

## 添付資料

- リンデンのラットを用いた2世代繁殖毒性試験 -

## 試験実施概要

1. 表 題 : リンデンのラットを用いた 2 世代繁殖毒性試験  
(試験番号: 8L784)
2. 試験目的 : リンデンを用いて, OECD 等のガイドラインを参考にした内分泌攪乱作用検出のための毒性指標を加えたラットの 2 世代繁殖毒性試験を実施し, その妥当性を検討する .
3. 参考ガイドライン :  
農薬の生殖毒性試験ガイドライン改定案 ( 農薬リスク評価試験ガイドライン策定調査, 1998 )  
OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Revised Draft Guideline 416 (Draft document), Two-Generation Reproduction Toxicity Study (1998)  
US EPA Health Effects Test Guidelines, OPPTS 870.3800, Reproduction and Fertility Effects (1998)
4. 試験委託者 : 環境省環境管理局水環境部土壤環境課農薬環境管理室  
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2 番 2 号
5. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
6. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所  
茨城県鹿島郡波崎町砂山 14 番地  
( 血中ホルモン濃度分析 )  
第一化学薬品株式会社  
茨城県那珂群東海村 2117

7. 試験責任者 : 松浦 郁夫  
株式会社三菱化学安全科学研究所  
鹿島研究所 毒性第1研究部
8. 分担責任者 : (調剤分析) 鈴木 美江  
(血中ホルモン濃度測定) 豊田 直人  
(薬物代謝酵素活性測定) 岩田 宏  
(病理検査) 涌生 ゆみ
9. 試験日程 : F0 動物入荷 1999年3月31日  
F0 動物投与開始 1999年4月12日  
F0 動物交配 1999年6月21 ~ 28日  
F0 動物分娩 1999年7月14 ~ 17日  
F1 動物離乳 1999年8月4 ~ 7日  
F1 動物交配 1999年10月25日 ~ 11月14日  
F1 動物分娩 1999年11月17 ~ 29日  
F2 動物離乳 1999年12月8 ~ 15日

# 目 次

要 約.....	1
緒 言.....	4
材料および方法.....	6
1. 被験物質.....	6
2. 試験動物.....	6
3. 動物飼育.....	6
4. 投 与.....	7
5. 被験物質混合飼料の調製.....	8
6. 群構成.....	8
7. 観察・検査項目.....	8
7.1 親動物 (F0, F1) の観察・検査項目.....	8
7.1.1 被験物質摂取量.....	8
7.1.2 一般状態.....	9
7.1.3 体 重.....	9
7.1.4 摂餌量.....	9
7.1.5 摂餌効率.....	9
7.1.6 繁殖機能.....	9
7.1.7 病理学的検査.....	11
7.1.8 血中ホルモン濃度測定.....	12
7.2 児動物 (F1, F2) の観察・検査項目.....	13
7.2.1 生存率および一般状態.....	13
7.2.2 体 重.....	13
7.2.3 肛門・生殖結節間距離.....	14
7.2.4 乳頭発達.....	14
7.2.5 生後形態分化.....	14
7.2.6 性成熟.....	14
7.2.7 反射反応性.....	14

7.2.8 行動機能 .....	14
7.2.9 病理学的検査 .....	15
7.3 薬物代謝酵素活性測定 .....	16
8. 統計学的解析 .....	17
結 果 .....	18
1. 親動物に及ぼす影響 .....	18
1.1 被験物質摂取量 .....	18
1.2 一般状態 .....	18
1.3 体 重 .....	19
1.4 摂餌量 .....	19
1.5 摂餌効率 .....	19
1.6 繁殖機能に及ぼす影響 .....	20
1.7 病理学的検査 .....	21
1.8 血中ホルモン濃度 .....	23
2. 児動物に及ぼす影響 .....	24
2.1 生存率および一般状態 .....	24
2.2 体 重 .....	24
2.3 肛門・生殖結節間距離 .....	25
2.4 乳頭発達 .....	25
2.5 生後形態分化 .....	25
2.6 性成熟 .....	25
2.7 反射反応性 .....	25
2.8 行動機能 .....	25
2.9 病理学的検査 .....	26
3. 肝臓薬物代謝酵素活性 .....	26
考察および結論 .....	28
参考文献 .....	33
図 .....	38

結果概要表.....	41
1. 親動物の結果概要.....	41
2. 児動物の結果概要.....	46
3. 肝薬物代謝酵素活性.....	50
写 真.....	51

最終ページ 61

別冊 1 ( Figures and Tables )

別冊 2 ( Appendices )

## 要 約

環境省の「農薬生殖毒性総合評価体系確立調査研究」の一環として、我が国で策定すべき内分泌攪乱作用を含む農薬リスク評価試験ガイドラインの検討に必要な情報を得ることを目的とし、エストロゲン系の内分泌攪乱作用の報告があるリンデンを用いて、内分泌攪乱作用検出するための指標を追加したラットの2世代繁殖毒性試験を実施し、その妥当性を検討した。すなわち、リンデンを混餌法により Crj:CD(SD)IGS ラットの雌雄に 10, 60 および 300 ppm の濃度で交配前 10 週間、交配、妊娠および哺育期間を通して2世代にわたり経口投与し、従来の毒性指標に加えて、肛門・生殖結節間距離 (Anogenital distance, AGD)、乳頭発達、性成熟 (膻開口および包皮分離)、性周期、精子形成、生殖器官重量および血中ホルモン濃度 (甲状腺ホルモン、性ホルモン) を検査した。また、リンデンには神経系への影響を示唆する報告があることから、F1 動物について情動性 (open field test)、運動協調機能 (rotarod test)、学習機能 (pole-climbing test) を検査した。さらに、データ解析の参考のため、肝薬物代謝酵素活性を測定した。親動物における交配前の平均被験物質摂取量は 10, 60 および 300 ppm 群でそれぞれ F0 動物の雄が 0.565, 3.43 および 17.2 mg/kg/day、雌が 0.617, 3.75 および 19.0 mg/kg/day、F1 動物は雄が 0.739, 4.53 および 23.3 mg/kg/day、雌が 0.799, 4.85 および 25.2 mg/kg/day であった。

リンデンを2世代にわたり投与した結果、親動物への一般毒性学的影響、繁殖機能への影響および児動物の発育への影響は認められたものの、内分泌攪乱作用検出のために追加した指標については明確な変化は認められなかった。すなわち、親動物への一般毒性学的影響として、F0 および F1 動物ともに 300 ppm 群において雌雄で体重増加抑制および摂餌量減少、雌で死亡が認められた。また、F1 動物では 300 ppm 群の雌で妊娠末期に痙攣、分娩後にいらいら等の過敏性が観察された。病理検査では、F0 および F1 動物とも肝臓の重量増加を伴った小葉中心性肝細胞肥大が 10 あるいは 60 ppm 以上の群の雌雄、腎臓の重量増加を伴った近位尿細管上皮の硝子滴増加および好塩基性尿細管が 10 ppm 以上の群の雄で認められた。内分泌系器官では、下垂体重量の減少が 300 ppm 群の F0 動物の雌、F1 動物の雌雄、副腎重量の増加が 300 ppm 群の F1 動物の雌雄で認められたが、これらの変化と関連する組織学的異常は認められず、内分泌攪乱を示唆する変化はなかった。また、甲状腺ろ胞上皮の肥大が F0 動物では 300 ppm 群の雌、F1 動物では 60 ppm 以上の群の雄で認められ、血中甲状腺ホル

モン濃度測定において F0 および F1 動物とも T3 あるいは T4 の低下または低下傾向が 300 ppm 群の雌雄で認められた。肝薬物代謝酵素活性の測定では甲状腺ホルモン抱合酵素である T4-UDP-GT 活性の上昇が認められたことから、甲状腺の組織変化および血中甲状腺ホルモン濃度の変化については、肝臓における薬物代謝酵素誘導に伴った二次的变化と考えられた。生殖器の重量および病理組織学的検査ならびに血中性ホルモン濃度においては雌雄ともリンデンに起因する変化は認められなかった。なお、肝薬物代謝酵素活性測定の結果、F0 および F1 動物の雌雄とも 10 ppm 群から用量依存的な活性の上昇が認められた (BROD >> EROD > MROD, T-6β-OH, T4-UDP-GT)。したがって、リンデンは CYP2B 分子種に対する誘導作用が最も強い化合物であるが、CYP1A, CYP3A および UDP-GT 等の複数の薬物代謝酵素に対しても誘導作用を有することが示唆された。

繁殖機能への影響として、300 ppm 群の F1 母動物で授乳行動あるいは児の回集行動の欠如等、哺育行動の異常とそれに伴う F2 動物の全出産児死亡が認められた。哺育機能への影響については、F1 母動物で痙攣および過敏性が観察されていることから、リンデンによる神経系への影響による可能性が考えられた。性周期、精子形成、交尾能、受胎能、妊娠および分娩にはリンデンの影響は認められなかった。

児動物への影響として、雌雄の F1 および F2 児動物に、60 ppm 以上の群で体重増加抑制、300 ppm 群で胸腺および脾臓重量の減少が認められた。また、F2 児動物では 300 ppm 群で母動物の哺育異常に起因した生存率の低下が認められた。さらに、離乳後の F1 動物 (F1 親動物) では 300 ppm 群で雌雄とも性成熟 (雄: 包皮分離, 雌: 膣開口) の遅延が認められた。これらのうち、胸腺および脾臓重量の変化については、対応する組織学的異常は認められなかったこと、および F1 親動物の剖検では異常がみられなかったことから、これらの変動は発育抑制に伴った変化と考えられた。また、性成熟の変化についても、被験物質の内分泌活性に基づく場合は、アンドロゲン作動系またはエストロゲン作動系のいずれか一方がより強く阻害されると推測されるにもかかわらず、今回は雌雄ともに遅延が認められたことから、発育抑制に伴った変化と考えられた。内分泌攪乱作用検出のために追加した肛門・生殖結節間距離および乳頭発達には、雌雄とも変化は認められなかった。また、F1 動物の行動検査においても、情動性、運動協調機能および学習機能のいずれにも明確な変化は認められなかった。

以上のように、リンデンでは親動物に死亡等の重篤な毒性が発現する用量でもいずれの世



代においても内分泌攪乱作用の検出のために追加した指標に明確な変化は認められなかった。リンデンはエストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を有するとの報告があるが、環境省のプロジェクトにおいて実施されたリンデンの uterotrophic assay および Hershberger assay では、エストロゲン様作用および抗エストロゲン作用は検出されず、アンドロゲン様作用および抗アンドロゲン作用も認められなかったことが報告されている。少なくともこれらの結果から、エストロゲン作動系とアンドロゲン作動系に関しては、in vivo 試験でリンデンの影響について再現性を得ることは困難と考えられる\*。したがって、試験方法の妥当性を検証する観点からは、さらに内分泌活性が明確な他の物質を用いた試験を実施して知見を集積し、検討する必要があると考えられる。

なお、過去に実施された 100 ppm を最高用量としたリンデンの 3 世代繁殖毒性試験では、次世代および繁殖機能への影響はなかったことが報告されている。しかし、本試験において最大耐量付近の用量である 300 ppm を投与することにより、次世代の発育および繁殖機能への影響が捉えられた。このことから 2 世代繁殖毒性試験において適切な用量を設定すれば、化学物質の生殖発生毒性をより鋭敏に検出できるものと考えられる。

---

\*：エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を有すると考えられている他の物質を用いた試験では、今回変化がみられなかった毒性指標に変化が認められている（You *et al.*, 2002; Ashby *et al.*, 1997; Sharpe *et al.*, 1995; Newbold *et al.*, 1983; Yamasaki *et al.*, 2005; Chamness *et al.*, 1979; Clevenger *et al.*, 1998）。例えば、性周期、精子検査、離乳時の子宮重量、血中エストロゲン濃度を測定項目に加えた 2 世代繁殖毒性試験がメトキシクロルにおいて国内で実施されている。この試験では、メトキシクロルの投与により性周期の延長、精子数の減少、離乳時の子宮重量の増加、血中エストロゲン濃度の減少が確認された（Aoyama and Suzuki, 2003）。また、本プロジェクトの一環として同一試験方法により抗アンドロゲン作用を有するピンクロゾリンを用いた 2 世代繁殖毒性試験を実施した結果、内分泌攪乱作用検出のために追加した指標で変化が捉えられている。

## 緒 言

農薬等の化学物質が生体の繁殖機能に及ぼす影響の評価については、従来からラット等のげっ歯類を用いた2世代繁殖毒性試験が実施され、そのためのガイドラインが各国で制定されている。その内容は交尾能や受胎能への影響の評価を主眼としたものであるが、毒性学の進歩に伴い、それらの毒性指標は検出感度が必ずしも高いものではないとの指摘も見受けられる (Takayama *et al.*, 1995)。そのような中、1996年にコルボーンらの“ Our Stolen Future (奪われし未来)” が出版され (Colborn *et al.*, 1996)、野生生物の繁殖障害 (Grier, 1982; Hunt and Hunt, 1977; Gibbs *et al.*, 1991; Guillette *et al.*, 1994; Facemire *et al.*, 1995) やヒトにおける精子数の減少、生殖器の形態異常、精巣あるいは前立腺癌の増加傾向等の報告 (Carlsen *et al.*, 1992; Chambers and Malone, 1999; Weir *et al.*, 1999; Fleming *et al.*, 1999) と相まって、その原因としての内分泌攪乱化学物質の危険性がクローズアップされた。しかし、従来の試験法は必ずしも化学物質の内分泌攪乱作用を検出するために設計されたものではないため、各国で毒性指標が見直しされ、内分泌攪乱作用の評価も含めたガイドラインの改定が行われている (農林水産省, 2000; OECD, 2001; USEPA, 1998)。

本研究は、これらの状況を踏まえて企画された環境省の「農薬生殖毒性総合評価体系確立調査研究」の一環として、我が国で策定すべき内分泌攪乱作用を含む農薬のリスクを詳細に評価するための試験ガイドラインの検討に必要な情報を得ることを目的とし、エストロゲン作動系に対して内分泌攪乱作用を有するとの報告があるリンデンを参照物質に用いて、内分泌攪乱作用検出のための指標を加えたラットの2世代繁殖毒性試験を実施し、その妥当性について検討を試みたものである。

リンデンは、我が国では1949年に殺虫剤として登録された農薬で、1972年には登録が失効している。内分泌攪乱作用として、エストロゲン様 (Raizada *et al.*, 1980) あるいは抗エストロゲン作用 (Uphouse and Williams, 1989; Chadwick *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1989) を有するとの報告がある。また、ラットへの投与で雄の精巣障害、精子数減少 (Dalsenter *et al.*, 1996)、雌の性周期の延長、および膣開口の遅延 (Uphouse and Williams, 1989; Chadwick *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1989) が、哺育中の母動物への投与で次世代の雄の精巣障害、精子数減少 (Dalsenter *et al.*, 1997) が誘発されると報告されている。

本研究においては、従来の2世代繁殖毒性試験に内分泌攪乱作用検出のための指標としてAGD、乳頭発達、性成熟、性周期、精子形成、生殖器官重量、血中ホルモン濃度等の検査を

加えた試験を実施し、本試験法の内分泌攪乱作用を含めた生殖発生毒性試験としての有用性について検討した。

## 材料および方法

### 1. 被験物質

和光純薬工業株式会社から入手したリンデン（ロット番号：PAF1029，純度：99.5%）を室温で保管し，試験に使用した．被験物質は下記の化学名，分子式，分子量および構造式を有する水に不溶，エタノール，アセトンに易溶の無色・無臭の結晶性粉末である．

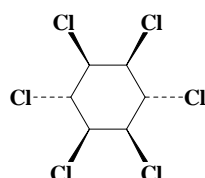
化学名 : 1 $\alpha$ , 2 $\alpha$ , 3 $\beta$ , 4 $\alpha$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$  - hexachlorocyclohexane (gamma-isomer)

CAS No. : 58-89-9

分子式 : C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>Cl<sub>6</sub>

分子量 : 290.83

構造式 :



### 2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社（筑波飼育センター）から入手した SD ラット（Crj:CD(SD)IGS, SPF）を入荷後 12 日間検疫・馴化し，健康状態が良好であることを確認した後，試験に供した．雌雄とも投与開始 3 日前に体重別層化無作為抽出法により，各群の平均体重がほぼ均一になるように群分けした．F0 動物の投与開始時の週齢は雌雄とも 6 週齢，体重範囲は雄が 227～271 g，雌が 161～191 g であった．

F0 動物は，検疫・馴化期間は油性ペンによる尾へのマーキング，群分け以降は耳パンチ法により個体識別した．出生後の F1 および F2 動物は，児数調整後から離乳までは四肢掌部および尾への入墨法，離乳後は耳パンチ法により個体識別した．ケージには試験種，試験番号，被験物質名，動物番号，性別，用量または群名，動物種および系統などの必要事項を記載したラベルを付けた．

### 3. 動物飼育

検疫・馴化を含めた全飼育期間を通じて，温度 22 $\pm$ 2 ，相対湿度 55 $\pm$ 15%，換気約 12 回/時（オールフレッシュエアー供給），照明 12 時間/日（7:00 - 19:00）に自動調節した飼育室を使用した．

動物は、実験動物用床敷（ベータチップ、日本チャールス・リバー株）を敷いたポリカーボネート製ケージ（265W×426D×200Hmm、トキワ科学器械株）に1ケージあたり、検疫・馴化期間は2～3匹（同性）、群分け後は2匹（同性）、交配期間は雌雄各1匹、妊娠期間は雌1匹、哺育期間は1腹、F1動物の離乳後は2匹（同性）で収容し、前後面透明樹脂付不織布製フィルターキャップ（トキワ科学器械株）を装着してスチール製架台（トキワ科学器械株）上で飼育した。ケージの配置場所は妊娠および哺育期間を除き、週1回ローテーションした。給餌にはステンレス製粉末飼料用給餌器（トキワ科学器械株）を、給水にはポリカーボネート製給水瓶（700 mL、トキワ科学器械株）を使用した。ケージ（含床敷）、給餌器、給水瓶およびフィルターキャップはオートクレーブ滅菌し、フィルターキャップは2週に1回、その他の飼育器材は週1回の頻度で交換した。

動物には、放射線滅菌した実験動物用粉末飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業株）と5 μmのフィルター濾過後、紫外線照射した水道水を自由に摂取させ、いずれも週1回交換した。飼料はロットごと、床敷は定期的に残留農薬等の汚染物質濃度が当研究所で定めた基準に適合していることを確認した。また、飲用水は水道法に準拠した水質検査を定期的に実施し、分析値が基準に適合していることを確認した。

