

350×H200mm：日本ケージ株式会社)に個別収容し、毎日1回の飼育室内の清掃を実施した。固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社、ロット番号:060606、060706、060808) 及び御殿場市営水道水を給水瓶により自由に摂取させた。

#### 6.6 飼料及び飲料水中の混入物質

飼料中の混入物質に関しては使用全ロットについて財団法人日本食品分析センターで分析を行い、また、飲料水については東芝機械環境センター株式会社で水道法に準拠する水質検査を定期的に(年4回)行った。これらの分析成績書を入手し、試験成績に影響がないことを確認した後、写しを保存した。

#### 6.7 動物の識別及びケージへの表示

動物は入所時に耳標を装着して個体識別した。入荷から群分け前までの間は試験番号、性別及び耳標番号を明記したケージラベルをつけた。群分け後は、性別及び用量ごと(対照群、低、中及び高用量群の順)に4桁の番号をつけた。この場合、1000の位は群、100の位は性(0番を雄、1番を雌)、10と1の位は個体番号とした。各飼育ケージには、群分け前まで使用したケージラベルの裏に用量(群)ごとに色分けしたラベルをつけ、試験番号、投与経路、投与量、性、動物番号、耳標番号及び剖検予定日を明記した。ただし、詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量測定中は、観察者に対して投与の情報を制限するためケージラベルを裏返して試験番号、性別及び耳標番号のみを表示した。

#### 6.8 投与経路、投与期間、投与方法及び投与回数とそれらの選択理由

毒性試験法ガイドラインに準じ、投与経路は経口投与を選択し、投与期間は28日間とした。投与回数は反復投与試験で一般的に行われている1日1回(7回/週)とした。回復期間は障害の可逆性を検討するのに適当と考えられる2週間(14日間)とし、この間投与を行わなかった。投与容量は10 mL/kg体重とし、胃ゾンデを用いて強制経口投与した(08:04~11:46の間)。対照群の動物には媒体(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)を同様に投与した。個体ごとの投与液量は最新の体重に基づいて算出した。

#### 6.9 投与量及びその設定根拠並びに群構成

2,6-ジ-tert-ブチル-4-エチルフェノールの0(0.5w/v%メチルセルロース水溶液)、125、250、500及び1000 mg/kg/dayを1群雌雄各5匹のラットに14日間反復経口投与した結果<sup>1)</sup>、1000mg/kg投与群の雄4例、雌3例に死亡動物が認められた。また、250 mg/kg以上の投与群(中用量群)の器官重量において肝臓重量の高値が雌雄に、腎臓重量の高値が雄に認められた。したがって、本試験における投与量は、28日間の反復経口投与により明らかな毒性変化が発現すると考えられる250 mg/kgを高用量とし、以下公比約4で除して、60及び15 mg/kgの3用量を設定した。これに対照群を加え、計4群を設けた。主群では雌雄各6匹、回復群では対照群及び高用量群で雌雄各6匹とし

た。群構成表を次の表 1 に示す。

表 1. 群構成表

試験群	投与量 (mg/kg)	濃 度 (mg/mL)	投与容量 (mL/kg)	性	主 群		回 復 群	
					動物数	動物番号	動物数	動物番号
対照群	0	0	10	雄	6	1001~1006	6	1007~1012
				雌	6	1101~1106	6	1107~1112
低用量群	15	1.5	10	雄	6	2001~2006	-	—
				雌	6	2101~2106	-	—
中用量群	60	6	10	雄	6	3001~3006	-	—
				雌	6	3101~3106	-	—
高用量群	250	25	10	雄	6	4001~4006	6	4007~4012
				雌	6	4101~4106	6	4107~4112

## 6.10 観察及び検査の方法

それぞれ記載された時期に観察及び検査を実施した。試験日の起算に関しては下記の通りである。

- 投与開始日 : 投与第 1 日 (day 1 of administration)  
 投与 1 から投与 7 日 : 投与第 1 週 (week 1 of administration)  
 回復開始日 (投与期間終了の翌日)  
 : 回復第 1 日 (day 1 of recovery)  
 回復 1 から回復 7 日 : 回復第 1 週 (week 1 of recovery)

