

O,O'-ジエチルジチオリン酸のラットを用いる 反復経口投与毒性・生殖発生毒性併合試験

Combined Repeated Dose Reproductive/Developmental Toxicity Screening Test of O,O'-Diethyl dithiophosphate by Oral Administration in Rats

要約

既存化学物質の毒性学的性質を評価するため、O,O'-ジエチルジチオリン酸の0(溶媒の1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v% CMC-Na水溶液のみ投与)、30、100および300 mg/kg/dayをラットの交配前14日から交配期間、妊娠期間および哺育4日まで連続強制経口投与し、反復投与毒性および生殖発生毒性に及ぼす影響を検討した。また、投与終了の翌日から対照群および300 mg/kg群の雌雄各5例について14日間観察を継続し、休薬による毒性の回復性についても検討した。

1. 反復投与毒性

投与期間中に雌の300 mg/kg群で6例の死亡動物および2例の切迫解剖動物が認められた。これらの動物の剖検所見および組織所見より主な死因には、気道の急性炎症による窒息死と消化管障害に伴う栄養状態の悪化の二種類が考えられた。

被験物質投与に起因する一般状態の変化として、雌雄の30 mg/kg以上の投与群で流涎、雌雄の300 mg/kg群で軟便が観察された。

体重では、300 mg/kg群の雄では投与期間を通じて、雌では交配前投与期間に体重増加抑制が認められ、被験物質投与の影響が示唆された。

摂餌量では、雌雄ともに被験物質投与の影響は認められなかった。

機能観察総合検査では、詳細な症状観察で雌雄ともに100および300 mg/kg群で一般状態と同様に流涎を示す動物数の増加が認められた。また、雌の300 mg/kg群で移動量の軽度な減少を示す動物数の増加が認められ、同群の投与期間終了時および哺育4日の自発運動量が低値を示したことから、被験物質投与に起因すると考えられる自発運動の低下が認められた。運動感覚反応の観察および握力には被験物質投与との影響は認められなかった。

血液学検査では、雄の投与期間終了時において300 mg/kg群でヘモグロビン量および赤血球数が低値を示した。回復期間終了時では、300 mg/kg群で白血球数、好中球数が高値を示した。雌の哺育5日の検査では300 mg/kg群で血小板数が低値を示した。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でヘモグロビン量が高値を示したが、軽度な変化であり毒性学的意義は低いと考えられた。

血液凝固能検査では、雌雄のいずれの時期にも被験物

質投与に起因すると考えられる変化は認められなかった。

血液生化学検査において、雄の投与期間終了時および雌の哺育5日に300 mg/kg群で総蛋白が低値傾向を示し、雌の哺育5日の検査において全ての投与群でコリンエステラーゼが低値を示した。また、300 mg/kg群でカリウムが高値を示した。雌の回復期間終了時では、300 mg/kg群でアルカリホスファターゼが高値を示した。

尿検査では、雄の投与期間終了時に100および300 mg/kg群でケトン体陽性例が増加したが、軽度な変化であり被験物質投与との関連は明らかでなかった。

コリンエステラーゼ活性検査では、投与期間終了時に雄の300 mg/kg群および雌の100および300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が低値を示した。

病理学検査では、毒性所見としては100および300 mg/kg群で精巣障害が観察された。精子形成サイクルの観察で100 mg/kg群のプレレプトテン期精母細胞およびパキテン期精母細胞のセルトリ細胞当たりの比率が低値を示した。また、300 mg/kg群の組織像から精巣障害はセルトリ細胞障害に起因した変化であることが想定された。この変化は、300 mg/kg群の回復期間終了時においてより著明であることから遅延性あるいは進行性病変と考えられる。

器官重量では300 mg/kg群の精巣や精巣上体重量が低下し、雄の投与期間終了時に胸腺重量が100および300 mg/kg群で高値を示した。また、哺育5日の雌の300 mg/kg群で心臓および腎臓重量が高値を示した。