#### 4. 投 与

投与経路は被験物質の人体への主な取り込み経路である経口とし、混餌法により投与した。投与期間はF0動物は6週齢から、雄は交配前10週間および交配期間を経て剖検日まで、雌は交配前10週間および交配期間を経てF1動物の離乳（分娩後21日）までとし、毎日投与した。F1動物は離乳時（3週齢）から、雄は交配前10週間および交配期間を経て剖検日まで、雌は交配前10週間および交配期間を経てF2動物の離乳（分娩後21日）までとし、毎日投与した。非分娩動物は交尾確認後26日以降の剖検日までとした。

投与用量は、同系統のラットを用いた4週間反復投与試験（用量：0, 50, 100, 200, 400 ppm, 雌雄各6匹/群）の結果を基に決定した。すなわち、雄では50 ppm以上の群で腎臓の重量増加と褪色、200 ppm以上の群で肝臓の重量増加、400 ppm群で投与初期の体重増加抑制傾向と摂餌量減少が認められた。また、雌では200 ppm群で体重増加抑制傾向と投与初期の摂餌量減少、400 ppm群で顕著な体重増加抑制と摂餌量減少および肝臓の重量増加が認められた。これらの結果および本試験の投与期間を考慮し、高用量には400 ppmと200 ppmの中間用量である300 ppmを設定し、以下公比約5で中用量は60 ppm、

低用量は 10 ppm とした。対照群には基礎飼料のみを給餌した。

## 5. 被験物質混合飼料の調製

各用量ごとに秤量した被験物質と飼料の一部を小型粉碎機（サンプルミル，協立理工（株））で粉碎混合した後，卓上万能ミキサー（ケンミックス，愛工舎製作所（株））および大型混合機（富士 W 型混合機，富士産業（株））を用いて段階的に飼料と混合し，所定の濃度の被験物質混合飼料を調製した。対照群の飼料は特に処理しなかった。調製後の飼料は投与に供するまで冷蔵飼料室に保管し，安定性が確認された期間内に使用した。

なお，飼料中の被験物質の均一性（上部，中間部，下部の濃度の C.V.値が 10%以内）および冷蔵保存条件下で 12 週間，飼育条件下で 3 週間の安定性（初期分析値の±10%以内）を 10 および 400 ppm の濃度で GC-FID 法により確認した。

また，使用した被験物質混合飼料の全ロットについて分析し，濃度がほぼ設定どおり（設定値±10%以内）であることを確認した。

## 6. 群構成

群 名	F0 動物		F1 動物 <sup>*3</sup>	
	雄	雌	雄	雌
対 照	24 <sup>*1</sup>	24	48	48
	(00101-00124) <sup>*2</sup>	(50101-50124)		
10 ppm	24	24	48	48
	(00201-00224)	(50201-50224)		
60 ppm	24	24	48	48
	(00301-00324)	(50301-50324)		
300 ppm	24	24	48	48
	(00401-00424)	(50401-50424)		

\*1：投与動物数。このうち，F0 および F1 動物とも雌雄各 4 例は肝薬物代謝酵素活性測定用とし，一部の検査（器官重量，血中ホルモン濃度，精子検査，病理組織学的検査）の対象外とした。

\*2：動物番号。

\*3：F1 動物は離乳時（生後 21 日）に各腹から継代用（F1 親動物）および諸検査用動物としてそれぞれ雌雄各 1 匹を選抜し，投与に供した。

## 7. 観察・検査項目

### 7.1 親動物（F0, F1）の観察・検査項目

#### 7.1.1 被験物質摂取量

被験物質混合飼料の濃度，各動物の体重および摂餌量から次式により算出した。さらに交配前期間，妊娠期間および哺育期間ごとの被験物質摂取量を算出した。

被験物質摂取量 (mg/kg/day) :

$$\{\text{摂餌量 (g/animal/day)} \times 10^3 \times \text{被験物質濃度 (ppm)} \times 10^{-6}\} / \text{体重(g)} \times 10^{-3}$$

#### 7.1.2 一般状態

1日1回以上観察し、少なくとも週1回は触診による詳細な観察を行った。

#### 7.1.3 体重

雄は投与開始日から剖検日まで週1回、雌は投与開始日から交尾成立まで週1回、交尾した雌は妊娠0(交尾確認日)、7、14、20日および哺育0(分娩完了日)、4、7、14、21日に測定した。また、体重増加量を交配前期間は投与開始日、妊娠期間は妊娠0日、哺育期間は哺育0日の体重を基準に算出した。

#### 7.1.4 摂餌量

雌雄ともケージごとに投与開始日から交配開始まで週1回、交尾した雌は個体ごとに妊娠0、7、14、20日および哺育0、4、7、14、21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。

#### 7.1.5 摂餌効率

各動物の体重および摂餌量から次式により算出した。

$$\text{摂餌効率(\%)} : 1 \text{日あたりの体重増加量(g)} / 1 \text{日あたりの摂餌量(g)} \times 100$$

#### 7.1.6 繁殖機能

##### 1) 性周期

交配開始前の2週間、毎日午前中に膣垢を採取して性周期を検査し、平均性周期日数を算出した。性周期が4~6日周期でないものは異常性周期とした。

##### 2) 交配

各群内で雄1雌1の交配对(F1動物は兄妹交配を避ける)を設け、14日間を限度に昼夜同居させ、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。これらの結果から次の項目を算出した。

交尾所要日数：交配開始後，交尾成立までに要した日数

交尾成立までに逸した発情期の回数

交尾率(%)：(交尾動物数/同居動物数) × 100

受胎率(%)：(受胎動物数/交尾動物数) × 100

### 3) 精子検査

交配期間終了後の剖検時に片側の精巣および精巣上体尾部を摘出した。全群について 精巣上体尾部の一部を切開して精子塊を採取し，1%BSA添加Medium 199中に精子を浮遊させ，精子自動解析装置（HTM-IVOS, Hamilton-Thorne Research）を用いて運動精子率を算出した。

精巣および精巣上体尾部は-20℃以下で凍結保存し，対照群および 300 ppm 群について，後日室温にて解凍後精製水を加えてホモジナイズしたものを測定用原液とし，上記装置を用いて精巣の精子細胞数（homogenization-resistant spermatid），精巣上体尾部の精子数を計測した。

また 運動精子率測定用サンプルを用いてエオジン Y 染色塗抹標本を作製し，対照群および 300 ppm 群について形態異常精子の発現率および Tailless sperm の発現率を算出した。

### 4) 分娩および哺育の観察

分娩の観察は，妊娠 21 日から 25 日まで 1 日 2 回（午前 9 時，午後 4 時）行い，午後 4 時までには分娩が完了した動物を当該日分娩とした。交尾確認後 25 日を経ても分娩しない場合は非分娩動物とした。

哺育の観察は 1 日 1 回とし，授乳，営巣，食殺の有無等を哺育 21 日まで観察した。

分娩動物は哺育 21 日以降，非分娩動物は交尾確認後 26 日以降に子宮を摘出して着床数を検査した。肉眼的に着床が認められない動物の子宮は 10% 硫化アンモニウム溶液に浸漬して着床の有無を確認し（Salewski, 1964），着床が認められない場合は非妊娠動物とした。これらの検査結果から以下の項目を算出した。

妊娠期間：妊娠 0 日から分娩完了日までの日数

出産率(%)：(生存児出産雌数/妊娠雌数) × 100

出生率(%)：(出產生存児数/着床数) × 100



## 7.1.7 病理学的検査

### 1) 器官重量

全生存動物について、剖検時に以下の器官重量を測定した。また、剖検時の体重を基に相対重量（対体重比）を算出した。甲状腺については、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で約 24 時間固定した後に摘出し、測定した（下線は内分泌攪乱作用検出を主眼とした項目を示す）。

脳，下垂体，甲状腺，胸腺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，精巢，精巢上体（全体および片側尾部），精囊（凝固腺および内容を含む），前立腺（腹葉），卵巢，子宮（頸部を含む）

### 2) 剖 検

雄は交配期間終了後\*，断頭・放血により安楽死させた後，頭部，胸腔および腹腔内器官・組織を肉眼的に検査した。交尾した雄は，射精から少なくとも 2 日間以上の回復期間を経た後，剖検した。

雌は分娩動物を哺育 21 日以降\*，非分娩動物を交尾確認後 26 日以降，未交尾動物を交配期間終了後 7～14 日に雄と同様に剖検した。

\*：肝代謝酵素活性を測定する動物は雌雄とも哺育終了後のほぼ同時期に剖検した。なお，離乳後に解剖する雌は剖検日の午前中に膈垢を採取し，性周期のステージを検査した。

死亡動物は発見後速やかに剖検した。また，瀕死動物および全出産児が死亡した母動物はその時点で，チオペンタールナトリウムによる麻酔下で腹大動脈を切断・放血により安楽死させた後，剖検した。

### 3) 病理組織学的検査

各群とも肝薬物代謝酵素活性を測定する動物の肝臓を除く全動物の以下の器官・組織を摘出し，10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定した後，対照群および 300 ppm 群の無作為に選抜した雌雄各 10 例の下線で示した器官・組織について，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，F1 動物の雌については痙攣が認められたため，脳，脊髄および坐骨神経も検査した。

脳，下垂体<sup>\*1</sup>，甲状腺，胸腺，肝臓，腎臓<sup>\*2</sup>，脾臓，副腎，精巢<sup>\*3</sup>，精巢上体<sup>\*4</sup>，精囊，凝固腺，前立腺（腹葉），卵巢<sup>\*5</sup>，卵管，子宮（頸部を含む），膈，全出産児が死亡した雌の乳腺，肉眼的異常部位<sup>\*6</sup>

\*1：F1 動物の雌の対照群および 300 ppm 群の下垂体についてはアザン染色標本を作製し，

鏡検した（重量減少がみられたため）。

- \*2：F0 および F1 動物の各群雄 4 例，対照群および 300 ppm 群の雌各 4 例は抗  $\alpha_{2u}$  グロブリン抗体（株パナファーム・ラボラトリーズ）を用いた免疫染色を行った。
- \*3：精巢はブアン液で固定した後，10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。
- \*4：精巢上体は片側の頭部，体部，尾部の縦断切片標本作製して検査した。
- \*5：F1 動物の卵巣については，左右ともほぼ中央部から 100  $\mu$ m おきに 3 切片，計 6 切片の標本作製し，原始卵胞および二次卵胞を計数した（Bolon *et al.*, 1997; Bucci *et al.*, 1997; Pedersen and Peter, 1968）。
- \*6：この他 F1 動物については 300 ppm 群の雌 2 例で妊娠期間中に痙攣が観察されたため，以後剖検に処する各群の雄（肝薬物代謝酵素活性測定動物）および雌（全例）の脊髄および坐骨神経を保存した。

検査の結果，F0 動物の雌雄の肝臓，雄の腎臓，雌の甲状腺，F1 動物の雌雄の肝臓および甲状腺，雄の腎臓において被験物質に起因すると思われる変化が認められたため，これらの器官・組織については各群の全例を検査した。

瀕死・死亡動物については，上記の器官・組織の他，胸腺，下顎リンパ節，脾臓，大腿骨骨髓，胸骨骨髓，心臓，鼻腔，肺，胃，脳，脊髄および乳腺，全出産児が死亡した母動物については乳腺を検査した。

#### 7.1.8 血中ホルモン濃度測定

雄は交配期間終了後に 12 匹，雌は哺育期間終了後，発情前期および発情後期を示すものをそれぞれ 6 匹選抜して検査に供した\*。雌雄とも，飼育室から搬出した後約 1 時間静置し，午後 1 時以降のほぼ一定時刻に無麻酔下で断頭採血した。採取した血液は室温で約 30 分間静置後遠心分離し，得られた血清を用いて以下の項目を第一化学薬品株式会社において測定した。血清は測定まで - 80 で保存し，測定施設への送付時はドライアイス凍結状態とした。

\*：300 ppm 群の F1 の雌については，全出産児死亡が多発し哺育期間終了時の母動物数が 10 例に  
なったため，半数ずつ発情前期および発情後期の検査に供した。

項目	性	測定法
Thyroid stimulating hormone (TSH)	雌雄	RIA 法
Triiodo thyronine (T3)	雌雄	RIA 法
Thyroxine (T4)	雌雄	RIA 法
Luteinizing hormone (LH)	雌雄	RIA 法
Follicle stimulating hormone (FSH)	雌雄	RIA 法
Prolactin (PRL)	雌雄	RIA 法
Testosterone (T)	雄	RIA 法
Dihydrotestosterone (DHT)	雄	RIA 法
Estradiol - 17 $\beta$ (E2)	雌	RIA 法
Progesterone (P)	雌	RIA 法

## 7.2 児動物 (F1, F2) の観察・検査項目

### 7.2.1 生存率および一般状態

出生日に出生児数 (生存児数, 死亡児数), 性別および外表異常の有無を検査した。その後は一般状態, 死亡の有無を毎日観察した。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。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た後, 全身を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した。

出生日, 生後 4 および 21 日 (離乳日) 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

F1 動物は, 生後 21 日に原則として各腹から継代用 (F1 親動物) および諸検査用動物としてそれぞれ雌雄各 1 匹を無作為に選抜し, 投与を開始して離乳後の検査に供した。

その他の F1 動物および F2 動物は 3 週齢に剖検した。なお, 各群とも継代用動物のうち雌雄各 4 匹は肝薬物代謝酵素活性測定用とした。また, 諸検査用動物は各群につき雌雄各 8 匹を投与開始後 2 および 4 週の肝薬物代謝酵素活性測定用, その他を行動機能検査用とした。F1 動物の離乳後検査は原則として以下のとおりとした。

世代	腹内番号 <sup>*1</sup>	性	検査項目
F1	1	雄	体重, 摂餌量, 被験物質摂取量, 包皮分離, 精子検査, 生殖機能, 血中ホルモン濃度, 肝薬物代謝酵素活性
	2		行動機能, 肝薬物代謝酵素活性
	3		3 週齢器官重量, 剖検
	4		3 週齢剖検
	5	雌	体重, 摂餌量, 被験物質摂取量, 膈開口, 性周期, 生殖機能, 分娩・哺育, 血中ホルモン濃度, 肝薬物代謝酵素活性
	6		行動機能, 肝薬物代謝酵素活性
	7		3 週齢器官重量, 剖検
	8		3 週齢剖検

\*1: 児数調整時に雄から無作為に番号付けした。

\*2: 諸検査用動物のうち各群雌雄 8 匹は投与開始後 2 および 4 週の肝薬物代謝酵素活性測定用, その他は行動機能検査用とした。検査終了後は剖検した。

### 7.2.2 体重

出生日, 生後 4, 7, 14, 21 日に個体ごとに測定した。また, 体重増加量を児数

調整前は同腹児単位で出生日の平均体重を基準に，児数調整後は個体ごとに生後 4 日の体重を基準に算出した．

### 7.2.3 肛門・生殖結節間距離

生後 4 日の児数調整後に選抜された動物について，肛門・生殖結節間距離を測定した．また，測定日の体重の 3 乗根で除した相対距離を算出した（Gallavan *et al.*, 1999）．

### 7.2.4 乳頭発達

生後 12 日に全例について乳頭の発現状況を検査した．

### 7.2.5 生後形態分化

F1 動物の全例について，生後 2～4 日の耳介展開の発現を観察し，発現率を算出した．また，全例について生後 6 日から上切歯萌出，10 日から眼瞼開裂の発現日を検査した．

### 7.2.6 性成熟

F1 動物の生殖機能検査用動物について，生後 27 日から膻開口（雌），35 日から包皮分離（雄）の発現日を検査した．包皮分離および膻開口の発現日には体重を測定した．また，雄については包皮分離の完了日も検査した．

### 7.2.7 反射反応性

F1 動物の全例について，生後 19 日齢に以下の項目を検査し，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

### 7.2.8 行動機能

行動機能検査用の F1 動物は，各群につき無作為に選抜した雌雄各 10 匹について，4 週齢以降に以下の検査を行った．検査終了後は全例を剖検した．

#### 1) 情動性（オープンフィールドテスト）

4～5 週齢に Dandiya ら（1969）の方法を参考に，円形フィールド（80Φ×60Hcm，

25 区画，トキワ科学器械(株)内の 3 分間あたりの潜時，区画移動数，立ち上がり回数，身繕い数，脱糞数，排尿回数を検査した。

## 2) 運動協調機能 (ロータロッドテスト)

4~5 週齢にロータロッドテスト装置 (KN-10, (株)夏目製作所) を用いて, Lynch ら (1974) の方法を参考に, ロッド径 90 mm, 回転数 10 rpm, 前方歩行の回転ドラム上における 3 分間歩行時の歩行状態および落下回数を検査した。

## 3) 学習機能 (ポールクライミングテスト)

5~6 週齢にポールクライミングテスト装置 (東洋産業(株)) を用いて, Cook and Weidley (1957) の方法を参考に, 条件回避反応試験を実施した。すなわち, 条件刺激としてブザーを 10 秒間提示した後 無条件刺激として電撃 10 秒間与えた。これを 1 試行とし, 20 秒間の試行間隔を設け, 1 日 10 試行で 5 日間連続して行った。学習機能の指標として, 条件刺激提示中にポールに登り, 電撃を回避した回数 (条件回避反応: CR), 無条件刺激提示中に電撃を回避した回数 (無条件回避反応: UCR) および刺激提示中に回避しなかった回数 (無逃避反応: NO) を検査した。

## 7.2.9 病理学的検査

### 1) 器官重量

生後 21 日に各腹につき雌雄各 1 例の以下の器官重量を測定した。また, 剖検日の体重を基に相対重量 (対体重比) を算出した (下線は内分泌攪乱作用検出を主眼とした項目を示す)。

脳, 胸腺, 脾臓, 精巣, 精巣上体, 卵巣, 子宮

### 2) 剖 検

離乳後の検査に供する F1 動物を除き, 他の動物は F1 および F2 とも全例を生後 21 日にチオペンタールナトリウムによる麻酔下で腹大動脈の切断・放血により安楽死させた後, 剖検した。死亡動物は食殺などで検査に耐えないものを除き, 児数調整前は外表異常の有無を検査し, 児数調整後は剖検した。

### 3) 病理組織学的検査

肉眼的異常部位および器官重量測定動物の以下の器官は 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した\*。

脳，胸腺，脾臓，精巣，精巣上体，精嚢，前立腺，卵巣，子宮，膣

\*：精巣は死亡動物を除きブアン液で固定した後，10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した．死亡動物は全身を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に保存した

