

反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験による既存工業化学物質のリスク評価に関する研究

坪倉，靖？

<https://doi.org/10.15017/1932020>

出版情報：九州大学，2017，博士（農学），論文博士
バージョン：
権利関係：



反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験による
既存工業化学物質のリスク評価に関する研究

坪 倉 靖 祐

2 0 1 8

目 次

緒 論.....	1
第一章 4-methoxy-2-nitroaniline の毒性評価.....	8
1.1 緒言.....	8
1.2 用量設定試験.....	9
1.2.1 材料および方法.....	9
1.2.2 結果.....	10
1.2.3 考察.....	10
1.3 併合試験.....	11
1.3.1 材料および方法.....	11
1.3.1.1 被験物質.....	11
1.3.1.2 飼育動物.....	11
1.3.1.3 飼育環境.....	12
1.3.1.4 被験物質の設定用量.....	13
1.3.1.5 投与および回復期間.....	13
1.3.1.6 投与.....	13
1.3.1.7 反復投与毒性に関する観察・検査.....	14
1.3.1.7.1 一般状態観察.....	14

1.3.1.7.2	詳細な一般状態観察.....	14
1.3.1.7.3	機能検査.....	15
1.3.1.7.4	体重および摂餌量測定.....	15
1.3.1.7.5	血液検査.....	15
1.3.1.7.6	剖検.....	16
1.3.1.7.7	組織採取および器官重量測定.....	16
1.3.1.7.8	病理組織学的検査.....	18
1.3.1.8	生殖発生毒性に関する観察・検査.....	19
1.3.1.8.1	性周期検査.....	19
1.3.1.8.2	生殖能力検査.....	19
1.3.1.9	統計学的方法.....	20
1.3.2	結果.....	21
1.3.2.1	状態および機能に対する影響.....	21
1.3.2.2	体重および摂餌量に対する影響.....	22
1.3.2.3	血液学的性状に対する影響.....	22
1.3.2.4	血液生化学的性状に対する影響.....	23
1.3.2.5	器官重量に対する影響.....	23
1.3.2.6	体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響...	24

1.3.2.7	病理組織学的観察.....	24
1.3.2.8	生殖および発生に対する影響.....	25
1.3.3	考察.....	39
第二章	benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs.の毒性評価.....	46
2.1	緒言.....	46
2.2	用量設定試験.....	46
2.2.1	材料および方法.....	47
2.2.2	結果.....	47
2.2.3	考察.....	48
2.3	併合試験.....	48
2.3.1	材料および方法.....	48
2.3.1.1	被験物質.....	48
2.3.1.2	飼育動物.....	49
2.3.1.3	飼育環境.....	49
2.3.1.4	被験物質の設定用量.....	50
2.3.1.5	投与および回復期間.....	50
2.3.1.6	投与.....	51
2.3.1.7	反復投与毒性に関する観察・検査.....	51

2.3.1.7.1 一般状態観察、詳細な一般状態観察、機能検査、体重測定および 摂餌量測定.....	51
2.3.1.7.2 血液検査.....	51
2.3.1.7.3 剖検.....	53
2.3.1.7.4 組織採取および器官重量測定.....	54
2.3.1.7.5 病理組織学的検査.....	54
2.3.1.8 生殖発生毒性に関する観察・検査.....	55
2.3.1.8.1 性周期検査.....	55
2.3.1.8.2 生殖能力検査.....	56
2.3.1.9 統計学的方法.....	56
2.3.2 結果.....	56
2.3.2.1 状態、機能、体重および摂餌量に対する影響.....	56
2.3.2.2 血液学的性状に対する影響.....	57
2.3.2.3 血液生化学的性状に対する影響.....	57
2.3.2.4 器官重量に対する影響.....	58
2.3.2.5 体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響..	59
2.3.2.6 病理組織学的観察.....	59
2.3.2.7 生殖および発生に対する影響.....	59

2.3.3	考察.....	74
第三章	1- <i>tert</i> -butoxy-4-chlorobenzene の毒性評価.....	78
3.1	緒言.....	78
3.2	用量設定試験.....	78
3.2.1	材料および方法.....	79
3.2.2	結果.....	79
3.2.3	考察.....	80
3.3	併合試験.....	80
3.3.1	材料および方法.....	80
3.3.1.1	被験物質.....	80
3.3.1.2	飼育動物.....	81
3.3.1.3	飼育環境.....	81
3.3.1.4	被験物質の設定用量.....	81
3.3.1.5	投与および回復期間.....	82
3.3.1.6	投与.....	82
3.3.1.7	反復投与毒性に関する観察・検査.....	83
3.3.1.7.1	一般状態観察、詳細な一般状態観察、機能検査、体重測定および 摂餌量測定.....	83

3.3.1.7.2	血液検査.....	83
3.3.1.7.3	剖検、組織採取および器官重量測定.....	83
3.3.1.7.4	病理組織学的検査.....	83
3.3.1.8	生殖発生毒性に関する観察・検査.....	84
3.3.1.9	統計学的方法.....	84
3.3.2	結果.....	84
3.3.2.1	状態、機能、体重および摂餌量に対する影響.....	84
3.3.2.2	血液学的性状に対する影響.....	85
3.3.2.3	血液生化学的性状に対する影響.....	86
3.3.2.4	器官重量に対する影響.....	86
3.3.2.5	体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響..	87
3.3.2.6	病理組織学的観察.....	87
3.3.2.7	生殖および発生に対する影響.....	89
3.3.3	考察.....	105
第四章	環境からのばく露による 3 物質のリスクについての検討.....	109
4.1	緒言.....	109
4.2	不確実係数の設定.....	111
4.3	毒性の性質に関する不確実係数.....	112

4.4	TDI の算出.....	116
4.5	ばく露量の推定およびリスクについての検討.....	116
4.5.1	4M2NA のばく露量の推定およびリスクについての検討.....	118
4.5.2	BOTD のばく露量の推定およびリスクについての検討.....	119
4.5.3	TBCB のばく露量の推定およびリスクについての検討.....	121
4.6	まとめ.....	123
	総括.....	125
	謝辞.....	128
	参考文献.....	129

緒 論

これまでヒトの生活を豊かにするため、数多くの化学物質が開発され、使用されてきた。化学物質はその用途から食品添加物や医薬品、農薬などヒトの摂取が想定される物質と、工業化学物質など通常ではヒトが摂取しないことが想定される物質の2つに分類される。しかし、工業化学物質であっても、これまで食品への混入、飲料水の汚染、消費者製品の誤飲事故等により非意図的にヒトにばく露し、健康被害を引き起こしてきた。

1950 年台には、富山県の神通川下流域において鉱山廃水に含まれるカドミウムにより農作物が汚染され、汚染された食品を長年摂取した周辺住民にイタイイタイ病が発生した。1968 年に発生したカネミ油症事件では、食品工場の配管から漏出したポリ塩化ビフェニル (PCB) やポリクロロジベンゾフラン等が米ぬか油に混入し、摂取した人々に皮膚症状を中心とした中毒症状を引き起こした (倉恒, 2000)。当時、PCB は熱媒体、絶縁体、塗料など様々な用途で大量に使用されており、使用や廃棄の過程で自然界に排出された PCB によって環境や野生動物、魚介類に汚染が広がっていた。そのため、汚染された魚介類を摂取したヒトに対する健康被害、さらに PCB は胎盤および母乳を通じて移行するため (児玉および太田, 1977)、胎児および乳児に対する健康被害が懸念され、大きな社会問題となった。近年では工業化学物質による公害の発生件数は減少傾向にあるが、化粧品や洗剤など消費者製品の誤飲事故など身の回りに存在する物質による中毒事故が依然発生しており、工業化学物質についても安全性評価を行うことが重要である。

国内では、PCB 汚染によるヒトへの健康被害が社会問題となったことを契機として、1973 年に「化学物質の審査および製造等の規制に関する法律（昭和 48 年 10 月 16 日法律第 117 号、化審法）」が制定された。化審法では新たに製造・輸入される工業化学物質（新規化学物質）について、製造・輸入前に 28 日間反復投与毒性試験等の安全性試験を実施することが義務付けられた。しかしその一方で、化審法制定以前から製造・輸入されていた工業化学物質（既存化学物質）については、製造・輸入する事業者に安全性試験は義務づけられなかった。この流れは国外でも同様であり、アメリカや EU でも新規化学物質を規制する法律は存在するが、既存化学物質については試験の実施義務がなかった。そのため、数多くの既存化学物質が安全性が不明なまま世界的に使用されている。そこで 1990 年代より経済協力開発機構（OECD）が中心となり、加盟国で分担して既存化学物質の安全性評価を実施している。筆者の所属する一般財団法人化学物質評価研究機構では、新規化学物質のみならず、OECD のプログラムの一環で日本政府から委託を受け、これまで数多くの既存化学物質の安全性試験を実施している。

新規化学物質については、ヒトが経口摂取した場合の健康影響を評価する試験として 28 日間反復投与毒性試験が要求されている。28 日間反復投与毒性試験は、ラットに対して 28 日間化学物質を毎日 1 回経口投与し、全身の器官・組織への反復投与毒性を質的・量的に評価する試験である。しかし、生殖発生毒性に関しては評価できないため、生殖発生毒性が懸念される物質については、生殖発生毒性試験を別途実施する必要がある。

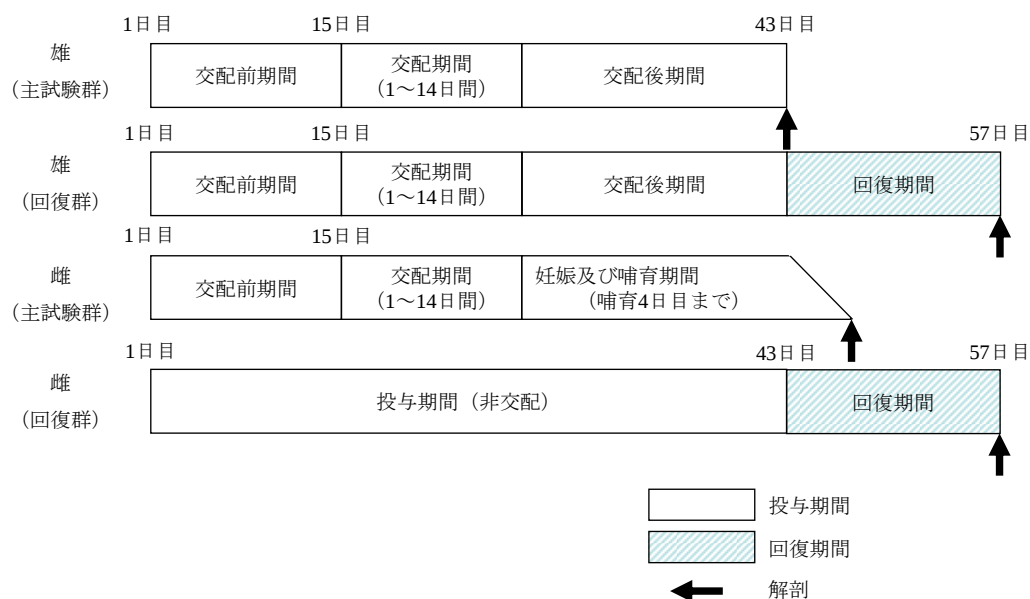


図 1 併合試験における試験の流れ

る。一方、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（OECD, 1996、以下、併合試験と略す）は、反復投与試験に繁殖を組み合わせた試験であり、全身の器官・組織への反復投与毒性と生殖発生毒性を一度に評価することができる。併合試験における試験フローの一例を図 1 に示す。併合試験は一度の試験で得られる情報量が多いことから、毒性情報が得られていない物質の初期評価に有効な試験と考えられ、これまで多くの既存化学物質の毒性の評価に用いられている。

本研究では、生産量が多く、その用途から非意図的な経口ばく露によりヒトへ健康被害を引き起こす恐れがあり、これまで安全性情報が得られていない既存化学物質の中から以下の 3 物質 {4-methoxy-2-nitroaniline (4M2NA、CAS 番号：96-96-8、図 2)、benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs. (BOTD、CAS 番号：119345-02-7、図 3)、1-tert-butoxy-

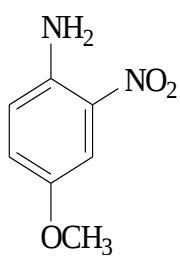


図 2 4-methoxy-2-nitroaniline (4M2NA) の構造式

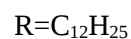
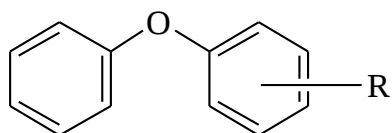


図 3 benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs. (BOTD) の構造式

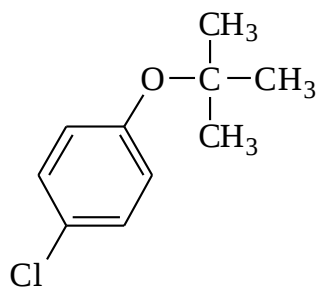


図 4 1-*tert*-butoxy-4-chlorobenzene (TBCB) の構造式

4-chlorobenzene (TBCB、CAS 番号：18995-35-2、図 4) } について、ヒトが経口摂取したときの毒性について評価を行うため、併合試験を実施し、得られた結果に基づいて安全性評価を行った。

4M2NA は、ベンゼン環上にメトキシ基、ニトロ基およびアミノ基が 1 つずつ結合した物質であり、橙色の有機顔料であるハンサオレンジ（橙色 401 号）の原料として使用されている。ハンサオレンジはファンデーションや洗顔料等の化粧品の着色のために使用されている。4M2NA の部分構造物であるアニリンは赤血球内のヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンを生成することで、溶血性貧血を起こすことが知られている（Harrison and Jollow, 1986、Khan *et al.*, 1993）。また、同じく部分構造物であるニトロベンゼンは、体内で腸内細菌により還元されアニリンとなり溶血性貧血を引き起こすほか（Reddy *et al.*, 1976、Goldstein *et al.*, 1984、Shimo *et al.*, 1994）、精巣毒性を有することが報告されている（Shimo *et al.*, 1994、Mitsumori *et al.*, 1994）。そのため、4M2NA についても、血液毒性および精巣毒性に加え、二次的影響として生殖毒性が懸念される。そこで、本研究では 4M2NA について併合試験を実施し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討を行い、無毒性量（no observed adverse effect level、NOAEL）を求めた。

BOTD はジフェニルエーテルにモノドデシル基が結合した化合物であり、耐熱性の高い潤滑油として電子機器や自動車、食品製造用の機械に使用されているほか、洗剤に使用されるアルキルジフェニルエーテルスルホン酸塩の原料として使用されている。

BOTD のエーテル結合が開裂した場合に生成する 4-ドデシルフェノールは、反復投与毒性試験において副腎、腎臓、肝臓、甲状腺および生殖器への毒性影響 {European Chemicals Agency (ECHA) , 2004b、ECHA, 2012a}、二世代繁殖毒性試験においては F2 世代の生

存率低下が報告されている（ECHA, 2012b）。そのため、BOTD についても同様の臓器に対する毒性や生殖発生毒性を引き起こすことが懸念されている。そこで、本研究では BOTD について併合試験を実施し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討を行い、NOAEL を求めた。さらに、血液凝固時間の延長が雄のみで認められた理由について考察した。

TBCB は、ベンゼン環上にクロロ基および *tert*-ブトキシ基が 1 つずつ結合した物質であり、半導体製造における保護膜（レジスト）や香料の原料として使用されている。TBCB のエーテル結合が開裂した場合に生成する 4-クロロフェノールは、反復投与により振戦、流涎等の神経症状を誘発させることが報告されている {Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW) , 2000}。また、同様にエーテル結合で開裂した場合に生成する *tert*-ブチルアルコールは、簡易生殖発生毒性試験において産児数および生存率の低下を誘発させることが報告されている（ECHA, 2004a）。そのため、TBCB についても神経毒性および発生毒性の誘発が懸念されている。本研究において TBCB について併合試験を実施し、反復投与毒性および生殖発生毒性について検討を行い、NOAEL を求めた。

また、本研究の 3 物質について併合試験により得られた NOAEL から一日耐容摂取量の算出を試みた。さらに、本研究の 3 物質が環境経路によりヒトへ経口ばく露した場合のばく露量の最大値を推定し、ヒト健康へのリスクについて検討した。

本研究により、4M2NA、BOTD、TBCB の 3 物質について、併合試験による NOAEL

が初めて示された。本研究で示した手法は、毒性が不明なまま使用されている既存化学物質についての毒性評価および安全性評価に有効であり、安全性の確保に貢献することが期待される。

第一章 4-methoxy-2-nitroaniline の毒性評価

1.1 緒言

4-methoxy-2-nitroaniline (4M2NA) は図 2 のようにベンゼン環上にメトキシ基、ニトロ基およびアミノ基が 1 つずつ結合した物質であり、分子式は $C_7H_8N_2O_3$ 、分子量は 168.15 の赤橙色の固体である。アミノ基に対してメトキシ基はパラ位に、ニトロ基はオルト位に結合している。4M2NA は主として橙色の有機顔料であるハンサオレンジ（橙色 401 号）の原料として使用されている。4M2NA の部分構造物であるアニリンは、代謝物であるフェニルヒドロキシルアミンが赤血球内のヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンを生成することにより、溶血性貧血を起こすことが知られている (Harrison and Jollow, 1986, Khan *et al.*, 1993)。また、同じく部分構造物であるニトロベンゼンは、体内で腸内細菌により還元されアニリンとなり溶血性貧血を引き起こすほか (Reddy *et al.*, 1976, Goldstein *et al.*, 1984, Shimo *et al.*, 1994)、精巣毒性を有することが報告されている (Shimo *et al.*, 1994, Mitsumori *et al.*, 1994)。なお、同じく部分構造物であるメトキシベンゼンについては、急性毒性（経口）の LD50 が 3700 mg/kg (ECHA) という情報があるが、反復投与毒性については情報が得られなかった。また、4M2NA と同様の官能基を有する 2-メトキシ-4-ニトロアニリン (CAS No. : 97-52-9) では、28 日間反復投与試験において 100 mg/kg/日 でヘマトクリット値の低値が認められ、NOAEL は 30 mg/kg/日 と報告されている (MHLW, 1997)。そのため、4M2NA についても、血液毒性および

精巢毒性に加え、二次的影響として生殖毒性が懸念される。しかし、4M2NA の毒性については急性毒性（経口）の LD50 が 14100 mg/kg（ECHA）との報告があるが、反復投与毒性については情報が得られていない。そこで、本研究では 4M2NA の安全性評価のため、本物質について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（併合試験）を実施し、毒性評価を行った。

1.2 用量設定試験

4M2NA について、併合試験における投与用量を設定するため、14 日間反復投与毒性試験を行った。

1.2.1 材料および方法

被験物質として、東京化成工業株式会社から提供された 4M2NA（ロット番号:AZ01、純度：99.7%）を試験に使用した。4M2NA を 0.5%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：化学用、和光純薬工業、精製水：日本薬局方、高杉製薬）に懸濁させ、0（0.5%CMC-Na 水溶液）、25、250、500 および 1000 mg/kg/日の用量で 14 日間投与した。投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用い、強制経口投与を行った。動物は 9 週齢の Crl:CD(SD)ラットを用いて 1 群雌雄各 3 匹とした。投与期間中は一般状態観察および体重測定を実施し、解剖日に血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量測定および剖検を行った（1.3.1.7 参照）。

1.2.2 結果

一般状態観察では、1000 mg/kg 群の雌雄で自発運動低下、呼吸数減少、被毛の汚れ、橙色尿等がみられた。1000 mg/kg 群の雄 1 例では、さらに閉瞼、摂餌不良、うずくまり、体温低下等がみられ、投与 7 日目に瀕死と判断し切迫殺した。体重では、投与 3 日目に雄の 500 および 1000 mg/kg 群および雌の 1000 mg/kg 群で有意な低値又は低値傾向がみられた。血液学的検査では、500 mg/kg 以上の群の雌雄で赤血球数、ヘマトクリット値（血液中に占める血球の体積の割合を示す）およびヘモグロビン濃度の有意な低値又は低値傾向、1000 mg/kg 群の雌で平均赤血球容積および平均赤血球ヘモグロビン量の有意な高値、250 mg/kg 以上の群の雌雄で網状赤血球数比率の有意な高値又は高値傾向がみられた。網状赤血球は脱核直後の未熟な赤血球であり、網状赤血球数比率の上昇は赤血球産生の亢進を示唆する変化である（日本トキシコロジー学会編, 2003）。器官重量では、250 mg/kg 以上の群の雌雄で肝臓の相対重量の有意な高値又は高値傾向、1000 mg/kg 群の雌で脾臓の絶対および相対重量の有意な高値がみられた。剖検では、500 mg/kg 以上の群の雄および 1000 mg/kg 群の雌で肝臓の腫大、1000 mg/kg 群の雌で脾臓の黒色化および腫大がみられた。

1.2.3 考察

1000 mg/kg 群で死亡が発生し、500 mg/kg 群でも体重、血液、肝臓に影響がみられていることから、4M2NA の併合試験では 450、75 および 12.5 mg/kg/日の 3 用量を設定す

ることが適切と考えられた。

1.3 併合試験

1.3.1 材料および方法

試験は OECD テストガイドライン {TG422 : 反復投与毒性試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の複合試験 (1996.3.22 採択)} に準拠し、優良試験所基準 (GLP : Good Laboratory Practice) で実施した。また、LABORATORY ANIMAL SCIENCE (1987、American Association for Laboratory Animal Science) を参考に一般財団法人 化学物質評価研究機構日田事業所が作成した「日田事業所動物実験に関する指針」および「ヘルシンキ宣言」(1964 年制定) の主旨に沿って試験を行った。

1.3.1.1 被験物質

東京化成工業株式会社から提供された 4M2NA (ロット番号 : AZ01、純度 : 99.7%) を試験に使用した。

1.3.1.2 飼育動物

日本チャールス・リバー日野飼育センターから 8 週齢の Crl:CD(SD)ラット (SPF) {SD : Sprague Dawley[®]、SPF : Specific Pathogen Free (特定の有害な病原体が存在しない)} の雄 55 匹、雌 65 匹を入手し、6 日間の検疫を含む 8 日間の馴化を行った。検疫・馴化期間中、すべての動物に異常は認められなかった。

投与開始 1 日前に測定した体重を用いて、対照群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、低用量群 (雄

12 匹、雌 12 匹)、中用量群 (雄 12 匹、雌 12 匹)、高用量群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、対照群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹)、高用量群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹) の計 6 群に体重層別無作為抽出法により群分けした (表 1-1)。投与開始時の動物の週齢は雌雄とも 9 週齢で、体重範囲は雄が 330.8~367.5 g、雌が 210.4~238.9 g であった。また、雌雄ともに投与 1 日目の体重が、各群の平均体重 $\pm$ 20%の範囲内にあることを確認した。

1.3.1.3 飼育環境

動物は、全飼育期間を通して、温度 21~25°C、相対湿度 40~70%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯, 19 時消灯) に設定したバリアシステム (構造的、機能的に微生物学的障壁を設け、病原微生物の侵入および拡散を防ぐ動物管理形態) の飼育室で飼育した。ケージは、群分け前は雌雄ともにステンレス製金網床ケージを使用して群飼育した。群分け後は、雄はステンレス製金網床ケージで個別飼育した。雌は妊娠 16 日まではステンレス製金網床ケージを使用し、妊娠 17 日から解剖前日までは床敷 (サンフレーク、日本チャールス・リバー) を入れたポリカーボネイト製平床ケージを使用して個別又は児動物とともに飼育した。回復期間中は雌雄ともステンレス製金網床ケージを使用して個別飼育した。なお、交配中は雄のケージに雌雄各 1 匹で飼育した。飼料は実験動物用固形飼料 (MF、オリエンタル酵母工業)、飲料水は塩素添加 (約 5 mg/L) 水道水を自由摂取させた。飼育器材および餌料はオートクレーブ滅菌 (121°C、30 分間) したものを使用した。

1.3.1.4 被験物質の設定用量

用量設定試験の結果から 450、75 および 12.5 mg/kg/日の 3 用量を設定した。群構成を表 1-1 に示す。

表 1-1 4M2NA の併合試験における群構成

試験群	投与用量 (mg/kg/日)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液濃度 (w/v%)	動物数 (匹)	
				雄	雌
媒体対照 (主試験)	0	5	0	7	12
媒体対照 (回復)	0	5	0	5	5
被 低用量 (主試験)	12.5	5	0.25	12	12
験 中用量 (主試験)	75	5	1.5	12	12
物 高用量 (主試験)	450	5	9.0	7	12
質 高用量 (回復)	450	5	9.0	5	5

1.3.1.5 投与および回復期間

投与期間は、雄の主試験群および回復群並びに雌の回復群は 42 日間、雌の主試験群は交配前期間 (14 日間)、交配期間 (最長 14 日間)、妊娠期間および哺育期間 (5 日間) の 42~55 日間とした。また、回復期間は雌雄とも 42 日間投与した後、14 日間の休薬期間を設けた。

1.3.1.6 投与

被験物質および CMC-Na (最終濃度 0.5 w/v%) を混合し、精製水に懸濁させ 9.0 w/v% の被験物質液を調製した。さらに、9.0 w/v%液を 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液で希釈して 1.5 および 0.25 w/v%の被験物質液を調製した。9.0、1.5 および 0.25 w/v%の被験物質液をそ

れぞれ高、中および低用量群に体重 1 kg あたり 5 mL の液量で強制経口投与した。投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用いた。対照群には 0.5 w/v%CMC-Na 水溶液を同様にして投与した。投与は 8 時から 13 時の間に行い、分娩途中の動物は分娩終了後に行った。

1.3.1.7 反復投与毒性に関する観察・検査

1.3.1.7.1 一般状態観察

生死、栄養状態、被毛の状態、体位、姿勢、活動状況（意識・態度、行動、歩行様式の異常）、振戦・麻痺の有無、呼吸様式及び呼吸音の異常の有無についてケージサイドから観察した。また、トレイ上、ケージ内の排泄物及び食べこぼした餌の状態あるいは量、尿の色調、糞の状態（量、性状、色調）についても観察した。観察は、投与期間中は投与前および投与中～投与後の毎日 2 回、回復期間中は毎日 1 回行った。妊娠動物については分娩状況および哺育状態も観察した。

1.3.1.7.2 詳細な一般状態観察

投与開始前に 1 回、投与期間および回復期間中は週 1 回の頻度で、動物を手に取り、体温低下の有無、被毛の状態、皮膚及び粘膜の色、眼の異常の有無、分泌物の有無について詳細に観察した。また、90 cm×60 cm の観察台上に 1 分間以上動物を置き、姿勢、活動性、呼吸及び歩行の状態、眼瞼閉鎖の有無、振戦・攣縮・痙攣の有無、常同行動及び異常行動の有無について観察した。これらの観察は盲検法で行った（交配期間中を除

く)。また、観察台上での行動の観察時に排糞回数および排尿回数を計測した。なお、主試験群の雌については投与 6 週目の観察は行わず、分娩後に 1 回観察した。

1.3.1.7.3 機能検査

反応性（視覚、聴覚、痛覚、瞳孔反射、空中正向反射）並びに前肢および後肢の握力について盲検法で検査した。また、自発運動量を 60 分間（10 分間隔で 6 回）測定した。

雄は、各用量の動物番号の小さい 5 匹について、投与 6 週目に検査した。雌は、主試験群については各群の分娩日の近い 5 匹を選択して哺育 4 日に 1 回検査した。回復群については投与 6 週目に検査した。

1.3.1.7.4 体重および摂餌量測定

投与期間および回復期間を通じて週 1～2 回測定を行った。

1.3.1.7.5 血液検査

投与期間の最終日又は回復期間の最終日から 16～20 時間絶食させた後、麻酔下で腹部大動脈から採血した。採血して得た全血、血漿および血清を用いて表 1-2 および 1-3 の項目を測定した。全血は EDTA-2K 添加採血びん（SB-41、シスメックス）で採血した。PT および APTT 測定用の血漿は、抗凝固剤にクエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業）の 3.2 w/v% 水溶液を用いて採血し、遠心分離（3000 r.p.m.×10 分間）して調製した。血清は、採血した後、遠心分離（3000 r.p.m.×10 分間）して調製した。採血は機能検査を行った各群 5 匹の動物について実施した。

表 1-2 4M2NA の併合試験における血液学的検査項目

検査項目	機器	試料
赤血球数	全自動総合血液学分析装置 CELL-DYN3500 (アボットラボラトリーズ)	全血
白血球数		
ヘモグロビン濃度		
ヘマトクリット値		
平均赤血球容積 (MCV)		
平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH)		
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)		
血小板数	総合血液学検査装置 ADVIA 120 (シーメンス)	全血
網状赤血球数比率		
白血球百分率		
好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球、大型非染色球		
プロトロンビン時間 (PT)	血液凝固自動測定装置 KC-10A (アメルング)	血漿
活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)		

1.3.1.7.6 剖検

生存例について、麻酔下での放血により安楽死させた後、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。主試験群は最終投与日の翌日、回復群は回復期間終了日の翌日に実施した。また、妊娠 25 日までに分娩が確認できなかった雌は妊娠 25 日以降に、死亡動物は発見時に同様の観察を行った。

1.3.1.7.7 組織採取および器官重量測定

全例について、表 1-4 の器官・組織を採取した。精巣および精巣上体はブアン液 (Hess and Moore, 1993) で固定し、その他の器官・組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液 (りん酸

表 1-3 4M2NA の併合試験における血液生化学的検査項目

検査項目	機器	試料
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）	a)	血清
アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）		
アルカリ性フォスファターゼ（ALP）	b)	
コリンエステラーゼ（ChE）	a)	
γ-グルタミルトランスぺプチダーゼ（γ-GTP）	b)	
総コレステロール		
トリグリセリド		
血糖		
総蛋白	a)	
アルブミン		
A/G 比	—	—
尿素窒素	b)	血清
クレアチニン		
総ビリルビン	a)	
カルシウム	b)	
無機リン		
ナトリウム	c)	
カリウム		
塩素		

a) : 生化学自動分析装置 (7150 Automatic Analyzer、日立製作所)

b) : 生化学自動分析装置 (7170 Automatic Analyzer、日立製作所)

c) : 電解質分析装置 PVA- α III (A&T)

緩衝液) で固定した。採取した器官又は組織のうち、表 1-4 の「*」を付した器官・組織

は重量を測定し、解剖日の体重を基に相対重量を算出した。なお、腎臓、精巣、精巣上

体および副腎は左右の器官をまとめて測定した。

表 1-4 4M2NA の併合試験における採取器官・組織

分類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	胃、腸（十二指腸から直腸、パイエル板を含む）、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上体*、前立腺、精嚢、卵巣、子宮、膣
神経系	脳*（大脳、小脳および脳橋を含む）、脊髄、坐骨神経
造血器系	骨髄（大腿骨）、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、副腎*

1.3.1.7.8 病理組織学的検査

各群 5 例について、固定した器官・組織からパラフィン包埋薄切切片を作り、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999）後、光学顕微鏡観察により検査した。対照群および 450 mg/kg 群は採取したすべての器官・組織について検査した。75 および 12.5 mg/kg 群については、雌雄の肝臓および脾臓、雌の腎臓および甲状腺、回復群については、雌雄の肝臓、腎臓および脾臓、雌の甲状腺について検査した。また、肉眼的病変部についても検査した。交尾が成立しなかった 75 mg/kg 群の雌は、卵巣、子宮および膣について検査を行った。死亡した対照群の雌は、気管、肺、肝臓、心臓、腎臓、膣、脾臓、胸腺、副腎について検査した。また、検査の結果、脾臓にヘモジデリンの沈着が疑われた。ヘモジデリンはヘモグロビンが分解されて生じる色素群であり、溶血性貧血やメトヘモグロビン血症など、赤血球が大量に破壊された際に

沈着量が増加する（日本トキシコロジー学会編, 2003）。そこで、ヘモジデリン沈着の有無について検討するため、対照群と 450 mg/kg 群の雌雄各 2 匹の脾臓について、ベルリン青染色を行い検査した（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999）。

1.3.1.8 生殖発生毒性に関する観察・検査

1.3.1.8.1 性周期検査

雌全例について、投与 1 日目から 15 日目まで膣垢を採取し、ギムザ染色後、光学顕微鏡的に検査して（日本毒性病理学会編, 2017）、発情期から次の発情期までの性周期日数を求めて平均性周期日数を算出した。

1.3.1.8.2 生殖能力検査

投与 15 日目から交配を行った。交配期間は最長 14 日間とし、交尾が確認されるまで行った。分娩は自然分娩とし、産児数および出産生児数を計測し、産児の雌雄の確認を行った。児動物は哺育 0 日および哺育 4 日に体重を測定した。交尾確認日から分娩完了前日までの日数を妊娠期間とした。剖検時に妊娠黄体数および着床痕数を計測し、妊娠の確認は着床痕の有無により行った。また、下記項目を算出した（Mitsumori *et al.*, 1994、Takahashi *et al.*, 2014）。

- ・ 交尾率（%）：（交尾確認された雌動物数／交配させた雌動物数）×100
- ・ 受胎率（%）：（妊娠動物数／交尾確認された雌動物数）×100
- ・ 着床率（%）：（着床痕数／妊娠黄体数）×100

- ・ 出産率 (%) : $(\text{生児出産動物数} / \text{妊娠動物数}) \times 100$
- ・ 出生率 (%) : $(\text{出產生児数} / \text{着床痕数}) \times 100$
- ・ 0 日生存率 (%) : $(\text{出產生児数} / \text{産児数}) \times 100$
- ・ 出産児性比 : $\text{雄出産児数} / \text{産児数}$
- ・ 0 日生存児性比 : $\text{哺育 0 日雄生存児数} / \text{哺育 0 日生存児数}$
- ・ 4 日生存率 (%) : $(\text{哺育 4 日生存児数} / \text{出產生児数}) \times 100$
- ・ 4 日生存児性比 : $\text{哺育 4 日雄生存児数} / \text{哺育 4 日生存児数}$