病理学検査で認められた精巣毒性および臨床検査の一部で回復性は確認できなかったが、その他の変化は回復していた。

2. 生殖発生毒性

平均性周期および交尾能に被験物質投与の影響は認められなかった。300 mg/kg群で妊娠不成立と判定された雄2例には病理組織学検査で精巣毒性が観察され、これらの変化が妊娠を成立させなかった原因であると推察された。分娩時観察では、分娩状態の異常はいずれの投与群でも認められなかった。新生児の外表検査および哺育4日の剖検では異常は認められなかった。300 mg/kg群で出生児の哺育4日の体重増加が抑制され、雌新生児の4日の生存率にも有意な低値が認められ、被験物質投与による出生児の発育阻害が示唆された。その他、妊娠期間、妊娠黄体数および着床数に被験物質投与の影響は認められず、出産児数、出生児数、性比および出産率に

も影響は認められなかった。

以上のことから、*O,O'*-ジエチルジチオリン酸の本試験条件下における無影響量 (NOEL) は雌雄ともに 30 mg/kg/day 未満と判断された。

生殖能に及ぼす影響は 100 および 300 mg/kg/day 投与で精巢毒性が認められたことから雄の無影響量は 30 mg/kg/day、雌は 300 mg/kg/day 投与でも影響は認められず 300 mg/kg/day と判断された。児動物の発生・発育に及ぼす影響は 300 mg/kg/day 投与で雌の生後 4 日生存率の有意な低値および哺育 4 日の体重増加抑制が認められ、無影響量は 100 mg/kg/day と判断された。

方法

1. 被験物質

O,O'-ジエチルジチオリン酸 (和光純薬工業製造, Lot No. ASK5069, 含量 98.9 wt%, 分子量 186.24) は暗青色の液体であり、使用時まで被験物質保管庫 (冷暗所) に保存した。残余被験物質を製造元で再分析することにより、本ロットが投与期間中安定であったことを確認した。被験物質は 1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v% カルボキシメチルセルロースナトリウム (CMC-Na) 水溶液 (CMC-Na: 和光純薬工業, 注射用水: 光製薬, Tween 80: ナカライテスク) に懸濁し、6, 20 および 60 mg/mL の投与液を調製した。投与液は投与まで冷暗所に保存し、調製後 7 日以内に使用した。被験物質の 1.0 vol% Tween 80 を含む 0.5 w/v% CMC-Na 水溶液での安定性は、1 および 200 mg/mL の濃度について 7 日間冷蔵保存後室温放置 24 時間は安定であることを確認した。

投与液の濃度/均一性分析は、初回および最終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、基準範囲内 (設定濃度の $\pm 15\%$ 以内、変動係数 10 % 以下) であった。

2. 使用動物および飼育条件

試験には、日本チャールス・リバーから購入した生後 8 週齢の Sprague-Dawley (Crj:CD(SD)IGS, SPF) 系雄ラット 48 匹および雌ラット 58 匹を使用した。購入した動物は 7 日間検疫・馴化飼育した後、8 日間の予備飼育をし、体重推移および一般状態に異常が認められなかったものを 10 週齢で群分けして試験に用いた。群分け時の体重は、雄で 317~385 g、雌で 208~247 g の範囲であった。

動物は、温度 $24 \pm 3^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 20\%$ 、換気回数 15 回/時間、照度 150~300 lux、照明時間 12 時間 (午前 7 時点灯、午後 7 時消灯) に管理されたバリアシステムの飼育室でアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに 1 匹ずつ収容し飼育した。妊娠 18 日以降の母動物は哺育 4 日までアルミ製前面・床ステンレス網目飼育ケージに哺育トレイおよび巣作り材料 (サンフレック, 日本チャールス・リバー製造) を入れて飼育した。

飼料は、オリエンタル酵母製造の CRF-1 固型飼料 (放

射線滅菌飼料) を使用し、飼育期間中自由に摂取させた。飲水は、水道水を自由に摂取させた。

3. 群分け

動物は投与開始日の体重をもとに層別化し、無作為抽出法により雄は 1 群当たり各 12 匹、雌は対照群および高用量群に各 17 匹、低および中用量群に各 12 匹を振り分けた。雌雄ともに毒性試験群として 1 群当たり 12 匹を配し、雄は投与終了後、対照群と高用量群の各 5 匹を選抜して回復性試験群に用いた。雌は毒性試験群の動物とは別に回復性試験群として対照群と高用量群に各 5 匹を配した。なお、雌は群分け前に 8 日間の性周期観察を行い、正常な性周期を有する動物を群分けに用いた。