器官重量測定の結果，F1 および F2 動物とも 300 ppm 群において胸腺および脾臓重量の減少，子宮の相対重量の増加がみられたため，対照群および 300 ppm 群の雌雄各 9～10 例について胸腺および脾臓，F1 動物の子宮を検査した．また，哺育期間中に死亡した 300 ppm 群の F1 児動物の雌 2 例について，下垂体，甲状腺，副腎，卵巣，子宮，膣，卵管，肺，肝臓，腎臓の組織検査を実施した．

### 7.3 薬物代謝酵素活性測定

各群とも，F0 および F1 親動物\*は哺育期間終了後のほぼ同時期（投与開始後 17 週）に，F1 児動は投与開始後 2 および 4 週（5 および 7 週齢）に，雌雄各 4 匹を解剖日の前日午後 4 時から絶食し，翌日断頭・放血により安楽死させて肝臓を摘出し，薬物代謝酵素活性測定に供した．

摘出した肝臓は，速やかに氷冷した 1.15 w/v% KCl を肝静脈側から注入して血液を除去後，1.15 w/v% KCl を加えて約 25 w/v% のホモジネートを調製した．4 ，9000×g，20 分間遠心分離し，その上清を 4 ，105000×g，60 分間遠心分離した．その沈殿物を 0.1 mM の EDTA を含む 10 mM リン酸緩衝液（pH 7.4）に懸濁してミクロソーム懸濁液を調製した．ミクロソーム懸濁液は液体窒素で凍結した後 -80 で保存し，測定時に解凍して使用した．調製したミクロソームを用いて，以下の項目を測定した（Arlotto *et al.*, 1991; McClain *et al.*, 1989; Nerurkar *et al.*, 1993; Omura and Sato, 1964）．

\*：300 ppm 群の F1 雌親動物については，全出産児死亡が多発し，例数が少なくなったため検査しなかった．

項目	測定法
チトクローム P450 含量 (P450)	CO 差スペクトル法
7-Methoxyresorufin <i>O</i> -dealkylase (MROD, CYP1A1)	蛍光法
7-Ethoxyresorufin <i>O</i> -dealkylase (EROD, CYP1A2)	蛍光法
7-Benzyloxyresorufin <i>O</i> -dealkylase (BROD, CYP2B)	蛍光法
Testosterone 6β-hydroxylase (T-6β-OH, CYP3A)	HPLC 法
T4-UDP-Glucuronosyltransferase (T4-UDP-GT)	RI-TLC 法

## 8. 統計学的解析

離乳までの出生児に関するデータは、各母動物ごとに算出した数値を標本単位とした。非妊娠動物の交尾確認後の体重、摂餌量および器官重量、未交尾の雌および生存児を有しない母動物の器官重量は評価の対象から除外した。

計量データは Bartlett 法 (Bartlett, 1937) による等分散性の検定を行い、分散が等しい場合は一元配置分散分析、分散が等しくない場合は Kruskal-Wallis の検定 (Kruskal and Wallis, 1952) を行った。群間に有意差が認められた場合は Dunnett 法 (Dunnett, 1955) または Dunnett 型の多重比較検定 (Dunnett, 1964) を行った。ただし、一部の項目は Kruskal-Wallis の検定から行い、群間に有意差が認められた場合は Dunnett 型の多重比較検定を行った。計数データのうち、病理組織所見は  $a \times b$  の  $\chi^2$  検定を行い、有意差が認められた場合は Armitage の  $\chi^2$  検定 (Armitage, 1971) により対照群と各被験物質投与群間の比較を行った。その他の計数データは Fisher の直接確率法 (Fisher, 1955) により検定した。いずれの検定も有意水準は 5% とした。統計学的解析の対象項目は以下のとおりである。一般状態および剖検所見については、統計学的解析を実施しなかった。

多重比較検定： 体重，体重増加量，摂餌量，摂餌効率，器官重量，着床数，出産児数，出生児数，肛門・生殖結節間距離，性周期日数，精子細胞数，精子数，卵胞数，オープンフィールドテスト，血中ホルモン濃度，肝薬物代謝酵素活性

Kruskal-Wallis 検定と Dunnett 型の多重比較検定：

交尾所要日数，交尾成立までに逸した発情期の回数，妊娠期間，運動精子率，精子形態異常の発現率，出生率，出産時生存率，4 日生存率，離乳率，外表異常児の発現率，乳頭発現異常児の発現率，生後形態分化，反射反応性，ロータロッドテストの落下回数，ポールクライミングテスト

$a \times b$  の  $\chi^2$  検定と Armitage の  $\chi^2$  検定：病理組織所見

Fisher の直接確率法：

交尾率，受胎率，出産率，性比 (雄/雌)，異常性周期動物の発現率，ロータロッドテストの歩行異常動物の発現率，外表異常児を有する母動物の発現率，乳頭発現異常児を有する母動物の発現率

# 結 果

## 1. 親動物に及ぼす影響

### 1.1 被験物質摂取量（表 1-1）

各世代の被験物質投与群の被験物質摂取量を以下に示す。

10, 60 および 300 ppm 群の交配前の平均被験物質摂取量は、それぞれ F0 動物の雄が 0.565, 3.43 および 17.2 mg/kg/day, 雌が 0.617, 3.75 および 19.0 mg/kg/day, F1 動物は雄が 0.739, 4.53 および 23.3 mg/kg/day, 雌が 0.799, 4.85 および 25.2 mg/kg/day で、F0 動物より若干高い値を示した。また、交尾後の雌は F0 および F1 動物ともほぼ同様の値であり、妊娠期間は交配前より若干低く、哺育期間は交配前の約 2 倍の値であった。

用 量 (ppm)	性	期 間	平均被験物質摂取量 (mg/kg/day)	
			F0	F1
10	雄	交配前	0.5645	0.7386
		交配前	0.6173	0.7992
	雌	妊娠中	0.5730	0.6105
		哺育中	1.525	1.484
60	雄	交配前	3.427	4.531
		交配前	3.752	4.850
	雌	妊娠中	3.389	3.617
		哺育中	8.941	8.709
300	雄	交配前	17.23	23.34
		交配前	18.95	25.21
	雌	妊娠中	16.55	18.01
		哺育中	45.21	41.68

### 1.2 一般状態（表 1-1）

雄では、F0 および F1 動物とも被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、300 ppm 群の F0 雄動物 1 例が投与開始後 80 日に自発運動量の低下、緩徐呼吸、および紅涙を示して瀕死期解剖され、病理検査の結果から骨髄性白血病と診断されたが、本例のみの発現であったことから、自然発生病変による死亡と判断した。

雌では、300 ppm 群で F0 および F1 動物とも死亡が認められ、F1 母動物では妊娠末期に痙攣および分娩後にいらだち等の過敏性が観察された。すなわち、F0 動物では投与開始後 8 日および妊娠 11 日（投与開始後 84 日）にそれぞれ 1 例、F1 動物では投与



開始後 35 日および 46 日（生後 56 および 67 日）にそれぞれ 1 例死亡した。また，F1 母動物では痙攣が妊娠 18 および 20 日にそれぞれ 1 例で認められ，分娩日～哺育 2 日にいらいちが 4 例で観察された。

その他，脱毛，痂皮あるいは皮下腫瘍が各群の極少数例で観察されたが，本系統では自然発生的に観察される所見であり，発現状況に用量との関連もみられなかったことから，いずれも偶発所見と判断した。

### 1.3 体 重（図 1, 2, 表 1-1）

F0 および F1 動物とも，300 ppm 群の雌雄で体重増加抑制が認められ，体重あるいは体重増加量に継続して有意差が認められた。なお，F0 および F1 動物とも雌の哺育期間の体重増加量が有意な高値を示したが，分娩日の体重が低値を示したことが反映した結果と考えられた。この他，60 ppm 群の F0 雌動物で投与開始後 21 および 49 日の体重増加量が有意な低値を示したが，一過性の変化であったことから偶発変化と判断した。

### 1.4 摂餌量（図 1, 2, 表 1-1）

F0 および F1 動物とも，300 ppm 群の雌雄で摂餌量減少が認められ，F0 動物では雌雄の投与初期および雌の妊娠・哺育期間，F1 動物では雌雄の投与初期から中期および雌の妊娠・哺育期間に有意差が認められた。なお，F1 雌動物において 10 ppm 群で哺育 21 日が有意な高値，60 ppm 群で投与開始後 56 日が有意な低値を示したが，一過性の変化であったことから偶発変化と判断した。

### 1.5 摂餌効率

F0 および F1 動物とも，雌雄いずれの被験物質投与群にも毒性学的意義のある変化は認められなかった。雌において，F0 動物では 60 ppm 群の投与開始後 56 日が有意な高値，300 ppm 群の投与開始後 7 日および妊娠 7 日が有意な低値，哺育 21 日が有意な高値を，F1 動物では 300 ppm 群の投与開始後 7 日および哺育 4 日が有意な高値，妊娠 20 日が有意な低値を示したが，一過性であったことから，毒性学的意義に乏しい変化と判断した。

## 1.6 繁殖機能に及ぼす影響

### 1) 性周期 (表 1-1)

F0 および F1 動物とも、被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、F1 動物の 300 ppm 群の平均性周期日数に有意差が認められたが、同群では全例がラットでは正常である 4 日周期を示しており、毒性的に意義のある変化とは考えられなかった。

### 2) 交配成績 (表 1-1)

F0 および F1 動物とも、交尾能および受胎能とも被験物質の影響は認められなかった。

F0 および F1 動物とも各群のほとんどの交配对が交配開始後の初回の発情期に交尾して受胎し、交尾所要日数、交尾成立までに逸した発情期の回数、交尾率および受胎率のいずれにも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、F1 動物の 300 ppm 群の 1 対では交配期間中に雌の発情期 3 回とも交尾が認められなかったことから、未交尾の雌を同群の受胎能が確認された雄と同居させた結果、交尾し受胎した。また、未交尾の雄には精巣および精巣上体の小型化と運動精子率の低下が認められたことから、未交尾の原因は雄にあるものと考えられた。

### 3) 精子検査 (表 1-1)

F0 および F1 動物とも、いずれの項目にも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。なお、F0 動物の 300 ppm 群の運動精子率および精子数が若干低値を示し、精子形態異常発現率が若干高値を示した。しかし、同群の未交尾雄 1 例で運動精子が認められず、顕著な精子数の減少および形態異常精子の増加を示したことが反映した結果であり、他の動物は対照群とほぼ同様の値であったことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

### 4) 分娩・哺育成績 (表 1-2)

分娩の観察では、F0 および F1 母動物とも各群のほとんどの母動物が妊娠 21～23 日に正常に分娩し、妊娠期間、着床数、出生率および分娩率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、F1 母動物において 60 ppm 群で難産が 1 例観察されたが、発現状況から偶発変化と判断した。この母動物は分娩が妊娠 23 日から 25 日にわたり、出産児は全例が死亡した。また、F1 母動物の 10 ppm 群で

着床数が有意な高値を示したが、用量との関連がなかったことから偶発変化と判断した。

哺育の観察では、F0 母動物には被験物質に起因する変化は認められなかった。300 ppm 群の 1 例で回集行動の欠如と全出産児死亡が観察されたが、自然発生的にも観察される場合があり、今回の場合 1 例のみの発現であったことから偶発的なものと判断した。

F1 母動物では、300 ppm 群で全出産児死亡が哺育 7 日までに 6 例に認められた。これらの母動物には哺育初期に授乳あるいは回集行動等の母性行動がみられず、出産児のほとんどが哺育 4 日までに死亡した。その他に 300 ppm 群では、一部の母動物(全出産児が死亡した母動物を含む)にいらだち等の過敏性が観察された。60 ppm 群でも 1 例で全出産児死亡が観察されたが、難産を示した動物であったことから、被験物質とは関連のない変化と判断した。

## 1.7 病理学的検査

### 1) 器官重量 (表 1-2, 1-3)

F0 動物では、雄において 10 ppm 群以上の群において肝臓および腎臓重量の増加がみられ、肝臓では 300 ppm 群の絶対重量および全被験物質投与群の相対重量、腎臓では 60 ppm 以上の群で腎臓の絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。

雌では、60 ppm 以上の群で肝臓重量の増加および 300 ppm 群の下垂体重量の減少がみられ、絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。

F1 動物では、雄において用量依存的な腎臓重量の増加がみられ、60 ppm 以上の群で絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。また、300 ppm 群で肝臓および副腎重量が高値傾向を示し、相対重量では有意差が認められた。この他、300 ppm 群の下垂体重量が有意な低値を示し、相対重量も低値傾向を示した。

雌では、300 ppm 群の下垂体が絶対重量および相対重量とも有意な低値を示した。また、60 ppm 以上の群の肝臓および 300 ppm 群の副腎重量が高値傾向を示し、相対重量では有意差が認められた。

この他、F1 動物では 300 ppm 群で雌雄の脳の相対重量が有意な高値を示したが、絶対重量は対照群とほぼ同様な値であったことから、解剖時の低体重が反映した結果と考えられた。また、F0 および F1 動物とも性周期別にみた卵巣および

子宮重量に対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

## 2) 剖 検 (表 1-4)

被験物質に起因すると思われる変化が、雌雄の肝臓および雄の腎臓に認められた。F0 動物において、肝臓の腫大および小葉構造の明瞭化が 60 ppm 以上の群の雌、腎臓の褪色および腫大が 60 ppm 以上の群の雄に認められた。

F1 動物において肝臓の暗赤色化が 300 ppm 群の雌、腫大が 60 ppm 以上の群の雌、小葉構造の明瞭化が 60 ppm 以上の群の雌雄、腎臓の褪色および腫大が 60 ppm 以上の群の雄に認められた。

死亡した 300 ppm 群の F0 雌動物 2 例および F1 雌動物 1 例において、死亡に関連すると思われる所見として肺のうっ血および水腫が認められた。なお、死亡した F1 親動物の雌 1 例では、異常所見は認められなかった。その他、瀕死期解剖された 300 ppm 群の F0 雄動物の 1 例では、主な所見として脾臓および肝臓の腫大が認められた。また、全出産児が死亡した母動物では、F0 および F1 母動物とも出生児死亡に関連すると思われる所見は認められなかった。

## 3) 病理組織学的検査 (表 1-4)

被験物質に起因すると思われる変化が雌雄の肝臓および甲状腺、雄の腎臓に認められた。

### 肝臓

肝小葉中心性肝細胞肥大が、F0 動物では 60 ppm 以上の群の雌雄、F1 動物では 10 ppm 以上の群の雄および 60 ppm 以上の群の雌に認められた。軽度の例では肥大した肝細胞の細胞質が好酸性を増すのみであったが、中等度の例では細胞質がすりガラス様を呈していた。

### 腎臓

好塩基性尿細管および近位尿細管上皮の硝子滴が F0 および F1 動物ともに対照群を含む各群の雄に認められたが、10 ppm 以上の群で発現数が有意に増加した。F0 動物と F1 動物とで、変化の程度や発現状況に明らかな差はなかった。軽度の例では好塩基性尿細管および硝子滴はネフロン単位で巣状に認められたが、中等度および重度の例では硝子滴を有する近位尿細管が広い範囲に認められ、好塩基性上皮からなる尿細管の拡張や基底膜の肥厚、間質の線維化やリンパ球の浸潤を

伴う例も認められた。なお比較的小型の硝子滴は抗  $\alpha_{2U}$  グロブリン抗体に陽性であったが、大きさが増すと抗体に反応しにくくなる傾向がみられた。

#### 甲状腺

ろ胞上皮の肥大が F0 動物では 300 ppm 群の雌で有意に、F1 動物では 60 ppm 群および 300 ppm 群の雄 1 および 5 例に認められ、300 ppm 群で有意な発現であった。これらの例ではろ胞上皮細胞の高さが増し、ろ胞腔は狭小化していた。なお F1 動物の雌においては、対照群を含む全群で 1~3 例に認められ、被験物質との関連は明らかではなかった。

なお、重量減少がみられた F1 雌動物の下垂体についてアザン染色を施し検査したが、対照群と 300 ppm 群とで差は認められなかった。また、F1 動物で重量増加がみられた副腎についても組織変化は認められなかった。さらに、F1 動物の雌の脳、脊髄および坐骨神経にも異常は認められなかった。

死亡した 300 ppm 群の F0 雌動物 2 例では、死亡に関連すると思われる変化としての肺のうっ血および水腫が認められた。それ以外に脾臓の萎縮、腺胃のびらんおよび副腎皮質束状帯細胞の肥大が認められ、衰弱状態であったことが示唆された。また、F1 動物の死亡した雌 2 例でも、剖検で異常がみられなかった例も含めて肺のうっ血および水腫が認められた。なお、300 ppm 群の F0 動物の瀕死期殺された雄 1 例は、骨髄性白血病であった。

全出産児が死亡した 300 ppm 群の F0 母動物 1 例および F1 母動物 6 例、60 ppm 群の F1 母動物 1 例には、児動物の死亡に関連すると思われる変化は認められなかった。

F1 動物の卵巣の原始卵胞数、二次卵胞数およびこれらの卵胞を合計した数について検査した結果、対照群と 300 ppm 群の間で有意な差は認められなかった。

## 1.8 血中ホルモン濃度 (表 1-5)

### 1) 甲状腺ホルモン

F0 および F1 動物とも、300 ppm 群の雌雄で T3 あるいは T4 の有意な低下または低下傾向が認められた。

## 2) 性ホルモン

F0 および F1 動物の雌雄とも、いずれの項目にも被験物質に起因する変化は認められなかった。なお、F1 動物において、雄で全被験物質投与群の LH が有意な低値あるいは高値を示したが、用量との関連はみられず、対照群との差も僅かであったことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。

また、雌の被験物質投与の全群で LH が有意な高値を示したが、F0 動物の対照群とほぼ同様な値であり、他の検査項目で本変化に関連すると思われる変化は認められなかったことから、毒性学的に意義のない変化と判断した。

## 2. 児動物に及ぼす影響

### 2.1 生存率および一般状態（表 2-1）

#### 1) 生存率

F1 児動物では、出産児数、生存児数、性比、出産時生存率、4 日生存率および離乳率のいずれにも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。

F2 児動物では、出産児数および出産時生存率には被験物質に起因する変化は認められなかったが、300 ppm 群で生後の死亡が多発し、生後 4 日の生存児数および 4 日生存率の有意な減少が認められた。なお、10 ppm 群の出産生存児数が有意な高値、60 ppm 群の性比が有意な低値を示したが、用量との関連がなかったことから、いずれも偶発変化と判断した。

#### 2) 一般状態

F1 児動物では、被験物質に起因する変化は認められなかった。

F2 児動物では、300 ppm 群で生後 4 日までに死亡および授乳の欠如が多数観察されたが、ほとんどは前述した母動物の哺育機能の異常に伴ったもので、その他には被験物質に起因する変化は認められなかった。

