

⑤ 回復試験群の雌雄

全固定器官について実施した。

また、②については高用量群の胃、精巣および精巣上体に被験物質投与の影響が疑われたため、これらの器官については低および中用量群も各5例ずつ検査を実施した。③については高用量群の胃に被験物質投与の影響が疑われたため、低および中用量群も胃を各5例ずつ検査を実施した。

6. 統計解析

体重、体重増加量、摂餌量、累積摂餌量、平均性周期、黄体数、着床痕数、妊娠期間、出産児数、死産児数、性比、着床率、出生率、分娩率、外表異常発現率、新生児の4日の生存率、FOB検査値(握力、自発運動量、立ち上がり回数、脱糞回数、排尿回数)、血液学検査値、血液凝固能検査値、血液生化学検査値、コリンエステラーゼ活性検査値、尿検査値(尿量および尿浸透圧)、器官重量および相対重量については自動判別方式に従い、最初にBartlettの等分散検定²⁾を実施した。等分散の場合はDunnettの多重比較検定³⁾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⁴⁾で対照群と各投与群間の有意差を検定した。

出産率、交尾率および受胎率については χ^2 検定を用いた。

異常性周期発現率、立ち上がり、脱糞および排尿を除く詳細な症状観察ならびに種々の刺激に対する運動感覚反応の観察の各項目、剖検所見および病理組織所見の発生率についてはFisherの直接確率検定法⁵⁾で検定した。病理組織所見のうち程度の増強が認められた所見は-(マイナス)を「1」、+1を「2」、+2を「3」、+3を「4」に割り当ててMann-WhitneyのU検定を実施した。精子形成サイクルのセルトリ細胞当たりの各ステージの細胞比率についても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。ただし、供試動物数が1群につき2例以下の場合、有意差検定は行わなかった。

なお、哺育期間中の出生児に関する成績は1母体当たりの平均を1標本として集計した。

結果

1. 反復投与毒性

1) 死亡および一般状態

投与期間中に雌の300 mg/kg群で6例が死亡し、2例が瀕死状態になったため切迫解剖した。これら動物の死亡は、投与5、12および20日に各1例、妊娠1および12日に各1例、哺育0日に1例認められた。また、切迫解剖動物は、妊娠13日に2例認められた。雄には死亡例は観察されなかった。

一般状態の変化として、雄では投与後30～60分に流

涎が30、100および300 mg/kg群でそれぞれ2、10および9例に観察された。また、軟便が30および300 mg/kg群でそれぞれ1および3例に観察された。その他、外傷が対照群の1例、眼分泌物が対照群および300 mg/kg群で各1例に観察された。300 mg/kg群の回復試験群においても投与期間中に流涎および軟便が観察されたが、回復期間中には一般状態の変化は認められなかった。

雌では投与期間を通じて投与後30～60分に流涎が30、100および300 mg/kg群でそれぞれ2、8および7例に観察された。死亡例の内3例は死亡前に著明な一般状態の変化は観察されなかったが、他の死亡例および切迫解剖例には削瘦、立毛、被毛の汚れ、蒼白、眼瞼下垂、体温低下、腹部膨満、軟便、水様便、異常呼吸音、呼吸促迫、および呼吸困難等の全身状態の悪化を示す症状が認められた。異常呼吸音は、生存例の3例(回復試験群の1例を含む)にも単発性に認められた。その他、眼分泌物が対照群で1例、軟便が30 mg/kg群で1例、流涎および歯異常が100 mg/kg群で各1例に観察された。300 mg/kg群の回復試験群においても投与期間中に流涎、異常呼吸音、体温低下および呼吸困難が観察されたが、回復期間中には一般状態の変化は認められなかった。

2) 体重(Fig. 1-4)

雄では、対照群に比べ300 mg/kg群で投与15日以降投与期間終了時まで低値傾向が認められ、投与1から42日の体重増加量も低値傾向を示した。300 mg/kg群の回復試験群においても投与期間中の体重増加量は低値傾向を示し、回復期間でも対照群に比べ体重が低値で推移したが、体重増加量には差は認められなかった。

雌では、対照群に比べ300 mg/kg群で投与8および15日に低値傾向が認められ、投与1から15日の体重増加量も統計学的に有意な低値を示した。妊娠期間および哺育期間では対照群と被験物質投与各群との間に統計学的に有意な差は認められなかった。300 mg/kg群の回復試験群においても投与期間中の体重増加量は低値傾向を示し、回復期間でも対照群に比べ体重が低値で推移したが、体重増加量には差は認められなかった。

3) 摂餌量(Fig. 5-8)

雌雄ともに、投与期間および回復期間を通じて対照群と被験物質投与各群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

4) 機能観察総合検査(FOB)

a) 詳細な症状観察および種々の刺激に対する運動感覚反応の観察

詳細な症状観察において、被験物質投与の影響と考えられる変化として、雄では、ケージ外観察において投与期間の後半に流涎なしの動物数が100および300 mg/kg群で有意に減少し、逆に軽度の流涎を示す動物数が有意に増加した。その他、有意な発生数の増減を示した所見が認められたが、用量に関連しない、一貫した変化ではない、あるいは対照群の値が偶発的に高かったことに起

