

用量群 (mg/kg/日)	使用動物数 (動物番号)	
	雄	雌
0	10 (301~310)	10 (341~350)
100	10 (311~320)	10 (351~360)
300	10 (321~330)	10 (361~370)
1000	10 (331~340)	10 (371~380)

4.5. 被験物質投与液の調製

各用量 (0, 100, 300, 1000 mg/kg) の被験物質投与液を週に2回 (月曜日と金曜日), 1回の調製あたり120 mLずつ調製した。なお, 動物の体重増加による投与容量増加のため, 2004年11月15日以降は1回の調製あたり160 mLずつ調製した。用量群ごとに必要量の被験物質を秤量した後, 注射用水 (大塚製薬株式会社, 東京都)にて希釈・定容し, スターラーで攪拌した。各用量の投与液は1日分 (当初30 mLで, 2004年11月15日以降は40 mL) ずつ小分けし, 投与日まで冷蔵庫 (設定値5℃, 許容範囲1~10℃の冷蔵庫) にて保管した。投与当日, 投与の約30分前に室温にもどし, 投与に用いた。また, 対照群では注射用水を用いた。

4.6. 観察および検査項目

4.6.1. 死亡率

全動物について, 投与期間中少なくとも1日2回, 瀕死状態ないし死亡の有無をケージサイドから観察した。

各用量群の死亡率は, 死亡・切迫殺動物数を分子, 使用動物数を分母とする分数表示により, 投与週毎の累積死亡率として雌雄別に表した。

4.6.2. 一般状態の観察

一般状態の観察は, 少なくとも1日1回被験物質投与前に実施した。また, 触診を含む観察を少なくとも毎週1回実施した。一般状態の観察によって何らかの異常が認められた場合は, その発見日, 状態, 強度および持続期間を記録した。

4.6.3. 詳細な状態の観察

全動物について, 詳細な状態の観察を投与開始前1回と投与期間中毎週1回, 午前のほぼ一定時刻 (被験物質投与前) に実施した。詳細な状態の観察時には以下の項目について発現の有無あるいは程度を観察し, 採点 (スコアリング) した。

ケージ内: 興奮, 鎮静, 異常姿勢 (腹臥, 横臥など), 異常行動 (後ずさり, 常同行動, 自傷行動など)

ハンドリング： 取り扱い難さ，筋緊張の変化（亢進，低下），振戦，眼瞼閉鎖，瞳孔径の変化（散瞳，縮瞳），流涎，流涙，分泌物（鼻孔，耳孔，膣などからの分泌物），眼球突出，体温の変化（上昇，下降），呼吸異常音，被毛の変化（外陰部湿潤），皮膚および可視粘膜の変化（充血）

オープンフィールド： 跳躍，旋回，痙攣，歩様異常（運動協調性を含む，よろめき歩行，ひきずり歩行，後肢麻痺など），自発運動（亢進，低下），身づくろい動作（頻度），立ち上がり姿勢（頻度），呼吸（促迫，緩徐），発声，立毛，排尿（回数），排便（回数），異常姿勢（腹臥，横臥など），異常行動（後ずさり，常同行動，自傷行動など）

4.6.4. 機能検査

全動物について，投与 11 週時に以下の項目の機能検査を実施した。

自発運動量，握力（前肢，後肢），感覚運動反応（位置視覚，接近反応，聴覚反応，触覚反応，痛覚反応，空中立ち直り反射）

自発運動量は，遠赤外線方式の検出器（SUPER MEX®）を装着した運動量測定装置（室町機械株式会社，東京都）を用いて連続 1 時間，10 分ごとに測定した。握力はラット握力測定器 CPU gauge Model-9505（アイコーエンジニアリング株式会社，愛知県）を用いて測定した。感覚運動反応の各項目は以下の方法で行い，正常あるいは通常範囲を“0”に設定した尺度基準を用いて採点（スコアリング）した。

位置視覚：動物の尾部を持ち垂直にぶら下げた状態で，平面に近づけて行った際の前肢を伸ばすタイミングを判定

接近反応：動物の正面に検査棒をゆっくりと近づけた際の反応を判定

聴覚反応：動物の背後で突然クリッカーを鳴らした際の反応を判定

触覚反応：動物の背部をピンセットで軽く触れた際の反応を判定

痛覚反応：動物の尾部をピンセットで挟んだ際の反応を判定

空中立ち直り反射：動物を仰向けに持ち上げて約 20 cm の高さから落下させた際の着地の姿勢を判定

各検査は，群間に偏りが出ないように各用量群から動物番号の若い順に 1 匹ずつ選択し，この操作を繰り返して実施した。機能検査は午前 9 時から午後 3 時の間に実施した。