### 2.2 体重（図 2, 表 2-1）

F1 および F2 児動物ともに、300 ppm 群の雌雄で出生時の低体重および生後の体重増加抑制が認められた。60 ppm 群でも、雌雄とも体重増加量がやや低値を示し、体重あるいは体重増加量で有意差が散見された。

### 2.3 肛門・生殖結節間距離（表 2-2）

F1 および F2 児動物ともに，被験物質に起因する変化は認められなかった．なお，F1 児動物の雌の 10 ppm 群で体重補正值が有意な低値を示したが，用量との関連がなかったことから偶発変化と判断した．

### 2.4 乳頭発達（表 2-2）

F1 および F2 児動物の雌雄とも，いずれの被験物質投与群にも異常は認められなかった．

### 2.5 生後形態分化（表 2-2）

F1 児動物について検査した結果，耳介展開の発現率，上切歯萌出および眼瞼開裂の発現日ともに被験物質に起因する変化は認められなかった．なお，60 ppm 群の雄で生後 3 日の耳介展開の発現率が有意な低値を示したが，用量との関連はなく，生後 4 日には全例で耳介展開が認められたことから，偶発的な変化と判断した．

### 2.6 性成熟（表 2-2）

F1 児動物について検査した結果，300 ppm 群において雄で包皮分離の発現日および完了日，雌で膣開口の発現日ともに有意な遅延が認められた．なお，雌雄とも発現日あるいは完了日の体重には対照群との間に有意な差は認められなかった．

### 2.7 反射反応性（表 2-2）

F1 児動物について検査した結果，平面正向反射，角膜反射，聴覚性驚愕反応，疼痛反応，空中正向反射ともに被験物質に起因する変化は認められなかった．

### 2.8 行動機能（表 2-3）

#### 1) 情動性

F1 児動物のオープンフィールドテストの結果，雌雄とも被験物質投与群で潜時がやや短く，区画移動数がやや多い傾向がみられたが，対照群との間に有意な差は認められなかった．また，立ち上がり回数，身繕い数，脱糞数および排尿回数についても有意差は認められなかった．

## 2) 運動協調機能

F1 児動物のロータロッドテストの結果，各群雌雄ともに歩行状態に異常は認められず，3 分間歩行時の落下回数にも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった．

## 3) 学習機能

F1 児動物のポールクライミングテストの結果，各群雌雄ともに試行日の経過に伴った順調な学習効果みられ，条件回避反応数，無条件回避反応数および無逃避反応数のいずれにも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった．

## 2.9 病理学的検査

### 1) 器官重量 (表 2-3)

300 ppm 群において，F1 および F2 児動物とも雌雄の胸腺および脾臓の絶対重量が有意な低値を示し，相対重量でも有意な低値あるいは低値傾向が認められた．なお，300 ppm 群ではその他にも脳，精巣，精巣上体，卵巣および子宮で有意差が認められたが，絶対重量あるいは相対重量いずれかの変化であったことから，体重増加抑制が反映した結果と考えられた．また，F1 児動物の雌の脾臓において 10 ppm 群の絶対重量および相対重量，60 ppm 群の相対重量が有意な高値を示したが，用量との関連がなかったことから偶発変化と判断した．

### 2) 剖 検 (表 2-4)

F1 および F2 児動物とも，各群で腎盂拡張，肝臓の暗赤色化，肝・横隔膜面結節あるいは胸腺の頸部残留が観察されたが，発現状況に用量との関連はなく，被験物質に起因する変化は認められなかった．

### 3) 病理組織学的検査 (表 2-4)

F1 および F2 児動物の胸腺および脾臓ならびに F1 児動物の子宮を検査した結果，いずれの器官にも被験物質に起因する組織変化は認められなかった．

## 3. 肝臓薬物代謝酵素活性 (図3, 表3)

F0 および F1 親動物ならびに F1 児動物の投与開始後 2 および 4 週の検査のいずれにおいても雌雄ともほぼ同様の傾向がみられ，ほとんどの酵素が 10 ppm 群から用量依存的な活性の上昇を示した．



ミクロソーム蛋白量については 300 ppm 群で対照群の 1.1 ~ 1.6 倍 , チトクローム P450 含量については 300 ppm 群で対照群の 1.1 ~ 1.6 倍を示した . 被験物質による影響は BROD 活性が最も顕著で , 60 および 300 ppm 群で対照群のそれぞれ 2.3 ~ 6.1 倍および 11.2 ~ 17.9 倍の上昇が認められた . また , MROD , EROD および T-6 $\beta$ -OH 活性についても影響が認められ , 300 ppm 群でそれぞれ対照群の 1.5 ~ 2.5 倍 , 2.7 ~ 5.2 倍および 1.7 ~ 3.1 倍の上昇がみられた . さらに , T4-UDP-GT 活性に対しても上昇が認められ , 300 ppm 群で対照群の 1.5 ~ 3.1 倍の活性を示した .

## 考察および結論

リンデンを Crj:CD(SD)IGS ラットに 10、60 および 300 ppm の濃度で交配前 10 週間 交配、妊娠および哺育期間を通して 2 世代にわたり混餌投与し、内分泌攪乱作用検出のための指標を加えたラットの 2 世代繁殖毒性試験の妥当性について検討した。

その結果、親動物への一般毒性学的影響、繁殖機能への影響および児動物の発育への影響と、甲状腺ホルモンの血中濃度やこれらのホルモンの代謝酵素の活性に被験物質に関連した変化が認められたものの、AGD、乳頭発達、性成熟、性周期、精子検査、生殖器官重量、血中性ホルモン濃度等の内分泌攪乱作用を検出するために追加した指標については明確な変化は認められなかった。

### 1. 親動物への影響

#### 1.1 一般毒性学的影響

親動物への一般毒性学的影響として、F0 および F1 動物ともに 300 ppm 群において雌雄で体重増加抑制および摂餌量減少、雌で死亡が認められた。また、F1 動物では 300 ppm 群の雌で妊娠末期に痙攣、分娩後にいらだち等の過敏性が観察された。リンデンは神経毒性を有することが知られており、ラットでは高用量の反復投与で、苛立ち、活動性亢進、痙攣が発現する (Doisy and Bocklage, 1949, 1950)。F0 動物では神経症状は認められなかったが、リンデンは乳汁を介して容易に出生児に移行し (Shibata, 1978)、その毒性に対する感受性は若齢動物が高いことから (Doisy and Bocklage, 1949; Srinivasan *et al.*, 1991)、出生後から暴露された F1 動物で影響が強く発現した可能性が考えられる。

病理検査では、F0 および F1 動物とも肝臓の重量増加を伴った小葉中心性肝細胞肥大が 10 あるいは 60 ppm 以上の群の雌雄、腎臓の重量増加を伴った近位尿細管上皮の硝子滴増加および好塩基性尿細管が 10 ppm 以上の群の雄で認められた。また、300 ppm 群の雌の死亡動物には肺のうっ血および水腫が共通して認められ、死亡と関連する変化と思われた。生殖器にはリンデンに起因する変化は認められなかった。肝臓の小葉中心性肝細胞肥大は、種々の薬物投与により薬物代謝酵素の誘導が惹起された際に生じる生体の適応性変化であり (Gopinath *et al.*, 1987; Greaves, 1990a)、本試験の肝薬物代謝酵素活性測定において種々の代謝酵素活性の上昇がみられたことに関連する変化と考えられる。また、腎臓の近位尿細管上皮の硝子滴の出現はラットの雄の加齢性変化として認め

られるが、種々の薬物投与により増強される(Lehman-McKeeman *et al.*, 1990; Swenberg *et al.*, 1989)。硝子滴の出現が重篤になると尿細管上皮細胞に障害が生じ、再生性の変化である好塩基性尿細管などが認められる。また、硝子滴には  $\alpha_{2U}$  グロブリンが証明されることから、これら一連の変化は雄ラットに特異的な  $\alpha_{2U}$  グロブリン腎症ともいわれる(Greaves, 1990b)。本試験においても硝子滴が雄のみに認められ、抗  $\alpha_{2U}$  グロブリン抗体に陽性であったことから、 $\alpha_{2U}$  グロブリン腎症であることが示唆された。

## 1.2 繁殖機能への影響

300 ppm 群の F1 母動物で授乳行動あるいは児の回集行動の欠如等、哺育行動の異常とそれに伴う F2 動物の全出産児死亡が認められた。哺育機能への影響については、F1 母動物で痙攣および過敏性が観察されていることから、リンデンによる神経系への影響による可能性が考えられる。性周期、精子形成、交尾能、受胎能、妊娠および分娩にはリンデンの影響は認められなかった。

## 1.3 内分泌攪乱作用検出のために追加した指標について

内分泌系器官では、下垂体重量の減少が 300 ppm 群の F0 動物の雌、F1 動物の雌雄、副腎重量の増加が 300 ppm 群の F1 動物の雌雄で認められたが、これらの変化と関連する組織学的異常は認められず、内分泌攪乱を示唆する変化はなかった。また、甲状腺ろ胞上皮の肥大が F0 動物では 300 ppm 群の雌、F1 動物では 60 ppm 以上の群の雄で認められ、血中甲状腺ホルモン濃度測定において F0 および F1 動物とも T3 あるいは T4 の低下または低下傾向が 300 ppm 群の雌雄で認められた。甲状腺のろ胞上皮の肥大は、薬物の直接作用あるいは肝臓における甲状腺ホルモン代謝酵素の誘導を介した二次的作用として生じる(Greaves, 1990c)。本試験においては肝薬物代謝酵素活性測定で甲状腺ホルモン抱合酵素である T4-UDP-GT 活性の上昇が認められていることから、甲状腺の組織変化および血中 T3、T4 の減少については、肝薬物代謝酵素誘導に伴い肝臓における甲状腺ホルモンの分解が亢進(Owen *et al.*, 1971; Oppenheimer *et al.*, 1968)したことによる二次的变化と推察される。性周期、精子形成、生殖器官重量、血中性ホルモン濃度および卵巣の卵胞数についてはリンデンの影響は認められなかった。

リンデンは、ラットへの投与で雄の精巣障害、精子数減少(Dalsenter *et al.*, 1996)、雌の性周期の延長、膣開口の遅延(Uphouse and Williams, 1989; Chadwick *et al.*, 1988; Cooper

*et al.*, 1989), 哺育中の母動物への投与で次世代の雄の精巣障害, 精子数減少 (Dalsenter *et al.*, 1997) が報告されているが, 本試験においては同様な変化は認められなかった。これらの研究報告は, 用いた動物の系統, 用量, 投与経路あるいは投与期間等が様々であり, 本試験結果との相違は試験条件の違いによるものである可能性が考えられる。

## 2. 児動物への影響

### 2.1 一般毒性学的影響

F1 および F2 児動物とも雌雄で 60 ppm 以上の群で体重増加抑制, 300 ppm 群で胸腺および脾臓重量の減少が認められた。また, F2 児動物では 300 ppm 群で母動物の哺育異常に起因した生存率の低下が認められた。胸腺および脾臓重量の変化については, 対応する組織学的異常は認められず, F1 動物の成獣では回復していたことから, 発育抑制に伴った変化と考えられる。

F1 動物について情動性, 運動協調機能および学習機能検査を実施したが, いずれの検査においても明確な変化は認められなかった。オープンフィールドテストにおいてリンデン投与群で雌雄とも潜時の短縮傾向, 区画移動数の増加傾向がみられたが, 対照群との間に有意差は認められず, リンデンの影響によるものかは明らかでなかった。リンデンはラットで活動量の増加, 学習障害等, 行動機能への影響が報告されているが (Desi, 1974; Tilson *et al.*, 1987; Rivera *et al.*, 1998), 用いた動物の系統, 用量, 投与経路, 投与期間, 検査方法等が本試験とは異なっており, 本試験結果との相違は試験条件の違いによるものである可能性が考えられる。

### 2.2 内分泌攪乱作用検出のために追加した指標について

内分泌攪乱作用検出のために追加した指標として検査した肛門・生殖結節間距離および乳頭発達においては, 雌雄とも変化は認められなかった。

離乳後の F1 動物では 300 ppm 群で雌雄とも性成熟 (雄: 包皮分離, 雌: 膣開口) の遅延が認められた。しかし, 性成熟の変化が被験物質の内分泌活性に基づく場合は, アンドロゲン作動系またはエストロゲン作動系のいずれか一方がより強く阻害されると推測されるにもかかわらず, 今回は雌雄ともに遅延が認められたことから, 発育抑制に伴った変化と考えられる。

### 3. 肝薬物代謝酵素活性

肝薬物代謝酵素活性では、F0 および F1 動物の雌雄とも 10 ppm 群から用量依存的な活性の上昇が認められ、BROD 活性の上昇が最も顕著であったが、その他に MROD、EROD、T-6 $\beta$ -OH および T4-UDP-GT 活性にも上昇が認められた (BROD >> EROD > MROD, T-6 $\beta$ -OH, T4-UDP-GT)。MROD、EROD および BROD の 3 種の活性はそれぞれ P450 の CYP1A1、CYP1A2 および CYP2B (Nerurkar *et al.*, 1993)、T-6 $\beta$ -OH 活性は CYP3A 分子種に特異性の高い反応であることが報告されている (Arlotto *et al.*, 1991)。このことから、リンデンは CYP2B 分子種に対する誘導作用が最も強く、CYP1A、CYP3A および UDP-GT 等の複数の薬物代謝酵素に対しても誘導作用を有する化合物であることが示唆された。

### 4. 試験法の評価

リンデンを 2 世代にわたり投与した結果、いずれの世代においても内分泌攪乱作用検出のために有用であると考えられる毒性指標に明確な変化は認められなかった。

リンデンにはエストロゲン様 (Raizada *et al.*, 1980) あるいは抗エストロゲン作用 (Uphouse and Williams, 1989; Chadwick *et al.*, 1988; Cooper *et al.*, 1989) が観察されるとの報告がある一方で、以前にガイドラインで推奨される方法に基づいて実施した本試験においては、親動物に死亡等の重篤な毒性が発現する用量でも内分泌攪乱作用を示す変化は認められなかった。環境省のプロジェクトにおいて実施したリンデンの uterotrophic assay および Hershberger assay では、エストロゲン様作用および抗エストロゲン作用は検出されず、アンドロゲン様作用および抗アンドロゲン作用も認められなかったこと、さらに過去に実施された 100 ppm を最高用量とした 3 世代繁殖毒性試験 (Palmer *et al.*, 1978) では、次世代および繁殖機能への影響はなかったことも報告されている。少なくとも、これらの結果からはエストロゲン作動系とアンドロゲン作動系に関しては、*in vivo* 試験でリンデンの影響について再現性を得ることは困難と考えられる。したがって、試験方法の妥当性を検証する観点からは、さらに内分泌活性が明確な他の物質を用いた試験を実施して知見を集積し、検討する必要があると考えられる\*。

\*: エストロゲン様作用あるいは抗エストロゲン作用を有すると考えられている他の物質を用いた試験では、今回変化がみられなかった毒性指標に変化が認められている (You *et al.*, 2002; Ashby *et al.*, 1997; Sharpe *et al.*, 1995; Newbold *et al.*, 1983; Yamasaki *et al.*, 2005; Chamness *et al.*, 1979; Clevenger *et al.*, 1998)。例えば、性周期、精子検査、離乳時の子宮重量、血中エストロゲン濃度を測定項目に加えた 2 世代繁殖毒性試験がメトキシクロルにおいて国内で実施されている。この試験では、メトキシクロ

ルの投与により性周期の延長，精子数の減少，離乳時の子宮重量の増加，血中エストロゲン濃度の減少が確認された（Aoyama and Suzuki, 2003）．また，本プロジェクトの一環として同一試験方法により抗アンドロゲン作用を有するビクロゾリンを用いた 2 世代繁殖毒性試験を実施した結果，内分泌攪乱作用検出のために追加した指標で変化が捉えられている．

なお，過去に実施された 100 ppm を最高用量としたリンデンの 3 世代繁殖毒性試験（Palmer *et al.*, 1978）では，次世代および繁殖機能への影響はなかったことが報告されている．しかし，本試験において最大耐量付近の用量である 300 ppm を投与することにより，従来の試験では捉えられなかった次世代の発育および繁殖機能への影響が捉えられた．このことは，2 世代繁殖毒性試験において適切な用量を設定すれば，化学物質の生殖発生毒性を十分捉えられることを示唆している．

## 参考文献

- Aoyama, H. and Suzuki, K. (2003): Enhanced one-generation reproductive toxicity study in rats for detecting endocrine-disrupting effects of chemicals. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 2497-2501.
- Arlotto, M.P. , Trant, J.M. and Estabrook, R.W. (1991): Measurement of steroid hydroxylation reactions by high-performance liquid chromatography as indicator of P450 identity and function. *Methods Enzymol.*, **206**, 454-462.
- Armitage, P. (1971): Further analysis of qualitative data. In *Statistical Methods in Medical Research* (Armitage, P. ed.), pp. 362-393. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Ashby, J, Tinwell, H., Lefevre, P.A., Odum, J., Paton, D., Millward, S.W., Tittensor, S. and Brooks, A.N.(1997): Normal sexual development of rats exposed to butyl benzyl phthalate from conception to weaning. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **26**, 102-118.
- Bartlett, M.S. (1937): Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. Roy. Soc.*, **160**, 268-282.
- Bolon, B., Bucci, T.J., Warbritton, A.R., Chen, J.J., Mattison, D.R. and Heindel, J.J. (1997): Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: Results from continuous breeding bioassays. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **39**, 1-10.
- Bucci, T.J., Bolon, B., Warbritton, A.R., Chen, J.J. and Heindel, J.J. (1997): Influence of sampling on the reproducibility of ovarian follicle counts in the mouse toxicity studies. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 689-696.
- Carlsen, E., Giwerman, A., Keiding, N. and Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Chambers, E.L. and Malone, P.S. (1999): The incidence of hypospadias in two English cities: A case-control comparison of possible causal factors. *BJU Int.*, **84**, 95-98.
- Chamness, G.C., Bannayan, G.A., Landry, L.A. Jr., Sheridan, P.J. and McGuire, W.L. (1979): Abnormal reproductive development in rats after neonatally administered antiestrogen (Tamoxifen). *Biol. Reprod.*, **21**, 1087-1090.
- Chadwick, R.W., Cooper, R.L., Chang, J., Rehnberg, G.L. and McElroy, W.K. (1988): Possible anti estrogenic activity of lindane in female rats. *J. Biochem. Toxicol.*, **3**, 147-158.
- Clevenger, J.E., Hess, R.A., Parlow, A.F., Bahr, J.M., Simutis, C.A., Brown, L.J., Carroll, D.A., Jassim, E.W., Jackson, G.L. Nakai, M., Poulet, F.M. and Vancustem, P.M. (1998): Long-term

