

## 添付資料

- ビンクロゾリ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 : ビンクロゾリンのラットを用いた2世代繁殖毒性試験  
(試験番号: B000530)
  
2. 試験目的 : ビンクロゾリンを用いて, 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, Proposal for Updating Guideline 416 (Draft document), Two-Generation Reproduction Toxicity Study (2000)  
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壌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)  
株式会社パナファーム・ラボラトリーズ  
熊本県宇土市栗崎町1285

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 2001年1月24日

F0 動物投与開始 2001年2月1日

F0 動物交配 2001年4月22 ~ 29日

F0 動物分娩 2001年5月14 ~ 21日

F1 動物離乳 2001年6月4 ~ 11日

F1 動物交配 2001年8月19日 ~ 9月2日

F1 動物分娩 2001年9月11 ~ 18日

F2 動物離乳 2001年10月2 ~ 10日

F1 動物第2次交配 (追加試験)

交配用無処置雌入荷 2001年9月26日

交配 2001年10月2 ~ 10日

帝王切開 2001年10月17 ~ 24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.....	9
7. 観察・検査項目.....	9
7.1 親動物 ( F0,F1 ) の観察・検査項目.....	9
7.1.1 被験物質摂取量.....	9
7.1.2 一般状態.....	9
7.1.3 体 重.....	9
7.1.4 摂餌量.....	10
7.1.5 摂餌効率.....	10
7.1.6 繁殖機能.....	10
7.1.7 病理学的検査.....	12
7.1.8 血中ホルモン濃度測定.....	13
7.2 児動物 ( F1 , F2 ) の観察・検査項目.....	14
7.2.1 体 重.....	14
7.2.2 生存率および一般状態.....	14
7.2.3 肛門・生殖結節間距離.....	15
7.2.4 乳頭発達.....	15
7.2.5 生後形態分化.....	15
7.2.6 性成熟.....	15
7.2.7 反射反応性.....	16

7.2.8 病理学的検査 .....	16
7.3 肝薬物代謝酵素活性測定.....	16
8. 統計学的解析 .....	17
結果.....	19
1. 親動物に及ぼす影響 .....	19
1.1 被験物質摂取量 .....	19
1.2 一般状態 .....	19
1.3 体 重 .....	19
1.4 摂餌量 .....	20
1.5 摂餌効率 .....	20
1.6 繁殖機能に及ぼす影響.....	20
1.7 病理学的検査 .....	22
1.8 血中ホルモン濃度 .....	24
2. 児動物に及ぼす影響 .....	25
2.1 生存率および一般状態.....	25
2.2 体 重 .....	25
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 .....	26
2.6 性成熟 .....	26
2.7 反射反応性 .....	26
2.8 病理学的検査 .....	26
3. 肝臓薬物代謝酵素活性 .....	27
考察および結論 .....	28
参考文献.....	34
図 .....	39
結果概要表.....	42
1. 親動物の結果概要 .....	42

2. 児動物の結果概要 .....	47
3. 肝薬物代謝酵素活性 .....	50
写 真.....	51

最終ページ 59

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、抗アンドロゲン作用を有するピンクロゾリンを用いて、内分泌攪乱作用検出の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、ピンクロゾリンを混餌法により C<sub>57</sub>:CD(SD)IGS ラットの雌雄に 40, 200 および 1000 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 (膣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。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 40, 200 および 1000 ppm 群でそれぞれ F0 動物の雄が 2.34, 11.5 および 57.3 mg/kg/day、雌が 2.61, 12.8 および 64.0 mg/kg/day、F1 動物は雄が 3.01, 14.9 および 74.7 mg/kg/day、雌が 3.17, 15.8 および 75.9 mg/kg/day であった。

ピンクロゾリンを2世代にわたり投与した結果、親動物および児動物の雄において AGD、乳頭発達、性成熟、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で抗アンドロゲン作用による変化が捉えられた。また、従来からの指標である病理組織学的検査および交配においても影響が捉えられた。すなわち、親動物への影響として F0 および F1 動物とも雄では下垂体および精巣重量の増加、精巣上体重量の減少が 1000 ppm 群で認められ、F1 動物では前立腺および精巣上体重量の減少が 200 ppm 群から、精巣重量の減少が 1000 ppm 群で認められた。病理組織学的検査では、F0 および F1 動物ともに雄で下垂体の好塩基性細胞の肥大が 200 ppm 以上の群、精巣の間細胞のびまん性増生および精囊粘膜の萎縮が 1000 ppm 群で認められた。さらに F1 動物のみの変化として、前立腺の分泌液減少が 200 ppm 以上の群で認められた。

また、血中性ホルモン濃度測定では、F0 および F1 動物ともに LH、FSH、Testosterone および DHT の上昇あるいは上昇傾向が 1000 ppm 群の雄で認められた。

この他、一般毒性学的影響として、1000 ppm 群で体重増加抑制が F0 および F1 動物の雌

ならびに F1 動物の雄，摂餌量減少が F0 および F1 動物の雌で認められた．また，病理学的検査では，F0 および F1 動物ともに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 200 ppm 以上の群の雄および 1000 ppm 群の雌，副腎の束状帯 / 球状帯の脂肪滴増加が 200 ppm 以上の群の雄および 40 ppm 以上の群の雌，卵巣の間質細胞の増生および黄体細胞の空胞化が 1000 ppm 群の雌で認められ，ほとんどの組織変化が重量変化を伴っていた．

また，血中甲状腺ホルモン濃度測定において，T3 および T4 の低下あるいは低下傾向が，F0 動物では 1000 ppm 群の雄および 200 ppm 以上の群の雌，F1 動物では 1000 ppm 群の雌雄で認められた．肝薬物代謝酵素活性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，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．なお，肝薬物代謝酵素活性測定の結果，1000 ppm 群では F0 および F1 動物の雌雄ともいずれの代謝酵素活性も上昇を示したが，BROD 活性に最も顕著な上昇が認められ，ピンクロゾリンは主に CYP2B 分子種に対する誘導作用を示すことが示唆された．

繁殖機能への影響として，1000 ppm 群で F1 動物において雄に起因した顕著な受胎率の低下が認められた．しかし，精子形成への影響は F0 および F1 動物とも認められなかった．不妊雄動物には生殖結節（包皮）の裂および陰茎の発育不全が認められたことから，不妊の原因は外生殖器の形態異常が関連している可能性が考えられた．雌においては，性周期，交尾能，受胎能，妊娠，分娩および哺育行動のいずれにおいても F0 および F1 動物ともにピンクロゾリンの影響は認められなかった．

児動物への影響として，F1 動物で雌雄とも体重増加抑制が 1000 ppm 群で認められた他，F1 および F2 動物ともに雄ではピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用によると考えられる変化が認められた．すなわち，AGD の短縮が F1 動物では 1000 ppm 群，F2 動物では 200 ppm 以上の群，乳頭あるいは乳輪の遺残が F1 動物では 200 ppm 以上の群で，F2 動物では 40 ppm 以上の群で認められた．また，離乳時の精巣上体重量の減少および生殖結節（包皮）の裂，陰茎の発育不全，vaginal pouch 等の外生殖器の形態異常が F1 および F2 動物とも 1000 ppm 群で認められた．さらに，F1 動物の雄では，性成熟検査において包皮分離の遅延が 200 ppm 以上の群で認められた．雌においては，いずれの検査項目においても内分泌攪乱を示唆する変化は認められなかった．



以上のように、本試験の結果、新たに2世代繁殖毒性試験に追加されたAGD、乳頭発達、性成熟、生殖器官重量、血中性ホルモン濃度などの内分泌攪乱作用を検出するための指標においてビクロゾリンの抗アンドロゲン作用によると考えられる次世代の雄への影響が捉えられ、併せて次世代の雄の顕著な繁殖障害が検出された。これらの結果は種々の研究報告と一致し、特に乳頭/乳輪の遺残については現時点で報告されている最も低い用量とほぼ同じ用量で異常が検出され、本試験条件は検出感度においても充分高いことが示唆された。したがって、本試験法は化学物質の内分泌攪乱作用を含む繁殖毒性を評価する試験法として有用であることが確認された。

## 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、抗アンドロゲン作用を有するビクロゾリ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。

ビクロゾリンは、我が国では1971年に殺菌剤として登録された農薬で、1998年には登録が失効している。ラットの母動物に投与した場合、内分泌攪乱作用として次世代の雄に対して肛門・生殖結節間距離 (AGD) の短縮、乳頭/乳輪の遺残、生殖器の形態異常等、抗アンドロゲン作用による種々の異常を起こすことが明らかにされている (Gray ら, 1993, 1994)。近年、ビクロゾリンの抗アンドロゲン作用は、その代謝物がアンドロゲン受容体に結合することによるものであることが明らかになっている (Kelce *et al.*, 1994, 1997)。

本研究においては、従来の2世代繁殖毒性試験に、内分泌攪乱作用を検出するための指標として 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、内分泌攪乱作用の観点も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。なお，環境省の平成 10 年度の環境実態調査においてビクロゾリンは水質，底質，土壌，水生生物調査のいずれにおいても未検出であったため（環境庁水質保全局，1999）\*，人畜への曝露の可能性は極めて低いと考えられる。

\*：環境省環境保健部 平成 11 年度第 1 回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料（平成 11 年 10 月 29 日開催），資料 4 環境ホルモン戦略 S P E E D ' 9 8 関連の農薬等の環境残留実態調査の結果について，P. 8.

# 材料および方法

## 1. 被験物質

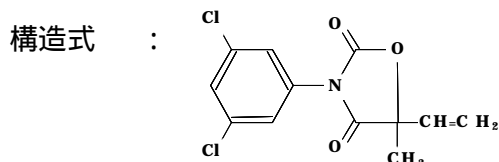
関東化学株式会社から入手したピンクロゾリン（ロット番号：000403，純度：99.0%）を冷蔵で保管し，試験に使用した．被験物質は下記の化学名，分子式，分子量および構造を有する類白色の結晶性粉末である．

化学名 : 3-(3,5-dichlorophenyl)-5-methyl-5-vinylloxazolidine-2,4-dione

CAS No. : 50471-44-8

分子式 :  $C_{12}H_9Cl_2NO_3$

分子量 : 286.11



## 2. 試験動物

日本チャールス・リバー株式会社（厚木飼育センター）から入手した SD ラット（Crj:CD(SD)IGS, SPF）を入荷後 7 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．雌雄とも投与開始前日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 192 ~ 221 g，雌が 141 ~ 167 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 $\mu$ m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，被験物質を同系統のラットの雌雄に交配前3週間，および雄は交配を経て剖検まで約6週間，雌は交配，妊娠，分娩を経て哺育12日まで混餌投与した用量設定試験（用量：0，500，1000，3000，6000 ppm，雌雄各8匹/群）の結果を基に決定した。すなわち，親動物では3000 ppm以上の群の雌雄で体重増加抑制，摂餌量減少，肝臓重量の増加および副腎の重量増加と白色化，雄で精巣上体，前立腺および精嚢重量の減少，

雌で胸腺および子宮重量の減少などの顕著な毒性が認められ，6000 ppm 群では受胎率の低下が認められた．また，1000 ppm 群でも雌雄の副腎，雌の肝臓と子宮で同様な変化が認められ，500 ppm 群でも雌雄の副腎，雌の肝臓で同様な徴候が観察された．一方，児動物では，3000 ppm 以上の群で雌雄とも低体重および生後の体重増加抑制が認められ，雄では 500 ppm 群から内分泌攪乱を示唆する AGD の短縮，乳頭あるいは乳輪の発現が認められた．よって本試験では，内分泌攪乱作用検出のための指標の変化と用量との関係およびその検出感度について検討するため，高用量には，親動物に毒性徴候を示し，かつ長期投与に耐え得る用量として 1000 ppm を設定し，以下公比 5 で中および低用量をそれぞれ 200 および 40 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 18 週間，飼育条件下で 2 週間の安定性（初期分析値の $\pm 10\%$ 以内）を 40 および 6000 ppm の濃度で HPLC 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 $\pm 10\%$ 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> (00101-00124) <sup>*2</sup>	24 (50101-50124)	24	24
40 ppm	24 (00201-00224)	24 (50201-50224)	24	24
200 ppm	24 (00301-00324)	24 (50301-50324)	24	24
1000 ppm	24 (00401-00424)	24 (50401-50424)	24	24

\*1：投与動物数．このうち，F0 動物の雌雄各 4 例，F1 動物の雄 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：離乳時に各腹から継代用（F1 親動物）として雌雄各 1 匹を選抜し，投与に供した．この他に，各群 4 腹から雌雄各 4 例を選抜し，投与開始後 2 および 4 週の肝薬物代謝酵素活性測定用として投与に供した

## 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。

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(第1次交配)、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(%) :  $(\text{交尾動物数} / \text{同居動物数}) \times 100$

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

##### 3) 二次交配

第1次交配の結果、F1親動物では1000ppm群において雄に起因した交尾能および受胎能の低下が疑われたため、同群の雌雄について第2次交配を実施した。すなわち、交尾しなかった雌については、同群内で既に交尾能が認められた雄と7日間を限度に昼夜同居させ、交尾能の有無を確認した。

また、受胎能が認められなかった雄については、新たに入手した同系統の無処置雌(10~11週齢)と交配させ、受胎能の有無を確認した。無処置雌は午前中



に膣垢を採取して発情前期の動物を選別し、雄と夜間同居させた。交尾した場合は膣栓の数を検査した。なお、無処置雌との交配中は基礎飼料のみを給餌し、ケージにはポリカーボネート製ケージに金網スノコを敷いたものを用いた。第2次交配で全例が交尾したため、雌は妊娠 13～15 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、卵巢、子宮を摘出し、黄体数、着床数、生存胚数、死亡胚数（早期・後期死亡胚数）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 (Salewski, 1964)、着床の有無を検査した。

#### 4) 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 1000 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 1000 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。

\*: F0 動物では精子細胞数および F1 動物では精子数がやや低値を示したため、他の群も検査した。

#### 5) 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、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。内分泌攪乱作用検出を主眼とした項目は下線で示す。

脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、精巣、精巣上体(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)、卵巣、子宮(頸部を含む)

#### 2) 剖検

雄は交配期間終了後<sup>\*1</sup>、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<sup>\*1</sup>、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<sup>\*2</sup>。

