

Table 68

Two generation reproductive toxicity study of BBP by oral administration in rats  
Morphological observations of F<sub>2</sub> pups culled on postnatal day 4

Compound	Butyl benzyl phthalate			
	0 <sup>a</sup>	20	100	500
Number of pups examined	77	75	85	62
<u>External abnormalities</u>				
Number of pups	0	0	0	0
<u>Visceral abnormalities</u>				
Number of pups	0	0	0	0
<u>Visceral variations</u>				
Number of pups	1	0	0	0
<u>Types and number</u>				
Dilatation of renal pelvis	1	0	0	0

a: vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

Table 69

Two generation reproductive toxicity study of BBP by oral administration in rats  
Morphological observations of F<sub>2</sub> weanlings

Compound	Butyl benzyl phthalate		
	0 <sup>a</sup>	20	500
Dose (mg/kg)			
Number of weanlings examined	128	119	130
<u>External abnormalities</u>			
Number of weanlings	0	0	1
<u>Types and number</u>			
Anury	0	0	1
<u>Visceral abnormalities</u>			
Number of pups	1	0	1
<u>Types and number</u>			
Small testis	1	0	1
<u>Visceral variations</u>			
Number of pups	3	1	0
<u>Types and number</u>			
Red spot thymus	0	0	0
Dilatation of renal pelvis	3	1	0

a: vehicle control, corn oil (2 mL/kg)

平成10年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「メトキシクロルのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験」

## 【目次】

	頁
要 約 . . . . .	1
緒 言 . . . . .	4
方 法 . . . . .	6
1. 被験物質 . . . . .	6
2. 使用動物 . . . . .	6
3. 飼料 . . . . .	7
4. 飲料水 . . . . .	7
5. 投与検体の調製 . . . . .	7
6. 投与方法 . . . . .	7
7. 試験操作・検査・測定 . . . . .	8
8. データの解析法 . . . . .	11
結 果 . . . . .	12
1. 一般状態 . . . . .	12
2. 体重 . . . . .	12
3. 性周期 . . . . .	12
4. 血中ホルモン濃度 . . . . .	12
5. 血液学的検査 . . . . .	12
6. 血液生化学的検査 . . . . .	13
7. 病理学的検査 . . . . .	13
8. 精子検査 . . . . .	16
考 察 . . . . .	18
文 献 . . . . .	21

Table 1~11

Photo. 1~4

## 【要約】

OECD内分泌攪乱物質検査及び評価ワーキンググループ（EDTA）の検討を踏まえて実施される国際共同バリデーションプロジェクトの一環として、メトキシクロルの28日間反復経口投与毒性試験を、「EMSG Proposal for Testing of Adequacy of an enhanced OECD 407 Protocol」（1998年10月15日）に従って、雌雄のSprague-Dawley系[Crj:CD(SD)IGS,SPF]ラットを用いて実施した。投与量は、雌雄とも0（溶媒対照群、コーン油）、25、100 および 400 mg/kg とし、1群10例で雄については28回投与の翌日に剖検した。雌については、投与期間の末期に性周期を観察し、28回以上投与の後、発情休止期に剖検した。結果は以下の様に要約される。

1. 雌雄とも死亡は認められなかった。一般状態においては、雌雄とも400 mg/kg 投与群で脱毛が、雄ではさらに消瘦や排便量の減少がみられた。
2. 体重は雌雄とも100 mg/kg 以上の投与群で、有意に抑制された。
3. 100 mg/kg 以上の投与群では、腔垢像の変化として角化細胞、有核細胞に白血球が混在する、異常な像が認められた。また、400 mg/kg 投与群の性周期では連続発情している動物が3例認められた。
4. 血中プロラクチン濃度は雌雄とも100 mg/kg 以上の投与群で、血中FSH濃度は雄の100 mg/kg 以上の投与群、雌の400 mg/kg 投与群でそれぞれ増加した。一方、雄の血中テストステロン濃度は、100 mg/kg 以上の投与群で低下した。
5. 雄の400 mg/kg 投与群ならびに雌の100 mg/kg 以上の投与群で貧血傾向が認められた。
6. 血中総コレステロール値の低下が投与全群の雌雄で、トリグリセライド濃度の増加が100 mg/kg 以上の投与群の雌で、 $\gamma$ -GTP活性の増加が400 mg/kg 投与群の雌雄で、それぞれ認められた。  
一方、無機リン濃度には400 mg/kg 投与群の雌で有意な低下が認められたが、雄には変化が認められず、カルシウム濃度にも変化はなかった。
7. 剖検の結果、100 mg/kg 以上の投与群で、精巣、精巣上体、精嚢ならびに前立腺が用量依存的に小型化し、卵巣では400 mg/kg 投与群の少数例で小型化が認められた。