4. 投与量、群構成、投与期間および投与方法

MSDS に記載されている本被験物質のラットにおける急性経口毒性の結果 (LD_{50} : 4510 mg/kg) を参考にして、0, 30, 100, 300 および 1000 mg/kg の用量で 2 週間投与予備試験を実施した。その結果、1000 mg/kg 群では雄の 5/5 例および雌の 2/5 例が死亡した (雄の切迫解剖 1 例含む)。また、一般状態の変化として、雌雄に流涎、被毛の汚れ、耳介および四肢の蒼白、体温低下、散瞳、眼瞼下垂、眼球貧血および自発運動低下が観察された。雌雄ともに体重の増加抑制および摂餌量の低下が認められた。血液学検査では、雌の生存例で赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値、平均赤血球血色素量、平均赤血球血色素濃度およびリンパ球比率が低値を、血小板数および好中球比率が高値を示した。また、網赤血球率が高値傾向を示した。血液生化学検査では、雌の生存例で総コレステロール、総ビリルビン、アラニンアミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、カルシウム、無機リンおよびカリウムが高値または高値傾向を示し、総蛋白、アルブミン、A/G、アルカリフォスファターゼおよび塩素が低値を示した。器官重量では、雌の生存例で肝臓重量の高値および胸腺重量の低値が認められた。病理学検査では、被験物質投与の影響が疑われる所見として雌の生存例に消瘦、腺胃の潰瘍あるいは白色斑/区域および前胃の肥厚が観察された。300 mg/kg 群では、一般状態の変化として、雌雄に流涎が観察された。雄に体重の増加抑制が認められた。血液学検査では、赤血球数、ヘモグロビン量およびヘマトクリット値が雄で低値傾向を、雌で低値を示した。また、網赤血球率が雄で高値を、雌で高値傾向を示した。血液生化学検査では、雌雄の総コレステロールが高値を示し、総蛋白が低値を示した。また、雄のアルブミンおよび尿素窒素の低値、雌の総ビリルビンが高値を示した。したがって、本試験では明らかな毒性徴候が現れることが予想され、長期の投与期間でも死亡動物が多発しないと考えられる 300 mg/kg/day を高用量とし、以下公比約 3 で除し、100 および 30 mg/kg/day を中および低用量に設定した。

投与量は、体重 100 g 当たり 0.5 mL とし、交配前および交配期間ならびに交配期間終了後の投与期間の雌雄

では、個体別に測定した最新体重に基づいて算出した。また、妊娠期間および哺育期間中の雌は、妊娠0, 7, 14, 20および哺育0日に測定した個体別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回強制経口投与した。対照群には1.0 vol% Tween 80を含む0.5 w/v% CMC-Na水溶液のみを投与した。

投与期間は、雄は交配前14日間と交配期間14日間および交配期間終了後14日間の連続42日間とした。雌は交配前14日間と交配期間中(最長4日間)および交尾した雌は妊娠期間を通じて分娩後の哺育4日まで(42~46日間)とした。また、交尾後分娩しない雌は妊娠25日の解剖前日まで(40日間)とした。雌の回復性試験用動物は雄と同じ連続42日間とした。

5. 観察および検査

1) 一般状態

雌雄とも、全例について試験期間中毎日2回以上(回復期間中および剖検日は1回)行い、異常および死亡の有無を記録した。

2) 体重

雄は投与1(投与開始日), 8, 15, 22, 29, 36, 42および43日(剖検日あるいは回復1日)に測定し、投与1から42日までの体重増加量を算出した。回復試験群の雄は、投与終了後回復1, 8, 14および15日(剖検日)に測定し、回復1から14日までの体重増加量を算出した。

雌は投与1(投与開始日), 8および15日に測定し、投与1から15日までの体重増加量を算出した。また、交尾後の雌は、妊娠0, 7, 14および20日に、分娩した雌は分娩後0, 4および5日(剖検日)に測定し、それぞれ妊娠0から20日および分娩後0から4日までの体重増加量を算出した。回復試験群の雌は、回復試験群の雄と同日に測定し、投与1から42日および回復1から14日までの体重増加量を算出した。