また、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。

\*1：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。

\*2：第 2 次交配で交尾した 1000 ppm 群の F1 雌については、妊娠 13~15 日に剖検した。

#### 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、F0 動物では

対照群および1000 ppm 群の雌雄各 10～11 例、F1 動物では対照群の雌雄各 10 例、1000 ppm 群の雌雄全例<sup>\*1</sup>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<sup>\*2</sup>。

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

\*1： F1 動物では受胎率の低下が認められたため、1000 ppm 群は雌雄全例を検査した。

\*2： この他、F0 動物では 1000 ppm 群の非妊娠雌の卵管、子宮、膻およびその雌と交配させた雄の精巢上体、凝固腺および前立腺も検査した。また、全出産児が死亡した母動物の乳腺も検査した。

\*3： F1 動物の対照群の雄 1 例および 1000 ppm 群の雄 2 例の下垂体について、抗 LH 抗体（ダコ・サイトメーション株）を用いた免疫染色を行った。

\*4： 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。

\*5： 精巢上体は片側の頭部、体部、尾部の縦断切片標本を作製して検査した。

\*6： F1 動物の 1000 ppm 群の雌 2 例の卵巢については、脂肪を証明するためにオイルレッド O 染色を行った。

検査の結果、F0 および F1 動物の雌雄の肝臓、副腎および雄の下垂体、精巢、精嚢、雌の卵巢、F1 親動物の雄の前立腺において被験物質による変化が認められたため、これらの器官・組織については、全群の全例を検査した。

#### 7.1.8 血中ホルモン濃度測定

雄は交配期間終了後に 8 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 8 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株式会社パナファーム・ラボラトリーズにおいて測定した。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。

\*： 1000 ppm 群の F1 の雌については、受胎率の低下により哺育期間終了時の母動物数が 8 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 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。

### 7.2.2 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 )  $\times$  100

4 日生存率 (%) : ( 生後 4 日の生存児数 / 出生生存児数 )  $\times$  100

離乳率 (%) : ( 離乳時の生存児数 / 児数調整後の生存児数 )  $\times$  100

F1 動物は, 生後 21 日に各腹から継代用 (F1 親動物) 動物として雌雄各 1 匹を無作為に選抜して投与を開始し, 離乳後の検査に供した。

その他の F1 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, F1 動物の投与開始後 2

および4週の肝薬物代謝酵素活性測定用として、各群4腹から雌雄各2例を選抜し、投与を開始した。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
	2		3週齢器官重量，剖検
	3		3週齢剖検，肝薬物代謝酵素活性 <sup>*2</sup>
	4		3週齢剖検
	5	雌	体重，摂餌量，被験物質摂取量，膣開口，性周期，生殖機能，分娩・哺育，血中ホルモン濃度
	6		3週齢器官重量，剖検
	7		3週齢剖検，肝薬物代謝酵素活性 <sup>*2</sup>
	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：離乳時に各群4腹から雌雄各2例を選抜し、投与開始後2および4週齢の検査用として投与を開始した。検査終了後は剖検した。

### 7.2.3 肛門・生殖結節間距離

出生日の全生存動物および生後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日から膣開口（雌）、35日から包皮分離（雄）の発現日を検査した。包皮分離および膣開口の発現日には体重を測定した。

### 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 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\*。なお，器官重量測定の結果，被験物質の影響は認められなかったことから，病理組織学的検査は実施しなかった。

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

## 7.3 肝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 19 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，総重量を測定した後，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，液体窒素を用いて速やかに凍結し，細胞分画を行うまで - 80 のフリーザーで保存した．フリーザーに移すまでの間は液体窒素を用いて保冷した．細胞分画の実施直前に凍結した肝臓を解凍し，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 mmol/L の EDTA を含む 10 mmol/L 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， - 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 ) .

\* : F1 雌親動物については，1000 ppm 群で不妊が多発し 2 次交配を実施し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，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

$a \times b$  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，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。

40, 200 および 1000 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 2.34, 11.5 および 57.3 mg/kg/day, 雌が 2.61, 12.8 および 64.0 mg/kg/day, F1 動物は雄が 3.01, 14.9 および 74.7 mg/kg/day, 雌が 3.17, 15.8 および 75.9 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
40	雄	交配前	2.337	3.010
		交配前	2.607	3.168
	雌	妊娠中	2.285	2.277
		哺育中	5.946	5.533
200	雄	交配前	11.53	14.85
		交配前	12.78	15.83
	雌	妊娠中	11.22	11.28
		哺育中	29.42	28.60
1000	雄	交配前	57.30	74.71
		交配前	63.98	75.93
	雌	妊娠中	58.65	55.81
		哺育中	145.55	151.6

### 1.2 一般状態（表 1-1）

F0 および F1 動物の雌雄とも、被験物質に起因する変化は認められなかった。

なお、切歯の破損が 1000 ppm 群の F0 および F1 雄動物で各 1 例、皮下腫瘍が各群の F0 母動物 1~2 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、発現率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 動物では、雄においては被験物質に起因する変化は認められなかった。一方、雌

では 1000 ppm 群で体重増加抑制が認められ、投与中期以降の体重あるいは体重増加量で有意差が認められた。

F1 動物では、雌雄とも 1000 ppm 群で体重増加抑制が認められ、雄では投与開始後 7 日（生後 28 日）の体重、雌では投与中期以降の体重および体重増加量で有意差が認められた。

#### 1.4 摂餌量（図 1, 2, 表 1-1）

雄では、F0 および F1 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。

雌では、F0 および F1 動物ともに 1000 ppm 群で軽度の摂餌量減少が認められ、投与中期以降有意差が散見された。

#### 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。1000 ppm 群において、F0 動物では雄の投与開始後 70 日および雌の投与開始後 28 日が有意な低値、雌の哺育 21 日が有意な高値を、F1 動物では雄の投与開始後 14 日が有意な高値、雌の投与開始後 42 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（表 1-2, 1-3）

##### 1) 性周期（表 1-1）

F0 および F1 動物とも、平均性周期日数に対照群と被験物質投与群との間で有意な差は認められなかった。また、各群とも異常性周期を示す動物は認められなかった。

##### 2) 交配成績（表 1-1）

F0 動物では、交尾能および受胎能に被験物質の影響は認められなかった。しかし、F1 動物では、1000 ppm 群では交尾率には明確な変化は認められなかったものの（19 例中 17 匹が交尾）、交尾を逸した発情期の回数の増加が認められ、さらに受胎率の低下が認められた。同群では、雄 3 例は雌の発情期を 2~4 回逸し、このうち 2 例は 14 日間の交配期間中に交尾しなかった。また、交尾した雄 17 例中 8 例

は雌が不妊であった。

なお、剖検の結果、交尾あるいは受胎が認められなかった雄はいずれも外生殖器の形態異常を伴っていた。

### 3) 二次交配成績 (表 1-1)

F1 動物について、1000 ppm 群で受胎率の低下が認められたことから、交尾後雌が不妊であった雄 8 例について、同系統の無処置の雌と交配させ、交尾確認時の膣栓の数を検査するとともに、交尾した雌は妊娠中期に解剖し、受胎の有無を確認した。また、未交尾であった雌 2 例についてその原因を確認するため、同群内で受胎能が認められた雄と交配させ、同様に受胎の有無を確認した。

その結果、雄は無処置雌との交配により全例が交尾したが、6 例は雌が不妊であった。一方、1 次交配で交尾しなかった雌 2 例は、同群内の受胎能が認められた雄との交配によりいずれも交尾し、受胎した。したがって、1 次交配で観察された未交尾および受胎率低下の原因は雄にあるものと考えられた。なお、受胎能が認められなかった雄は、交尾確認時の膣栓の数が 3 個以下と少なかった。また、受胎した雄 2 例の外生殖器に異常は認められなかったが、受胎しなかった雄はいずれも生殖器結節 (包皮) の裂が認められたものであった。

### 4) 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。また、未交尾および交配対の雌が不妊であった雄にも異常は認められなかった。

### 5) 分娩・哺育成績 (表 1-2)

分娩の観察では、F0 および F1 動物とも各被験物質投与群のいずれの母動物も妊娠 21～23 日に正常な分娩を示した。また、妊娠期間、着床数、出生率および分娩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。

哺育の観察では、1000 ppm 群の F0 母動物 2 例で哺育 3 日以降に授乳行動が観察されず、いずれも全出産児が哺育 5 日までに死亡した。また、F1 母動物では 1000 ppm 群の 1 例で哺育 1 日に全出産児死亡が観察された。

しかし、全出産児死亡はラットでは自然発生的にも観察される所見であり、各世代とも 1～2 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。

## 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 1000 ppm 群で下垂体、副腎および精巣重量の増加がみられ、絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。また、1000 ppm 群で精巣上体重量が低値傾向を示し、尾部では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、1000 ppm 群で肝臓および副腎の絶対重量および相対重量が有意な高値を示した。

F1 動物では、雄において 200 ppm 以上の群で前立腺重量の減少および 1000 ppm 群で副腎重量の増加がみられ、絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。また、200 ppm 以上の群で精巣上体重量が低値傾向を示し、尾部では絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。さらに、1000 ppm 群で下垂体および精巣重量が高値傾向、精嚢重量が低値傾向を示し、絶対重量あるいは相対重量で有意差が認められた。

雌では、1000 ppm 群で副腎重量の増加がみられ、絶対重量および相対重量とも有意差が認められた。また、1000 ppm 群で肝臓重量が高値傾向を示し、相対重量で有意差が認められた。

この他、F0 動物の雄では 40 および 1000 ppm 群の肝臓、雌では 200 ppm 群の下垂体および 40 ppm 群の発情後期の子宮において、絶対重量あるいは相対重量が有意な高値を示したが、用量との関連は明確でなく、F1 動物では変化が認められなかったことから、いずれも偶発変化と判断した。

また、F0 動物の雌および F1 動物の雄では 1000 ppm 群の腎臓、F1 動物の雌では 200 ppm 以上の群の卵巣で相対重量がいずれも有意な高値を示したが、絶対重量は対照群とほぼ同等の値であったことから、解剖時の体重差が反映した結果と考えられた。

### 2) 剖 検 (表 1-4)

F0 動物では、雌雄とも被験物質に起因する変化は認められなかった。

F1 動物では、1000 ppm 群の雄で生殖結節 (包皮) の裂が 8 例および尿道下裂と vaginal pouch の合併が 1 例で認められた。尿道下裂を示した例は陰茎も変形してお

り、精巣、精巣上体、精嚢および前立腺の小型化も伴っていた。また、生殖結節の裂を示した例のほとんどは陰茎も完全には発達していなかった。なお、異常が認められた雄9例中2例は交尾せず、他の7例は交尾したものの雌が妊娠したのは1例のみであった。

### 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、F0 および F1 動物の雌雄の肝臓、副腎、雄の精巣、精嚢、下垂体、雌の卵巣、F1 動物の雄の前立腺に認められた\*。

\*：この他、F0 動物の非妊娠雌およびその雌と交配した雄の生殖器について検査したが、不妊と関連するような変化は認められず原因は不明であった。また、F0 動物の全出産児が死亡した母動物の乳腺を検査したが異常は認められず、乳腺の発達不良による児動物の死亡ではなかった。

#### 肝臓

肝臓では、小葉中心性肝細胞肥大が F0 および F1 動物ともに 200 ppm 以上の群の雄、1000 ppm 群の雌に認められ、いずれも発現頻度に有意差が認められた。肥大した小葉中心部肝細胞の細胞質は好酸性を増していた。

#### 副腎

副腎では、束状帯の脂肪滴増加が、F0 および F1 動物ともに 200 ppm 以上の群の雄、40 ppm 以上の群の雌に認められ、雌雄とも 200 ppm 以上の群で有意差を伴っていた。束状帯細胞は肥大し、細胞質は微細空胞状を呈していた。また、球状帯の脂肪滴増加が F0 動物では 1000 ppm 群の雄および対照群を含む全群の雌、F1 動物では 200 ppm 以上の群の雄および 40 ppm 以上の群の雌に認められた。F0 および F1 動物ともに、1000 ppm 群の雄、200 ppm 以上の群の雌で有意差が認められた。球状帯細胞は、束状帯細胞と同様に肥大し細胞質は微細空胞状を呈していた。

#### 下垂体

下垂体では、前葉の好塩基性細胞の肥大が F0 および F1 動物ともに 200 ppm 以上の群の雄に認められ、1000 ppm 群で有意差を伴っていた。肥大した好塩基性細胞の細胞質は抗 LH 抗体に陽性であり、性腺刺激ホルモン分泌細胞であることを確認した。

### 精巣

精巣では、間細胞のび慢性増生が F0 および F1 動物ともに 1000 ppm 群に認められ、有意差を伴っていた。

### 精嚢

精嚢では、粘膜の萎縮が F0 動物では対照群および 200 ppm 以上の群に、F1 動物では 1000 ppm 群に認められ、F0 動物の 1000 ppm 群では有意差が認められた。腺上皮は小型化し、細胞質内の分泌顆粒の減少が認められた。

### 卵巢

卵巢では、間質細胞の増生が F0 および F1 動物ともに 1000 ppm 群に認められ、有意差を伴っていた。間質細胞の細胞質は微細空胞状を呈し、脂肪を蓄積しているものと思われた。また、黄体細胞の空胞化が F0 および F1 動物ともに 1000 ppm 群に認められ、F0 動物で有意差を伴っていた。黄体細胞の空胞は、オイルレッド O 染色で赤褐色に染まる中性脂肪であった。

### 前立腺

前立腺では、分泌液の減少が F1 動物の 200 ppm 以上の群に認められ、有意差を伴っていた。分泌物の減少により腔は小さくなっていたが、上皮細胞に変化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

T3 および T4 の有意な低下あるいは低下傾向が、F0 動物では 1000 ppm 群の雄および 200 ppm 以上の群の雌、F1 動物では 1000 ppm 群の雌雄で認められた。

### 2) 性ホルモン

雄では、F0 および F1 動物とも 1000 ppm 群で LH、FSH、Testosterone および DHT の有意な上昇あるいは上昇傾向が認められた。DHT/Testosterone 比には被験物質の影響は認められなかった。なお、F1 動物の 40 ppm 群で DHT/Testosterone 比が有意な高値を示したが、用量との関連はなかったことから、偶発変化と判断した。