1.3.1.9 統計学的方法

親動物の体重、摂餌量、握力、自発運動量、血液学的検査項目、血液生化学的検査項目、器官重量、平均性周期日数、交尾所要日数、妊娠期間、妊娠黄体数および着床痕数、産児数（雌雄合計値）、出產生児数（雌雄合計値）、0 日生存児数（雌雄合計値）、出産児性比、0 日生存児性比、0 日生存児体重、4 日生存児数（雌雄合計値）、4 日生存児性比および 4 日生存児体重については、Bartlett 検定（Bartlett, 1937）により各群の分散の同一性を検定した。Bartlett 検定において 5%水準で有意差が無く、等分散と判定された項目については、一元配置分散分析による検定を行い、5%水準で有意差がみられた場合には、さらに、対照群と被験物質の各用量群との間で Dunnett 検定（Dunnett, 1964）を行った。Bartlett 検定において 5%水準で有意差が有り、不等分散と判定された項目については、Kruskal-Wallis の検定（Kruskal and Wallis, 1952）を行い、5%水準で有意差がみ

られた場合には、さらに、対照群と被験物質の各用量群との間でノンパラメトリックの Dunnett 検定を行った。排糞回数および排尿回数については、Kruskal-Wallis の検定を行い、5%水準で有意差がみられた項目については、さらに対照群と被験物質の各用量群との間でノンパラメトリックの Dunnett 検定を行った。交尾率、受胎率、出産率、出産児性比、0 日生存児性比および 4 日生存児性比については、Fisher の直接確率検定 (Fisher, 1922) で対照群との間で有意差検定を行った。着床率、出生率、0 日生存率、および 4 日生存率については、Kruskal-Wallis の検定を行い、5%水準で有意差がみられた項目については、さらに対照群と被験物質の各用量群との間でノンパラメトリックの Dunnett 検定を行った。出生児の体重は、一腹を標本単位として雌雄毎に処理した。

血液学的検査項目、血液生化学的検査項目の検定には、N88-BASIC の統計処理プログラム (NEC) を使用し、その他は統計ツール StatLight 2000(C) (Yukms) を使用した。

試験成績の評価は、被験物質の投与群において、対照群と比較し有意水準 1 又は 5% で有意差がみられた場合に有意な変動と判定した。

1.3.2 結果

1.3.2.1 状態および機能に対する影響

一般状態観察結果を表 1-5 に示す。被験物質投与の影響ではないが、対照群の雌 1 例が妊娠 16 日目に死亡した。死亡例では自発運動低下、蒼白等が認められ、トレイ上に赤色液状物が認められた。450 mg/kg 群において、投与後に一過性の流涎が雄 12 例中 5

例、主試験群の雌 12 例中 5 例、回復群の雌 5 例中 3 例、被毛の汚れが全例で認められた。また、橙色尿が被験物質投与群の全例で認められた。被毛の汚れおよび橙色尿は被験物質又は被験物質の代謝物の色によるものと考えられた。詳細な一般状態観察および機能検査については、雌雄ともにすべての被験物質投与群に被験物質投与の毒性影響と考えられる異常は認められなかった（未掲載データ）。

1.3.2.2 体重および摂餌量に対する影響

体重測定結果を図 5 に示す。雄の 450 mg/kg 群において投与および回復期間を通じて低値傾向、雌の 450 mg/kg 群において投与 3 日目（交配前期間）に有意な低値、妊娠期間中に低値傾向が認められた。雌雄ともに 12.5 および 75 mg/kg 群には有意な変動は認められなかった。

摂餌量測定結果を図 6 に示す。雌雄の 450 mg/kg 群および雌の 75 mg/kg 群において、投与 3 日目に有意な低値が認められた。また、雌の 450 mg/kg 群では投与 7 日目にも有意な低値が認められた。その他の被験物質投与群に有意な変動は認められなかった。

1.3.2.3 血液学的性状に対する影響

血液学的検査結果を表 1-6 および 1-7 に示す。主試験群の雄では、被験物質投与群に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。雌では、450 mg/kg 群で平均赤血球容積（MCV）および網状赤血球数比率の有意な高値（対照群比 108%および 164%）が認められた。

回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

1.3.2.4 血液生化学的性状に対する影響

血液生化学的検査結果を表 1-8 および 1-9 に示す。主試験群の雄では、450 mg/kg 群でアルブミン濃度およびカルシウム濃度の有意な高値が認められた。しかし、これらは試験施設の背景値内の変動であったため（アルブミン：2.52-3.00、カルシウム：8.73-10.53）、毒性学的意義のない偶発的な変動と考えた。

主試験群の雌の 450 mg/kg 群において、被験物質投与の影響と考えられる変化として、総コレステロール濃度の有意な高値（対照群比 156%）がみられた。また、コリンエステラーゼ活性の有意な低値が認められたが、背景値内の変動であったため（112.2-338.8）、毒性学的意義のない偶発的な変動と考えた。

回復群では、雄の総コレステロール濃度およびカルシウム濃度、雌の γ -GTP 活性で有意な高値が認められたが、いずれも背景値内の変動であったことから（総コレステロール：31.4-70.6、カルシウム：8.33-10.53、 γ -GTP：0.17-1.81）、遅発毒性ではなく偶発的な変動によるものと考えた。

1.3.2.5 器官重量に対する影響

器官重量測定結果を表 1-10 および 1-11 に示す。主試験群では、被験物質投与の影響と考えられる変動として雄の 75 mg/kg 以上の群および雌の 450 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値又は高値傾向がみられた。また、雌の 450 mg/kg 群で腎臓

の相対重量および脾臓の絶対および相対重量の有意な高値がみられた。雌の 75 mg/kg 以上の群では、副腎の絶対および相対重量の有意な低値がみられた。雌雄ともに、その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

回復群では、雄の 450 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値が引き続きみられた。雌では主試験群で認められた変動は消失した。

1.3.2.6 体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響

剖検結果のうち被験物質投与の影響と考えられた変化を表 1-12 に示す。主試験群では、腹腔において、肝臓の腫大が雄の 450 mg/kg 群で 7 例全例、雌の 450 mg/kg 群で 12 例中 10 例にみられた。また、雌の 450 mg/kg 群では肝臓の白色部が 1 例、脾臓の黒色化が 9 例、脾臓の腫大が 2 例にみられた。体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔および骨盤腔に被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

1.3.2.7 病理組織学的観察

被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた肝臓、脾臓、腎臓および甲状腺の結果を表 1-13 に示す。主試験群の雄では、450 mg/kg 群において脾臓のヘモジデリン沈着（軽度～中等度）が 5 例中 3 例、うっ血が 1 例に認められた。脾臓のヘモジデリン沈着およびうっ血は回復群でもそれぞれ 4 例および 1 例に認められた。450 mg/kg 群では、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 5 例にみられたが、甲状腺の変化は認められなかった。

肝臓の変化は回復群では消失した。

雌では、450 mg/kg 群において脾臓のヘモジデリン沈着（軽度～中等度）および髄外造血亢進が 5 例全例、うっ血が 2 例に認められた。髄外造血亢進およびうっ血は回復群では消失したが、ヘモジデリン沈着はさらに高い程度で 5 例に認められた。また、450 mg/kg 群において、肝臓の小葉中心性肝細胞肥大が 5 例、甲状腺の濾胞上皮細胞のびまん性肥大が 3 例で認められた。また、腎臓の尿細管上皮の空胞化が 2 例で認められた。重量の低値が認められた副腎に異常は認められなかった。肝臓、甲状腺および腎臓の変化は回復群では消失した。

1.3.2.8 生殖および発生に対する影響

分娩・哺育状態についての観察結果を表 1-14 に示す。すべての被験物質投与群において被験物質投与の影響と考えられる異常は認められなかったが、分娩日に 450 mg/kg 群の 1 例で乳頭未発達、75 mg/kg 群の 1 例で胎盤処理不全および乳頭未発達が認められた。これらの動物では、それぞれ 9 例および 8 例の児動物が哺育 1 日に死亡したが、残りの児動物にその後異常は認められなかった。生殖発生毒性に関する観察・検査結果を表 1-15 に示す。すべての被験物質投与群において被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

表 1-5 4M2NA の併合試験における一般状態観察所見

所見名	用量（mg/kg/日）				回復期間	
	投与期間					
	0	12.5	75	450	0	450
雄						
橙色尿	0/12	12/12	12/12	12/12	0/5	5/5
被毛の汚れ	0/12	0/12	0/12	12/12	0/5	5/5
流涎	0/12	0/12	0/12	5/12	0/5	0/5
雌						
橙色尿	0/17	12/12	12/12	17/17	0/5	5/5
被毛の汚れ	0/17	0/12	0/12	17/17	0/5	5/5
流涎	0/17	0/12	0/12	8/17	0/5	0/5
自発運動低下	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5
呼吸数減少	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5
蒼白	1/17	0/12	0/12	1/17	0/5	0/5
外陰部周囲の汚れ	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5
トレイ上の赤色液状物	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5
下腹部の汚れ	0/17	0/12	1/12	0/17	0/5	0/5
脱毛	1/17	0/12	0/12	0/17	1/5	1/5
死亡	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5

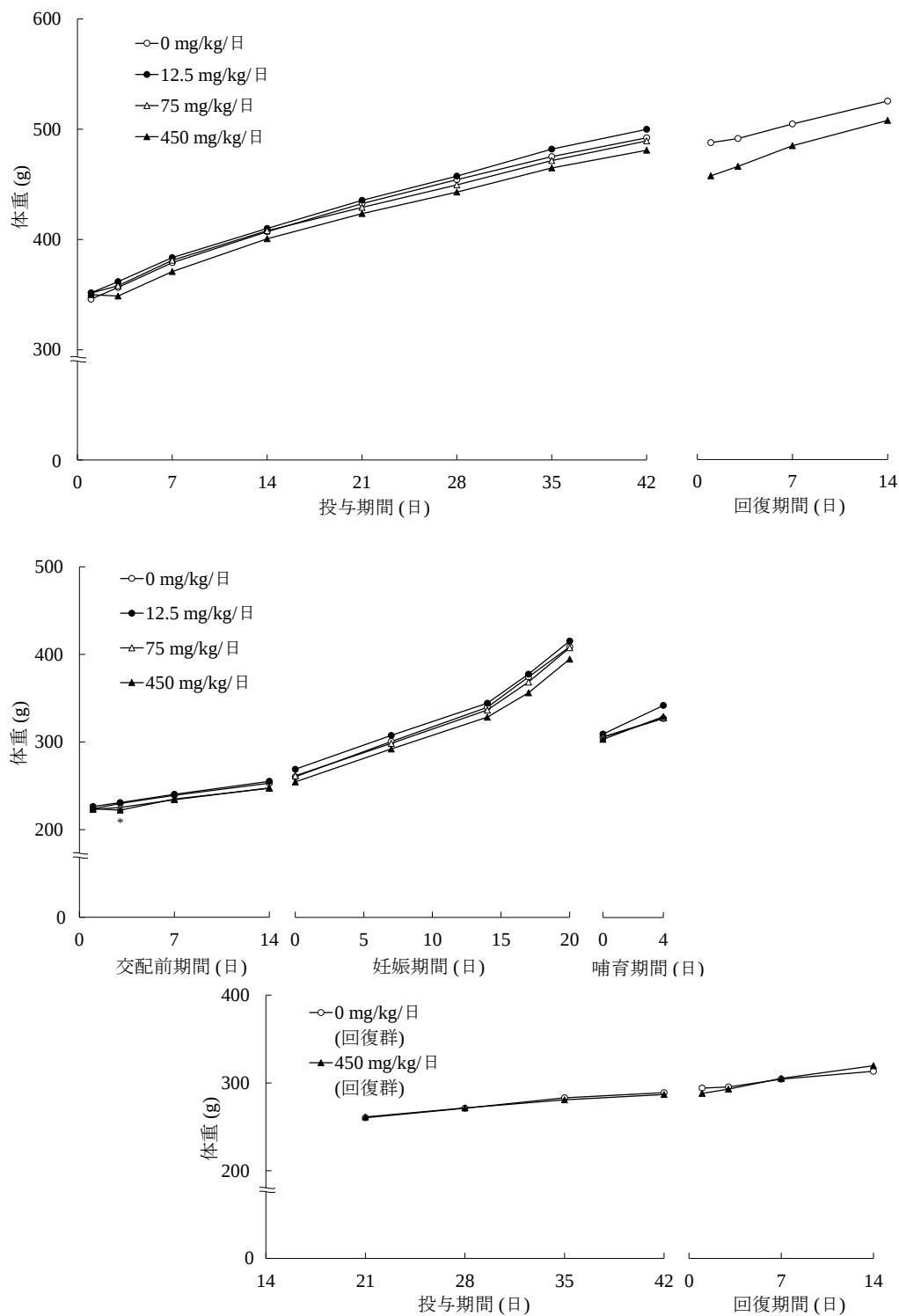


図5 4M2NAの併合試験における体重測定結果
 上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群)
 *：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.05$ ）

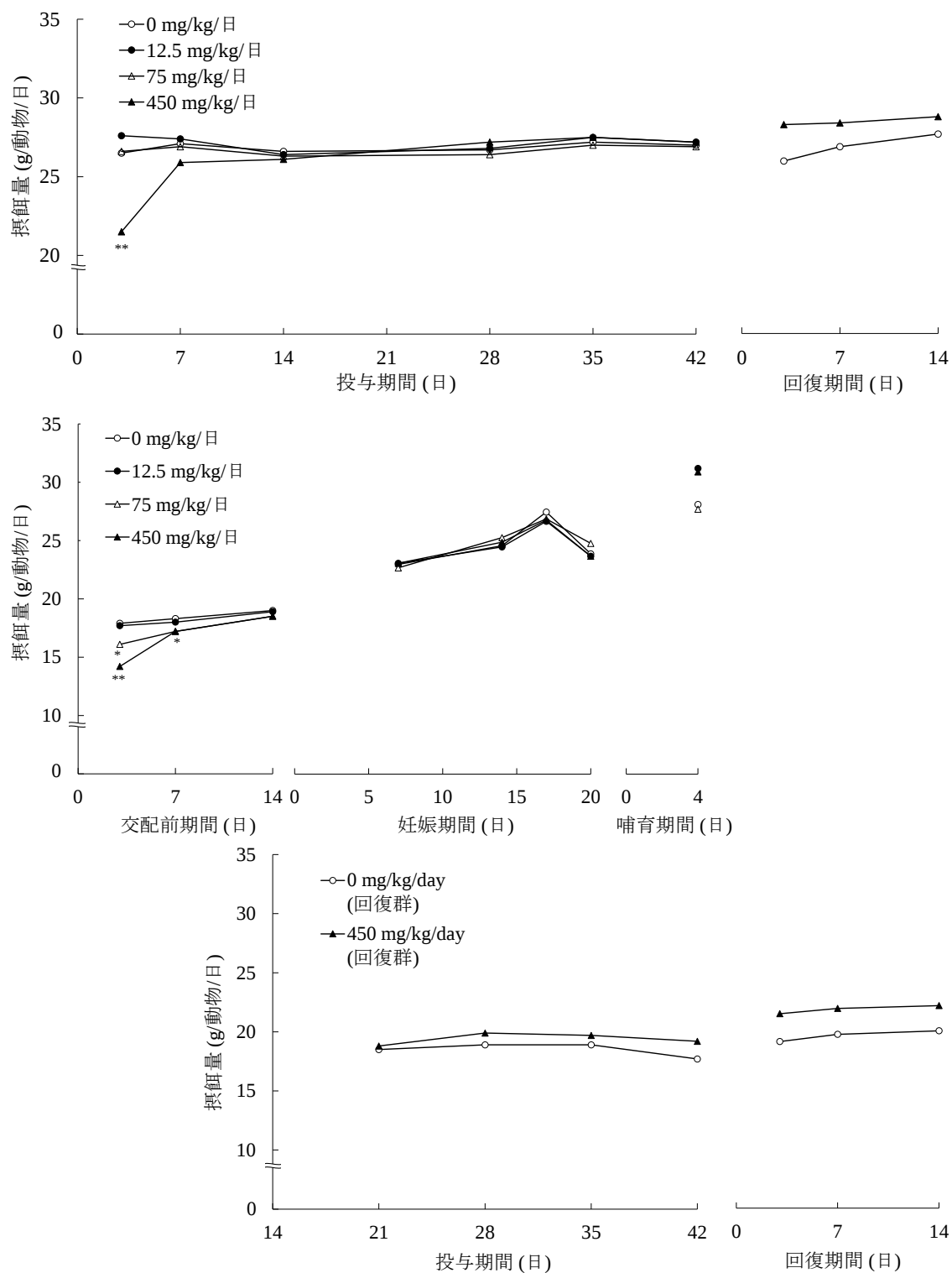


図6 4M2NAの併合試験における摂餌量測定結果

上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群

*：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.05$ ）、**：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.01$ ）

（Tsubokura *et al.*, 2015）

表 1-6 4M2NA の併合試験における血液学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)					
	主試験群			回復群		
	0	12.5	75	450	0	450
動物数	5	5	5	5	5	5
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	860 $\pm$ 14	873 $\pm$ 47	856 $\pm$ 15	835 $\pm$ 24	890 $\pm$ 19	865 $\pm$ 10*
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.9 $\pm$ 0.3	15.8 $\pm$ 0.7	15.4 $\pm$ 0.2	15.1 $\pm$ 0.7	15.9 $\pm$ 0.7	15.9 $\pm$ 0.5
ヘマトクリット値 (%)	46.7 $\pm$ 0.9	46.4 $\pm$ 1.8	45.5 $\pm$ 0.7	45.1 $\pm$ 1.9	46.6 $\pm$ 2.2	46.1 $\pm$ 1.4
MCV (fL)	54.3 $\pm$ 1.5	53.1 $\pm$ 1.4	53.1 $\pm$ 1.1	53.9 $\pm$ 1.5	52.4 $\pm$ 1.6	53.3 $\pm$ 1.2
MCH (pg)	18.5 $\pm$ 0.4	18.2 $\pm$ 0.6	18.0 $\pm$ 0.3	18.0 $\pm$ 0.5	17.9 $\pm$ 0.5	18.4 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)	34.0 $\pm$ 0.5	34.2 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4	33.5 $\pm$ 0.4	34.2 $\pm$ 0.5	34.5 $\pm$ 0.3
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	93.0 $\pm$ 6.4	104.8 $\pm$ 15.0	98.1 $\pm$ 4.0	106.1 $\pm$ 13.0	102.8 $\pm$ 7.3	108.4 $\pm$ 6.4
網状赤血球数比率 (%)	2.0 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.5	2.5 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.1	1.9 $\pm$ 0.7
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	153 $\pm$ 16	108 $\pm$ 9*	108 $\pm$ 20*	133 $\pm$ 33	131 $\pm$ 10	120 $\pm$ 7
白血球百分率 (%)						
好中球	16.1 $\pm$ 2.2	20.7 $\pm$ 6.2	17.3 $\pm$ 7.0	15.6 $\pm$ 4.4	19.8 $\pm$ 3.0	17.2 $\pm$ 6.5
リンパ球	79.4 $\pm$ 2.0	74.6 $\pm$ 6.0	78.2 $\pm$ 8.0	80.0 $\pm$ 4.8	75.2 $\pm$ 3.0	77.8 $\pm$ 6.5
好酸球	1.2 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.4
好塩基球	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.3	0.4 $\pm$ 0.5
単球	1.9 $\pm$ 0.3	2.4 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 1.0	2.0 $\pm$ 0.4	2.2 $\pm$ 0.5	2.2 $\pm$ 0.7
大型非染色球	1.2 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.4
PT (s)	15.3 $\pm$ 2.6	18.3 $\pm$ 2.3	16.9 $\pm$ 2.7	15.4 $\pm$ 2.3	18.4 $\pm$ 5.4	18.9 $\pm$ 1.4
APTT (s)	26.8 $\pm$ 4.2	32.0 $\pm$ 2.2	31.0 $\pm$ 5.4	29.3 $\pm$ 3.7	29.5 $\pm$ 3.7	30.9 $\pm$ 5.2

平均値 $\pm$ 標準偏差*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)

表 1-7 4M2NA の併合試験における血液学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)					
	主試験群			回復群		
	0	12.5	75	450	0	450
動物数	5	5	5	5	5	5
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	746 $\pm$ 25	720 $\pm$ 21	740 $\pm$ 48	684 $\pm$ 42	840 $\pm$ 44	789 $\pm$ 43
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	14.2 $\pm$ 0.5	13.9 $\pm$ 0.6	14.6 $\pm$ 0.6	13.8 $\pm$ 0.6	15.5 $\pm$ 0.6	15.0 $\pm$ 0.7
ヘマトクリット値 (%)	41.5 $\pm$ 1.2	40.8 $\pm$ 1.4	42.8 $\pm$ 2.0	41.2 $\pm$ 1.8	44.8 $\pm$ 1.4	43.6 $\pm$ 1.9
MCV (fL)	55.6 $\pm$ 1.9	56.8 $\pm$ 2.6	58.0 $\pm$ 1.9	60.3 $\pm$ 1.2**	53.3 $\pm$ 1.2	55.3 $\pm$ 1.9
MCH (pg)	19.0 $\pm$ 0.7	19.3 $\pm$ 1.1	19.8 $\pm$ 0.9	20.2 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 0.4	19.1 $\pm$ 0.5
MCHC (g/dL)	34.1 $\pm$ 0.2	33.9 $\pm$ 0.5	34.1 $\pm$ 0.6	33.4 $\pm$ 0.6	34.6 $\pm$ 0.5	34.4 $\pm$ 0.4
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	114.8 $\pm$ 10.2	112.1 $\pm$ 5.8	107.3 $\pm$ 2.4	107.0 $\pm$ 12.9	119.4 $\pm$ 8.1	119.7 $\pm$ 10.7
網状赤血球数比率 (%)	4.5 $\pm$ 1.7	4.6 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 1.3	7.4 $\pm$ 1.6*	1.8 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	118 $\pm$ 40	140 $\pm$ 21	129 $\pm$ 21	168 $\pm$ 24	72 $\pm$ 21	67 $\pm$ 19
白血球百分率 (%)						
好中球	30.1 $\pm$ 1.5	42.2 $\pm$ 7.4	31.9 $\pm$ 10.2	28.9 $\pm$ 5.5	23.4 $\pm$ 4.4	18.1 $\pm$ 4.9
リンパ球	65.4 $\pm$ 1.0	53.3 $\pm$ 6.6*	63.1 $\pm$ 10.3	66.9 $\pm$ 5.9	71.7 $\pm$ 4.1	77.2 $\pm$ 4.6
好酸球	0.8 $\pm$ 0.4	0.7 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.0	1.4 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.7
好塩基球	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.1 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0*
単球	2.1 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.6	2.4 $\pm$ 1.0	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3
大型非染色球	1.6 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.8	1.8 $\pm$ 0.9	1.3 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1
PT (s)	14.0 $\pm$ 1.0	14.0 $\pm$ 0.4	14.6 $\pm$ 0.8	14.4 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.2	14.3 $\pm$ 0.6
APTT (s)	18.3 $\pm$ 3.6	18.5 $\pm$ 2.2	20.1 $\pm$ 2.6	18.6 $\pm$ 2.3	20.5 $\pm$ 0.5	20.8 $\pm$ 1.5

平均値 $\pm$ 標準偏差

* : 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)

** : 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 1-8 4M2NA の併合試験における血液生化学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)							
	主試験群				回復群			
	0	12.5	75	450	0	450	450	450
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	76 ± 2	68 ± 6	76 ± 13	78 ± 23	76 ± 15	78 ± 23	62 ± 4	62 ± 4
ALT (IU/L)	31 ± 3	25 ± 2	32 ± 9	32 ± 8	28 ± 9	32 ± 8	25 ± 2	25 ± 2
ALP (IU/L)	229 ± 47	212 ± 20	233 ± 45	211 ± 51	178 ± 39	211 ± 51	181 ± 48	181 ± 48
ChE (IU/L)	39 ± 2	39 ± 11	51 ± 14	63 ± 34	41 ± 14	63 ± 34	38 ± 5	38 ± 5
γ-GTP (IU/L)	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.5	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.5	1.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4
総コレステロール (mg/dL)	54 ± 11	52 ± 6	54 ± 8	61 ± 10	51 ± 10	61 ± 10	66 ± 10*	66 ± 10*
トリグリセリド (mg/dL)	52 ± 14	62 ± 11	67 ± 28	77 ± 23	41 ± 16	77 ± 23	48 ± 24	48 ± 24
血糖 (mg/dL)	154 ± 11	158 ± 15	162 ± 20	148 ± 17	155 ± 15	148 ± 17	157 ± 17	157 ± 17
総蛋白 (g/dL)	5.8 ± 0.1	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.2	5.8 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2
アルブミン (g/dL)	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.0	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1**	2.8 ± 0.1	2.9 ± 0.1**	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.2
A/G 比	0.90 ± 0.05	0.93 ± 0.06	0.92 ± 0.04	0.98 ± 0.06	0.91 ± 0.07	0.98 ± 0.06	0.90 ± 0.04	0.90 ± 0.04
尿素窒素 (mg/dL)	14.6 ± 2.4	14.2 ± 2.8	14.5 ± 1.3	15.1 ± 1.3	14.0 ± 2.0	15.1 ± 1.3	16.0 ± 3.1	16.0 ± 3.1
クレアチニン (mg/dL)	0.26 ± 0.03	0.24 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.27 ± 0.04	0.25 ± 0.03	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02
総ビリルビン (mg/dL)	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
カルシウム (mg/dL)	9.5 ± 0.3	9.8 ± 0.3	9.8 ± 0.2	10.0 ± 0.2*	9.4 ± 0.2	10.0 ± 0.2*	9.7 ± 0.1*	9.7 ± 0.1*
無機リン (mg/dL)	5.9 ± 0.4	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.7	6.7 ± 0.5	5.6 ± 0.6	6.7 ± 0.5	6.0 ± 0.2	6.0 ± 0.2
ナトリウム (mEq/L)	143 ± 1	143 ± 1	143 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 0	142 ± 0
カリウム (mEq/L)	4.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2
塩素 (mEq/L)	105.9 ± 0.6	105.6 ± 1.2	105.4 ± 1.6	105.0 ± 1.3	105.5 ± 1.7	105.0 ± 1.3	105.7 ± 0.8	105.7 ± 0.8

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 1-9 4M2NA の併合試験における血液生化学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	12.5	75	450	0	450	0	450	0	450
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	87 ± 17	75 ± 13	68 ± 10	82 ± 6	76 ± 15	70 ± 13	76 ± 15	70 ± 13	76 ± 15	70 ± 13
ALT (IU/L)	40 ± 8	38 ± 6	32 ± 7	41 ± 7	26 ± 8	22 ± 7	26 ± 8	22 ± 7	26 ± 8	22 ± 7
ALP (IU/L)	104 ± 22	105 ± 8	116 ± 24	105 ± 28	106 ± 16	94 ± 25	106 ± 16	94 ± 25	106 ± 16	94 ± 25
ChE (IU/L)	259 ± 67	232 ± 47	209 ± 51	155 ± 29*	526 ± 115	429 ± 38	526 ± 115	429 ± 38	526 ± 115	429 ± 38
γ-GTP (IU/L)	0.9 ± 0.4	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3*	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3*	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.3*
総コレステロール (mg/dL)	57 ± 12	61 ± 14	72 ± 17	89 ± 10**	73 ± 15	77 ± 11	73 ± 15	77 ± 11	73 ± 15	77 ± 11
トリグリセリド (mg/dL)	44 ± 21	83 ± 25	74 ± 33	53 ± 8	20 ± 6	20 ± 9	20 ± 6	20 ± 9	20 ± 6	20 ± 9
血糖 (mg/dL)	142 ± 4	149 ± 5	150 ± 10	137 ± 6	149 ± 16	130 ± 21	149 ± 16	130 ± 21	149 ± 16	130 ± 21
総蛋白 (g/dL)	5.9 ± 0.2	5.9 ± 0.1	6.0 ± 0.4	6.0 ± 0.3	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.5	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.5	6.6 ± 0.2	6.6 ± 0.5
アルブミン (g/dL)	2.9 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2	3.3 ± 0.1	3.2 ± 0.2
A/G 比	0.98 ± 0.11	0.96 ± 0.06	1.03 ± 0.11	0.99 ± 0.05	1.01 ± 0.10	0.97 ± 0.09	1.01 ± 0.10	0.97 ± 0.09	1.01 ± 0.10	0.97 ± 0.09
尿素窒素 (mg/dL)	15.8 ± 1.3	15.2 ± 4.1	14.5 ± 2.4	18.8 ± 2.7	16.0 ± 1.9	19.3 ± 3.0	16.0 ± 1.9	19.3 ± 3.0	16.0 ± 1.9	19.3 ± 3.0
クレアチニン (mg/dL)	0.32 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.27 ± 0.02*	0.32 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04	0.30 ± 0.03	0.31 ± 0.04
総ビリルビン (mg/dL)	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.03	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.05	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.01
カルシウム (mg/dL)	10.2 ± 0.2	10.2 ± 0.2	10.0 ± 0.2	10.0 ± 0.3	9.7 ± 0.1	9.6 ± 0.3	9.7 ± 0.1	9.6 ± 0.3	9.7 ± 0.1	9.6 ± 0.3
無機リン (mg/dL)	7.6 ± 0.5	7.6 ± 0.5	6.8 ± 0.2	7.8 ± 1.0	4.5 ± 0.4	5.0 ± 0.3	4.5 ± 0.4	5.0 ± 0.3	4.5 ± 0.4	5.0 ± 0.3
ナトリウム (mEq/L)	142 ± 2	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1	141 ± 1
カリウム (mEq/L)	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.4 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.5	3.7 ± 0.3	3.8 ± 0.5
塩素 (mEq/L)	105.9 ± 0.5	104.9 ± 1.2	106.3 ± 0.3	104.8 ± 1.0	107.0 ± 1.3	106.7 ± 1.1	107.0 ± 1.3	106.7 ± 1.1	107.0 ± 1.3	106.7 ± 1.1

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 1-10 4M2NA の併合試験における器官重量測定結果 (雄)

器官名	用量 (mg/kg/日)							
	主試験群				回復群			
	0	12.5	75	450	0	450	0	450
動物数	7	12	12	7	5	5	5	5
脳 (g)	2.13 ± 0.10	2.17 ± 0.08	2.18 ± 0.11	2.19 ± 0.06	2.10 ± 0.07	2.15 ± 0.09	2.15 ± 0.07	2.15 ± 0.09
(g/100 g)	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.47 ± 0.03	0.47 ± 0.02	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.05	0.43 ± 0.02	0.45 ± 0.05
胸腺 (mg)	344.6 ± 47.0	341.8 ± 75.4	333.2 ± 69.7	295.3 ± 55.4	288.6 ± 95.4	344.8 ± 32.1	288.6 ± 95.4	344.8 ± 32.1
(mg/100 g)	73.7 ± 8.8	72.1 ± 14.9	72.1 ± 14.4	63.4 ± 12.1	58.1 ± 17.3	72.8 ± 8.2	58.1 ± 17.3	72.8 ± 8.2
心臓 (g)	1.50 ± 0.15	1.51 ± 0.18	1.49 ± 0.14	1.45 ± 0.13	1.53 ± 0.07	1.54 ± 0.19	1.53 ± 0.07	1.54 ± 0.19
(g/100 g)	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.31 ± 0.02	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.31 ± 0.01	0.33 ± 0.03
肝臓 (g)	12.15 ± 1.08	12.72 ± 1.13	13.30 ± 1.37	17.64 ± 2.67**	11.98 ± 0.67	14.17 ± 1.53*	11.98 ± 0.67	14.17 ± 1.53*
(g/100 g)	2.60 ± 0.11	2.69 ± 0.14	2.87 ± 0.20*	3.76 ± 0.34**	2.43 ± 0.07	2.98 ± 0.23**	2.43 ± 0.07	2.98 ± 0.23**
脾臓 (g)	0.74 ± 0.03	0.79 ± 0.07	0.75 ± 0.10	0.86 ± 0.14	0.74 ± 0.07	0.77 ± 0.12	0.74 ± 0.07	0.77 ± 0.12
(g/100 g)	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.18 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.15 ± 0.01	0.16 ± 0.03
腎臓 (g)	3.22 ± 0.23	3.26 ± 0.30	3.16 ± 0.30	3.50 ± 0.32	3.05 ± 0.27	3.25 ± 0.37	3.05 ± 0.27	3.25 ± 0.37
(g/100 g)	0.69 ± 0.03	0.69 ± 0.06	0.69 ± 0.08	0.75 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.68 ± 0.04*	0.62 ± 0.05	0.68 ± 0.04*
副腎 (mg)	62.3 ± 6.9	59.8 ± 6.2	60.6 ± 11.6	53.8 ± 7.2	57.5 ± 11.3	61.0 ± 9.9	57.5 ± 11.3	61.0 ± 9.9
(mg/100 g)	13.4 ± 1.6	12.7 ± 1.1	13.1 ± 2.4	11.5 ± 1.3	11.7 ± 2.6	12.9 ± 1.9	11.7 ± 2.6	12.9 ± 1.9
精巣 (g)	3.54 ± 0.33	3.47 ± 0.31	3.31 ± 0.33	3.51 ± 0.17	3.49 ± 0.35	3.16 ± 0.42	3.49 ± 0.35	3.16 ± 0.42
(g/100 g)	0.76 ± 0.07	0.74 ± 0.07	0.72 ± 0.09	0.75 ± 0.08	0.71 ± 0.06	0.66 ± 0.07	0.71 ± 0.06	0.66 ± 0.07
精巣上体 (g)	1.35 ± 0.06	1.29 ± 0.10	1.33 ± 0.12	1.34 ± 0.04	1.33 ± 0.10	1.32 ± 0.23	1.33 ± 0.10	1.32 ± 0.23
(g/100 g)	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.27 ± 0.02	0.28 ± 0.04
解剖日体重 (g)	467.4 ± 32.0	473.0 ± 27.5	462.3 ± 25.4	467.1 ± 30.3	493.8 ± 32.9	475.6 ± 36.7	493.8 ± 32.9	475.6 ± 36.7

平均値 ± 標準偏差、上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 1-11 4M2NA の併合試験における器官重量測定結果 (雌)