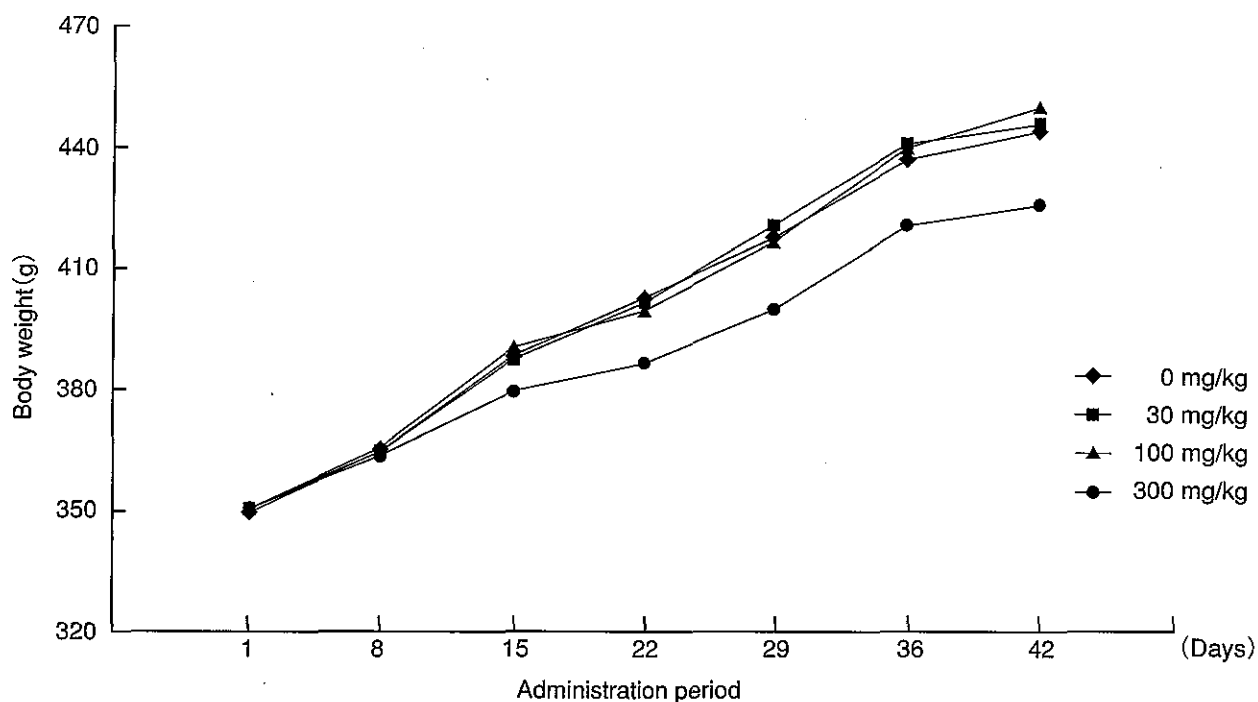


Fig. 1 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (ReproTox study)