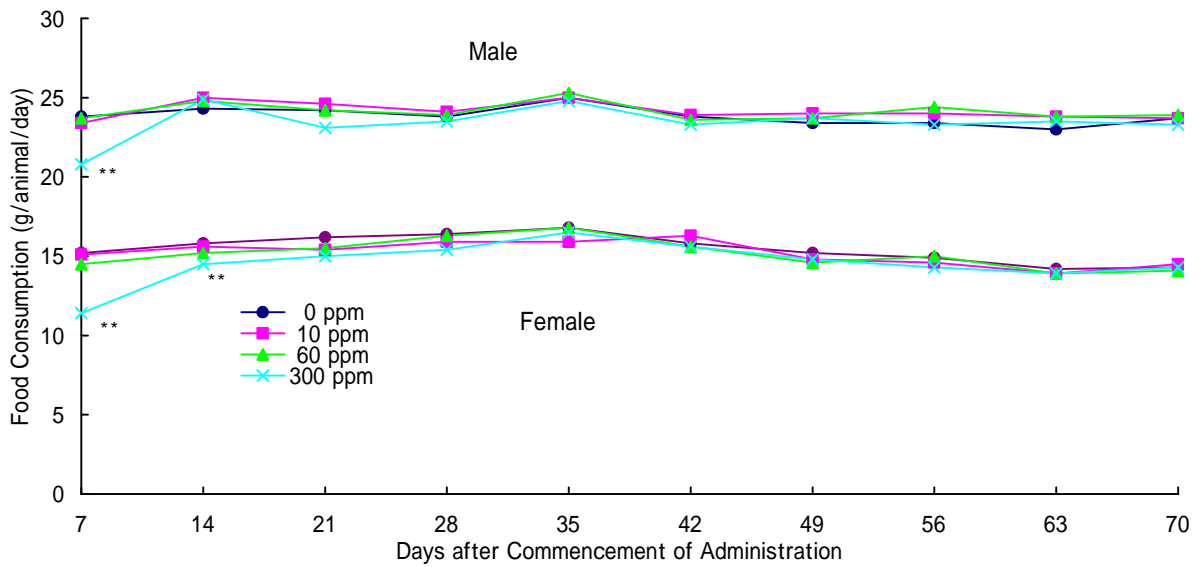
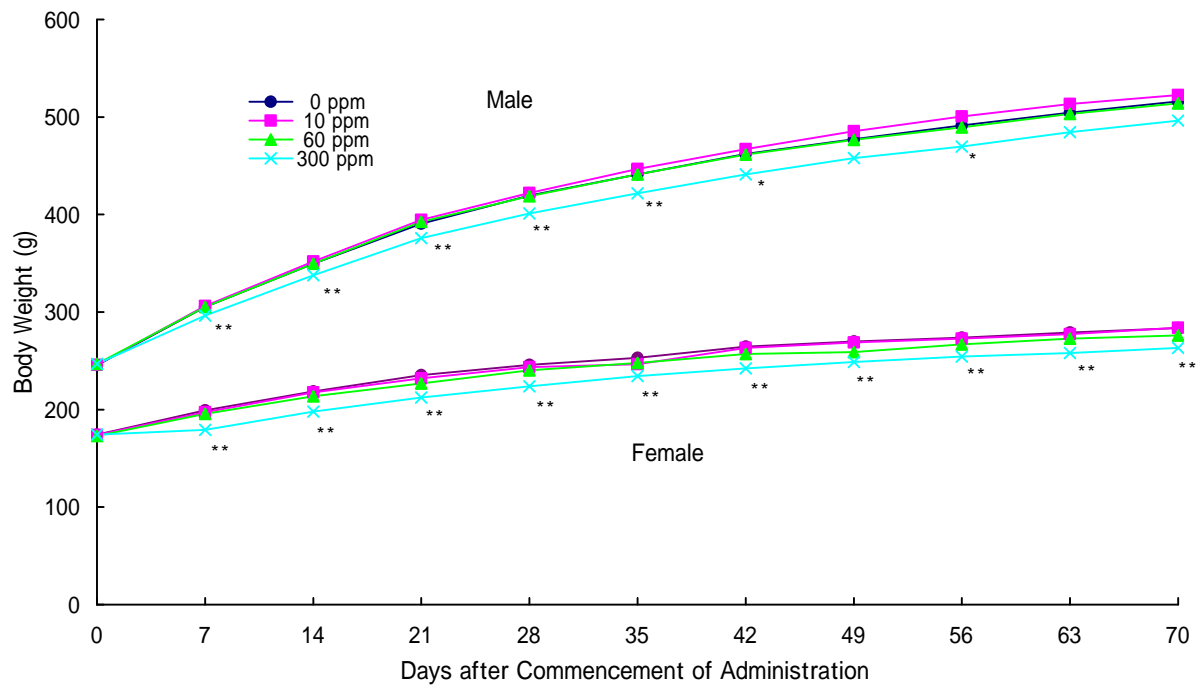
- consequences of neonatal tamoxifen administration on male reproduction in rats. *Teratol.*, **57**, 256.
- Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, J.P. (1996): Our stolen future: Are we threatening our fertility, intelligence, and survival? – A scientific detective story. The Spieler Agency, New York.
- Cook, L. and Weidley, E. (1957): Behavioral effects of some psychopharmacological agents. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **66**, 740-752.
- Cooper, R.L., Chadwick, R.W., Rehnberg, G.L., Goldman, J.M., Booth, K.C., Hein, J.F. and McElroy, W.K. (1989): Effect of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 384-394
- Dalsenter, P.R., Faqi, A.S., Webb, J., Merker, H-J. and Chahoud, I. (1996): Reproductive toxicity and tissue concentrations of lindane in adult male rats. *Hum. Exp. Toxicol.*, **15**, 406-410.
- Dalsenter, P.R., Faqi, A.S., Webb, J., Merker, H-J. and Chahoud, I. (1997): Reproductive toxicity and toxicokinetics of lindane in the male offspring of rats exposed during lactation. *Hum. Exp. Toxicol.*, **16**, 146-153.
- Dandiya, P.C., Gupta, B.D., Gupta, M.L. and Patni, S.K. (1969): Effects of LSD on open field performance in rats. *Psychopharmacologia*, **15**, 333-340.
- Dunnnett, C.W. (1955): A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.*, **50**, 1096-1121.
- Dunnnett, C.W. (1964): New tables for multiple comparison with a control. *Biometrics*, **20**, 482-492.
- Desi, I. (1974): Neurotoxicological effect of small quantities of lindane. *Int Arch. Arbeitsmed*, **33**, 153-162.
- Doisy, E.A. and Bocklage, B.C. (1949): Chronic toxicity of gamma isomer of hexachlorocyclohexane in the albino rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **71**, 490-493.
- Doisy, E.A. and Bocklage, B.C. (1950): Inositol and the toxicity of four benzenehexachloride for the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **74**, 613-616.
- Facemire, C.F., Gross, T.S. and Guillete, L.J. Jr. (1995): Reproductive impairment in the Florida panther: Nature or nurture? *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl 4), 79-86.
- Fisher, R.A. (1955): Statistical methods and scientific induction. *J.R. Stat. Soc.*, **17**, 69-78.
- Fleming, L.E., Bean, J.A., Rudolph, M. and Hamilton, K. (1999): Cancer incidence in a cohort of licensed pesticide applicators in Florida. *J. Occup. Environ. Med.*, **41**, 279-288.



- Gallavan, R.H., Holson, J.F., Stump, D.G. and Knapp, J.F. (1999): Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, **13**, 383-390.
- Gibbs, P.E., Pascoe, P.L. and Bryan, G.W. (1991): Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol.*, **100**, 231-236.
- Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J. (1987): The Liver. In *Atlas of Experimental Toxicological Pathology* (Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J. ed.), pp. 43-60. MTP Press Ltd., Lancaster.
- Greaves, P. (1990a): Digestive system 2. Liver. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 393-441. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990b): Urinary Tract. Kidney. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 497-554. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990c): Endocrine glands. Thyroid gland. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies*, pp. 721-739. Elsevier, Amsterdam.
- Grier, J.W. (1982): Ban of DDT and subsequent recovery of reproduction in bald eagles. *Science*, **218**, 1232-1235.
- Guillette, L.J. Jr., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F. and Woodward, A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health. Perspect.*, **102**, 680-688.
- Hunt, G.L. and Hunt, M.W. (1977): Female-female pairing in Western gulls (*Larus Occidentalis*) in southern California. *Science*, **196**, 1466-1467.
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952): Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Statist. Assoc.*, **47**, 583-621.
- Lynch, A., Smart, J.L. and Dobbing, J. (1974): Motor co-ordination and cerebellar size in adult rats undernourished in early life. *Brain Res.*, **83**, 249-259.
- Lehman-McKeeman, L.D., Rivera-Torres, M.I. and Caudill, D. (1990): Lysosomal degradation of  $\alpha$ 2u-globulin and  $\alpha$ 2u-globulin-xenobiotic conjugates. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **103**, 539-548.
- MAFF in Japan (2000): Test guidelines for agricultural chemicals, 12-Nousan-No. 8147.

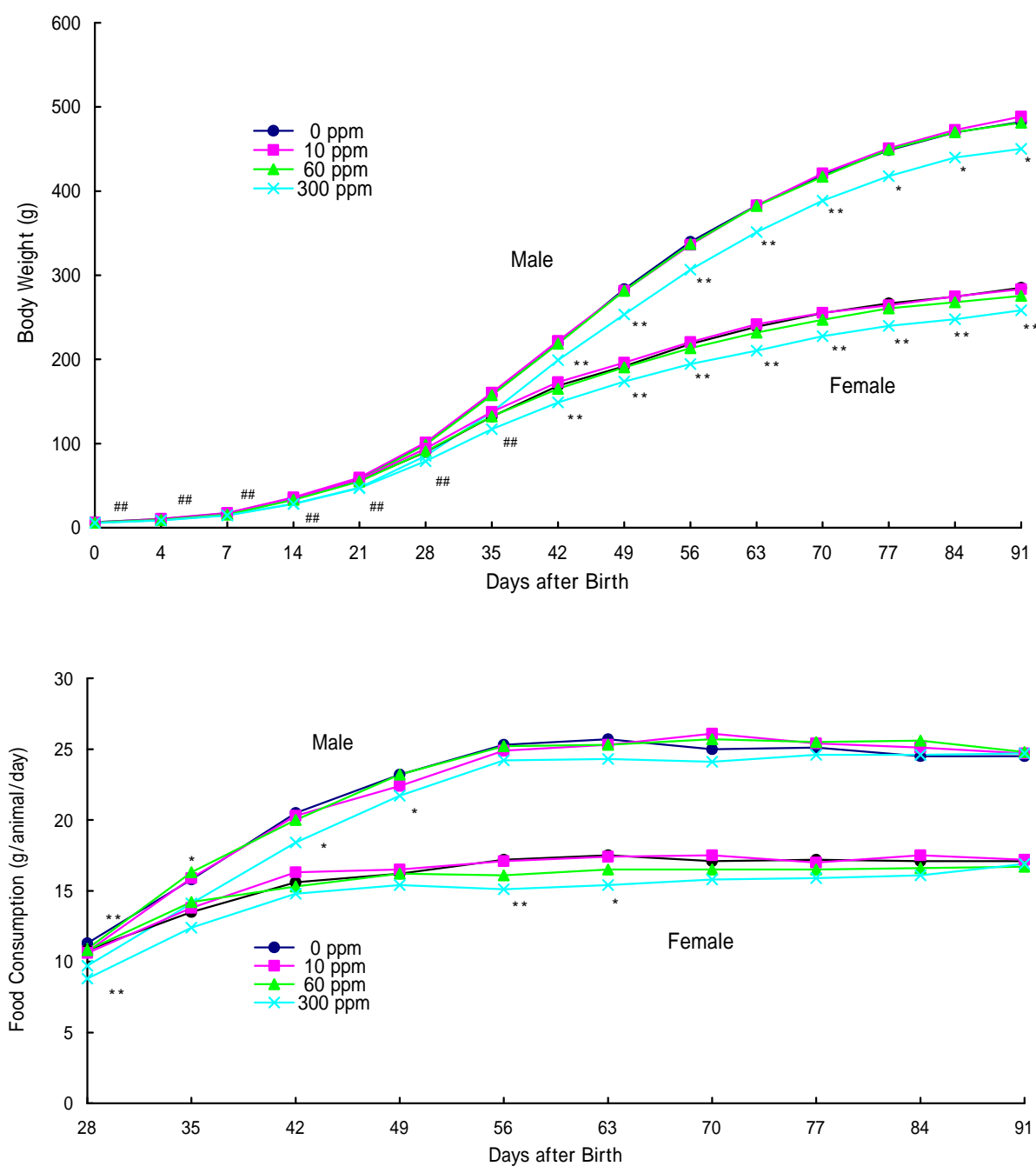
- McClain, R.M., Levin, A.A., Posch, R. and Downing, J.C. (1989): The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **99**, 216-228.
- Nerurkar, P.V., Park, S.S., Thomas, P.E., Nims, R.W. and Lubet, R.A. (1993): Methoxyresorufin and benzyloxyresorufin: substrates preferentially metabolized by cytochromes P4501A2 and 2B, respectively, in the rat and mouse. *Biochem. Pharmacol.*, **46**, 933-943.
- Newbold, R.R., Tyrey, S., Haney, A.F. and McLachlan, J.A. (1983): Developmentally arrested oviduct: a structural and functional defect in mice following prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Teratol.*, **27**, 417-426
- OECD (2001): OECD guidelines for testing of chemicals, No. 416.
- Omura, T. and Sato, R. (1964): The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.*, **239**, 2370-2378.
- Oppenheimer, J.H., Bernstein, G. and Surks, M.I. (1968): Increased thyroxine turnover and thyroidal function after stimulation of hepatocellular binding of thyroxine by phenobarbital. *J. Clin. Invest.*, **47**, 1399-1406.
- Owen, N.V., Griffing, W.J., Hoffman, D.G., Gibson, W.R. and Anderson, R.C. (1971): Effects of dietary administration of 5-(3,4-dichlorophenyl)-5-ethylbarbituric acid (dichlorophenobarbital) to rats: Emphasis on hepatic drug-metabolizing enzymes and morphology. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **18**, 720-733.
- Palmer, A.K., Cozens, D.D., Spicer, E.J. and Worden, A.N. (1978): Effects of lindane upon reproductive function in a 3-generation study in rats. *Toxicology*, **10**, 45-54.
- Pedersen, T. and Peter, H. (1968): Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reprod. Fertil.*, **17**, 555-557.
- Raizada, R.B., Misra, P., Saxena, P., Datta, K.K. and Dikshith, T.S. (1980): Weak estrogenic activity of lindane in rats. *J Toxicol Environ Health.*, **6**, 483-492..
- Rivera, S., Rosa, R., Martinez, E., Sunol, C., Serrano, M.T., Vendrell, M., Rodriguez-Farre, E. and Sanfeliu, C. (1998): Behavioral and monoaminergic changes after lindane exposure in developing rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, **20**, 155-160.
- Salewski, E. (1964): Färbemethode zum makroskopischen Nachweis von Implantations-stellen am Uterus der Ratte. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, **247**, 367.
- Sharpe, R.M., Fisher, J.S., Millar, M.M., Jobling, S. and Sumpter, J.P. (1995): Gestation and

- lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.*, **103**, 1136-1143.
- Shibata, T. (1978): Experimental studies on the dynamic aspects of BHC and PCB in vivo. *Jap. J. Hyg.*, **32**, 736-746.
- Srinivasan, K., Mahadevappa, K.L. and Radhakrishnamurty, R. (1991): Toxicity of  $\beta$ - and  $\gamma$ -hexachlorocyclohexane in rats of different ages. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 623-627.
- Swenberg, J.A., Short, B., Borghoff, S., Strasser, J. and Charbonneau, M. (1989): The comparative pathobiology of  $\alpha$ 2u-globulin nephropathy. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 35-46.
- Takayama, S., Akaike, M., Kawashima, K., Takahashi, M. and Kurokawa, Y. (1995): A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *J. Am. Coll. Toxicol.*, **14**, 266-292.
- Tilson, H.A., Shaw, S. and McLamb, R.L. (1987): The effects of lindane, DDT, and Chlordecone on avoidance responding and seizure activity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 57-65.
- Uphouse, L. and Williams, J. (1989): Diestrous treatment with lindane disrupts the female rat reproductive cycle. *Toxicol. Lett.*, **48**, 21-28.
- USEPA (1998): Health effects test guidelines, OPPTS 870.3800.
- Yamasaki, K., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S. and Sakamoto, S. (2005): Effects of in utero and lactational exposure to tamoxifen in SD rats. *Toxicol Lett.*, **156**, 289-296.
- You, L., Casanova, M., Bartolucci, E.J., Fryczynski, M.W., Dorman, D.C., Everitt, J.I., Gaido, K.W., Ross, S.M. and Heck, H. (2002): Combined effects of dietary phytoestrogen and synthetic endocrine-active compound on reproductive development in Sprague-Dawley rats: Genistein and methoxychlor. *Toxicol. Sci.*, **66**, 91-104.
- Weir, H.K., Marrett, L.D. and Maravan, V. (1999): Trends in the incidence of testicular germ cell cancer in Ontario by histologic subgroup, 1964-1996. *Can. Med. A. J.*, **160**, 201-205.



**Fig. 1 Body weight and food consumption of F0 animals**

Significantly different from control at 300 ppm: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01.



**Fig. 2 Body weight and food consumption of F1 animals**

Significantly different from control at 300 ppm: \*, P<0.05; \*\*, P<0.01; ##, P<0.01 (males and females).