器官名	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	12.5	75	450	0	450	0	450	0	450
動物数	11 ^{a)}	12	11 ^{a)}	12	5	5	5	5	5	5
脳 (g)	1.94 ± 0.07	1.93 ± 0.10	1.97 ± 0.08	1.95 ± 0.07	1.97 ± 0.04	1.94 ± 0.09	1.94 ± 0.04	1.94 ± 0.09	1.94 ± 0.04	1.94 ± 0.09
(g/100 g)	0.65 ± 0.05	0.62 ± 0.05	0.66 ± 0.04	0.66 ± 0.04	0.68 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.66 ± 0.05	0.68 ± 0.04	0.66 ± 0.05
胸腺 (mg)	211.0 ± 74.6	193.1 ± 45.1	198.0 ± 82.7	230.1 ± 54.0	265.4 ± 49.5	283.2 ± 24.2	265.4 ± 49.5	283.2 ± 24.2	265.4 ± 49.5	283.2 ± 24.2
(mg/100 g)	69.4 ± 23.0	61.9 ± 14.8	65.5 ± 26.6	77.4 ± 17.5	91.4 ± 17.3	96.7 ± 6.9	91.4 ± 17.3	96.7 ± 6.9	91.4 ± 17.3	96.7 ± 6.9
心臓 (g)	0.98 ± 0.07	1.01 ± 0.06	0.98 ± 0.09	1.01 ± 0.09	0.94 ± 0.05	1.01 ± 0.10	0.94 ± 0.05	1.01 ± 0.10	0.94 ± 0.05	1.01 ± 0.10
(g/100 g)	0.33 ± 0.03	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.03	0.34 ± 0.02	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.32 ± 0.01	0.35 ± 0.03
肝臓 (g)	10.20 ± 0.87	10.22 ± 0.78	10.24 ± 1.05	12.57 ± 0.99**	7.28 ± 0.36	7.85 ± 0.46	7.28 ± 0.36	7.85 ± 0.46	7.28 ± 0.36	7.85 ± 0.46
(g/100 g)	3.40 ± 0.30	3.27 ± 0.20	3.40 ± 0.27	4.23 ± 0.23**	2.51 ± 0.06	2.68 ± 0.18	2.51 ± 0.06	2.68 ± 0.18	2.51 ± 0.06	2.68 ± 0.18
脾臓 (g)	0.63 ± 0.10	0.64 ± 0.11	0.59 ± 0.07	0.80 ± 0.15**	0.50 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.50 ± 0.07	0.58 ± 0.07	0.50 ± 0.07	0.58 ± 0.07
(g/100 g)	0.21 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.27 ± 0.05**	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.03
腎臓 (g)	1.85 ± 0.11	1.88 ± 0.13	1.93 ± 0.13	1.96 ± 0.14	1.83 ± 0.07	1.88 ± 0.13	1.83 ± 0.07	1.88 ± 0.13	1.83 ± 0.07	1.88 ± 0.13
(g/100 g)	0.62 ± 0.05	0.60 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.66 ± 0.03*	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.07	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.07	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.07
副腎 (mg)	78.5 ± 9.0	78.3 ± 10.4	68.2 ± 8.3*	63.0 ± 11.4**	70.1 ± 7.0	76.3 ± 12.4	70.1 ± 7.0	76.3 ± 12.4	70.1 ± 7.0	76.3 ± 12.4
(mg/100 g)	26.2 ± 3.2	25.1 ± 3.2	22.7 ± 2.9*	21.2 ± 3.8**	24.1 ± 2.2	26.2 ± 4.7	24.1 ± 2.2	26.2 ± 4.7	24.1 ± 2.2	26.2 ± 4.7
解剖日体重 (g)	301.0 ± 17.8	312.8 ± 20.2	301.2 ± 20.6	297.0 ± 13.9	290.9 ± 17.2	292.8 ± 17.0	290.9 ± 17.2	292.8 ± 17.0	290.9 ± 17.2	292.8 ± 17.0

平均値 ± 標準偏差、上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

a): 死亡動物および未分娩動物は除いた。

表 1-12 4M2NA の併合試験における剖検所見

所見名	(mg/kg/日)									
	主試験群 (雄)		回復群 (雄)		主試験群 (雌)		回復群 (雌)			
肝臓	0	12.5	75	450	0	450	0 ^{a)}	12.5	75	450
腫大	0/7	0/12	0/12	7/7	0/5	0/5	0/11	0/12	0/12	10/12
白色部	0/7	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/11	0/12	0/12	1/12
脾臓										
黒色化	0/7	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/11	1/12	0/12	9/12
腫大	0/7	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/11	0/12	0/12	2/12

a): 死亡動物の所見は結果表の記載から除いた。

表 1-13 4M2NA の併合試験における病理組織学的検査所見

所見名	グレード	(mg/kg/日)											
		主試験群 (雄)					主試験群 (雌)						
		0	12.5	75	450	回復群 (雄)	0	450	0	12.5	75	450	回復群 (雌)
肝臓													
小葉中心性肝細胞肥大	+	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5/5	0/5
限局性肝細胞壊死	+	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	1/5	0/5
小肉芽腫	+	2/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
脾臓													
うっ血	+	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	2/5	0/5	2/5	0/5
ヘモジデリン沈着	+	1/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	3/5	0/5	1/5	1/5	2/5	0/5
	++	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	3/5	1/5
	+++	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4/5
髓外造血亢進	+	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5
腎臓													
尿管上皮の空胞化	+	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5
髓質の孤在性嚢胞	+	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	2/5	0/5	0/5	0/5
好塩基性尿管	+	0/5	-	-	0/5	1/5	1/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
甲状腺													
濾胞上皮細胞のびまん性肥大	+	0/5	-	-	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5	0/5
異所性胸腺組織	+	0/5	-	-	1/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
左葉無形成		0/5	-	-	0/5	-	-	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5
嚢嚢遺残	+	0/5	-	-	0/5	-	-	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5	3/5

-: 未検査、+: 軽度、++: 中等度、+++: 重度

表 1-14 4M2NA の併合試験における分娩・哺育状態観察所見

所見名	0	用量 (mg/kg/日)		
		12.5	75	450
雌				
胎盤処理不全	0/11	0/12	1/11	0/12
乳頭未発達	0/11	0/12	1/11	1/12

表 1-15 4M2NA の併合試験における生殖発生毒性関連の結果

検査項目	用量 (mg/kg/日)			
	0	12.5	75	450
雌動物数	17	12	12	17
性周期 (日、平均±標準偏差)	4.0 ± 0.0	4.2 ± 0.6	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1
同居動物数	12	12	12	12
交尾動物数	12	12	12	12
妊娠動物数	12	12	11	12
交尾率 ^{a)} (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
受胎率 ^{b)} (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
交尾所要日数 (平均±標準偏差)	1.5 ± 0.7	3.1 ± 3.7	3.7 ± 3.2*	2.4 ± 1.0
妊娠期間 (日、平均±標準偏差)	22.0 ± 0.4	22.1 ± 0.3	22.2 ± 0.4	22.2 ± 0.4
妊娠黄体数 (平均±標準偏差)	16.2 ± 1.5	16.3 ± 2.1	15.7 ± 2.0	16.8 ± 2.3
着床痕数 (平均±標準偏差)	15.3 ± 1.6	15.2 ± 1.5	14.2 ± 2.6	14.7 ± 2.3
着床率 ^{c)} (平均±標準偏差)	94.9 ± 5.6	93.5 ± 7.1	89.8 ± 11.9	88.7 ± 15.4
哺育 0 日				
生児出産動物数	11	12	11	12
出産率 ^{d)} (%)	91.7	100.0	100.0	100.0
産児数 (平均±標準偏差)	13.4 ± 3.4	14.3 ± 1.9	12.5 ± 2.9	13.5 ± 2.7
出產生児数 (平均±標準偏差)	13.2 ± 3.4	14.1 ± 1.8	12.3 ± 2.9	13.4 ± 2.7
0 日生存児数 (平均±標準偏差)	13.2 ± 3.4	13.9 ± 1.8	12.3 ± 2.9	13.2 ± 2.7
出生率 ^{e)} (%、平均±標準偏差)	86.3 ± 19.0	92.7 ± 5.3	86.1 ± 12.2	91.1 ± 9.2
0 日生存率 ^{f)} (%、平均±標準偏差)	98.7 ± 4.3	98.4 ± 4.1	98.0 ± 4.5	99.5 ± 1.8
出産児性比 ^{g)}	78 / 147	70 / 172	65 / 138	87 / 162
(平均±標準偏差)	0.52 ± 0.09	0.40 ± 0.09*	0.47 ± 0.20	0.53 ± 0.14
0 日生存児性比 ^{h)}	77 / 145	68 / 167	63 / 135	86 / 158
(平均±標準偏差)	0.52 ± 0.09	0.41 ± 0.09*	0.46 ± 0.20	0.54 ± 0.14
外表異常児数	0 / 145	0 / 169	0 / 135	0 / 161
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	6.77 ± 0.62	6.57 ± 0.63	6.81 ± 0.31	6.42 ± 0.63
雌	6.41 ± 0.65	6.26 ± 0.52	6.41 ± 0.36	6.08 ± 0.57
哺育 4 日				
生存児を持つ動物数	11	12	11	12
4 日生存児数 (平均±標準偏差)	13.1 ± 3.3	13.8 ± 1.7	11.5 ± 3.5	12.3 ± 4.2
4 日生存率 ⁱ⁾ (%、平均±標準偏差)	99.5 ± 1.7	98.3 ± 3.1	93.8 ± 18.5	91.2 ± 24.3
4 日生存児性比 ^{j)}	77 / 144	68 / 166	60 / 126	80 / 147
(平均±標準偏差)	0.52 ± 0.09	0.41 ± 0.09*	0.47 ± 0.20	0.50 ± 0.21
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	10.89 ± 1.77	10.82 ± 1.25	11.41 ± 1.54	10.11 ± 1.19
雌	10.43 ± 1.69	10.29 ± 1.11	10.87 ± 1.64	9.52 ± 1.10

a) 交尾率：(交尾確認された雌動物数／交配させた雌動物数) ×100

b) 受胎率：(妊娠動物数／交尾確認された雌動物数) ×100

c) 着床率：(着床痕数／妊娠黄体数) ×100

d) 出産率：(生児出産動物数／妊娠動物数) ×100

e) 出生率：(出產生児数／着床痕数) ×100

f) 0 日生存率：(出產生児数／産児数) ×100

g) 出産児性比：雄出産児数／産児数

h) 0 日生存児性比：哺育 0 日雄生存児数／哺育 0 日生存児数

i) 4 日生存率：(哺育 4 日生存児数／出產生児数) ×100

j) 4 日生存児性比：哺育 4 日雄生存児数／哺育 4 日生存児数

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)

1.3.3 考察

4M2NA について併合試験を実施した結果、主に脾臓、肝臓、甲状腺および腎臓への影響が認められた。構造式から血液への影響が予想されていたが、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値に影響は認められなかった。しかし、450 mg/kg 群で脾臓のうっ血、髄外造血亢進およびヘモジデリン沈着（表 1-13）、血液学的検査で網状赤血球数比率の高値が認められた（表 1-7）。髄外造血は、出血や溶血等により大量の血液細胞の補給が必要な場合に認められる（日本トキシコロジー学会編, 2003）。また、ヘモジデリンはヘモグロビンが分解されて生じる色素群であり、溶血性貧血やメトヘモグロビン血症など、赤血球が大量に破壊された際に沈着量が増加する（日本トキシコロジー学会編, 2003）。また、網状赤血球は脱核直後の未熟な赤血球であり、網状赤血球数比率の上昇は赤血球産生の亢進を示す（日本トキシコロジー学会編, 2003）。そのため、4M2NA により軽度の貧血が生じていたことが推察された。しかし、4M2NA と同様の官能基を有する 2-メトキシ-4-ニトロアニリン（CAS No. : 97-52-9）では、28 日間反復投与試験において 100 mg/kg/日でヘマトクリット値の低値が認められ、NOAEL は 30 mg/kg/日と報告されており（MHLW, 1997）、4M2NA より強い毒性が認められている。この理由として官能基の結合部位の違いが考えられるが、官能基の結合部位と毒性の強弱について考察するため、4M2NA と同様にベンゼン環上にニトロ基、アミノ基又はメトキシ基を有する物質について血液毒性の情報を調査した（表 1-16）。その結果、3-ニトロア

ニリン (CAS No. : 99-09-2) では、28 日間反復投与試験において最小毒性量 (LOAEL) が 15 mg/kg/日 (MHLW, 1994b)、4-ニトロアニリン (CAS No. : 100-01-6) では 2 年間反復投与試験で NOAEL が 1.5 mg/kg/日と報告されており (Nair *et al.*, 1990)、いずれも貧血が報告されている。一方、2-ニトロアニリン (CAS No. : 88-74-4) では、50、150、450 mg/kg/日の 3 用量で実施した併合試験において 450 mg/kg/日で軽微な毒性影響がみられたのみで貧血は認められておらず (Sisti, 2001)、3-ニトロアニリンおよび 4-ニトロアニリンと比較し明らかに弱い毒性影響であった。また、メトキシアニリンおよびメトキシニトロベンゼンでは明確な傾向は認められなかった。そのため、今回 4M2NA が 2-メトキシ-4-ニトロアニリンと比較し非常に弱い血液毒性を示した理由として、4M2NA ではアミノ基とニトロ基がオルト位に結合していることが考えられた。しかし、毒性が減弱する機序は不明であった。

また、本研究では、雌雄で肝臓重量の高値 (表 1-10 および 1-11) および肝細胞肥大 (表 1-13)、雌で甲状腺の濾胞上皮細胞のびまん性肥大が認められた (表 1-13)。肝細胞肥大は、一般に生体内に侵入した異物を代謝・解毒するための肝臓の適応性変化として認められ、薬物代謝酵素の誘導を伴う。また、甲状腺の濾胞上皮細胞のびまん性肥大は、血中の甲状腺ホルモン濃度が低下した際に、ネガティブフィードバック機構により濾胞上皮細胞を甲状腺刺激ホルモンが持続的に刺激することにより引き起こされる (日本毒性病学会編, 2017)。薬物代謝酵素を誘導する代表的な物質であるフェノバルビタール

やプレグネノン-16 α -カルボニトリルでは、ラットにおいて薬物代謝酵素としてシトクロム P450 (CYP) 2B や CYP3A のほか、UDP-glucuronosyltransferase 2B (UGT2B) ファミリーを誘導することが報告されている。UGT2B は甲状腺ホルモンであるトリヨードサイロニン (T3) のグルクロン酸抱合を誘導し、血中 T3 レベルの低下を引き起こすことが報告されている (Klaassen and Hood, 2001、Richardson and Klaassen, 2010)。そのため、甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大は、4M2NA により CYP2B、CYP3A や UGT2B が誘導された結果として生じた可能性が考えられた。ヒトと比較しラットではグルクロン酸抱合による T3 レベルの低下が起きやすいことが知られており、この甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大はヒトには外挿されない変化と考えられた (Capen 2001)。

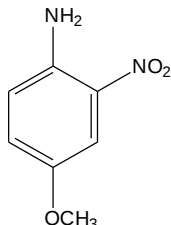
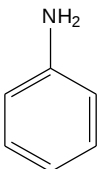
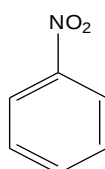
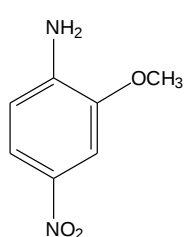
また、本研究では雌で総コレステロール濃度の高値が認められた (表 1-9)。4M2NA が UGT2B の誘導により T3 レベルの低下を引き起こしていた場合、このコレステロールの変化は T3 レベルの低下に関連した変化の可能性がある。肝臓での低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体の発現は sterol regulatory element binding protein-2 (SREBP-2) により上方に制御されており、SREBP-2 の発現は甲状腺ホルモンにより制御されている (Shin and Osborne, 2003)。そのため、甲状腺ホルモンレベルの低下が SREBP-2 の発現を低下させ、それにより LDL-受容体の発現の低下およびコレステロールの肝臓への取り込みが低下し、最終的に血中コレステロールレベルが上昇した可能性が考えられた。なお、雌のみでコレステロール濃度の高値が認められた理由については不明であった。

腎臓において、尿細管上皮の空胞化が雌の 450 mg/kg 群で 5 例中 2 例に認められた (表 1-13)。尿細管上皮の空胞化は液胞又はライソゾームの大型化や増加のことが多く、前者は糖類などの投与による浸透圧性腎症の際に認められ、後者は陽イオン性両親媒性化合物の投与によるリン脂質症で認められる (日本毒性病理学会編, 2017)。本研究でみられた変化は機序が不明であるが、血液生化学的検査において腎毒性に関連する BUN、クレアチニンに異常が認められないため (表 1-9)、毒性学的意義の乏しい変化と考えた。

また、ニトロベンゼンで認められる精巣への影響については、4M2NA では認められなかった。精巣への影響は 2-ニトロアニリンでも認められていない (Sisti, 2001) ことから、アミノ基とニトロ基がオルト位に結合していることが精巣への影響が認められなかった原因として考えられた。

4M2NA の NOAEL は、反復投与毒性については、雌の 450 mg/kg 群で網状赤血球数比率の高値並びに脾臓の髄外造血亢進およびヘモジデリン沈着が認められたため 75 mg/kg/日、生殖発生毒性については、450 mg/kg 群で異常が認められなかったため 450 mg/kg/日と考えられた。

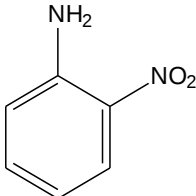
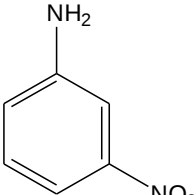
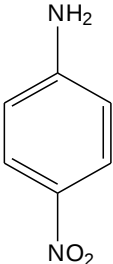
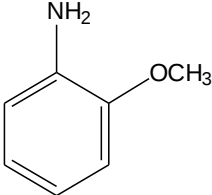
表 1-16 4M2NA および類似物質の毒性情報

名称および CAS 番号	構造式	毒性試験における貧血に関連する情報
4-メキシ-2-ニトロアニリン CAS No. 96-96-8		NOAEL : 75 mg/kg/日 動物種 : SD ラット 投与期間 : 42~55 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 12.5、75、450 mg/kg/日 RBC、Hb および Ht に影響は認められなかった。 雌の 450 mg/kg 群で網状赤血球数比率の高値、脾臓のうっ血および髄外造血亢進が認められた。
アニリン*1 CAS No. 62-53-3		LOAEL : 600 ppm (アニリン換算 : 30 mg/kg/日) 動物種 : SD ラット 投与期間 : 30~90 日間 投与経路 : 飲水投与 投与用量 : 600 ppm 投与 30 および 90 日目に RBC、Hb および Ht の低値が認められた (Khan <i>et al.</i> , 1993)。
ニトロベンゼン CAS No. 98-95-3		NOAEL : 5 mg/kg/日 動物種 : F344 ラット 投与期間 : 28 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 5、25、125 mg/kg/日 25 mg/kg 以上の群で RBC、Hb および Ht の低値が認められた (Shimo <i>et al.</i> , 1994)。
2-メキシ-4-ニトロアニリン CAS No. 97-52-9		NOAEL : 30 mg/kg/日 動物種 : SD ラット 投与期間 : 28 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 30、100、300 mg/kg/日 雌の 100 mg/kg 群で Ht の低値が認められた (MHLW, 1997)。

RBC : 赤血球数、Hb : ヘモグロビン濃度、Ht : ヘマトクリット値

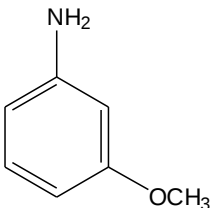
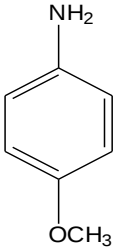
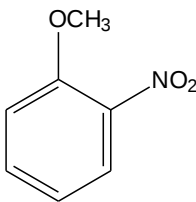
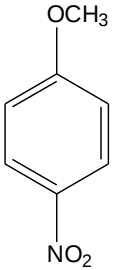
*1 : アニリン塩酸塩 (CAS No. 142-04-1) として試験を実施

表 1-16 4M2NA および類似物質の毒性情報（続き）

名称および CAS 番号	構造式	毒性試験における貧血に関連する情報
2-ニトロアニリン CAS No. 88-74-4		NOAEL : ≥ 100 mg/kg/日 動物種 : SD ラット 投与期間 : 14 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 1、10、100 mg/kg/日 すべての投与群に影響は認められなかった (Komsta <i>et al.</i> , 1989)。
3-ニトロアニリン CAS No. 99-09-2		LOAEL : 15 mg/kg/日 動物種 : F344 rat 投与期間 : 28 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 15、50、170 mg/kg/日 15 mg/kg 以上の群において RBC、Hb および Ht の低値が認められた (MHLW, 1994b)。
4-ニトロアニリン CAS No. 100-01-6		NOAEL : 1.5 mg/kg/日 (RBC および Hb の結果から) 動物種 : SD ラット 投与期間 : 12 か月間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 0.25、1.5、9.0 mg/kg/日 9.0 mg/kg 群において RBC および Hb の低値が認められた (Nair <i>et al.</i> , 1990)。
2-メトキシアニリン CAS No. 90-04-0		NOAEL : 16 mg/kg/日 動物種 : Wistar ラット 投与期間 : 28 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 16、80、400 mg/kg/日 80 mg/kg 以上の群において軽度の溶血性貧血が認められた (European Chemicals Bureau, 2002)。

RBC : 赤血球数、Hb : ヘモグロビン濃度、Ht : ヘマトクリット値

表 1-16 4M2NA および類似物質の毒性情報（続き）

名称および CAS 番号	構造式	毒性試験における貧血に関連する情報
3-メトキシアニリン CAS No. 536-90-3		NOAEL : 12 mg/kg/日 (RBC、Hb、Ht の結果から) 動物種 : SD ラット 投与期間 : 40～50 日間 投与経路 : 強制経口投与 投与用量 : 2.4、12、60、300 mg/kg/日 60 mg/kg 以上の群の雄で RBC、Hb および Ht の低値が認められた (MHLW, 1994a)。
4-メトキシアニリン*2 CAS No. 104-94-9		NOAEL : 0.3% (4-メトキシアニリン換算:約 160 mg/kg/日) 動物種 : ラット 投与期間 : 8 週間 投与経路 : 混餌投与 投与用量 : 0.1、0.3、1、3% 1%群で脾臓の暗紫色化および黒色化が認められた (National Cancer Institute, 1978)。血液学的検査は実施されていない。
1-メトキシ-2-ニトロベンゼン CAS No. 91-23-6		LOAEL : 583 ppm (約 40 mg/kg/日) 動物種 : F344 ラット 投与期間 : 14 日間 投与経路 : 混餌投与 投与用量 : 583、1166、2332、4665、9330 ppm すべての群の雄で RBC、Hb および Ht の低値が認められた (National Toxicology Program, 1993)。
1-メトキシ-4-ニトロベンゼン CAS No. 100-17-4		LOAEL : 2000 ppm (約 140 mg/kg/日) 動物種 : F344 ラット 投与期間 : 2 年間 投与経路 : 混餌投与 投与用量 : 2000、4000、8000 ppm 4000 ppm 以上の群の雄および 2000 ppm 以上の群の雌で貧血が認められた (Kano <i>et al.</i> , 2005)。

RBC : 赤血球数、Hb : ヘモグロビン濃度、Ht : ヘマトクリット値

*2 : 4-メトキシアニリン塩酸塩 (CAS No. 20265-97-8) として試験を実施

1-メトキシ-3-ニトロベンゼンについては、情報が得られなかった。

第二章 benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs.の毒性評価

2.1 緒言

benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs. (BOTD) は図 3 のようにジフェニルエーテルにドデシル基が結合した化合物であり、分子式は $C_{24}H_{34}O$ 、分子量は 338.54 の無色透明の液体である。ドデシル基は様々な分岐を有するものが存在し、また、ジフェニルエーテルへの結合部位も 3 種類あるため、BOTD は多数の異性体の混合物である。BOTD は耐熱性の高い潤滑油として電子機器や自動車、食品製造用の機械に使用されているほか、洗剤に使用されるアルキルジフェニルエーテルスルホン酸塩の原料として使用されている。これまでに BOTD の部分構造物である 4-ドデシルフェノールは、反復投与毒性試験において副腎、腎臓、肝臓、甲状腺および生殖器への毒性影響 (ECHA, 2004b、ECHA, 2012a)、二世代繁殖毒性試験においては F2 世代の生存率の低下が報告されている (ECHA, 2012b)。そのため、BOTD についても同様に臓器に対する毒性や生殖発生毒性を引き起こすことが懸念されているが、BOTD の毒性については現在まで報告がない。そこで、本研究では BOTD の安全性評価のため、本物質について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験 (併合試験) を実施し、毒性評価を行った。

2.2 用量設定試験

BOTD について併合試験における投与用量を設定するため、14 日間反復投与毒性試験を行った。

2.2.1 材料および方法

被験物質として、花王株式会社から提供された BOTD {ロット番号：2010-S-007、純度：98.8% (モノ体) (不純物：ジ体 1.2%)} を試験に使用した。BOTD をオリーブ油（日本薬局方、日興製薬）に溶解させ、0（オリーブ油）、25、250、500 および 1000 mg/kg/日の用量で 14 日間投与した。投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用い、強制経口投与を行った。動物は 9 週齢の Crl:CD(SD)ラットを用いて 1 群雌雄各 3 匹とした。投与期間中は一般状態観察および体重測定を実施し、解剖日に血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量測定および剖検を行った (2.3.1.7 参照)。

2.2.2 結果

血液学的検査において雄の 250 mg/kg 以上の群で主として外因系の血液凝固因子と関連するプロトロンビン時間 (Prothrombin time : PT) および主として内因系の血液凝固因子と関連する活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated partial thromboplastin time : APTT) の有意な延長、雌の 1000 mg/kg 群で PT の有意な延長および APTT の延長傾向がみられた。また、血液生化学的検査において、雌の 1000 mg/kg 群で γ -グルタミルトランスぺプチターゼ (γ -Glutamyl transpeptidase : γ -GTP) 活性および総コレステロール濃度の有意な高値がみられた。器官重量では、雄の 250 mg/kg 以上の群で肝臓の相対重量の有意な高値、500 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対重量の有意な高値、250 mg/kg 群で肝臓の絶対重量の高値傾向がみられた。また、雌の 500 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対および

相対重量の有意な高値がみられた。剖検では、雌雄ともに、250 mg/kg 以上の群で肝臓の腫大がみられた。

2.2.3 考察

1000 mg/kg 群の雌雄において肝重量の高値が認められたが、他に重篤な毒性影響を示唆する変化が認められなかったことから、併合試験で 1000 mg/kg/日を経口投与しても親動物に死亡又は瀕死が発生する可能性は低いと考えられた。そのため、BOTD の併合試験では 1000、200 および 40 mg/kg/日の 3 用量が適切と考えられた。

2.3 併合試験

2.3.1 材料および方法

試験は OECD テストガイドライン {TG422：反復投与毒性試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の複合試験（1996.3.22 採択）} に準拠し、優良試験所基準（GLP：Good Laboratory Practice）で実施した。また、LABORATORY ANIMAL SCIENCE（1987、American Association for Laboratory Animal Science）を参考に一般財団法人 化学物質評価研究機構日田事業所が作成した「日田事業所動物実験に関する指針」および「ヘルシンキ宣言」（1964 年制定）の主旨に沿って試験を行った。

2.3.1.1 被験物質

花王株式会社から提供された BOTD {ロット番号：2010-S-007、純度：98.8%（モノ体）（不純物：ジ体 1.2%）} を試験に使用した。

2.3.1.2 飼育動物

日本チャールス・リバー日野飼育センターから 8 週齢の Crl:CD(SD)ラット (SPF) の雄 55 匹、雌 65 匹を入手し、7 日間の検疫を含む 9 日間の馴化を行った。雌では、入荷翌日から 6 日間の性周期を検査した。検疫・馴化期間中、すべての動物に異常は認められなかった。

投与開始 2 日前に測定した体重を用いて、対照群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、低用量群 (雄 12 匹、雌 12 匹)、中用量群 (雄 12 匹、雌 12 匹)、高用量群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、対照群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹)、高用量群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹) の計 6 群に体重層別無作為抽出法により群分けした (表 2-1)。投与開始時の動物の週齢は雌雄とも 9 週齢で、体重範囲は雄が 331.6~370.6 g、雌が 208.4~244.1 g であった。また、雌雄ともに投与 1 日目の体重が、各群の平均体重 $\pm$ 20%の範囲内にあることを確認した。

2.3.1.3 飼育環境

動物は、全飼育期間を通して、温度 21~25°C、相対湿度 40~70%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯, 19 時消灯) に設定したバリアシステム of 飼育室で飼育した。ケージは、群分け前は雌雄ともにステンレス製金網床ケージを使用して群飼育した。群分け後は、雄はステンレス製金網床ケージで個別飼育した。雌は妊娠 13 日まではステンレス製金網床ケージを使用し、妊娠 14 日から解剖前日までは床敷 (サンフレーク、日本チャールス・リバー) を入れたポリカーボネイト製平床ケージ

を使用して個別又は児動物とともに飼育した。また、妊娠 0 日から解剖前日まではエンリッチメント（ウッドバイト S、日本チャールス・リバー）をケージ内に入れた。回復期間中は雌雄ともステンレス製金網床ケージを使用して個別飼育した。なお、交配中は雄のケージに雌雄各 1 匹で飼育した。飼料は実験動物用固形飼料（MF、オリエンタル酵母工業）、飲料水は塩素添加（約 5 mg/L）水道水を自由摂取させた。飼育器材および餌料はオートクレーブ滅菌（121℃、30 分間）したものを使用した。

2.3.1.4 被験物質の設定用量

用量設定試験の結果から、1000、200 および 40 mg/kg/日の 3 用量を設定した。群構成を表 2-1 に示す。

2.3.1.5 投与および回復期間

投与期間は、雄の主試験群および回復群並びに雌の回復群は 42 日間、雌の主試験群は交配前期間（14 日間）、交配期間（最長 14 日間）、妊娠期間および哺育期間（5 日間）

表 2-1 BOTD の併合試験における群構成

試験群	投与用量 (mg/kg/日)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液濃度 (w/v%)	動物数（匹）	
				雄	雌
媒体対照（主試験）	0	4	0	7	12
媒体対照（回復）	0	4	0	5	5
被 低用量（主試験）	40	4	1.00	12	12
験 中用量（主試験）	200	4	5.00	12	12
物 高用量（主試験）	1000	4	25.0	7	12
質 高用量（回復）	1000	4	25.0	5	5

の 42～53 日間とした。また、回復期間は雌雄とも 42 日間投与した後、14 日間の休薬期間を設けた。

2.3.1.6 投与

被験物質をオリーブ油に溶解させ 25.0 w/v%の被験物質液を調製した。さらに、25.0 w/v%液をオリーブ油で希釈して 5.00 および 1.00 w/v%の被験物質液を調製した。25.0、5.00 および 1.00 w/v%の被験物質液をそれぞれ高、中および低用量群に体重 1 kg あたり 4 mL の液量で強制経口投与した。投与にはネラトンカテーテル（テルモ）を取り付けた注射筒（テルモ）を用いた。対照群にはオリーブ油を同様にして投与した。投与は 9 時から 13 時の間に行い、分娩途中の動物は分娩終了後に行った。

2.3.1.7 反復投与毒性に関する観察・検査

2.3.1.7.1 一般状態観察、詳細な一般状態観察、機能検査、体重測定および摂餌量測定

1.3.1.7.1～1.3.1.7.4 に記載の条件と同様にして行った。なお、検査の結果、雄の握力について高用量群で統計学的に有意な変化が認められたため、雄の握力のみ回復 2 週目にも検査を実施した。

2.3.1.7.2 血液検査

投与期間の最終日又は回復期間の最終日から 16～20 時間絶食させた後、麻酔下で腹部大動脈から採血した。採血して得た全血、血漿および血清を用いて表 2-2 および 2-3 の項目を測定した。全血は EDTA-2K 添加採血びん（SB-41、シスメックス）で採血し

た。PT および APTT 測定用の血漿は、抗凝固剤にクエン酸三ナトリウム二水和物（和光純薬工業）の 3.2 w/v% 水溶液を用いて採血し、遠心分離（3000 r.p.m.×10 分間）して調製した。乳酸脱水素酵素用の血漿は抗凝固剤にヘパリンナトリウム注射液（10000 単位/10 mL、扶桑薬品工業）を用いて採血し、遠心分離（3000 r.p.m.×10 分間）して調製した。血清は、採血した後、遠心分離（3000 r.p.m.×10 分間）して調製した。採血は機能検査を行った各群 5 匹の動物について実施した。

表 2-2 BOTD の併合試験における血液学的検査項目

検査項目	機器	試料
赤血球数	全自動総合血液学分析装置 CELL-DYN3500（アボットラボラトリーズ）	全血
白血球数		
ヘモグロビン濃度		
ヘマトクリット値		
平均赤血球容積（MCV）		
平均赤血球ヘモグロビン量（MCH）		
平均赤血球ヘモグロビン濃度（MCHC）		
血小板数	総合血液学検査装置 ADVIA 120（シーメンス）	血漿
網状赤血球数比率		
白血球百分率		
好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、単球、大型非染色球		
プロトロンビン時間（PT）	全自動血液凝固線溶測定装置 STA Compact（ロシュ・ダイアグノスティックス）	血漿
活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）		

表 2-3 BOTD の併合試験における血液生化学的検査項目

検査項目	機器	試料
アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)		
アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)		
アルカリ性フォスファターゼ (ALP)		
γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (γ -GTP)		
総コレステロール	生化学自動分析装置	血清
トリグリセリド	7180 型 (日立製作所)	
血糖		
総蛋白		
アルブミン		
リン脂質		
乳酸脱水素酵素 (LDH)		血漿
A/G 比	—	—
尿素窒素		
クレアチニン		
総ビリルビン	生化学自動分析装置	
総胆汁酸	7180 型 (日立製作所)	
カルシウム		血清
無機リン		
ナトリウム	電解質分析装置 PVA-	
カリウム		
塩素	EX II (A&T)	

2.3.1.7.3 剖検

生存例について、麻酔下での放血により安楽死させた後、体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔とその内容について肉眼的観察を行った。主試験群は最終投与日の翌日、回復群は回復期間終了日の翌日に実施した。なお、交尾が成立しなかった雌雄については交配期間終了後に同様の観察を行った。また、妊娠 25 日までに分娩

が確認できなかった雌は妊娠 25 日以降に、全腹児が死亡した雌は発見時に同様の観察を行った。死亡動物は発見時に同様の観察を行った。

2.3.1.7.4 組織採取および器官重量測定

全例について、表 2-4 の器官・組織を採取した。精巣および精巣上体は変法デビットソン液で固定し (Latendresse *et al.*, 2002)、その他の器官・組織は 10% 中性緩衝ホルマリン液 (りん酸緩衝液) で固定した。採取した器官又は組織のうち、表 2-4 の*を付した器官・組織は重量を測定し、解剖日の体重を基に相対重量を算出した。なお、腎臓、精巣、精巣上体、卵巣および副腎は左右の器官をまとめて測定した。

