

項目	方法
(1) pH	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(2) 蛋白	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(3) グルコース	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(4) ケトン体	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(5) ビリルビン	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(6) 潜血	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(7) ウロビリノーゲン	試験紙法 (マルティステックス, ハイエル メディカル株式会社)
(8) 尿量	メスシリンダーで測定
(9) 比重	屈折法
(10) ナトリウム	イオン選択電極法
(11) カリウム	イオン選択電極法
(12) クロール	電量滴定法
(13) 尿沈渣	Sternheimer-Malbin 染色した標本を鏡検

#### 測定機器

(1)~(7) : クリニテック 100 (バイエル メディカル株式会社)

(9) : ユリコン-JE (株式会社アタゴ)

(10)~(12) : PVA- $\alpha$  III (株式会社エイアンドティー)

#### 器官重量

全生存例について、下記の器官重量を電子天秤 (AW120 : 株式会社島津製作所) を用いて測定した (両側性の器官はまとめて測定した)。解剖日に体重を測定し、その体重に基づいて相対重量 (対体重比) を算出した。死亡動物については、体重は測定したが、器官重量は測定しなかった。

肝臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 胸腺, 脾臓, 脳, 心臓

#### 病理解剖検査

全計画解剖動物については、採血後、腹大動脈を切断・放血し、安楽死させた後、剖検した。死亡動物については、発見後速やかに剖検した。

#### 病理組織学的検査

全例の下記器官・組織を採取し、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、保存した。ただし、精巣および精巣上体はブアン液で、眼球およびハーダー腺はダビドソン液でそれぞれ固定後、10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で保存した (死亡動物については10 vol %中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定)。なお、脳について行った特殊染色では、固定時間の制限

があったため、脳の固定条件は常温で約 24 時間とした。

肉眼的異常部位，脳（大脳，小脳および橋を含む部位，4 断面），脊髓，胃，十二指腸，空腸，回腸（パイエル板を含む），盲腸，結腸，直腸，肝臓，腎臓，副腎，脾臓，心臓，胸部大動脈，胸腺，眼球およびハーダー腺，下垂体，甲状腺（上皮小体含む），気管および肺，精巣，卵巣，精巣上体，前立腺，子宮，膣，膀胱，下顎リンパ節，腸間膜リンパ節，坐骨神経（大腿筋に付けて採材），骨髓（大腿骨），腸腰筋（腰腸肋筋）

投与期間終了後解剖動物の対照群と 15 mg/kg 群の雌雄全例および死亡動物の上記器官・組織，ならびに対照群を含む全動物の肉眼的異常部位について，常法に従ってヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し，鏡検した．また，剖検で総胆管の拡張が 15 mg/kg 群に認められたことから，全例の総胆管についても検査した．その結果，15 mg/kg 群で被験物質投与の影響が疑われる変化が，総胆管以外に雄の肝臓，腎臓および骨髓（大腿骨）に認められた．このため雄全例の肝臓，腎臓および骨髓（大腿骨）についても検査を行った．なお，投与期間終了後解剖動物の対照群および 15 mg/kg 群の脳について，アポトーシス検出のための TUNEL 法，髄鞘を確認するための Kluver-Barrera 染色，神経膠線維を確認するための Holzer 染色，軸索・神経線維を確認するための Bodian's 染色を実施した．なお，脳については約 24 時間固定であるため，投与期間終了後解剖動物の 2 および 5 mg/kg 群の全例および回復期間終了後解剖動物の全例の脳についてパラフィン包埋まで行った（10.2 項参照）．また，死亡動物のうち動物番号：40401 の十二指腸，空腸，回腸，盲腸および総胆管，動物番号：40405 の盲腸，動物番号：40409 の回腸は，死後の自己融解により，病理組織学的に評価できなかった．

## 結果および結論

投与期間中に 15 mg/kg 群の雄 3/10 例が死亡した．死亡動物では一般状態観察および詳細な症状の観察において，振戦が認められた．剖検では，腎臓の皮髄境界部の暗赤色化および白色化が認められた．病理組織学的検査では，肝臓の胆管増生，総胆管の増殖性炎，腎臓の皮髄境界部の壊死と再生性尿細管が認められた．その他，剖検および病理組織学的検査では，一般状態の悪化に伴うと思われる変化が胸腺，脾臓，骨髓，十二指腸および副腎に認められた．生存動物では，一般状態観察，詳細な症状の観察および機能検査において，被験物質投与に起因した変化は認められなかった．

