

要 約

2-ナフチルイソブチルエーテルの毒性学的性質を評価するため、当該物質の0（溶媒のコーンオイルのみ投与）、20、100 および 500 mg/kg/day を CrI:CD(SD)系ラットの雌雄各5例に28日間反復経口投与した。また、0 mg/kg（対照群）および500 mg/kg 群には、雌雄各5例の回復群を設け、28日間の反復投与終了後、14日間の休薬による毒性の回復性についても検討した。

試験期間を通じて、一般状態の観察、機能観察総合検査（FOB）、体重および摂餌量の測定を行い、投与期間および回復期間終了時に、臨床検査（血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査、血清蛋白電気泳動検査および尿検査）および病理学検査（器官重量測定、肉眼観察および病理組織学検査）を実施した。

その結果の要約は、次の通りである。

500 mg/kg 群の雌で Day 6 および 7 の投与前に各1例が死亡した。

投与後の一般状態の変化として、500 mg/kg 群の雌雄で流涎、軟便、粘液便および水様下痢が観察された。

体重では、500 mg/kg 群の雌雄で体重増加抑制が認められ、雄では回復期間終了時にも低体重が認められたものの、休薬による回復傾向が認められた。

摂餌量では、500 mg/kg 群の雌雄で投与期間中に減少が認められた。

機能観察総合検査（FOB）では、投与期間中に500 mg/kg 群の雄で自発運動量の減少および反応性の低下が認められた。

尿検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌雄で尿量の増加および尿浸透圧の低下、同群の雄でナトリウムおよびカリウム排泄量の減少、尿 pH の中性化が認められた。

血液学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で貧血が認められた。

血液生化学検査では、投与期間終了時に500 mg/kg 群の雌で総蛋白が低下、中性脂肪およびALPが上昇し、回復期間終了時に500 mg/kg 群の雄で総蛋白が低下、雌で中性脂肪および総コレステロールが上昇を示し、蛋白・脂質代謝系への影響が示唆された。また、500 mg/kg 群の雄で投与期間終了時および回復期間終了時に血糖が低下した。

病理学検査では、主に脾臓、前胃、盲腸、結腸、肝臓および副腎に対する影響が認められた。500 mg/kg 群の雌雄あるいは雌雄のいずれかで、脾臓の鬱血および色素沈着、前胃の扁平上皮過形成、出血、繊維化、浮腫および潰瘍、盲腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、結腸の粘膜上皮細胞の好塩基化および核分裂像増加、肝臓の肝細胞好酸性化および小葉中心帯肝細胞肥大、副腎の血管拡張、空胞変性、壊死、マクロファージ集簇および皮質肥大が観察された。なお、結腸の粘膜上皮細胞の核分裂像増加

は、100 mg/kg 群の雄でも観察された。消化管および肝臓での変化は、休業による回復性が認められた。脾臓および副腎での変化については、休業による回復傾向は認められたものの、変化は継続していた。

以上のことから、当該試験条件下において、2-ナフチルイソブチルエーテルの反復投与に起因する変化が、雄では100 mg/kg/day 以上の投与で、雌では500 mg/kg/day の投与で認められたことから、無毒性量は、雄では20 mg/kg/day、雌では100 mg/kg/day と判断された。また、14 日間の回復期間後、雄の体重および病理学検査における雌雄の脾臓および副腎に投与の影響は残ったものの、概ね回復傾向を示した。

1. 表題

2-ナフチルイソブチルエーテルのラットにおける 28 日間反復投与毒性試験

2. 試験目的

既存化学物質の毒性学的性質を評価する一環として、ラットを用いる反復経口投与毒性試験を行い、一般毒性学的影響を検討する。また、2 週間の休業期間を設け、一般毒性学的影響に対する回復性を検討する。

3. 準拠したガイドラインと遵守した GLP および動物実験関連規則

毒性試験ガイドライン

OECD テストガイドライン 407 (1995 年 7 月 27 日)

GLP

- 新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について(平成 15 年 11 月 21 日薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号)

- OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17

動物実験関連規則

動物の飼育および動物の取り扱いについては、「動物の愛護及び管理に関する法律」, 「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」を遵守し、動物を適正に使用した。

4. 試験番号

9933 (115-212)