2.3.1.7.5 病理組織学的検査

固定した器官・組織からパラフィン包埋薄切切片を作り、HE 染色 (日本病理学会編, 1981、大畑, 1999) 後、光学顕微鏡観察により検査した。対照群および 1000 mg/kg 群は

表 2-4 BOTD の併合試験における採取器官・組織

分類	器官・組織
呼吸器系	気管、肺
消化器系	胃、腸 (十二指腸から直腸、パイエル板を含む)、肝臓*
心・血管系	心臓*
泌尿器系	腎臓*、膀胱
生殖器系	精巣*、精巣上体*、前立腺、精嚢、卵巣*、子宮*、陰
神経系	脳* (大脳、小脳および脳橋を含む)、脊髄、坐骨神経
造血器系	骨髄 (大腿骨)、腋窩リンパ節、腸間膜リンパ節、脾臓*、胸腺*
内分泌系	下垂体*、甲状腺* (上皮小体を含む)、副腎*
感覚器	眼球

採取したすべての器官・組織について検査した。40 および 200 mg/kg 群については、雌雄の肝臓および甲状腺、雌の脾臓、回復群については、雌雄の肝臓および甲状腺、雄の精巣、大脳、小脳、脳橋、雌の脾臓、心臓、腎臓、副腎についても検査した。また、肉眼的病変部についても検査した。交尾が成立しなかった雌雄および分娩が確認されなかった雌および対の雄は、下垂体の他、精巣および精巣上体又は卵巣、子宮および膣についても検査を行った。全腹児が死亡した雌は、前胃、腺胃、心臓、卵巣、子宮、膣、胸腺、下垂体、副腎についても検査した。また、検査の結果、脾臓にヘモジデリンの沈着が疑われた。ヘモジデリンはヘモグロビンが分解されて生じる色素群であり、溶血性貧血やメトヘモグロビン血症など、赤血球が大量に破壊された際に沈着量が増加する（日本トキシコロジー学会編, 2003）。そこで、ヘモジデリン沈着の有無について検討するため、対照群と 1000 mg/kg 群の雌の各 2 匹の脾臓について、ベルリン青染色を行い検査した（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999）。

2.3.1.8 生殖発生毒性に関する観察・検査

2.3.1.8.1 性周期検査

雌全例について、投与 1 日目から 14 日目まで膣垢を採取し、ギムザ染色後、光学顕微鏡的に検査して（日本毒性病理学会編, 2017）、発情期から次の発情期までの性周期日数を求めて平均性周期日数を算出した。

2.3.1.8.2 生殖能力検査

1.3.1.8.2 に記載の条件と同様にして行った。

2.3.1.9 統計学的方法

1.3.1.9 に記載の条件と同様にして行った。

2.3.2 結果

2.3.2.1 状態、機能、体重および摂餌量に対する影響

一般状態観察結果を表 2-5 に示す。被験物質投与の影響ではないが、200 mg/kg 群の雄 1 例が投与 5 日目に、対照群の雌 1 例が妊娠 23 日目に死亡した。一般状態観察では、1000 mg/kg 群において、投与後に一過性の流涎が雄 12 例中 3 例、主試験群の雌 12 例中 1 例、回復群の雌 5 例中 3 例で認められた。機能検査結果のうち、対照群と統計学的有意差が認められた握力検査結果を表 2-6 に示す。雄の 40 および 1000 mg/kg 群で前肢の握力に有意な低値が認められた。しかし、背景値の範囲 {範囲 (平均 $\pm$ 2S.D.) 339.91～607.63 g} 内の変動であった。雌の握力に有意な変動は認められなかった。体重測定結果を図 7 に示す。雄では有意な変動は認められなかった。雌では 1000 mg/kg の回復群で投与 21 日目から回復 14 日目まで有意な低値が認められたが、1000 mg/kg の主試験群には有意な変動は認められなかった。摂餌量測定結果を図 8 に示す。雄では 1000 mg/kg 群で投与 7 日目から 42 日目、回復 14 日目に有意な高値が認められた。雌では 1000 mg/kg 群および 200 mg/kg 群で投与 3 日目に有意な低値が認められた。また、1000 mg/kg

群で妊娠 17 日および 20 日、200 mg/kg 群で妊娠 20 日目に有意な高値が認められた。これらの摂餌量の変動は、体重に有意な変動が認められないため毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

2.3.2.2 血液学的性状に対する影響

血液学的検査結果を表 2-7 および 2-8 に示す。主試験群では、雄の 200 mg/kg 以上の群で PT および APTT の有意な延長がみられた。雌では、1000 mg/kg 群で PT の有意な短縮が認められた。雌雄ともに、他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

2.3.2.3 血液生化学的性状に対する影響

血液生化学的検査結果を表 2-9 および 2-10 に示す。主試験群において、雄の 40 mg/kg 以上の群でカルシウム濃度の有意な高値、200 mg/kg 以上の群で総蛋白濃度の有意な高値、1000 mg/kg 群で AST 活性の有意な低値が認められたが、背景値の範囲内の変動であり、毒性学的に意義のない変動と考えられた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。回復群の雄には被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

雌では、被験物質投与の影響と考えられる変動として、1000 mg/kg 群で γ -GTP 活性、総コレステロール濃度およびリン脂質濃度の有意な高値並びに A/G 比の低値、200

mg/kg 以上の群でトリグリセリド濃度の有意な低値が認められた。これらの変動のうち、 γ -GTP 活性、総コレステロール濃度およびリン脂質濃度については、雌の回復群では消失していたが、トリグリセリド濃度および A/G 比については、回復群でも変動が認められた。このほか、40 mg/kg 以上の群で血糖値および総ビリルビン濃度の有意な低値、200 mg/kg 以上の群でカルシウム濃度および無機リン濃度の有意な低値、1000 mg/kg 群で塩化物イオン濃度の有意な高値がみられた。しかし、これらの変動は背景値の範囲内の変動であり、毒性学的に意義のある変動ではないと考えられた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

2.3.2.4 器官重量に対する影響

器官重量測定結果を表 2-11 および 2-12 に示す。主試験群では、被験物質投与の影響と考えられる変動として雄の 40 mg/kg 以上の群および雌の 200 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値がみられた。また、雌の 200 mg/kg 以上の群で甲状腺の絶対および相対重量の有意な高値、1000 mg/kg 群で心臓の相対重量の有意な高値がみられた。雌雄ともに、その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

回復群では、雌の 1000 mg/kg 群で心臓の相対重量の有意な高値がみられた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

2.3.2.5 体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響

剖検結果のうち被験物質投与の影響と考えられた変化を表 2-14 に示す。主試験群では、腹腔において、肝臓の腫大が雄の 1000 mg/kg 群で 7 例全例、200 mg/kg 群で 10 例中 5 例、雌の 1000 mg/kg 群で 9 例全例、200 mg/kg 群で 10 例中 5 例にみられた。また、雌の 1000 mg/kg 群で脾臓の黒色化が 1 例に認められた。体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔および骨盤腔に被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

2.3.2.6 病理組織学的観察

器官重量測定および剖検において被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた肝臓、甲状腺および脾臓の結果を表 2-14 に示す。主試験群において、雄の 200 mg/kg 以上の群および雌の 40 mg/kg 以上の群で軽度又は中等度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。また、雄の 1000 mg/kg 群および雌の 200 mg/kg 以上の群で甲状腺のびまん性の濾胞上皮細胞肥大、雌の 1000 mg/kg 群で脾臓のうっ血が認められた。これらの変化は雌雄ともに回復群では消失した。

2.3.2.7 生殖および発生に対する影響

分娩・哺育状態についての観察結果を表 2-15 に示す。200 mg/kg 群の 1 例で分娩日に胎盤処理、営巣行動であるリトリベイング行動、授乳のため児動物を抱え込む行動であるクラウチング行動の不全を伴う哺育状態の不良がみられ、哺育 2 日に全腹児が死亡し

た。また、対照群の 1 例で分娩や哺育状態に異常は認められなかったが、哺育 1 日に全腹児が死亡した。40 および 1000 mg/kg 群では分娩・哺育状態に異常は認められなかった。生殖発生毒性に関する観察・検査結果を表 2-16 に示す。1000 mg/kg 群で 3 例が不妊となり、受胎率が 75.0%であった。また、哺育 0 日の児動物の体重について、200 mg/kg 以上の群の雄および 1000 mg/kg 群の雌について有意な高値がみられた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

表 2-5 BOTD の併合試験における一般状態観察所見

所見名	用量 (mg/kg/日)				回復期間	
	0	投与期間			0	1000
雄		40	200	1000		
流涎	0/12	0/12	0/12	3/12	0/5	0/5
死亡	0/12	0/12	1/12	0/12	0/5	0/5
雌						
流涎	0/17	0/12	0/12	4/17	0/5	0/5
死亡	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5
自発運動低下	0/17	0/12	1/12	0/17	0/5	0/5
呼吸数減少	0/17	0/12	1/12	0/17	0/5	0/5
下腹部の汚れ	2/17	1/12	1/12	0/17	0/5	0/5
鼻・口周囲の汚れ	1/17	0/12	0/12	0/17	0/5	0/5

表 2-6 BOTD の併合試験における握力検査結果

性	検査 時期	用量 (mg/kg/日)	動物数	前肢 (g)	後肢 (g)
雄		0	5	555.0 ± 16.1	445.4 ± 69.4
	投与	40	5	456.0 ± 80.3 *	450.8 ± 44.7
	6 週目	200	5	535.0 ± 30.3	494.6 ± 76.2
		1000	5	450.2 ± 23.8 *	436.4 ± 49.5
	回復	0	5	471.0 ± 38.2	481.8 ± 6.9
	2 週目	1000	5	482.6 ± 39.1	474.4 ± 30.3
雌		0	5	399.4 ± 22.7	372.6 ± 53.1
	哺育	40	5	412.6 ± 45.8	350.0 ± 41.3
	4 日	200	5	373.6 ± 54.4	404.4 ± 32.5
		1000	5	409.0 ± 52.8	443.8 ± 66.3
	投与	0	5	428.4 ± 38.2	379.2 ± 46.1
	6 週目	1000	5	383.4 ± 51.8	353.2 ± 38.5

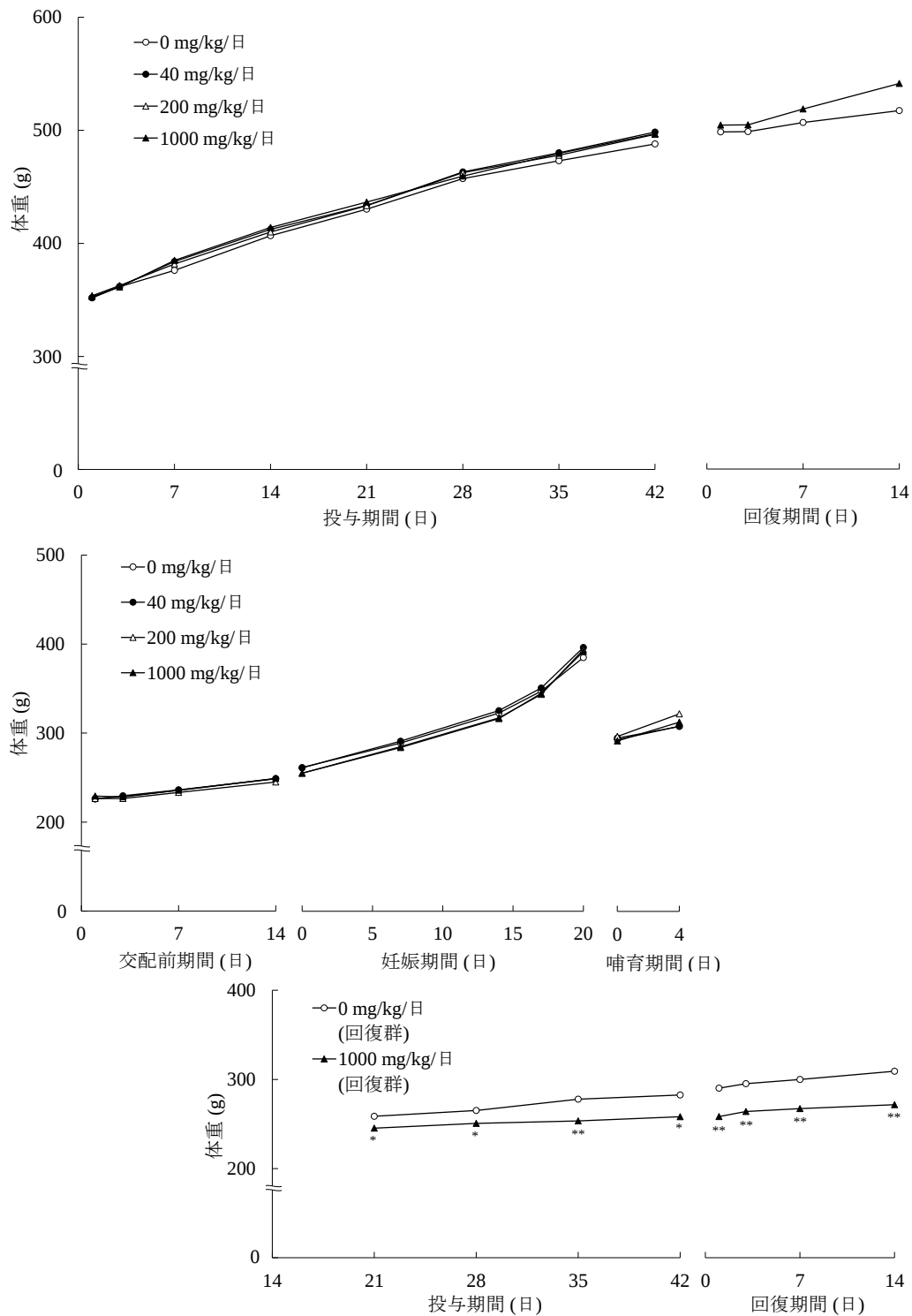


図7 BOTDの併合試験における体重測定結果

上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群)

*：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.05$ ）、**：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.01$ ）

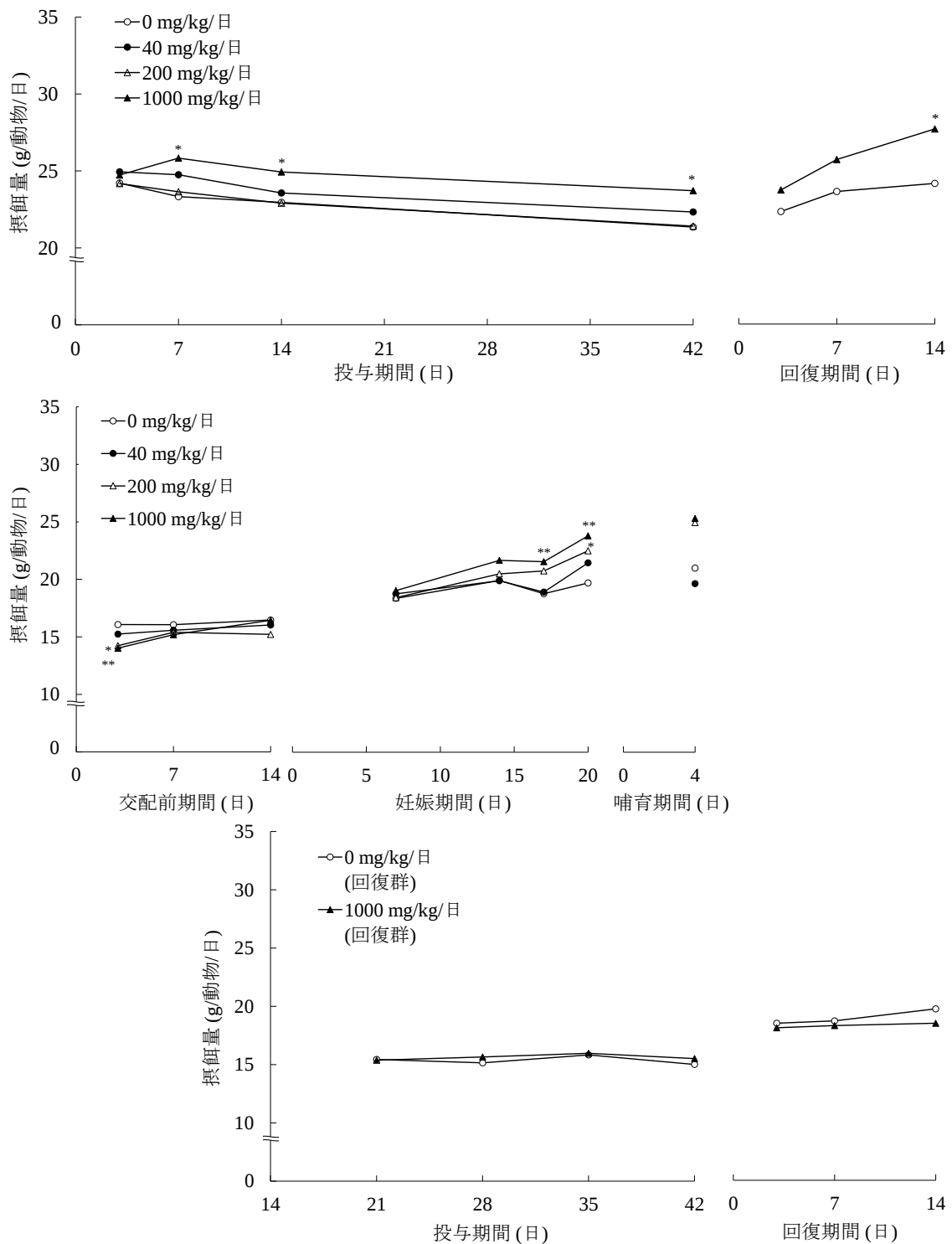


図8 BOTDの併合試験における摂餌量測定結果

上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群

*：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.05$ ）、**：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.01$ ）

表 2-7 BOTD の併合試験における血液学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)					回復群				
	主試験群									
	0	40	200	1000	0	1000	0	1000	1000	
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	858 $\pm$ 42	859 $\pm$ 33	849 $\pm$ 35	845 $\pm$ 27	869 $\pm$ 47	871 $\pm$ 20				
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.4 $\pm$ 0.4	15.4 $\pm$ 0.6	15.2 $\pm$ 0.4	15.1 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.2	15.2 $\pm$ 0.4				
ヘマトクリット値 (%)	45.7 $\pm$ 1.3	45.7 $\pm$ 1.2	45.2 $\pm$ 1.4	44.5 $\pm$ 1.2	45.6 $\pm$ 2.0	44.7 $\pm$ 1.0				
MCV (fL)	53.4 $\pm$ 1.4	53.3 $\pm$ 1.4	53.3 $\pm$ 1.1	52.7 $\pm$ 0.8	52.6 $\pm$ 1.4	51.3 $\pm$ 2.0				
MCH (pg)	18.0 $\pm$ 0.5	17.9 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 0.6	17.9 $\pm$ 0.3	18.0 $\pm$ 1.0	17.4 $\pm$ 0.8				
MCHC (g/dL)	33.7 $\pm$ 0.2	33.6 $\pm$ 0.6	33.6 $\pm$ 0.3	34.0 $\pm$ 0.2	34.2 $\pm$ 1.2	34.0 $\pm$ 0.2				
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	97.4 $\pm$ 14.2	93.2 $\pm$ 9.1	110.3 $\pm$ 7.3	98.7 $\pm$ 18.2	106.1 $\pm$ 8.9	103.4 $\pm$ 7.4				
網状赤血球数比率 (%)	1.9 $\pm$ 0.3	2.0 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.2**				
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	143 $\pm$ 38	124 $\pm$ 23	137 $\pm$ 22	142 $\pm$ 33	124 $\pm$ 18	116 $\pm$ 12				
白血球百分率 (%)										
好中球	18.6 $\pm$ 4.5	20.7 $\pm$ 1.4	20.6 $\pm$ 4.7	14.9 $\pm$ 2.1	16.0 $\pm$ 3.7	20.4 $\pm$ 4.8				
リンパ球	76.8 $\pm$ 4.7	74.4 $\pm$ 1.9	75.5 $\pm$ 5.5	80.9 $\pm$ 1.9	79.2 $\pm$ 4.4	74.8 $\pm$ 4.8				
好酸球	1.4 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.1				
好塩基球	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0				
単球	1.7 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.7				
大型非染色球	1.0 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.5	1.5 $\pm$ 0.5				
PT (s)	19.6 $\pm$ 3.7	20.9 $\pm$ 2.1	31.8 $\pm$ 5.6**	51.4 $\pm$ 8.8**	18.4 $\pm$ 1.1	18.2 $\pm$ 2.5				
APTT (s)	22.5 $\pm$ 2.8	25.0 $\pm$ 2.9	30.4 $\pm$ 2.0*	37.8 $\pm$ 6.8**	24.2 $\pm$ 3.1	22.5 $\pm$ 3.9				

平均値 $\pm$ 標準偏差*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 2-8 BOTD の併合試験における血液学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	40	200	1000	1000	0	0	1000	1000	1000
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	685 $\pm$ 51	698 $\pm$ 43	633 $\pm$ 59	618 $\pm$ 18	618 $\pm$ 18	782 $\pm$ 47	782 $\pm$ 47	761 $\pm$ 32	761 $\pm$ 32	761 $\pm$ 32
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	13.2 $\pm$ 1.0	13.1 $\pm$ 0.5	12.8 $\pm$ 0.3	12.1 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.5	14.7 $\pm$ 0.3	14.7 $\pm$ 0.3	14.1 $\pm$ 0.4*	14.1 $\pm$ 0.4*	14.1 $\pm$ 0.4*
ヘマトクリット値 (%)	39.1 $\pm$ 3.0	39.2 $\pm$ 1.7	36.3 $\pm$ 3.5	36.1 $\pm$ 1.6	36.1 $\pm$ 1.6	42.5 $\pm$ 0.4	42.5 $\pm$ 0.4	40.9 $\pm$ 1.1*	40.9 $\pm$ 1.1*	40.9 $\pm$ 1.1*
MCV (fL)	57.1 $\pm$ 1.5	56.3 $\pm$ 2.0	57.3 $\pm$ 0.7	58.4 $\pm$ 2.5	58.4 $\pm$ 2.5	54.5 $\pm$ 2.6	54.5 $\pm$ 2.6	53.8 $\pm$ 1.0	53.8 $\pm$ 1.0	53.8 $\pm$ 1.0
MCH (pg)	19.2 $\pm$ 0.4	18.8 $\pm$ 0.6	20.4 $\pm$ 2.2	19.6 $\pm$ 0.8	19.6 $\pm$ 0.8	18.7 $\pm$ 0.7	18.7 $\pm$ 0.7	18.5 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 0.6
MCHC (g/dL)	33.6 $\pm$ 0.6	33.4 $\pm$ 0.3	35.5 $\pm$ 4.0	33.5 $\pm$ 0.3	33.5 $\pm$ 0.3	34.4 $\pm$ 0.3	34.4 $\pm$ 0.3	34.5 $\pm$ 0.7	34.5 $\pm$ 0.7	34.5 $\pm$ 0.7
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	109.2 $\pm$ 14.5	118.8 $\pm$ 20.1	88.4 $\pm$ 10.4	92.7 $\pm$ 7.3	92.7 $\pm$ 7.3	114.9 $\pm$ 10.8	114.9 $\pm$ 10.8	119.4 $\pm$ 11.7	119.4 $\pm$ 11.7	119.4 $\pm$ 11.7
網状赤血球数比率 (%)	6.6 $\pm$ 1.9	6.5 $\pm$ 1.8	6.3 $\pm$ 1.3	6.9 $\pm$ 2.7	6.9 $\pm$ 2.7	2.0 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.3
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	147 $\pm$ 44	122 $\pm$ 31	112 $\pm$ 8	111 $\pm$ 24	111 $\pm$ 24	75 $\pm$ 14	75 $\pm$ 14	69 $\pm$ 12	69 $\pm$ 12	69 $\pm$ 12
白血球百分率 (%)										
好中球	34.8 $\pm$ 14.4	37.6 $\pm$ 6.5	39.5 $\pm$ 8.2	37.3 $\pm$ 2.6	37.3 $\pm$ 2.6	17.7 $\pm$ 5.0	17.7 $\pm$ 5.0	15.3 $\pm$ 1.2	15.3 $\pm$ 1.2	15.3 $\pm$ 1.2
リンパ球	61.1 $\pm$ 11.9	55.6 $\pm$ 5.7	56.3 $\pm$ 7.7	58.6 $\pm$ 2.4	58.6 $\pm$ 2.4	77.1 $\pm$ 5.1	77.1 $\pm$ 5.1	80.7 $\pm$ 1.5	80.7 $\pm$ 1.5	80.7 $\pm$ 1.5
好酸球	0.3 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.3*	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.3	1.6 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.2*	1.1 $\pm$ 0.2*	1.1 $\pm$ 0.2*
好塩基球	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
単球	2.1 $\pm$ 1.7	1.9 $\pm$ 1.0	2.2 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2
大型非染色球	1.4 $\pm$ 1.0	4.1 $\pm$ 3.8	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5	1.4 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.2
PT (s)	15.6 $\pm$ 1.0	14.7 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 0.5	14.1 $\pm$ 0.7*	14.1 $\pm$ 0.7*	14.4 $\pm$ 0.2	14.4 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 0.5**	15.3 $\pm$ 0.5**	15.3 $\pm$ 0.5**
APTT (s)	16.9 $\pm$ 2.7	17.2 $\pm$ 2.6	16.1 $\pm$ 3.1	17.8 $\pm$ 1.7	17.8 $\pm$ 1.7	17.7 $\pm$ 1.1	17.7 $\pm$ 1.1	19.9 $\pm$ 1.9	19.9 $\pm$ 1.9	19.9 $\pm$ 1.9

平均値 $\pm$ 標準偏差*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 2-9 BOTD の併合試験における血液生化学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	40	200	1000	5	0	5	1000	5	1000
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	101 ± 21	94 ± 19	73 ± 19	66 ± 8*	75 ± 11	87 ± 9				
ALT (IU/L)	24 ± 5	25 ± 2	23 ± 2	25 ± 4	23 ± 1	27 ± 3*				
ALP (IU/L)	232 ± 43	213 ± 47	252 ± 37	209 ± 30	189 ± 35	181 ± 53				
LDH (IU/L)	60 ± 9	88 ± 27	82 ± 11	68 ± 12	61 ± 11	87 ± 23*				
γ-GTP (IU/L)	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.2	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.6	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3				
総コレステロール (mg/dL)	55 ± 7	61 ± 9	68 ± 6	72 ± 20	54 ± 12	53 ± 14				
トリグリセリド (mg/dL)	57 ± 25	57 ± 23	22 ± 11*	28 ± 7	61 ± 28	44 ± 20				
リン脂質 (mg/dL)	90.8 ± 10.9	101.2 ± 12.0	103.2 ± 5.0	112.9 ± 29.8	88.0 ± 16.8	86.3 ± 18.2				
血糖 (mg/dL)	156 ± 29	173 ± 13	140 ± 16	141 ± 25	182 ± 13	158 ± 11*				
総蛋白 (g/dL)	5.8 ± 0.2	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.2**	6.1 ± 0.2*	6.0 ± 0.1	6.0 ± 0.3				
アルブミン (g/dL)	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.5 ± 0.1	2.6 ± 0.1				
A/G 比	0.78 ± 0.02	0.77 ± 0.06	0.77 ± 0.05	0.76 ± 0.07	0.73 ± 0.02	0.74 ± 0.03				
尿素窒素 (mg/dL)	13.1 ± 0.3	13.7 ± 0.9	14.3 ± 2.3	13.0 ± 2.3	16.4 ± 1.2	16.2 ± 0.9				
クレアチニン (mg/dL)	0.29 ± 0.02	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.25 ± 0.02*				
総ビリルビン (mg/dL)	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01				
総胆汁酸 (μmol/L)	24.0 ± 38.4	10.5 ± 7.2	23.6 ± 24.3	7.0 ± 6.5	20.7 ± 11.4	15.3 ± 8.3				
カルシウム (mg/dL)	9.3 ± 0.2	9.7 ± 0.2*	10.0 ± 0.1**	9.9 ± 0.2**	9.7 ± 0.4	9.4 ± 0.2				
無機リン (mg/dL)	6.5 ± 0.8	6.4 ± 0.4	6.4 ± 0.6	6.2 ± 0.3	6.4 ± 0.6	6.4 ± 0.2				
ナトリウム (mEq/L)	141 ± 0	140 ± 1	141 ± 1	140 ± 1	143 ± 1	143 ± 1				
カリウム (mEq/L)	4.5 ± 0.4	4.4 ± 0.2	4.3 ± 0.3	4.0 ± 0.4	4.5 ± 0.2	4.2 ± 0.2				
塩素 (mEq/L)	104.6 ± 1.4	104.5 ± 1.0	104.8 ± 0.8	103.7 ± 1.8	105.4 ± 0.8	104.4 ± 1.7				

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 2-10 BOTD の併合試験における血液生化学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	40	200	1000	1000	0	0	1000	1000	1000
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	92 ± 22	106 ± 19	92 ± 9	98 ± 17	107 ± 31	88 ± 14				
ALT (IU/L)	39 ± 12	42 ± 14	37 ± 4	57 ± 13	30 ± 9	23 ± 6				
ALP (IU/L)	138 ± 23	143 ± 47	114 ± 23	176 ± 29	95 ± 23	75 ± 9				
LDH (IU/L)	60 ± 26	61 ± 20	73 ± 34	63 ± 21	108 ± 36	74 ± 17				
γ-GTP (IU/L)	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3	2.6 ± 0.6**	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.2				
総コレステロール (mg/dL)	63 ± 7	69 ± 18	68 ± 6	95 ± 16**	70 ± 12	64 ± 9				
トリグリセリド (mg/dL)	48 ± 17	30 ± 8	26 ± 10*	23 ± 8**	34 ± 16	22 ± 8				
リン脂質 (mg/dL)	123.8 ± 11.3	124.9 ± 24.0	121.1 ± 7.0	166.8 ± 24.6**	136.8 ± 23.3	121.0 ± 16.5				
血糖 (mg/dL)	154 ± 20	123 ± 9**	117 ± 13**	126 ± 13*	151 ± 7	137 ± 21				
総蛋白 (g/dL)	6.1 ± 0.2	6.3 ± 0.4	6.0 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.8 ± 0.2				
アルブミン (g/dL)	2.8 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.0 ± 0.1				
A/G 比	0.83 ± 0.06	0.83 ± 0.08	0.77 ± 0.03	0.71 ± 0.05**	0.90 ± 0.07	0.81 ± 0.05*				
尿素窒素 (mg/dL)	11.6 ± 2.4	14.9 ± 2.1	14.4 ± 1.3	14.7 ± 2.4	18.7 ± 3.0	19.1 ± 1.6				
クレアチニン (mg/dL)	0.27 ± 0.04	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.05	0.27 ± 0.04	0.34 ± 0.02	0.30 ± 0.02*				
総ビリルビン (mg/dL)	0.09 ± 0.01	0.06 ± 0.01**	0.06 ± 0.01**	0.06 ± 0.01**	0.07 ± 0.03	0.06 ± 0.02				
総胆汁酸 (μmol/L)	18.4 ± 17.1	16.4 ± 6.3	11.8 ± 9.3	12.3 ± 3.3	23.8 ± 16.4	16.2 ± 5.9				
カルシウム (mg/dL)	10.2 ± 0.3	10.2 ± 0.2	9.6 ± 0.3*	9.6 ± 0.3*	9.5 ± 0.2	9.6 ± 0.2				
無機リン (mg/dL)	7.7 ± 0.9	7.4 ± 0.6	6.6 ± 0.6*	6.6 ± 0.6*	4.1 ± 0.3	4.7 ± 0.4*				
ナトリウム (mEq/L)	140 ± 3	139 ± 1	139 ± 1	140 ± 2	142 ± 1	142 ± 1				
カリウム (mEq/L)	4.2 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.6	4.4 ± 0.6				
塩素 (mEq/L)	104.5 ± 2.6	105.4 ± 0.8	106.2 ± 0.8	107.4 ± 0.5*	107.8 ± 1.4	108.4 ± 2.2				

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 2-11 BOTD の併合試験における器官重量測定結果 (雄)

