与群の一部の動物につき14日間の回復期間を設け、回復性について検討した。

なお、初回投与日を投与1日とし、最終投与日の翌日を回復1日とした。

4. 観察および検査項目

1) 一般状態

一般状態および死亡の有無を、投与期間中は投与前・後の1日2回ならびに回復期間中は毎日1回観察した。

2) 体重

投与期間中および回復期間中とも1週間に2回、体重を測定した。

3) 摂餌量

投与期間中および回復期間中ともに連続2日間量を測定して1日量に換算し、1週間に1回、摂餌量を測定した。なお、剖検前日の夕刻からは絶食とした。

4) 摂水量

摂餌量測定と同様にして摂水量を測定した(ただし、絶食期間中は給水を行った)。

5) 尿検査

投与期間終了前に投与期間終了時の剖検用動物について、回復期間終了前に回復期間終了時の剖検用動物について尿検査を実施した。すなわち、採尿ケージを用いて絶食・給水下で3時間で採取した尿(3時間尿)と、引き続き給餌・給水下で21時間で採取した尿(21時間尿)、およびそれらを合計した尿(24時間尿)について、以下の検査を実施した。なお、投与期間中の採尿は当日の検体投与後に行った。

- 3時間尿 : 色調は、外観判定とした。pH, 潜血, 蛋白, 糖, ケトン体, ウロビリノーゲンおよびビリルビンは、エームスクリニテック用検査紙(マイルス・三共(株))に尿を滴下後に、エームス尿分析器(クリニテック200, マイルス・三共(株))を用いて検査した。尿沈渣は、沈渣を尿沈渣染色液で染色後に顕微鏡下で観察した。
- 21時間尿 : 比重を、屈折率により屈折率比重計(ユリベクト・IID, (株)ニコン)を用いて測定した。
- 24時間尿 : 尿量を重量により測定した。

6) 血液学検査

最終投与の翌日および回復期間終了後に、ペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による麻酔下で腹大動

脈から血液を採取し、以下の検査を実施した。

プロトロンビン時間(PT)および活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)は、3.13%クエン酸ナトリウムで処理した血漿について、散乱光検出方式により血液凝固分析装置(コアグマスターII, 三共(株))を用いて測定した。

赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、血小板数および白血球数(WBC)は、EDTA-2KコーティングしたSysmexサンプルカップに採取した血液について、多項目自動血球計数装置(Sysmex E-2000, 東亜医用電子(株))を用いて測定した。さらに、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)および平均赤血球色素濃度(MCHC)を算出した。

網状赤血球数は、EDTA-2K処理した血球をBrecher法により超生体染色してスライドグラスに塗抹後、Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で赤血球1000個中の数を数えた。

白血球百分率は、EDTA-2K処理した血液をスライドグラスに塗抹し、May-Giemsa染色標本を作製して顕微鏡下で白血球100個を分類計数した。

7) 血液生化学検査

血液学検査用の血液と同時期に腹大動脈から採取した血液から分離して得た血清について、以下の検査を実施した。

GOTおよびGPTはHenry変法、ALPはp-NPP基質法、 γ -GTPは γ -G-P-NA基質法、総蛋白(TP)はBiuret法、総ビリルビン(T-Bil)はAzobilirubin法、尿素窒素(BUN)はUrease-GIDH法、クレアチニン(Jaffé法)、ブドウ糖はGlucose dehydrogenase法、総コレステロール(T-Chol)はCOD-DAOS法、トリグリセライド(TG)はGPO-DAOS法、無機リン(IP)はMolybdenum blue法、Caはo-CPC法により、いずれも自動分析装置(AU 500, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