3) 摂餌量

雄は投与1(投与開始日), 8, 15, 22, 29, 36および42日(剖検前日)に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日および投与22から42日までの累積摂餌量を算出した。回復試験群の雄は、投与終了後回復1, 8および14日(剖検前日)に測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに回復1から14日までの累積摂餌量を算出した。

雌は投与1(投与開始日), 8および15日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から15日までの累積摂餌量を算出した。また、交尾した雌は妊娠0, 7, 14および20日に、分娩した雌は分娩後0および4日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに妊娠0から20日までの累積摂餌量を算出した。回復試験群の雌は、回復試験群の雄と同日に餌重量を測定し、測定日から次の測定日

までの摂餌量を求め平均1日摂餌量を算出するとともに投与1から42日および回復1から14日までの累積摂餌量を算出した。なお、交配期間中の同居動物は摂餌量を測定しなかった。

4) 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行った。検査は、投与期間中は投与30分後から開始した。以下の機能観察総合検査の内、詳細な症状観察は群分け前に1回、投与開始後は週1回行った(回復期間を含む)。ただし、交尾した雌は妊娠7および14日、分娩した雌は哺育4日に行った。種々の刺激に対する運動感覚反応の観察、握力測定および自発運動量測定は、雄は各群5例(対照群および高用量群は回復試験群の5例、低および中用量群は動物番号の若い順に5例)について投与42日および回復14日に行った。雌は動物番号の若い順に各群5例について分娩後4日に行った。回復試験群の雌は投与42日および回復14日に行った。群分け前の詳細な症状観察は、仮動物番号の若い順に実施した。投与期間中の検査は、群により検査の時間帯が偏らないよう配慮して行った。

a) 詳細な症状観察

詳細な症状観察では、ケージ内の姿勢について観察し、身悶え、旋回、咬み行動、痙攣および異常発声の有無を確認し、記録した。また、ケージ外へ動物を取り出し、出し易さ、扱い易さ、異常発声、筋緊張、立毛、被毛の状態、眼瞼状態、咬傷、流涙、流涎、呼吸、眼球、可視粘膜、尿失禁およびカタレプシーについて観察し、記録した。さらにオープンフィールド装置の中央で30 cmの高さからの空中正向反射を観察し、動物が着地した時点から3分間オープンフィールド内での動物の呼吸、協調運動、痙攣、毛繕い、歩行、歩行異常、眼瞼状態、常同行動、異常行動、異常発声、覚醒度および移動量について観察し、立ち上がり回数、脱糞回数および排尿回数を数え、記録した。

b) 種々の刺激に対する運動感覚反応の観察

瞳孔反射、接近反応、触覚反応、聴覚反応および痛覚反応を検査し、記録した。

c) 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。

d) 自発運動量測定

CAS(東洋産業)を用いて個別に測定した。上記a)からc)項の検査終了後(投与後約40分)に測定を開始した。データの収集間隔は1分毎とし、集計時間は10分毎の1時間とした。測定環境は、照明を点灯状態、測定室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)でおよそ70 dBに保ち、普通騒音計NA20(RION)を用いて測定し、記録した。

5) 交配

交配は交配前14日間の性周期観察を行った雌と同群内の雄を1対1で最長4日毎晩同居させた。交尾の確認

は、同居させた翌朝、陰栓または陰垢中の精子確認により行い、交尾が確認された雌はその日を妊娠0日とした。雌が死亡したために交配の組み合わせができなかった雄については、交配させることなく、そのまま投与を続け、他の雄と同様に扱った。性周期観察は交尾確認日まで行い、発情期から次の発情期までの間の日数を性周期日数として平均性周期を算出した。また、性周期観察期間中の異常性周期(4または5日以外の性周期)発現率[(異常性周期を示す雌動物数/観察雌動物数)×100]を算出した。交配結果から各群について交尾率[(交尾動物数/同居動物数)×100]を算出した。なお、回復試験群の雌は、性周期観察および交配を実施しなかった。