雌では、F0 および F1 動物ともに発情前期および発情後期ともに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。

## 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 および F2 児動物ともに、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。

#### 2) 一般状態（表 2-1）

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。

死亡、受乳の欠如、腹部膨満、蒼白、体温低下、咬傷などが各群で散見されたが、発現状況に用量との関連はなかった。

### 2.2 体 重（図 2, 表 2-1）

F1 児動物では、1000 ppm 群で、出生時の体重には変化がなかったものの、雌雄とも哺育期間に体重増加抑制が認められ、生後 14 および 21 日の体重および体重増加量に有意差が認められた。

F2 児動物では、雌雄とも出生時の体重および生後の体重増加ともに対照群とほぼ同様な値を示した。

### 2.3 肛門・生殖結節間距離（表 2-2）

雄では、F1 児動物の 1000 ppm 群で出生日および生後 4 日の肛門・生殖結節間距離（AGD）および体重補正值がともに有意な低値を示した。また、F2 児動物では 200 ppm 以上の群の出生日、1000 ppm 群の生後 4 日の AGD および体重補正值がいずれも有意な低値を示した。

雌では、F1 および F2 児動物ともいずれの被験物質投与群においても AGD および体重補正值ともに対照群との間に有意な差は認められなかった。

### 2.4 乳頭発達（表 2-2）

雄では、乳頭/乳輪の遺残が F1 児動物の 200 および 1000 ppm 群でそれぞれ 36.0 および 97.4%（14/22 および 19/19 腹）の出生児で認められた。また、F2 児動物では、40、

200 および 1000 ppm 群でそれぞれ 6.0, 59.5 および 100% (4/20, 19/22 および 8/8 腹) の出生児で乳頭 / 乳輪の遺残が認められた。異常の発現状況を見ると, 200 ppm 以下の群では異常を示した全例が乳輪の遺残型であったのに対し, 1000 ppm 群では約半数が乳頭 / 乳輪の遺残型であった。

雌では, F1 および F2 児動物ともいずれの被験物質投与群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。

## 2.6 性成熟 (表 2-2)

F1 児動物について検査した結果, 雄では 200 ppm 以上の群で包皮分離の発現日の有意な遅延が認められ, 発現日の体重も有意な高値を示した。一方, 雌の膣開口の発現日および発現日の体重には被験物質の影響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各群全例が正常な反射あるいは反応を示した。

## 2.8 病理学的検査

### 1) 器官重量 (表 2-3)

雄では, F1 および F2 児動物とも, 1000 ppm 群で精巣上体が絶対重量および相対重量とも有意な低値を示した。

雌では, F1 および F2 児動物とも, いずれの器官についても被験物質に起因する変化は認められなかった。F1 動物の 1000 ppm 群で脳の絶対重量が有意な低値を示したが, 相対重量は有意な高値であったことから, 体重増加抑制が反映した結果と考えられた。



## 2) 剖 検 (表 2-3)

雄では、生殖結節（包皮）の裂が 1000 ppm 群の F1 児動物で 56 例中 19 例、F2 児動物で 31 例中 8 例に認められた。また、F2 児動物の 6 例は Vaginal pouch を伴っていた。

雌では、F1 および F2 児動物とも被験物質に起因する異常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を示した。

ミクロソーム蛋白量については 1000 ppm 群で対照群の 1.1 ~ 1.3 倍の値を示した。

肝ミクロソーム蛋白 1 mg あたりの活性について、1000 ppm 群では BROD 活性が対照群の 6 ~ 19 倍を示し、顕著な上昇が認められた。また、1000 ppm 群では MROD 活性および EROD 活性がそれぞれ対照群の 0.8 ~ 1.6 倍および 1.3 ~ 2.1 倍の値を示し、雌雄とも有意差が散見された。チトクローム P450 含量、T-6 $\beta$ -OH 活性および T4-UDP-GT 活性については、肝ミクロソーム蛋白 1 mg あたりの活性には有意差が認められなかったが、肝湿重量 1 g あたりの活性は対照群の 1.1 ~ 1.8 倍といずれもやや高い値を示した。

## 考察および結論

ビクロゾリンを Cj:CD(SD)IGS ラットに 40, 200 および 1000 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、内分泌攪乱作用を検出する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、親動物および児動物の雄において AGD、乳頭発達、性成熟、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で抗アンドロゲン作用による変化が捉えられた。また、従来からの指標である病理組織学的検査および交配においても影響が捉えられた。

### 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、1000 ppm 群で体重増加抑制が F0 および F1 動物の雌ならびに F1 動物の雄、摂餌量減少が F0 および F1 動物の雌で認められた。ビクロゾリンの体重および摂餌量への影響は雌で顕著であり、F1 動物の雄でみられた体重増加抑制については、投与開始初期の体重に有意差が認められたのみの軽度の変化であった。また、F1 動物の雄では離乳後（投与開始後）の体重増加量には有意差は認められなかったことから、体重増加抑制は離乳前から認められている生後発育抑制の延長である可能性が考えられた。

病理学的検査では、F0 および F1 動物ともに肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 200 ppm 以上の群の雄および 1000 ppm 群の雌、副腎の束状帯 / 球状帯の脂肪滴増加が 200 ppm 以上の群の雄および 40 ppm 以上の群の雌、卵巣の間質細胞の増生および黄体細胞の空胞化が 1000 ppm 群の雌で認められ、ほとんどの組織変化が重量変化を伴っていた。

肝臓の小葉中心性肝細胞肥大は、種々の薬物投与によりしばしば引き起こされる変化で、薬物代謝酵素が誘導された場合にみられる生体の適応性変化と考えられており (Gopinath *et al.*, 1987; Greaves, 1990d)、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。副腎皮質はステロイド生合成の場であり、正常な副腎でも多くの脂肪滴が認められる。種々の薬物投与により脂肪滴は増加するが、その機序としてステロイド合成阻害が考えられている。

(Greaves, 1990e). また, 卵巣の間質細胞と黄体細胞もステロイド合成細胞である. ステロイド合成阻害作用は, 副腎と同様に卵巣にも生じることが報告されている (Latendresse *et al.*, 1994, 1995). これらのことから, 本試験においても同様の変化が生じている可能性が示唆される.

## 1.2 繁殖機能への影響

1000 ppm 群では F1 動物で雄に起因する顕著な受胎率の低下が 1000 ppm 群で認められた. しかし, 精子検査においては F0 および F1 動物ともピンクロゾリンの影響を示唆する変化は認められなかった. 受胎能が認められなかった雄の全てに生殖結節 (包皮) の裂と陰茎の発育不全が観察され, 二次交配の結果から交尾時の膣栓の減少傾向が窺われた. また, 外生殖器の形態異常が著しい動物では雌が発情期でも交尾が成立しなかった.

ある文献では, ピンクロゾリンの母動物への投与により外生殖器の形態異常を示した雄は, 雌との交配時の乗駕行動には変化がなかったものの, 陰茎の膣への挿入あるいは射精などの行動に障害を来し, 射精精子数および膣栓数の減少とそれに伴った受胎率の低下が報告されている (Gray *et al.*, 1994; Ostby *et al.*, 1999). また, 別の文献では雄の雌への乗駕行動には, 脳の特定部位におけるアンドロゲンのエストロゲンへの芳香化が関与しているが, ピンクロゾリンはエストロゲン依存性の脳の性分化には影響しないことが報告されている (Gray and Ostby, 1998). 本試験では交尾行動は観察しなかったが, これらの報告と精子形成への影響が認められなかったことを考え合わせると, F1 動物の雄における不妊の原因は外生殖器の形態異常が関連している可能性が考えられる.

雌においては, 性周期, 交尾能, 受胎能, 妊娠, 分娩および哺育行動のいずれにおいても F0 および F1 動物ともにピンクロゾリ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

親動物において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変化が捉えられた. すなわち, F0 および F1 動物とも雄では下垂体および精巣重量の増加, 精巣上体重量の減少が 1000 ppm 群で認められ, F1 動物では前立腺および精巣上体重量の減少が 200 ppm 群から, 精嚢重量の減少が 1000 ppm 群で認められた. 病理組織学的検査で

は、F0 および F1 動物ともに雄で下垂体の好塩基性細胞の肥大が 200 ppm 以上の群、精巣の間細胞のび慢性増生および精嚢粘膜の萎縮が 1000 ppm 群で認められた。さらに F1 動物のみの変化として、前立腺の分泌液減少が 200 ppm 以上の群で認められた。

ピンクロゾリンは、アンドロゲン受容体を介する抗アンドロゲン作用物質と考えられている (Kelce *et al.*, 1994, 1997)。抗アンドロゲン作用物質は雄性生殖器の萎縮を引き起こし、フィードバック作用として下垂体前葉の性腺刺激ホルモン分泌細胞の肥大や精巣間細胞の増生が生じる (Greaves, 1990a, 1990b, 1990c)。本試験において認められた前立腺の分泌液減少、精嚢の萎縮、精巣間細胞の増生、下垂体前葉の好塩基性細胞肥大は、ピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用により生じたものと考えられる。なお、前立腺の重量減少を伴う分泌液の減少および精嚢重量の減少は F1 動物のみに認められ、前立腺の変化は 200 ppm から発現した。

ピンクロゾリンの胎生期あるいは周産期の母動物への投与により児動物の前立腺および精嚢重量が減少し (Wolf *et al.*, 2000; Gray *et al.*, 1994)、生殖器の分化への影響は精巣上体、精嚢などのウォルフ管由来の臓器に比べて前立腺で顕著であったことが報告されている (Gray *et al.*, 1994)。このことから、F1 動物は母動物を介してピンクロゾリンに暴露された結果、前立腺および精嚢への影響が明らかになったものと推察される。

血中性ホルモン濃度測定では、F0 および F1 動物ともに LH、FSH、Testosterone および DHT の上昇あるいは上昇傾向が 1000 ppm 群の雄で認められた。ピンクロゾリンの周産期の母動物への投与では、F1 児動物の血中 Testosterone は変化がないか軽度の減少を示すが (Gray *et al.*, 1994; Ostby *et al.*, 1999)、性成熟期の雄への投与では LH および Testosterone が上昇することが報告されている (Monosson *et al.*, 1999)。本試験における雄の血中性ホルモン濃度の変化については、F0 および F1 動物ともほぼ同程度に認められていることから、ピンクロゾリンの反復投与による抗アンドロゲン作用に対するフィードバックを反映したものと推察される。なお、DHT/Testosterone 比には変化は認められなかったが、ピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用はその代謝物がアンドロゲン受容体へ結合することによるものであり、Testosterone を DHT に変換する 5 $\alpha$ -reductase 活性には影響しないことから裏付けされる (Kelce *et al.*, 1994, 1997)。

精子検査においては F0 および F1 動物ともピンクロゾリンの影響は認められなかった。精子形成への影響については、ラットでは 100 mg/kg 以上の高用量の母動物への投与で

F1 動物の精子数の減少が報告されている (Ostby *et al.*, 1999; Gray *et al.*, 1994)。しかし一方では、性成熟期のウサギへのピンクロゾリン投与により、精子数が増加したという報告もある (Moorman *et al.*, 2000)。本試験では F0 および F1 動物ともに雄で血中 LH、FSH、Testosterone および DHT が同程度に上昇していることから、反復投与されたピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用に対してフィードバック機構が働き、精巣における造精能力が亢進し、精子検査では影響として捉えられなかった可能性が考えられる。

血中甲状腺ホルモン濃度において、T3 および T4 の低下あるいは低下傾向が、F0 動物では 1000 ppm 群の雄および 200 ppm 以上の群の雌、F1 動物では 1000 ppm 群の雌雄で認められた。しかし、肝薬物代謝酵素活性測定の結果、F0 および F1 動物とも甲状腺ホルモン抱合酵素である T4-UDP-OH 活性も上昇していた。このことから、血中甲状腺ホルモン濃度の変化については、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。

## 2. 児動物への影響

### 2.1 一般毒性学的影響

F1 動物で雌雄とも体重増加抑制が 1000 ppm 群で認められた。一般状態、生存率、生後形態分化および反射反応性には被験物質の影響は認められなかった。また、F1 および F2 動物とも離乳時の脳、胸腺および脾臓重量にも影響は認められなかった。

### 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

F1 および F2 動物ともに雄では、ピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用によると考えられる変化が認められた。すなわち、AGD の短縮が F1 動物では 1000 ppm 群、F2 動物では 200 ppm 以上の群、乳頭あるいは乳輪の遺残が F1 動物では 200 ppm 以上の群で、F2 動物では 40 ppm 以上の群で認められた。また、離乳時の精巣上体重量の減少および生殖結節 (包皮) の裂、陰茎の発育不全、vaginal pouch 等の外生殖器の形態異常が F1 および F2 動物とも 1000 ppm 群で認められた。さらに、F1 動物の雄では、性成熟検査において包皮分離の遅延が 200 ppm 以上の群で認められた。ピンクロゾリンの抗アンドロゲン作用による次世代の雄への変化は種々報告されており (Gray *et al.*, 1993, 1994;

Kelce *et al.*, 1994; Ostby *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2000; Monosson *et al.*, 1999), そのほとんどが本試験においても捉えられ, 特に乳輪の遺残 (Imperato-McGinley *et al.*, 1986; Kratochwil, 1977) については, 最低用量の 40 ppm 群 (2~3 mg/kg/day) でも発現していた。近年, ビンクロゾリンの 3~12.5 mg/kg の低用量域において雄の児動物の AGD の短縮, 前立腺重量の減少, 乳輪の遺残が報告されており (Ostby *et al.*, 1999), 本試験でもほぼ同じ用量で同様の異常が検出された。雌においては, いずれの検査項目においても内分泌攪乱を示唆する変化は認められなかった。

### 3. 肝薬物代謝酵素活性

肝薬物代謝酵素活性測定では, 1000 ppm 群では F0 および F1 動物の雌雄ともいずれの代謝酵素活性にも上昇がみられ, BROD 活性が最も顕著な上昇を示した。BROD 活性は CYP2B 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ことから (Nerurkar *et al.*, 1993), ビンクロゾリンは主に CYP2B 分子種に対する誘導作用を示すことが示唆された。