NaおよびKはイオン選択電極法により、Clは電量滴定法により、いずれも全自動電解質分析装置(EA04, (株)A&T)を用いて測定した。

蛋白分画は、自動電気泳動装置(AES 600, オリンパス光学工業(株))を用いて測定した。

アルブミン量は総蛋白量および蛋白分画値から、A/G比は蛋白分画値から算出した。

8) 剖検

上記の6)および7)の項で採血した動物をさらに放血致死させた後に、器官・組織の肉眼的観察を行った。

9) 器官重量

剖検時に、以下の器官重量を測定した。さらに、剖検前に測定した体重を基準として器官重量の体重比(相対重量)を算出した。

脳(大脳、小脳、延髄)、肝臓、腎臓、副腎、甲状腺(上皮小体を含む)、精巣または卵巣。

10) 病理組織学的検査

以下の器官または組織を摘出して10%中性緩衝ホルマリン液(ただし、眼球はグルタルアルデヒド・ホルマリ

ン液)で固定し、全例について常法に従ってパラフィン包埋標本を作製した。

心臓、肺、肝臓、胃、脾臓、腎臓、膀胱、精巣、卵巣、下垂体、副腎、甲状腺(上皮小体を含む)、脳(大脳、小脳、延髄)、眼球、骨髄(大腿骨)。

投与期間終了時剖検例の対照群および最高用量(40 mg/kg)群の心臓、肝臓、脾臓および腎臓についてH-E染色組織標本を作製し、病理組織学的検査を行った。さらに、剖検時に大型化の所見が得られた甲状腺(上皮小体を含む)、および投与期間終了時の40 mg/kg群の観察で対照群に比して異常所見を示す動物数が多かった副腎は、投与期間終了時および回復期間終了時の対照群を含む全投与群の雌雄について同様に検査した。また、死亡例の剖検で異常がみられた肺および胸腺についても検査した。

5. 統計学的方法

測定値の統計学的方法は下記のように多重比較検定を行い、有意差検定は対照群と被験物質各投与群との間で行った。いずれの検定においても、危険率5%未満を有意とし、5%未満($p < 0.05$)と1%未満($p < 0.01$)とに分けて表示した。

体重、摂餌量、摂水量、尿量、尿比重、血液学検査、血液生化学検査、器官重量(相対重量を含む)については、各群で平均値および標準偏差を算出した。多重比較検定では、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散ならば一元配置法による分散分析を行い、有意ならば対照群との群間比較はDunnnett法(例数が等しい場合)またはScheffé法(例数が等しくない場合)を用いて行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば対照群との群間比較は順位を利用したDunnnett法またはScheffé法を用いて行った。

結果

1. 一般状態

1) 投与期間中

対照群および12 mg/kg以下の群の雌雄ならびに40 mg/kg群の雄では、異常症状は観察されなかった。40 mg/kg群の雌では、投与18日以降剖検日まで1~3例で被毛光沢不良がみられた。投与24日に、40 mg/kg群の雌1例が死亡した。当例では、死亡前日まで異常症状は観察されなかった。

2) 回復期間中

40 mg/kg群の雌では、投与期間中から引き続いて1~2例で被毛光沢不良がみられたが、回復9日以降には当症状は消失した。その他には、異常症状は観察されなかった。

2. 体重(Fig. 1)

1) 投与期間中

4 mg/kg以下の群の雌雄および12 mg/kg群の雌の体重は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

12 mg/kg群の雄では、対照群に比して投与3週頃から体重増加抑制傾向、あるいは前回測定値に比して減少を示す日もあり、投与18日から最終投与日まで有意差が認められた。40 mg/kg群では、雌雄ともに対照群に比して投与2週頃から体重増加抑制傾向、あるいは前回測定値に比して減少を示す日もあり、雄は投与11日から、雌は投与15日から、いずれも最終投与日まで有意差が認められた。一般状態の観察で被毛光沢不良がみられた40 mg/kg群の雌の3例の体重は、同群内でもやや低い値で推移した。なお、40 mg/kg群の雌の死亡例では、同一群内の他の動物に比して体重推移に異常はみられなかった。

2) 回復期間中

40 mg/kg群では、雌雄ともに回復期間中の体重増加量は対照群よりも大きかったが、回復14日まで有意な低値が継続して認められた。

3. 摂餌量 (Fig.2)