15 mg/kg 群の雌雄に体重，体重増加量および摂餌量の有意な低値が認められた．15 mg/kg 群の雌での体重の低値については，回復期間のみにみられたが，投与期間中に生じた対照群との体重差に起因すると考えられた．

血清学的検査において，15 mg/kg 群の雄に赤血球数，ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の有意な低値が認められた．

血清生化学的検査において，15 mg/kg 群の雄にアルブミンおよび A/G 比の有意な低値，尿素窒素の有意な高値と  $\gamma$ GT の増加傾向がみられ，15 mg/kg 群の雌にクロールの有意な低値が認められた．また，15 mg/kg 群の雄 1 例に総ビリルビンの明らかな高値が認められた．

尿検査において、統計学的に有意ではなかったが、15 mg/kg 群の雌雄に尿円柱（類円柱，硝子円柱）が認められた。また、15 mg/kg 群の雄に尿量およびビリルビンの明らかな高値を示す動物が認められた。

器官重量において、15 mg/kg 群の雄に精巣上体の絶対重量の有意な低値および腎臓の相対重量の有意な高値がみられ、15 mg/kg 群の雌に脾臓相対重量の有意な低値が認められた。

剖検において、15 mg/kg 群の雌雄に総胆管の拡張がみられ、15 mg/kg 群の雄に肝臓の白色斑および腎臓の黄色斑が認められた。このうち、15 mg/kg 群の雌での総胆管の拡張は回復期間終了後のみに認められた。

病理組織学的検査において、15 mg/kg 群の雌雄に総胆管の増殖性炎がみられ、15 mg/kg 群の雄に骨髓（大腿骨）の赤血球系造血細胞の増加，肝臓の胆管増生，グリソン鞘における炎症性細胞浸潤および肉芽腫性炎，腎臓の硝子円柱，皮髄境界部の線維化および尿細管の壊死，皮質における再生性尿細管が認められた。ただし、15 mg/kg 群の雌での総胆管の増殖性炎は回復期間終了後のみに認められた。なお，一般状態観察で振戦など神経系への作用がみられたが，脳のヘマトキシリン・エオジン染色標本では器質的变化は認められなかった。

本試験で認められたほとんどの変化は，投与の休止により，回復性あるいは回復傾向が認められたが，15 mg/kg の雌雄で認められた剖検における総胆管の拡張および病理組織学的検査における総胆管の増殖性炎については，回復性を確認することができなかった。この他，回復期間終了後には，15 mg/kg 群の雄に病理組織学的検査における腎臓の再生性尿細管，尿検査における類円柱が認められた。しかし，再生性尿細管は障害された尿細管の修復像であること，他の尿細管壊死等の病理組織学的変化は回復したことから，腎臓の変化には回復性があると考えられた。また，類円柱は腎臓の尿細管の基質性変化に伴う変化と考えられることから，回復性があると考えられた。

以上の結果から，本試験条件下における MPAA の無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 5 mg/kg/day と判断した。

## 5.2 生殖毒性試験

### 5.2.1 DPAA ラット催奇形性試験

コード番号： B-1

試験番号： B041215

DPAA を 0, 0.3, 1.0 および 3.0 mg/kg の用量で SD 系ラット [Crj:CD(SD) IGS, SPF] の妊娠 7 日から 17 日（胎児器官形成期）まで反復経口投与し，母動物および胚・胎児に及ぼす影響を検討した．各群の妊娠動物数はいずれも 22 匹であった．

#### 群構成

群名	交尾動物数（妊娠動物数）
対照	22 (22)
0.3 mg/kg	22 (22)
1.0 mg/kg	22 (22)
3.0 mg/kg	22 (22)

#### 母動物の観察・測定項目

##### 一般状態

投与期間は 1 日 2 回（投与前，投与後約 30 分）観察し，他の期間は 1 日 1 回午前中に観察した．

##### 体重

妊娠 0, 7, 10, 14, 17 および 20 日に測定した．測定には動物用天秤（UX4200H：株式会社島津製作所）を用いた．また，妊娠 7 日の体重を基準に体重増加量を算出した．