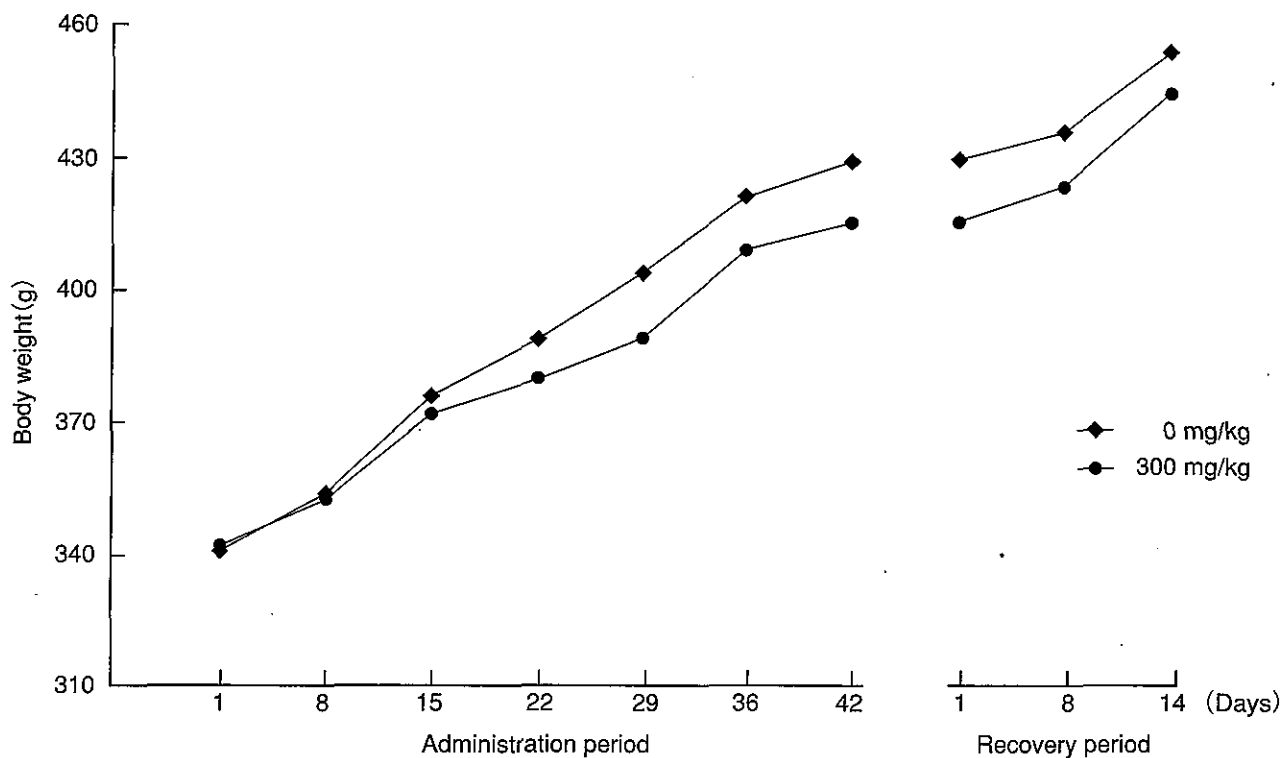


Fig. 2 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

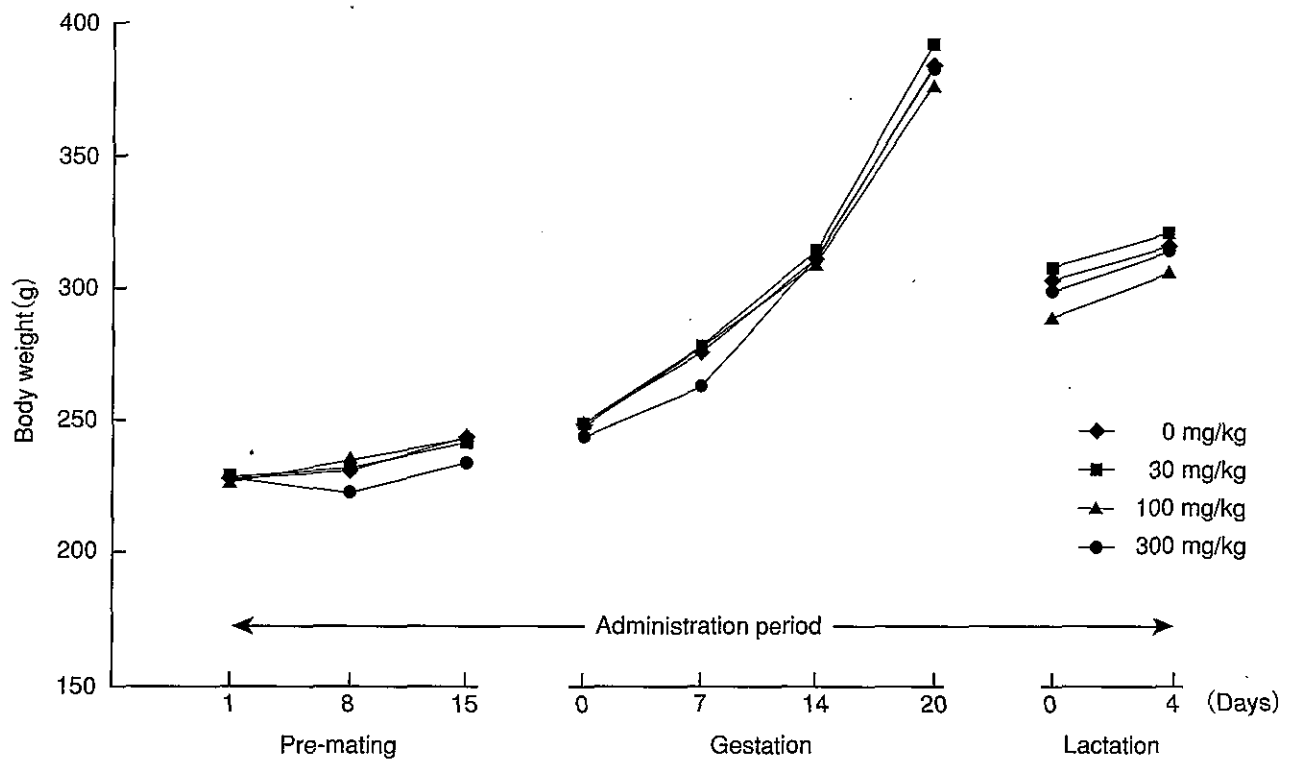


Fig. 3 Body weight change of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (ReproTox study)

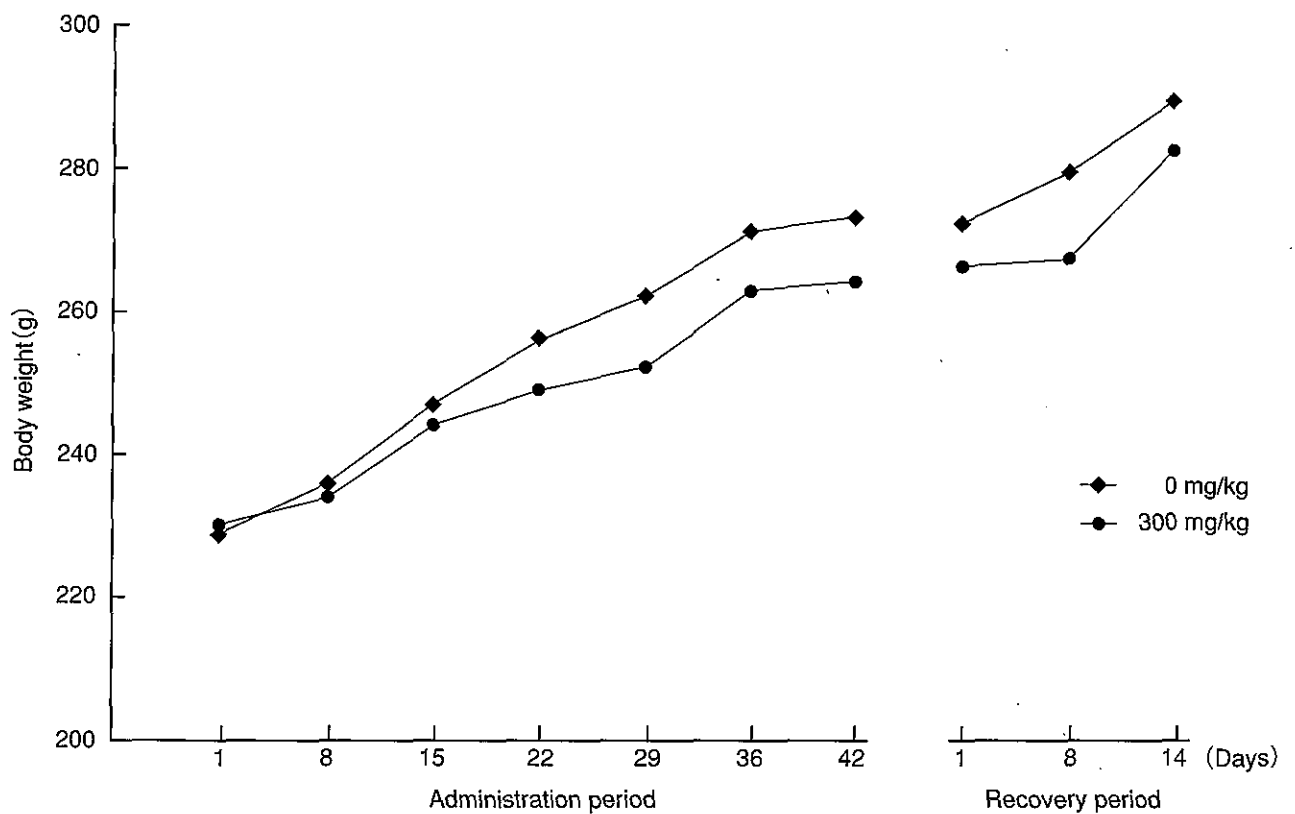


Fig. 4 Body weight change of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