腎臓では 400 mg/kg 投与群の雄の 1 例でモザイク様を呈した淡色域がみられ、雌の 1 例では腫大かつ軟化し皮質に淡色域がみられた。副腎では 400 mg/kg 投与群の雌 1 例に淡色化が認められた。

8. 器官重量測定の結果 100 mg/kg 以上の投与群で、精巣、精巣上体、精嚢と前立腺を合わせた副生殖腺重量、ならびに凝固腺を含む精嚢重量および前立腺腹葉の重量はいずれも低下した。一方、雌では卵巣重量が 100 mg/kg 以上の投与群で有意に低下した。

下垂体重量には、雄の 100 mg/kg 以上の投与群ならびに雌の 25 mg/kg 以上の投与群で低下が認められた。

副腎重量には雄の 400 mg/kg 投与群で有意な増加が認められたが、雌では認められなかった。相対重量には雄の 100 mg/kg 以上の投与群、雌の 100 mg/kg 投与群で有意な増加が認められた。

肝臓重量には雄の 100 mg/kg 以上の投与群で有意な低下が認められたが、雌では 400 mg/kg 投与群で有意に増加しており、体重あたりの重量を求めると、雄では 400 mg/kg 投与群で、雌では 100 mg/kg 以上の投与群でそれぞれ有意な増加が確認された。

腎臓重量は雄の 100 mg/kg 以上の投与群で低下が認められたが、相対重量は雌雄とも 400 mg/kg 投与群で増加した。

9. 病理組織学検査の結果、精巣では 25 mg/kg 以上の投与群で精細管の萎縮、多核巨細胞が認められ、100 mg/kg 以上の投与群ではさらに、精細管に壊死や変性に陥った精母細胞、主としてステージVIIおよびVIIIにある精細管における精子細胞および精子形成の減少、精子細胞の変性、ライディヒ細胞の萎縮が観察された。精細管の萎縮の程度が他の例と比較して重度な例ではステップ9以降の精子細胞が減少し、精細管内に精子はほとんどみられず生殖上皮層には空胞が認められた。さらに、精巣に萎縮がみられた例の一部では精巣上体管腔内の精子数の減少や細胞残屑がみられた。前立腺、凝固腺および精嚢では 100 mg/kg 以上の投与群で、腺腔内の分泌液の減少を伴った上皮細胞の萎縮が認められた。

雌では 100 mg/kg 以上の投与群の卵巣で閉鎖卵胞の増加、黄体数の減少、子宮腔上皮細胞の肥大、膣における上皮の角化あるいは粘液細胞化を伴う上皮層の肥厚が認められ、400 mg/kg 投与群ではさらに、変性した卵子の鉍質沈着、通常発情期に認められる様な子宮腔上皮細胞および子宮腺上皮細胞における細胞残屑を含む空胞の増加、腔上皮細胞の分裂像の減少、子宮内膜および筋層の好酸球浸潤の減少がみられた。

乳腺は雄においては 100 mg/kg 以上の投与群で萎縮が認められたが、雌には変化が認められなかった。

副腎では雌雄とも 100 mg/kg 以上の投与群で皮質細胞の肥大が認められた。

腎臓では雌雄の 400 mg/kg 投与群の皮質に好塩基性尿細管および近位尿細管の空胞

変性、遠位尿細管、髓質や乳頭部の集合管の拡張、管腔内への細胞残屑や好中球が認められたほか、好中球の浸潤が乳頭部の管腔外にも波及している例が認められた。雌の1例では皮質の近位尿細管にも拡張がみられた。