##### 摂餌量

妊娠 0, 7, 10, 14, 17 および 20 日に風袋込み重量を測定し，各測定日間の 1 匹あたりの 1 日平均摂餌量を算出した．測定には動物用天秤（UX4200H：株式会社島津製作所）を用いた．摂餌量は各測定期間の終了日で表示した．

##### 剖検

妊娠 20 日（帝王切開日）に，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の尾静脈内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈を切断・放血し，安楽死させた後，胸腔および腹腔内の器官・組織を肉眼的に検査した．死亡動物は速やかに剖検した．死亡した 3.0 mg/kg 群の雌 1 例（動物番号 50412）の肝臓，腎臓，心臓，胸腺，胃，小腸および子宮，他の動物では胎盤および羊膜に肉眼的異常が認められたため当該器官・組織を摘出し，10 vol%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した．比較対照として対照群の 3 例の当該器

官・組織を同様にして保存した。

## 胚・胎児の検査項目

### 帝王切開時の検査

妊娠 20 日の剖検時に卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚数（早期死亡胚数：着床痕数＋胎盤遺残数、後期死亡胚数：浸軟胎児数＋死亡胎児数）および胎盤を肉眼的に検査した。また、検査結果に基づき次の項目を算出した。

着床前胚死亡率 (%)：(黄体数－着床数) / 黄体数 × 100

着床後胚死亡率 (%)：(早期死亡胚数＋後期死亡胚数) / 着床数 × 100

総胚死亡率 (%)：{(黄体数－着床数)＋早期死亡胚数＋後期死亡胚数} / 黄体数 × 100

生存胎児は、臍動静脈切断による放血で安楽死させ、性別および口腔を含む外表を検査した後、個体ごとに体重を電子天秤（EB-620S：株式会社島津製作所）を用いて測定した。各腹ごとに約半数の生存胎児を内臓検査、残りの生存胎児を骨格検査に供した。死亡動物の胎児は、可能な限り生死および外表を検査した。

### 内臓検査

ホルマリン・酢酸混合液で胎児を固定した後、対照群と 3.0 mg/kg 群について頭部を Wilson 氏法、頸部、胸部および腹部を顕微解剖法により、内臓異常（奇形および変異）の有無を検査した。検査の結果、被験物質の影響がないと判断したため 0.3 および 1.0 mg/kg 群の検査は行わなかった。

### 骨格検査

骨格標本に供した全胎児について、アリザリンレッド S 骨格染色標本を作製した。対照群と 3.0 mg/kg 群について骨格異常（奇形および変異）の有無および骨化進行度（頸椎椎体、胸骨、中手骨、中足骨、仙・尾椎椎体の骨化数を指標とする）を検査した。検査の結果、被験物質の影響がないと判断したため 0.3 および 1.0 mg/kg 群の検査は行わなかった。

## 結果および結論

母動物に対する影響として、3.0 mg/kg 群で神経症状と考えられる易刺激性および振戦が妊娠 16 日以降 6/22 例および 2/22 例に観察された。振戦を呈した動物のうち 1 例は、その後全身状態が急激に悪化し、神経症状のほか自発運動の低下、腹臥位、膣口出血、貧血様症状および下腹部の汚れが認められ、妊娠 19 日に死亡した。また他の 1 例は膣口出血および下腹部の汚れが認められた。3.0 mg/kg 群では体重増加の抑制および摂餌量の低値が認められた。剖検では、死亡動物で肝臓、腎臓、心臓、胸腺、胃および小腸に変化がみられたが、帝王切開動物では死亡動物と同様な変化は認められなかった。帝王切開時の剖検で羊膜の暗黄色化が 3.0 mg/kg 群の 7/14 例に認められたが、胎児の死亡あるいは奇形は認められず、羊膜の暗黄色化