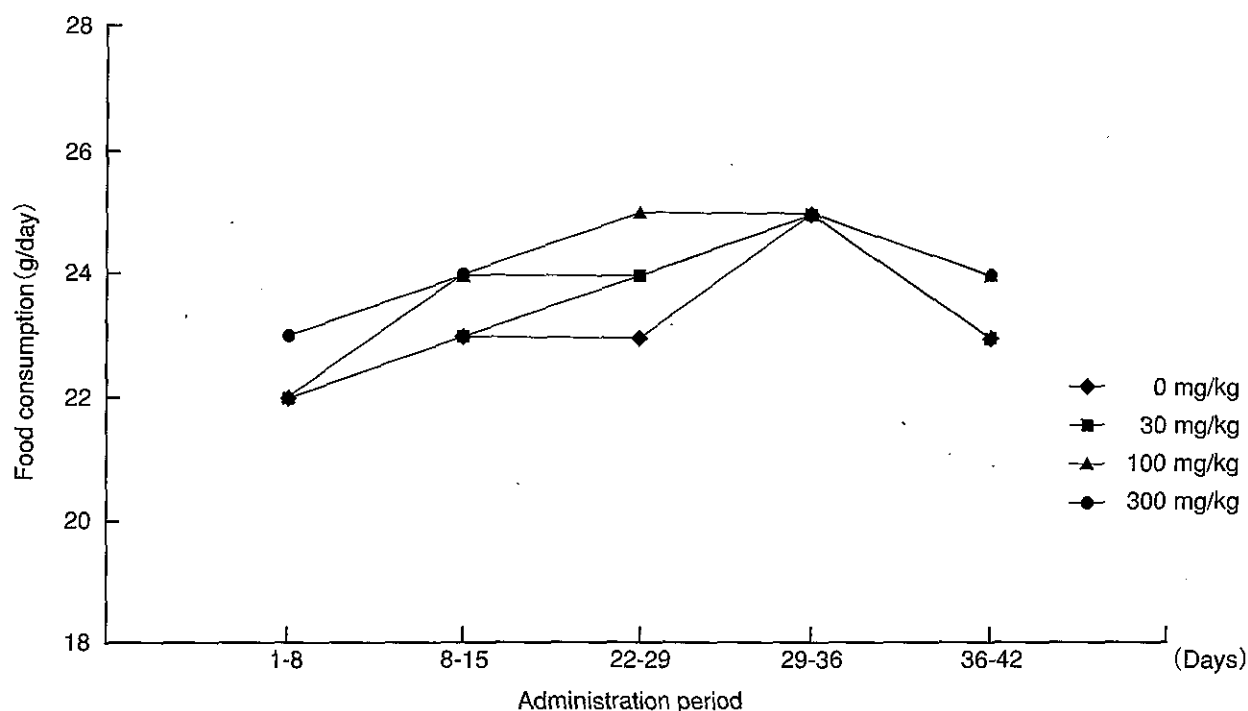


Fig. 5 Food consumption of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (ReproTox study)

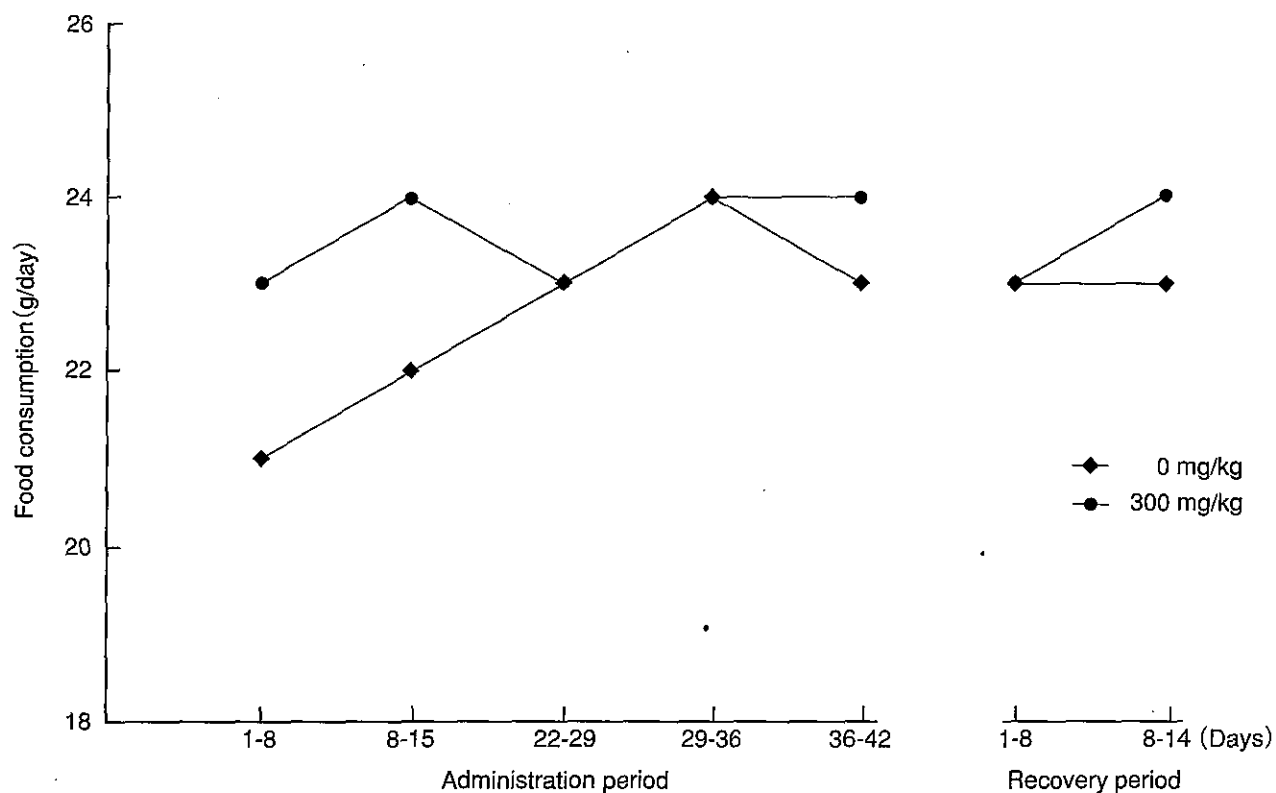


Fig. 6 Food consumption of male rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