器官名 動物数	用量 (mg/kg/日)										回復群	
	主試験群					0					0	
	0	40	200	1000	1000	7	5	5	5	5	5	5
脳 (g)	2.14 ± 0.07	2.12 ± 0.08	2.19 ± 0.08	2.14 ± 0.11	2.14 ± 0.11	2.14 ± 0.11	2.17 ± 0.08	2.17 ± 0.08	2.17 ± 0.08	2.17 ± 0.08	2.29 ± 0.06*	2.29 ± 0.06*
脳 (g/100 g)	0.47 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.46 ± 0.04	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.44 ± 0.03	0.45 ± 0.02	0.45 ± 0.02
胸腺 (mg)	333.3 ± 59.6	345.5 ± 85.7	365.9 ± 57.7	388.2 ± 79.3	388.2 ± 79.3	388.2 ± 79.3	332.1 ± 71.8	332.1 ± 71.8	332.1 ± 71.8	332.1 ± 71.8	325.9 ± 72.7	325.9 ± 72.7
胸腺 (mg/100 g)	73.4 ± 14.3	72.8 ± 16.5	78.7 ± 14.8	83.7 ± 17.7	83.7 ± 17.7	83.7 ± 17.7	67.9 ± 15.2	67.9 ± 15.2	67.9 ± 15.2	67.9 ± 15.2	64.1 ± 14.0	64.1 ± 14.0
心臓 (g)	1.36 ± 0.10	1.43 ± 0.11	1.36 ± 0.13	1.37 ± 0.12	1.37 ± 0.12	1.37 ± 0.12	1.43 ± 0.18	1.43 ± 0.18	1.43 ± 0.18	1.43 ± 0.18	1.48 ± 0.03	1.48 ± 0.03
心臓 (g/100 g)	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.29 ± 0.02
肝臓 (g)	11.21 ± 0.79	13.94 ± 0.92**	15.14 ± 1.08**	15.89 ± 1.04**	15.89 ± 1.04**	15.89 ± 1.04**	12.39 ± 1.14	12.39 ± 1.14	12.39 ± 1.14	12.39 ± 1.14	12.89 ± 0.93	12.89 ± 0.93
肝臓 (g/100 g)	2.45 ± 0.10	2.95 ± 0.16**	3.24 ± 0.19**	3.42 ± 0.19**	3.42 ± 0.19**	3.42 ± 0.19**	2.53 ± 0.09	2.53 ± 0.09	2.53 ± 0.09	2.53 ± 0.09	2.54 ± 0.14	2.54 ± 0.14
脾臓 (g)	0.69 ± 0.10	0.71 ± 0.09	0.69 ± 0.08	0.73 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.73 ± 0.09	0.64 ± 0.06	0.64 ± 0.06	0.64 ± 0.06	0.64 ± 0.06	0.70 ± 0.05	0.70 ± 0.05
脾臓 (g/100 g)	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01
腎臓 (g)	2.87 ± 0.18	3.06 ± 0.26	3.13 ± 0.40	3.01 ± 0.22	3.01 ± 0.22	3.01 ± 0.22	3.01 ± 0.28	3.01 ± 0.28	3.01 ± 0.28	3.01 ± 0.28	3.28 ± 0.24	3.28 ± 0.24
腎臓 (g/100 g)	0.63 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.67 ± 0.07	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.65 ± 0.05	0.65 ± 0.05
副腎 (mg)	58.4 ± 6.2	56.2 ± 6.3	62.4 ± 7.7	63.7 ± 6.1	63.7 ± 6.1	63.7 ± 6.1	55.8 ± 6.4	55.8 ± 6.4	55.8 ± 6.4	55.8 ± 6.4	58.0 ± 7.3	58.0 ± 7.3
副腎 (mg/100 g)	12.8 ± 1.7	11.9 ± 1.3	13.3 ± 1.3	13.7 ± 1.4	13.7 ± 1.4	13.7 ± 1.4	11.4 ± 1.3	11.4 ± 1.3	11.4 ± 1.3	11.4 ± 1.3	11.4 ± 1.0	11.4 ± 1.0
精巣 (g)	3.38 ± 0.23	3.23 ± 0.23	3.43 ± 0.18	3.29 ± 0.16	3.29 ± 0.16	3.29 ± 0.16	3.22 ± 0.21	3.22 ± 0.21	3.22 ± 0.21	3.22 ± 0.21	3.59 ± 0.26*	3.59 ± 0.26*
精巣 (g/100 g)	0.74 ± 0.04	0.68 ± 0.05	0.74 ± 0.08	0.71 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.71 ± 0.05	0.66 ± 0.09	0.66 ± 0.09	0.66 ± 0.09	0.66 ± 0.09	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.04
精巣上体 (g)	1.31 ± 0.11	1.23 ± 0.09	1.37 ± 0.06	1.27 ± 0.10	1.27 ± 0.10	1.27 ± 0.10	1.26 ± 0.12	1.26 ± 0.12	1.26 ± 0.12	1.26 ± 0.12	1.33 ± 0.06	1.33 ± 0.06
精巣上体 (g/100 g)	0.29 ± 0.02	0.26 ± 0.02*	0.29 ± 0.03	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.01	0.26 ± 0.01
下垂体 (mg)	13.8 ± 1.1	13.7 ± 1.4	15.0 ± 1.7	14.1 ± 1.6	14.1 ± 1.6	14.1 ± 1.6	42.3 ± 62.5	42.3 ± 62.5	42.3 ± 62.5	42.3 ± 62.5	16.4 ± 2.3	16.4 ± 2.3
下垂体 (mg/100 g)	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.1 ± 0.3	9.1 ± 13.8	9.1 ± 13.8	9.1 ± 13.8	9.1 ± 13.8	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3
甲状腺 (mg)	29.5 ± 5.4	30.4 ± 6.0	29.2 ± 4.9	31.8 ± 4.3	31.8 ± 4.3	31.8 ± 4.3	25.9 ± 1.6	25.9 ± 1.6	25.9 ± 1.6	25.9 ± 1.6	30.8 ± 4.8	30.8 ± 4.8
甲状腺 (mg/100 g)	6.5 ± 1.2	6.4 ± 1.3	6.2 ± 0.9	6.9 ± 0.9	6.9 ± 0.9	6.9 ± 0.9	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.5	5.3 ± 0.5	6.1 ± 1.1	6.1 ± 1.1
解剖日体重 (g)	456.1 ± 21.4	474.1 ± 32.7	468.2 ± 40.2	464.6 ± 19.5	464.6 ± 19.5	464.6 ± 19.5	489.6 ± 37.6	489.6 ± 37.6	489.6 ± 37.6	489.6 ± 37.6	507.4 ± 26.3	507.4 ± 26.3

平均値 ± 標準偏差、上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

a): 死亡動物および交尾不成立の動物は除いた。

表 2-12 BOTD の併合試験における器官重量測定結果 (雌)

器官名 動物数	用量 (mg/kg/日)										回復群	
	主試験群					9 ^{a)}					0	
	0	40	12	10 ^{a)}	200	1000	1000	1000	1000	1000	5	1000
脳 (g)	1.97 ± 0.08	1.99 ± 0.08	1.99 ± 0.08	1.96 ± 0.09	1.96 ± 0.09	1.98 ± 0.07	1.98 ± 0.07	1.98 ± 0.07	1.98 ± 0.07	1.92 ± 0.09	1.96 ± 0.09	1.96 ± 0.09
(g/100 g)	0.69 ± 0.05	0.69 ± 0.04	0.69 ± 0.04	0.66 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.71 ± 0.04	0.68 ± 0.03	0.79 ± 0.07*	0.79 ± 0.07*
胸腺 (mg)	171.5 ± 65.8	184.6 ± 62.7	184.6 ± 62.7	210.5 ± 50.5	210.5 ± 50.5	161.9 ± 51.5	161.9 ± 51.5	161.9 ± 51.5	161.9 ± 51.5	279.2 ± 35.1	233.1 ± 15.1*	233.1 ± 15.1*
(mg/100 g)	59.3 ± 20.0	63.6 ± 20.2	63.6 ± 20.2	71.0 ± 15.2	71.0 ± 15.2	57.3 ± 16.6	57.3 ± 16.6	57.3 ± 16.6	57.3 ± 16.6	97.9 ± 11.2	93.6 ± 2.7	93.6 ± 2.7
心臓 (g)	0.94 ± 0.09	0.94 ± 0.08	0.94 ± 0.08	1.04 ± 0.10*	1.04 ± 0.10*	1.03 ± 0.08	1.03 ± 0.08	1.03 ± 0.08	1.03 ± 0.08	0.92 ± 0.07	0.90 ± 0.06	0.90 ± 0.06
(g/100 g)	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.37 ± 0.03**	0.37 ± 0.03**	0.37 ± 0.03**	0.37 ± 0.03**	0.32 ± 0.02	0.36 ± 0.01**	0.36 ± 0.01**
肝臓 (g)	9.66 ± 1.20	10.20 ± 0.92	10.20 ± 0.92	12.60 ± 0.96**	12.60 ± 0.96**	15.32 ± 1.32**	15.32 ± 1.32**	15.32 ± 1.32**	15.32 ± 1.32**	7.34 ± 0.76	6.82 ± 0.86	6.82 ± 0.86
(g/100 g)	3.39 ± 0.35	3.55 ± 0.33	3.55 ± 0.33	4.27 ± 0.30**	4.27 ± 0.30**	5.45 ± 0.40**	5.45 ± 0.40**	5.45 ± 0.40**	5.45 ± 0.40**	2.57 ± 0.18	2.74 ± 0.24	2.74 ± 0.24
脾臓 (g)	0.56 ± 0.07	0.53 ± 0.09	0.53 ± 0.09	0.57 ± 0.09	0.57 ± 0.09	0.52 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.52 ± 0.07	0.45 ± 0.03	0.44 ± 0.08	0.44 ± 0.08
(g/100 g)	0.20 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.19 ± 0.04	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03
腎臓 (g)	1.72 ± 0.07	1.83 ± 0.19	1.83 ± 0.19	1.88 ± 0.15	1.88 ± 0.15	1.82 ± 0.14	1.82 ± 0.14	1.82 ± 0.14	1.82 ± 0.14	1.70 ± 0.13	1.69 ± 0.16	1.69 ± 0.16
(g/100 g)	0.61 ± 0.04	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.04	0.64 ± 0.04	0.65 ± 0.08	0.65 ± 0.08	0.65 ± 0.08	0.65 ± 0.08	0.60 ± 0.03	0.68 ± 0.06*	0.68 ± 0.06*
副腎 (mg)	70.5 ± 7.0	75.5 ± 10.6	75.5 ± 10.6	75.1 ± 9.1	75.1 ± 9.1	73.3 ± 10.7	73.3 ± 10.7	73.3 ± 10.7	73.3 ± 10.7	60.5 ± 10.9	66.0 ± 7.2	66.0 ± 7.2
(mg/100 g)	24.9 ± 3.3	26.3 ± 3.5	26.3 ± 3.5	25.4 ± 2.8	25.4 ± 2.8	26.1 ± 3.6	26.1 ± 3.6	26.1 ± 3.6	26.1 ± 3.6	21.1 ± 3.1	26.4 ± 1.7**	26.4 ± 1.7**
卵巣 (mg)	95.2 ± 9.8	99.1 ± 11.0	99.1 ± 11.0	102.8 ± 13.4	102.8 ± 13.4	89.0 ± 11.8	89.0 ± 11.8	89.0 ± 11.8	89.0 ± 11.8	86.8 ± 13.2	80.4 ± 14.6	80.4 ± 14.6
(mg/100 g)	33.5 ± 3.5	34.5 ± 3.4	34.5 ± 3.4	34.8 ± 4.1	34.8 ± 4.1	31.8 ± 4.7	31.8 ± 4.7	31.8 ± 4.7	31.8 ± 4.7	30.5 ± 4.8	32.2 ± 4.5	32.2 ± 4.5
子宮 (g)	0.60 ± 0.06	0.58 ± 0.08	0.58 ± 0.08	0.61 ± 0.06	0.61 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.55 ± 0.06	0.67 ± 0.28	0.50 ± 0.10	0.50 ± 0.10
(g/100 g)	0.22 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.10	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.04
下垂体 (mg)	15.8 ± 2.9	16.9 ± 3.2	16.9 ± 3.2	17.9 ± 1.9	17.9 ± 1.9	15.5 ± 1.8	15.5 ± 1.8	15.5 ± 1.8	15.5 ± 1.8	17.9 ± 3.8	16.1 ± 2.8	16.1 ± 2.8
(mg/100 g)	5.5 ± 0.9	5.9 ± 0.9	5.9 ± 0.9	6.1 ± 0.6	6.1 ± 0.6	5.5 ± 0.6	5.5 ± 0.6	5.5 ± 0.6	5.5 ± 0.6	6.3 ± 1.2	6.5 ± 1.2	6.5 ± 1.2
甲状腺 (mg)	20.0 ± 2.8	21.4 ± 3.3	21.4 ± 3.3	26.7 ± 2.1**	26.7 ± 2.1**	24.3 ± 4.0*	24.3 ± 4.0*	24.3 ± 4.0*	24.3 ± 4.0*	20.5 ± 4.7	21.4 ± 4.3	21.4 ± 4.3
(mg/100 g)	7.1 ± 1.2	7.5 ± 1.2	7.5 ± 1.2	9.0 ± 0.7**	9.0 ± 0.7**	8.6 ± 1.1*	8.6 ± 1.1*	8.6 ± 1.1*	8.6 ± 1.1*	7.2 ± 1.4	8.6 ± 1.6	8.6 ± 1.6
解剖日体重 (g)	284.8 ± 21.7	287.7 ± 18.2	287.7 ± 18.2	295.4 ± 13.2	295.4 ± 13.2	281.0 ± 12.3	281.0 ± 12.3	281.0 ± 12.3	281.0 ± 12.3	285.1 ± 9.4	248.9 ± 14.9	248.9 ± 14.9

平均値 ± 標準偏差、上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

a): 死亡動物、交尾不成立の動物、未分娩動物および全腹死動物は除いた。

表 2-13 BOTD の併合試験における剖検所見

所見名	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群 (雄)			回復群 (雄)			主試験群 (雌)			回復群 (雌)
	0	40	200 ^{a)}	1000	0	1000	0 ^{a)}	40	200 ^{a)}	1000
肝臓										
腫大	0/7	0/12	5/10	7/7	0/5	0/5	0/11	0/12	5/11	9/12
脾臓										
黒色化	0/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/5	0/11	0/12	0/11	3/12
退色	0/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/5	0/11	0/12	1/11	0/12
小型化	0/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/5	0/11	0/12	1/11	0/12

a): 死亡動物および交尾不成功の動物の所見は結果表の記載から除いた。

表 2-14 BOTD の併合試験における病理組織学的検査所見

所見名	用量 (mg/kg/日)												
	主試験群 (雄)				回復群 (雄)				主試験群 (雌)				回復群 (雌)
	0	40	200 ^{a)}	1000	0	1000	0 ^{a)}	40	200 ^{a)}	1000	0	1000	
グレード													
肝臓													
限局性肝細胞壊死	+	0/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/11	0/12	2/11	0/12	0/5	0/5	
小葉中心性肝細胞肥大	+	0/7	0/12	6/10	5/7	0/5	0/11	2/12	7/11	3/12	0/5	0/5	
	++	0/7	0/12	0/10	2/7	0/5	0/11	0/12	3/11	9/12	0/5	0/5	
小肉芽腫	+	2/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/11	0/12	0/11	0/12	1/5	0/5	
甲状腺													
びまん性の濾胞上皮細胞肥大	+	0/7	0/12	0/10	3/7	0/5	0/11	0/12	3/11	5/12	0/5	0/5	
嚢嚢遺残	+	1/7	0/12	0/10	0/7	0/5	0/11	1/12	0/11	0/12	0/5	0/5	
脾臓													
うっ血	+	0/7	-	-	0/7	-	1/11	1/12	0/11	5/12	0/5	0/5	
ヘモジデリン沈着	+	0/7	-	-	0/7	-	0/11	0/12	0/11	3/12	4/5	3/5	
	++	0/7	-	-	0/7	-	0/11	0/12	0/11	0/12	1/5	2/5	
髓外造血亢進	+	0/7	-	-	0/7	-	0/11	1/12	1/11	1/12	0/5	0/5	
萎縮	++	0/7	-	-	0/7	-	0/11	0/12	1/11	0/12	0/5	0/5	

-: 未検査、+: 軽度、++: 中等度

a): 死亡動物および交尾不成功の動物の所見は結果表の記載から除いた。

表 2-15 BOTD の併合試験における分娩・哺育状態観察所見

所見名	用量 (mg/kg/日)			
	0	40	200	1000
雌				
胎盤処理の不全	0/11	0/12	1/11	0/9
リトリーピング行動の不全	0/11	0/12	1/11	0/9
クラウチング行動の不全	0/11	0/12	1/11	0/9
全腹児死亡	1/11	0/12	1/11	0/9

表 2-16 BOTD の併合試験における生殖発生毒性関連の結果

検査項目	用量 (mg/kg/日)			
	0	40	200	1000
雌動物数	17	12	12	17
性周期 (日、平均±標準偏差)	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.0	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.2
同居動物数	12	12	12	12
交尾動物数	12	12	11	12
妊娠動物数	12	12	11	9
交尾率 ^{a)} (%)	100.0	100.0	91.7	100.0
受胎率 ^{b)} (%)	100.0	100.0	100.0	75.0
交尾所要日数 (平均±標準偏差)	3.6 ± 3.2	2.9 ± 1.1	2.9 ± 1.3	2.5 ± 2.2
妊娠期間 (日、平均±標準偏差)	22.0 ± 0.4	22.0 ± 0.0	22.0 ± 0.4	22.2 ± 0.4
妊娠黄体数 (平均±標準偏差)	14.1 ± 1.9	14.8 ± 1.3	14.5 ± 1.7	13.0 ± 1.4
着床痕数 (平均±標準偏差)	12.8 ± 4.0	13.8 ± 2.6	13.5 ± 1.4	12.4 ± 1.5
着床率 ^{c)} (平均±標準偏差)	90.0 ± 23.6	93.0 ± 15.9	93.4 ± 6.3	95.7 ± 4.2
哺育 0 日				
生児出産動物数	11	12	11	9
出産率 ^{d)} (%)	91.7	100.0	100.0	100.0
産児数 (平均±標準偏差)	11.8 ± 3.7	13.2 ± 2.4	12.0 ± 2.8	11.8 ± 1.5
出產生児数 (平均±標準偏差)	11.5 ± 3.8	13.1 ± 2.3	11.5 ± 2.8	11.7 ± 1.5
0 日生存児数 (平均±標準偏差)	11.5 ± 3.8	13.1 ± 2.3	11.5 ± 2.8	11.4 ± 1.7
出生率 ^{e)} (%、平均±標準偏差)	96.0 ± 5.0	96.0 ± 4.4	89.2 ± 17.5	94.8 ± 5.7
0 日生存率 ^{f)} (%、平均±標準偏差)	93.4 ± 14.8	99.5 ± 1.8	96.8 ± 10.8	99.1 ± 2.8
出産児性比 ^{g)}	75 / 130	80 / 158	66 / 132	55 / 106
(平均±標準偏差)	0.57 ± 0.11	0.51 ± 0.13	0.51 ± 0.11	0.53 ± 0.16
0 日生存児性比 ^{h)}	72 / 126	79 / 157	62 / 127	53 / 103
(平均±標準偏差)	0.52 ± 0.20	0.51 ± 0.13	0.49 ± 0.14	0.52 ± 0.16
外表異常児数	1 / 126	1 / 157	0 / 127	0 / 105
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	6.27 ± 0.60	6.46 ± 0.55	6.92 ± 0.62*	7.21 ± 0.43**
雌	6.04 ± 0.57	6.05 ± 0.49	6.46 ± 0.44	6.65 ± 0.34*
哺育 4 日				
生存児を持つ動物数	10	12	10	9
4 日生存児数 (平均±標準偏差)	10.1 ± 5.0	12.0 ± 3.5	10.4 ± 4.4	11.2 ± 1.6
4 日生存率 ⁱ⁾ (%、平均±標準偏差)	80.5 ± 38.1	92.8 ± 23.0	87.8 ± 29.4	96.2 ± 6.1
4 日生存児性比 ^{j)}	61 / 111	72 / 144	58 / 114	53 / 101
(平均±標準偏差)	0.53 ± 0.25	0.47 ± 0.20	0.52 ± 0.10	0.53 ± 0.15
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	9.73 ± 1.94	9.82 ± 1.95	11.02 ± 1.43	10.61 ± 1.20
雌	9.89 ± 1.47	9.15 ± 1.68	10.43 ± 1.19	10.05 ± 1.00

a) 交尾率: (交尾確認された雌動物数/交配させた雌動物数) ×100

b) 受胎率: (妊娠動物数/交尾確認された雌動物数) ×100

c) 着床率: (着床痕数/妊娠黄体数) ×100

d) 出産率: (生児出産動物数/妊娠動物数) ×100

e) 出生率: (出產生児数/着床痕数) ×100

f) 0 日生存率: (出產生児数/産児数) ×100

g) 出産児性比: 雄出産児数/産児数

h) 0 日生存児性比: 哺育 0 日雄生存児数/哺育 0 日生存児数

i) 4 日生存率: (哺育 4 日生存児数/出產生児数) ×100

j) 4 日生存児性比: 哺育 4 日雄生存児数/哺育 4 日生存児数

*: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.01$)

2.4 考察

BOTD について併合試験を実施した結果、主に肝臓および血液凝固系への影響が認められた。肝臓への影響として、雌雄で肝臓の重量増加を伴う小葉中心性肝細胞肥大（表 2-11、2-12 および 2-14）、雌で γ -GTP の高値が認められた（表 2-10）。げっ歯類を用いた動物実験でみられる肝細胞肥大は、生体の恒常性維持のための薬物代謝酵素の誘導による適応性変化と考えられており、他に生体の恒常性機能の破綻を示す変化が無い場合は毒性影響ではないとみなされる（Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 2006）。しかしながら、本研究では 1000 mg/kg 群の雌で胆管系の障害時に上昇する γ -GTP について、高値が認められた。そのため、病理組織学的検査では胆管系の変化は認められていないが、本研究で認められた肝細胞肥大は、肝臓への毒性影響である可能性があると考えられた。

本研究では、第一章の 4M2NA と同様に雌雄で小葉中心性肝細胞肥大と共に甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大が認められた（表 2-14）。甲状腺の濾胞上皮細胞のびまん性肥大は、血中の甲状腺ホルモン濃度が低下した際に、ネガティブフィードバック機構により濾胞上皮細胞を甲状腺刺激ホルモンが持続的に刺激することにより引き起こされる（日本毒性病理学会編, 2017）。そのため、BOTD についても CYP2B、CYP3A や UGT2B が誘導された結果、血中 T3 レベルが低下し、続いて甲状腺刺激ホルモンの分泌が促進されたことにより甲状腺の濾胞上皮細胞が肥大した可能性が考えられた。また、4M2NA と同

様に、この甲状腺の濾胞上皮細胞の肥大もヒトには外挿されない変化と考えられた (Capen, 2001)。なお、本研究では、雌雄ともに甲状腺の器官重量に明確な用量依存性が認められなかったが、これは甲状腺への影響が軽微であったためと考えられた。

また、本研究においても 4M2NA と同様に雌で総コレステロール濃度の高値が認められた (表 2-10)。そのため、BOTD が UGT2B の誘導により T3 レベルの低下を引き起こしていた場合、このコレステロールの変化は T3 レベルの低下に関連した変化であると考えられた。なお、雌のみで総コレステロール濃度の高値が認められた理由については不明であった。また、雌で認められたトリグリセリド濃度の低値およびリン脂質濃度の高値 (表 2-10) については、肝臓での何らかの脂質代謝異常が生じたことによるものと推察した。

血液凝固系パラメーターの延長、特に PT の延長について、本研究では 200 mg/kg 以上の群の雄に顕著に認められた (表 2-7)。この血液凝固パラメーターの延長のメカニズムについて考察するため、過去の反復投与毒性試験のデータについて有害性評価支援システム統合プラットフォーム (HESS DB : Hazard Evaluation Support System Databases、独立行政法人製品評価技術基盤機構) を用いて検索した。HESS DB は、ラットの 28 日～90 日間反復投与毒性試験における投与群単位での詳細なデータから構成される知識情報データベースであり、過去の 655 件の反復投与毒性試験の結果を横断的に検索することができる。本研究では、過去に PT の 50%以上の延長が認められた物質について検

索した。その結果、PT の延長が認められた 17 物質に構造的な特徴は認められなかったが、PT の延長はラットにおける反復投与試験では 17 物質すべてにおいて雄の方が雌より強く認められ、そのうち 14 物質では雌で PT の延長が認められないか、認められても 25%未満の延長であった。また、代表的な血液凝固阻害物質であるワルファリンにおいても同様の性差が認められている (Hara *et al.*, 1994、Reyers *et al.*, 1986、Winn and Park, 1987)。PT の延長は、肝細胞障害又は凝固因子の生合成の際の補酵素であるビタミン K の欠乏が主な原因とされている (山田, 2013)。本研究では雄に肝臓の機能障害は認められていないため、ビタミン K の欠乏が原因である可能性が高いと考えられた。ワルファリンはビタミン K エポキシド還元酵素を阻害することによりビタミン K サイクルを阻害し、血液凝固阻害を引き起こすことが報告されている (MacNicoll and Dean, 1992、Tie and Stafford, 2008)。しかし、BOTD はワルファリンのようなクマリン骨格を有さないため、血液凝固阻害のメカニズムは異なる可能性がある。抗菌剤においては、腸内細菌叢への影響により、ビタミン K の欠乏と低プロトロンビン血症が生じることが報告されている (Matsuura *et al.*, 1988、1989、Uchida *et al.*, 1985)。そのため、BOTD の場合も腸管からのビタミン K 吸収量の減少により、肝臓におけるビタミン K 欠乏が引き起こされた可能性が考えられた。この BOTD による血液凝固阻害については、ヒトでも起こり得る毒性影響と考えられた。また、PT の延長の雌雄差については、低ビタミン K 食による PT の延長がエストラジオールの投与により回復したとの報告 (Uchida *et al.*, 1985)

があることから、エストラジオールの発現量の性差によるものと考えられた。

生殖発生毒性については、受胎率の低値が 1000 mg/kg 群で認められた（表 2-16）。しかし、1000 mg/kg 群の雄において精巣に影響は認められておらず、1000 mg/kg 群の妊娠動物において妊娠および分娩状態に異常は認められなかった。そのため、受胎率の低値の原因は不明であるが、BOTD による毒性影響であることを否定することはできないと考えられた。なお、哺育 0 日の生存児の体重の高値については、対照群の生存児が偶発的に小さかったことによるものであり、BOTD による影響ではないと考えられた。

雌の 1000 mg/kg の主試験群で認められた脾臓のうっ血、ヘモジデリン沈着および髄外造血亢進（表 2-14）は、血液学的検査結果に貧血を示唆する変動が認められないことから、毒性学的に意義のない変化と考えた。

BOTD の NOAEL は、反復投与毒性については、PT の延長が雄の 200 mg/kg 群で認められたため 40 mg/kg/日、生殖発生毒性については、1000 mg/kg 群で受胎率の低値が認められたため 200 mg/kg/日と考えられた。

第三章 1-*tert*-butoxy-4-chlorobenzene の毒性評価

3.1 緒言

1-*tert*-butoxy-4-chlorobenzene (TBCB) は、図 4 のようにベンゼン環上にクロロ基および *tert*-ブトキシ基が 1 つずつ結合した物質であり、クロロ基に対して *tert*-ブトキシ基がパラ位に結合している。分子式は $C_{10}H_{13}ClO$ 、分子量は 184.66 の無色透明の液体である。TBCB は半導体製造における保護膜（レジスト）や香料の原料として使用されている。TBCB のエーテル結合が開裂した場合に生成する 4-クロロフェノールは、28 日間反復投与試験により中枢神経への影響として、振戦、頻呼吸、流涎等の一般状態の変化が報告されている (MHLW, 2000)。また、同様にエーテル結合が開裂した場合に生成する *tert*-ブチルアルコールは、簡易生殖発生毒性試験において産児数および生存率の低下を誘発させることが報告されている (ECHA, 2004a)。加えて、雄ラット特異的病変であるが、 $\alpha 2u$ -グロブリン腎症が 13 週間反復投与試験において認められている (Mahler, 1997)。そのため、TBCB についても中枢神経系への影響および発生毒性の誘発が懸念されているが、TBCB の毒性については現在まで報告がない。そこで、本研究では TBCB の安全性評価のため、本物質について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（併合試験）を実施し、毒性評価を行った。

3.2 用量設定試験

TBCB について併合試験における投与用量を設定するため、14 日間反復投与毒性試

験を行った。

3.2.1 材料および方法

被験物質として、北興化学工業株式会社から提供された TBCB (ロット番号:D0L001、純度:>99%) を試験に使用した。TBCB をオリーブ油 (日本薬局方、日興製薬) に溶解させ、0 (オリーブ油)、25、250、500 および 1000 mg/kg/日の用量で 14 日間投与した。投与にはネラトンカテーテル (テルモ) を取り付けした注射筒 (テルモ) を用い、強制経口投与を行った。動物は 9 週齢の Crl:CD(SD)ラットを用いて 1 群雌雄各 3 匹とした。投与期間中は一般状態観察および体重測定を実施し、解剖日に血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量測定および剖検を行った (3.3.1.7 参照)。

3.2.2 結果

雄の 250 mg/kg 以上の群で流涎、自発運動低下、呼吸数減少、半眼等が認められた。また、1000 mg/kg 群では自咬による出血がみられた 1 例および状態が悪化した 1 例を投与 3 日目および 6 日目に安楽死させた。雌では、250 mg/kg 以上の群で流涎、500 mg/kg 以上の群で自発運動低下、半眼、不穏、散瞳、1000 mg/kg 群で呼吸数減少、歩行失調および流涎が認められた。また、血液学的検査において雌の 500 mg/kg 以上の群で赤血球数の低値傾向、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値の有意な低値が認められた。器官重量では、雌雄の 500 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対重量の有意な高値、雄の 500 mg/kg 群および雌の 250 mg/kg 以上の群で肝臓の相対重量の有意な高値、雌の 1000 mg/kg

群で腎臓の相対重量の有意な高値が認められた。剖検では、雌雄の 500 mg/kg 以上の群で肝臓の腫大、雄の 500 mg/kg 以上の群および雌の 1000 mg/kg 群で肝臓の白色部が認められた。また、雄の 250 mg/kg 以上の群で腎臓の表面点状模様明瞭化がみられた。

3.2.3 考察

500 mg/kg 群で肝臓に影響が認められ、500 mg/kg/日を超える用量では死亡の可能性があることから、TBCB の併合試験では 500、100 および 20 mg/kg/日の 3 用量が適切と考えられた。

3.3 併合試験

3.3.1 材料および方法

試験は OECD テストガイドライン {TG422：反復投与毒性試験と生殖発生毒性スクリーニング試験の複合試験（1996.3.22 採択）} に準拠し、優良試験所基準（GLP：Good Laboratory Practice）で実施した。また、LABORATORY ANIMAL SCIENCE（1987、American Association for Laboratory Animal Science）を参考に一般財団法人 化学物質評価研究機構日田事業所が作成した「日田事業所動物実験に関する指針」および「ヘルシンキ宣言」（1964 年制定）の主旨に沿って試験を行った。

3.3.1.1 被験物質

北興化学工業株式会社から提供された TBCB（ロット番号：D0L001、純度：>99%）を試験に使用した。

3.3.1.2 飼育動物

日本チャールス・リバー日野飼育センターから 8 週齢の Crl:CD(SD)ラット (SPF) の雄 55 匹、雌 61 匹を入手し、6 日間の検疫を含む 8 日間の馴化を行った。雌では、入荷翌日から 7 日間の性周期を検査した。検疫・馴化期間中、すべての動物に異常は認められなかった。

投与開始 2 日前に測定した体重を用いて、対照群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、低用量群 (雄 12 匹、雌 12 匹)、中用量群 (雄 12 匹、雌 12 匹)、高用量群 (雄 7 匹、雌 12 匹)、対照群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹)、高用量群の回復群 (雄 5 匹、雌 5 匹) の計 6 群に体重層別無作為抽出法により群分けした (表 3-1)。投与開始時の動物の週齢は雌雄とも 9 週齢で、体重範囲は雄が 320.5~363.9 g、雌が 201.6~233.7 g であった。また、雌雄ともに投与 1 日目の体重が、各群の平均体重 $\pm$ 20%の範囲内にあることを確認した。

3.3.1.3 飼育環境

動物の飼育環境については、2.3.1.3 に記載の条件と同様にして行った。

3.3.1.4 被験物質の設定用量

用量設定試験の結果から 500、100 および 20 mg/kg/日の 3 用量を設定した。群構成を表 3-1 に示す。

表 3-1 TBCB の併合試験における群構成

試験群	投与用量 (mg/kg/日)	投与容量 (mL/kg)	被験物質液濃度 (w/v%)	動物数 (匹)	
				雄	雌
媒体対照 (主試験)	0	4	0	7	12
媒体対照 (回復)	0	4	0	5	5
被 低用量 (主試験)	20	4	0.500	12	12
験 中用量 (主試験)	100	4	2.50	12	12
物 高用量 (主試験)	500	4	12.5	7	12
質 高用量 (回復)	500	4	12.5	5	5

3.3.1.5 投与および回復期間

投与期間は、雄の主試験群および回復群並びに雌の回復群は 42 日間、雌の主試験群は交配前期間 (14 日間)、交配期間 (最長 14 日間)、妊娠期間および哺育期間 (5 日間) の 41~46 日間とした。また、回復期間は雌雄とも 42 日間投与した後、14 日間の休薬期間を設けた。

3.3.1.6 投与

被験物質をオリーブ油に溶解させ 12.5 w/v%の被験物質液を調製した。さらに、12.5 w/v%液をオリーブ油で希釈して 2.50 および 0.500 w/v%の被験物質液を調製した。12.5、2.50 および 0.500 w/v%の被験物質液をそれぞれ高、中および低用量群に体重 1 kg あたり 4 mL の液量で強制経口投与した。投与にはネラトンカテーテル (テルモ) を取り付けた注射筒 (テルモ) を用いた。対照群にはオリーブ油を同様にして投与した。投与は 9 時から 13 時の間に行い、分娩途中の動物は分娩終了後に行った。

3.3.1.7 反復投与毒性に関する観察・検査

3.3.1.7.1 一般状態観察、詳細な一般状態観察、機能検査、体重測定および摂餌量測定

1.3.1.7.1～1.3.1.7.4 に記載の条件と同様にして行った。なお、機能検査の結果、雌の高用量群で瞳孔反射の異常および自発運動量の統計学的に有意な変化が認められた。そのため、雌の瞳孔反射および自発運動量については回復 2 週目にも検査を実施した。

3.3.1.7.2 血液検査

2.3.1.7.2 に記載の条件と同様にして行った。

3.3.1.7.3 剖検、組織採取および器官重量測定

2.3.1.7.3 および 2.3.1.7.4 に記載の条件と同様にして行った。

3.3.1.7.4 病理組織学的検査

固定した器官・組織からパラフィン包埋薄切切片を作り、HE 染色（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999）後、光学顕微鏡観察により検査した。対照群および 500 mg/kg 群は採取したすべての器官・組織について検査した。20 および 100 mg/kg 群並びに回復群については、雌雄の肝臓および雄の腎臓についても検査した。全腹児が死亡した雌は、前胃、腺胃、心臓、卵巣、子宮、膈、脾臓、胸腺、下垂体および副腎についても検査した。また、検査の結果、腎臓において雄ラット特異的病変である $\alpha 2u$ -グロブリン腎症が疑われる変化がみられた。そのため、 $\alpha 2u$ -グロブリンの蓄積の有無について検討するため、対照群と 100 および 500 mg/kg 群の雄の各 2 匹の腎臓について、免疫組織化学的染色を行

い検査した（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999、Hanamura *et al.*, 2006）。また、腎臓に尿管上皮細胞の空胞化がみられた対照群および 500 mg/kg 群の各 1 例について、脂肪の蓄積の有無について検討するため、オイル赤 O 染色（日本病理学会編, 1981、大畑, 1999）を行った。