### 4. 試験法の評価

本試験の結果, 新たに 2 世代繁殖毒性試験に追加された AGD, 乳頭発達, 性成熟, 生殖器官重量などの内分泌攪乱作用を検出するために有用と考えられる指標について, ビンクロゾリンの抗アンドロゲン作用によると考えられる次世代の雄への影響が捉えられ, 併せて次世代の雄の顕著な繁殖障害が検出された。これらの結果は種々の研究報告と一致し, 特に乳頭/乳輪の遺残については現時点で報告されている最も低い用量とほぼ同じ用量で異常が検出されたことは, 本試験方法は検出感度においても充分高いことを示唆している。なお, 血中ホルモン濃度については, 性ホルモンにおいてビンクロゾリンの影響による変化が認められたが, 最高用量群でのみの変化であり, 検出感度は高くはなかった。

血中ホルモン濃度は測定時期や個体によるばらつきが大きく, 測定費用も高額であることを考慮した場合, むしろ発現機構の解明の裏付けとして, 必要な場合に測定するのが適切と思われる。

以上のように, 本試験の結果, 種々の研究で報告されているビンクロゾリンによる内分泌攪乱作用を検出するために有用と考えられる毒性指標のほとんどが検出された。

本研究は、ビクロゾリンの抗アンドロゲン作用の検出を指標として試験法の妥当性について検討したものであるが、内分泌攪乱作用は今回検討した抗アンドロゲン作用の他に、エストロゲン様作用、抗エストロゲン作用およびアンドロゲン作用がある。それぞれ作用は異なるものの、それらによる影響が AGD、乳頭発達、性成熟、性周期、精子形成あるいは器官重量等の検査で捉えられることを数多くの研究が示している (Aoyama and Suzuki, 2003; 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; Goldman *et al.*, 1976; Rhee *et al.*, 1997)。このことから、抗アンドロゲン作用物質以外の化学物質についても、本試験法によりその内分泌攪乱作用を検出し得るものと予想される。したがって、本試験法は化学物質の内分泌攪乱作用を含む繁殖毒性を評価する試験法として有用であることが確認された。

## 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): Chapter 12. 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.
- 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.
- 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.
- Dunnett, C.W. (1955): A multiple comparison procedure for comparing several treatments with a control. *J. Am. Stat. Assoc.*, **50**, 1096-1121.
- Dunnett, C.W. (1964): New tables for multiple comparison with a control. *Biometrics*, **20**, 482-492.

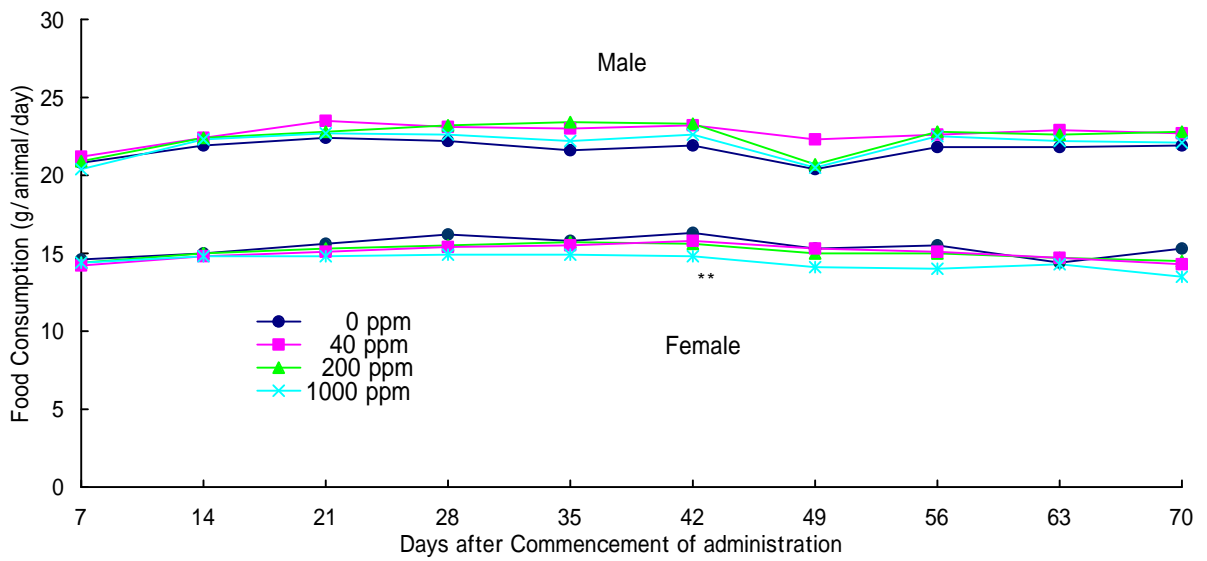
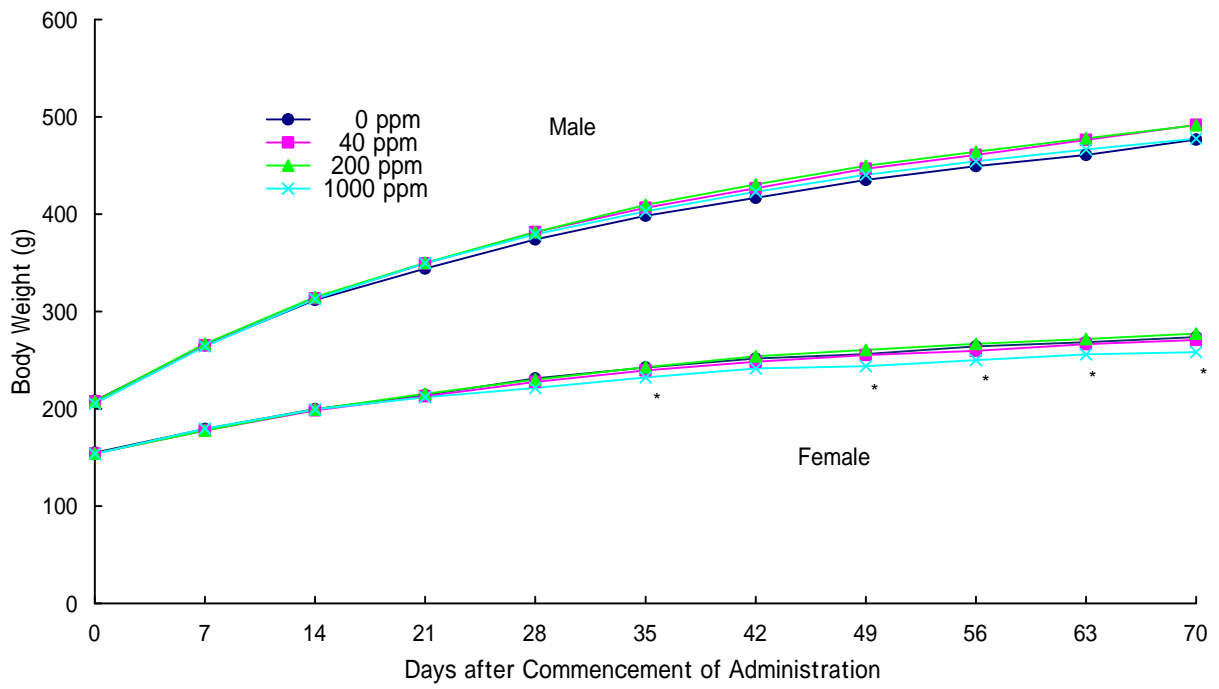


- Facemire, C.F., Gross, T.S. and Guillete, L.J. Jr. (1995): Reproductive impairment in the Florida panther: Nature or nurture? *Environ. Health Perspect.*, **103** (Suppl 4), 79-86.
- Fisher, R.A. (1955): Statistical methods and scientific induction. *J.R. Stat. Soc.*, **17**, 69-78.
- Fleming, L.E., 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.
- Goldman, A.S., Shapilo, B.H. and Neumann, F. (1976): Role of testosterone and its metabolites in the differentiation of the mammary gland in rats. *Endocrinology*, **99**, 1490-1495.
- Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J. (1987): The liver. Morphological lesions in the liver. Hypertrophy. In *Atlas of Experimental Toxicological Pathology* (Gopinath, C., Prentice, D.E. and Lewis, D.J., eds.), p. 53. MTP Press Limited, Lancaster.
- Gray, L.E. Jr., Ostby, J.M. and Marshall, R. (1993): The fungicide vinclozolin inhibits morphological sex differentiation in the male rat. *Biol. Reprod.*, **48** (Suppl 1), 97.
- Gray, L.E. Jr., Ostby, J.S. and Kelce, W.R. (1994): Developmental effects of an environmental antiandrogen: The fungicide vinclozolin alters sex differentiation of the male rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **129**, 46-52.
- Gray, L.E. Jr. and Ostby, J. (1998): Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: Endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicol. Ind. Health.*, **14**, 159-184.
- Greaves, P. (1990a): Digestive system 2. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 393-441. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990b): Endocrine glands. Adrenal gland. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* pp. 696-721. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990c): Endocrine glands. Pituitary gland. In *Histopathology of Preclinical Toxicity*

- Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 678-696. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990d): Male genital Tract. Prostate gland. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 584-594. Elsevier, Amsterdam.
- Greaves, P. (1990e): Male genital Tract. Testis. In *Histopathology of Preclinical Toxicity Studies* (Greaves, P., ed.), pp. 596-617. 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.
- Imperato-McGinley, J., Binienda, Z., Gedney, J. and Vaughan, E.D. Jr. (1986): Nipple differentiation in fetal male rats treated with an inhibitor of the enzyme 5 $\alpha$ -reductase: Definition of a selective role for dihydrotestosterone. *Endocrinology*, **118**, 132-137.
- Kelce, W.R., Monosson, E., Gamcsik, M.P., Laws, S.C. and Gray E.L. Jr. (1994): Environmental hormone disruptors: Evidence that vinclozolin developmental toxicity is mediated by antiandrogenic metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **126**, 276-285.
- Kelce, W.R., Lambright, C.R., Gray, E.L. Jr. and Roberts, K.P. (1997): Vinclozolin and *p,p'*-DDE alter androgen-dependent gene expression: *In vivo* confirmation of an androgen receptor-mediated mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **142**, 192-200.
- Kruskal, W.H. and Wallis, W.A. (1952): Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Am. Statist. Assoc.*, **47**, 583-621.
- Kratochwil, K. (1977): Development and loss of androgen responsiveness in the embryonic rudiment of the mouse mammary gland. *Dev. Biology*, **61**, 358-365.
- Latendresse, J.R., Brooks, C.L. and Capen, C.C. (1994): Pathologic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate on the adrenal gland, ovary, and testis in the Fischer-344 rat. *Toxicol. Pathol.*, **22**, 341-352.

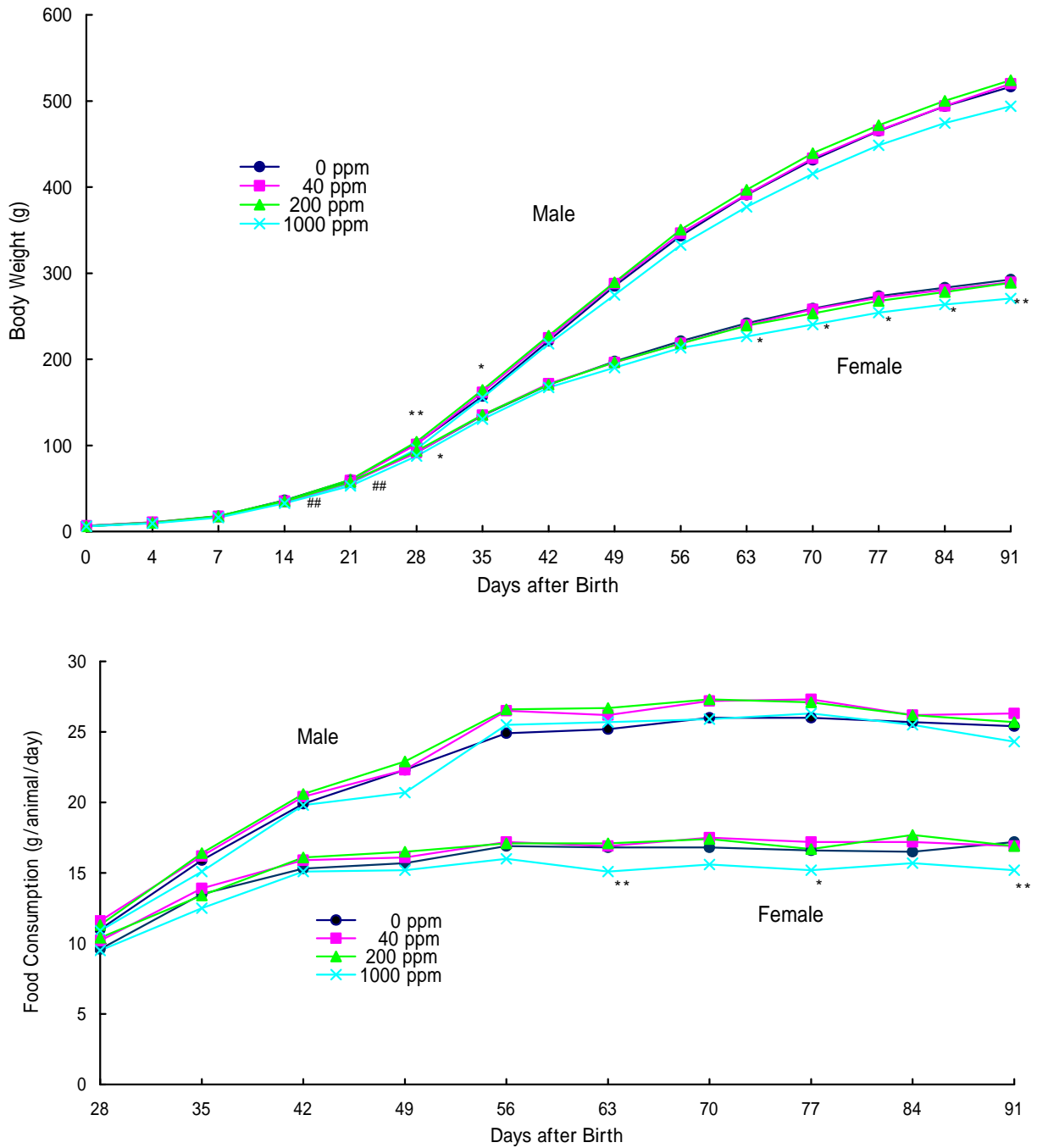
- Latendresse, J.R., Brooks, C.L. and Capen, C.C. (1995): Toxic effects of butylated triphenyl phosphate-based hydraulic fluid and tricresyl phosphate in female F344 rats. *Vet. Pathol.*, **32**, 394-402.
- MAFF in Japan (2000): Test guidelines for agricultural chemicals, 12-Nousan-No. 8147.
- McClain, 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.
- Moorman, W.J., Cheever, K.L., Skaggs, S.R., Clark, J.C., Turner, T.W., Marlow, K.L. and Schrader, S.M. (2000): Male adolescent exposure to endocrine-disrupting pesticides: vinclozolin exposure in peripubertal rabbits. *Andrologia*, **32**, 285-293.
- Monosson, E., Kelce, W.R., Lambright, C., Ostby, J. and Gray, L.E. Jr. (1999): Peripubertal exposure to the antiandrogenic fungicide, vinclozolin, delays puberty, inhibits the development of androgen-dependent tissues, and alters androgen receptor function in the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 65-79.
- 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.
- Ostby, J.S., Monosson, E., Kelce, W.R. and Gray, L.E. Jr. (1999): Environmental antiandrogens: Low doses of the fungicide vinclozolin alter sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 48-64.
- 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.
- Rhees, R.W., Kirk, B.A., Sephton, S. and Lephart, E.D. (1997): Effects of prenatal testosterone on sexual behavior, reproductive morphology and LH secretion in the female rat. *Dev. Neurosci.*, **19**, 430-437.
- 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.
- 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.
- 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.
- Wolf, C.J., LeBlanc, G.A., Ostby, J.S. and Gray, L.E. Jr. (2000): Characterization of the period of sensitivity of fetal male sexual development to vinclozolin. *Toxicol. Sci.*, **55**, 152-161.