と胎児との間に関連はなかった。

胚・胎児発生に対する影響としては、高用量の 3.0 mg/kg 群においても、黄体数、着床数、着床後の死亡胚数、胚死亡率、生存胎児数、性比および胎盤所見では被験物質に起因する変化は認められなかった。また、胎児の外表面、内臓および骨格検査のいずれにも、被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、同群の生存胎児体重（雌雄）の高値および頸椎椎体数、胸骨数、仙・尾椎椎体数の高値が認められた。しかし、これらは背景データ内の変動であったことから、偶発変化と判断した。

0.3 および 1.0 mg/kg 群では、母動物および胚・胎児に対して、いずれの検査においても被験物質に起因する変化は認められなかった。

以上のように、母動物への影響として 3.0 mg/kg 群で死亡がみられ、さらに神経症状の発現、体重増加の抑制および摂餌量の減少が認められた。しかし、胚・胎児に死亡はなく、奇形および変異の増加も認められなかったことから、被験物質による胚致死作用、胎児発育抑制および催奇形作用はないと考えられる。したがって、本試験条件下における母動物に対する一般毒性学的無影響量 (NOEL) は 1.0 mg/kg/day、母動物の生殖機能および胚・胎児に対する無影響量 (NOEL) はともに 3.0 mg/kg/day と判断した。

## 5.2.2 DPAA ラット初期胚発生（受胎能～着床）に関する試験

コード番号： B-2

試験番号： B041587

DPAA を 0, 0.3, 1 および 3 mg/kg の用量で SD 系ラット [Cri:CD(SD), SPF] の交配前から交尾、着床までの期間に反復経口投与し、生殖能および初期胚発生に及ぼす影響を検討した。なお、第 1 次交配において 3 mg/kg 群の交尾率が低下したため、同群の交尾しなかった雌雄を対象に雄は無処置雌と、雌は妊孕能（にんようのう）の確認された対照群の雄を用いて第 2 次交配を実施した。

### 群構成

群名	雄	雌
対照	20	20
0.3 mg/kg	20	20
1 mg/kg	20	20
3 mg/kg	20	20
無処置雌	—	10

## 親動物の観察・測定項目

### 一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察し，他の期間は1日1回午前中に観察した。

### 体重

雌雄とも，投与開始日から剖検日まで週2回（3および4日間隔）測定した。交尾後の雌は妊娠0，3，7，10および13日に測定した。測定には動物用天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。また，体重増加量を交配前期間は雌雄とも投与開始日，雄の交配以降は第17日，雌の妊娠期間は妊娠0日の体重を基準に算出した。ただし，無処置雌は交尾確認後の妊娠0，7および13日に体重を測定した（体重増加量は算出しなかった）。

### 摂餌量

雌雄とも，ケージごとに投与開始日から交配開始日まで週2回（3および4日間隔），交尾後の雌は個体ごとに妊娠0，3，7，10および13日に風袋込み重量を測定し，1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。測定には動物用天秤（BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。摂餌量は測定期間の終了日で表示した。

無処置雌の摂餌量は測定しなかった。

### 剖検

剖検は雌雄とも，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後，胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した。死亡および瀕死動物は速やかに剖検した。すべての動物の精巣，精巣上体，前立腺腹葉，精嚢（凝固腺含む），卵巣および子宮を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。ただし，死亡動物以外の精巣はブアン液で固定した後，保存した。

死亡あるいは瀕死動物において，胸腺，眼球，腸腰筋，皮下（皮膚），脊髄，膀胱，胃～直腸，口腔，心臓，脳，下垂体，肝臓，総胆管，脾臓，腎臓，膵臓および肺に肉眼的異常がみられたため器官・組織を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。また，比較対照として対照群の3例の当該器官・組織も同様に保存した。

## 生殖機能検査

### 性周期

各群の雌について投与開始日から第1次交配開始日（同居日）まで毎日午前中に膣垢を採取して性周期を検査し，平均性周期日数および異常性周期動物の発現率を算出した。

第1次交配において交尾が確認されなかった3 mg/kg群の雌は，第1次交配の期間終了後から第2次交配開始日（同居日）までの間，同様に性周期を検査し，性周期が回帰するか否かを確認した。ただし，平均性周期日数および異常性周期動物の発現率は算出しなかった。