3.3.1.8 生殖発生毒性に関する観察・検査

2.3.1.8 に記載の条件と同様にして行った。

3.3.1.9 統計学的方法

1.3.1.9 に記載の条件と同様にして行った。

3.3.2 結果

3.3.2.1 状態、機能、体重および摂餌量に対する影響

一般状態観察結果を表 3-5 に示す。被験物質の影響ではないが、対照群の 1 例が投与 22 日目に死亡した。一般状態観察では、500 mg/kg 群の雌雄で流涎、自発運動低下、呼吸数減少、半眼が認められた。流涎は数例で投与 30 分後以降にも認められたが、自発運動低下、呼吸数減少および半眼はほとんどの動物で投与 30 分後までに消失した。また、自発運動低下、呼吸数減少および半眼は、雄ではほとんどが投与期間の初期～中期に認められ、投与期間の終盤には認められなかった。雌では交配前期間から妊娠期間に認められ、哺育期間には分娩日およびその翌日に各 1 例で認められたのを除いて認められなかった。500 mg/kg 群の雌の 1 例では、分娩翌日に閉瞼、鼻・口周囲および下腹部

の汚れがみられ、全腹児が死亡した。

詳細な一般状態観察において被験物質の影響と考えられた所見を表 3-6 に示す。500 mg/kg 群の雌で散瞳が投与 5 週目に 2 例、投与 6 週目に 1 例で認められた。雌のその他の検査時期では異常は認められなかった。雄には異常は認められなかった。

機能検査のうち異常が認められた瞳孔反射検査の結果を表 3-7、対照群と統計学的有意差が認められた自発運動量の結果を表 3-8 に示す。500 mg/kg 群の雌の 1 例で投与 6 週目に瞳孔反射の消失が認められた。また、500 mg/kg 群の雌で測定 20～30 分の自発運動量が有意な低値となった。自発運動量については、他の測定時間や合計値に有意差が認められないため、偶発的变化と考えた。投与 6 週目の検査で雄には異常は認められなかった。また、雌のみ実施した回復期間の瞳孔反射検査および自発運動量測定では異常は認められなかった。

体重測定結果を図 9 に示す。雌雄ともに有意な変動は認められなかった。摂餌量測定結果を図 10 に示す。雄では有意な変動は認められなかった。雌では 500 mg/kg の回復群で投与 21 日目から回復 14 日目まで有意な高値又は高値傾向が認められたが、500 mg/kg の主試験群には有意な変動は認められなかった。

3.3.2.2 血液学的性状に対する影響

血液学的検査結果を表 3-9 および 3-10 に示す。主試験群では、雄の 500 mg/kg 群で赤血球数の有意な低値（対照群比：93%）が認められた。しかし、背景値の範囲内の変動

{範囲 (平均±2S.D.) : 790.7～924.3 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)}であったため、偶発的な変動と考えた。

雌では有意な変動は認められなかった。回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

3.3.2.3 血液生化学的性状に対する影響

血液生化学的検査結果を表 3-11 および 3-12 に示す。主試験群において、雄の 500 mg/kg 群でカルシウム濃度の有意な高値が認められたが、背景値 (8.73～10.53 mg/dL) の範囲内の変動であったため、偶発的な変動と考えられた。雌では 100 mg/kg 以上の群でトリグリセリド濃度の有意な高値が認められた。トリグリセリド濃度の変化は被験物質による脂質代謝への影響と考えられるが、リン脂質濃度や総コレステロール濃度といった他の脂質関連の項目に異常は認められないため、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。また、20 および 500 mg/kg 群において血糖の有意な高値が認められたが、用量依存性のない変化であるため、偶発的な変動と考えられた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。回復群の雄には被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

3.3.2.4 器官重量に対する影響

器官重量測定結果を表 3-13 および 3-14 に示す。主試験群では雌雄の 100 mg/kg 以上の群で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値又は高値傾向が認められた。また、雄の 100 mg/kg 以上の群および雌の 500 mg/kg 群で腎臓の絶対および相対重量の有意な高値

が認められた。雌雄ともに、その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

回復群では、雄の 500 mg/kg 群で腎臓の絶対および相対重量の有意な高値、雌の 500 mg/kg 群で肝臓の絶対および相対重量の有意な高値が引き続き認められた。その他の項目に被験物質投与の影響と考えられる変動は認められなかった。

3.3.2.5 体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔、腹腔および骨盤腔に対する影響

剖検結果のうち被験物質投与の影響と考えられた変化を表 3-15 に示す。主試験群では、腹腔において、雄の 500 mg/kg 群の 7 例全例、雌の 500 mg/kg 群の 11 例で肝臓の腫大が認められた。また、雄の 500 mg/kg 群の 5 例および 100 mg/kg 群の 2 例で腎臓の表面点状模様明瞭化、500 mg/kg 群の 2 例で腎臓の腫大が認められた。また、全腹児が死亡した雌の 500 mg/kg 群の 1 例で肝臓の白色部が認められた。体表、開孔部、皮下、頭蓋腔、胸腔および骨盤腔に被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。回復群では、雌雄ともに被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

3.3.2.6 病理組織学的観察

被験物質投与の影響と考えられる変化が認められた肝臓および腎臓の結果を表 3-16 に示す。主試験群において、雌雄の 500 mg/kg 群でびまん性肝細胞肥大、雄の 100 mg/kg 群および雌の 100 mg/kg 以上の群で軽度又は中等度の小葉中心性肝細胞肥大が認められた。びまん性肝細胞肥大は、肝細胞肥大が小葉の中心だけでなく、小葉全体に広がって

いる変化である。また、雌の 500 mg/kg 群の 1 例で限局性肝細胞壊死が認められた。また、雄の 100 mg/kg 以上の群で腎臓の好塩基性尿細管、好酸性小体増加および硝子滴増加、500 mg/kg 群で皮髄境界部の細胞残渣を伴う尿細管拡張が認められた。好塩基性尿細管は、再生中の尿細管が好塩基性の細胞質を有する上皮から成ることから（日本毒性病理学会編, 2017）、尿細管の再生と関連した所見とされている。好酸性小体および硝子滴は、尿細管においてタンパク質が細胞内に再吸収されたものとして認められる所見であり、雄ラット特異的病変である $\alpha 2u$ -グロブリン腎症の際にも認められる（日本毒性病理学会編, 2017）。また、尿細管拡張は尿が鬱滞した際や、尿細管上皮の傷害後に基底膜が破壊された際に認められる所見である（日本毒性病理学会編, 2017）。また、雌の対照群および 500 mg/kg 群の各 1 例で腎臓の尿細管上皮の空胞化が認められた。なお、大脳、小脳、脳橋、脊髄といった中枢神経系に異常は認められなかった。回復群では、肝臓の変化は消失したが、腎臓の好塩基性尿細管および皮髄境界部の細胞残渣を伴う尿細管拡張は引き続き認められた。

雄の腎臓で好酸性小体増加および硝子滴増加が認められたため、抗 $\alpha 2u$ -グロブリン抗体による免疫組織化学的染色を行った。その結果、100 mg/kg 以上の群の皮質の尿細管上皮細胞、および 500 mg/kg 群の皮髄境界部の拡張した尿細管内の細胞残渣中に陽性物質が認められ、雄の腎臓で認められた一連の変化は $\alpha 2u$ -グロブリン腎症によるものと考えられた。また、雌の尿細管上皮細胞の空胞化が認められた対照群および 500 mg/kg

群の各 1 例に対し、オイル赤 O 染色を行った。その結果、空胞に一致して陽性物質が認められ、中性脂肪であることが確認された。しかし、この変化は対照群でも認められているため、自然発生病変と考えられた。

3.3.2.7 生殖および発生に対する影響

分娩・哺育状態についての観察結果を表 3-17 に示す。20 および 100 mg/kg の各 1 例が分娩途中で死亡した。また、100 mg/kg 群の 2 例および 500 mg/kg 群の 1 例で営巣行動であるリトリート行動、授乳のため児動物を抱え込む行動であるクラウチング行動の不全がみられ、全腹児が死亡した。生殖発生毒性に関する観察・検査結果を表 3-18 に示す。500 mg/kg 群で雌雄の児動物の哺育 0 日の体重が有意な低値、哺育 4 日の体重が低値傾向を示した。また、500 mg/kg 群で妊娠期間に有意な短縮が認められたが、20 mg/kg 群と同様の値であり用量依存性が認められなかったため、偶発的な変化と考えられた。

表 3-5 TBCB の併合試験における一般状態観察所見

所見名	用量 (mg/kg/日)					
	投与期間				回復期間	
	0	20	100	500	0	500
雄						
流涎	0/12	0/12	2/12	12/12	0/5	0/5
自発運動低下	0/12	0/12	0/12	10/12	0/5	0/5
呼吸数減少	0/12	0/12	0/12	7/12	0/5	0/5
半眼	0/12	0/12	0/12	4/12	0/5	0/5
死亡	1/12	0/12	0/12	0/12	0/5	0/5
雌						
流涎	0/17	0/12	0/12	17/17	0/5	0/5
自発運動低下	0/17	0/12	0/12	16/17	0/5	0/5
呼吸数減少	0/17	0/12	0/12	8/17	0/5	0/5
半眼	0/17	0/12	0/12	9/17	0/5	0/5
閉瞼	0/17	0/12	0/12	1/17	0/5	0/5
鼻・口周囲の汚れ	0/17	0/12	0/12	1/17	0/5	0/5
下腹部の汚れ	0/17	0/12	0/12	1/17	0/5	0/5
紅涙	0/17	0/12	0/12	1/17	0/5	0/5

表 3-6 TBCB の併合試験における詳細な一般状態観察所見

		用量 (mg/kg/日)			
検査時期	所見名	0	20	100	500
雌	投与 5 週目※				
	散瞳	0/17	0/12	0/12	2/17
	投与 6 週目※				
	散瞳	0/5	0/5	0/5	1/5

※投与 5 週目：主試験群および回復群、投与 6 週目：回復群

表 3-7 TBCB の併合試験における瞳孔反射検査結果

所見名	用量 (mg/kg/日)				回復期間※	
	0	投与期間※			0	500
雄						
正常	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
瞳孔反射の消失	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
雌						
(主試験群)						
正常	5/5	5/5	5/5	5/5	-	-
瞳孔反射の消失	0/5	0/5	0/5	0/5	-	-
(回復群)						
正常	5/5	5/5	5/5	4/5	0/5	0/5
瞳孔反射の消失	0/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5

※：雄は投与 6 週目、雌の主試験群は哺育 4 日、雌の回復群は投与 6 週目および回復 2 週目に検査を実施

表 3-8 TBCB の併合試験における自発運動量測定結果

測定時間 (分)		投与期間※				用量 (mg/kg/日)		回復期間※	
		0	20	100	500	0	500	0	500
雄									
動物数		5	5	5	5				
0-10	171.8 ± 74.0	165.6 ± 34.0	188.8 ± 49.0	190.0 ± 67.3					
10-20	118.0 ± 57.0	109.6 ± 37.6	69.2 ± 41.3	92.0 ± 53.8					
20-30	67.2 ± 67.8	25.0 ± 11.6	96.8 ± 57.5	35.0 ± 36.2					
30-40	48.6 ± 37.1	49.4 ± 33.9	62.8 ± 44.6	10.6 ± 19.0					
40-50	17.2 ± 14.7	17.6 ± 20.2	22.4 ± 27.7	5.0 ± 3.9					
50-60	18.8 ± 21.7	29.0 ± 36.1	19.0 ± 35.4	6.8 ± 7.2					
合計	441.6 ± 225.9	396.2 ± 57.4	459.0 ± 118.3	339.4 ± 162.3					
雌 (主試験群)									
動物数		5	5	5	5				
0-10	126.6 ± 34.4	144.0 ± 46.2	143.8 ± 38.9	90.2 ± 41.5					
10-20	60.4 ± 42.6	87.6 ± 10.8	76.6 ± 36.5	52.8 ± 29.5					
20-30	105.6 ± 37.0	70.4 ± 19.5	63.6 ± 35.7	24.6 ± 27.7 **					
30-40	51.8 ± 64.2	50.4 ± 33.6	55.8 ± 30.9	45.0 ± 64.4					
40-50	35.6 ± 33.9	75.6 ± 50.1	39.8 ± 53.8	11.4 ± 16.2					
50-60	36.6 ± 32.4	44.4 ± 41.5	22.6 ± 14.4	31.4 ± 63.6					
合計	416.6 ± 202.5	472.4 ± 105.2	402.2 ± 169.7	255.4 ± 103.1					
雌 (回復群)									
動物数		5			5			5	
0-10	223.8 ± 65.2			251.2 ± 61.1			93.4 ± 65.7	147.6 ± 60.3	
10-20	120.8 ± 64.8			163.2 ± 28.6			64.0 ± 31.6	48.2 ± 22.0	
20-30	91.0 ± 46.3			103.6 ± 63.3			26.8 ± 27.0	60.4 ± 58.4	
30-40	25.2 ± 19.4			18.6 ± 23.0			18.6 ± 16.9	54.2 ± 50.5	
40-50	9.8 ± 15.7			1.2 ± 2.2			32.2 ± 30.5	44.4 ± 45.6	
50-60	38.6 ± 36.2			27.2 ± 59.7			22.6 ± 34.9	42.0 ± 50.8	
合計	509.2 ± 164.2			565.0 ± 123.6			257.6 ± 157.7	396.8 ± 224.6	

平均値 ± 標準偏差、*: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.01$)

※: 雄は投与 6 週目、雌の主試験群は哺育 4 日、雌の回復群は投与 6 週目および回復 2 週目に検査を実施

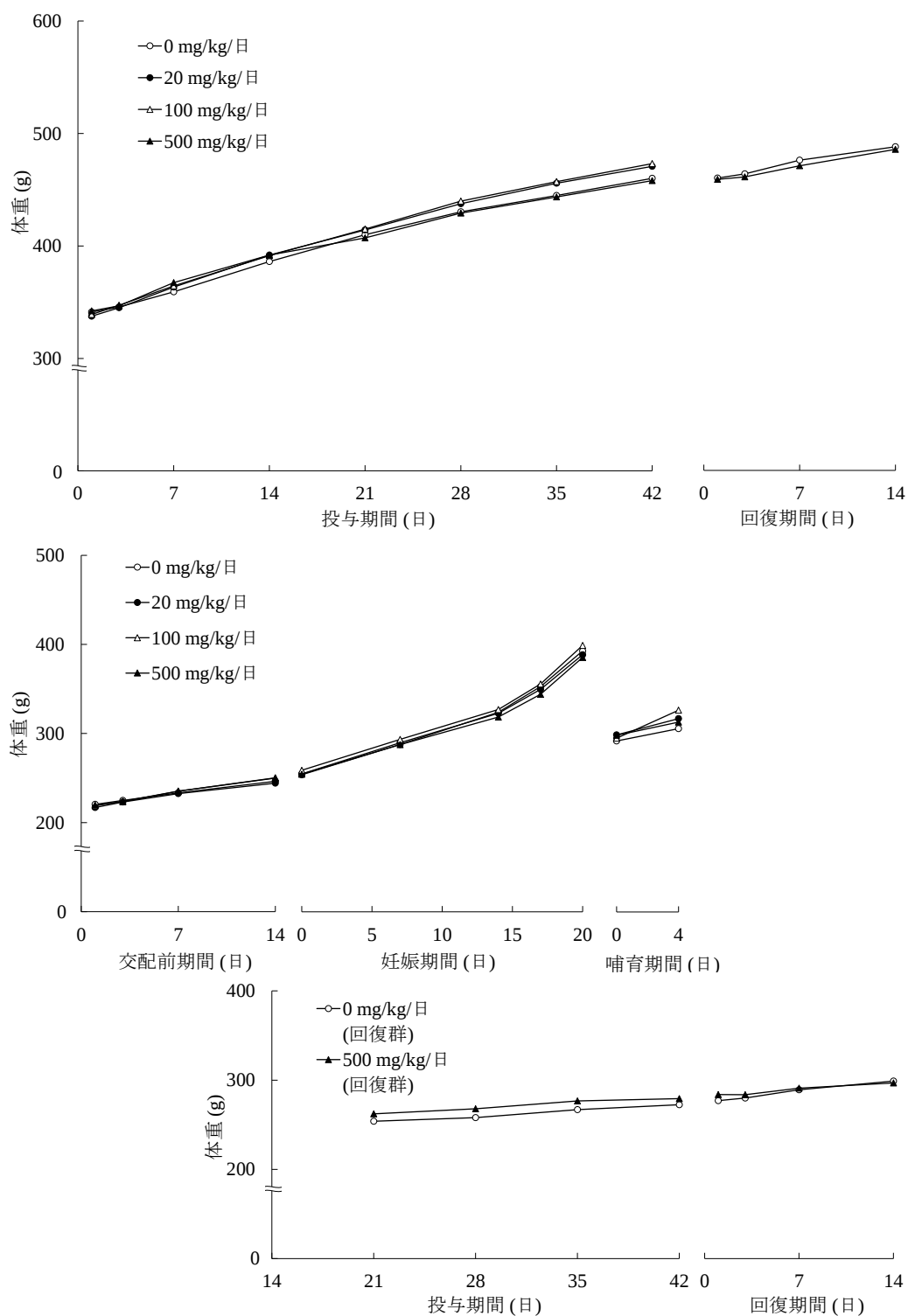


図9 TBCBの併合試験における体重測定結果
 上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群
 (Tsubokura *et al.*, 2017)

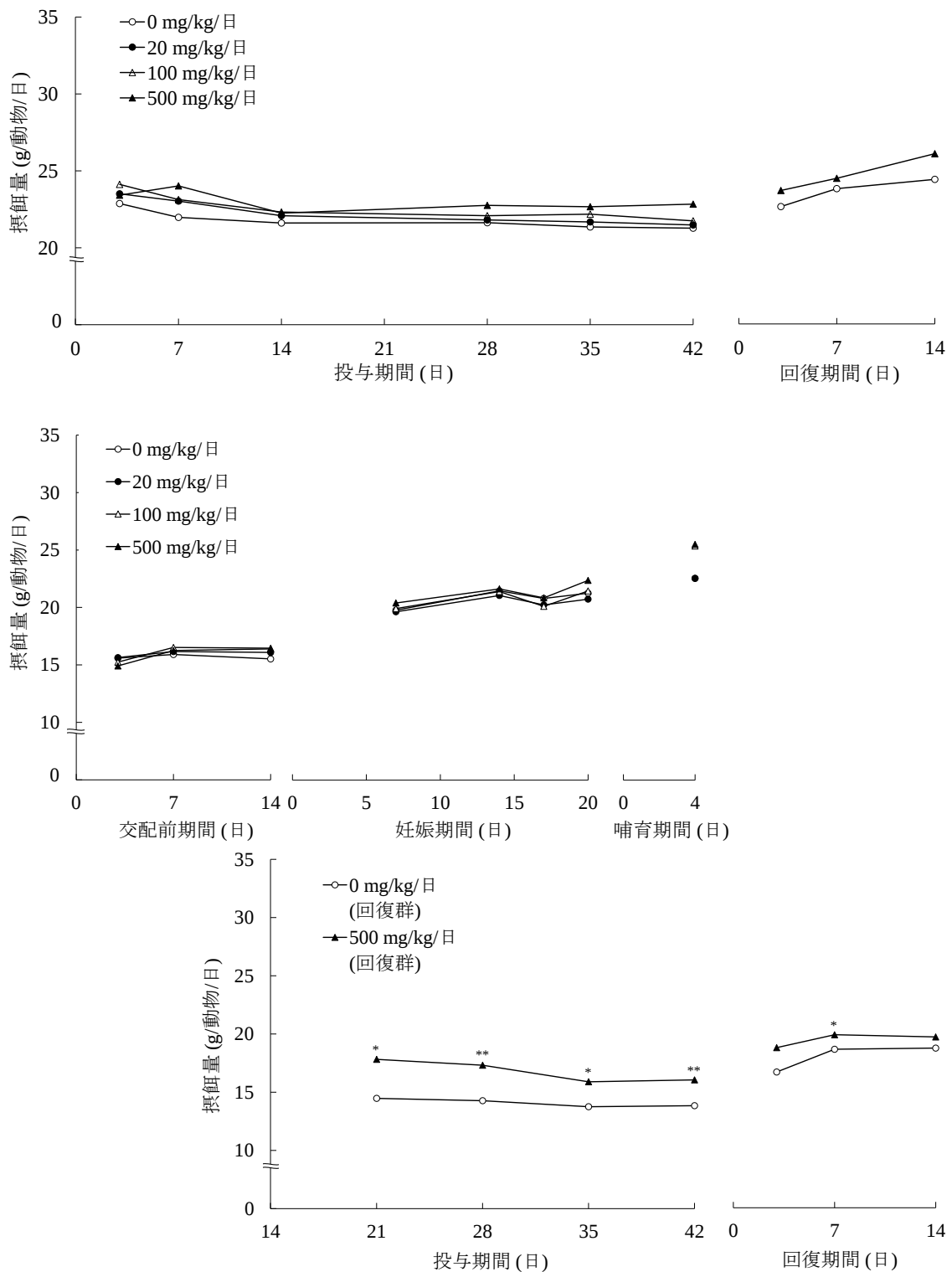


図 10 TBCB の併合試験における摂餌量測定結果

上段：雄、中段：雌主試験群、下段：雌回復群

*：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.05$ ）

**：統計学的に有意（対対照群、 $p < 0.01$ ）

（Tsubokura *et al.*, 2017）

表 3-9 TBCB の併合試験における血液学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)					
	主試験群			回復群		
	0	20	100	500	0	500
動物数	5	5	5	5	5	5
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	864 $\pm$ 42	844 $\pm$ 35	857 $\pm$ 42	801 $\pm$ 16*	857 $\pm$ 29	854 $\pm$ 24
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	15.0 $\pm$ 0.4	15.3 $\pm$ 0.5	15.3 $\pm$ 0.6	14.4 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 0.5	15.0 $\pm$ 0.6
ヘマトクリット値 (%)	44.6 $\pm$ 1.6	46.1 $\pm$ 2.0	45.4 $\pm$ 2.0	42.5 $\pm$ 1.0	44.5 $\pm$ 1.1	43.7 $\pm$ 2.1
MCV (fL)	51.7 $\pm$ 1.1	54.7 $\pm$ 2.5	53.0 $\pm$ 2.0	53.1 $\pm$ 1.5	52.0 $\pm$ 1.8	51.2 $\pm$ 2.4
MCH (pg)	17.3 $\pm$ 0.8	18.1 $\pm$ 0.5	17.9 $\pm$ 0.7	18.0 $\pm$ 0.5	17.8 $\pm$ 0.7	17.6 $\pm$ 0.6
MCHC (g/dL)	33.5 $\pm$ 0.8	33.2 $\pm$ 0.6	33.7 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.3	34.2 $\pm$ 0.4	34.4 $\pm$ 0.5
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	102.5 $\pm$ 9.2	102.9 $\pm$ 7.7	94.6 $\pm$ 11.6	103.3 $\pm$ 6.2	113.1 $\pm$ 10.7	112.5 $\pm$ 11.0
網状赤血球数比率 (%)	1.7 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.6	2.0 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.3
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	125 $\pm$ 26	132 $\pm$ 31	147 $\pm$ 14	124 $\pm$ 16	132 $\pm$ 23	130 $\pm$ 23
白血球百分率 (%)						
好中球	14.9 $\pm$ 3.2	25.8 $\pm$ 6.3	18.0 $\pm$ 3.8	17.5 $\pm$ 6.8	17.3 $\pm$ 1.6	16.1 $\pm$ 4.2
リンパ球	1.2 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.3
好酸球	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.4
好塩基球	80.4 $\pm$ 3.2	69.9 $\pm$ 6.2	78.2 $\pm$ 3.6	79.2 $\pm$ 6.3	78.0 $\pm$ 2.1	79.3 $\pm$ 4.1
単球	1.7 $\pm$ 0.4	2.0 $\pm$ 0.6	1.4 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.5	2.0 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.4
大型非染色球	1.4 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.4	1.1 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.5
PT (s)	18.4 $\pm$ 1.4	19.8 $\pm$ 2.9	22.7 $\pm$ 2.5	24.5 $\pm$ 6.8	18.9 $\pm$ 1.8	19.7 $\pm$ 1.8
APTT (s)	21.2 $\pm$ 3.2	23.8 $\pm$ 2.8	23.8 $\pm$ 3.3	24.7 $\pm$ 3.2	23.0 $\pm$ 3.1	23.4 $\pm$ 1.1

平均値 $\pm$ 標準偏差*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)

表 3-10 TBCB の併合試験における血液学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)					
	主試験群			回復群		
	0	20	100	500	0	500
動物数	5	5	5	5	5	5
赤血球数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	684 $\pm$ 50	669 $\pm$ 33	668 $\pm$ 83	680 $\pm$ 54	804 $\pm$ 15	804 $\pm$ 32
ヘモグロビン濃度 (g/dL)	13.2 $\pm$ 0.8	13.0 $\pm$ 0.6	12.9 $\pm$ 1.0	13.2 $\pm$ 0.8	14.6 $\pm$ 0.3	14.8 $\pm$ 0.5
ヘマトクリット値 (%)	38.9 $\pm$ 2.4	38.7 $\pm$ 1.9	38.3 $\pm$ 3.1	39.1 $\pm$ 2.8	41.6 $\pm$ 1.1	42.2 $\pm$ 1.5
MCV (fL)	56.8 $\pm$ 1.5	57.8 $\pm$ 0.9	57.5 $\pm$ 2.8	57.6 $\pm$ 2.3	51.7 $\pm$ 1.1	52.6 $\pm$ 2.4
MCH (pg)	19.3 $\pm$ 0.3	19.4 $\pm$ 0.3	19.5 $\pm$ 1.0	19.5 $\pm$ 0.9	18.1 $\pm$ 0.4	18.5 $\pm$ 0.9
MCHC (g/dL)	33.9 $\pm$ 0.3	33.5 $\pm$ 0.3	33.9 $\pm$ 0.4	33.8 $\pm$ 0.5	35.0 $\pm$ 0.3	35.1 $\pm$ 0.4
血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$)	100.7 $\pm$ 8.0	98.2 $\pm$ 17.1	100.3 $\pm$ 8.6	103.2 $\pm$ 7.8	189.5 $\pm$ 12.9	197.8 $\pm$ 34.5
網状赤血球数比率 (%)	6.0 $\pm$ 1.1	6.6 $\pm$ 0.8	5.4 $\pm$ 1.5	5.2 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.5
白血球数 ($\times 10^2/\mu\text{L}$)	145 $\pm$ 17	134 $\pm$ 21	197 $\pm$ 58	185 $\pm$ 41	89 $\pm$ 21	82 $\pm$ 23
白血球百分率 (%)						
好中球	36.8 $\pm$ 5.4	40.5 $\pm$ 5.6	31.7 $\pm$ 7.7	33.2 $\pm$ 5.6	19.1 $\pm$ 3.5	23.3 $\pm$ 5.1
リンパ球	0.3 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.7	1.7 $\pm$ 0.4
好酸球	0.2 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1
好塩基球	59.6 $\pm$ 5.3	56.0 $\pm$ 4.7	63.4 $\pm$ 7.4	62.4 $\pm$ 5.5	76.3 $\pm$ 3.4	71.9 $\pm$ 4.4
単球	1.7 $\pm$ 0.7	1.9 $\pm$ 1.0	2.5 $\pm$ 1.6	2.4 $\pm$ 0.5	1.6 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.5
大型非染色球	1.3 $\pm$ 0.7	0.9 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 1.2	1.4 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.3	1.1 $\pm$ 0.4
PT (s)	15.3 $\pm$ 0.7	15.9 $\pm$ 0.7	15.2 $\pm$ 0.8	14.8 $\pm$ 0.5	14.4 $\pm$ 0.3	14.7 $\pm$ 0.7
APTT (s)	17.7 $\pm$ 2.2	18.4 $\pm$ 2.0	16.8 $\pm$ 1.4	18.7 $\pm$ 1.3	19.1 $\pm$ 1.0	19.1 $\pm$ 1.9

平均値 $\pm$ 標準偏差

表 3-11 TBCB の併合試験における血液生化学的検査結果 (雄)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	20	100	500	500	0	5	10	25	500
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	84 ± 8	75 ± 9	74 ± 9	78 ± 21	78 ± 21	76 ± 10	76 ± 10	90 ± 25	90 ± 25	90 ± 25
ALT (IU/L)	26 ± 6	22 ± 2	22 ± 1	24 ± 6	24 ± 6	24 ± 4	24 ± 4	28 ± 4	28 ± 4	28 ± 4
ALP (IU/L)	209 ± 31	229 ± 13	215 ± 27	261 ± 76	261 ± 76	212 ± 48	212 ± 48	164 ± 25	164 ± 25	164 ± 25
LDH (IU/L)	76 ± 8	71 ± 20	100 ± 29	83 ± 19	83 ± 19	68 ± 20	68 ± 20	61 ± 7	61 ± 7	61 ± 7
γ-GTP (IU/L)	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2
総コレステロール (mg/dL)	54 ± 12	50 ± 2	54 ± 12	57 ± 13	57 ± 13	56 ± 13	56 ± 13	61 ± 10	61 ± 10	61 ± 10
トリグリセリド (mg/dL)	33 ± 9	43 ± 10	50 ± 18	31 ± 9	31 ± 9	50 ± 9	50 ± 9	45 ± 12	45 ± 12	45 ± 12
リン脂質 (mg/dL)	91.1 ± 15.4	96.3 ± 5.8	97.5 ± 18.8	100.0 ± 13.8	100.0 ± 13.8	91.5 ± 11.9	91.5 ± 11.9	95.4 ± 11.6	95.4 ± 11.6	95.4 ± 11.6
血糖 (mg/dL)	153 ± 12	159 ± 9	159 ± 12	164 ± 26	164 ± 26	184 ± 26	184 ± 26	170 ± 22	170 ± 22	170 ± 22
総蛋白 (g/dL)	5.9 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.1	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.2	6.1 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.3
アルブミン (g/dL)	2.5 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.7 ± 0.2	2.6 ± 0.1	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1
A/G 比	0.75 ± 0.05	0.77 ± 0.06	0.78 ± 0.08	0.83 ± 0.08	0.83 ± 0.08	0.74 ± 0.04	0.74 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.78 ± 0.04	0.78 ± 0.04
尿素窒素 (mg/dL)	13.9 ± 0.9	12.0 ± 1.4	13.7 ± 1.2	13.4 ± 1.7	13.4 ± 1.7	15.1 ± 1.7	15.1 ± 1.7	15.6 ± 2.1	15.6 ± 2.1	15.6 ± 2.1
クレアチニン (mg/dL)	0.27 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.25 ± 0.05	0.27 ± 0.06	0.27 ± 0.06	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.26 ± 0.04
総ビリルビン (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
総胆汁酸 (μmol/L)	18.0 ± 20.1	14.0 ± 8.5	9.8 ± 6.2	15.3 ± 17.8	15.3 ± 17.8	23.9 ± 14.7	23.9 ± 14.7	20.7 ± 11.7	20.7 ± 11.7	20.7 ± 11.7
カルシウム (mg/dL)	9.3 ± 0.2	9.5 ± 0.3	9.7 ± 0.2	9.9 ± 0.2**	9.9 ± 0.2**	9.3 ± 0.2	9.3 ± 0.2	9.6 ± 0.2*	9.6 ± 0.2*	9.6 ± 0.2*
無機リン (mg/dL)	6.0 ± 0.5	6.0 ± 0.6	6.5 ± 0.4	6.5 ± 0.4	6.5 ± 0.4	6.2 ± 0.6	6.2 ± 0.6	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.3	6.0 ± 0.3
ナトリウム (mEq/L)	141 ± 1	142 ± 1	141 ± 1	142 ± 0	142 ± 0	141 ± 2	141 ± 2	142 ± 1	142 ± 1	142 ± 1
カリウム (mEq/L)	4.2 ± 0.3	4.0 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.4	4.5 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.4	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.3 ± 0.2
塩素 (mEq/L)	104.7 ± 1.4	104.2 ± 1.3	104.5 ± 1.4	103.5 ± 1.8	103.5 ± 1.8	105.7 ± 2.4	105.7 ± 2.4	105.0 ± 0.8	105.0 ± 0.8	105.0 ± 0.8

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 3-12 TBCB の併合試験における血液生化学的検査結果 (雌)

検査項目	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群					回復群				
	0	20	100	500	500	0	500	0	500	500
動物数	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
AST (IU/L)	130 ± 69	100 ± 29	99 ± 34	109 ± 68	109 ± 68	96 ± 18	128 ± 39	96 ± 18	128 ± 39	128 ± 39
ALT (IU/L)	55 ± 47	45 ± 22	44 ± 12	49 ± 22	49 ± 22	27 ± 7	38 ± 20	27 ± 7	38 ± 20	38 ± 20
ALP (IU/L)	130 ± 62	122 ± 65	167 ± 81	127 ± 39	127 ± 39	96 ± 18	82 ± 12	96 ± 18	82 ± 12	82 ± 12
LDH (IU/L)	78 ± 52	107 ± 73	65 ± 16	91 ± 41	91 ± 41	73 ± 12	95 ± 24	73 ± 12	95 ± 24	95 ± 24
γ-GTP (IU/L)	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	8.2 ± 0.2	8.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5	0.7 ± 0.3	0.9 ± 0.5	0.9 ± 0.5
総コレステロール (mg/dL)	70 ± 17	74 ± 12	82 ± 10	82 ± 10	82 ± 10	71 ± 12	89 ± 22	71 ± 12	89 ± 22	89 ± 22
トリグリセリド (mg/dL)	31 ± 10	40 ± 9	58 ± 25*	83 ± 12**	83 ± 12**	25 ± 6	26 ± 6	25 ± 6	26 ± 6	26 ± 6
リン脂質 (mg/dL)	133.3 ± 28.0	137.8 ± 17.6	152.2 ± 16.0	166.3 ± 18.4	166.3 ± 18.4	131.0 ± 14.3	152.3 ± 28.7	131.0 ± 14.3	152.3 ± 28.7	152.3 ± 28.7
血糖 (mg/dL)	133 ± 14	153 ± 9*	150 ± 5	151 ± 14*	151 ± 14*	154 ± 19	145 ± 13	154 ± 19	145 ± 13	145 ± 13
総蛋白 (g/dL)	6.1 ± 0.3	5.9 ± 0.4	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.3	6.2 ± 0.3	6.7 ± 0.3	6.9 ± 0.4	6.7 ± 0.3	6.9 ± 0.4	6.9 ± 0.4
アルブミン (g/dL)	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.3	3.0 ± 0.3
A/G 比	0.82 ± 0.05	0.84 ± 0.06	0.79 ± 0.04	0.86 ± 0.08	0.86 ± 0.08	0.78 ± 0.03	0.78 ± 0.07	0.78 ± 0.03	0.78 ± 0.07	0.78 ± 0.07
尿素窒素 (mg/dL)	10.6 ± 2.1	12.2 ± 2.3	13.2 ± 2.1	13.5 ± 1.5	13.5 ± 1.5	19.3 ± 2.0	16.4 ± 0.9*	19.3 ± 2.0	16.4 ± 0.9*	16.4 ± 0.9*
クレアチニン (mg/dL)	0.24 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.33 ± 0.03	0.30 ± 0.01	0.30 ± 0.01
総ビリルビン (mg/dL)	0.08 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02	0.06 ± 0.02
総胆汁酸 (μmol/L)	10.7 ± 3.3	30.9 ± 29.2	14.7 ± 5.1	24.9 ± 27.8	24.9 ± 27.8	16.1 ± 7.5	27.4 ± 24.2	16.1 ± 7.5	27.4 ± 24.2	27.4 ± 24.2
カルシウム (mg/dL)	10.1 ± 0.3	10.1 ± 0.1	9.8 ± 0.4	10.2 ± 0.4	10.2 ± 0.4	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.7	9.3 ± 0.2	9.4 ± 0.7	9.4 ± 0.7
無機リン (mg/dL)	7.2 ± 0.3	7.9 ± 1.0	7.0 ± 0.3	7.8 ± 1.3	7.8 ± 1.3	4.6 ± 0.5	4.5 ± 0.6	4.6 ± 0.5	4.5 ± 0.6	4.5 ± 0.6
ナトリウム (mEq/L)	141 ± 1	141 ± 0	139 ± 1**	140 ± 1	140 ± 1	139 ± 1	139 ± 1	139 ± 1	139 ± 1	139 ± 1
カリウム (mEq/L)	4.5 ± 0.2	4.4 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.4 ± 0.4	4.4 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.1 ± 0.5	4.3 ± 0.5	4.1 ± 0.5	4.1 ± 0.5
塩素 (mEq/L)	104.1 ± 1.6	103.4 ± 1.4	101.5 ± 1.9	102.6 ± 1.2	102.6 ± 1.2	106.2 ± 1.2	105.1 ± 1.2	106.2 ± 1.2	105.1 ± 1.2	105.1 ± 1.2