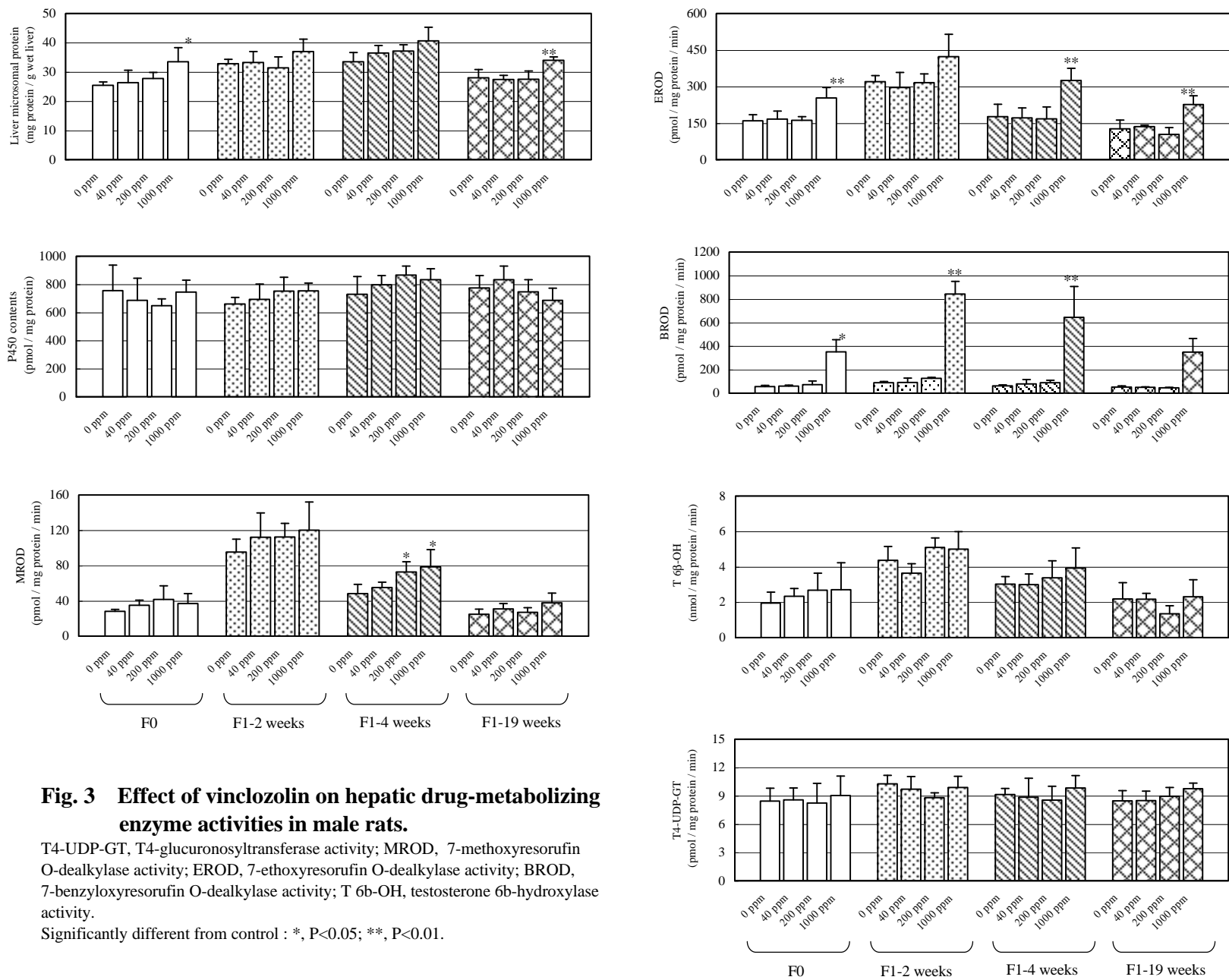
**Fig. 1 Body weight and food consumption of F0 animals**

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).



**Fig. 3 Effect of vinclozolin on hepatic drug-metabolizing enzyme activities in male rats.**

T4-UDP-GT, T4-glucuronosyltransferase activity; MROD, 7-methoxyresorufin O-dealkylase activity; EROD, 7-ethoxyresorufin O-dealkylase activity; BROD, 7-benzyloxyresorufin O-dealkylase activity; T 6β-OH, testosterone 6β-hydroxylase activity.

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

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		F0				F1			
投与群 (ppm)		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000
平均検体摂取量 (mg/kg/day)	雄 交配前 (10週間)	0	2.337 ± 0.095	11.53 ± 0.68	57.30 ± 3.19	0	3.010 ± 0.265	14.85 ± 0.72	74.71 ± 4.92
	雌 交配前 (10週間)	0	2.607 ± 0.161	12.78 ± 0.69	63.98 ± 3.42	0	3.168 ± 0.244	15.83 ± 0.97	75.93 ± 5.47
	妊娠期間	0	2.285 ± 0.128	11.22 ± 0.69	58.65 ± 2.70	0	2.277 ± 0.114	11.28 ± 0.767	55.81 ± 2.82
	哺育期間	0	5.946 ± 0.591	29.42 ± 3.85	145.55 ± 21.95	0	5.533 ± 0.676	28.6 ± 2.94	151.6 ± 7.7
動物数	雄	24	24	24	24	21	22	22	19
	雌	24	24	24	24	21	22	22	19
死亡数	雄	0	0	0	0	0	0	0	0
	雌	0	0	0	0	0	0	0	0
一般状態	雄	-	-	-	-	-	-	-	-
	雌	-	-	-	-	-	-	-	-
体重 (g)	雄 交配前 (10週)	476.7 ± 33.8	491.8 ± 35.8	491.6 ± 39.9	477.5 ± 54.5	516.6 ± 52.5	519.9 ± 48.9	524.0 ± 34.7	494.0 ± 40.5 ( )
	雌 交配前 (10週)	273.6 ± 19.1	270.6 ± 19.3	277.3 ± 22.9	258.1 ± 16.4	292.6 ± 19.8	289.6 ± 21.0	288.9 ± 24.6	270.7 ± 20.5
	妊娠中 (20日)	418.7 ± 28.6	413.5 ± 28.8	418.1 ± 31.5	399.4 ± 28.9 ( )	440.8 ± 25.7	434.2 ± 33.0	442.8 ± 33.8	367.8 ± 69.4
	哺育中 (21日)	326.1 ± 22.9	326.7 ± 20.0	326.9 ± 26.8	319.2 ± 25.9 ( )	338.5 ± 21.2	343.7 ± 19.3	337.6 ± 25.7	331.6 ± 36.4
体重増加量 (g)	雄 交配前 (10週)	268.4 ± 32.0	284.2 ± 31.8	284.1 ± 36.6	272.1 ± 53.0	456.5 ± 50.9	460.8 ± 47.3	463.3 ± 34.3	438.1 ± 38.9
	雌 交配前 (10週)	118.8 ± 16.5	116.6 ± 17.3	123.5 ± 20.7	104.4 ± 12.6	235.1 ± 19.0	232.4 ± 19.0	231.0 ± 23.0	216.7 ± 19.2
	妊娠中 (0-20日)	134.5 ± 15.3	134.8 ± 16.4	132.2 ± 13.9	134.8 ± 16.3	140.6 ± 16.0	135.2 ± 26.2	147.0 ± 17.8	91.6 ± 63.7 ( )
	哺育中 (0-14日) (0-21日)	26.0 ± 17.9 -0.9 ± 19.7	27.5 ± 14.4 7.1 ± 18.3	29.5 ± 20.3 6.5 ± 19.2	26.8 ± 31.4 19.1 ± 32.7	8.5 ± 14.1 -16.9 ± 15.4	11.2 ± 17.7 -10.3 ± 20.7	11.4 ± 18.0 -14.5 ± 16.2	18.0 ± 15.4 1.3 ± 10.0
摂餌量 (g)	雄 交配前 (10週)	21.9 ± 1.6	22.7 ± 1.2	22.8 ± 2.1	22.1 ± 1.7	25.4 ± 1.6	26.3 ± 1.6	25.7 ± 1.1	24.3 ± 3.0
	雌 交配前 (10週)	15.3 ± 2.8	14.5 ± 0.8	14.3 ± 1.1	13.5 ± 1.3 ( )	17.2 ± 1.3	16.9 ± 1.2	16.9 ± 1.1	15.2 ± 0.9
	妊娠中 (20日)	20.9 ± 1.7	20.8 ± 1.9	20.8 ± 2.2	21.5 ± 2.7 ( )	22.1 ± 2.0	21.8 ± 2.5	22.5 ± 2.1	19.1 ± 4.7 ( )
	哺育中 (21日)	65.8 ± 6.2	65.3 ± 5.7	66.6 ± 7.2	62.6 ± 9.7 ( )	64.1 ± 7.2	64.5 ± 6.0	65.5 ± 6.9	68.4 ± 4.9
性周期	平均性周期日数	4.05 ± 0.24	4.06 ± 0.22	4.10 ± 0.36	4.00 ± 0.00	4.25 ± 0.46	4.18 ± 0.39	4.20 ± 0.43	4.00 ± 0.00
	異常性周期動物	0/24	0/24	0/24	0/24	0/21	0/22	0/22	0/19
生殖機能	交尾所要日数	2.1 ± 1.5	2.1 ± 1.2	2.6 ± 1.6	2.1 ± 1.2	3.0 ± 1.6	2.4 ± 1.0	2.5 ± 1.1	2.8 ± 2.1
	逸した発情期の回数	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 1.2
	交尾率 (%)	95.8 (23/24)	95.8 (23/24)	95.8 (23/24)	100.0 (24/24)	100.0 (21/21)	95.5 (21/22)	100.0 (22/22)	89.5 (17/19)
	受胎率 (%)	95.7 (22/23)	95.7 (22/23)	95.7 (22/23)	87.5 (21/24)	100.0 (21/21)	95.2 (20/21)	100.0 (22/22)	52.9 (9/17)
二次交配 (1000 ppm)						不妊雄 × 無処置雌		未交尾雌 × 授胎能確認雌	
検査動物数		0	0	0	0	8		2	
交尾率 (%)		NE	NE	NE	NE	100.0 (8/8)		100.0 (2/2)	
受胎率 (%)		NE	NE	NE	NE	25.0 (2/8)		100.0 (2/2)	
黄体数		NE	NE	NE	NE	16.0		16.5	
着床数		NE	NE	NE	NE	15.5		14.5	
着床率 (%)		NE	NE	NE	NE	96.9		87.70	
精子検査	運動精子率 (%)	90.5 ± 5.1	89.4 ± 8.2	88.6 ± 7.2	89.2 ± 5.9	88.5 ± 8.1	89.4 ± 7.8	86.3 ± 7.9	87.4 ± 7.5
	精巢精子数 (×10 <sup>6</sup> /g)	101.24 ± 13.92	96.09 ± 12.57	99.41 ± 20.17	91.61 ± 15.39	98.24 ± 15.95	NE	NE	93.45 ± 17.50
	精巢上体尾部精子数 (×10 <sup>6</sup> /g)	588.63 ± 116.71	NE	NE	584.10 ± 126.16	805.66 ± 79.55	763.73 ± 71.93	839.91 ± 90.42	701.38 ± 154.32
	形態異常 (%)	0.20 ± 0.50	NE	NE	1.15 ± 2.08	0.71 ± 0.75	NE	NE	0.73 ± 1.13
	Tailless Sperm (%)	1.15 ± 1.42	NE	NE	1.05 ± 1.39	1.00 ± 0.94	NE	NE	0.87 ± 0.99