1) 投与期間中

4 mg/kg以下の群の雌雄および12 mg/kg群の雌の摂餌量は、対照群とほぼ同様の推移を示した。

12 mg/kg群の雄では対照群に比して低値であり、投与2週から投与4週まで有意差が認められた。

40 mg/kg群では、雌雄とも投与1週から投与4週まで有意な低値を示した。一般状態の観察で被毛光沢不良であった雌3例の内の2例の摂餌量は、低い値を示す日がみられた。なお、雌の死亡例では同一群内の他の動物に比

して摂餌量推移に異常は認められなかった。

2) 回復期間中

40 mg/kg群の雌雄ともに、回復期間中の摂餌量は投与期間中の後期よりもわずかの増加傾向がうかがわれたが、対照群に比して有意な低値が継続して認められた。

4. 摂水量

1) 投与期間中

各投与群の摂水量は、雌雄とも対照群に比してほぼ同程度かやや高値傾向であった。投与用量に関連性の無い変動として、1.2 mg/kg群の投与4週に有意な高値が認められた。なお、40 mg/kg群の雌の死亡例では、同一群内の他の動物に比して摂水量推移に異常は認められなかった。

2) 回復期間中

対照群に比して40 mg/kg群の雄はほぼ同程度、雌は高値であったが、有意差は認められなかった。

5. 尿検査

1) 投与期間終了前

尿量は、対照群に比して12 mg/kg以上の群の雌と40 mg/kg群の雄で高値であり、雄では有意差が認められた。

尿比重は、対照群に比して12 mg/kg以上の群の雌雄で低値であり、12および40 mg/kg群の雄で有意差が認められた。

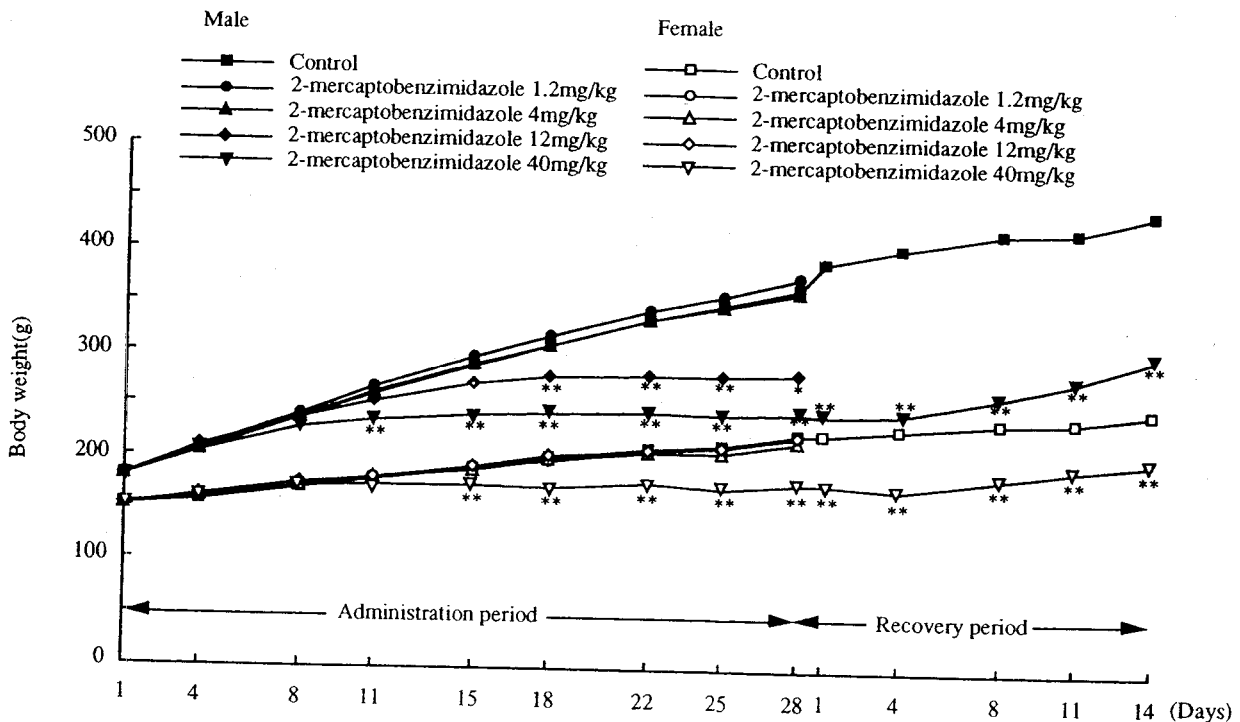


Fig. 1 Body weight of male and female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole. Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

色調, pH, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンおよび沈渣は, 各投与群の雌雄とも対照群とほぼ同様であった。

2) 回復期間終了前

尿量は, 40 mg/kg群の雄で投与期間終了前の有意な高値に代わり, 有意な低値を示した。また, 尿比重は40 mg/kg群の雌で新たに有意な低値が認められた。