肝臓では雄の 400 mg/kg 投与群、雌の 100 mg/kg 以上の投与群で小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

10. 精子検査の結果、100 mg/kg 以上の投与群では精巣上体中の精子数の用量依存的な減少が認められ、400 mg/kg 投与群においては、運動精子率の平均値が低下し、形態に異常のみられた精子の発現率が増加した。
11. 強化 TG407 プロトコールに従った今回の試験においては、既に報告されているメトキシクロルの影響をほぼ再現することが可能であった。本試験において低用量から認められた変化は、血中総コレステロール値の低下、雌の下垂体重量の低下ならびに精巣の病理組織学的変化（精細管の萎縮、多核巨細胞）であった。

## 【緒言】

1998年10月15日、OECDの「Endocrine Disrupter Testing and Assessment」に関するワーキンググループ (EDTA) より、「OECD 化学物質試験法ガイドライン [407]げっ歯類を用いた28日間反復経口投与毒性試験 強化案 (強化TG407)」が提示された。

本試験は、この改正案において新たに追加された内分泌攪乱作用に関する検査法の第1段階バリデーション試験として行うもので、「内分泌攪乱物質の健康影響に関する調査研究費 (平成10年度予算)」に拠り実施した。

本試験の被験物質である1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-methoxyphenyl)ethane(メトキシクロル)は、2つの六員環を持つ有機塩素系農薬の一種で1893年に初めて合成され<sup>1)</sup>、効果スペクトルの広さと残効性の長さに比較して<sup>2)</sup>、環境中からの消失が速いことから<sup>3)</sup>、DDTに代わる安全な農薬として、1950年代から黒バエやカの殺虫薬や殺虫薬、果実や野菜用農薬、園芸用薬物として使用されている<sup>4)</sup>。ヒトにおいては、メトキシクロルを含んだ塵芥を吸入した農夫が再生不良性貧血を起し死亡したとする報告も見られるが<sup>5)</sup>、毒性が完全に立証された報告は認められず、ウシに殺虫剤として使用されたメトキシクロルが、経皮吸収され牛乳中へ排出されるものの、ヒトへの悪影響は予測されないとするアセスメントの報告もある<sup>6)</sup>。WHOにより1965年に設定されたヒトでの1日許容摂取量は0.1 mg/kg以下である<sup>7)</sup>。

一方近年、人工的に合成された化学物質によるエストロゲン類似作用あるいは内分泌攪乱作用が話題となるにもなって<sup>8-10)</sup>、DDTならびにその構造類似物質としてのメトキシクロルに注目が集まっている。メトキシクロルのエストロゲン様作用については*in vitro*手法ならびに<sup>11,12)</sup>、種々の動物を用いて検討され<sup>12-21)</sup>、現在では陽性物質として試験法の評価に用いられることも多い<sup>22-26)</sup>。メトキシクロルのエストロゲン様作用は原体では弱く<sup>6,12,27,28)</sup>、エストロゲンの受容体への結合阻害は10%程度であること<sup>29)</sup>、アンドロゲン結合蛋白への5 $\alpha$ ジヒドロテストステロンの結合は、最高40%程度阻害されることが明らかになっている<sup>30)</sup>。*In vitro*での検討の結果、肝ミクロソームとNADPHの存在下でメトキシクロルを処理すると、ラット子宮のエストロゲン受容体への結合が増強されること<sup>6,12,27,30)</sup>、マウスならびに昆虫のいずれにおいても、メトキシクロルが*o*-demethyl化されモノあるいはビスフェノール体になること<sup>12,31)</sup>、メトキシクロルのモノあるいはビスフェノール体は、*in vitro*の検討でエストロゲン受容体へ結合することが証明されており<sup>16,19,32)</sup>、この代謝にはチトクロームP-450 2C19や1A2が関与していることも判明している<sup>33)</sup>。また、メトキシクロルのビスフェノール体である2,2-bis(*p*-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethaneは*in vivo*の検討でもエストロゲン様作用を有することが証明されている<sup>12)</sup>。近年、このビスフェノール体は $\alpha$ エストロゲン受容体へのアゴニスト作用が原体の約100倍も強いこと、ならびに $\beta$ エストロゲン受容体に対する作用は弱いことが明らかになっており<sup>34)</sup>、アンドロゲン受容体に対する作用は弱いとする報告も認められる<sup>35)</sup>。