6) 自然分娩時および新生児の観察

妊娠動物は全て自然分娩させた。自然分娩時に分娩状態の観察を行った。分娩の確認を妊娠20から25日の午前8時30分～10時の間に行い、この時間帯に分娩が完了していることを確認した動物および分娩を開始した動物は分娩完了まで待ち、その日を哺育0日とした。午前10時を過ぎて分娩を開始した場合は翌日を哺育0日とした。また、妊娠期間(哺育0日の年月日から妊娠0日の年月日を減じた日数)、受胎率[(受胎動物数/交尾動物数)×100]、出産率[(生児出産雌数/妊娠雌数)×100]、着床率[(着床痕数/妊娠黄体数)×100]、分娩率[(総出産児数/着床痕数)×100]、出生率[(出産生児数/総出産児数)×100]を算出した。妊娠25日の午前9時までに分娩のみられない動物は病理解剖し、着床痕の認められない場合、妊娠不成立と判定した。哺育5日に母動物は病理解剖し、黄体数および着床痕数を調べ肉眼的に異常の有無を調べた。

新生児については哺育0日に出産児数(生存児+死亡児)を調べ、性別を判定し、性比(雄/雌)を算出するとともに、外表異常の有無を調べた。また、哺育0および4日に雌雄個体別の体重を測定し、1腹の雌雄別平均体重を算出した。哺育4日の体重測定後、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。哺育期間中の死亡児はブアン液に固定し、器官・組織の肉眼観察を実施した。また、新生児の4日の生存率[(哺育4日生児数/出産生児数)×100]を算出した。

7) 臨床検査

血液学検査、血液凝固能検査および血液生化学検査は雄および自然分娩した雌の剖検時(雄:投与43日、雌:哺育5日)に各群の動物番号の若い順に5例、雌雄の回復試験群の剖検時(回復15日)に全例について実施した。採血するに当たり、動物を約16時間絶食させた。

動物をエーテルで麻酔後開腹し、腹部大動脈から採血した。

a) 血液学検査

抗凝固剤(EDTA-2 K)入り採血管インセバック-E(積水化学工業)に新鮮血を採取し、総合血液学検査装置ADVIA120(バイエル)を用いて白血球数(WBC:フローサイトメトリー)、赤血球数(RBC:暗視野板法)、ヘモ

グロビン量(HGB:シアンメトヘモグロビン法)、ヘマトクリット値(HCT:RBC, MCVより算出)、平均赤血球容積(MCV:暗視野板法)、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)、血小板数(PLT:暗視野板法)、白血球百分率(フローサイトメトリー)および網赤血球率(Reticulocyte:RNA染色法)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・ギムザ染色して保存した。

b) 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、3000 r.p.m.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(ロシュ)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。

c) 血液生化学検査

採血管インセバックSQ(積水化学工業)に血液を採取した後、3000 r.p.m.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)、アルブミン(Albumin:BCG法)、A/G(計算値)、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:パナジン酸酸化法)、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)、コリンエステラーゼ(ChE:ヨウ化ブチリルチオコリン基質法)、γ-グルタミルトランスベプチダーゼ(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)および総胆汁酸(T. bile acid:酵素サイクリング法)を、電解質測定装置EA06R(エイアンドティー)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。

d) 尿検査

投与期間終了週に、各群それぞれ5例の雄動物について検査を行った。

給餌・給水の条件下で採尿ケージを用いて3時間尿(午前10時から午後1時まで)および24時間尿(午前10時から翌日午前10時まで)を採取した。

3時間尿を用いてpH、潜血、糖、蛋白、ケトン体、ビリルビンおよびウロビリノーゲンを検査した。検査にはN-マルティスティックスSG(バイエルメディカル)を用い、判定は尿分析装置CLINITEK500(バイエル)で行った。

24時間尿を用いて尿量(計量)および色調(目視)を検査した後、尿を室温、1500 r.p.m.で5分間遠心し、上清および残渣に分離した。上清を用いて上述の電解質測定装置EA06Rでナトリウム、カリウムおよび塩素を測定した。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。また、Auto&stat OM-6030(アークレイファクトリー)で尿浸透圧(氷点降下法)を測定した。

e) コリンエステラーゼ活性検査

臨床検査を実施する動物全例の脳のコリンエステラーゼ(ChE)活性を測定した。解剖時に脳重量を測定した後、脳の左半分を採取して重量を測定し記録した。重量測定後、脳の左半分は約-80℃で保存し、コリンエステラーゼ活性を測定した。測定は、テクニコンAA II(テクニコン)を用いてヨウ化アセチルチオコリンを基質とするDTNB法で行った。