色調, pH, 蛋白, 糖, ケトン体, ビリルビン, 潜血, ウロビリノーゲンおよび沈渣は, 40 mg/kg群の雌雄とも対照群とほぼ同様であった。

6. 血液学検査 (Table 1, 2)

1) 投与期間終了時

4 mg/kg以下の群では, 雌雄ともにいずれの検査項目とも対照群とほぼ同程度であり, 有意差は認められなかった。

12 mg/kg群では, 雌で赤血球数の低値に, 雄で平均赤血球容積, 血小板数, 網状赤血球数の低値および平均赤血球血色素濃度の高値に有意差が認められた。

40 mg/kg群の雄では, 12 mg/kg群にみられた変動に加え, ヘマトクリット値の低値, プロトロンビン時間および活性化部分トロンボプラスチン時間の延長に有意差が認められた。雌では, 赤血球数の低値に加え, ヘマトクリット値, 平均赤血球血色素濃度, 血小板数, 網状赤血球数およびプロトロンビン時間に雄と同様の変動が認められた。さらに, 雌では白血球数が有意な低値を示した。

2) 回復期間終了時

投与期間終了時に認められた40 mg/kg群の雌の赤血球数の低値および雌雄のヘマトクリット値の有意な低値が, 継続してみられた。新たに, 雄で赤血球数および白血球数, 雌雄でヘモグロビン量の低値が認められた。一方, 雌雄でプロトロンビン時間の延長, 雄で平均赤血球容積および血小板数の低値, 活性化部分トロンボプラスチン時間の延長, 雌で平均赤血球血色素濃度の高値, 網状赤血球数の低値および白血球数の低値の各有意差は消失した。なお, 雄で平均赤血球血色素濃度は低値を, 網状赤血球数は高値を, 雌で血小板数は高値を示し, 投与期間終了時とは逆の有意差が認められた。

7. 血液生化学検査 (Table 3, 4)

1) 投与期間終了時

1.2 mg/kg群では, 雌雄ともにいずれの検査項目とも対照群とほぼ同程度であり, 有意差は認められなかった。

4 mg/kg群では, 雌雄でKが, 雄でCaが有意な低値を示した。

12 mg/kg群では, 4 mg/kg群でみられた変動に加え, 雌雄でGOT, Clの低値, 雄で α 2-グロブリン比, β -グロブリン比, トリグリセライドおよび無機リンの低値, 総蛋白, 尿素窒素, クレアチニンおよび総コレステロールの高値, 雌でNaの高値に有意差が認められた。

40 mg/kg群では, 12 mg/kg群でみられた変動に加え, 雌雄で γ -GTPおよびアルブミン量の高値, 雄でアルブミン比, A/G比および総ビリルビンの高値, 雌で総蛋白,