### 6.10.1 一般状態の観察

投与期間中は毎日 3 回、投与前と投与直後及び投与約 2 時間後 (ただし、土曜及び休日は投与前と投与直後の 2 回)、回復期間中は毎日 1 回、体外表、栄養状態、姿勢、行動及び排泄物などの一般状態を観察した。

### 6.10.2 詳細な一般状態の観察、機能検査、握力及び自発運動量の測定

詳細な一般状態の観察は全個体について、投与開始前に 1 回、投与期間中及び回復期間中は毎週 1 回観察した。また、機能検査、握力及び自発運動量の測定は全個体について、投与第 4 週 (雄を投与第 26 日、雌を投与第 27 日) 及び回復第 2 週 (回復第 13 日) に行った。なお、観察及び検査は投与の情報を制限し、動物をランダムに配置した状態 (ブラインド) で行った。

なお、投与開始前 (検疫・馴化期間中) の詳細な一般状態の観察において異常は認められなかった。

#### 6.10.2.1 詳細な一般状態の観察

- 1) ホームケージ内観察  
 姿勢、痙攣、異常行動

2) 手に持つての観察

ケージからの取り出しやすさ、被毛・皮膚の状態、眼・鼻の分泌物、眼球（眼球突出、眼瞼閉鎖状態）、可視粘膜、自律神経機能（流涙、立毛、瞳孔径、流涎、異常呼吸）、ハンドリングに対する反応

3) オープンフィールド内観察

覚醒状態、痙攣、異常行動、常同行動、歩行、姿勢、身繕い、立ち上がり回数、排泄物（排糞数、排尿）

6.10.2.2 機能検査

聴覚反応、接近反応、接触反応、痛覚反応、瞳孔反射、空中正向反射、着地開脚幅

6.10.2.3 握力測定

CPU ゲージ MODEL-9502A（アイコーエンジニアリング株式会社）を用いて前肢及び後肢の握力を測定した。

6.10.2.4 自発運動量の測定

実験動物用自発運動センサーNS-AS01（株式会社ニューロサイエンス）を用いて自発運動量を測定した。測定は1時間とし、10分間隔及び0~60分の測定値を集計した。

6.10.3 体重測定

全個体について、投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復1、3、7、10及び14日に測定した。測定は08:19~10:20の間に行った。更に、全投与期間中及び回復期間中の体重増加量を算出した。剖検日には相対器官重量算出のため、前日から約16時間絶食させた後の体重を測定した。

6.10.4 摂餌量測定

全個体について、投与期間中は投与1、4、7、10、14、17、21、24及び28日の投与前に、回復期間中は回復3、7、10及び14日に測定した。測定は08:33~10:44の間に行った。なお、投与期間中の投与1日は前日からの1日量、それ以降は3~4日間の累積量、回復期間中の回復3日は回復1日からの2日間の累積量、それ以降は3~4日間の累積量を測定し、1匹1日量に換算表示した。

## 6.10.5 尿検査

投与第4週及び回復第2週に行った。

投与第4週（投与第22及び23日）は検査当日の投与後に全個体について、回復第2週（回復第11日及び12日）は回復群の全個体について、それぞれ採尿器をセットしたケージに收容し、絶食・自由摂水下で4時間尿を、次いで自由摂食・自由摂水下でその後の20時間尿を採取し、表2に記載した項目及び方法により検査した。また、摂水量は、採尿ケージに收容した状態で前日からの1日摂取量を、給水瓶を用いて測定した。