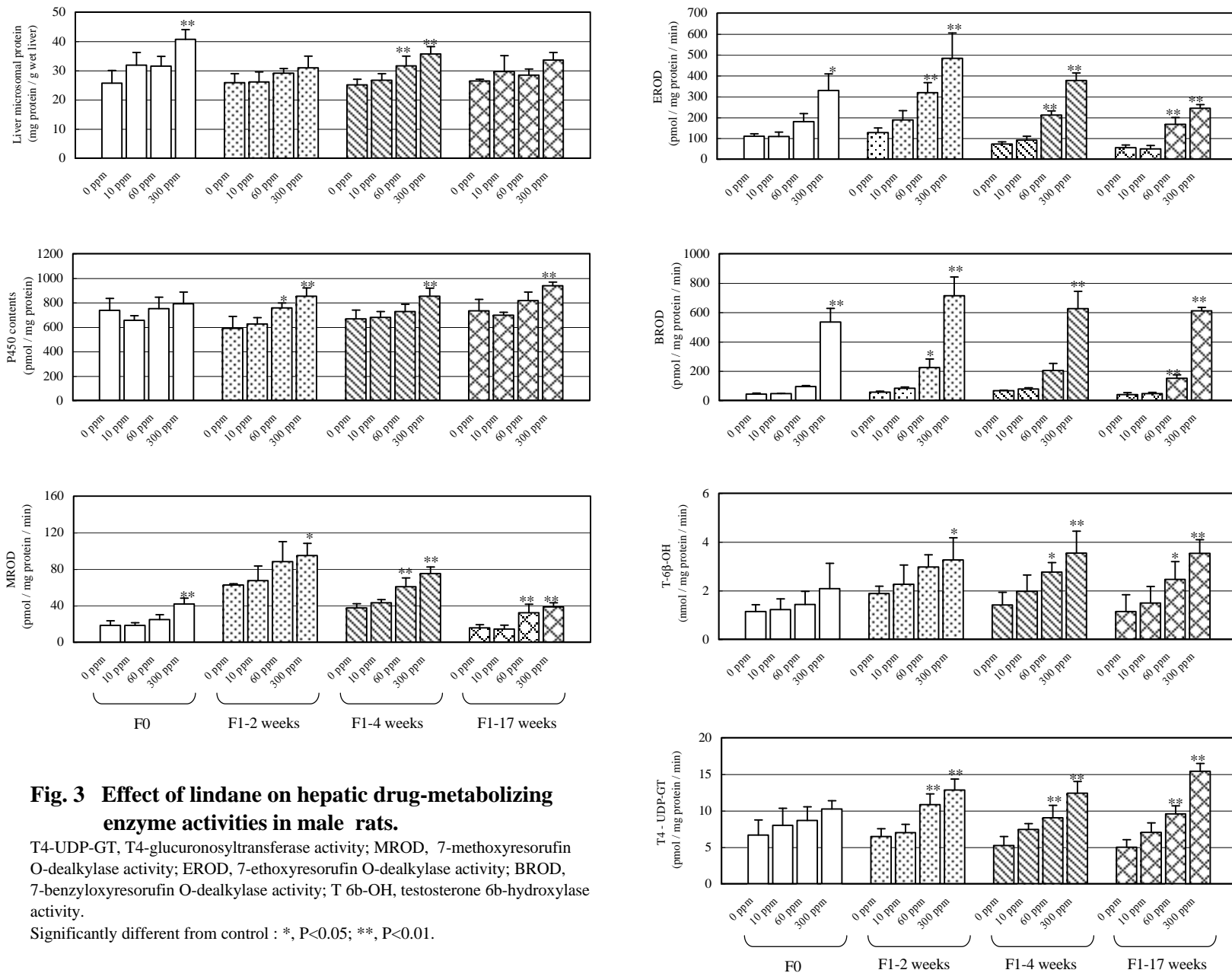


表 1 - 1 親動物の結果概要 ( 1 )

(青色 追加項目, 黄色/橙色 影響)

世代	投与群 (ppm)		F0				F1			
			0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄	交配前 (10週間)	0	0.5645 ± 0.0297	3.427 ± 0.211	17.23 ± 1.10	0	0.7386 ± 0.0257	4.531 ± 0.313	23.34 ± 1.78
		雌	0	0.6173 ± 0.0327	3.752 ± 0.183	18.95 ± 1.24	0	0.7992 ± 0.0532	4.850 ± 0.315	25.21 ± 1.93
	雌	妊娠期間	0	0.5730 ± 0.0328	3.389 ± 0.167	16.55 ± 0.95	0	0.6105 ± 0.0372	3.617 ± 0.201	18.01 ± 1.35
		哺育期間	0	1.525 ± 0.075	8.941 ± 0.677	45.21 ± 3.54	0	1.484 ± 0.098	8.709 ± 0.738	41.68 ± 5.65
動物数	雄		24	24	24	24	22	22	21	18
	雌		24	24	24	24	22	22	21	18
死亡数	雄		0	0	0	1	0	0	0	0
	雌		0	0	0	2	0	0	0	2
一般状態	雄		-	-	-	-	-	-	-	-
		瘻瘻 (妊娠末期)	-	-	-	-	-	-	-	2
	雌		-	-	-	-	-	-	-	-
		いらだち (分娩後)	-	-	-	-	-	-	-	4
体重 (g)	雄	交配前 (10週)	516.1 ± 36.8	522.7 ± 36.8	514.1 ± 47.4	496.2 ± 41.3 ( )	482.4 ± 29.9	488.6 ± 28.1	481.2 ± 45.9	450.1 ± 43.3
		雌	283.6 ± 19.1	284.0 ± 20.8	276.2 ± 18.1	263.1 ± 20.9	285.1 ± 26.0	283.6 ± 24.9	275.6 ± 23.2	258.3 ± 18.5
	雌	妊娠中 (20日)	413.1 ± 23.2	417.7 ± 23.7	411.4 ± 26.1	362.7 ± 26.1	436.0 ± 39.0	445.2 ± 29.5	433.0 ± 26.7	386.5 ± 31.1
		哺育中 (21日)	321.9 ± 17.8	322.4 ± 18.5	329.3 ± 21.2	300.3 ± 21.2	354.2 ± 25.8	354.6 ± 20.5	353.8 ± 22.5	331.7 ± 21.4
体重増加量 (g)	雄	交配前 (10週)	270.7 ± 32.9	276.9 ± 31.9	267.5 ± 41.0	249.3 ± 36.5 ( )	423.9 ± 28.5	428.8 ± 26.9	424.0 ± 43.3	401.6 ± 39.2 ( )
		雌	109.3 ± 15.1	110.0 ± 15.2	103.3 ± 14.8	89.0 ± 16.7	229.0 ± 24.9	224.9 ± 23.1	219.8 ± 23.4	210.2 ± 17.8 ( )
	雌	妊娠中 (20日)	132.7 ± 14.9	135.6 ± 12.0	131.7 ± 14.3	102.9 ± 12.5	136.3 ± 19.7	146.0 ± 13.8	138.2 ± 8.9	116.1 ± 23.0
		哺育中 (21日)	4.4 ± 18.2	1.0 ± 16.2	10.6 ± 18.0	26.8 ± 17.5	-4.5 ± 17.2	-2.6 ± 15.1	7.3 ± 14.8	36.1 ± 22.7
摂餌量 (g)	雄	交配前 (10週)	23.7 ± 1.2	23.7 ± 1.1	23.9 ± 1.4	23.3 ± 1.7 ( )	24.5 ± 1.8	24.7 ± 1.4	24.8 ± 1.6	24.7 ± 1.6 ( )
		雌	14.3 ± 1.2	14.5 ± 0.9	14.1 ± 0.8	14.3 ± 1.2 ( )	17.1 ± 1.1	17.2 ± 1.5	16.7 ± 1.5	16.9 ± 1.8 ( )
	雌	妊娠中 (20日)	21.1 ± 2.1	20.8 ± 1.7	20.5 ± 1.7	18.6 ± 1.9	22.7 ± 2.3	23.5 ± 2.5	22.8 ± 2.3	20.3 ± 2.7
		哺育中 (21日)	66.9 ± 5.1	67.4 ± 3.2	66.1 ± 4.4	61.3 ± 3.9	68.5 ± 4.4	72.7 ± 4.4	69.1 ± 4.9	60.0 ± 8.9 ( )
性周期	平均性周期日数	4.21 ± 0.46	4.23 ± 0.42	4.00 ± 0.00	4.00 ± 0.00	4.45 ± 0.59	4.25 ± 0.49	4.15 ± 0.37	4.00 ± 0.00	
	異常性周期動物	0/24	0/24	0/24	0/23	1/22	2/22	1/21	0/16	
生殖機能	交尾所要日数	2.3 ± 1.0	2.1 ± 1.1	2.7 ± 0.8	2.6 ± 1.2	2.5 ± 1.8	2.8 ± 1.4	2.5 ± 1.2	3.2 ± 2.9	
	逸した発情期の回数	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2	0.0 ± 0.2	0.2 ± 0.8	
	交尾率 (%)	95.8 (23/24)	95.8 (23/24)	100.0 (24/24)	95.7 (22/23)	100.0 (22/22)	100.0 (22/22)	100.0 (21/21)	93.8 (15/16)[*3]	
	受胎率 (%)	95.7 (22/23)	95.7 (22/23)	91.7 (22/24)[*1]	90.9 (20/22)[*2]	100.0 (22/22)	95.5 (21/22)	95.2 (20/21)	100.0 (16/16)	
精子検査	運動精子率 (%)	84.8 ± 6.81	80.7 ± 9.10	84.1 ± 7.88	77.7 ± 21.65	90.0 ± 4.89	88.5 ± 6.69	87.0 ± 7.27	87.6 ± 8.12	
	精巣精子数 (×10 <sup>6</sup> /g)	108.5 ± 19.35	NE	NE	104.2 ± 23.42	125.2 ± 23.30	NE	NE	114.9 ± 12.51	
	精巣上体尾部精子数 (×10 <sup>9</sup> /g)	540.3 ± 151.48	NE	NE	470.6 ± 167.20	574.9 ± 113.58	NE	NE	573.8 ± 204.03	
	形態異常 (%)	1.6 ± 1.39	NE	NE	5.9 ± 21.73	1.0 ± 1.21	NE	NE	1.3 ± 1.77	
	Tailless Sperm (%)	3.3 ± 4.33	NE	NE	2.4 ± 4.11	3.8 ± 4.18	NE	NE	2.3 ± 4.53	

- : 特記すべき所見なし, NE : 検査せず

: P<0.05, : P<0.01

( ) : 期間内で有意差あり

\*1 妊娠動物の1例は分娩しなかった.

\*2 妊娠動物の1例は妊娠中に死亡した.

\*3 未交尾雌の1例は同群の交尾した雄との再交配により交尾, 受胎し, 分娩した.

表 1 - 2 親動物の結果概要 ( 2 )

(青色 追加項目, 黄色/橙色 影響)

世代 投与群 (ppm)	F0				F1					
	0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300		
分娩・哺育										
妊娠期間 (日)	22.1 ± 0.3	21.9 ± 0.3	21.9 ± 0.3	22.1 ± 0.3	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.2	22.0 ± 0.9	22.1 ± 0.4		
着床数	13.9 ± 2.4	14.5 ± 2.2	14.9 ± 1.8	13.6 ± 1.4	13.7 ± 2.6	16.0 ± 1.9	15.3 ± 1.4	14.4 ± 3.0		
分娩異常	0/22	0/22	0/21	0/19	0/22	0/21	1/20	0/16		
出生率 (%)	93.14 ± 8.53	93.48 ± 7.76	92.39 ± 7.79	91.47 ± 7.65	93.84 ± 9.01	91.55 ± 5.69	89.87 ± 22.07	91.25 ± 7.00		
出産率 (%)	100.0 (22/22)	100.0 (22/22)	100.0 (21/21)	100.0 (19/19)	100.0 (22/22)	100.0 (21/21)	95.0 (19/20)	100.0 (16/16)		
哺育異常	0/22	0/22	0/21	1/19	0/22	0/21	1/20	6/16		
器官重量	雄	最終体重	526.2 ± 38.9	528.5 ± 39.3	526.7 ± 54.3	517.1 ± 43.6	547.3 ± 37.5	548.6 ± 41.1	544.4 ± 63.9	498.8 ± 48.3
		脳	2.191 ± 0.077	2.205 ± 0.088	2.176 ± 0.106	2.213 ± 0.080	2.261 ± 0.078	2.278 ± 0.138	2.208 ± 0.128	2.257 ± 0.164
上段:実重量 (g)		下垂体 (×10 <sup>-3</sup> )	0.418 ± 0.027	0.420 ± 0.033	0.417 ± 0.042	0.431 ± 0.035	0.415 ± 0.021	0.417 ± 0.033	0.411 ± 0.047	0.455 ± 0.031
			16.11 ± 1.60	15.94 ± 1.71	15.69 ± 1.74	15.06 ± 1.81	15.14 ± 1.41	15.30 ± 2.32	14.52 ± 1.78	12.82 ± 1.74
下段:対体重比 (g/100gBW)			3.08 ± 0.38	3.04 ± 0.40	3.00 ± 0.29	2.93 ± 0.40	2.78 ± 0.33	2.79 ± 0.37	2.69 ± 0.35	2.56 ± 0.35
		甲状腺 (×10 <sup>-3</sup> )	32.12 ± 5.52	32.63 ± 11.14	31.80 ± 5.27	32.37 ± 6.49	28.68 ± 6.45	27.22 ± 5.22	26.13 ± 4.21	24.35 ± 4.21
			6.15 ± 1.22	6.22 ± 2.35	6.09 ± 1.15	6.28 ± 1.30	5.27 ± 1.17	4.98 ± 0.95	4.84 ± 0.91	4.92 ± 0.95
		胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	265.4 ± 58.6	277.4 ± 69.2	248.0 ± 37.6	262.2 ± 66.6	354.8 ± 92.9	339.2 ± 74.9	311.1 ± 76.8	292.5 ± 70.0
			50.51 ± 10.99	52.55 ± 12.85	47.16 ± 6.02	50.93 ± 13.31	64.51 ± 14.43	61.73 ± 12.13	56.84 ± 11.31	58.61 ± 12.21
F0: 雄16w		肝臓	16.369 ± 2.036	17.728 ± 1.873	17.375 ± 2.331	19.888 ± 2.219	18.019 ± 1.316	18.386 ± 2.342	18.741 ± 2.880	19.296 ± 3.389
雌17-18w			3.104 ± 0.185	3.350 ± 0.180	3.293 ± 0.196	3.843 ± 0.213	3.294 ± 0.151	3.344 ± 0.244	3.432 ± 0.207	3.845 ± 0.391
		脾臓	0.834 ± 0.118	0.828 ± 0.079	0.864 ± 0.095	0.855 ± 0.118	0.876 ± 0.085	0.866 ± 0.088	0.928 ± 0.152	0.838 ± 0.087
F1: 雄21-22w			0.158 ± 0.020	0.157 ± 0.015	0.165 ± 0.016	0.166 ± 0.026	0.159 ± 0.017	0.157 ± 0.014	0.170 ± 0.018	0.168 ± 0.013
雌20-23w		腎臓	3.664 ± 0.348	3.934 ± 0.434	4.520 ± 0.558	4.941 ± 0.615	3.768 ± 0.332	4.124 ± 0.446	4.739 ± 0.684	5.275 ± 1.243
			0.696 ± 0.045	0.744 ± 0.049	0.859 ± 0.078	0.958 ± 0.111	0.691 ± 0.065	0.752 ± 0.065	0.870 ± 0.088	1.060 ± 0.254
		副腎 (×10 <sup>-3</sup> )	56.68 ± 6.72	54.06 ± 8.24	58.05 ± 5.76	58.19 ± 8.28	58.48 ± 5.05	60.77 ± 6.67	63.81 ± 8.45	66.82 ± 12.23
			10.82 ± 1.40	10.24 ± 1.45	11.10 ± 1.27	11.28 ± 1.73	10.74 ± 1.29	11.11 ± 1.30	11.76 ± 1.37	13.42 ± 2.17
		精巣	3.669 ± 0.384	3.408 ± 0.307	3.540 ± 0.277	3.498 ± 0.295	3.674 ± 0.243	3.602 ± 0.303	3.601 ± 0.342	3.422 ± 0.454
			0.699 ± 0.072	0.647 ± 0.055	0.678 ± 0.079	0.681 ± 0.070	0.673 ± 0.059	0.658 ± 0.046	0.669 ± 0.092	0.686 ± 0.065
		前立腺	0.700 ± 0.157	0.677 ± 0.125	0.667 ± 0.152	0.657 ± 0.144	0.754 ± 0.166	0.699 ± 0.162	0.691 ± 0.134	0.592 ± 0.187
			0.135 ± 0.034	0.129 ± 0.026	0.128 ± 0.037	0.126 ± 0.030	0.137 ± 0.034	0.126 ± 0.024	0.128 ± 0.034	0.119 ± 0.038
		精囊	2.950 ± 0.316	2.766 ± 0.343	2.878 ± 0.263	2.763 ± 0.306	2.782 ± 0.251	2.793 ± 0.349	2.955 ± 0.282	2.722 ± 0.396
			0.564 ± 0.057	0.526 ± 0.075	0.549 ± 0.085	0.537 ± 0.066	0.512 ± 0.061	0.509 ± 0.051	0.551 ± 0.088	0.549 ± 0.083
		精巣上体	1.294 ± 0.096	1.253 ± 0.097	1.300 ± 0.124	1.301 ± 0.105	1.262 ± 0.081	1.305 ± 0.090	1.267 ± 0.129	1.217 ± 0.159
			0.247 ± 0.025	0.237 ± 0.020	0.250 ± 0.032	0.253 ± 0.028	0.232 ± 0.021	0.238 ± 0.016	0.235 ± 0.032	0.244 ± 0.028

: P<0.05, : P<0.01



表 1 - 3 親動物の結果概要 ( 3 )

(青色:追加項目,黄色/橙色:影響)