メトキシクロルはアメリカ等で現在も使用されていることに加えて、生物濃縮が証明されており、食物連鎖の一つの頂点である魚類における濃度は水中濃度の 1500 倍であったとする報告が認められる<sup>30)</sup>。また、環境水中での半減期は 46 日と報告されており、米国では湖や川、土壌、種々の食品中から検出されている<sup>1,22)</sup>。一方、生体からの排泄は比較的早く、マウスにおいて、DDT では投与後 24 時間で排泄された量は僅かに 1.02%であったのに対し、メトキシクロルはその 98.3%が排泄されたとする報告があり<sup>30)</sup>、また、ラットにメトキシクロル 25 mg/kg を混餌で投与した場合、18 週間後には体脂肪中に薬物が認められなかったとする報告がある<sup>36)</sup>。ただし、ラットに 2 年間に亘りメトキシクロル 25、200 および 1600 mg/kg を混餌投与した場合には、脂肪組織とならんで腎臓、肝臓ならびに脳中に残留していたとする報告がある<sup>37)</sup>。

Field らによれば、環境中に認められる多くの化学物質の内分泌攪乱作用は比較的弱いものであるが<sup>38)</sup>、複数の化学物質の協同作用について検討すると著しい相乗効果が認められたとする報告もあり<sup>39)</sup>、複数の化学物質による内分泌攪乱作用の検討は今後の課題として残されていると考えられる。

メトキシクロルは明瞭な抗エストロゲン作用を有し、前述の通り、陽性物質として試験法の評価に用いられることも多いことから<sup>21-26)</sup>、今回のバリデーション試験における被験物質として選択されている。

## 【方法】

### 1. 被験物質

(名称) メトキシクロル

(化学名) Ethan, 1,1,1-trichloro-2,2-bis(*p*-methoxyphenyl)-,

(CAS No.) 72-43-5

(英名) methoxychlor

(ロット番号) 87H1099

(純度) 95%

(物理化学的性質) 性状：黄色結晶

(分子量) 345.66

(分子式) C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>

(保管条件) 遮光、室温

### 2. 使用動物

(種、系統、品質) ラット、Sprague-Dawley (SD) 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF]

(動物の選定理由) 1) 毒性試験で一般的に用いられる動物種である。

2) 毒性試験に関する背景データがある系統である。

(生産所) 日本チャールス・リバー筑波飼育センター

(購入動物数) 雄、45匹；雌、45匹

(入荷時週齢) 雄、6週齢；雌、6週齢

(入荷時体重範囲) 雄、181.4～202.6g；雌、150.7～168.6g

(検疫並びに馴化期間) 入荷後約1週間検疫と馴化を兼ねて飼育し、その間、外観および一般状態を観察して異常の認められなかった動物を使用した。

(投与開始時週齢) 雄、7週齢；雌、7週齢

(投与開始時体重範囲) 雄、238.1～259.0g；雌、176.5～199.6g

(群数) 雄、4群；雌、4群

(群分け法) 検疫終了時の測定体重をもとに体重別層化無作為抽出法により群分けした。

(動物数) 各群、雄10匹；雌10匹

(標識方法-動物) 耳パンチにより一連の個体番号を標識した。

(標識方法-飼育ケージ) 群ごとに色彩の異なったラベルを用い、試験計画番号、性別、群(投与量)、動物番号等を記入し、飼育ケージに掛けた。

(基準温湿度) 温度、23.0～24.5℃；湿度、45～68%

(換気回数) 約15回/時

(明暗サイクル) 12時間(7:00～19:00)点灯、12時間(19:00～7:00)消灯

(ケージ) 金属製金網床ケージ(220w×270d×190h)

(飼育密度) 1匹/ケージ

### 3. 飼料

(種類) CRF1 固型

(販売業者) 日本チャールス・リバー

(給餌方法) 自由摂取

(混入物) 使用ロットの混入物の化学分析については東京顕微鏡院で、微生物学的検査および組成分析については日本チャールス・リバーで行った結果、試験に支障をきたす可能性が考えられる混入物は認められなかった。