8) 病理学検査

a) 剖検および器官重量

解剖では動物の外観、口腔、鼻孔および頭蓋腔、骨格、脳および脊髄の外観と切断面、胸腔、腹腔および骨盤腔とその内臓、頸部の組織および器官を検査した。生殖器官については、特に注意を払い検査した。全ての肉眼的異常について、部位、大きさ、硬さなどを記録した。また、解剖した全ての動物について皮膚、乳腺、リンパ節(腸間膜、下顎)、唾液腺(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:左側注入固定)、心臓、甲状腺、上皮小体、舌、食道、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、脾臓、膵臓、腎臓、副腎、膀胱、精囊、前立腺、卵巣、子宮、陰、眼球(視神経を含む)、ハーダー腺、脳(大脳、小脳、橋を含む:コリンエステラーゼ活性測定動物は右半分のみ固定)、下垂体、脊髄(頸部、胸部、腰部)、坐骨神経および肉眼で異常病変が認められた器官・組織を10 vol%中性緩衝ホルマリン液に、精巣および精巣上体をブアン液で前固定した後、10 vol%中性緩衝ホルマリン液に固定した。

重量を測定した器官については、器官重量/体重比(相対重量)を剖検日の体重および器官重量から算出した[(器官重量/剖検日の体重)×100]。なお、コリンエステラーゼ活性検査のため、脳の重量測定を最初に実施した。

① 死亡動物(300 mg/kg群の雌6例)および瀕死動物(300 mg/kg群の雌2例)

死亡動物は発見後解剖まで冷蔵庫に保存し、人工的变化を防止するため、凍結しないようにした。瀕死動物はエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ解剖した。交尾確認後に死亡した300 mg/kg群の雌4例の内、子宮内を調べ着床が認められなかった2例については妊娠不成立と判定した。なお、妊娠1日に相当する日に死亡した1例は妊娠判定が不可能であったため、この動物の妊娠期間のデータは集計に含めなかった。

② 雄動物

42日間投与した翌日にエーテル麻酔下で採血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

③ 自然分娩した雌

哺育4日まで投与した翌日にエーテル麻酔下で採血安楽死させた。器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定した。なお、剖検時に黄体数および着床痕数を調べた。

④ 自然分娩の認められない雌(30 mg/kg群の1例)

妊娠25日に相当する日に、エーテル麻酔下で放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った。子宮内を調べ、着床痕が認められなかったため妊娠不成立と判定した。

⑤ 回復試験群の雄

回復14日の翌日にエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣および精巣上体重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

⑥ 回復試験群の雌

回復14日の翌日にエーテル麻酔下で採血後、放血安楽死させ、器官・組織の肉眼観察を行った後、脳、胸腺、唾液腺、甲状腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎および卵巣重量を測定した。甲状腺は固定後測定した。

b) 病理組織学検査

下記に該当する動物について病理組織学検査を実施した。

組織は常法に従ってパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。鏡検では病変の種類、程度について記録した。

なお、精巣についてはPAS・ヘマトキシリン染色およびヘマトキシリン・エオジン染色した後、ヘマトキシリン・エオジン染色標本で一般的病変を検査し、②、④および⑤についてはPAS・ヘマトキシリン染色標本で精子形成サイクル(VIIまたはVIII)を検査した¹⁾。

① 死亡動物(300 mg/kg群の雌6例)および瀕死動物(300 mg/kg群の雌2例)

全固定器官について実施した。

② 妊娠を成立させた雄

対照群と高用量群の各5例の全固定器官、および全群の剖検時に認められたそれ以外の異常病変部組織について実施した。

③ 自然分娩した雌

対照群と高用量群の各5例の全固定器官、および全群の剖検時に認められたそれ以外の異常病変部組織について実施した。

④ 妊娠を成立させなかった雄および妊娠不成立の雌

雄は唾液腺、精巣、精巣上体、精囊および前立腺、および異常病変部組織、雌は唾液腺、陰、子宮および卵巣について実施した。