世代 投与群 (ppm)	器官重量	雌		F0				F1			
				0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300
			最終体重	296.9±18.0	301.9±18.3	301.5±17.9	291.9 ± 19.6	332.4±23.3	329.6±23.5	329.9±25.9	301.9 ± 18.0
			脳	2.038±0.064	2.016±0.070	1.990±0.053	2.067±0.095	2.073±0.066	2.097±0.087	2.079±0.066	2.055±0.051
	上段:実重量			0.690±0.042	0.669±0.042	0.664±0.050	0.709±0.040	0.626±0.043	0.639±0.045	0.633±0.048	0.683±0.042
	(g)		下垂体 (×10 <sup>-3</sup> )	22.26±2.64	22.28±2.72	21.85 ± 2.00	18.80±1.59	22.39±2.56	22.25±2.65	21.25±3.00	17.19±1.78
				7.52±1.00	7.39±0.85	7.27±0.74	6.46±0.56	6.75±0.71	6.76±0.72	6.46±0.90	5.70±0.51
	下段:対体重比		甲状腺 (×10 <sup>-3</sup> )	24.78±4.28	22.69±4.21	23.19±2.84	23.74±3.71	25.33±3.74	26.54±4.91	23.94±2.72	22.65±1.90
	(g/100gBW)			8.39±1.55	7.52±1.31	7.69±0.86	8.16±1.25	7.66±1.26	8.04±1.26	7.29±0.90	7.54±0.74
			胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	210.0±50.2	225.8±49.1	225.5±51.2	201.0±58.6	272.4±51.4	286.5±72.7	296.9±83.0	216.7±45.1
				70.59±15.97	74.92±15.81	74.86±16.47	69.40±21.67	82.29±16.34	87.37±23.11	89.65±21.77	71.67±13.41
	F0: 雄16w		肝臓	11.549±1.041	11.636±1.350	13.042±0.978	13.816 ± 1.252	14.189±2.064	14.376±1.541	15.452±1.953	15.226±1.628
	雌17-18w			3.894±0.313	3.851±0.372	4.326±0.207	4.734 ± 0.321	4.257±0.408	4.366±0.382	4.682±0.429	5.036 ± 0.347
			脾臓	0.563±0.082	0.581±0.070	0.583±0.073	0.553±0.064	0.645±0.104	0.625±0.081	0.649±0.070	0.572±0.063
	F1: 雄21-22w			0.188±0.026	0.193±0.026	0.194±0.021	0.190±0.019	0.196±0.031	0.190±0.025	0.198±0.019	0.190±0.016
	雌20-23w		腎臓	2.375±0.158	2.391±0.189	2.446±0.110	2.359±0.191	2.645±0.291	2.702±0.224	2.791±0.231	2.463±0.203
				0.801±0.039	0.793±0.062	0.812±0.045	0.808 ± 0.037	0.796±0.061	0.821±0.057	0.849±0.068	0.816±0.046
			副腎 (×10 <sup>-3</sup> )	69.26±8.95	69.59±11.16	71.74±8.22	74.35 ± 10.50	74.30±9.87	74.03±5.89	74.73±8.22	80.54 ± 10.47
				23.33±2.70	23.09±3.61	23.81±2.55	25.52 ± 3.49	22.36±2.50	22.54±2.26	22.71±2.42	26.64 ± 2.77
			卵巢 (×10 <sup>-3</sup> )	106.28±13.39	112.19±11.60	113.38±10.86	107.68±15.60	121.62±20.11	128.12±19.30	123.04±17.97	119.86±5.68
				35.81±3.74	37.23±4.05	37.64±3.20	36.84±3.96	36.54±4.84	38.96±5.55	37.45 ± 5.51	39.85 ± 3.22
			子宮	0.727±0.339	0.715±0.324	0.630±0.287	0.800±0.441	0.808±0.328	0.701±0.311	0.746±0.303	0.722±0.384
				0.246±0.116	0.235±0.103	0.210±0.097	0.276±0.154	0.245±0.104	0.215±0.103	0.229±0.103	0.241±0.129
			発情前期	1.051±0.236	1.133±0.138	0.950±0.353	1.212±0.370	1.015±0.242	1.017±0.213	1.024±0.132	0.990±0.387
				0.354±0.089	0.365±0.055	0.320±0.112	0.420±0.128	0.312±0.079	0.319±0.078	0.319±0.063	0.330±0.132
			発情後期/発情休止期	0.448±0.075	0.505±0.104	0.497±0.092	0.493±0.107	0.455±0.031	0.479±0.098	0.467±0.033	0.454±0.059
				0.151±0.020	0.170±0.034	0.164±0.037	0.166±0.032	0.135±0.015	0.143±0.025	0.139±0.015	0.152±0.016

: P<0.05, : P<0.01

表 1 - 4 親動物の結果概要 ( 4 )

(青色 追加項目,黄色/橙色 影響)

世代 投与群 (ppm)	程度	F0				F1				
		0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300	
<b>剖検</b>										
雄		<24>#	<24>	<24>	<23>	<22>	<22>	<21>	<18>	
肝臓	小葉構造明瞭	0	0	0	0	0	0	5	8	
腎臓	褪色	0	0	12	21	0	0	9	16	
	腫大	0	0	1	4	0	0	7	12	
雌		<24>	<24>	<24>	<22>	<22>	<22>	<21>	<16>	
肝臓	暗褐色化	0	0	0	0	0	0	0	8	
	腫大	0	0	1	9	0	0	2	9	
	小葉構造明瞭	0	0	3	16	0	0	1	9	
<b>組織所見</b>										
雄	肝臓		<20>	<20>	<20>	<19>	<18>	<18>	<17>	<14>
	小葉中心性肝細胞肥大	1	0	0	18	1	0	1	17	2
		2	0	0	0	18	0	0	0	12
	腎臓		<24>	<24>	<24>	<23>	<22>	<22>	<21>	<18>
	好塩基性尿細管	1	4	20	3	3	5	17	1	0
		2	0	0	19	7	0	1	16	8
		3	0	0	2	13	0	0	4	9
	近位尿細管上皮の硝子滴	1	11	24	0	0	9	22	0	0
		2	0	0	24	9	0	0	20	11
		3	0	0	0	14	0	0	1	7
	甲状腺		<10>	<0>	<0>	<10>	<21>	<22>	<20>	<18>
	る胞上皮の肥大	1	0	0	0	0	0	0	1	5
雌	肝臓		<20>	<20>	<20>	<18>	<18>	<18>	<17>	<16>
	小葉中心性肝細胞肥大	1	0	0	19	2	0	0	15	0
		2	0	0	0	16	0	0	0	16
	甲状腺		<24>	<24>	<24>	<22>	<22>	<22>	<21>	<16>
	る胞上皮の肥大	1	0	0	0	6	1	3	2	2
	卵胞数						<10>			<10>
	原始卵胞		NE	NE	NE	NE	145.8±85.3	NE	NE	129.7±49.3
	二次卵胞		NE	NE	NE	NE	27.4±10.5	NE	NE	20.5±4.0
	合計		NE	NE	NE	NE	173.2±93.0	NE	NE	150.2±49.5

# : < > は検査例数を示す, 程度 : 1, 軽度 ; 2, 中等度 ; 3, 重度

NE : 検査せず

: P<0.05, : P<0.01

表 1 - 5 親動物の結果概要 ( 5 )

(青色 追加項目, 黄色/橙色 影響)

世代		F0				F1					
投与群 (ppm)		0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300		
血中ホルモン濃度											
甲状腺ホルモン											
雄		TSH (ng/mL)	11.6±4.28	10.6±4.26	10.9±3.97	12.3±5.33	13.6±4.40	13.5±4.37	11.0±2.67	12.5±4.57	
		T3 (ng/mL)	0.74±0.14	0.77±0.12	0.78±0.11	0.72 ± 0.08	0.74±0.15	0.73±0.12	0.66±0.16	0.58 ± 0.08	
		T4 (ng/mL)	36.3±5.70	38.8±5.50	37.5±4.47	30.8 ± 3.42	48.3±9.05	49.6±8.19	41.5±6.18	31.9 ± 6.06	
雌		TSH (ng/mL)	7.1±1.34	8.4±2.73	7.4±2.09	10.7±4.94	8.9±1.15	8.5±1.70	8.9±2.11	10.7±3.52	
		T3 (ng/mL)	0.95±0.14	0.88±0.10	0.84±0.13	0.74±0.10	0.77±0.12	0.80±0.15	0.70±0.14	0.65±0.11	
		T4 (ng/mL)	21.2±5.94	20.6±6.81	18.9 ± 4.67	17.15 ± 4.25	45.5±13.41	36.2±9.90	39.3±11.85	34.7 ± 7.08	
性ホルモン											
雄		LH (ng/mL)	2.38±0.28	2.48±0.35	2.48±0.33	2.63 ± 0.45	1.74±0.38	1.72±0.25	1.70±0.32	1.76 ± 0.31	
		FSH (ng/mL)	12.7±3.9	11.4±1.2	11.3±2.0	11.1 ± 2.0	11.1±1.5	12.0±1.8	11.9±2.2	11.2 ± 1.5	
		PRL (ng/mL)	12.8±14.7	11.8±14.0	12.3±11.9	12.3±13.9	5.8±3.5	3.9±1.8	4.9±1.9	4.5±2.3	
		T (ng/mL)	3.57±1.95	4.23±2.03	4.32±2.18	4.85 ± 2.60	3.43±2.32	2.72±1.28	2.82±1.73	3.02 ± 1.32	
		DHT (pg/mL)	142±65.7	109±46.6	170±106	176 ± 96	164±99	150±75	135±71	137 ± 66	
雌		発情前期	LH (ng/mL)	2.15±1.32	1.77±0.15	1.55±0.05	2.14±0.93	1.58±0.14	1.94±0.28	2.12±0.29	2.27±0.20
			FSH (ng/mL)	7.8±1.9	7.0±0.8	7.3±1.4	8.0±1.8	6.1±0.6	6.3±1.1	7.5±0.9	7.0±1.1
			PRL (ng/mL)	21.1±17.0	8.5±9.5	4.0±1.0	12.7±13.2	6.3±6.2	18.5±35.3	7.6±7.5	4.5±0.7
			E2 (pg/mL)	23.2±6.7	32.2±10.9	17.8±5.6	26.0±9.3	17.6±2.9	18.0±4.3	16.0±5.7	24.8±8.7
			P (ng/mL)	356±237	524±418	492±369	829±264	447±222	796±425	365±69	475±129
		発情後期	LH (ng/mL)	1.80±0.24	1.97±0.42	2.09±0.29	1.98±0.18	2.52±0.58	2.39±0.34	2.66±0.50	2.76±0.50
			FSH (ng/mL)	7.52±0.85	7.93±1.54	7.59±0.81	7.05±0.76	7.20±1.27	7.84±1.82	6.83±0.11	7.06±0.79
			PRL (ng/mL)	3.3±3.5	4.0±4.35	3.9±2.5	2.6±1.7	4.3±2.8	3.7±1.3	6.5±4.5	2.7±0.8
			E2 (pg/mL)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	
			P (ng/mL)	772±522	673±455	831±329	1341±426	1116±550	701±131	865±390	1259±407

N.D.: 検出限界 ( 5 pg/mL ) 以下

: P<0.05 , : P<0.01

表2 - 1 兎動物の結果概要 ( 1 )

(青色 追加項目, 黄色/橙色 影響)

世代		F1				F2						
投与群 (ppm)		0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300			
出産児数		13.0±2.1	13.5±2.1	13.8±2.0	12.7±1.4	13.2±2.7	14.8±1.8	14.5±1.7	13.4±2.8			
出産生存児数		12.8±2.1	13.5±2.1	13.7±2.0	12.4±1.3	12.8±2.6	14.7±1.8	13.7±3.5	13.1±2.8			
性比 (雄/雌)		0.99 (140/142)	0.93 (143/154)	0.82 (130/158)	0.80 (105/131)	1.31(160/122)	1.03(156/152)	0.90(129/144)	0.99(109/110)			
出生時生存率 (%)		99.00±3.39	100.00±0.00	99.66±1.55	97.82±5.72	97.25±6.03	99.40±1.90	93.46±22.44	97.73±3.50			
4日生存率 (%)		99.35±2.12	99.70±1.43	98.98±3.41	94.56±12.77	99.40±1.96	99.34±2.08	98.01±4.29	50.91±42.44			
離乳率 (%)		100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	98.51±4.34	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	90.91±30.15			
外表異常 一般状態		-	-	-	-	-	-	-	-			
体重 (g)	雄	0日	6.5±0.5	6.4±0.4	6.3±0.5	6.0±0.4	6.7±0.4	6.7±0.5	6.4±0.7	5.9±0.5		
		4日	10.3±1.0	10.5±1.3	9.8±0.9	8.9±0.8	10.8±1.0	10.3±0.9	9.8±1.4	7.7±1.2		
		7日	17.2±1.3	17.6±1.8	16.4±1.3	14.8±1.1	17.9±1.4	17.2±1.5	16.5±2.3	13.1±1.2		
		14日	35.2±2.4	36.0±2.8	34.2±2.2	28.4 ± 2.0	36.9±2.9	36.5±2.2	35.1±3.8	28.1±1.3		
		21日	58.8±4.2	59.7±3.6	56.9±3.5	47.7 ± 3.4	60.2±3.6	60.8±3.5	57.6±5.8	47.5±2.5		
	雌	0日	6.1±0.4	6.0±0.4	5.9±0.5	5.6±0.3	6.4±0.4	6.3±0.5	6.0±0.7	5.6±0.5		
		4日	9.8±1.0	9.9±1.2	9.4±0.9	8.6±0.6	10.2±1.1	9.8±1.0	9.2±1.4	7.7±1.1		
		7日	16.5±1.4	16.8±1.6	15.6±1.4	14.4±0.9	17.0±1.6	16.3±1.8	15.4±2.6	13.2±1.5		
		14日	34.1±2.5	34.8±2.5	33.2±2.2	28.0 ± 1.7	35.4±3.2	35.2±2.7	33.2±4.2	28.4±3.3		
		21日	55.9±3.6	57.3±3.4	54.8±3.2	46.9 ± 3.4	57.3±3.4	57.9±4.3	54.0±6.1	46.9±5.3		
		体重増加量 (g)		0-4日	3.8±0.8	4.0±1.1	3.6±0.7	2.9±0.6	4.2±0.8	3.6±0.7	3.3±0.9	1.6±1.5
		雄	4-7日	6.8±0.6	7.0±0.7	6.4±0.7	5.8±0.6	7.0±0.8	6.6±0.8	6.5±1.1	5.0±0.7	
4-14日	24.9±2.0		25.5±2.1	24.3±1.7	19.3 ± 1.7	26.0±2.4	25.9±1.8	25.1±2.7	20.0±1.0			
4-21日	48.4±4.0		49.2±2.9	46.9±3.1	38.7 ± 3.0	49.3±3.2	50.3±3.1	47.6±4.6	39.4±2.3			
雌	0-4日		3.6±0.8	3.8±1.0	3.5±0.8	3.0±0.6	3.9±0.8	3.5±0.7	3.2±0.9	2.0±1.1		
	4-7日		6.6±0.7	6.8±0.7	6.0±0.7	5.6±0.6	6.7±0.8	6.3±1.0	6.0±1.3	5.2±0.8		
	4-14日		24.3±2.1	24.8±2.0	23.6±1.8	19.2 ± 1.4	25.0±2.5	25.2±2.1	23.8±3.0	20.4±2.8		
	4-21日		46.1±3.4	47.3±2.8	45.2±2.8	38.2 ± 3.0	47.0±2.9	48.0±3.7	44.6±4.9	38.9±4.7		

- : 特記すべき所見なし

: P&lt;0.05 , : P&lt;0.01

表 2 - 2 兎動物の結果概要 ( 2 )

(青色 追加項目, 黄色/橙色 影響)

世代			F1				F2			
投与群 (ppm)			0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300
AGD	雄	AGD	4.55±0.41	4.46±0.32	4.38±0.34	4.33 ± 0.21	4.62±0.48	4.58±0.49	4.45 ± 0.54	3.93 ± 0.63
		( AGD/BW <sup>1/3</sup> )	2.09±0.20	2.04±0.14	2.04±0.14	2.08 ± 0.10	2.09±0.24	2.09±0.22	2.07 ± 0.23	1.98 ± 0.25
4日	雌	AGD	2.12±0.29	2.01±0.16	1.98±0.18	2.15±0.21	2.17±0.19	2.18±0.21	2.11±0.25	2.00±0.27
		( AGD/BW <sup>1/3</sup> )	0.99±0.13	0.93±0.07	0.93±0.07	1.04±0.11	1.00±0.09	1.01±0.09	1.00±0.10	1.01±0.12
乳頭発現異常 (%)	雄 (乳頭/乳輪の遺残)		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	0.0±0.0
	雌		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	0.0±0.0
生後形態分化										
耳介展開 (%)	雄	2日	30.0±38.3	30.9±32.7	29.2±33.0	28.8±37.3	NE	NE	NE	NE
		3日	100.0±0.0	97.8±7.6	86.3±29.7	97.5±8.1	NE	NE	NE	NE
		4日	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0 ± 0.0	NE	NE	NE	NE
		雌	2日	27.0±35.3	36.7±37.2	30.8±27.0	28.6±32.3	NE	NE	NE
上切歯萌出	雌	3日	100.0±0.0	96.9±8.9	88.9±27.5	97.7±6.9	NE	NE	NE	NE
		4日	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	NE	NE	NE	NE
		雄 (日)	10.5±1.1	10.5±1.0	10.8±0.8	10.4±0.8	NE	NE	NE	NE
		雌 (日)	10.5±0.9	10.3±0.9	10.7±1.0	10.2±0.8	NE	NE	NE	NE
眼瞼開裂	雄 (日)	14.0±0.4	13.8±0.4	14.1±0.7	14.0±0.5	NE	NE	NE	NE	
	雌 (日)	13.8±0.4	13.6±0.5	13.6±0.6	13.9±0.5	NE	NE	NE	NE	
性成熟										
包皮分離 (雄)	発現日	(日)	40.1±1.4	39.7±1.2	40.0 ± 1.2	41.6 ± 1.5	NE	NE	NE	NE
		(発現日体重)	(g)	202.9±16.5	202.4±13.8	200.7 ± 19.3	191.9 ± 21.5	NE	NE	NE
	完了日	(日)	42.4±1.8	42.7±1.6	42.3 ± 1.3	44.3 ± 2.1	NE	NE	NE	NE
		(完了日体重)	(g)	223.7±22.1	226.5±16.0	221.7 ± 19.9	215.6 ± 29.0	NE	NE	NE
膣開口 (雌)	(日)	32.5±1.3	32.0±1.6	32.5±1.9	33.9±1.9	NE	NE	NE	NE	
	(発現日体重)	(g)	116.4±9.4	117.2±11.3	116.8±12.9	109.9±13.2	NE	NE	NE	NE
反射反応性										
平面正向反射	雄/雌 (%)		100/100	100/100	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE
角膜反射	雄/雌 (%)		100/100	100/100	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE
聴覚性驚愕反応	雄/雌 (%)		100/100	100/100	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE
疼痛反応	雄/雌 (%)		100/100	100/100	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE
空中正向反射	雄/雌 (%)		100/100	100/98.9	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE

NE: 検査せず

: P&lt;0.05, : P&lt;0.01

表 2 - 3 児動物の結果概要 ( 3 )

(青色:追加項目,黄色/橙色:影響)