- : 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



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		F0				F1			
投与群 (ppm)		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000
分娩・哺育									
妊娠期間 (日)		21.8 ± 0.4	22.0 ± 0.4	22.0 ± 0.2	21.9 ± 0.4	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.0	21.9 ± 0.4	22.1 ± 0.3
着床数		13.9 ± 1.9	14.0 ± 2.5	13.8 ± 2.8	13.8 ± 2.3	14.1 ± 2.6	14.6 ± 3.1	15.4 ± 1.5	15.6 ± 1.0
出生率 (%)		94.89 ± 7.61	93.34 ± 8.68	93.34 ± 8.49	89.02 ± 16.01	95.56 ± 5.45	93.62 ± 7.20	91.57 ± 10.58	89.92 ± 8.71
出産率 (%)		95.5 (21/22)	100.0 (22/22)	100.0 (22/22)	100.0 (21/21)	100.0 (21/21)	100.0 (20/20)	100.0 (22/22)	100.0 (9/9)
分娩異常									
難産		0/21	0/22	0/22	0/21	0/21	0/20	0/22	0/9
哺育異常									
全児死亡 (授乳欠如)		0/21	0/22	0/22	2/21	0/21	0/20	0/22	0/9
全児死亡 (授乳行動あり)		0/21	0/22	0/22	0/21	0/21	0/20	0/22	1/9
器官重量									
雄									
最終体重		527.4 ± 46.3	558.3 ± 44.5	552.3 ± 44.8	532.0 ± 72.2	637.6 ± 64.7	645.9 ± 57.2	642.8 ± 55.2	604.3 ± 45.4
脳		2.166 ± 0.079	2.171 ± 0.076	2.161 ± 0.095	2.156 ± 0.083	2.255 ± 0.072	2.248 ± 0.120	2.244 ± 0.079	2.224 ± 0.084
上段:実重量 (g)		0.413 ± 0.035	0.391 ± 0.030	0.392 ± 0.027	0.409 ± 0.051	0.356 ± 0.030	0.349 ± 0.020	0.351 ± 0.027	0.371 ± 0.025
下垂体 (×10 <sup>-3</sup> )		13.22 ± 1.33	14.05 ± 1.57	13.59 ± 2.02	15.08 ± 2.10	15.28 ± 1.83	14.88 ± 1.50	15.34 ± 1.39	16.54 ± 2.11
下段:対体重比 (g/100gBW)		2.52 ± 0.24	2.51 ± 0.23	2.46 ± 0.28	2.83 ± 0.35	2.41 ± 0.20	2.32 ± 0.25	2.41 ± 0.31	2.75 ± 0.31
甲状腺 (×10 <sup>-3</sup> )		26.95 ± 4.41	26.22 ± 4.70	25.36 ± 4.55	25.94 ± 4.67	30.22 ± 7.42	28.67 ± 6.00	28.37 ± 6.06	29.41 ± 5.24
胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )		5.13 ± 0.82	4.71 ± 0.86	4.61 ± 0.79	4.96 ± 1.10	4.76 ± 1.13	4.47 ± 0.94	4.44 ± 0.95	4.87 ± 0.85
F0: 雄16w		46.65 ± 9.99	46.22 ± 8.97	50.08 ± 15.71	43.76 ± 10.98	44.89 ± 7.26	47.77 ± 11.57	48.89 ± 15.54	41.39 ± 13.06
雌17-18w		16.177 ± 2.337	18.242 ± 1.723	17.587 ± 2.192	17.509 ± 3.343	19.606 ± 2.565	20.263 ± 2.360	19.872 ± 2.504	18.846 ± 2.236
F1: 雄21-22w		3.058 ± 0.247	3.271 ± 0.217	3.178 ± 0.196	3.259 ± 0.236	3.073 ± 0.243	3.134 ± 0.204	3.089 ± 0.243	3.112 ± 0.213
雌20-23w		0.828 ± 0.114	0.860 ± 0.143	0.812 ± 0.127	0.852 ± 0.163	0.977 ± 0.135	0.918 ± 0.116	0.935 ± 0.170	0.915 ± 0.097
腎臓		0.158 ± 0.024	0.153 ± 0.020	0.147 ± 0.018	0.158 ± 0.013	0.154 ± 0.016	0.143 ± 0.014	0.145 ± 0.024	0.152 ± 0.014
副腎 (×10 <sup>-3</sup> )		3.331 ± 0.458	3.388 ± 0.278	3.406 ± 0.327	3.410 ± 0.446	3.842 ± 0.433	3.858 ± 0.343	3.861 ± 0.363	3.905 ± 0.348
精巣		0.632 ± 0.070	0.609 ± 0.041	0.618 ± 0.046	0.641 ± 0.060	0.604 ± 0.051	0.598 ± 0.039	0.602 ± 0.040	0.646 ± 0.050
前立腺		51.54 ± 6.93	55.26 ± 6.00	53.57 ± 6.35	63.58 ± 11.84	58.32 ± 5.87	58.49 ± 8.31	60.33 ± 7.84	73.42 ± 8.42
精囊		9.84 ± 1.56	9.92 ± 1.11	9.72 ± 1.08	11.98 ± 2.15	9.25 ± 1.32	9.07 ± 1.21	9.43 ± 1.29	12.20 ± 1.64
精巣上部		3.314 ± 0.240	3.493 ± 0.276	3.347 ± 0.302	3.666 ± 0.363	3.748 ± 0.287	3.790 ± 0.350	3.693 ± 0.559	4.021 ± 0.448
精巣上部尾部 (片側)		0.635 ± 0.085	0.629 ± 0.066	0.610 ± 0.079	0.700 ± 0.100	0.594 ± 0.072	0.591 ± 0.066	0.578 ± 0.091	0.669 ± 0.078
精巣下部		0.778 ± 0.158	0.748 ± 0.139	0.775 ± 0.249	0.666 ± 0.147	0.721 ± 0.159	0.716 ± 0.180	0.578 ± 0.092	0.428 ± 0.150
精囊		0.149 ± 0.032	0.136 ± 0.028	0.142 ± 0.044	0.126 ± 0.032	0.114 ± 0.027	0.112 ± 0.028	0.090 ± 0.014	0.071 ± 0.026
精巣上部		2.624 ± 0.280	2.706 ± 0.269	2.619 ± 0.321	2.514 ± 0.437	2.874 ± 0.354	2.771 ± 0.435	2.790 ± 0.303	2.461 ± 0.517
精巣上部尾部 (片側)		0.499 ± 0.061	0.489 ± 0.062	0.478 ± 0.077	0.477 ± 0.101	0.452 ± 0.049	0.431 ± 0.070	0.436 ± 0.047	0.409 ± 0.089
精巣上部		1.296 ± 0.118	1.322 ± 0.080	1.274 ± 0.092	1.215 ± 0.156	1.351 ± 0.100	1.284 ± 0.114	1.257 ± 0.077	1.205 ± 0.142
精巣上部尾部 (片側)		0.249 ± 0.032	0.238 ± 0.026	0.232 ± 0.024	0.232 ± 0.036	0.212 ± 0.020	0.199 ± 0.025	0.198 ± 0.017	0.199 ± 0.028
精巣上部尾部 (片側)		0.268 ± 0.021	0.263 ± 0.018	0.253 ± 0.021	0.229 ± 0.017	0.281 ± 0.024	0.274 ± 0.028	0.257 ± 0.022	0.225 ± 0.028
精巣上部尾部 (片側)		0.051 ± 0.006	0.046 ± 0.007	0.046 ± 0.007	0.044 ± 0.008	0.045 ± 0.0054	0.043 ± 0.0056	0.040 ± 0.0045	0.037 ± 0.0051

: P&lt;0.05, : P&lt;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		F0				F1			
投与群 (ppm)		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000
器官重量	雌 最終体重	302.6±22.4	299.6±18.5	305.7±22.7	285.7 ± 19.4	332.0±22.2	332.7±20.5	326.9±26.0	311.9 ± 27.5
	脳	1.974±0.053	1.968±0.095	1.998±0.089	1.923±0.072	2.034±0.066	2.020±0.093	2.005±0.080	2.004±0.102
上段：実重量 (g)	下垂体 (×10 <sup>-3</sup> )	17.02±2.75	17.07±2.13	18.86 ± 1.76	17.03±2.02	17.55±2.03	19.00±2.64	18.33±2.14	15.99±2.63
	甲状腺 (×10 <sup>-3</sup> )	5.63±0.81	5.70±0.59	6.19±0.66	5.97±0.56	5.30±0.56	5.71±0.73	5.62±0.58	5.13±0.71
下段：対体重比 (g/100gBW)	甲状腺 (×10 <sup>-3</sup> )	20.02±3.69	19.22±4.46	20.43±5.20	20.83±3.36	21.63±5.75	18.71±3.59	19.96±3.70	21.81±5.26
	胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	6.62±1.12	6.44±1.46	6.67±1.57	7.29±1.08	6.50±1.62	5.64±1.05	6.11±1.02	7.03±1.75
F0: 雄16w 雌17-18w	肝臓	210.2±49.1	247.7±71.6	240.5±57.9	196.8±71.6	272.2±63.9	298.9±80.9	310.1±80.1	304.4±96.8
	脾臓	69.57±15.54	82.54±22.41	78.98±19.61	68.72±23.47	81.66±16.89	90.23±26.24	94.19±19.85	96.48±23.69
F1: 雄21-22w 雌20-23w	腎臓	10.910±3.049	11.234±0.700	11.814±1.314	12.562 ± 1.104	12.610±0.972	12.501±1.072	12.339±1.155	13.541±1.393
	副腎 (×10 <sup>-3</sup> )	3.597±0.924	3.756±0.223	3.879±0.465	4.403 ± 0.348	3.809±0.325	3.761±0.282	3.780±0.281	4.349 ± 0.340
	卵巣 (×10 <sup>-3</sup> )	0.546±0.058	0.574±0.088	0.612±0.173	0.517±0.080	0.622±0.050	0.630±0.076	0.631±0.122	0.628±0.127
	子宮	0.182±0.021	0.191±0.026	0.198±0.045	0.181±0.025	0.189±0.019	0.190±0.022	0.192±0.033	0.201±0.025
	発情前期	2.208±0.283	2.151±0.160	2.264±0.167	2.236±0.196	2.396±0.215	2.370±0.175	2.365±0.217	2.428±0.269
	発情後期/発情休止期	0.728±0.065	0.719±0.043	0.743±0.053	0.782 ± 0.047	0.724±0.078	0.714±0.039	0.725±0.057	0.780±0.074
	子宮	66.24±7.40	69.37±8.27	72.06±7.72	83.43 ± 9.71	69.08±9.15	71.54±6.72	73.66±8.54	94.33 ± 10.15
	子宮	21.96±2.52	23.16±2.48	23.64±2.57	29.24 ± 3.27	20.86±2.84	21.54±1.89	22.59±2.54	30.29 ± 2.72
	子宮	102.21±12.89	103.39±8.69	110.52±15.87	92.51±12.53	108.30±10.31	113.70±10.63	116.13±18.49	119.08±18.80
	子宮	33.81±3.76	34.61±3.40	36.07±3.27	32.33±3.19	32.70±3.30	34.23±2.90	35.43 ± 4.10	38.09 ± 4.03
	子宮	0.718±0.312	0.763±0.352	0.761±0.344	0.727±0.358	0.715±0.294	0.747±0.349	0.783±0.284	0.788±0.397
	子宮	0.240±0.109	0.257±0.119	0.250±0.115	0.255±0.126	0.217±0.093	0.229±0.115	0.240±0.087	0.250±0.119
	子宮	1.016±0.155	1.111±0.212	1.009±0.287	0.991±0.290	0.966±0.156	1.048±0.283	1.008±0.171	1.130±0.228
	子宮	0.340±0.068	0.373±0.074	0.340±0.102	0.348±0.102	0.299±0.058	0.328±0.093	0.306±0.062	0.358±0.043
	子宮	0.431±0.035	0.490±0.066	0.475±0.041	0.426±0.036	0.474±0.129	0.451±0.061	0.488±0.030	0.445±0.058
	子宮	0.145±0.016	0.168±0.030	0.159±0.010	0.149±0.019	0.140±0.031	0.131±0.022	0.156±0.015	0.143±0.015

: 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)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000
<b>剖検</b>									
雄		<24>#	<24>	<24>	<24>	<21>	<22>	<22>	<19>
精巣	小型	0	0	0	0	0	0	0	1
	腫大	0	0	0	0	0	0	1	0
精巣上体	小型	0	0	0	0	0	0	0	1
精囊	小型	0	0	0	0	0	0	0	1
陰茎	包皮の裂	0	0	0	0	0	0	0	8
	尿道下裂	0	0	0	0	0	0	0	1
	Vaginal pouch	0	0	0	0	0	0	0	1
雌		<22>	<22>	<22>	<21>	<21>	<22>	<22>	<19>
<b>組織所見</b>									
雄	肝臓	<20>	<20>	<20>	<20>	<17>	<18>	<18>	<15>
	小葉中心性肝細胞肥大	1	0	4	17	0	0	7	13
副腎	束状帯の脂肪滴増加	1	0	12	5	0	0	6	6
		2	0	2	18	0	0	1	13
	球状帯の脂肪滴増加	1	0	0	7	0	0	1	10
		2	0	0	9	0	0	0	7
下垂体	好塩基性細胞の肥大	1	0	2	20	0	0	1	8
精巣	間細胞のびまん性増生	1	0	0	13	0	0	0	13
精囊	粘膜の萎縮	1	1	0	9	0	0	0	3
前立腺	分泌液の減少	1	0	NE	0	0	0	8	9
		2	0	NE	0	0	0	0	5
雌	肝臓	<20>	<20>	<20>	<20>	<21>	<22>	<22>	<19>
	小葉中心性肝細胞肥大	1	0	0	18	0	0	0	15
副腎	束状帯の脂肪滴増加	1	0	2	7	0	1	8	10
		2	0	0	2	0	0	1	7
	球状帯の脂肪滴増加	1	1	5	9	0	2	13	9
		2	0	0	3	0	0	1	8
卵巣	間質細胞の増生	1	0	0	6	0	0	0	6
	黄体細胞の空胞化	1	0	0	8	0	0	0	3

