

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ぺプチダーゼ (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 { [分画比率 (%) × 総蛋白 (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-マルティスティックス 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 × 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 × 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, 脾臓, 腎臓, 副腎, 膀胱, 精囊, 前立腺, 精巣上体, 卵巣, 卵管, 子宮, 膣, 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。

14. 試験結果

14.1. 死亡および一般状態 (Table 1, Appendix 1)

死亡動物が、雌の 500 mg/kg 群で Day 6 および 7 の投与前に各 1 例 (動物番号 2301, 2305) に認められた。死亡動物には、一般状態の変化として、軟便、粘液便、鼻周囲の汚れおよび被毛の汚れ (生殖器肛門周囲) が観察されていた。雄では死亡動物は認められなかった。

投与期間中の一般状態の変化として、雌雄の 500 mg/kg 群で、全例に軟便および粘液便の発現が認められ、少数例では水様下痢も認められた。さらに、流涎が 500 mg/kg 群の雄で全例、雌で多数例に認められた。その他、雌の 20 mg/kg 群で搔創 (頸部)、500 mg/kg 群で紅涙および被毛の汚れ (生殖器肛門周囲) が認められたが、単発的な発現であることから、被験物質投与と関連のない変化と考えられた。

回復期間中の一般状態の変化として、雌雄とも 500 mg/kg 群で Day 29 (回復期間開始日) に軟便あるいは粘液便が認められたが、Day 30 以降に一般状態の変化は認められなかった。

14.2. 体重 (Figure 1, 2, Table 2, Appendix 2)

雄では、500 mg/kg 群で Day 4 以降投与期間終了時まで、統計学的に有意な低値が認められ、Day 1 から 28 の体重増加量も有意な低値を示した。500 mg/kg 群では、回復期間 (Day 29 から 42) においても有意な低値を示した。しかし、回復期間中の体重増加量は有意な高値を示した。

雌では、500 mg/kg 群で Day 4 から 11 に有意な低値を示した。回復期間では、対照群と 500 mg/kg 群で差は認められず、回復期間の体重増加量にも対照群と差は認められなかった。

14.3. 摂餌量 (Figure 3, 4, Table 3, Appendix 3)

雄では、500 mg/kg 群で Day 1-8, Day 15-22 および Day 22-28 の平均 1 日摂餌量が有意な低値を示した。回復期間では、500 mg/kg 群で Day 29-36 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示した。また、20 mg/kg 群で Day 8-15 および Day 15-22 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示したが、体重に影響のない軽微な変化であり、被験物質投与に関連した変化ではないと考えた。

雌では、500 mg/kg 群で Day 1-8 の平均 1 日摂餌量が有意な低値を示した。回復期間では、500 mg/kg 群で Day 29-36 の平均 1 日摂餌量が有意な高値を示した。