世代 投与群 (ppm)		F1				F2				
		0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300	
行動機能										
情動性 (オープンフィールドテスト)										
雄	潜時	45.9±36.6	26.7±21.2	22.1±15.7	22.2±21.6	NE	NE	NE	NE	
	区画移動数	42.0±29.4	72.4±39.9	73.8±30.6	90.1±48.3	NE	NE	NE	NE	
	立ち上がり	9.8±7.3	15.6±11.3	12.5±8.7	12.8±9.2	NE	NE	NE	NE	
雌	潜時	34.5±30.5	44.6±34.0	13.2 ± 9.7	22.1 ± 19.2	NE	NE	NE	NE	
	区画移動数	66.8±19.6	67.6±39.5	81.9±39.3	84.8±21.2	NE	NE	NE	NE	
	立ち上がり	11.3±4.6	10.4±8.0	13.9±9.5	11.9±8.1	NE	NE	NE	NE	
運動協調機能 (ロータロッドテスト)										
雄	落下回数	5.5±5.1	3.3±1.9	3.8±3.2	4.9±2.2	NE	NE	NE	NE	
	歩行状態	-	-	-	-	NE	NE	NE	NE	
雌	落下回数	3.0±2.0	3.5±1.9	3.9±2.1	5.4±2.2	NE	NE	NE	NE	
	歩行状態	-	-	-	-	NE	NE	NE	NE	
学習機能 (ボールクライミングテスト) [最終日, 回/10試行]										
雄	条件回避反応	6.7±3.59	7.9±1.97	7.9±1.97	7.7±2.31	NE	NE	NE	NE	
	無条件回避反応	3.3±3.59	2.1±1.97	2.1±1.97	2.3±2.31	NE	NE	NE	NE	
	無逃避反応	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	NE	NE	NE	NE	
雌	条件回避反応	7.7±2.63	9.5±0.71	8.3±1.83	8.2±2.97	NE	NE	NE	NE	
	無条件回避反応	2.3±2.63	0.5±0.71	1.7±1.83	0.8±0.79	NE	NE	NE	NE	
	無逃避反応	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	1.0±3.16	NE	NE	NE	NE	
器官重量 (3週齢)										
上段:実重量 (g)	雄	最終体重	59.6±3.4	59.3±4.3	57.7±3.6	47.1±5.2	60.0±4.4	61.1±4.5	58.5±6.9	48.0±4.7
	脳	1.532±0.069	1.511±0.053	1.506±0.071	1.468±0.057	1.515±0.068	1.543±0.053	1.505±0.076	1.435±0.055	
	胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	2.577±0.172	2.559±0.211	2.617±0.181	3.149±0.325	2.531±0.152	2.536±0.155	2.601±0.274	3.012±0.269	
	脾臓	265.1±21.3	269.7±38.5	257.9±37.7	182.7±24.2	273.2±42.2	277.0±36.0	268.5±47.6	186.2±35.2	
	精巣	445.24±33.24	455.29±61.83	447.01±60.25	388.89±40.48	455.2±63.84	453.33±47.25	457.88±45.27	387.32±56.02	
	精巣上体 (×10 <sup>-3</sup> )	0.272±0.048	0.285±0.041	0.270±0.043	0.195±0.040	0.297±0.047	0.307±0.049	0.295±0.061	0.205±0.024	
	卵巣 (×10 <sup>-3</sup> )	0.456±0.072	0.480±0.061	0.466±0.064	0.410±0.065	0.495±0.071	0.502±0.064	0.502±0.068	0.429±0.042	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	0.255±0.025	0.237±0.040	0.238±0.027	0.199±0.022	0.241±0.032	0.241±0.022	0.233±0.040	0.179±0.025	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	0.428±0.029	0.399±0.059	0.411±0.033	0.422±0.034	0.402±0.048	0.395±0.026	0.398±0.040	0.371±0.022	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	43.567±3.990	42.536±5.239	41.537±5.077	35.647 ± 3.957	40.300±4.111	39.970±4.059	41.237±5.859	33.050 ± 5.134	
下段:対体重比 (g/100gBW)	雌	最終体重	73.154±6.459	71.694±6.723	71.837±6.649	75.878 ± 5.839	67.353±7.651	65.569±5.726	70.548±5.992	68.952 ± 8.952
	脳	55.8±3.5	57.2±3.2	54.8±3.8	47.1 ± 4.3	58.0±4.5	58.8±5.7	53.4±7.6	46.8±6.2	
	胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	1.460±0.041	1.498±0.056	1.433±0.071	1.448±0.050	1.481±0.032	1.500±0.074	1.454±0.076	1.432±0.049	
	脾臓	2.626±0.156	2.628±0.169	2.621±0.153	3.098 ± 0.275	2.570±0.179	2.565±0.179	2.760±0.301	3.110±0.416	
	精巣	260.5±29.6	270.1±33.3	261.1±39.0	205.0±30.2	261.9±27.2	286.8±37.8	259.8±54.7	203.7±45.8	
	精巣上体 (×10 <sup>-3</sup> )	467.36±47.31	472.62±54.85	476.62±63.00	434.98±43.56	453.77±50.03	489.58±61.37	484.27±62.26	431.52±52.93	
	卵巣 (×10 <sup>-3</sup> )	0.253±0.038	0.288±0.035	0.275±0.047	0.208±0.040	0.294±0.054	0.306±0.060	0.271±0.068	0.199±0.053	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	0.452±0.052	0.504±0.055	0.501±0.084	0.441±0.065	0.506±0.088	0.518±0.075	0.501±0.082	0.421±0.075	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	17.74±4.22	18.70±4.01	16.59±2.28	14.67±3.73	16.60±3.15	16.20±2.60	14.48±4.25	12.39±3.72	
	子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	31.77±7.20	32.55±5.89	30.32±4.05	30.99±6.72	28.79±6.01	27.69±4.55	26.93±6.52	26.16±5.49	
子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	33.332±6.051	35.250±4.649	34.133±5.071	34.506±6.782	37.295±6.858	38.857±6.537	38.700±6.152	36.278±7.559		
子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	59.692±9.015	61.864±9.275	62.398±9.215	73.711±14.383	64.726±12.832	66.339±10.666	73.198±12.276	78.198±16.278		

-: 特記すべき所見なし, NE: 検査せず  
 \*: P<0.05, \*\*: P<0.01

表 2 - 4 兎動物の結果概要 ( 4 )

(青色 追加項目,黄色/橙色 影響)

世代 投与群 (ppm)	F1				F2			
	0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300
剖検 (3週齢)	-	-	-	-	-	-	-	-
雄	<42>#	<42>	<38>	<25>	<92>	<83>	<75>	<61>
腎臓	0	0	3	0	5	2	6	1
肝臓	0	0	0	0	0	0	0	1
雌	<46>	<46>	<47>	<36>	<82>	<85>	<77>	<31>
腎臓	1	0	3	0	0	2	0	1
肝臓	1	0	0	0	0	0	0	0
胸腺	0	0	0	0	0	2	1	1
組織所見								
雄	<10>			<10>	<10>			<10>
胸腺	-	NE	NE	-	-	NE	NE	-
脾臓	-	NE	NE	-	-	NE	NE	-
雌	<10>			<10>	<10>			<9>
胸腺	-	NE	NE	-	-	NE	NE	-
脾臓	-	NE	NE	-	-	NE	NE	-
子宮	-	NE	NE	-	NE	NE	NE	NE

# : < > は検査例数を示す。

- : 特記すべき所見なし, NE : 検査せず

: P<0.05, : P<0.01

表3 肝薬物代謝酵素活性

投与群(ppm)			雄				雌			
			0 (対照)	10	60	300	0 (対照)	10	60	300
Liver microsomal protein	(mg protein / g wet liver)	F0-17w	25.7 ± 4.3	31.8 ± 4.4	31.5 ± 3.3	40.7 ± 3.3	24.5 ± 3.0	24.6 ± 1.8	26.5 ± 3.9	33.9 ± 7.3
		F1-2w	25.8 ± 3.1	26.1 ± 3.4	29.1 ± 1.6	30.9 ± 4.0	24.1 ± 2.9	28.0 ± 2.7	24.9 ± 2.6	30.4 ± 3.1
		F1-4w	25.1 ± 1.9	26.7 ± 2.2	31.6 ± 3.3	35.7 ± 2.5	25.7 ± 2.4	28.8 ± 2.4	28.7 ± 2.6	34.7 ± 4.3
		F1-17w	26.4 ± 0.6	29.7 ± 5.4	28.4 ± 2.1	33.6 ± 2.6	24.9 ± 2.6	24.0 ± 1.6	26.4 ± 2.8	NE
Cytochrome P450	(pmol / mg protein)	F0-17w	736 ± 97	655 ± 38	750 ± 94	791 ± 95	425 ± 50	434 ± 32	450 ± 67	472 ± 65
		F1-2w	589 ± 97	625 ± 52	756 ± 41	851 ± 69	464 ± 61	467 ± 39	534 ± 50	726 ± 153
		F1-4w	666 ± 73	678 ± 48	727 ± 60	852 ± 65	486 ± 49	552 ± 55	606 ± 29	735 ± 57
		F1-17w	733 ± 92	697 ± 23	815 ± 70	938 ± 30	517 ± 39	479 ± 78	509 ± 90	NE
	(nmol / g wet liver)	F0-17w	18.72 ± 2.34	20.84 ± 3.44	23.48 ± 2.61	32.22 ± 5.09	10.31 ± 0.81	10.66 ± 0.53	11.86 ± 2.28	15.88 ± 3.34
		F1-2w	15.16 ± 2.79	16.20 ± 1.00	21.97 ± 1.55	26.27 ± 4.14	11.28 ± 2.60	13.02 ± 1.10	13.33 ± 2.04	22.39 ± 6.56
		F1-4w	16.67 ± 2.09	18.03 ± 0.54	22.86 ± 2.05	30.51 ± 4.17	12.44 ± 1.09	15.91 ± 2.34	17.33 ± 0.80	25.33 ± 2.00
		F1-17w	19.35 ± 2.45	20.68 ± 3.99	23.08 ± 1.88	31.51 ± 2.75	12.87 ± 1.88	11.51 ± 2.29	13.54 ± 3.52	NE
7-Methoxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-17w	18.3 ± 5.3	18.3 ± 3.1	24.7 ± 5.4	42.0 ± 6.2	28.7 ± 2.9	27.6 ± 4.8	31.1 ± 7.0	45.6 ± 8.2
		F1-2w	62.6 ± 1.5	67.4 ± 16.0	88.2 ± 22.0	95.0 ± 13.4	57.0 ± 12.6	56.0 ± 6.3	74.5 ± 17.2	100.1 ± 30.5
		F1-4w	37.5 ± 4.7	43.1 ± 3.6	60.9 ± 9.6	75.3 ± 7.1	34.2 ± 7.9	39.3 ± 14.8	51.9 ± 13.0	57.1 ± 9.4
		F1-17w	15.7 ± 3.4	14.4 ± 4.2	32.3 ± 9.4	38.7 ± 4.5	23.9 ± 4.2	26.7 ± 6.9	31.0 ± 8.9	NE
	(nmol / g wet liver / min)	F0-17w	0.49 ± 0.20	0.58 ± 0.14	0.78 ± 0.21	1.70 ± 0.21	0.71 ± 0.15	0.68 ± 0.14	0.84 ± 0.27	1.56 ± 0.48
		F1-2w	1.62 ± 0.20	1.77 ± 0.51	2.57 ± 0.68	2.93 ± 0.55	1.37 ± 0.31	1.57 ± 0.19	1.87 ± 0.56	3.10 ± 1.26
		F1-4w	0.94 ± 0.15	1.16 ± 0.17	1.90 ± 0.13	2.69 ± 0.29	0.88 ± 0.23	1.13 ± 0.43	1.49 ± 0.42	2.00 ± 0.48
		F1-17w	0.42 ± 0.10	0.44 ± 0.16	0.93 ± 0.33	1.30 ± 0.20	0.59 ± 0.12	0.65 ± 0.21	0.84 ± 0.32	NE
7-Ethoxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-17w	109.2 ± 12.4	108.9 ± 20.6	179.7 ± 38.5	329.3 ± 79.4	120.4 ± 30.0	130.6 ± 38.0	204.2 ± 23.3	322.8 ± 59.8
		F1-2w	126.9 ± 22.2	188.4 ± 43.6	318.2 ± 47.6	483.4 ± 121.2	145.2 ± 26.6	146.0 ± 35.3	300.5 ± 84.3	431.1 ± 136.9
		F1-4w	72.1 ± 10.9	91.5 ± 17.7	211.5 ± 19.0	376.9 ± 35.6	114.7 ± 25.1	125.1 ± 22.7	256.7 ± 45.8	321.2 ± 35.9
		F1-17w	55.2 ± 12.3	49.2 ± 15.6	166.6 ± 33.1	243.7 ± 18.2	94.2 ± 8.7	96.3 ± 23.9	151.2 ± 57.3	NE
	(nmol / g wet liver / min)	F0-17w	2.82 ± 0.67	3.44 ± 0.65	5.69 ± 1.46	13.29 ± 2.93	2.89 ± 0.40	3.17 ± 0.67	5.35 ± 0.65	10.81 ± 2.29
		F1-2w	3.26 ± 0.52	4.97 ± 1.47	9.30 ± 1.81	14.89 ± 4.32	3.51 ± 0.85	4.13 ± 1.28	7.57 ± 2.68	13.36 ± 5.26
		F1-4w	1.81 ± 0.36	2.47 ± 0.67	6.65 ± 0.69	13.51 ± 2.11	2.93 ± 0.57	3.58 ± 0.55	7.43 ± 1.94	11.09 ± 1.42
		F1-17w	1.46 ± 0.35	1.47 ± 0.54	4.77 ± 1.24	8.18 ± 0.94	2.34 ± 0.30	2.33 ± 0.73	4.10 ± 1.98	NE
7-Benzoyloxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-17w	42.3 ± 6.9	46.0 ± 2.6	95.2 ± 5.7	534.0 ± 93	21.9 ± 9.0	21.7 ± 5.9	75.4 ± 13.7	245.7 ± 69.1
		F1-2w	55.7 ± 8.1	83.5 ± 7.9	223.3 ± 59.2	713.6 ± 127.1	35.4 ± 5.3	38.8 ± 9.7	214.2 ± 66.5	632.7 ± 93.2
		F1-4w	66.2 ± 3.7	78.2 ± 8.2	204.1 ± 48.7	625.0 ± 117.3	29.9 ± 10.3	39.5 ± 9.5	171.4 ± 29.9	458.3 ± 61.7
		F1-17w	40.1 ± 13.2	45.7 ± 8.4	150.6 ± 22.8	610.5 ± 23.3	25.8 ± 10.1	35.0 ± 14.5	66.7 ± 24.0	NE
	(nmol / g wet liver / min)	F0-17w	1.11 ± 0.33	1.47 ± 0.27	3.00 ± 0.33	21.60 ± 3.35	0.52 ± 0.18	0.53 ± 0.12	1.96 ± 0.23	8.06 ± 1.39
		F1-2w	1.45 ± 0.37	2.17 ± 0.26	6.49 ± 1.81	21.74 ± 2.83	0.85 ± 0.08	1.09 ± 0.33	5.33 ± 1.65	19.47 ± 4.80
		F1-4w	1.66 ± 0.20	2.10 ± 0.36	6.38 ± 1.31	22.54 ± 5.81	0.75 ± 0.19	1.13 ± 0.28	4.89 ± 0.79	15.91 ± 2.93
		F1-17w	1.06 ± 0.37	1.38 ± 0.47	4.27 ± 0.69	20.47 ± 1.27	0.62 ± 0.19	0.86 ± 0.41	1.79 ± 0.80	NE
Testosterone 6β-hydroxylase	(nmol / mg protein / min)	F0-17w	1.14 ± 0.28	1.22 ± 0.44	1.43 ± 0.54	2.08 ± 1.04	0.07 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.06
		F1-2w	1.88 ± 0.30	2.26 ± 0.79	2.97 ± 0.50	3.26 ± 0.91	0.48 ± 0.38	0.16 ± 0.04	0.27 ± 0.10	0.88 ± 0.74
		F1-4w	1.41 ± 0.52	1.97 ± 0.67	2.76 ± 0.39	3.54 ± 0.90	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.22 ± 0.03
		F1-17w	1.14 ± 0.69	1.49 ± 0.68	2.46 ± 0.73	3.53 ± 0.56	0.07 ± 0.01	0.11 ± 0.05	0.13 ± 0.04	NE
	(nmol / g wet liver / min)	F0-17w	29.0 ± 6.4	39.9 ± 18.3	46.0 ± 20.8	85.5 ± 44.5	1.7 ± 0.5	1.6 ± 0.5	2.0 ± 0.4	5.7 ± 3.0
		F1-2w	50.3 ± 13.0	60.5 ± 27.6	86.5 ± 16.9	101.7 ± 35.8	11.9 ± 9.9	4.5 ± 1.5	6.8 ± 3.0	27.4 ± 23.6
		F1-4w	35.0 ± 12.1	52.7 ± 18.8	87.1 ± 16.5	127.6 ± 38.2	1.7 ± 0.5	1.9 ± 0.3	3.1 ± 0.5	7.6 ± 0.7
		F1-17w	30.1 ± 18.7	45.8 ± 28.0	70.6 ± 25.1	119.3 ± 26.8	1.8 ± 0.3	2.7 ± 1.5	3.4 ± 1.4	NE
T4-UDP-Glucuronosyltransferase	(pmol / mg protein / min)	F0-17w	6.66 ± 2.06	8.01 ± 2.32	8.68 ± 1.86	10.23 ± 1.15	6.82 ± 1.17	6.62 ± 0.63	6.89 ± 1.77	9.88 ± 0.80
		F1-2w	6.47 ± 1.08	6.99 ± 1.16	10.84 ± 1.47	12.82 ± 1.51	6.94 ± 2.02	7.03 ± 1.13	9.76 ± 0.86	13.12 ± 2.00
		F1-4w	5.23 ± 1.23	7.45 ± 0.79	9.03 ± 1.69	12.39 ± 1.62	7.90 ± 1.43	7.64 ± 0.61	10.00 ± 1.06	12.57 ± 1.77
		F1-17w	5.00 ± 1.05	7.04 ± 1.29	9.56 ± 1.11	15.39 ± 1.07	7.48 ± 1.09	6.95 ± 0.50	7.21 ± 2.19	NE
	(pmol / g wet liver / min)	F0-17w	176 ± 69	259 ± 98	273 ± 65	417 ± 68	165 ± 19	164 ± 26	186 ± 65	335 ± 82
		F1-2w	168 ± 42	185 ± 51	314 ± 29	394 ± 64	168 ± 56	198 ± 47	244 ± 48	402 ± 92
		F1-4w	131 ± 36	200 ± 34	286 ± 62	442 ± 57	204 ± 44	221 ± 34	288 ± 46	442 ± 109
		F1-17w	133 ± 29	213 ± 70	273 ± 48	518 ± 69	188 ± 45	166 ± 19	192 ± 67	NE

w: 投与期間(週), NE 検査せず  
 : P<0.05, : P<0.01