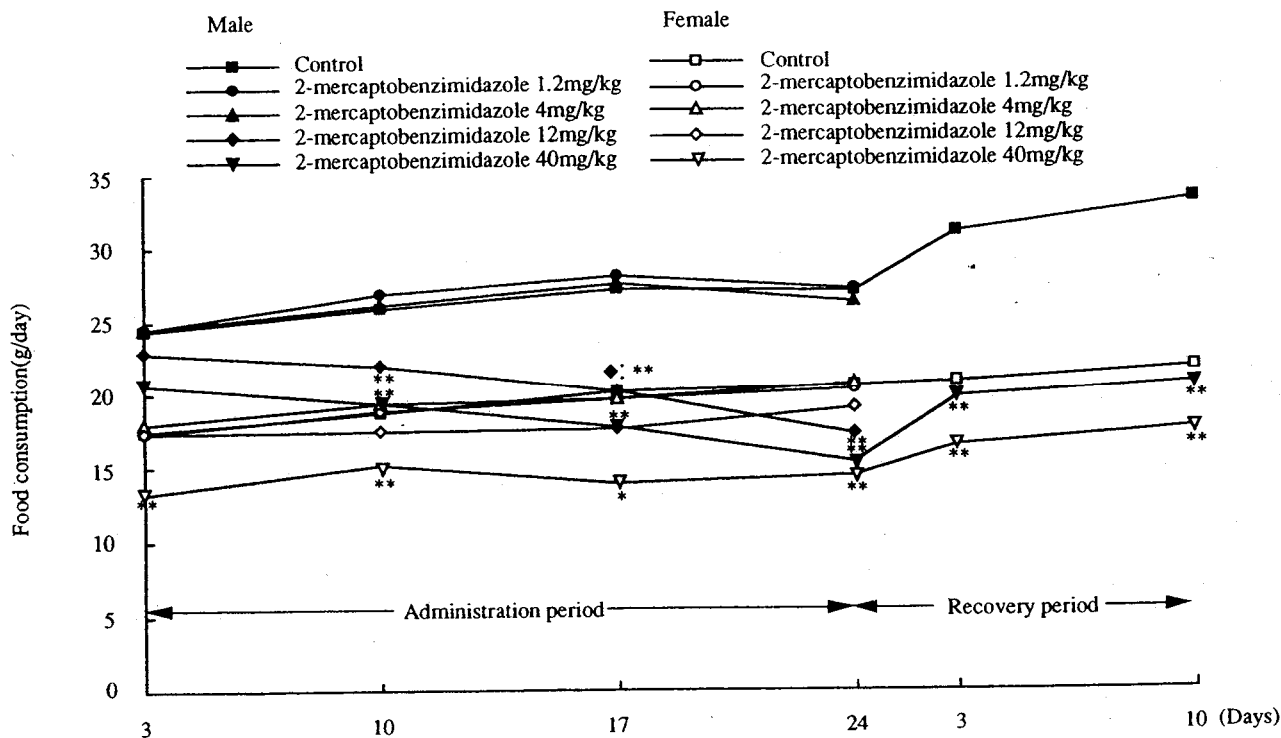


Fig. 2 Food consumption of male and female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole. Significantly different from control (*:p<0.05, **:p<0.01)

尿素窒素, クレアチニン, ブドウ糖および総コレステロールの高値に有意差が認められた。

2) 回復期間終了時

投与期間終了時と同様に, 40 mg/kg群の雄でGOTおよびβ-グロブリン比が有意な低値を示した。新たに, 雄でNaの有意な高値が認められた。なお, 雄では無機リンが高値を, 総蛋白およびクレアチニンが低値を, 雌ではブドウ糖が低値を示し, 投与期間終了時とは逆の有意差が認められた。

8. 剖検所見

1) 投与期間終了時

4 mg/kg以上の群の雌雄では, 甲状腺の大型化が5~10例にみられた。その他には, 著変はみられなかった。

死亡例(雌1例)では, 甲状腺の大型化に加えて胸水(無色)貯留, 胸腺の暗赤色化, 肺の暗赤色化がみられた。

2) 回復期間終了時

投与期間終了時と同様に, 40 mg/kg群の雌雄の全例で

甲状腺の大型化がみられた。その他には, 著変はみられなかった。

9. 器官重量 (Table 5, 6)