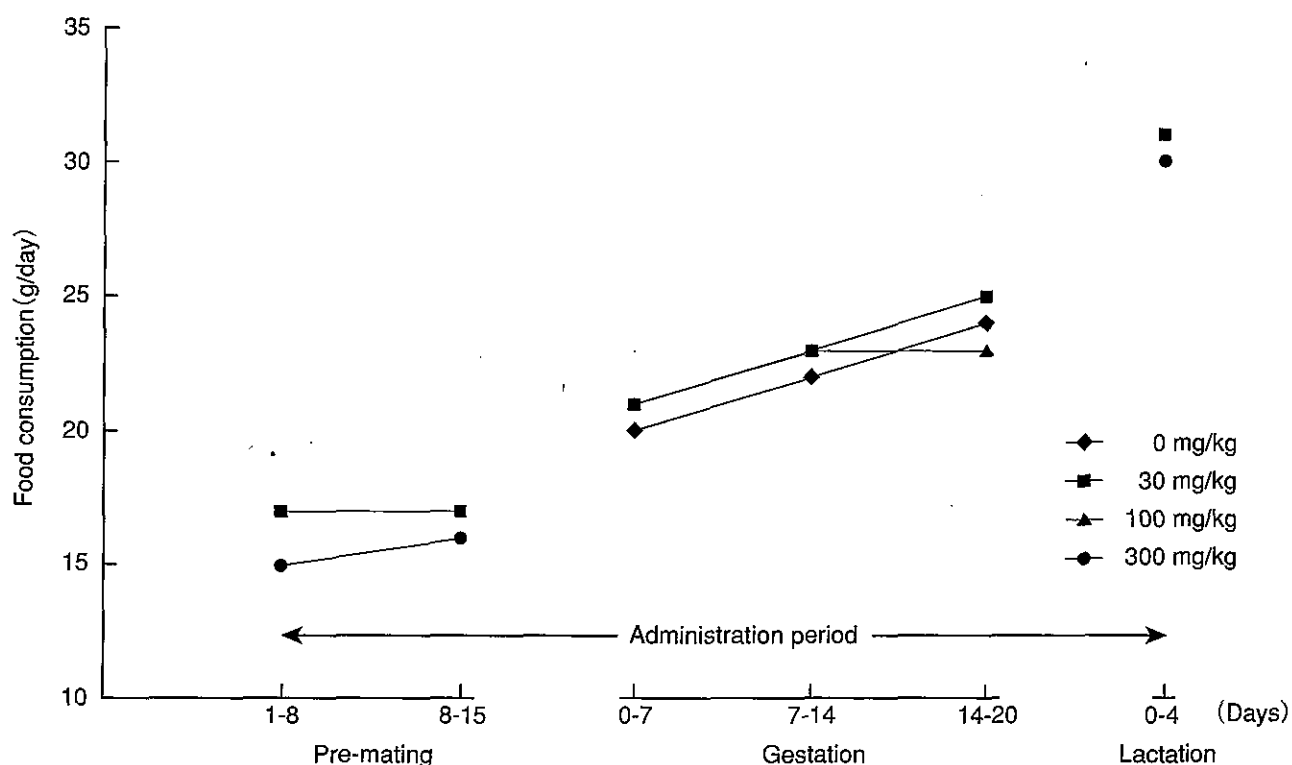


Fig. 7 Food consumption of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (ReproTox study)