平均値 ± 標準偏差

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 3-13 TBCB の併合試験における器官重量測定結果 (雄)

器官名	主試験群						用量 (mg/kg/日)			回復群	
	0	20	100	500	0	500	0	500	0	500	
	6	12	12	7	5	5	5	5	5	5	
動物数	6	12	12	7	5	5	5	5	5	5	
脳 (g)	2.10 ± 0.05	2.08 ± 0.07	2.15 ± 0.08	2.05 ± 0.07	2.12 ± 0.07	2.10 ± 0.05					
(g/100 g)	0.48 ± 0.01	0.47 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.48 ± 0.04	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.03					
下垂体 (mg)	12.0 ± 1.4	13.2 ± 1.1	13.0 ± 1.6	13.4 ± 1.6	12.6 ± 2.0	12.8 ± 0.6					
(mg/100 g)	2.7 ± 0.3	3.0 ± 0.2	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.2					
甲状腺 (mg)	24.5 ± 2.7	25.1 ± 3.6	28.7 ± 3.5	28.2 ± 3.9	23.7 ± 4.5	27.0 ± 6.0					
(mg/100 g)	5.6 ± 0.6	5.6 ± 0.8	6.4 ± 0.6	6.5 ± 1.0	5.1 ± 0.9	6.0 ± 1.3					
胸腺 (mg)	329.4 ± 70.9	283.6 ± 54.0	302.0 ± 65.0	344.7 ± 96.3	337.5 ± 21.3	295.8 ± 72.4					
(mg/100 g)	75.1 ± 16.4	63.0 ± 10.0	67.0 ± 14.7	79.2 ± 20.2	73.8 ± 8.4	64.7 ± 13.2					
心臓 (g)	1.32 ± 0.07	1.34 ± 0.10	1.36 ± 0.15	1.30 ± 0.15	1.44 ± 0.13	1.31 ± 0.12					
(g/100 g)	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.02	0.30 ± 0.03	0.30 ± 0.04	0.31 ± 0.02	0.29 ± 0.02					
肝臓 (g)	11.13 ± 1.02	11.59 ± 1.20	12.98 ± 1.61	16.54 ± 1.90**	11.88 ± 1.52	12.65 ± 0.91					
(g/100 g)	2.53 ± 0.17	2.58 ± 0.16	2.87 ± 0.24*	3.82 ± 0.35**	2.58 ± 0.19	2.78 ± 0.12					
脾臓 (g)	0.67 ± 0.07	0.63 ± 0.05	0.64 ± 0.06	0.67 ± 0.11	0.60 ± 0.11	0.71 ± 0.11					
(g/100 g)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.15 ± 0.02					
腎臓 (g)	2.69 ± 0.20	3.02 ± 0.22	3.36 ± 0.38**	3.74 ± 0.57**	2.86 ± 0.30	3.23 ± 0.20*					
(g/100 g)	0.61 ± 0.04	0.67 ± 0.05	0.74 ± 0.07**	0.87 ± 0.11**	0.62 ± 0.02	0.71 ± 0.06*					
副腎 (mg)	54.7 ± 3.8	54.5 ± 6.3	54.1 ± 8.1	56.9 ± 7.2	53.3 ± 5.4	51.7 ± 1.7					
(mg/100 g)	12.5 ± 1.3	12.2 ± 1.6	11.9 ± 1.4	13.2 ± 1.8	11.6 ± 1.2	11.4 ± 0.6					
精巢 (g)	3.25 ± 0.25	3.21 ± 0.18	3.34 ± 0.25	3.24 ± 0.29	3.41 ± 0.33	3.44 ± 0.29					
(g/100 g)	0.74 ± 0.04	0.72 ± 0.05	0.74 ± 0.06	0.75 ± 0.08	0.75 ± 0.09	0.76 ± 0.04					
精巢上体(g)	1.33 ± 0.10	1.24 ± 0.09	1.29 ± 0.11	1.21 ± 0.13	1.35 ± 0.14	1.31 ± 0.15					
(g/100 g)	0.30 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03					
解剖日体重 (g)	439.5 ± 18.6	449.1 ± 31.7	452.3 ± 27.7	433.2 ± 28.8	459.8 ± 35.8	454.5 ± 20.4					

上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.05$)、**: 統計学的に有意 (対対照群、 $p < 0.01$)

表 3-14 TBCB の併合試験における器官重量測定結果 (雌)

器官名 動物数	用量 (mg/kg/日)										回復群		
	主試験群												
	0	20	11	9	100	500	11	500	0	5	0	5	500
脳 (g)	1.93 ± 0.08	1.97 ± 0.07	2.02 ± 0.08	2.02 ± 0.08	1.95 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.95 ± 0.08	2.01 ± 0.08	2.01 ± 0.08	1.98 ± 0.07	2.01 ± 0.08	1.98 ± 0.07	1.98 ± 0.07
(g/100 g)	0.68 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.67 ± 0.07	0.67 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.67 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.05
下垂体 (mg)	15.5 ± 1.9	14.6 ± 1.8	17.1 ± 1.6	17.1 ± 1.6	15.4 ± 1.1	17.3 ± 1.0	15.4 ± 1.1	17.3 ± 1.0	17.3 ± 1.0	16.2 ± 2.1	17.3 ± 1.0	16.2 ± 2.1	16.2 ± 2.1
(mg/100 g)	5.4 ± 0.5	5.0 ± 0.6	5.6 ± 0.5	5.6 ± 0.5	5.3 ± 0.5	6.3 ± 0.6	5.3 ± 0.5	6.3 ± 0.6	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.9	6.3 ± 0.6	6.0 ± 0.9	6.0 ± 0.9
甲状腺 (mg)	24.0 ± 6.5	21.2 ± 4.8	20.0 ± 4.3	20.0 ± 4.3	22.9 ± 3.2	19.5 ± 2.5	22.9 ± 3.2	19.5 ± 2.5	19.5 ± 2.5	19.4 ± 2.7	19.5 ± 2.5	19.4 ± 2.7	19.4 ± 2.7
(mg/100 g)	8.3 ± 1.7	7.2 ± 1.4	6.7 ± 1.6	6.7 ± 1.6	7.9 ± 1.1	7.1 ± 1.0	7.9 ± 1.1	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0	7.1 ± 1.0
胸腺 (mg)	161.7 ± 56.7	176.5 ± 75.3	183.9 ± 50.8	183.9 ± 50.8	198.0 ± 66.4	316.5 ± 57.7	198.0 ± 66.4	316.5 ± 57.7	316.5 ± 57.7	260.7 ± 48.9	316.5 ± 57.7	260.7 ± 48.9	260.7 ± 48.9
(mg/100 g)	55.3 ± 16.4	58.3 ± 21.1	60.9 ± 16.5	60.9 ± 16.5	68.4 ± 23.2	114.6 ± 15.4	68.4 ± 23.2	114.6 ± 15.4	114.6 ± 15.4	94.9 ± 13.1	114.6 ± 15.4	94.9 ± 13.1	94.9 ± 13.1
心臓 (g)	1.10 ± 0.51	0.94 ± 0.07	0.97 ± 0.07	0.97 ± 0.07	0.94 ± 0.04	0.88 ± 0.05	0.94 ± 0.04	0.88 ± 0.05	0.88 ± 0.05	0.92 ± 0.09	0.88 ± 0.05	0.92 ± 0.09	0.92 ± 0.09
(g/100 g)	0.38 ± 0.17	0.32 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.32 ± 0.02	0.34 ± 0.05	0.34 ± 0.05
肝臓 (g)	9.50 ± 1.39	10.20 ± 0.66	11.02 ± 0.37*	11.02 ± 0.37*	13.84 ± 0.67**	6.63 ± 0.34	13.84 ± 0.67**	6.63 ± 0.34	6.63 ± 0.34	7.88 ± 0.81*	6.63 ± 0.34	7.88 ± 0.81*	7.88 ± 0.81*
(g/100 g)	3.30 ± 0.26	3.46 ± 0.29	3.66 ± 0.23*	3.66 ± 0.23*	4.78 ± 0.28**	2.42 ± 0.12	4.78 ± 0.28**	2.42 ± 0.12	2.42 ± 0.12	2.88 ± 0.18**	2.42 ± 0.12	2.88 ± 0.18**	2.88 ± 0.18**
脾臓 (g)	0.55 ± 0.12	0.58 ± 0.08	0.60 ± 0.10	0.60 ± 0.10	0.58 ± 0.06	0.48 ± 0.07	0.58 ± 0.06	0.48 ± 0.07	0.48 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.48 ± 0.07	0.50 ± 0.05	0.50 ± 0.05
(g/100 g)	0.19 ± 0.03	0.20 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.04	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.18 ± 0.01	0.18 ± 0.01
腎臓 (g)	1.77 ± 0.20	1.81 ± 0.16	1.94 ± 0.13	1.94 ± 0.13	2.05 ± 0.15**	1.72 ± 0.14	2.05 ± 0.15**	1.72 ± 0.14	1.72 ± 0.14	1.86 ± 0.16	1.72 ± 0.14	1.86 ± 0.16	1.86 ± 0.16
(g/100 g)	0.62 ± 0.10	0.61 ± 0.03	0.64 ± 0.05	0.64 ± 0.05	0.71 ± 0.06**	0.63 ± 0.06	0.71 ± 0.06**	0.63 ± 0.06	0.63 ± 0.06	0.68 ± 0.03	0.63 ± 0.06	0.68 ± 0.03	0.68 ± 0.03
副腎 (mg)	68.8 ± 8.0	70.2 ± 10.8	68.9 ± 6.0	68.9 ± 6.0	74.6 ± 6.4	64.4 ± 5.4	74.6 ± 6.4	64.4 ± 5.4	64.4 ± 5.4	66.8 ± 6.0	64.4 ± 5.4	66.8 ± 6.0	66.8 ± 6.0
(mg/100 g)	24.0 ± 1.9	24.0 ± 4.8	22.9 ± 2.7	22.9 ± 2.7	25.8 ± 2.7	23.4 ± 1.1	25.8 ± 2.7	23.4 ± 1.1	23.4 ± 1.1	24.6 ± 3.5	23.4 ± 1.1	24.6 ± 3.5	24.6 ± 3.5
卵巢 (mg)	93.3 ± 10.1	95.1 ± 8.6	104.8 ± 10.2	104.8 ± 10.2	101.8 ± 14.2	83.9 ± 8.0	101.8 ± 14.2	83.9 ± 8.0	83.9 ± 8.0	86.7 ± 14.0	83.9 ± 8.0	86.7 ± 14.0	86.7 ± 14.0
(mg/100 g)	32.5 ± 2.0	32.2 ± 3.0	34.7 ± 3.3	34.7 ± 3.3	35.1 ± 4.6	30.7 ± 3.9	35.1 ± 4.6	30.7 ± 3.9	30.7 ± 3.9	31.9 ± 5.9	30.7 ± 3.9	31.9 ± 5.9	31.9 ± 5.9
子宮 (g)	0.55 ± 0.07	0.55 ± 0.07	0.53 ± 0.03	0.53 ± 0.03	0.52 ± 0.06	0.58 ± 0.18	0.52 ± 0.06	0.58 ± 0.18	0.58 ± 0.18	0.57 ± 0.08	0.58 ± 0.18	0.57 ± 0.08	0.57 ± 0.08
(g/100 g)	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.07	0.18 ± 0.02	0.22 ± 0.07	0.22 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.22 ± 0.07	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.03
解剖日体重 (g)	287.1 ± 27.9	296.4 ± 27.1	301.9 ± 12.0	301.9 ± 12.0	289.9 ± 11.2	274.6 ± 17.3	289.9 ± 11.2	274.6 ± 17.3	274.6 ± 17.3	273.3 ± 17.6	274.6 ± 17.3	273.3 ± 17.6	273.3 ± 17.6

平均値 ± 標準偏差

上段：絶対重量、下段：相対重量

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

表 3-15 TBCB の併合試験における剖検所見

所見名	用量 (mg/kg/日)									
	主試験群 (雄)			回復群 (雄)			主試験群 (雌)			回復群 (雌)
	0	20	100	500	0	500	0	20	100	500
肝臓										
腫大	0/6	0/12	0/12	7/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	11/12
白色部	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	1/12
腎臓										
表面点状模様明瞭化	0/6	0/12	2/12	5/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	0/12
腫大	0/6	0/12	0/12	2/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	0/12
										0/5

表 3-16 TBCB の併合試験における病理組織学的検査所見

所見名	用量 (mg/kg/日)												回復群 (雌)			
	主試験群 (雄)				回復群 (雄)				主試験群 (雌)				回復群 (雌)			
	0 ^{a)}	20	100	500	0	500	0	500	0	20 ^{a)}	100 ^{a)}	500	0	500		
グレード																
肝臓																
小葉中心性肝細胞肥大	+	0/6	0/12	1/12	0/7	0/5	0/5	0/12	0/11	1/11	4/12	0/5	0/5	0/5		
	++	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	4/12	0/5	0/5	0/5		
びまん性肝細胞肥大	+	0/6	0/12	0/12	7/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	2/12	0/5	0/5	0/5		
限局性肝細胞壊死	++	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	0/11	0/11	1/12	0/5	0/5	0/5		
腎臓																
好塩基性尿細管	+	0/6	0/12	4/12	2/7	0/5	3/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
	++	0/6	0/12	0/12	4/7	0/5	2/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
皮質の嚢胞形成	+	1/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
髄質の嚢胞形成	+	0/6	1/12	1/12	0/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
皮髄境界部の細胞残渣を伴う尿細管拡張	++	0/6	0/12	0/12	1/7	0/5	1/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
好酸性小体増加	+	0/6	0/12	6/12	5/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
硝子滴増加	+	0/6	0/12	6/12	3/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
	++	0/6	0/12	0/12	3/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
片側性の腎盂炎	+	0/6	2/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
髄質の孤在性嚢胞	+	0/6	1/12	0/12	0/7	1/5	0/5	0/12	-	-	0/12	-	-	-		
尿細管の限局性嚢胞状拡張	+	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	1/12	-	-	0/12	-	-	-		
尿細管拡張	+	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	0/12	-	-	1/12	-	-	-		
尿細管上皮の空胞化	+	0/6	0/12	0/12	0/7	0/5	0/5	1/12	-	-	1/12	-	-	-		

-: 未検査、+: 軽度、++: 中等度

a): 死亡動物の所見は結果表の記載から除いた。

表 3-17 TBCB の併合試験における分娩・哺育状態観察所見

所見名	用量 (mg/kg/日)			
	0	20	100	500
雌				
難産	0/12	1/12	1/12	0/12
死亡	0/12	1/12	1/12	0/12
リトリーピング行動の不全	0/12	0/12	2/12	1/12
クラウチング行動の不全	0/12	0/12	2/12	1/12
全腹児死亡	0/12	0/12	2/12	1/12

表 3-18 TBCB の併合試験における生殖発生毒性関連の結果

検査項目	用量 (mg/kg/日)			
	0	20	100	500
雌動物数	17	12	12	17
性周期 (日、平均±標準偏差)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.1 ± 0.2
同居動物数	12	12	12	12
交尾動物数	12	12	12	12
妊娠動物数	12	12	12	12
交尾率 ^{a)} (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
受胎率 ^{b)} (%)	100.0	100.0	100.0	100.0
交尾所要日数 (平均±標準偏差)	2.0 ± 1.2	2.4 ± 1.0	2.1 ± 1.0	2.3 ± 1.4
妊娠期間 (日、平均±標準偏差)	22.2 ± 0.4	21.7 ± 0.5	21.8 ± 0.4	21.7 ± 0.5 *
妊娠黄体数 (平均±標準偏差)	13.8 ± 1.6	14.0 ± 1.5	15.3 ± 1.3	14.8 ± 1.4
着床痕数 (平均±標準偏差)	13.3 ± 2.2	13.2 ± 3.0	14.6 ± 1.2	13.6 ± 2.1
着床率 ^{c)} (平均±標準偏差)	95.8 ± 7.7	93.3 ± 16.6	96.0 ± 8.1	92.1 ± 11.3
哺育 0 日				
生児出産動物数	12	11	11	12
出産率 ^{d)} (%)	100.0	91.7	91.7	100.0
産児数 (平均±標準偏差)	12.0 ± 2.3	12.0 ± 2.9	13.7 ± 1.7	12.8 ± 2.5
出生生児数 (平均±標準偏差)	11.5 ± 2.2	11.9 ± 2.9	13.5 ± 1.7	12.8 ± 2.5
0 日生存児数 (平均±標準偏差)	11.4 ± 2.4	11.9 ± 2.9	13.5 ± 1.7	12.8 ± 2.6
出生率 ^{e)} (%)、平均±標準偏差)	87.5 ± 12.8	92.4 ± 8.4	93.0 ± 7.3	94.1 ± 7.2
0 日生存率 ^{f)} (%)、平均±標準偏差)	96.1 ± 7.7	99.2 ± 2.7	98.8 ± 4.0	100.0 ± 0.0
出産児性比 ^{g)}	62 / 144	71 / 132	73 / 151	79 / 154
(平均±標準偏差)	0.43 ± 0.12	0.56 ± 0.21	0.49 ± 0.15	0.51 ± 0.13
0 日生存児性比 ^{h)}	60 / 137	71 / 131	73 / 149	79 / 153
(平均±標準偏差)	0.43 ± 0.12	0.57 ± 0.20	0.49 ± 0.15	0.52 ± 0.13
外表異常児数	0 / 138	0 / 131	3 / 149	0 / 154
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	6.81 ± 0.64	6.55 ± 0.56	6.24 ± 0.38	6.02 ± 0.67 **
雌	6.50 ± 0.66	5.99 ± 0.53	6.02 ± 0.39	5.63 ± 0.54 **
哺育 4 日				
生存児を持つ動物数	12	11	9	11
4 日生存児数 (平均±標準偏差)	11.4 ± 2.4	11.5 ± 2.8	10.0 ± 5.5	10.8 ± 4.5
4 日生存率 ⁱ⁾ (%)、平均±標準偏差)	99.1 ± 3.2	97.2 ± 4.9	74.0 ± 39.4	86.2 ± 31.9
4 日生存児性比 ^{j)}	60 / 137	70 / 127	56 / 110	69 / 129
(平均±標準偏差)	0.43 ± 0.12	0.58 ± 0.20	0.49 ± 0.19	0.53 ± 0.12
生存児の体重 (g、平均±標準偏差)				
雄	10.66 ± 2.40	10.55 ± 2.13	10.67 ± 1.68	9.86 ± 1.75
雌	10.31 ± 2.33	9.51 ± 1.68	10.21 ± 1.39	9.49 ± 1.52

a) 交尾率：(交尾確認された雌動物数／交配させた雌動物数) ×100

b) 受胎率：(妊娠動物数／交尾確認された雌動物数) ×100

c) 着床率：(着床痕数／妊娠黄体数) ×100

d) 出産率：(生児出産動物数／妊娠動物数) ×100

e) 出生率：(出生生児数／着床痕数) ×100

f) 0 日生存率：(出生生児数／産児数) ×100

g) 出産児性比：雄出産児数／産児数

h) 0 日生存児性比：哺育 0 日雄生存児数／哺育 0 日生存児数

i) 4 日生存率：(哺育 4 日生存児数／出生生児数) ×100

j) 4 日生存児性比：哺育 4 日雄生存児数／哺育 4 日生存児数

*: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.05$)**: 統計学的に有意 (対照群、 $p < 0.01$)

3.4 考察

TBCB について併合試験を実施した結果、主として雌雄で自発運動低下、呼吸数減少、半眼といった一般状態観察の変化（表 3-5）、肝細胞肥大（表 3-16）、雄のみで尿細管の好酸性小体および硝子滴増加が認められた（表 3-16）。

自発運動低下、呼吸数減少、半眼といった一般状態観察の変化は、雌雄の 500 mg/kg 群のほとんどの動物で認められた（表 3-5）。これらの変化は投与直後から認められ、ほとんどの場合において 30 分後までに消失した。このように、本研究で認められた自発運動低下等の変化は、回復性を有することおよび病理組織的検査で中枢神経系に形態学的異常が認められないことから、被験物質の一過性の中枢神経抑制作用によるものと考えられた。中枢神経抑制作用とは、化学物質が中枢神経系に作用することにより生じる鎮痛作用、催眠作用、麻酔作用のことであり、工業化学物質では、一般的に有機溶媒を投与した際に認められる。詳細な一般状態観察および機能検査で認められた散瞳および瞳孔反射の消失（表 3-6）についても、中枢神経抑制作用と関連する変化と考えられた。

また、これらの症状はヒトにも外挿される変化と考えられた。

本研究では肝臓への影響として、雌雄で肝臓の重量増加を伴う小葉中心性肝細胞肥大およびびまん性肝細胞肥大が認められた（表 3-13、3-14 および 3-16）。前述の通り、げっ歯類を用いた動物実験でみられる肝細胞肥大は、生体の恒常性維持のための薬物代謝酵素の誘導による適応性変化と考えられており、他に生体の恒常性機能の破綻を示す変

化が無い場合は毒性影響ではないとみなされる (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 2006)。本研究では病理組織学的検査において肝臓に他の病変が認められず、血液生化学的検査においても肝毒性と関連する AST、ALT、ALP、 γ -GTP および LDH といった項目に変動が認められなかったことから (表 3-11 および 3-12)、本研究で認められた肝細胞肥大は適応性変化であり、毒性影響ではないと考えられた。なお、雄で認められたびまん性肝細胞肥大 (表 3-16) は、小葉中心性肝細胞肥大の程度が悪化し、小葉全体に広がった所見であるが、肝細胞肥大の程度の雌雄差については原因不明であった。また、雌の 1 例で認められた限局性の肝細胞壊死 (表 3-16) は、限局性であり、1 例のみの変化であることから、被験物質投与とは関係のない自然発生病変と考えられた。

化学物質により誘導される肝臓の薬物代謝酵素として、主に CYP1A、CYP2B、CYP3A、CYP4A が挙げられる。前述のように CYP2B および CYP3A を誘導するフェノバルビタールやプレグネノロン-16 α -カルボニトリルでは、ラットにおいて UGT2B を誘導し甲状腺の濾胞細胞肥大を引き起こすことが知られている (Klaassen and Hood, 2001, Richardson and Klaassen, 2010)。本研究では甲状腺に異常が認められなかったことから、本研究で誘導された酵素は CYP2B および CYP3A ではないと考えられた。CYP4A は核内受容体の PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor α) の関与で発現するとされ、げっ歯類においてペルオキシソーム増殖作用を伴い誘導される (Lee *et al.*, 1995)。本研究の結果だけでは特定することはできないが、CYP1A 又は CYP4A が主として誘導されたこ

とが推察された。

本研究では、腎臓への影響として雄の 100 mg/kg 以上の群で腎重量の増加を伴う好酸性小体および硝子滴増加が認められた（表 3-13 および 3-16）。また、免疫組織化学的染色により $\alpha 2u$ -グロブリン抗体の集積が認められたことから、雄ラット特異的病変である $\alpha 2u$ -グロブリン腎症が発症したと考えられた。 $\alpha 2u$ -グロブリンは分子量 18700 のタンパク質であり、雄ラットの肝臓においてアンドロゲンの制御下で特異的に産生される（Hard *et al.*, 1993、Schenellmann, 2008）。 $\alpha 2u$ -グロブリンは多様な化学物質と結合体を形成して腎臓の糸球体を通過するが、近位尿細管から再吸収される。しかし、 $\alpha 2u$ -グロブリンと化学物質の結合体はリソソームでの分解が困難なため、近位尿細管に $\alpha 2u$ -グロブリンが集積し、 $\alpha 2u$ -グロブリン腎症となる（Hard *et al.*, 1993、Read, 1991）。この $\alpha 2u$ -グロブリン腎症を引き起こす物質として、*tert*-ブチルアルコールも報告されていることから（Mahler, 1997）、TBCB そのものにより $\alpha 2u$ -グロブリン腎症が引き起こされた可能性、又は代謝物として生成した *tert*-ブチルアルコールにより $\alpha 2u$ -グロブリン腎症が引き起こされた可能性が考えられた。また、皮髄境界部の細胞残渣を伴う尿細管拡張についても、細胞残渣に $\alpha 2u$ -グロブリンが認められたことから、 $\alpha 2u$ -グロブリン腎症と関連する変化と考えられた。以上のように、雄の腎臓で認められた一連の変化は $\alpha 2u$ -グロブリン腎症による変化と考えられたが、 $\alpha 2u$ -グロブリン腎症は雄ラット特異的な変化であるためヒトには外挿されない変化とされている。なお、雌の 500 mg/kg 群で腎重量の増加

が認められたが（表 3-14）、病理組織学的検査において異常が認められなかったため、毒性学的意義の乏しい変化と考えられた。

生殖発生毒性については、児動物の体重の低値が 500 mg/kg 群で認められた（表 3-18）。雌では中枢神経抑制作用のみ認められたため、中枢神経抑制作用と関連した変化と考えられた。児動物の体重は、哺育 0 日では対照群比で 87～89%であり、統計学的有意差を伴ったが、哺育 4 日では対照群比で 92～93%と対照群との差は縮小し、有意差も消失した。哺育 0 日の児動物の体重低値は、妊娠期間の母動物に自発運動低下や呼吸数減少が認められていることから、子宮や胎盤への血流量低下や、毒性発現による母動物へのストレスに起因したものである可能性が考えられた。また、哺育 4 日に対照群との差が縮小した理由としては、哺育期間の母動物には自発運動低下等の毒性症状が認められていないことから、母動物の状態が改善したためと考えられた。また、投与期間の延長に伴い正常値に回復する変化と推察された。

TBCB の NOAEL は、反復投与毒性については、自発運動低下、呼吸数減少、半眼等の一般状態の変化が雌雄の 500 mg/kg 群で認められたため 100 mg/kg/日、生殖発生毒性についても、500 mg/kg 群で児動物の体重の低値が認められたため 100 mg/kg/日と考えられた。

第四章 環境からのばく露による3物質のリスクについての検討

4.1 緒言

化学物質のリスクとは、化学物質がヒトや環境中生物に有害な影響を与える可能性のことである。また、リスク評価とは、化学物質の有害な影響の程度とその化学物質のばく露量を比較することである。ヒトに対する化学物質のリスク評価では、動物実験や疫学研究によりヒトが化学物質を生涯毎日摂取しても有害な影響が出ないと推定される量を求め、ヒトのその化学物質に対する推定ばく露量（推定ヒトばく露量）と比較することによりリスクの有無が判定される。この、「ヒトが化学物質を生涯毎日摂取しても有害な影響が出ないと推定される量」は、食品添加物や農薬などヒトが摂取することが想定される物質については一日許容摂取量（Acceptable daily intake: ADI）と呼ばれるが、工業化学物質など本来ヒトが摂取することが想定されていない物質については一日耐用摂取量（Tolerable daily intake: TDI）と呼ばれている。これらの化学物質をヒトに直接投与して試験することが出来ないため、ADI や TDI の設定には実験動物を用いた毒性試験結果が多くの場合適用される。しかし、実験動物を用いた毒性試験の結果には、種差、個体差、試験期間の不十分さなどの面で不確実性が存在するため、そのまま TDI とすることはできない。そのため、TDI は実験動物を用いた毒性試験で得られた NOAEL を種差、個体差、試験期間の不十分さなどに対して設定した不確実係数の積で除することにより算出される（1）。

$$\text{TDI (mg/kg/日)} = \text{NOAEL (mg/kg/日)} / \text{不確実係数積} \cdots (1)$$

一方、推定ヒトばく露量は、食事や飲料水中の化学物質の濃度の実測値や環境中の化学物質の濃度から予測された食事や飲料水中の濃度から、食事や飲料水による摂取量を推定し、その総量として算出される。環境中の化学物質の濃度は、河川や大気のモニタリングデータなどの実測値や、環境中への排出量および物理化学的性状データから数理モデルにより得られた予測値が使用される。排出量が不明な物質についても、その用途に応じた排出係数（例：化審法のスクリーニング用排出係数一覧表）を製造量に乗じることにより排出量が推定され、推定ヒトばく露量が算出されている。

リスク評価では、一般的に NOAEL およびばく露量から、ハザード比（HQ : Hazard Quotient）やばく露マージン（MOE : Margin of Exposure）を算出し、リスクの有無を判断する。HQ は推定ヒトばく露量を TDI で除することにより得られる値（2）であり、HQ が 1 を超えない場合は現時点でヒト健康に悪影響を及ぼす懸念はないとし、HQ が 1 以上の場合はヒト健康に悪影響を及ぼすことが懸念されると判断する。MOE は NOAEL を推定ヒトばく露量で除することにより得られる値であり、MOE が不確実係数より大きければ現時点でヒト健康に悪影響を及ぼす懸念はないとし、MOE が不確実係数より小さければヒト健康に悪影響を及ぼすことが懸念されると判断する。

$$HQ = \text{推定ヒトばく露量} / TDI \cdots (2)$$

$$MOE = NOAEL / \text{推定ヒトばく露量} \cdots (3)$$

本章では本研究で毒性評価を行った 3 物質について、不確実係数の設定および TDI の算出を行った。また、各物質のヒトばく露量を推定し HQ を算出することにより、リスクについて考察した。

4.2 不確実係数の設定

不確実係数は、種差はラットの場合 10、個体差は 10、試験期間は 1～10、NOAEL が得られず最小毒性量（LOAEL）を採用した場合 10、毒性の性質として 1～10 が設定されることが多い。本研究では、3 物質が環境中から飲料水や食品を通じてばく露するこ

表 4-1 不確実係数（厚生労働省, 2003）

不確実性に係る項目	不確実係数
種差	10
個体差	10
試験期間	最大 10
LOAEL 採用	最大 10
毒性の性質	最大 10

とを想定するため、厚生労働省の「水質基準の見直し等について」（2003）を参考に、表 4-1 のように不確実係数を設定した。

厚生労働省の「水質基準の見直し等について」では、試験期間の不確実係数は最大 10 としか記載がないが、四塩化炭素の水質基準（案）根拠資料（厚生労働省, 2003）における週 5 日、12 週間の経口投与試験結果、および 1,2-ジクロロエチレンの水質基準（案）根拠資料（厚生労働省, 2003）における 90 日間の飲水投与試験結果について、短期試験の結果として試験期間の不確実係数は 10 が設定されている。そのため、本研究の 42～56 日間投与も短期試験結果として取扱い、原則として試験期間の不確実係数として 10 を設定することが妥当と考えられた。また、毒性試験で NOAEL が求められない場合、LOAEL を TDI の算出に使用し、不確実係数として最大 10 を設定するが、本研究では 3 物質とも NOAEL を求めることができたため、3 物質とも 1 とした。毒性の性質に関する不確実係数については、次項で各物質の毒性試験結果を考察し、設定した。

4.3 毒性の性質に関する不確実係数

厚生労働省の「水質基準の見直し等について」では、毒性試験で認められた毒性が重篤な場合、最大 10 の不確実係数を設定するように定められている。通常、重篤な毒性とは発がん性、回復性が極めて悪い毒性、神経毒性、投与期間後に発現する遅発毒性を指すことが多い。そのため、本研究で実施した試験において認められた毒性が“重篤な毒性”に当てはまるかどうかについての評価を行い、毒性の性質についての不確実係数

の決定を行った。なお、本研究の併合試験では発がん性については評価できないが、3物質の発がん性について欧州化学品庁の登録物質データベースおよび独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）の化学物質総合情報提供システムで調査したところ、発がん性を示す信頼性のある毒性試験結果は得られなかった。

本研究で得られた NOAEL を表 4-2 に示す。得られた反復投与毒性および生殖発生毒性の NOAEL のうち低い方の根拠とした毒性について、“重篤な毒性”に当てはまるかどうかについて評価した。

4M2NA では反復投与毒性の NOAEL の根拠となる毒性として、貧血に関連した項目である網状赤血球数比率の高値並びに脾臓の髄外造血亢進およびヘモジデリン沈着が認められた。しかし、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン量に変化は認められていないため、貧血に関連した毒性としては非常に弱いものと考えられる。また、網状赤血球数比率の高値および脾臓の髄外造血亢進は回復群では消失したため、回復性を有

表 4-2 本研究で得られた NOAEL

物質名	NOAEL (mg/kg/日)	
	反復投与毒性	生殖発生毒性
4M2NA	75	450
BOTD	40	200
TBCB	100	100

する変化と考えられた。また、ヘモジデリン沈着は回復群でも対照群より高いグレードで認められたが、ヘモジデリン沈着自体が容易には消失しない変化のため、回復性を評価するには適切ではないと考えた。そのため、4M2NA で認められた毒性は“重篤な毒性”には当てはまららないと考え、毒性の性質についての不確実係数は1とした。