5. 試験施設

〒437-1213 静岡県磐田市塩新田 582-2

財団法人 食品農医薬品安全性評価センター (略称 安評センター)

Tel: 0538-58-1266 Fax: 0538-58-1293

6. 試験委託者

〒100-8916 東京都千代田区霞が関一丁目 2 番 2 号

厚生労働省 医薬食品局 審査管理課 化学物質安全対策室

Tel: 03-3253-1111 Fax: 03-3593-8913

11. 試験日程

試験開始日：	平成18年7月6日
投与液の安定性分析	
調製直後：	平成18年7月10日
保存10日後：	平成18年7月20日
動物搬入日：	平成18年7月19日
群分け日：	平成18年7月26日
投与開始日（実験開始日）：	平成18年7月26日
解剖日（毒性試験群）：	平成18年8月23日
回復性試験終了日（解剖日）：	平成18年9月6日
被験物質の安定性分析：	平成18年9月13日
実験終了日：	平成19年1月26日
試験終了日：	平成19年11月12日

12. 試験材料および方法

12.1. 被験物質

被験物質として使用した2-ナフチルイソブチルエーテル (CAS No. 2173-57-1, Lot No. GI01, 純度 99.1%, 分子量 200.28, 東京化成工業) は, 白色の結晶塊であり, 安評センター7号館2階被験物質調製室B内プレハブ低温庫 ch. 72 に保存した. 被験物質の受領日から最終使用日までの保管庫温度実測値は 3.0~7.9°C であった. 受領時の被験物質の品質について, 分析結果を Reference data 1 に示した. 試験期間中の被験物質の安定性を確認するため, 投与期間終了後に被験物質の純度分析を実施した. その結果, 純度は 99.6% であり, 安定性評価の判定基準 (純度 98% 以上) を満たしていた. したがって, 試験期間中の被験物質が安定であることが確認された (Reference data 2).

被験物質を約 40°C に温めたコーンオイル (Lot No. V5R8265, V6A8960, V6F9868, ナカライテスク) に溶解し, 2, 10 および 50 mg/mL の投与液を調製した.

投与液の濃度および均一性分析は, 初回調製時に調製した全ての試験群の投与液について行った. その結果, 設定濃度 (2, 10 および 50 mg/mL) に対する割合が, それぞれ 103.4, 102.1 および 103.1%, 相対標準偏差がそれぞれ 0.5, 0.4 および 0.4% であり, 濃度/均一性評価の判定基準 (濃度平均値: 設定濃度の 90~110% 以内, 相対標準偏差: 10% 以下) を満たしていた (Reference data 3). したがって, 投与液は適切に調製されていることが確認された.

また、2 および 50 mg/mL 濃度の投与液を遮光条件下で 10 日間室温放置した後、濃度分析を行った。その結果、調製直後の被験物質濃度の平均値に対する割合が、投与液の安定性の判定基準 (90%以上) を満たしていたことから、安定であることが確認された (Reference data 3)。したがって、投与液は、投与まで遮光・室温条件下で保存 (保存場所: 被験物質調製室 A 内室温保管庫 ch. 67) し、調製後 10 日以内に使用した。

被験物質は、投与終了後に 2 g を安評センターに保存し、残りは廃棄された。

12.2. 使用動物および飼育条件

日本チャールス・リバー株式会社 厚木飼育センターから生後 4 週齢の CrI:CD(SD)系 SPF ラット雌雄各 36 匹を購入し、試験に雌雄各 30 匹を使用した。

購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した。検疫・馴化期間中の体重推移および一般状態に異常は認められなかった。

動物は、温度 $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ (実測値: $22.4\sim 23.3^{\circ}\text{C}$)、湿度 $55\pm 20\%$ (実測値: $52\sim 70\%$)、換気回数 10 回以上/h、空気差圧外気+2 mmH₂O以上、照明時間 12 時間 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に設定されたバリアシステムの 101 号飼育室 (W 8.0 × D 8.0 × H 2.5 m, 160.0 m³) で飼育した。株式会社 東京技研サービスの自動水洗式飼育機を使用し、アルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージ (W 15.8 × D 25.0 × H 16.0 cm, 6,320.0 cm³) に動物を 1 匹ずつ収容し飼育した。飼育ケージは隔週 1 回、給餌器は週 1 回交換した。