表2.尿検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 4時間尿についての検査		2) 20時間尿についての検査	
検査項目	測定方法	検査項目	測定方法
pH	オーシヨンスティックス-7EA 試験紙 <sup>a)</sup> (アークレイ株式会社)	尿量 (20時間量) <sup>注)</sup>	メスシリンダーを用いた 容量測定 (単位: mL)
たん白質		浸透圧	氷点降下法 <sup>b)</sup> (単位: mOsm/kg)
ケトン体			
グルコース			
潜血			
ビリルビン			
ウロビリノーゲン			
色調	肉眼観察		
沈渣	鏡検法		
尿量 (4時間量) <sup>注)</sup>	目盛付スピッツ管を用いた 容量測定 (単位: mL)		
<b>使用測定機器</b>			
a) : AUTION MINI™ AM-4290 (アークレイ株式会社)			
b) : 自動浸透圧測定装置 オートアンドスタット OM-6030 (アークレイ株式会社)			
<b>備考</b>			
注) : 4時間の尿量と20時間の尿量を合計して24時間の尿量 (mL/24h) を算出した。			

## 6.10.6 血液学検査

投与期間及び回復期間終了の翌日の計画剖検時に、前日から一夜（約 16~20 時間）絶食させた全個体についてエーテル麻酔下に開腹し、腹大動脈から EDTA-2K 加採血瓶（SB-41：シスメックス株式会社）に血液を採取した。得られた血液について表 3-1) に記載した項目及び方法により検査した。また、3.8%クエン酸ナトリウム溶液加試験管（血液 9 容に対し 1 容の割合）に採取した試料を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 3-2) に記載した項目及び方法により検査した。

表 3.血液学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) EDTA-2K 加血液についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
赤血球数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
ヘモグロビン量	シアンメトヘモグロビン法 <sup>c)</sup>	g/dL
ヘマトクリット値	赤血球数及び平均赤血球容積から算出	%
平均赤血球容積	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	fL
平均赤血球血色素量	赤血球数及びヘモグロビン量から算出	pg
平均赤血球血色素濃度	ヘモグロビン量及びヘマトクリット値から算出	%
網赤血球率	Brecher 法	%
血小板数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>4</sup> /μL
白血球数	電気抵抗変化検出法 <sup>c)</sup>	10 <sup>2</sup> /μL
白血球百分率	May-Giemsa 染色による鏡検法	%
2) クエン酸ナトリウム加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単 位
プロトロンビン時間	クロット法 <sup>d)</sup>	s
活性化部分トロンボ プラスチン時間	クロット法 <sup>d)</sup>	s
フィブリノーゲン量	トロンボプラスチン法 <sup>d)</sup>	mg/dL
使用測定機器		
<sup>c)</sup> : コールター全自動 8 項目血球アナライザー T890 (ベックマン・コールター株式会社)		
<sup>d)</sup> : 血液凝固自動測定装置 ACL 100 (Instrumentation Laboratory)		

### 6.10.7 血液化学検査

血液学検査用試料と同時に採取した血液を凝固促進剤入り試験管（ベノジェクト II-オートセップ：テルモ株式会社）に取り、遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血清について表 4-1) に示す項目について検査した。また、ヘパリン加試験管（血液 1mL 当たり約 20 単位のヘパリン）に採取した血液を遠心分離（設定：約 3,000rpm、約 1,600×g、約 10 分間）し、得られた血漿について表 4-2) に示す項目について検査した。

表 4. 血液化学検査の項目、測定法及び使用機器など

1) 分離した血清についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AIP	Bessey-Lowry 法 <sup>e)</sup>	IU/L
総コレステロール	CEH-COD-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
トリグリセライド	LPL-GK-GPO-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
リン脂質	PLD-ChOD-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
総ビリルビン	ビリルビンオキシダーゼ法 <sup>e)</sup>	mg/dL
グルコース	グルコースデヒドロゲナーゼ法 <sup>e)</sup>	mg/dL
尿素窒素	Urease-LEDH 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
クレアチニン	Creatininase-creatinase-sarcosine oxidase-POD 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
ナトリウム	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
カリウム	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
塩素	イオン選択電極法 <sup>e)</sup>	mmol/L
カルシウム	OCPC 法 <sup>e)</sup>	mg/dL
無機リン	モリブデン酸法 <sup>e)</sup>	mg/dL
総たん白質	Biuret 法 <sup>e)</sup>	g/dL
アルブミン	BCG 法 <sup>e)</sup>	g/dL
A/G 比	総たん白質及びアルブミンから算出	
2) ヘパリン加血液から分離した血漿についての検査		
検査項目	測定方法	単位
AST (GOT)	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
ALT (GPT)	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
LDH	UV-rate 法 <sup>e)</sup>	IU/L
γ-GTP	γ-グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド法 <sup>e)</sup>	IU/L
使用測定機器		
<sup>e)</sup> ：臨床化学自動分析装置 TBA-120FR 形（株式会社東芝）		