1) 投与期間終了時

4 mg/kg以上の投与群では, 対照群に比して雌雄とも甲状腺の絶対重量および相対重量がともに高値であり, 4 mg/kg以上の群の雄および12 mg/kg以上の群の雌で有意差が認められた。その他に, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣あるいは卵巣で有意差が認められたが, 絶対重量と相対重量が逆の変動であった。

2) 回復期間終了時

40 mg/kg群では, 対照群に比して甲状腺の絶対重量および相対重量がともに有意な高値を示したが, その程度は投与期間終了時によりも弱くなった。その他に, 脳, 肝臓, 腎臓, 副腎あるいは精巣で有意差が認められたが, 絶対重量と相対重量が逆の変動であった。

Table 1 Hematological examination of male rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Group	Termination of administration period						Termination of recovery period	
		Control		2-mercaptobenzimidazole				Control	2-mercaptobenzimidazole
		0	1.2	4	12	40	0	40	
Number of males		10	10	10	10	10	5	5	
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	778.5 ± 28.0	785.3 ± 29.9	753.1 ± 27.6	802.6 ± 28.6	788.1 ± 28.4	858.2 ± 37.9	721.2 ± 33.5**	
Hemoglobin	(g/dl)	15.28 ± 0.41	15.15 ± 0.28	14.83 ± 0.57	15.48 ± 0.76	15.07 ± 0.81	16.00 ± 0.32	13.30 ± 0.92**	
Hematocrit	(%)	45.50 ± 1.17	44.96 ± 0.97	43.79 ± 1.31	44.67 ± 1.86	43.12 ± 2.29**	46.56 ± 0.97	39.76 ± 1.98**	
MCV	(μm ³)	58.48 ± 1.69	57.28 ± 1.32	58.17 ± 1.33	55.64 ± 0.97**	54.69 ± 2.28**	54.30 ± 1.29	55.16 ± 1.63	
MCH	(pg)	19.65 ± 0.70	19.31 ± 0.55	19.69 ± 0.59	19.27 ± 0.41	19.13 ± 0.91	18.66 ± 0.48	18.42 ± 0.55	
MCHC	(g/dl)	33.59 ± 0.54	33.70 ± 0.41	33.86 ± 0.51	34.64 ± 0.38**	34.96 ± 0.45**	34.36 ± 0.23	33.44 ± 0.84*	
Platelet	(10 ⁴ /mm ³)	105.46 ± 13.77	108.15 ± 13.06	99.46 ± 11.17	84.61 ± 9.77**	91.03 ± 8.65*	110.22 ± 6.23	126.04 ± 19.02	
Reticulocyte	(%)	30.3 ± 3.9	26.8 ± 4.6	28.3 ± 4.8	10.8 ± 3.0**	11.0 ± 2.3**	26.2 ± 6.3	55.0 ± 13.2**	
PT	(sec.)	14.67 ± 2.08	13.99 ± 1.85	13.08 ± 0.56	14.24 ± 0.64	17.87 ± 2.86*	12.76 ± 0.49	12.38 ± 0.39	
APTT	(sec.)	30.36 ± 3.28	29.29 ± 2.56	28.98 ± 2.58	26.95 ± 2.29	35.13 ± 4.33**	25.82 ± 1.74	24.32 ± 1.15	
WBC	(10 ² /mm ³)	62.3 ± 13.0	70.2 ± 18.8	67.1 ± 25.4	42.2 ± 15.2*	47.1 ± 11.2	119.2 ± 20.1	57.8 ± 17.1**	
Differential leukocyte	(%)								
Lymphocyte		94.3 ± 3.3	94.4 ± 1.9	95.4 ± 3.3	94.2 ± 4.4	92.4 ± 3.4	95.6 ± 0.9	93.6 ± 2.3	
Neutrophil		4.9 ± 2.7	4.8 ± 1.9	4.0 ± 2.7	5.4 ± 3.9	7.0 ± 3.2	3.8 ± 1.1	5.6 ± 2.4	
Eosinophil		0.5 ± 0.7	0.4 ± 0.7	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte		0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.5 ± 0.8	0.2 ± 0.4	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.6 ± 0.5	