飼料は、放射線滅菌固型飼料 (CRF-1, Lot No. 051202, オリエンタル酵母工業) を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水 (磐田市上水) を給水ノズルより自由に摂取させた。供給した飼料および水に、試験に支障を来す可能性のある汚染物質の混在はなかった。

したがって、飼育期間中、データの信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因の変化はなかった。

12.3. 群分け

群分けは、雌雄ともに検疫・馴化期間終了後の投与開始日に行った。

群分け日の動物の体重は、平均体重の 20%以内に収まっており、群分け終了時の体重は、雄で 134~153 g、雌で 110~122 g の範囲にあった。投与開始日の体重を基に、無作為抽出法により対照群および高用量群に各 10 匹 (その内の各 5 匹は回復性試験用動物)、低および中用量群に各 5 匹を振り分けた。

余剰動物は、群分け後に炭酸ガス吸入により安楽死させた。

12.4. 個体識別

動物の個体識別は、機能観察総合検査 (Functional Observational Battery : FOB) を盲検法で実施するため、動物入荷時に雌雄別に通し番号を割り付け、検疫・馴化期間中に動

物の耳介にその通し番号(仮動物番号)を入れ墨した。群分け時に仮動物番号カードと群分け後の動物識別番号カード(IDカード)を用意し、群分け終了時に動物識別番号カードを表にし、対となる仮動物番号カードと重ね、個別飼育ケージに付けて動物を識別した。機能観察総合検査以外の観察、測定および検査は動物識別番号に基づき実施した。

12.5. 投与量, 群構成, 投与期間および投与方法

投与用量は、本被験物質の毒性に関する情報として、Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS)にラットに対する経口投与でのLD₅₀が 5,930 mg/kgと記載(RTECS番号: KO1255000)されていることから、当該試験に先立って0, 30, 100, 300 および1,000 mg/kg/dayの用量で、2週間投与予備試験(試験番号9960)を実施し、その結果を参考に設定した。予備試験では、1,000 mg/kg群の雄で4/5例、雌で5例(全例)が投与後4から7日の間に死亡した。投与後の症状として、雄の100 mg/kg以上および雌の300 mg/kg以上の投与群で軟便、雌雄の1,000 mg/kg群で下痢、雌雄の300 mg/kg以上の投与群で流涎が認められ、雄の300 mg/kg群で体重増加抑制傾向が認められた。血液生化学検査では、雄の300 mg/kg群で血糖の低値およびカリウムの高値、雌の300 mg/kg群でASTの低値およびγ-GTPの高値が認められた。病理学検査では、雌の300 mg/kg群で肝臓および腎臓の相対重量が高値を示したが、剖検所見としては、被験物質投与に関連する異常所見は認められなかった。以上の結果から、当該試験では、明らかに毒性影響が発現すると考えられる500 mg/kg/dayを最高用量に設定し、以下公比5で除し、100 および20 mg/kg/dayを設けた。

投与経路は、OECDガイドライン407で指示されている投与経路に準じて強制経口投与とした。

投与容量は、体重100 g当たり1 mLとし、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。投与液は、胃ゾンデを用いて、1日1回、午前8時30分~11時34分に強制経口投与した。対照群には媒体(コーンオイル)のみを投与した。

投与期間は、雌雄ともに28日間とした。回復性試験用動物の投与期間は、連続28日間とし、その後の休薬期間は14日間とした。

13. 観察および検査方法

下記の項目について観察および検査を行った。投与開始日をDay 1、Day 1~7を投与1週とした。また、Day 29以降を回復期間とし、Day 29~36を回復1週とした。

13.1. 一般状態の観察

全動物について、毎日、投与前、投与30~60分後および3~4時間後を含む3回以上(剖検日は動物搬出前に1回)観察し、観察所見を記録するとともに生死の確認を行っ

た。

13.2. 機能観察総合検査 (FOB)

機能観察総合検査は、全生存動物について、詳細な症状観察を投与開始前に1回、投与開始後は毎週1回実施した。反応性検査、握力および自発運動量測定は、投与4週目および回復2週目に行った。投与開始後の観察および検査は盲検法で行った。