機能検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 11 週時	2004 年 11 月 26～27 日	2004 年 12 月 3～4 日

4.6.5. 体重

全動物について投与開始日(0 週, 第一回目の投与日), およびその後毎週 1 回体重を測定した。投与期間中の体重測定は各投与週の最終日に行なった。各用量群の群平均体重を測定週ごとに雌雄別に算出した。また, 全動物について殺処分前に最終体重を測定し, 臓器重量測定時の比体重値の算出に用いた(4.6.12. 臓器重量参照)。

4.6.6. 摂餌量

全生存動物について, 投与期間中毎週 1 回連続 7 日分(最終週のみ 4 日分)の摂餌量を測定した。各測定値を測定期間中の延べ日数で除し, 1 日 1 匹あたりの摂餌量(個別別平均摂餌量)を算出した。これらの個別別摂餌量から各用量群における群平均摂餌量(g/rat/day)を測定週毎に雌雄別に算出した。さらに, これら週毎の群平均摂餌量を加重平均し, 全投与期間を通じた総平均摂餌量を雌雄別に求めた。

4.6.7. 食餌効率

全用量群について, 投与開始後毎週, 群平均体重増加量をそれぞれの群平均摂餌量で除して群平均食餌効率(%で表示)を雌雄別に算出した。さらに, これらの群平均食餌効率を平均し, 全投与期間を通じた総平均食餌効率を雌雄別に求めた。

4.6.8. 眼科学的検査

馴化期間中に雌雄の全馴化動物および投与 13 週時には対照群と 1000 mg/kg 用量群の全生存動物について, ハロゲン検眼鏡(株式会社ナイツ, 東京都)による観察を含む眼科学的検査を行なった。眼科学的検査では以下の部位を観察した。

眼球, 眼瞼, 結膜, 角膜, 前眼房, 瞳孔, 虹彩, 水晶体/硝子体, 眼底

投与 13 週時の検査において 1000 mg/kg 用量群の動物に被験物質の投与に関連した異常が認められなかったため, その他の投与群の動物の検査は行わなかった。

眼科学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与開始前	2004 年 9 月 13 日	2004 年 9 月 21 日
投与 13 週時	2004 年 12 月 13 日	2004 年 12 月 20 日

4.6.9. 尿検査

投与 13 週時に各群の全生存動物について尿検査を実施した。各動物から自然排泄によって得た尿を用いて以下の A の項目を検査した。また, 動物を個別別採尿ケージに一昼夜入れて採取した蓄積尿について B の項目を検査した。

A: 尿比重, ブドウ糖, ビリルビン, ケトン体, 潜血, pH, 蛋白質, ウロビリノーゲン, 尿沈渣
 B: 尿色, 尿量

尿比重は手持屈折計（株式会社アタゴ，東京都）で測定した。ブドウ糖，ビリルビン，ケトン体，潜血，pH，蛋白質およびウロビリノーゲンは，試験紙マルティスティックス®SG（バイエルメディカル株式会社，東京都）の呈色の程度を，クリニテック®50（バイエルメディカル株式会社）で準定量することによって行った。尿沈渣は鏡検した。

尿検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週時	2004 年 12 月 9～10 日	2004 年 12 月 16～17 日

4.6.10. 血液学的検査

13 週間反復投与終了後に各群の全生存動物について血液学的検査を実施した。検査動物は採血前に一晩絶食させた。動物をエーテル麻酔下で開腹し，無処理の注射筒を用いて後大静脈より採血した。

血液学的検査は，EDTA 処理後の試料カップに分注した各血液試料の一部を用いて，以下の項目について実施した。測定は総合血液学検査装置アドヴィア 120（Bayer Corporation, NY, U.S.A.）で行なった。なお，必要となった場合に参照する可能性を考慮して，各血液試料からメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した塗抹標本を作製した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
ヘマトクリット値 (Ht)	%	RBC, MCV 値より算出
血色素量 (Hb)	g/dl	シアンメトヘモグロビン変法
赤血球数 (RBC)	$10^6/\mu\text{l}$	光学的検知法
平均赤血球容積 (MCV)	fl	光学的検知法
平均赤血球血色素量 (MCH)	pg	Hb, RBC 値より算出
平均赤血球血色素濃度 (MCHC)	g/dl	Hb, RBC, MCV 値より算出
血小板数 (PLT)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
網赤血球数 (Retics)	$10^9/\text{l}$	光学的検知法
白血球数 (WBC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法
白血球のディファレンシャルカウント： 好中球 (N)，リンパ球 (L)，単球 (M)， 好酸球 (E)，好塩基球 (B)，大型非染色 球 (LUC)	$10^3/\mu\text{l}$	光学的検知法