## 交配

交配開始日の16時以降、各群内で雄1雌1の交配対を設け、14日間を限度に昼夜同居させた(第1次交配)。交配開始日の翌日から雌の膣垢を毎日午前中に採取し、鏡検した。膣栓あるいは膣垢標本中に精子が認められた場合を交尾成立と判断し、その日を妊娠0日とした。第1次交配の結果、3 mg/kg 群で交尾の低下が疑われたため、第1次交配で交尾しなかった3 mg/kg 群の雌雄について第2次交配を実施した。雄は無処置雌と雄1雌1の交配対を設け、無処置雌の発情期が2回回帰するまで昼夜同居させた。雌は妊孕能が確認された対照群の雄と雄1雌1の交配対を設け、雌の発情期が2回回帰するまで、あるいは最大14日間を限度に昼夜同居させた。交尾成立の判断は第1次交配と同様とした。

なお、死亡などで交配対が成立しない動物は交配を行わなかった。これらの結果から次の項目を算出した。

交尾所要日数(第1次交配)：交配開始後、交尾成立までに要した日数

交尾を逸した発情期の回数(第1次交配)

交尾率(%)： $(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$

受胎率(%)： $(\text{受胎動物数} / \text{交尾動物数}) \times 100$

## 胚の検査

妊娠中期帝王切開

妊娠13日に卵巣および子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数(早期死亡胚数：着床痕数+胎盤遺残数、後期死亡胚数：浸軟胚数+心停止胚数)および胎盤を肉眼的に検査した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は10v/v%硫化アンモニウム水溶液に浸漬し、着床の有無を確認した。検査結果に基づき次の項目を算出した。

着床前胚死亡率(%)： $\{(\text{黄体数} - \text{着床数}) / \text{黄体数}\} \times 100$

着床後胚死亡率(%)： $\{(\text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}) / \text{着床数}\} \times 100$

総胚死亡率(%)： $[(\text{黄体数} - \text{着床数}) + \text{早期死亡胚数} + \text{後期死亡胚数}] / \text{黄体数} \times 100$

## 結果および結論

親動物に対する一般毒性学的影響として、3 mg/kg 群で死亡が雄6/20例、雌2/20例、瀕死期解剖動物が雄2/20例、雌1/20例に認められた。一般状態観察では3 mg/kg 群の死亡、瀕死および生存動物ともに、易刺激性、振戦、間代性あるいは強直性痙攣がみられ、同群では投与回数の増加と共に全身状態が悪化し、痩せ、側臥位、自発運動の低下、歩行異常、緩徐呼吸、体温低下、被毛状態の異常、貧血様、鼻周囲あるいは下腹部の汚れ、眼球の異常所見(膨大、破裂、変色)が認められた。3 mg/kg 群の雌雄に体重および摂餌量の低値が認められた。剖検では3 mg/kg 群の雌雄に胸腺の小型、総胆管の硬化および眼球の混濁、雄で肝臓の腫大が認められた。なお、各被験物質投与群とも被験物質に起因する生殖器系への異常所見は認められなかった。

生殖機能に対する影響として、第1次交配において3 mg/kg 群に交尾率の低下がみられ、第2次交配でも3 mg/kg 群の雄に交尾例数の低下が認められた。交尾率の低下は状態悪化に伴う



二次的な影響として現れた変化と考えられる。受胎率については被験物質に起因する影響は認められなかった。

妊娠中期の帝王切開において、第1次交配で交尾した3 mg/kg 群の雌では黄体数、着床数および生存胚数の低値、早期死亡胚数、着床前後ならびに総胚死亡率の高値が認められた。さらに第2次交配で対照群の雄と交尾した3 mg/kg 群の雌では、黄体数、着床数および生存胚数の低値傾向など前述と同様な変化を示した。3 mg/kg 群の雄と交尾した無処置雌では胚死亡は観察されず、着床した胚のすべてが妊娠中期まで生存していた。これらのことから初期胚発生への影響を雌側より考察すると、母体毒性により吸収胚が増加することや、制限給餌（栄養状態不良）により黄体数の低下を招くことが知られており、一般状態の悪化に伴う二次的な影響であった可能性も考えられる。しかし、黄体数については第2次交配においても明らかに低値傾向を示していることから、状態悪化に伴うものだけでなく、これらを含め何らかの機序で排卵数（黄体数）の低下を招いたものと推察された。