投与開始前の検査は、仮動物番号の若い順に動物を飼育管理者からFOBの実施者に引き渡して実施した。投与期間中は、まず、動物の投与後に飼育管理者が個別飼育ケージからIDカードを外し、仮動物番号の若い順にFOBの実施者に飼育ケージごと引き渡した。FOBの実施者は、投与後約30分から検査を実施した。飼育管理者は検査には加わらなかった。検査が終了し、FOBの実施者が飼育室から退室した後、飼育管理者が仮動物番号と動物識別番号の対比表に基づき、個別飼育ケージにIDカードを付けた。

13.2.1. 詳細な症状観察

詳細な症状観察では、ケージから動物を取り出す際の反応として、出し易さおよび異常発声について、手にとつての詳細観察として、筋緊張、体温低下、立毛、毛の汚れ、被毛粗剛、皮膚の色、流涙、眼球突出、瞳孔径および流涎について観察し、記録した。さらに、アリーナ [ポリカーボネイト製エコンケージ (W 31.0 × D 36.0 × H 17.5 cm, 19,530.0 cm³)] 内に動物を移し、姿勢、活動性、呼吸、眼瞼状態、歩行状態、振戦、攣縮、痙攣 (強直性、間代性)、常同行動および異常行動について3分間観察し、記録した。また、最初の1分間の糞・尿のプール数も記録した。

13.2.2. 反応性検査

接近反応、触覚反応、聴覚反応、痛覚反応、瞳孔反射および空中正向反射を検査し、記録した。

13.2.3. 握力 (前後肢)

前後肢の握力については、デジタルプッシュプルゲージ (アイコーエンジニアリング) を用いて、それぞれ2回測定し、平均値を記録した。

13.2.4. 自発運動量測定

CAS (東洋産業) を用いて個別に測定した。13.2.1.から13.2.3.項の検査終了後 (投与後約40分) に測定を開始した。測定時間は1時間とし、測定データを1分間隔で収集し、10分毎に集計した。測定環境の照明は、点灯状態とし、測定中の騒音レベルは、ホワイトノイズ発生装置 (PA-1, 永島医科機械) でおおよそ70 dB とした。普通騒音計 (S-11, 横河北辰電機) を用いて、騒音レベルを測定し、記録した。

13.3. 体重

全動物について、Day 1, 4, 8, 11, 15, 18, 22, 25 および 28 の投与前に測定した。また、Day 1 から Day 28 までの体重増加量を算出した。回復性試験群の動物は、Day 29, 32, 36, 39 および 42 に測定し、Day 29 から Day 42 までの体重増加量を算出した。

死亡動物については発見時に、投与終了時の解剖動物および回復試験群の動物については解剖当日 (Day 29 および 43) にも測定した。ただし、解剖日の体重は、相対重量の算出にのみ用いて、体重値の集計には含めなかった。測定は、電子天秤 (XS4001S, メトラー・トレド) を用いて行い、記録した。

13.4. 摂餌量

全動物について、Day 1, 8, 15, 22 および 28 の投与前に給餌および残餌の餌重量を測定した。回復性試験群の動物は、Day 29, 36 および 42 に測定した。餌重量は、電子天秤 (XS4001S) を用いて測定し、測定日間の平均1日摂餌量 (g/day) を算出した。

13.5. 臨床検査

計画解剖時 (Day 29 および Day 43) の全生存動物について、血液学検査、血液凝固能検査、血液生化学検査および血清蛋白電気泳動検査を実施した。

動物は、採血にあたり、採血前日の午後5時頃に給餌器を取り除いて絶食させた。採血は、エーテル麻酔下で開腹し、腹大動脈から実施した。

また、Day 23-24 および Day 37-38 (回復群) に、検査時の全生存動物について、尿検査を実施した。

13.5.1. 血液学検査

抗凝固剤 (EDTA-2K) 入り採血管 (インセパック II-D, 積水化学工業) に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置 (ADVIA 120, バイエル) を用いてヘマトクリット値 (HCT : RBC, MCV より算出), ヘモグロビン量 (HGB : シアンメトヘモグロビン変法), 赤血球数 (RBC : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 平均赤血球容積 (MCV : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 平均赤血球血色素量 (MCH : HGB, RBC より算出), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC : HGB, HCT より算出), 白血球数 (WBC : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法), 白血球百分率 (ペルオキシダーゼ染色によるフローサイトメトリー法および2角度レーザーフローサイトメトリー法) および好中球数 (NEUT), リンパ球数 (LYMPH), 単球数 (MONO), 好酸球数 (EOSN), 好塩基球数 (BASO), 大型非染色球数 (LUC), 血小板数 (PLT : 2 角度レーザーフローサイトメトリー法) および網赤血球率 (Reticulocyte : RNA 染色によるレーザーフローサイトメトリー法) を測定した。