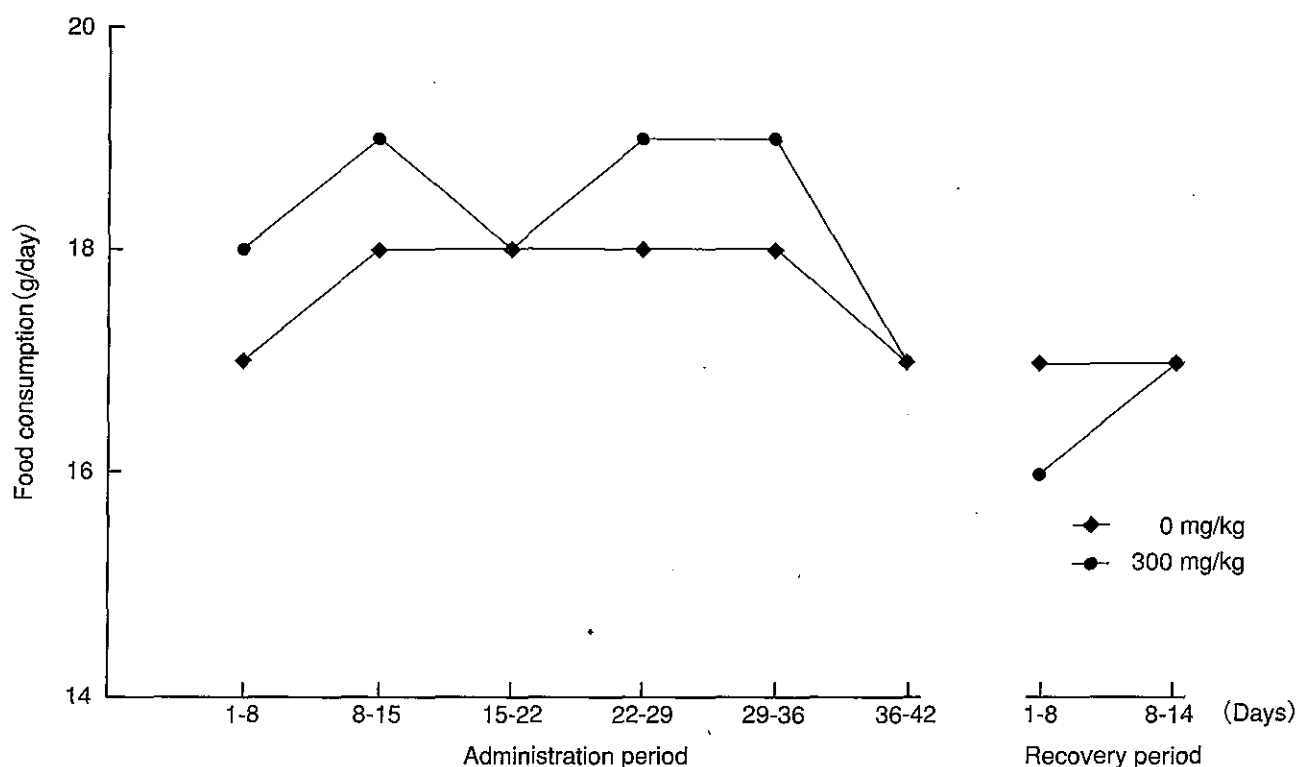


Fig. 8 Food consumption of female rats treated orally with *O,O'*-diethyl dithiophosphate in the combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test (Recovery study)

因した変化であった。回復期間では、上記軽度の流涎を示す動物は認められなかった。

雌では、ケージ外観察において妊娠7日に軽度の流涎を示す動物数が100 mg/kg群で有意に増加した。また、オープンフィールド内の観察において300 mg/kg群で投与10日に移動量の軽度な減少を示す動物数が有意に増加した。その他、有意な発生数の増減を示した所見が認められたが、用量に関連しない、あるいは毒性学的に意義のない変化であった。回復試験群では、被験物質投与群に関係すると考えられる変化は認められなかった。

種々の刺激に対する運動感覚反応の観察では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる反応の変化は認められなかった。

b) 握力(前後肢)

雄の投与期間終了時および回復期間終了時、雌の投与期間終了時および回復期間終了時ならびに哺育4日のいずれにおいても対照群と被験物質投与各群との間で前肢および後肢の握力に差はみられなかった。

c) 自発運動量

雄では、回復期間終了時の300 mg/kg群で測定開始後20～30分の自発運動量が対照群に比較して有意な高値を示したが、一過性の変化であり、投与期間終了時の同群には変化が認められなかった。

雌では300 mg/kg群で哺育4日の測定開始後10～20分および測定1時間の総計の自発運動量がそれぞれ有意な低値を示し、投与期間終了時の測定開始後0～10分および10～20分の自発運動量がそれぞれ有意な低値を示した。回復期間終了時の同群には変化は認められなかった。

5) 血液学検査(Table 1)

雄の血液学検査では、投与期間終了時に対照群に比べ300 mg/kg群でヘモグロビン量および赤血球数が統計学的に有意な低値を示した。また、30 mg/kg群で好中球比率が有意な低値、リンパ球比率が有意な高値を示したが、用量に対応しない変化であった。回復期間終了時では、300 mg/kg群で白血球数、好中球数が有意な高値を示した。また、同群で好酸球数が有意な高値を示したが、軽微な変化であった。

雌の血液学検査では、哺育5日に対照群に比べ300 mg/kg群で血小板数が有意な低値を示した。回復期間終了時では、300 mg/kg群でヘモグロビン量が有意な高値を示した。

血液凝固能検査では、雌雄ともに投与期間終了時および回復期間終了時でいずれの検査項目にも対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

6) 血液生化学検査(Table 2)

雄では、投与期間終了時に対照群に比べ300 mg/kg群で総蛋白が低値傾向を示した。回復期間終了時では、いずれの検査項目にも対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

雌では、哺育5日に対照群に比べ全ての被験物質投与

群でコリンエステラーゼが統計学的に有意な低値を示した。また、300 mg/kg群でカリウムが有意な高値を示し、総蛋白が雄と同様に低値傾向を示した。さらに、30および300 mg/kg群でクレアチニンが有意な低値を示したが、軽微な変化であった。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有意な高値を示した。

7) コリンエステラーゼ活性検査

雄では、投与期間終了時および回復期間終了時において、対照群に比べ300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が統計学的に有意な低値を示し、脳コリンエステラーゼ阻害率はそれぞれ14.6および4.6%であった。

雌では、哺育5日において100および300 mg/kg群で脳コリンエステラーゼ活性が有意な低値を示し、脳コリンエステラーゼ阻害率はそれぞれ13.8および30.3%であった。回復期間終了時では対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

8) 尿検査

各群のケトン体陽性例の数は、対照群、30、100および300 mg/kg群でそれぞれ2、3、5および5例であり、100および300 mg/kg群でケトン体陽性例が増加した。また、30 mg/kg群の1例が潜血3+を示したが、この例のみの変化であり、100および300 mg/kg群で認められないことから偶発的な変化と考えられた。その他の検査項目に被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

9) 器官重量(Table 3)

雄の投与期間終了時では、胸腺が対照群に比べ100 mg/kg群で実重量、300 mg/kg群で実重量および相対重量が統計学的に有意な高値を示した。さらに300 mg/kg群で肝臓、脾臓および腎臓の相対重量が有意な高値を示し、唾液腺および精巣上体の実重量が有意な低値を示した。その他、100 mg/kg群で脳の実重量が有意な高値を示したが、用量に関連しない変化であった。回復期間終了時では、300 mg/kg群で精巣および精巣上体の実重量および相対重量が有意な低値を示し、心臓の相対重量が高値を示した。

雌では、哺育5日に300 mg/kg群で腎臓の実重量および相対重量が有意な高値を示し、心臓の相対重量が有意な高値を示した。回復期間終了時では、いずれの測定器官にも対照群と300 mg/kg群との間に差は認められなかった。