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

Table 2 Hematological examination of female rats in 28-day repeat dose oral toxicity test of 2-mercaptobenzimidazole

Test period	Group	Termination of administration period						Termination of recovery period	
		Control		2-mercaptobenzimidazole				Control	2-mercaptobenzimidazole
		0	1.2	4	12	40	0	40	
Number of males		10	10	10	10	10	5	5	
RBC	(10 ⁶ /mm ³)	794.1 ± 28.1	773.5 ± 36.3	760.3 ± 28.0	735.1 ± 41.8*	728.8 ± 40.3**	822.2 ± 34.3	713.6 ± 23.0**	
Hemoglobin	(g/dl)	15.10 ± 0.32	15.02 ± 0.75	14.76 ± 0.49	14.56 ± 0.72	14.23 ± 0.82	15.32 ± 0.87	13.10 ± 0.22**	
Hematocrit	(%)	44.32 ± 0.96	43.72 ± 1.77	42.87 ± 1.13	42.01 ± 1.92	39.97 ± 2.22**	44.50 ± 2.02	38.52 ± 0.29**	
MCV	(μm ³)	55.86 ± 1.46	56.56 ± 1.29	56.43 ± 1.94	57.21 ± 1.96	54.84 ± 1.22	54.12 ± 0.99	54.04 ± 1.37	
MCH	(pg)	19.02 ± 0.55	19.43 ± 0.60	19.43 ± 0.56	19.81 ± 0.60	19.52 ± 0.42	18.64 ± 0.31	18.38 ± 0.58	
MCHC	(g/dl)	34.07 ± 0.39	34.35 ± 0.61	34.43 ± 0.63	34.65 ± 0.54	35.62 ± 0.48**	34.42 ± 0.61	34.02 ± 0.51	
Platelet	(10 ⁴ /mm ³)	106.63 ± 10.15	97.13 ± 7.28	101.67 ± 12.73	100.11 ± 10.10	86.71 ± 13.96**	102.76 ± 11.74	122.26 ± 10.03*	
Reticulocyte	(%)	28.7 ± 6.9	25.0 ± 5.1	26.7 ± 6.8	21.6 ± 7.5	10.0 ± 3.4**	28.6 ± 6.2	40.8 ± 11.9	
PT	(sec.)	12.04 ± 0.39	12.16 ± 0.30	12.04 ± 0.36	12.45 ± 0.50	12.87 ± 0.41**	12.46 ± 0.55	12.38 ± 0.83	
APTT	(sec.)	21.19 ± 1.63	20.14 ± 0.87	21.03 ± 1.15	21.89 ± 1.31	22.91 ± 2.23	21.30 ± 1.03	19.60 ± 1.48	
WBC	(10 ² /mm ³)	47.5 ± 11.2	44.2 ± 9.6	42.3 ± 16.3	38.5 ± 12.8	28.6 ± 9.6*	65.6 ± 28.0	51.8 ± 15.8	
Differential leukocyte	(%)								
Lymphocyte		94.0 ± 2.0	93.9 ± 3.0	93.6 ± 3.2	94.0 ± 2.6	94.4 ± 2.7	96.0 ± 1.6	95.6 ± 3.4	
Neutrophil		5.2 ± 2.0	5.4 ± 3.0	5.7 ± 3.2	5.3 ± 2.5	5.1 ± 2.5	3.4 ± 1.9	4.2 ± 3.1	
Eosinophil		0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.5	0.2 ± 0.4	0.1 ± 0.3	0.2 ± 0.4	0.2 ± 0.4	
Basophil		0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	
Monocyte		0.6 ± 0.8	0.4 ± 0.7	0.3 ± 0.5	0.5 ± 0.5	0.3 ± 0.7	0.4 ± 0.5	0.0 ± 0.0	

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