白血球百分率は、前述の機器で測定したが、別途血液塗抹標本を作製し、メイ・グリュ

ンワルド・ギムザ染色を行い保存した。

13.5.2. 血液凝固能検査

抗凝固剤 (3.13%クエン酸ナトリウム水溶液) 入り採血管 (ベノジェクト II, テルモ) に血液を採取した後, 冷却多本架遠心機 (H-700FR, コクサン) を用いて, 20°C, 1,700 × g で 13 分間, 遠心分離して得た血漿を検査に用いた。全自動血液凝固線溶測定装置 (STA Compact, ロシユ) を用いて, プロトロンビン時間 (PT: 粘度変化検知方式) および活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT: 粘度変化検知方式) を測定した。

13.5.3. 血液生化学検査

高速凝固促進剤・分離剤入り採血管 (インセパック II-D) に血液を採取した後, 多本架冷却遠心機 (EX-126, トミー精工) を用いて, 20°C, 1,700 × g で 7 分間, 遠心分離して得た血清を検査に用いた。多項目生化学自動分析装置 (日立 7170, 日立製作所) を用いて総蛋白 (T. protein: Biuret 法), 血糖 (Glucose: HK-G-6-PDH 法), 中性脂肪 (Triglyceride: GK-GPO 遊離グリセロール消去法), 総コレステロール (T. cholesterol: コレステロールオキシダーゼ HDAOS 法), 尿素窒素 (BUN: ウレアーゼ GLDH 法), クレアチニン (Creatinine: 酵素法), 総ビリルビン (T. bilirubin: バナジン酸化法), 総胆汁酸 (Total bile acid: 酵素サイクリング法), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST: 酵素-UV 法), アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT: 酵素-UV 法), アルカリホスファターゼ (ALP: *p*-ニトロフェニルリン酸基質法), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (Gamma-GTP: L- γ -グルタミル-3-カルボキシ-4-NA 法), カルシウム (Calcium: MXB 法), 無機リン (I. phosphorus: PNP-XDH 法) を, 全自動電解質分析装置 (EA06R, アットウィル) を用いてナトリウム (Sodium: イオン選択電極法), カリウム (Potassium: イオン選択電極法) および塩素 (Chloride: イオン選択電極法) を測定した。

13.5.4. 血清蛋白電気泳動検査

13.5.3. で採取した血清を検査に用いた。全自動電気泳動分析装置 (エパライザ, ヘレナ研究所) を用い, タイタンIII-Tセルローズアセテート膜を支持体として電気泳動を行った。泳動終了後, ポンソー-S-T溶液で染色し, 同装置のデンストメーターを用いて, 各分画の比率 (Albumin, Alpha₁, Alpha₂, Beta, Gamma) を測定するとともにA/Gを算出した。さらに, 各分画の比率および血液生化学検査で求めた総蛋白量を用いて, 各分画の濃度 (g/dL) を算出した $\{ \text{分画比率} (\%) \times \text{総蛋白} (\text{g/dL}) \} / 100$ 。

13.5.5. 尿検査

給餌・給水の条件下で, 採尿ケージを用いて, 新鮮尿 (放尿後 3 時間以内の尿) および 24 時間尿 (午前 10 時頃から翌日午前 10 時頃まで) を採取した。

pH, 潜血 (Occult blood), ケトン体 (Ketone bodies), 糖 (Glucose), 蛋白 (Protein), ビリルビン (Bilirubin) およびウロビリノーゲン (Urobilinogen) について, 新鮮尿を用いて検査した. 測定は, エームス尿検査試験紙 (N-マルチスティックス SG, バイエル メディカル) を用い, 自動尿分析装置 (CLINITEK500, バイエル) で判定を行った.