10) 剖検所見

死亡・切迫解剖した動物は300 mg/kg群の雌のみに認められた。胃から直腸の全長にわたるガスによる腹腔拡張が特徴的な肉眼所見であり、被験物質投与による特異的な変化と考えられた。加えて、脾臓および胸腺の萎縮が各4例に認められた。さらに、肺の赤色化および赤色斑/区域や胃の黒色斑/区域が2例、肺気腫が1例に認め

られた他、胸腺の浮腫および赤色斑/区域、皮下の出血および赤色化、腹腔内出血、腎臓の赤色斑/区域、腔の黒色内容物など出血を主体とする循環障害ならびに消化管の内腔拡張に起因する壁の菲薄化も各1例に認められた。これらの所見は少数例の発生とはいえ同週齢の無処置ラットには稀な変化であることから同様に被験物質投与の直接的あるいは間接的影響と考えられた。胃の結節については、漿膜面に存在し周囲組織と色調に違いがない直径1 mm以下の軽微な病変であり被験物質投与に起因する変化とは考えなかった。また、回復試験群の投与20日で死亡した300 mg/kg群の1例においても同様に肺の赤色斑/区域、胃の黒色斑/区域および皮下の赤色化が認められ、さらに下顎リンパ節の赤色化ならびに肝臓の白色斑/区域を伴っていた。

投与期間終了時の雄の剖検では、妊娠を成立させた300 mg/kg群の1例の精巣に両側性萎縮が認められた。同病変は同週齢の無処置ラットにはほとんど観察されない病変であり、後述する回復期間終了時の同群雄に類似病変が高率にみられていること、ならびにその組織像から被験物質投与の影響と考えられた。被験物質投与群に観察されたその他の所見はいずれも1例のみに発生した限局性の軽微な病変であり、その発生に用量との関連はなかった。

回復期間終了時の雄では300 mg/kg群で精巣萎縮が4例に認められ、有意な発生数の増加を示した。両側性の発生であり、発生数も多いことから被験物質投与の影響と考えられた。精巣および精巣上体以外に観察されたその他の所見は同週齢の無処置ラットにしばしば認められる病変と発生数、程度ならびに形態学的特徴に差がないことから自然発生病変と考えられた。

自然分娩した雌および回復期間終了時の雌に観察された所見は、いずれも対照群のみの発生、1例のみの発生あるいは用量との関連のない発生を示した。

妊娠を成立させなかった雄の30 mg/kg群の1例および300 mg/kg群の2例では異常所見は認められなかった。一方、妊娠不成立の雌では子宮および腔に粘液の貯留による内腔拡張が認められた。これは雌動物に非特異的に観察される所見である。

11) 組織所見 (Table 4, 5)

著明な体重低下とともに、腹部膨満を伴って衰弱死あるいは切迫解剖した4例では、前胃あるいは腺胃にびらんが認められ、そのうちの2例では前胃粘膜の肥厚も観察された。さらに1例では回腸にも潰瘍が認められた。また、衰弱死あるいは衰弱による切迫解剖例では、全例に膵臓外分泌腺腺房細胞のチモーゲン顆粒の減少、肝細胞の萎縮があり、胸腺の萎縮、脾臓における髄外造血の低下、リンパ濾胞の萎縮、骨髓における造血の低下、肺のうっ血・水腫も観察された。

一方、体重減少を伴わずに急性の経過をとって死亡した3例ではいずれも気管に著明な急性の炎症が認められ気管の上皮は剥離して内腔には粘液および好中球を主体とした滲出液が貯留しており、気管内腔を狭窄していた。

これに伴って全例で肺のうっ血・水腫、副腎皮質の肥大が認められた他、2例に心耳の拡張が、3例に腺胃のびらんがあり、1例では脾臓の髄外造血、骨髓の造血がむしろ増加し、これとともに脾臓のリンパ濾胞の萎縮も認められた。また、回復試験群の投与20日に死亡した300 mg/kg群の1例でも他の急死した動物と同様に肺のうっ血・水腫、気管の炎症、上皮剥離および内腔狭小化ならびに副腎皮質肥大に加え、骨髓の出血、下顎リンパ節および肝臓のうっ血ならびに肝細胞巣状壊死などが観察された。

なお、毒性試験群で肉眼的に内腔拡張の認められた小腸および大腸の粘膜に著変はなかった。その他に偶発所見と思われる変化として、腎臓の尿細管の空胞化、腎臓および副腎の出血、腔炎、下垂体のラトケ囊、肝臓の小葉辺縁帯肝細胞の空胞化などが観察された。

投与期間終了時の妊娠を成立させた雄および哺育5日の雌では被験物質投与に起因した変化として、300 mg/kg群の雄2例、雌1例に腺胃のびらんが認められたほか、雄では全例の精巣でセルトリ細胞の空胞化が観察され、そのうち1例で精細管の萎縮を伴っていた。これと共に雄の全例で精巣上体管内の精子が減少しており、2例では腺管内に変性した胚上皮細胞と思われる細胞残渣の貯留が認められた。なお、これらの変化はいずれも中用量群および低用量群には観察されなかった。

妊娠を成立させなかった30 mg/kg群の1例に組織学的異常は観察されず、妊娠不成立の原因は不明であった。一方、300 mg/kg群の2例では、精巣にセルトリ細胞の空胞化、精巣上体における管腔内の精子減少および細胞残渣の出現が観察され、1例では局所的ではあったが精細管の萎縮も伴っていたことからこれらの変化が妊娠を成立させなかった原因であった可能性が高い。妊娠不成立の雌では子宮の萎縮、腔の内腔拡張および炎症があり、これらの変化が不妊の原因と考えられた。