BOTD では、反復投与毒性の NOAEL の根拠となる毒性として、血液凝固時間の延長を示すプロトロンビン時間の延長が認められた。血液凝固時間の延長は、脳出血などの臓器内出血や外傷時の大量出血につながる可能性があるため、特にワルファリン等により抗凝固療法を行っている患者では注意が必要となる。しかし、BOTD によるプロトロンビン時間の延長は回復群では消失しており、回復性が認められている。そのため、BOTD で認められた毒性は“重篤な毒性”には当てはまららないと考え、毒性の性質についての不確実係数は1とした。

TBCB では、反復投与毒性の NOAEL の根拠となる毒性として、自発運動低下、呼吸数減少、半眼等の一般状態の変化、生殖発生毒性の根拠となる毒性として児動物の体重の低値が認められた。自発運動低下、呼吸数減少、半眼等の一般状態の変化は、投与30分後には消失する一過性の変化であり、投与期間の終盤から回復期間は認められなかったことから、回復性を有する変化と考えられた。児動物の体重の低値は、哺育0日と比較し哺育4日では対照群との差は縮小し、有意差も消失したことから、投与期間の延長に伴い回復する変化と推察された。そのため、TBCB で認められた毒性についても、“重

篤な毒性”には当てはまらないと考え、毒性の性質についての不確実係数は 1 とした。

また、TBCB で認められた毒性変化は、投与期間の延長に伴い回復する変化であるため、投与期間がさらに長期に渡る試験においても NOEL は同等と考えられる。そのため、TBCB については、試験期間の不確実性については 10 ではなく 1 を採用することとした。

以上の評価より、各物質についての不確実係数および不確実係数積は表 4-3 の通りとなった。

表 4-3 各物質の不確実係数および不確実係数積

不確実性に係る項目	不確実係数		
	4M2NA	BOTD	TBCB
種差	10	10	10
個体差	10	10	10
試験期間	10	10	1
LOAEL 採用	1	1	1
毒性の性質	1	1	1
不確実係数積	1000	1000	100

4.4 TDI の算出

4.1 で述べた様に、TDI は毒性試験で得られた NOAEL を不確実係数積で除することによって得られる。そこで、本研究で得られた 3 物質の NOAEL を 4.3 で得られた不確実係数積で除して TDI の算出を行った。結果を表 4-4 に示す。

4.5 ばく露量の推定およびリスクについての検討

4M2NA および TBCB の用途は主に中間体であるため、消費者製品経由のばく露はほとんどないと考えられる。また、BOTD は中間体のほか潤滑油として用いられているが、通常では消費者がばく露される用途ではないことから、BOTD についても消費者製品経由のばく露はほとんどないと考えられる。そのため、3 物質ともにヒトへのばく露経路は、主として環境経由による呼吸からの吸入ばく露と飲料水および食物からの経口ばく露が考えられた。

表 4-4 各物質の TDI

物質名	4M2NA	BOTD	TBCB
NOAEL (mg/kg/日)	75	40	100
不確実係数積	1000	1000	100
TDI (mg/kg/日)	0.075	0.040	1.00

通常、環境経由での推定ヒトばく露量は、環境モニタリングデータや数理モデルにより得られた環境中の化学物質の濃度から、大気、飲料水、食物からの摂取量を予測し、その総量として算出される。しかし、本研究で用いた 3 物質は入手可能なモニタリングデータがなく、化学物質の排出量も不明であり、物理化学的性状データについても不明なものが多い。そのため、まず上記とは異なる視点から本研究の 3 物質について大まかにヒトばく露量を推定することとした。

化学物質の環境中での大気、河川、土壌への分布は、その物質の物理化学的性状に左右される。そのため、構造が類似した物質は同様の物理化学的性状を有すると考えられ、環境中での大気、河川、土壌への分布も類似すると考えられる。また、環境中への排出量はその物質の用途に依存するため、同様の用途で用いられる物質は製造量に対する排出量の比率は同様であり、排出量は製造量に比例すると考えられる。そのため、本研究の 3 物質と類似した構造を有し、用途が同様であり、製造量が同等かそれ以上の物質では、ヒトばく露量は本研究の 3 物質と同等又はより多いと考えられる。そこで、過去にヒトばく露量が推定されている物質の中から、上記の 3 条件を満たす物質を選定した。さらに、その物質の推定ヒトばく露量を本研究の 3 物質のヒトばく露量の最大値と考え、本研究で得られた TDI と比較し、更なる詳細なリスク評価の必要性について検討を行った。

なお、物質の選定は、化学物質の初期リスク評価書（独立行政法人新エネルギー・産

業技術開発機構) が作成されている物質の中から行うこととした。化学物質の初期リスク評価書では、化学物質排出把握管理促進法の第一種指定化学物質のうち、製造量、環境への排出量および有害性情報を基に選定した物質について、実測値や数理モデルを用いて日本国民におけるばく露量が推定され、有害性評価によって得られた NOAEL と比較することによりリスク評価が行われている。

4.5.1 4M2NA のばく露量の推定およびリスクについての検討

4M2NA は 2012 年～2015 年度の製造・輸入量が 1～1,000 トン/年であり (NITE 化審法データベース)、主な用途は顔料の原料である。そのため、類似した用途で用いられるジニトロトルエンおよび *m*-フェニレンジアミン、4M2NA と同様にベンゼン骨格上に

表 4-5 選定物質 (4M2NA)

物質名	製造・輸入量 (t)	用途	推定ヒトばく露量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)
ジニトロトル エン	232,500 (1997 年～2001 年)	トルエンジアミン、火薬の中 間体、染料の合成原料	0.085
<i>m</i> -フェニレン ジアミン	976～1,136 (2000 年～2003 年)	染料の合成原料 (アゾ染料、 染毛剤、媒染剤)、顕色剤の 原料、ゴム添加剤の原料、耐 熱性ポリマーの原料、エポキ シ樹脂の硬化剤	2.0×10^{-3}
ニトロベンゼ ン	146,363～180,770 (1997 年～2001 年)	アニリン原料	0.039
アニリン	222,017～276,220 (1999 年～2003 年)	4,4'-メチレンジアニリンの 合成原料、染料、ゴム薬品、 医薬品、農薬等の合成原料	0.21

ニトロ基およびアミノ基を有するニトロベンゼンおよびアニリンを選定し、各物質の化学物質の初期リスク評価書（新エネルギー・産業技術総合開発機構）から推定ヒトばく露量を調査した（表 4-5）。

その結果、推定ヒトばく露量はアニリンの $0.21 \mu\text{g/kg/日}$ が最大であった。そのため、4M2NA の推定ヒトばく露量の最大値を $0.21 \mu\text{g/kg/日}$ と仮定した。4M2NA の推定ヒトばく露量を $0.21 \mu\text{g/kg/日}$ と仮定した場合、HQ は 2.8×10^{-3} となり 1 より小さい値となった。

アニリンは主な用途が 4M2NA と同様に中間体であるが、生成物の用途が 4M2NA と異なる。しかし、中間体は排出経路が工場からの排出に限られており、化審法のスクリーニング用排出係数一覧表では、排出係数は生成物の用途に関わらず同一の値となっている。そのため、4M2NA の製造・輸入量を最大値の 1,000 トンと仮定した場合、4M2NA の排出量はアニリンの 200 分の 1 以下と推定される。4M2NA とアニリンの物理化学的性状が完全に一致はしないため、環境への分布の違いが不確実性として残るが、 2.8×10^{-3} の HQ は充分小さい値と考えられ、実際はさらに環境中への排出量は少ないと考えられる。以上より、環境からのばく露により 4M2NA の毒性が発現するリスクは非常に小さいと推定され、更なる詳細なリスク評価は不要と考えられた。

4.5.2 BOTD のばく露量の推定およびリスクについての検討

BOTD は製造・輸入量が公開されておらず不明であったが、BOTD から製造されると考えられるアルキル(C6~14)ジフェニルエーテルスルホン酸塩(K, Na, Ca)の 2012 年

～2015 年度の製造・輸入量が 3,000～5,000 トン/年（NITE 化審法データベース）であったことから、最大で 5,000 トン程度と推察した。また、主な用途は潤滑油および家庭用洗剤に使用されるアルキルジフェニルエーテルスルホン酸塩の原料である。そのため、類似した用途で用いられる物質としてノニルフェノールを選定した。また、化学物質の初期リスク評価書が作成された物質の中にジフェニルエーテル骨格を有する物質がなかったため、類似構造を有する物質についてはベンゼン環が一原子を介して結合した骨格を有する 4,4'-メチレンジアニリン、ジフェニルアミンおよび 4,4'-イソプロピリデン

表 4-6 選定物質（BOTD）

物質名	製造・輸入量 (t)	用途	推定ヒトばく露量 ($\mu\text{g/kg/日}$)
ノニルフェノール	17,971～21,515 (1997 年～2001 年)	界面活性剤・酸化防止剤合成原料	0.024
4,4'-メチレンジアニリン	1,490～3,366 (1999 年～2003 年)	4,4'-メチレンビス(フェニルイソシアナート) (MDI) およびポリメリック MDI の合成原料、エポキシ樹脂およびポリウレタン樹脂の硬化剤	1.5×10^{-3}
ジフェニルアミン	2,692～6,068 (2000 年～2004 年)	有機ゴム薬品の老化防止剤である <i>N</i> -(1,3-ジメチルブチル)- <i>N'</i> -フェニル- <i>p</i> -フェニレンジアミンの合成原料	0.20
4,4'-イソプロピリデンジフェノール	394,300～535,500 (1997 年～2001 年)	ポリカーボネート樹脂およびエポキシ樹脂合成原料	0.40

ジフェノールを選定し、各物質の化学物質の初期リスク評価書（新エネルギー・産業技術総合開発機構）から推定ヒトばく露量を調査した（表 4-6）。

その結果、推定ヒトばく露量は 4,4'-イソプロピリデンジフェノールの $0.40 \mu\text{g/kg/日}$ が最大であった。そのため、BOTD の推定ヒトばく露量の最大値を $0.40 \mu\text{g/kg/日}$ と仮定した。また、BOTD の推定ヒトばく露量を $0.40 \mu\text{g/kg/日}$ と仮定した場合、HQ は 1×10^{-2} となり 1 より小さい値となった。BOTD は潤滑油としても使用されているが、潤滑油の排出係数は化審法のスクリーニング用排出係数一覧表では大気：0.0002 および水域：0.00002 であり、中間体の排出係数の大気：0.0001 および水域：0.0003 と比べ大気でも 2 倍程度しか変わらないことから、潤滑油として使用した場合でも中間体とほぼ同等の排出量と考えられる。そのため、選定物質に潤滑油として使用される物質が含まれていないことは問題ないと判断した。BOTD と 4,4'-イソプロピリデンジフェノールとの物理化学的性状が完全に一致はしないため、環境への分布の違いが不確実性として残るが、 1×10^{-2} の HQ は充分小さい値と考えられる。そのため、環境からのばく露により BOTD の毒性が発現するリスクは非常に小さいと推定され、更なる詳細なリスク評価は不要と考えられた。

4.5.3 TBCB のばく露量の推定およびリスクについての検討

TBCB は 2012 年～2015 年度の製造・輸入量が 1～1,000 トン/年であり（NITE 化審法データベース）、半導体製造における保護膜（レジスト）の原料および香料の原料とし

て使用されている。そのため、類似した用途で用いられる物質としてフェノール、類似した構造を有する物質として TBCB と同様にベンゼン環状にクロロ基を有するクロロベンゼンおよび *p*-ニトロクロロベンゼンを選定し、各物質の化学物質の初期リスク評価書（新エネルギー・産業技術総合開発機構）から推定ヒトばく露量を調査した（表 4-7）。

その結果、推定ヒトばく露量はフェノールの 2.2 µg/kg/日が最大であった。そのため、TBCB の推定ヒトばく露量の最大値を 2.2 µg/kg/日と仮定した。また、TBCB の推定ヒトばく露量を 2.2 µg/kg/日と仮定した場合、HQ は 2.2×10^{-2} となり 1 より小さい値となった。フェノールは主な用途が TBCB と同様に中間体であり、製品の一部は TBCB と同

表 4-7 選定物質（TBCB）

物質名	製造・輸入量 (t)	用途	推定ヒトばく露量 (µg/kg/日)
フェノール	834,821～918,687 (1997 年～2001 年)	ビスフェノール A 合成原料、 フェノール樹脂（レジスト） 合成原料等	2.2
クロロベンゼン	10,000～35,000 (1998 年～2002 年)	トリフェニルホスフィン (有機合成反応触媒)、フェ ニルシラン、チオフェノール (農・医薬中間体) 合成原料、 有機合成反応溶剤、農薬補助 剤、塗料・インキ、電子機器 洗浄溶剤	0.045
<i>p</i> -ニトロクロ ロベンゼン	17,465～22,598 (1997 年～2000 年)	アゾ染料、硫化染料、医薬品 等の原料である、 <i>p</i> -フェニレ ンジアミン等の原料	0.0096

様にレジストとして使用されている。そのため、TBCB の製造・輸入量を最大値の 1,000 トンと仮定した場合でも、TBCB の排出量はフェノールの 800 分の 1 以下と考えられる。よって、TBCB とフェノールとの物理化学的性状が完全に一致はしないため、環境への分布の違いが不確実性として残るが、 2.2×10^{-2} の HQ は充分小さい値と考えられ、実際はさらに環境中への排出量は少ないと考えられる。そのため、環境からのばく露により TBCB の毒性が発現するリスクは非常に小さいと推定され、更なる詳細なリスク評価は不要と考えられた。

4.6 まとめ

本研究で毒性評価を行った 3 物質について、毒性試験で得られた NOAEL から TDI を算出した。また、過去にヒトばく露量が推定されている物質の中から、本研究の 3 物質と類似した構造を有し、用途が同様であり、製造量が同等かそれ以上の物質を選定し、本研究の 3 物質のヒトばく露量の最大値を推定した。さらに TDI およびヒトばく露量の最大値から HQ を求め、リスクについて検討した。その結果、3 物質とも HQ が 1 より小さく、HQ が最大となった TBCB でも 2.2×10^{-2} であった。そのため、現状では 3 物質ともに環境からのばく露によるリスクは非常に小さく、更なる詳細なリスク評価は不要と考えられた。しかし、今後生産量が増加し、現在の 100 倍を超えた場合や、異なる用途で使用され排出量が増加することが想定される場合については、これらの 3 物質によるヒト健康影響が発現する可能性がある。その場合は、環境中の各物質の濃度測定、

又は工場からの排出量の調査および各物質の沸点、蒸気圧、水／オクタノール分配係数（logPow）等の物理化学的性状を明らかにし、信頼性のある推定ヒトばく露量の算出および詳細なリスク評価を行うことにより、リスクの有無について再度判断する必要があると考えられる。

総 括

これまでヒトの生活を豊かにするため、数多くの化学物質が開発され、使用されてきた。その一方で化学物質は、これまで食品への混入、飲料水の汚染、消費者製品の誤飲事故等により非意図的にヒトにばく露し、健康被害を引き起こしてきた。新規化学物質は、化審法により製造・輸入前に安全性試験を実施することが義務付けられているが、化審法制定以前から製造・輸入されていた既存化学物質は、事業者には安全性試験は義務づけられなかった。そのため、数多くの既存化学物質が安全性が不明なまま世界的に使用されている。本研究では、毒性情報の得られていない3種類の既存化学物質について、環境からの経口ばく露によるヒト健康へのリスクについて検討するため、まず、反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験（併合試験）により毒性評価を行い、無毒性量（NOAEL）を求めた。さらに、各物質のヒトばく露量を推定することにより、ヒト健康へのリスクについて検討した。

第一章では、4-methoxy-2-nitroaniline（4M2NA）について併合試験により毒性評価を行った。その結果、ヒトに外挿される変化として、雌の450 mg/kg 群で網状赤血球数比率の高値並びに脾臓の髄外造血亢進及びヘモジデリン沈着が認められ、軽度の貧血が生じたことが推察された。また、生殖発生毒性については、450 mg/kg 群でも異常が認められなかった。以上の結果から、NOAEL は反復投与毒性については75 mg/kg/日、生殖

発生毒性については、450 mg/kg/日と考えられた。

第二章では、benzene, 1,1'-oxybis-, tetrapropylene derivs. (BOTD) について評価した。

その結果、200 mg/kg 以上の群の雄および 40 mg/kg 以上の群の雌で肝臓の重量増加を伴う小葉中心性肝細胞肥大、1000 mg/kg 群の雌で γ -GTP の高値が認められた。小葉中心性肝細胞肥大は、単独では薬物代謝酵素の誘導による適応性変化と考えられるが、1000 mg/kg 群の雌では γ -GTP の高値が認められたため、この群の肝細胞肥大は、肝臓への毒性影響である可能性があると考えられた。また、200 mg/kg 以上の群の雄でプロトロンビン時間 (PT) の延長がみられ、血液凝固への影響が認められた。生殖発生毒性については、受胎率の低値が 1000 mg/kg 群で認められた。以上の結果から、NOAEL は反復投与毒性については 40 mg/kg/日、生殖発生毒性については 200 mg/kg/日と考えられた。

第三章では、1-tert-butoxy-4-chlorobenzene (TBCB) について併合試験により毒性評価を行った。その結果、500 mg/kg 群の雌雄で自発運動低下、呼吸数減少、半眼といった一般状態の変化が認められ、中枢神経抑制作用と推察された。また、生殖発生毒性については、哺育 0 日に児動物の体重の低値が 500 mg/kg 群で認められた。以上の結果から、NOAEL は、反復投与毒性、生殖発生毒性ともに 100 mg/kg/日と考えられた。

第四章では、第一章から第三章において得られた NOAEL について不確実係数を設定し、本研究の 3 物質について一日耐用摂取量 (TDI) の算出を試みた。また、過去にヒトばく露量が推定されている物質の中から、本研究の 3 物質と類似した構造を有し、用

途が同様であり、製造量が同等かそれ以上の物質を選定し、本研究の3物質のヒトばく露量の最大値を推定した。さらにTDIおよびヒトばく露量の最大値からハザード比(HQ)を求め、リスクについて検討した。その結果、3物質ともHQが1より小さく、HQが最大となったTBCBでも 2.2×10^{-2} であった。そのため、現状では3物質ともに環境からのばく露によるリスクは非常に小さいと考えられた。

以上のように、本研究により4M2NA、BOTD、TBCBの3種類の既存化学物質について反復投与毒性・生殖発生毒性併合試験(併合試験)によるNOAELが初めて示された。また、類似構造物質についての情報から現状ではこれら3物質とも、環境からの経口ばく露によりヒト健康に悪影響を及ぼす可能性は非常に小さいことが明らかとなった。しかし、本研究により安全性評価を行うことができた3物質以外にも、依然として毒性が不明なまま使用が続けられている既存化学物質が多く存在する。ヒトを含めた地球上の生物の多様性確保と持続的な生存のためには今後も継続して毒性の不明な既存化学物質の毒性を評価し、安全性を確認することが重要である。

謝 辞

本論文を作成するにあたり、細部にわたりご指導、ご鞭撻を賜りました九州大学大学院農学研究院生命機能科学部門食料化学工学講座食品衛生化学研究室教授 宮本敬久先生に深く感謝の意を表します。本論文を作成するにあたり、有益なご助言とご指導を賜りました同講座食品製造工学研究室教授 下田満哉先生、同講座栄養化学研究室教授 佐藤匡央先生、並びに同講座食品衛生化学研究室准教授 本城賢一先生に深く感謝の意を表します。本研究を遂行するにあたり、終始ご指導を賜りました一般財団法人化学物質評価研究機構化学物質安全センター技術顧問 長谷川隆一博士に深く感謝の意を表します。本研究の遂行にご協力いただいた一般財団法人化学物質評価研究機構日田事業所の諸氏に感謝致します。

参考文献

倉恒匡徳、2000 年、油症研究 30 年の歩み 第 1 章 油症ならびに油症研究の概要、

小栗一太、赤峰昭文、古江増隆（編）、九州大学出版会

大畑秀穂、1999 年、新染色法のすべて、医歯薬出版株式会社

厚生労働省、2003 年、水質基準の見直し等について、基 13 四塩化炭素 [online] Available

at: <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k13.pdf>

Accessed on 5 January 2018.

厚生労働省、2003 年、水質基準の見直し等について、基 16 シス-1,2-ジクロロエチレン

[online] Available at: <http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/k15.pdf>

Accessed on 5 January 2018.

児玉博和、太田秀夫、1977 年、PCB の母子移行に関する研究(1)、日本衛生学雑誌、32

巻 4 号、567-573

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.1 ノニルフェノール、[online] Available at: [http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_](http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/242riskdoc.pdf)

[search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/242riskdoc.pdf](http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/242riskdoc.pdf) Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No. 4 4,4'-イソプロピリデンジフェノール、[online] Available at: <http://www.nite.go.jp/>

chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/029riskdoc.pdf

Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.6 ニトロベンゼン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/240riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.32 フェノール、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/266riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.51 ジニトロトルエン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/157riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.57 p-ニトロクロロベンゼン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/237riskdoc.pdf

Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2005 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.82 クロロベンゼン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/093riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2007 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.42 4,4'-メチレンジアニリン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/340riskdoc.pdf

Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2007 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.63 アニリン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/015riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2008 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.54 m-フェニレンジアミン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/264riskdoc.pdf

Accessed on 5 January 2018.

新エネルギー・産業技術総合開発機構、2008 年、化学物質の初期リスク評価書 Ver.1.0

No.124 ジフェニルアミン、[online] Available at: http://www.nite.go.jp/chem/chrip/chrip_search/dt/pdf/CI_02_001/risk/pdf_hyoukasyo/159riskdoc.pdf Accessed on 5 January 2018.

日本トキシコロジー学会編、2003 年、トキシコロジー用語辞典、株式会社じほう

日本毒性病理学会編、2017 年、新毒性病理組織学、西村書店

日本病理学会編、1981 年、病理技術マニュアル 3 病理組織標本作製技術 下巻 染色法、

医歯薬出版株式会社

山田俊之、2013 年、異常値の出るメカニズム第 6 版 第 3 章血液検査、河合忠、屋形稔、

伊藤喜久、山田俊幸（編）、医学書院、p73-134

Bartlett, M.S., 1937. Properties of sufficiency and statistical tests, *Proc. R. Soc. Ser. A* 160, 268–282.

Capen, C.C., 2001. Chapter 21 Toxic Responses of the Endocrine System. *In*: Klaassen C.D. ed.

Casarett & Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons 6th edition. New York:

McGraw Hill Medical, 711–759.

Dunnett, C.W., 1964. New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, 482–491.

ECHA, Anisole, Supporting Acute Toxicity: oral 001, [online] Available at:

<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14423/7/3/2>

Accessed on 2 September 2017.

ECHA, 2-Nitro-p-anisidine, Exp Key Acute Toxicity: oral 001, [online] Available at:

<https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/13251/7/3/2>

Accessed on 12 September 2017.

ECHA, 2004a. 2-methylpropan-2-ol, Exp Key Developmental toxicity/ teratogenicity: 002,

[online] Available at: [https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-](https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14112/7/9/3/?documentUUID=4ffe8e0b-d2a0-4fbd-a9a5-21a2c2bb3cdd)

[dossier/14112/7/9/3/?documentUUID=4ffe8e0b-d2a0-4fbd-a9a5-21a2c2bb3cdd](https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14112/7/9/3/?documentUUID=4ffe8e0b-d2a0-4fbd-a9a5-21a2c2bb3cdd)

Accessed on 2 October 2017.

ECHA, 2004b. Phenol, dodecyl, branched, Exp Key Repeated dose toxicity: oral.001, [online]

Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14705/7/6/2>

Accessed on 3 August 2017.

ECHA, 2012a. Phenol, dodecyl, branched, Exp Key Repeated dose toxicity: oral.002, [online]

Available at: [https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14705/7/6/2/?](https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14705/7/6/2/?documentUUID=a86857dc-4520-44ba-a3c6-205bc76dc1b4)

documentUUID=a86857dc-4520-44ba-a3c6-205bc76dc1b4. Accessed on 3 August 2017.

ECHA, 2012b. Phenol, dodecyl, branched, Exp Key Toxicity to reproduction.001, [online]

Available at: <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14705/7/9/2>.

Accessed on 3 August 2017.

European Chemicals Bureau, 2002. European Union Risk Assessment Report, o-anisidine (CAS

No 90-04-0) Final Report p.40. [online] Available at: [https://echa.europa.eu/documents/](https://echa.europa.eu/documents/10162/c556ccd6-05be-41ab-a896-058ca6b8fae3)

10162/c556ccd6-05be-41ab-a896-058ca6b8fae3 Accessed on 25 September 2017.

Fisher, R. A., 1922. On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of

P, *J R Stat Soc*, 85, 87–94.

Goldstein, R.S., Chism, J.P., Sherrill, J.M., Hamm, T.E. Jr., 1984. Influence of dietary pectin on

intestinal microfloral metabolism and toxicity of nitrobenzene. *Toxicol Appl Pharmacol*, 75, 547–553.

- Hamamura, M., Hirose, A., Kamata, E., Katoku, K., Kuwasaki, K., Oshikata, T., Nakahara, Y., Ema, M., Hasegawa, R., 2006. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific α 2u-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation, *J Toxicol Sci*, 31, 35–47.
- Hara, K., Akiyama, Y., Tajima, T., 1994. Sex differences in the anticoagulant effects of warfarin. *Jpn J Pharmacol*, 66, 387–392.
- Hard, G.C., Rodgers, I.S., Baetcke, K.P., Richards, W.L., McGaughy, R.E., Valcovic, L.R., 1993. Hazard evaluation of chemicals that cause accumulation of alpha 2u-globulin, hyaline droplet nephropathy, and tubule neoplasia in the kidneys of male rats. *Environ Health Perspect*, 99, 313–349.
- Harrison, J.H. Jr, and Jollow, D.J., 1986. Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia. *J Pharmacol Exp Ther*. 238(3), 1045–1054.
- Hess, R.A., Moore, B.J., 1993. Histological Methods for the Evaluation of the Testis *In: Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin, R.E., and Heindel, J.J., (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp 52–85.
- Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues, 2006. 2.7 Guidance on the interpretation of hepatocellular hypertrophy. *In: Report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues*. Rome, 13–17

- Kano, H., Yamazaki, K., Matsumoto, M., Yamamoto, S., Matsushima, T., 2005. Two-year study of carcinogenicity and chronic toxicity of *p*-nitroanisole in rats and mice. *J Toxicol Sci*, 30, S158, P-75. Proceedings of the 32nd Annual Meeting.
- Khan, M.F., Kaphalia, B.S., Boor, P.J., Ansari, G.A., 1993. Subchronic toxicity of aniline hydrochloride in rats. *Arch Environ Contam Toxicol*, 24, 368–374.
- Klaassen, C.D., Hood, A.M., 2001. Effects of Microsomal Enzyme Inducers on Thyroid Follicular Cell Proliferation and Thyroid Hormone Metabolism. *Toxicologic Pathol*, 29(1), 34–40.
- Kruskal, W.H., Wallis, W.A., 1952. Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Amer Statist Assoc*, 47, 583–621.
- Latendresse, J.R., Warbritton, A.R., Jonassen, H., Creasy, D.M., 2002. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- Lee, S.S., Pineau, T., Drago, J., Lee, E.J., Owens, J.W., Kroetz, D.L., Fernandez-Salguero, P.M., Westphal, H., Gonzalez, F.J., 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 15, 3012–3022.
- MacNicoll, A.D., Dean, R.H., 1992. Warfarin inhibition of hepatic vitamin K epoxide reductase activity in warfarin-susceptible and -resistant house mice (*Mus domesticus*). *Pesticide*

Biochem Phys, 44, 68–73.

Mahler, J., 1997. NTP technical report on toxicity studies of t-butyl alcohol (CAS No. 75-65-0).

Administered by inhalation to F344/N rats and B6C3F1 mice. *Toxic Rep Ser*, 53, 1–56.

Matsuura, M., Satoh, S., Takano, K., Harauchi, T., Yoshizaki, T., Kobayashi, F., Matsubara, T.,

Uchida, K., 1988. Vitamin K-reversible hypoprothrombinemia in rats. I. Sex differences in the development of hypoprothrombinemia and the effects of beta-lactam antibiotics. *Jpn J Pharmacol*, 46, 303–310.

Matsuura, M., Satoh, S., Kobayashi, F., Uchida, K., Matsubara, T., 1989. Vitamin K-reversible hypoprothrombinemia in rats: comparison of hypoprothrombinemic changes in various strains of rats caused by vitamin K deficiency and antibiotic treatment. *J Toxicol Sci*, 14, 165–180.

MHLW, 1994a. Combined repeat dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 3-methoxybenzenamine by oral administration to rats. *In: Toxicity Testing Reports of Environmental Chemicals*, Vol. 1. Japan: Chemicals Investigation Promoting Council, 263–276.

MHLW, 1994b. Twenty-eight-day repeat dose toxicity test of 3-nitrobenzenamine in F344 rats. *In: Toxicity Testing Reports of Environmental Chemicals*, Japan: Chemicals Investigation Promoting Council, 147–155.

MHLW, 1997. Twenty-eight-day repeat dose oral toxicity test of 4-nitro-*o*-anisidine in rats. *In*: Toxicity Testing Reports of Environmental Chemicals, Vol. 5, Japan: Chemicals Investigation Promoting Council, 223–236.

MHLW, 2000. Twenty-eight-day repeat dose toxicity study of 4-chlorophenol in rats sponsored by Ministry of Health, Labour and Welfare [Online] Available at http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/pdf/PDF106-48-9b.pdf. (Japanese), http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/home/file/file106-48-9.html. (English summary) Accessed on 2 October 2017.

Mitsumori, K., Kodama, Y., Uchida, O., Takada, K., Saito, M., Naito, K., Tanaka, S., Kurokawa, Y., Usami, M., Kawashima, K., Yasuhara, K., Toyoda, K., Onodera, H., Furukawa, F., Takahashi, M., Hayashi, Y., 1994. Confirmation study, using nitrobenzene, of the Combined Repeat Dose and Reproductive/Developmental Toxicity Test protocol proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). *J Toxicol Sci*, 19, 141–149.

Nair, R.S., Auletta, C.S., Schroeder, R.E., Johannsen, F.R., 1990. Chronic toxicity, oncogenic potential, and reproductive toxicity of *p*-nitroaniline in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 15, 607–621.

National Cancer Institute, 1978. Bioassay of *p*-anisidine hydrochloride for possible

carcinogenicity. National Cancer Institute Carcinogenesis Technical Report Series, No.116.

National Toxicology Program, 1993. Toxicology and carcinogenesis studies of *o*-nitroanisole (CAS No. 91-23-6) in F344 rats and B6C3F1 mice (feed studies), Research Triangle Park, NC, (NTP TR 416; NIH Publication No. 93-3147).

Organisation for Economic Co-operation and Development, 1996. OECD Guideline For Testing of Chemicals. Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test, No. 422.

Read, N.G., 1991. The role of lysosomes in hyaline droplet nephropathy induced by a variety of pharmacological agents in the male rat. *Histochem J*, 23, 436–443.

Reddy, B.G., Pohl L.R., Krishna G., 1976. The requirement of the gut flora in nitrobenzene-induced methemoglobinemia in rats. *Biochem Pharmacol*, 25, 1119–1122.

Reyers, I., de Gaetano, G., Donati, M.B., 1986. Prolongation by warfarin of "template" bleeding time in rats: a vitamin K-dependent effect. *Proc Soc Exp Biol Med*, 181(2), 275–276.

Richardson, T.A., Klaassen, C.D., 2010. Role of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 2B2 in metabolism of triiodothyronine: Effect of microsomal enzyme inducers in Sprague Dawley and UGT2B2-deficient Fischer 344 rats. *Toxicol Sci*, 116(2), 413–421.

Schnellmann, R.G., 2008. Toxic Responses of the Kidney. *In*: Curtis D, Klaassen ed. Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons 7th edition. New York: McGraw-Hill,

583–608.

Shimo, T., Onodera, H., Matsushima, Y., Todate, A., Mitsumori, K., Maekawa, A., Takahashi, M.,

1994. A 28-day repeated dose toxicity study of nitrobenzene in F344 rats. *Bull Natl Inst Health Sci*, 112, 71–81.

Shin, D.J., Osborne, T.F., 2003. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are

connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J Biol Chem*, 278, 34114–34118.

Sisti, R., 2001. 2-Nitroaniline. Combined repeated toxicity and screening for reproduction and

development (OECD 422): RTC Study Report No. 8365/T/222/2001. *In: OECD SIDS Initial Assessment Report for 2-Nitroaniline*. [online]

Available at: <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/nitroaniline.pdf> Accessed on 11 September 2017.

Takahashi, M., Ishida, S., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Hirose, A., 2014. Repeated dose and

reproductive/developmental toxicity of perfluoroundecanoic acid in rats. *J Toxicol Sci.*, 39(1), 97–108.

Tie, J.K., Stafford, D.W., 2008. Structure and function of vitamin K epoxide reductase. *Vitam*

Horm, 78, 103–130.

Tsubokura, Y., Aso, S., Koga, T., Kikuchi, J., Kobayashi, T., Hoshuyama, S., Oshima, Y., Miyata,

- K., Kusune, Y., Muroi, T., Yoshida, T., Hasegawa, R., Ajimi, S., Furukawa, K., 2015. Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 4-methoxy-2-nitroaniline in rats. *Drug Chem Toxicol*, 38(4), 361–374.
- Tsubokura, Y., Hasegawa, R., Aso, S., Kobayashi, T., Koga, T., Hoshuyama, S., Oshima, Y., Miyata, K., Kusune, Y., Muroi, T., Hashizume, N., Inoue, Y., Ajimi, S., Furukawa, K., 2017. Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of 1-*tert*-butoxy-4-chlorobenzene in rats. *Drug Chem Toxicol*, 40(3), 344–358.
- Uchida, K., Shike, T., Kakushi, H., Takase, H., Nomura, Y., Harauchi, T., Yoshizaki, T., 1985. Effect of sex hormones on hypoprothrombinemia induced by N-methyltetrazolethiol in rats. *Thromb Res*, 39(6), 741–750.
- Winn, M.J., Park, B.K., 1987. The effects of 17 beta-oestradiol or testosterone on the response to S-warfarin in castrated male rats. *J Pharm Pharmacol*, 39, 958–960.