24 時間尿について, 尿量 (計量) および色調 (目視) の検査後, 卓上多本架遠心機 (LC-06SP, トミー精工) を用いて, 尿を約 $400 \times g$ で 5 分間遠心し, 上清および残渣に分離した. 上清を用いて, 全自動電解質分析装置 (EA06R) でナトリウム, カリウムおよび塩素濃度を測定 (イオン選択電極法) し, さらに, 尿量を用いてナトリウム, カリウムおよび塩素の総排泄量を算出した. 尿浸透圧 (Osmotic Pressure) は, 自動浸透圧測定装置 (Osmotic Pressure AUTO&STAT OM-6030, アークレイファクトリー) で測定 (氷点降下法) した. また, 残渣を用いて, 新ステルンハイマー法による染色を施し, 尿沈渣標本を作製し, 鏡検した. なお, 上皮細胞が 1+を示した動物については, 扁平上皮細胞・移行上皮細胞・腎尿細管上皮細胞に分類した.

13.6. 病理学検査

13.6.1. 剖検および器官重量

死亡動物 (動物番号 2301, 2305) は, 発見後直ちに剖検した. 計画解剖動物は, エーテル麻酔下で採血し, 放血により安楽死させた後に剖検した.

剖検では, 動物の体表, 自然開口部, 体腔および諸器官について観察し, 全ての肉眼所見を記録した.

計画解剖動物について, 脳, 胸腺, 下顎腺 (舌下腺を含む), 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 精巣, 精巣上体および卵巣重量を, 電子天秤 (PE160, メトラー・トレド) を用いて測定し, 剖検日の体重から器官重量/体重比 (相対重量: 器官重量 / 剖検日体重 $\times 100$) を算出した.

また, 解剖した全ての動物について, 皮膚, 乳腺 (雌), リンパ節 (腸間膜, 下顎), 舌下腺, 下顎腺, 胸骨, 大腿骨, 骨髄 (胸骨, 大腿骨), 胸腺, 気管, 肺 (気管支を含む: 左側注入および浸漬固定), 心臓, 甲状腺, 上皮小体, 舌, 食道, 胃, 十二指腸, 空腸, 回腸, 盲腸, 結腸, 直腸, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精囊, 前立腺, 精巣上体, 卵巣, 卵管, 子宮, 陰, 眼球, 視神経, ハーダー腺, 脳, 下垂体, 脊髄 (頸髄, 胸髄, 腰髄), 骨格筋 (大腿部), 坐骨神経および大動脈を 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で, 精巣はホルマリン・酢酸液 (FA 液) で前固定した後, 10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定した.

13.6.2. 病理組織学検査

13.6.1. で固定した器官・組織について, 常法に従ってパラフィン包埋し, 薄切後, へ

マトキシリン・エオジン染色標本を作製した。病理組織学検査は、毒性試験群および回復性試験群の対照群および高用量群ならびに死亡動物の固定した器官・組織、低および中用量の肉眼異常部位について実施した。また、心臓、肝臓、脾臓、副腎、胃、盲腸、結腸、精囊、前立腺および精巣上体については、高用量群で被験物質投与の影響が疑われたため、低および中用量群についても検査を実施した。鏡検では、病変の種類、程度について記録した。

13.7. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、FOB計量データ（握力、自発運動量）、血液学検査値、血液凝固能検査値、血液生化学検査値、血清蛋白泳動検査値、尿検査値（尿量、尿浸透圧および尿電解質）、器官重量および相対重量については、最初にBartlettの等分散検定²⁾を実施し、等分散の場合は、Dunnettの多重比較検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。Bartlettの等分散検定で不等分散の場合は、Steelの検定で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

FOB 計数データ（排糞数、排尿数）は、Kruskal-Wallis の検定を実施し、有意差が認められた場合は、Steel の検定で対照群と各投与群の有意差を検定した。

剖検所見および病理組織学検査所見の発生率は、Fisher の直接確率検定法で対照群と各投与群の有意差を検定した。病理組織学所見のうち被験物質投与群で程度の増強が認められた所見は、-を「1」、+1（軽度）を「2」、+2（中等度）を「3」、+3（高度）を「4」に割り当て、Mann-Whitney の U 検定を実施した。

一般状態の所見についての統計解析は行わなかった。

有意水準は、Bartlett の等分散検定については5%、その他の検定は5%および1%の両側検定で実施した。