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

- : 特記すべき所見なし,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)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000	
血中ホルモン濃度										
甲状腺ホルモン										
雄	TSH (ng/mL)	9.18±3.90	7.96±3.32	10.70±4.48	11.11±4.51	14.23±3.37	14.12±4.39	15.20±5.38	13.61±3.00	
	T3 (ng/dL)	178.3±22.9	162.3±20.7	168.7±18.9	144.2 ± 11.1	145.6±7.1	135.5±9.2	144.3±23.3	125.8 ± 18.0	
	T4 (µ g/dL)	5.65±0.67	5.77±1.03	5.12±0.98	3.51 ± 0.72	5.66±0.69	5.12±0.34	5.20±0.96	3.46 ± 0.60	
雌	TSH (ng/mL)	7.88±2.39	7.70±3.84	7.73±2.99	8.24±3.51	10.89±3.05	12.23±5.08	10.34±3.33	11.53±2.14	
	T3 (ng/dL)	169.6±28.4	175.5±26.2	158.5±21.8	127.0 ± 21.1	153.2±23.8	147.3±30.1	150.1±17.3	130.6±15.2	
	T4 (µ g/dL)	3.49±0.86	3.39±1.08	2.24 ± 0.68	1.45 ± 0.40	3.90±0.70	4.17±0.88	3.43±0.55	2.15 ± 0.40	
性ホルモン										
雄	LH (ng/mL)	1.70±0.19	1.48±0.25	1.79±0.22	2.57 ± 0.85	1.45±0.27	1.39±0.35	1.69±0.24	2.40 ± 0.74	
	FSH (ng/mL)	8.56±1.61	8.18±0.61	8.75±1.16	13.56 ± 2.09	11.22±1.83	11.02±2.27	11.83±1.97	14.50 ± 2.63	
	PRL (ng/mL)	10.40±9.82	4.47±1.96	4.85±3.12	7.02±5.54	4.05±1.39	4.07±2.10	5.72±4.21	4.84±2.02	
	T (ng/mL)	3.87±2.13	2.28±0.64	4.16±0.86	5.95 ± 3.62	3.85±3.02	2.50±1.03	4.49±2.18	5.86 ± 2.26	
	DHT (pg/mL)	156±59	111±48	158±35	202 ± 79	82±45	96±38	136±79	166 ± 65	
	DHT/T	0.048±0.018	0.049±0.014	0.039±0.008	0.042±0.018	0.025±0.008	0.040 ± 0.012	0.031±0.011	0.028±0.003	
雌	発情前期	LH (ng/mL)	1.52±0.21	1.72±0.31	1.66±0.33	1.83±0.16	1.31±0.20	1.62±0.17	1.60±0.31	1.44±0.56
		FSH (ng/mL)	4.31±0.74	4.48±0.92	4.64±1.59	4.97±2.09	7.24±0.55	7.44±0.50	7.98±1.46	7.48±0.47
		PRL (ng/mL)	10.19±14.51	16.49±25.26	31.00±43.67	29.35±46.05	4.09±4.55	7.91±5.89	5.90±6.40	4.74±2.74
		E2 (pg/mL)	70.8±29.7	73.2±19.8	69.9±33.7	48.9±22.8	73.8±13.4	72.4±17.5	68.1±26.4	66.6±25.0
		P (ng/mL)	4.31±3.62	7.67±5.51	7.02±6.97	7.12±4.03	5.53±2.49	5.91±1.90	5.57±1.44	8.81±6.27
	発情後期	LH (ng/mL)	2.08±0.63	2.38±0.70	2.08±0.32	2.02±0.56	1.48±0.35	1.48±0.28	1.48±0.38	1.67±0.34
		FSH (ng/mL)	5.61±3.38	5.61±4.18	4.34±0.90	5.59±3.36	8.01±0.98	7.72±0.49	7.70±0.64	7.47±0.47
		PRL (ng/mL)	3.59±3.59	3.53±3.01	6.86±5.19	2.08±1.83	3.17±2.88	4.12±6.56	3.75±3.90	3.88±3.70
		E2 (pg/mL)	8.4±6.2	15.0±4.6	9.5±3.5	10.4±4.8	13.1±8.1	12.0±7.2	13.5±4.6	13.3±5.4
		P (ng/mL)	17.79±15.82	16.11±3.40	16.17±5.45	16.76±6.21	14.19±2.57	14.95±2.87	14.72±2.15	13.98±2.80

: P<0.05, : P<0.01

表 2 - 1 児動物の結果概要 ( 1 )

(青色 追加項目,黄色/橙色 影響)

世代		F1								F2				
投与群 (ppm)		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000	
出産児数		13.4±2.1	13.2±2.5	13.1±3.0	12.8±2.9	13.6±2.5	13.9±3.1	14.3±2.0	14.3±1.7					
出産生存児数		13.2±2.1	13.1±2.4	13.0±3.0	12.4±2.9	13.4±2.5	13.7±3.0	14.1±2.0	14.0±1.7					
性比 (雄/雌)		1.04 (143/138)	1.09 (152/139)	0.90 (137/152)	1.22 (148/121)	0.97 (140/145)	1.00 (139/139)	1.07 (162/152)	0.95 (63/66)					
出生時生存率 (%)		98.30±4.46	99.11±3.07	98.71±2.81	97.15±6.02	99.04±2.42	98.45±3.31	98.81±4.40	97.72±4.95					
4日生存率 (%)		98.99±2.56	99.75±3.34	99.33±2.18	89.50±24.14	99.00±2.50	99.65±1.59	98.04±4.77	88.89±33.33					
離乳率 (%)		99.40±2.73	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	99.40±2.73	100.00±0.00	98.86±3.68	100.00±0.00					
外表異常 一般状態		0/166	0/172	0/172	0/146	0/163	0/156	0/174	0/64					
体重 (g)														
雄	0日	6.5±0.6	6.6±0.5	6.5±0.4	6.5±0.5	6.8±0.3	6.7±0.4	6.7±0.4	6.7±0.5					
	4日	10.4±1.4	10.7±1.1	10.7±1.1	9.9±1.3	11.1±0.9	10.9±1.3	11.3±1.2	10.8±1.1					
	7日	17.5±2.3	17.6±1.4	17.9±1.5	16.9±1.5	18.7±1.3	18.3±1.8	18.6±1.7	17.8±1.3					
	14日	36.1±3.2	35.4±2.4	36.0±1.7	34.0 ± 2.8	38.9±2.3	37.9±3.1	39.0±3.0	38.3±2.6					
	21日	59.9±5.4	59.2±3.3	60.2±2.9	55.4 ± 4.1	64.0±3.2	62.3±4.2	64.3±5.2	61.4±3.5					
雌	0日	6.1±0.7	6.3±0.4	6.1±0.4	6.1±0.6	6.4±0.4	6.3±0.5	6.3±0.4	6.2±0.6					
	4日	10.0±1.5	10.3±1.0	10.2±1.2	9.4±1.4	10.6±1.0	10.6±1.4	10.6±1.2	10.3±1.0					
	7日	16.9±2.2	16.9±1.5	17.3±1.4	16.1±1.3	17.6±1.5	17.2±2.0	17.2±1.7	16.7±1.5					
	14日	35.1±3.0	34.4±2.4	35.0±1.8	32.9 ± 2.6	37.5±2.7	36.5±3.0	37.2±2.9	36.4±2.3					
	21日	57.8±4.3	56.9±3.8	57.7±2.7	52.9 ± 3.6	61.3±3.7	60.0±4.7	60.8±4.3	58.4±2.1					
体重増加量 (g)	雄	0-4日	4.0±1.2	4.1±0.9	4.2±0.9	3.4±1.3	4.3±0.7	4.2±1.1	4.6±1.0	4.1±0.8				
		4-7日	7.0±1.0	6.9±0.7	7.2±0.7	6.7±0.8	7.5±0.7	7.2±0.7	7.2±0.7	6.9±0.7				
		4-14日	25.6±2.3	24.7±1.8	25.2±1.4	23.8 ± 2.2	27.7±1.8	26.7±2.1	27.6±2.2	27.3±1.7				
		4-21日	49.4±4.7	48.5±2.7	49.4±2.3	45.2 ± 3.5	52.8±2.7	51.2±3.3	52.9±4.6	50.5±2.6				
	雌	0-4日	3.8±1.1	4.0±0.8	4.1±0.9	3.4±1.3	4.2±0.8	4.3±1.2	4.3±1.0	3.9±0.6				
4-7日	6.7±0.9	6.6±0.6	6.9±0.6	6.4±0.7	6.8±0.8	6.5±0.9	6.6±0.7	6.3±0.9						
4-14日	25.0±2.0	24.1±1.9	24.6±1.4	23.2 ± 2.1	26.7±2.0	25.8±2.0	26.5±2.2	25.9±1.5						
4-21日	47.7±3.4	46.6±3.2	47.3±2.2	43.2 ± 3.1	50.5±3.1	49.4±3.7	50.1±3.8	48.0±1.4						

: P<0.05, : P<0.01

表 2 - 2 児動物の結果概要 ( 2 )

(青色 追加項目,黄色/橙色 影響)

世代投与群 (ppm)		F1				F2				
		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000	
AGD	雄 AGD	2.46±0.21	2.53±0.17	2.42±0.17	1.94 ± 0.31	2.56±0.18	2.46±0.18	2.37 ± 0.15	1.90 ± 0.24	
	(AGD/BW <sup>1/3</sup> )	1.32±0.09	1.35±0.08	1.30±0.10	1.04 ± 0.17	1.35±0.09	1.31±0.08	1.26 ± 0.08	1.01 ± 0.13	
0日	雌 AGD	1.03±0.12	1.06±0.12	1.08±0.12	1.05±0.18	1.10±0.08	1.05±0.07	1.07±0.06	1.07±0.08	
	(AGD/BW <sup>1/3</sup> )	0.57±0.06	0.58±0.06	0.59±0.07	0.58±0.10	0.59±0.04	0.57±0.03	0.58±0.03	0.58±0.05	
4日	雄 AGD	4.15±0.36	4.13±0.24	4.07±0.42	2.99 ± 0.37	4.34±0.38	4.44±0.40	4.28±0.51	3.33 ± 0.55	
	(AGD/BW <sup>1/3</sup> )	1.90±0.11	1.88±0.10	1.84±0.19	1.40 ± 0.14	1.94±0.14	1.99±0.15	1.90±0.18	1.50 ± 0.23	
	雌 AGD	1.84±0.20	1.82±0.11	1.84±0.12	1.76±0.24	2.05±0.15	2.02±0.18	1.94±0.19	1.94±0.15	
	(AGD/BW <sup>1/3</sup> )	0.85±0.08	0.84±0.06	0.84±0.06	0.84±0.10	0.93±0.07	0.92±0.07	0.88±0.07	0.89±0.07	
乳頭発現異常 (%)	雄 (乳頭/乳輪の遺残)	0.0±0.0	0.0±0.0	36.0 ± 35.6	97.4 ± 7.9	0.0±0.0	6.0±19.7	59.5 ± 33.8	100.0 ± 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	19.8±31.9	18.6±29.6	26.8±28.8	26.9±33.3	NE	NE	NE	NE
		3日	82.9±36.5	98.1±7.2	89.8±29.5	91.6±20.1	NE	NE	NE	NE
	雌	4日	95.2±21.8	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0 ± 0.0	NE	NE	NE	NE
		2日	22.5±29.6	27.3±28.1	33.2±31.7	39.9±39.1	NE	NE	NE	NE
上切歯萌出	雄	3日	85.0±31.0	95.2±13.8	87.5±30.4	92.4±24.9	NE	NE	NE	NE
		4日	95.2±21.8	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	NE	NE	NE	NE
	雌	(日)	10.7±1.0	10.5±0.6	10.4±0.8	10.2±1.2	NE	NE	NE	NE
眼瞼開裂	雄	(日)	10.7±0.8	10.5±0.6	10.7±0.7	10.5±1.1	NE	NE	NE	NE
	雌	(日)	13.9±0.6	13.9±0.7	14.1±0.6	13.7±0.9	NE	NE	NE	NE
性成熟	包皮分離 (雄)	(日)	13.9±0.6	13.7±0.8	13.8±0.5	13.6±0.8	NE	NE	NE	NE
		(g)	40.7±1.5	40.5±1.2	42.5 ± 1.7	47.4 ± 2.8	NE	NE	NE	NE
	膺開口 (雌)	(日)	209.4±19.8	212.2±17.5	232.5 ± 17.4	264.7 ± 20.6	NE	NE	NE	NE
		(g)	32.7±1.7	32.9±1.9	31.7±1.1	32.3±0.9	NE	NE	NE	NE
反射反応性	平面正向反射	雄/雌 (%)	118.9±10.8	120.2±12.1	114.6±10.9	112.8±10.7	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	100/100	100/100	100/100	NE	NE	NE	NE

