

血液凝固能を調べるために以下の検査を実施した。これらの項目は、未処理の血液 9 容と 3.2%クエン酸ソーダ水溶液 1 容の混和後に得られた血漿を試料として、自動血液凝固測定装置 CA-5000 (シスメックス株式会社, 兵庫県) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
プロトロンビン時間 (PT)	sec	プロトロンビン時間法
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)	sec	活性化部分トロンボプラスチン時間法

また、上述の血液学的検査に供した全動物の大腿骨髄から骨髓細胞を採取し、骨髓有核細胞数の測定およびメイグリュンワルド・ギムザ染色を施した骨髓塗抹標本の作製を実施した。骨髓有核細胞数は総合血液学検査装置アドヴィア 120 で行なった。血液学的検査成績において、本被験物質投与によると思われる造血器系への影響が考えられるため、骨髓塗抹標本を対象とした骨髓細胞形態検査を実施する。

血液学的検査は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

4.6.11. 血液生化学的検査

13 週間反復投与終了後に、各群の全生存動物について前項 (4.6.10. 血液学的検査) で採取した血液試料をヘパリン処理して得られた血漿を用い、以下の項目を JCA-BM1250 自動分析装置 (日本電子株式会社, 東京都) を用いて測定した。

測定項目(略号)	単位	測定方法
アルカリホスファターゼ (ALP)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)	U/l	JSCC 標準化対応法
グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (GPT)	U/l	JSCC 標準化対応法
γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGTP)	U/l	JSCC 標準化対応法
クレアチニン (Creat)	mg/dl	酵素法
尿素窒素 (BUN)	mg/dl	ウレアーゼ・UV LED アンモニア回避法
総蛋白 (TP)	g/dl	ビウレット法

アルブミン (Alb)	g/dl	BCG 法
グロブリン (Glob)	g/dl	計算値, TP-Alb
アルブミン/グロブリン比 (A/G ratio)	-	計算値, Alb/(TP-Alb)
血糖 (Gluc)	mg/dl	Gluc-DH 法
総コレステロール (T.Chol)	mg/dl	コレステロール酸化酵素法
トリグリセライド (TG)	mg/dl	FG 消去酵素法
総ビリルビン (T.Bil)	mg/dl	酵素法
カルシウム (Ca)	mg/dl	OCPC 法
無機リン (P)	mg/dl	酵素法
ナトリウム (Na)	mEq/l	イオン電極法
カリウム (K)	mEq/l	イオン電極法
塩素 (Cl)	mEq/l	イオン電極法

4.6.12. 臓器重量

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、採血および剖検後、以下の臓器の固定前の重量（絶対重量）を測定した。それらの値と最終体重から比体重値（相対重量）を算出した。

脳, 甲状腺 (両側), 心臓, 胸腺, 肝臓, 腎臓 (両側), 脾臓, 副腎 (両側), 精巣 (両側), 精巣上体 (両側), 前立腺 (腹葉), 卵巣 (両側), 子宮

臓器重量の測定は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

4.6.13. 剖検

13 週間反復投与終了後に各群の生存動物について、エーテルの深麻酔下で腹大動脈・後大静脈を切断して放血により安楽死させた後に剖検した。計画殺動物については剖検前に一晩絶食させた。剖検では、各個体の全身を詳細に観察し、肉眼的異常を記録した。

剖検は以下の日程で実施した。

	雄	雌
投与 13 週計画殺動物	2004 年 12 月 17 日	2004 年 12 月 24 日

4.6.14. 組織採取

剖検時に全動物から以下の臓器および組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。ただし、肺についてはホルマリン液を気管から注入した後に浸漬固定した。また、

精巣は FSA 液（ホルマリン-ショ糖-酢酸混合液）で 5 日間固定した後、10% 中性緩衝ホルマリン液に移して保存した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺および上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨，片側大腿骨および頸部，胸部，腰部椎骨），膝関節（片側），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，膵臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，頭部（鼻腔，副鼻腔，口腔粘膜および中耳を含む），舌，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（頸部を含む），膾，眼球（両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

4.6.15. 病理組織学的検査

次に示す動物および臓器・組織を対象にして病理組織学的検査を実施した。

(1) 対照群および高用量群の全動物から採取した次表に示す臓器・組織

(2) 低用量群および中用量群の動物から採取した肉眼的異常部位

なお，(1)の検査の結果，被験物質による作用が生じていると考えられる組織（標的組織）はなかったため，これらの群については肉眼的異常部位のみを検査した。

脳（大脳，小脳，橋および延髄），脊髄（頸部，胸部および腰部），坐骨神経（片側），下垂体，胸腺，甲状腺（両側），上皮小体（両側），副腎（両側），脾臓，骨および骨髄（胸骨および片側大腿骨），リンパ節（頸部および腸間膜），心臓，大動脈，唾液腺（顎下腺および舌下腺），食道，胃（前胃および腺胃），肝臓，膵臓，十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸，直腸，鼻腔，咽頭，喉頭，気管，肺（気管支を含む），腎臓（両側），膀胱，精巣（両側），精巣上体（両側），前立腺，精のう（両側），凝固腺（両側），卵巣（両側），子宮（角部および頸部），膾，眼球（網膜および視神経を含む，両側），ハーダー腺（両側），下腿三頭筋（片側），膝関節（片側），皮膚（腰背部），乳腺（腹部），肉眼的異常部位

病病理組織学的検査は，常法に従って作製したパラフィン包埋，ヘマトキシリン・エオジン染色標本を対象に実施した。

4.7. 有意差検定¹⁾

各検査項目について、対照群と各被験物質投与群間の統計学的有意差の有無を危険率 5 および 1% レベルで解析した。

運動量、握力、体重、摂餌量、尿比重、尿量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目および臓器重量のデータについては、先ず Bartlett の等分散検定を行った。この検定によって全用量群における分散が均一であるという判定が出た場合には、一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett の多重比較法を実施して対照群と各投与群間における有意差の有無を判定した。Bartlett の等分散検定で各群の分散が等しくないという判定が出た場合は、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた。その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

尿検査項目（尿比重、尿量を除く）のデータについては、Kruskal-Wallis のノンパラメトリックな分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べ、その結果群間に有意差が認められた場合には、Dunnett 型の多重比較法を用いて対照群と各投与群間における平均順位の有義差の有無を判定した。

死亡率ならびに一般状態の観察所見、眼科学的検査所見、剖検所見および病理組織学的所見の発生頻度については、Fisher の直接確率計算法（片側検定）を用いて解析した。