その他、雌雄ともに対照群あるいは300 mg/kg群に軽微な組織学的変化が観察されたが、いずれも当施設で観察される自然発生性変化であり、発生率にも対照群と高用量群との間に差がみられないことから、被験物質投与とは関連のない変化であると判断される。なお、雄の高用量群の1例に、心耳に限局した心筋炎と脾臓に浮腫を伴った炎症性細胞浸潤がありこれに伴って脾臓房細胞のチモーゲン顆粒の減少も認められたが、その毒性学的意義は明らかにすることは出来なかった。

回復期間終了時では、被験物質投与に起因した変化として、300 mg/kg群の雄全例の精巣にセルトリ細胞の空胞化を伴った精細管の萎縮があり、そのうち4例では間細胞(ライディッヒ細胞)の過形成も認められ、精巣の変化は投与期間終了時定期解剖例よりも増強していた。これと共に雄の全例で精巣上体管内の精子が減少しており、3例では腺管内に変性した胚上皮細胞と思われる細胞残渣の貯留が認められた。また、雌で肝臓の微小肉芽腫の発生が有意に減少していたが、毒性学的に意義のある変化ではなかった。その他、雌雄ともに対照群あるいは高用量群に軽微な組織学的変化が観察されたが、いず

れも当施設で観察される自然発生性変化であり、発生率にも対照群と300 mg/kg群との間に差がみられないことから、被験物質投与とは関連のない変化であると判断される。

毒性試験群の精子形成サイクルの観察では、100 mg/kg群で対照群に比べセトリ細胞当たりのプレトテン期精母細胞およびパキテン期精母細胞のそれぞれの比率が有意な低値を示した。妊娠を成立させなかった30 mg/kg群の1例および300 mg/kg群の2例もそれぞれの細胞数は対照群と同程度であった。なお、肉眼的に両側性精巣萎縮のみられた300 mg/kg群雄の1例では、精巣の変性性・壊死性変化が強かったことから精子形成サイクルのステージ分類が出来なかったために評価対象から除外した。

回復期間終了時の300 mg/kg群では肉眼的に両側性の萎縮がみられ、組織学的にも精巣障害が顕著であったために肉眼的に萎縮がなかった1例を除いて各種細胞のカウントが行えなかった。したがって、評価できなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 交尾および受胎能 (Table 6)

対照群を含む全ての投与群で全例が交尾した。受胎は30 mg/kg群で1例および300 mg/kg群で2例が成立せず受胎率はそれぞれ91.7および77.8%であり、他の群ではいずれも100%であった。

性周期観察では、異常性周期を示す動物が対照群および300 mg/kg群でそれぞれ1および2例に認められたが、300 mg/kg群の1例は偽妊娠の状態を示すものであり異常性周期発現率にも差は認められなかった。また、平均性周期にも対照群と被験物質投与各群との間に差は認められなかった。

2) 分娩および哺育 (Table 7)

対照群を含むいずれの投与群でも分娩状態に異常は観察されなかった。各群の妊娠期間、黄体数、着床痕数、出産児数および出産生児数はほぼ同様な値を示し、出産率、着床率、分娩率、出生率および性比に群間差は認められなかった。雌新生児の4日の生存率が対照群に比べ300 mg/kg群で統計学的に有意な低値を示し、同群の雄新生児および雌雄を合わせた新生児の4日の生存率も低値傾向を示した。哺育0日に死亡児が30、100および300 mg/kg群でそれぞれ4、3および9例に観察されたが、300 mg/kg群の9例の内8例は同一腹であり、この母動物は分娩直後に死亡していた。喰殺児はいずれの群にも観察されなかった。

3) 新生児の形態、体重および剖検所見

新生児の外表検査では、異常所見は認められなかった。

体重変化では、300 mg/kg群で哺育4日の体重が対照群と比べ雄で有意な低値、雌で低値傾向が認められた。

哺育期間中の死亡児の剖検では、異常所見は認められ

なかった。

哺育4日の剖検では、胃の赤色斑/区域が300 mg/kg群の雄で4例に観察され、対照群に比べ有意な発生数の増加が認められた。しかし、この所見は4例中3例が同一腹に認められたものであった。その他、肺の褐色斑/区域、腎盂拡張、尿管拡張、脳の褐色斑/区域あるいは皮膚の結節が雌雄の対照群を含む各群に単発性あるいは少数例に観察された。

考察

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。これらの動物の死亡あるいは切迫解剖に至る経過として、特に著明な一般症状の変化がなく急死する例と徐々に体重の低下と腹部膨満を伴って全身状態が悪化する2つのタイプに分けられた。前者の経過をとって死亡した例では、病理所見としていずれも気道(気管)に粘膜上皮細胞の剥離を伴った著明な急性炎症があり、気道は滲出液により、著しく狭小化していた。したがって、これらの例の主な死因は気道の急性炎症による窒息死と考えられた。一方後者の経過を辿って死亡した例は、いずれも胃あるいは回腸にびらん・潰瘍が認められ、脾臓の外分泌腺腺房細胞のチモーゲン顆粒の減少と肝臓をはじめとする幾つかの器官に萎縮が認められたことから、消化管障害に伴う栄養状態の悪化が主な死因と考えられた。これらの所見から、本被験物質は、局所刺激性を有しており、そのために経口的に摂取した場合は消化管障害に、また消化管内容物の逆流などにより気道内に入った場合には気道に急性炎症を惹起し、呼吸障害に至るものと考えられた。その他、脾臓および胸腺の萎縮も伴っていたが全例ではないことから、リンパ・造血器系への直接的な影響を示すものではなく、より状態が悪い動物にみられた非特異的な変化である可能性が高い。

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が観察された。流涎は用量に関連して発現例数あるいは発現日数が増加していること、また、2週間投与予備試験においても100 mg/kg以上の投与群で観察されていることから被験物質投与の影響と考えられた。被験物質は強酸性物質であり、流涎はその刺激性に起因したものとも考えられた。雌雄の300 mg/kg群で認められた軟便も例数は少ないものの後述の理由から被験物質投与の影響と考えられた。30 mg/kg群で認められた軟便は雌雄いずれも1回のみの発生であり、被験物質投与との関連は明らかではなかった。

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