NE : 検査せず  
 : P<0.05, : P<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		F1				F2					
投与群 (ppm)		0 (対照)	40	200	1000	0 (対照)	40	200	1000		
器官重量 (3週齢)	雄	最終体重	58.77±5.81	59.47±5.64	59.83±3.37	55.86±4.50	63.98±3.42	62.41±5.43	64.39±6.06	60.98±4.83	
		脳	1.509±0.055	1.526±0.070	1.523±0.066	1.493±0.070	1.529±0.051	1.539±0.061	1.523±0.055	1.503±0.084	
	上段：実重量		2.587±0.228	2.584±0.205	2.550±0.114	2.542±0.142	2.392±0.100	2.479±0.165	2.380±0.216	2.470±0.121	
	(g)	胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	253.0±32.7	272.9±42.4	262.9±25.7	238.3±44.2	256.8±32.1	276.8±39.7	269.7±51.4	266.3±39.6	
	下段：対体重比		431.0±40.8	458.4±60.1	441.0±51.7	424.7±55.9	401.9±50.5	444.2±56.1	418.7±63.9	434.9±38.3	
	(g/100gBW)	脾臓	0.293±0.046	0.308±0.052	0.295±0.029	0.276±0.050	0.333±0.046	0.330±0.065	0.326±0.073	0.319±0.057	
			0.500±0.076	0.517±0.076	0.494±0.056	0.489±0.072	0.521±0.066	0.525±0.069	0.502±0.075	0.524±0.085	
		精巣	0.256±0.039	0.250±0.041	0.264±0.024	0.243±0.030	0.264±0.032	0.266±0.037	0.279±0.033	0.249±0.052	
			0.435±0.051	0.420±0.056	0.441±0.029	0.437±0.037	0.411±0.040	0.427±0.035	0.434±0.044	0.405±0.060	
		精巣上体 (×10 <sup>-3</sup> )	45.18±5.86	44.07±5.20	44.32±7.47	32.87 ± 5.35	45.52±6.60	42.70±5.23	43.53±5.39	32.09 ± 7.07	
			76.97±7.44	74.44±8.56	74.08±12.05	58.87 ± 8.39	71.24±10.34	68.62±7.79	68.07±9.90	52.29 ± 9.69	
		雌	最終体重	57.23±4.64	57.56±4.11	57.59±3.04	52.27 ± 3.82	61.51±4.62	59.68±6.02	61.33±4.69	60.03±3.45
			脳	1.480±0.073	1.485±0.060	1.477±0.049	1.427±0.053	1.477±0.047	1.482±0.044	1.490±0.058	1.494±0.073
			2.599±0.187	2.591±0.193	2.570±0.124	2.740 ± 0.171	2.413±0.185	2.506±0.233	2.440±0.173	2.493±0.166	
		胸腺 (×10 <sup>-3</sup> )	265.3±43.8	280.0±43.4	270.8±40.7	252.1±33.9	267.2±33.4	273.3±31.8	283.8±54.2	280.5±34.8	
		463.1±60.7	485.5±58.4	471.5±74.1	484.2±69.0	436.0±56.5	460.6±59.8	462.6±76.7	467.3±49.8		
		脾臓	0.295±0.051	0.300±0.038	0.299±0.036	0.265±0.056	0.320±0.051	0.311±0.066	0.311±0.054	0.306±0.068	
		0.517±0.086	0.523±0.057	0.520±0.066	0.504±0.084	0.520±0.071	0.518±0.075	0.506±0.065	0.508±0.091		
		卵巣 (×10 <sup>-3</sup> )	17.76±2.94	17.20±2.70	17.95±3.91	15.59±4.14	17.37±3.11	17.36±4.12	17.24±3.07	17.20±2.15	
		31.12±5.08	30.00±4.87	31.11±6.51	29.84±7.73	28.29±4.88	29.13±6.25	28.05±4.08	28.63±2.85		
		子宮 (×10 <sup>-3</sup> )	39.24±5.96	40.75±7.57	43.79±7.85	39.76±6.58	38.19±7.52	40.33±10.29	40.06±8.41	38.44±7.12	
		68.84±10.91	70.94±13.63	75.95±12.21	76.38±14.18	61.99±11.07	67.19±13.19	65.51±13.76	63.86±10.10		
剖検 (3週齢)											
	雄	<64>#	<65>	<61>	<56>	<81>	<79>	<89>	<31>		
	精巣 小型	0	0	0	0	1	0	0	0		
	陰茎 包皮の裂	0	0	0	19	0	0	0	8		
	Vaginal pouch	0	0	0	0	0	0	0	6		
	雌	<61>#	<65>	<66>	<50>	<83>	<77>	<89>	<31>		
		-	-	-	-	-	-	-	-		

# : < > は検査例数を示す .

- : 特記すべき所見なし

: P<0.05 , : P<0.01

表 3 肝薬物代謝酵素活性

		雄								雌							
投与群(ppm)			0 (対照)		40	200	1000	0 (対照)		40	200	1000	0 (対照)		40	200	1000
Liver microsomal protein	(mg protein / g wet liver)	F0-19w	25.4 ± 1.2	26.3 ± 4.3	27.7 ± 4.3	33.5 ± 4.8	26.9 ± 2.1	30.3 ± 6.9	34.8 ± 4.6	30.7 ± 4.6							
		F1-2w	32.8 ± 1.5	33.2 ± 3.8	31.4 ± 3.7	37.0 ± 4.2	29.2 ± 1.6	32.7 ± 1.9	31.9 ± 2.7	39.0 ± 2.3							
		F1-4w	33.5 ± 3.1	36.5 ± 2.5	37.1 ± 2.2	40.6 ± 4.7	30.6 ± 4.5	36.3 ± 1.5	36.9 ± 2.3	36.2 ± 2.9							
		F1-19w	28.0 ± 2.8	27.4 ± 1.4	27.5 ± 2.8	34.0 ± 1.1	NE	NE	NE	NE							
Cytochrome P450	(pmol / mg protein)	F0-19w	755 ± 181	686 ± 156	648 ± 156	744 ± 85	392 ± 78	413 ± 48	453 ± 88	464 ± 12							
		F1-2w	659 ± 48	692 ± 110	752 ± 97	753 ± 56	557 ± 40	507 ± 51	523 ± 76	646 ± 56							
		F1-4w	728 ± 127	796 ± 66	865 ± 65	833 ± 77	486 ± 88	541 ± 77	543 ± 46	568 ± 47							
		F1-19w	774 ± 88	833 ± 96	746 ± 86	685 ± 87	NE	NE	NE	NE							
	(nmol / g wet liver)	F0-19w	19.2 ± 5.1	18.3 ± 6.2	18.0 ± 2.3	24.8 ± 3.8	10.6 ± 2.9	12.7 ± 4.3	15.8 ± 4.1	14.3 ± 2.4							
		F1-2w	21.6 ± 1.6	22.7 ± 2.1	23.8 ± 5.5	27.7 ± 2.5	16.2 ± 1.4	16.6 ± 2.5	16.8 ± 3.5	25.2 ± 2.8							
		F1-4w	24.5 ± 5.3	29.0 ± 2.1	32.1 ± 2.9	34.0 ± 6.3	15.0 ± 4.1	19.7 ± 3.3	20.1 ± 2.7	20.6 ± 2.1							
		F1-19w	21.8 ± 4.4	22.8 ± 2.0	20.4 ± 1.1	23.2 ± 2.3	NE	NE	NE	NE							
		7-Methoxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-19w	28.2 ± 2.0	35.1 ± 5.6	41.7 ± 15.3	36.8 ± 11.4	43.2 ± 5.4	44.0 ± 4.8	53.9 ± 15.2	46.3 ± 23.5					
				F1-2w	95.2 ± 14.6	112.0 ± 27.7	112.4 ± 15.3	120.2 ± 31.7	99.8 ± 5.2	112.5 ± 19.3	103.0 ± 12.3	84.6 ± 26.4					
				F1-4w	48.1 ± 10.5	55.2 ± 6.0	72.7 ± 11.5	78.6 ± 19.5	33.4 ± 3.9	42.2 ± 4.3	66.1 ± 4.7	49.3 ± 21.2					
				F1-19w	24.8 ± 5.9	30.8 ± 6.0	27.0 ± 5.2	37.8 ± 10.9	NE	NE	NE	NE					
(nmol / g wet liver / min)	F0-19w	0.72 ± 0.08	0.93 ± 0.26	1.17 ± 0.50	1.23 ± 0.42	1.16 ± 0.17	1.35 ± 0.41	1.91 ± 0.72	1.38 ± 0.59								
	F1-2w	3.11 ± 0.40	3.66 ± 0.74	3.49 ± 0.30	4.41 ± 1.17	2.91 ± 0.15	3.68 ± 0.68	3.29 ± 0.46	3.30 ± 1.12								
	F1-4w	1.59 ± 0.24	2.02 ± 0.30	2.69 ± 0.33	3.20 ± 0.96	1.03 ± 0.22	1.53 ± 0.15	2.43 ± 0.15	1.75 ± 0.69								
	F1-19w	0.70 ± 0.17	0.84 ± 0.17	0.74 ± 0.10	1.28 ± 0.32	NE	NE	NE	NE								
7-Ethoxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-19w	159.8 ± 24.1	166.7 ± 32.3	161.8 ± 14.9	252.7 ± 43.2	167.6 ± 10.0	168.3 ± 41.5	184.1 ± 39.5	355.7 ± 86.4							
		F1-2w	319.7 ± 25.0	295.7 ± 62.5	316.2 ± 35.6	422.2 ± 92.1	319.6 ± 88.8	350.3 ± 93.2	276.0 ± 72.0	411.9 ± 49.4							
		F1-4w	176.6 ± 50.8	171.3 ± 40.9	167.8 ± 48.8	325.2 ± 49.4	190.5 ± 59.0	230.0 ± 13.5	240.6 ± 47.8	295.8 ± 68.5							
		F1-19w	126.6 ± 36.0	135.3 ± 6.1	103.4 ± 28.2	226.2 ± 36.0	NE	NE	NE	NE							
	(nmol / g wet liver / min)	F0-19w	4.06 ± 0.74	4.48 ± 1.41	4.49 ± 0.64	8.47 ± 1.91	4.52 ± 0.63	5.30 ± 2.68	6.50 ± 2.04	10.75 ± 2.01							
		F1-2w	10.47 ± 0.61	9.66 ± 1.29	9.94 ± 1.80	15.36 ± 2.34	9.32 ± 2.57	11.48 ± 3.19	8.86 ± 2.57	15.99 ± 1.48							
		F1-4w	5.84 ± 1.36	6.20 ± 1.18	6.18 ± 1.57	13.13 ± 1.98	5.96 ± 2.47	8.35 ± 0.75	8.87 ± 1.90	10.59 ± 1.96							
		F1-19w	3.53 ± 0.95	3.71 ± 0.25	2.84 ± 0.87	7.68 ± 1.05	NE	NE	NE	NE							
		7-Benzoyloxyresorufin O-dealkylase	(pmol / mg protein / min)	F0-19w	56.5 ± 10.2	59.1 ± 9.3	73.0 ± 31.1	351.3 ± 102.9	17.3 ± 2.7	21.5 ± 7.4	33.0 ± 3.9	287.5 ± 145.5					
				F1-2w	88.1 ± 11.7	91.9 ± 37.0	125.0 ± 9.8	841.9 ± 107.8	35.2 ± 12.5	44.1 ± 18.2	51.7 ± 20.2	668.1 ± 176.5					
				F1-4w	62.0 ± 7.8	78.3 ± 37.0	88.0 ± 21.4	644.6 ± 262.3	21.5 ± 9.9	29.2 ± 1.2	34.3 ± 12.1	226.1 ± 124.8					
				F1-19w	52.2 ± 10.6	50.0 ± 3.8	45.7 ± 3.9	348.3 ± 116.1	NE	NE	NE	NE					
(nmol / g wet liver / min)	F0-19w	1.44 ± 0.30	1.58 ± 0.46	2.05 ± 0.94	11.89 ± 4.19	0.47 ± 0.10	0.68 ± 0.40	1.15 ± 0.25	8.69 ± 4.76								
	F1-2w	2.90 ± 0.47	2.96 ± 0.98	3.91 ± 0.50	31.20 ± 5.78	1.02 ± 0.36	1.44 ± 0.61	1.66 ± 0.72	26.29 ± 8.12								
	F1-4w	2.08 ± 0.34	2.80 ± 1.10	3.25 ± 0.70	25.65 ± 9.44	0.69 ± 0.38	1.06 ± 0.07	1.27 ± 0.48	8.02 ± 4.20								
	F1-19w	1.47 ± 0.35	1.37 ± 0.12	1.26 ± 0.15	11.8 ± 3.76	NE	NE	NE	NE								
	Testosterone 6β-hydroxylase	(nmol / mg protein / min)	F0-19w	1.95 ± 0.62	2.33 ± 0.44	2.67 ± 0.97	2.71 ± 1.51	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.14	0.20 ± 0.05						
			F1-2w	4.37 ± 0.78	3.63 ± 0.54	5.09 ± 0.54	4.99 ± 0.99	0.49 ± 0.29	0.67 ± 0.21	0.42 ± 0.09	0.41 ± 0.15						
			F1-4w	3.02 ± 0.42	2.99 ± 0.61	3.37 ± 0.97	3.93 ± 1.13	0.14 ± 0.06	0.14 ± 0.04	0.13 ± 0.03	0.22 ± 0.08						
			F1-19w	2.18 ± 0.92	2.17 ± 0.33	1.34 ± 0.46	2.31 ± 0.95	NE	NE	NE	NE						
(nmol / g wet liver / min)	F0-19w	49.2 ± 14.6	61.3 ± 16.3	74.5 ± 29.7	90.9 ± 51.9	3.6 ± 1.2	4.2 ± 1.3	6.4 ± 5.4	6.1 ± 2.1								
	F1-2w	143.4 ± 26.8	119.7 ± 14.2	160.1 ± 28.8	185.2 ± 45.1	14.2 ± 8.3	22.1 ± 8.1	13.3 ± 3.2	15.6 ± 5.1								
	F1-4w	101.1 ± 14.8	108.6 ± 20.8	123.7 ± 30.0	160.5 ± 55.4	4.4 ± 2.2	5.1 ± 1.3	4.9 ± 1.1	7.8 ± 3.0								
	F1-19w	59.8 ± 21.9	59.4 ± 9.0	36.0 ± 9.2	78.0 ± 28.8	NE	NE	NE	NE								
T4-UDP-Glucuronosyltransferase	(pmol / mg protein / min)	F0-19w	8.44 ± 1.36	8.57 ± 1.26	8.24 ± 2.09	9.04 ± 2.05	8.12 ± 0.75	8.47 ± 1.04	8.37 ± 2.26	10.60 ± 1.38							
		F1-2w	10.26 ± 0.91	9.69 ± 1.35	8.81 ± 0.50	9.88 ± 1.18	10.22 ± 1.08	9.41 ± 0.62	8.98 ± 0.77	9.09 ± 1.49							
		F1-4w	9.14 ± 0.64	8.86 ± 2.01	8.53 ± 1.47	9.84 ± 1.31	10.12 ± 0.96	10.01 ± 1.43	9.49 ± 1.11	10.27 ± 1.27							
		F1-19w	8.47 ± 1.07	8.49 ± 1.01	8.95 ± 0.92	9.76 ± 0.59	NE	NE	NE	NE							
	(pmol / g wet liver / min)	F0-19w	214.2 ± 37.3	223.0 ± 37.6	226.2 ± 54.0	297.3 ± 40.7	219.0 ± 33.0	254.9 ± 53.4	293.7 ± 102.2	321.6 ± 25.4							
		F1-2w	336.8 ± 38.1	318.3 ± 22.9	275.2 ± 22.5	362.0 ± 31.2	298.4 ± 37.2	308.3 ± 37.2	286.6 ± 34.1	351.4 ± 37.4							
		F1-4w	305.8 ± 28.6	324.2 ± 81.4	315.7 ± 52.9	400.6 ± 82.3	312.4 ± 71.9	364.2 ± 65.4	349.9 ± 47.5	370.6 ± 48.6							
		F1-19w	235.2 ± 16.7	232.0 ± 20.3	244.8 ± 18.3	331.5 ± 10.6	NE	NE	NE	NE							

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