一方、雄側から考察すると、28日間反復投与毒性試験では高用量（5 mg/kg 群）の雄に組織学的変化として精巣の変性がみられたこと、ほ乳類細胞を用いた染色体異常試験では陽性と判定されたことから、状態悪化に伴う影響と雄性生殖器への直接的な影響により生じた変化の可能性が考えられる。

以上のように、本試験条件下における、親動物に対する一般毒性学および生殖機能に対する無影響量 (NOEL), ならびに初期胚発生に対する無影響量 (NOEL) は、いずれも 1 mg/kg/day と考えられる。

### 5.2.3 DPAA ラット出生前後の発生・母動物に関する試験

コード番号： B-3

試験番号： B041589

DPAA を 0, 0.1, 0.3 および 1 mg/kg の用量で SD 系ラット [CrI:CD(SD), SPF] の妊娠 7 日から分娩を経て哺育 20 日まで経口投与し、母体の機能、胚の発生および出生児の発生、成長、行動、学習および生殖機能に及ぼす影響を検討した。各群の妊娠動物数はいずれも 24 匹であった。

#### 群構成

群名	交尾動物数 (妊娠動物数)
対照	24 (24)
0.1 mg/kg	24 (24)
0.3 mg/kg	24 (24)
1 mg/kg	24 (24)

## **F0 母動物の観察・測定項目**

### 一般状態

投与期間は1日2回（投与前，投与後約30分）観察し，他の期間は1日1回午前中に観察した。

### 体重

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に測定した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。また，妊娠期間は妊娠7日，哺育期間は哺育0日の体重を基準に体重増加量を算出した。

### 摂餌量

妊娠0，7，10，14，17および20日，哺育0，4，7，10，14，17および21日に風袋込み重量を測定し，各測定日間の1匹あたりの1日平均摂餌量を算出した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。摂餌量は各測定期間の終了日で表示した。

### 分娩および哺育の観察

分娩の観察は妊娠21日から23日まで1日2回（午前9時，午後4時）行った。午後4時までに分娩が完了した動物を当該日分娩とした。哺育の観察は1日1回とし，授乳，営巣，食殺の有無等を中心に哺育21日まで行った。分娩動物は哺育21日に子宮を摘出して着床数を検査した。これらの検査結果から次の項目を算出した。

妊娠期間：妊娠0日から分娩日までの日数

出産率（%）： $(\text{生存児出産雌数}/\text{受胎雌数}) \times 100$

出生率（%）： $(\text{出生生存児数}/\text{着床数}) \times 100$

### 剖検

分娩動物は哺育21日に，ペントバルビタールナトリウム（ネンブタール注射液，大日本製薬株式会社）の腹腔内投与による麻酔下で開腹し，腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後，胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した。対照群で2例，0.1 mg/kg群で1例に異常所見が認められたため，異常部位を10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。また，比較対照として対照群3例の当該器官・組織も同様にして保存した。

## **F1 動物の観察・検査項目**

### 児数調整

生後4日に同腹児数を無作為に8匹（原則として雌雄同数）に調整した。同腹児数が8匹に満たない場合はそのまま飼育した。いずれも同腹内個体番号は雄から無作為に付けた。児数調整時に除外した動物は炭酸ガス吸入により安楽死させ，10 v/v%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。

### 離乳時の振り分け

各腹から生殖機能検査用および行動試験用動物としてそれぞれ雌雄各 1 匹を同腹内個体番号の小さい順に選抜し、離乳後の検査に供した。1 mg/kg 群の 2 腹（動物番号 50404, 50414）では、同腹児の雌雄どちらかが 1 匹以下であったため生殖機能検査用あるいは行動試験用動物を確保することができなかった。その他の動物は生後 21 日に剖検した。

### 観察

出生日に出生児数（生存児数，死亡児数），性別および口腔内を含む外表異常の有無を検査した。その後は一般状態，死亡の有無等を毎日観察した。出生日，生後 4 および 21 日の生存児数から，次の項目を算出した。