### 6.10.8 病理学検査

#### 6.10.8.1 剖検

すべての計画剖検動物について、採血後腹大動脈切断により放血致死させ、体外表・頭部・胸部・腹部を含む全身の器官・組織の肉眼による詳細な病理解剖を行い、結果を記録した。

#### 6.10.8.2 器官重量測定

すべての計画剖検動物について、次に示す器官の重量（絶対重量）を測定するとともに、絶対重量と剖検時の体重から体重 100g 当たりの相対重量を算出した。なお、

\*印を付した両側性の器官については左右別々に測定し、その合計値で評価した。

脳、副腎\*、胸腺、脾臓、心臓、肝臓、腎臓\*、精巣\*、精巣上体\*、卵巢\*、子宮

### 6.10.8.3 病理組織学検査

すべての個体について次に示す器官・組織を採取し、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で固定した。ただし、肺はリン酸緩衝 10%ホルマリン液を注入後、眼球及び視神経はリン酸緩衝液で調製した 3%グルタルアルデヒド・2.5%ホルマリン液で固定後、精巣及び精巣上体はブアン液で固定した後、リン酸緩衝 10%ホルマリン液で保存し、パラフィン包埋した。その後、切片としてヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、対照群及び高用量群（肉眼的異常部位については全群）について鏡検した。なお、被験物質投与の影響が疑われた雌雄の肝臓及び甲状腺については低及び中用量群並びに回復群の全個体についても鏡検した。また、雌の肝臓及び甲状腺については写真撮影を行った。

なお、\*で示した両側性器官については両側を摘出したが、鏡検は片側のみ行った。

大脳、小脳、脊髄（胸部）、坐骨神経、眼球\*、下垂体、甲状腺\*、上皮小体\*、副腎\*、胸腺、脾臓、顎下リンパ節、腸間膜リンパ節、心臓、気管、肺（気管支を含む）、胃、十二指腸、空腸、回腸（パイエル板を含む）、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓\*、膀胱、精巣\*、精巣上体\*、前立腺、卵巢\*、子宮、胸骨（骨髄を含む）、大腿骨（骨髄を含む）及び大腿部骨格筋

他に、視神経、ハーダー腺、胸大動脈、舌、食道、顎下腺、舌下腺、膵臓、膈、精嚢、乳腺（鼠径部）、皮膚（鼠径部）、個体識別部位（耳介）及び喉頭を摘出して保存した。

## 6.11 統計解析

オープンフィールド内観察の定量的項目、機能検査の定量的項目、握力測定、自発運動量の測定、体重（体重増加量を含む）、摂餌量、摂水量、尿検査の定量的項目、血液学検査、血液化学検査及び器官重量データについて、対照群と各投与群との間で統計解析を行った。まず、Bartlett法により分散性の検定を行った（有意水準：両側 1%）。分散が等しい場合は Dunnett 法を用いて、非等分散の場合は Dunnett 型の mean rank test を用いて、対照群と各投与群との間で検定を行った（有意水準：両側 5 及び 1%）。なお、回復群については、F 検定により各群の分散の均一性の検定（有意水準：片側 5%）を行った。その結果、等分散性が認められた場合には対照群と被験物質投与群との平均値の差について Student の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を、等分散性が認められなかった場合には Aspin-Welch の t 検定（有意水準：両側 5 及び 1%）を行った。

また、詳細な一般状態の観察及び機能検査のスコア化したデータについては基本的に検査のグレードが 2 項目の時は  $\chi^2$  検定法、3 項以上は Mann-Whitney の U 検定等を用いて検定を実施した（有意水準 0.05 及び 0.01、両側）。<sup>2) 3)</sup>