出生時生存率（%）：（出生生存児数 / 出生児数）× 100

4 日生存率（%）：（生後 4 日の生存児数 / 出生生存児数）× 100

離乳率（%）：（離乳時の生存児数 / 児数調整後の生存児数）× 100

### 体重

離乳前は，全例について出生日，生後 4，7，14 および 21 日に個体ごとに測定した。離乳後は生殖機能検査用動物について生後 28，35，42，49，56，63 および 70 日に測定した。生殖機能検査で交尾が確認された雌は妊娠 0，7 および 13 日に測定した。測定には動物用天秤（UX4200H，BX3200H：株式会社島津製作所）を用いた。

体重増加量を見数調整前は生後 0 日および 4 日の体重より同腹児単位で腹平均ごとに，見数調整後は個体ごとに離乳までは生後 4 日の体重，離乳後は生後 21 日の体重を基準に算出した。また，生殖機能検査の妊娠期間は妊娠 0 日の体重を基準に体重増加量を算出した。

### 生後形態分化

見数調整前は全例について，耳介展開の発現を生後 2～4 日に観察し，発現率を算出した。離乳前は全例について，上切歯萌出を生後 6 日から，眼瞼開裂を生後 10 日からそれぞれの発現日まで観察した。離乳後は生殖機能検査用動物について，膣開口（雌）を生後 27 日から，陰茎亀頭包皮分離（雄）を生後 35 日からそれぞれの発現日まで観察し，その発現日の体重も測定した。

### 反射反応性

生後 19 日に次の項目を検査し，陽性率を算出した。

平面正向反射，角膜反射，聴覚性驚愕反応，疼痛反応，空中正向反射，瞳孔反射

### 行動試験

行動試験用動物は 4 週齢以降に次の検査を行い，検査終了後に剖検した。ただし，オープンフィールド試験については，4～5 週齢の検査において被験物質投与群の雄で立ち上がり回数および身繕いまたは洗顔回数が減少したため，生殖機能検査用動物の雌雄についても 8～9 週

齢に検査を行った。なお、0.1 mg/kg 群の 1 例（行動試験用動物：10205-2）が生後 34 日に人為的な操作ミス（動物を床へ落下）により歩行の異常を示したため、ロータロッド試験は実施しなかった。オープンフィールド試験および Beil 型水迷路学習試験は実施したが、データ集計から除外した。

#### オープンフィールド試験

##### ※装置と検査室

装置：円形フィールド（80φ×60H cm，25 区画，トキワ科学器械株式会社）

照度：約 100 Lux

騒音：約 75 dB

装置のセッティング：円形フィールド中央上部約 60cm の高さから照明し，円形フィールドの中央部分が約 100 Lux となるよう調整した。さらに，背景音として約 75 dB のホワイトノイズを発生させた。

検査室：消灯した動物のいない検査室

##### ※動物と観察

週齢：4～5 週齢（行動検査用動物の雌雄），8～9 週齢（生殖機能検査用動物の雌雄）

試行回数：1 日

試行回数：1 回（目視検査）

観察時間：3 分間／試行

観察時刻：4～5 週齢（行動検査用動物の雌雄），雄；13:27～16:35，雌；13:09～15:15

8～9 週齢（生殖機能検査用動物の雌雄），雄；13:05～15:25，雌；13:13～15:16

観察手順：観察者および観察時刻に群の偏りが生じないように観察予定表を作成し，それに基づいて観察を行った。検査対象動物を専用の移動容器に入れて検査室へ移動し，フィールド中央区画に静かに置いた。約 10 秒後に容器を取除いた時点から観察を開始した。3 分間の観察終了ごとにフィールドを十分に清掃し，糞尿，臭気などを除去した。観察は飼育作業のない午後に行い，雌雄は観察日を変えて実施した。

観察項目：行動潜時，区画移動数，立ち上がり回数，身繕いまたは洗顔回数，脱糞数，排尿回数

（目視により検査実施）

#### ロータロッド試験

週齢：4～5 週齢

装置：ロータロッドテスト装置（ロッド径：90 mm，KN-75：株式会社夏目製作所）

条件：累積歩行時間 3 分間（10 rpm.，前方歩行）

項目：落下回数，歩行状態

#### Beil 型水迷路学習試験

週齢：雄 5～6 週齢，雌 6～7 週齢

装置：Biel 型水迷路装置（145W×145D×30H cm，岡崎産業株式会社）