### 4. 飲料水

(種類) 水道水(秦野市水道局給水)

(給水方法) 給水瓶により自由摂取

(混入物) 秦野研究所において定期的(4回/年)に実施する実験動物用飲料水の水質試験成績を、水道法に基づく水質基準に従って確認した結果、試験に支障をきたす可能性が考えられる混入物は認められなかった。

### 5. 投与検体の調製

(調製法) 被験物質を秤量し、コーン油で溶解させた。

(保管条件) 遮光、室温

(安定性、含量測定) 投与開始に先立ち、コーン油溶液中の1週間の安定性を確認した。また、初回調製検体の被験物質含量を測定した結果、各濃度の検体中のメトキシクロルの平均含量は、調製指示値の92.7, 96.6 および97.6%であり、試料の各測定値のばらつきもそれぞれの平均値の97.4~102%であった。

### 6. 投与方法

(投与経路および方法) 胃管による強制経口投与

(投与経路選択理由) OECDガイドラインに準じた。正確な量を投与するため、強制経口投与とした。

(投与用量、群構成、動物番号)

群	投与物質	投与用量 (mg/kg)	投与液量 (mL/kg)	濃度 (w/v %)	動物番号	
					雄	雌
溶媒対照群	コーン油	0	5	0	1~10	41~50
低用量群	メトキシクロル	25	5	0.5	11~20	51~60
中用量群	メトキシクロル	100	5	2.0	21~30	61~70
高用量群	メトキシクロル	400	5	8.0	31~40	71~80

(投与液量) 雌雄とも最近時の体重をもとに個体別に算出した。

(投与用量設定理由) 情報検索の結果、メトキシクロル 2000 mg/kg を、雄ラットに 33 日間反復経口投与した場合、生殖器ならびに副生殖器に対する影響が認められている<sup>40)</sup>。また、投与経路は明らかではないが、100 mg/kg を 70 日間投与した場合、精子形成に影響がみられるとする報告がある<sup>41)</sup>。雌においては交配前 42 日から分娩後 21 日まで反復経口投与した母動物で、125 mg/kg の投与により受胎率が低下し、50 mg/kg の投与により卵巣や卵管に影響が認められている<sup>42)</sup>。また、メトキシクロルを出生前から投与した雌の出生児においては、5 mg/kg 以上の投与量で子宮重量の低下が、50 mg/kg 以上の投与量では性周期の異常がそれぞれ認められている<sup>43)</sup>。以上の結果、交配前に 42 日間、125 mg/kg のメトキシクロルを投与された雌動物で、受胎率が低下する等の明確な変化が起きていることから、中間量をほぼこの投与量を反復投与した場合の初期変化を検討し得る 100 mg/kg に設定し、公比 4 で、高ならびに低用量を 400 ならびに 25 mg/kg に設定した。

(投与回数、時刻) 1日1回、1週7回、毎日 9:00~12:00 に投与した。

(投与期間) 雄は 28 日間、雌は解剖の前日まで投与した。

## 7. 試験操作・検査・測定

(一般状態の観察) 毎日 1 回 (投与後)、全例の生死の確認を行い、一般状態を観察した。

(体重測定) 投与第 1 週では、投与第 1 日の投与直前に全例の体重を測定し、投与第 4 日にも測定を行った。第 2 週以降は毎週 2 回 (投与第 8、11、15、18、22 および 25 日) の頻度で測定した。また、投与期間終了日 (投与第 28 日) および剖検日にも体重を測定した。

(雌の性周期観察) 投与第 22 日以降剖検日まで毎日、雌全例の膣垢を採取し塗抹標本作製して性周期の確認を行なった。

(血中ホルモン濃度測定) エーテル麻酔下で、定期解剖例 (投与期間終了時屠殺剖検例)

全例の腹部大動脈から無処置乾燥注射筒を用いて採血した血液から血清を分離し、テストステロン、エストラジオール、卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、プロラクチンならびにコルチコステロン濃度を測定した。測定はテストステロンならびにエストラジオールについては Diagnostic Systems Laboratories 製の、FSH、LH ならびにプロラクチンについてはアマシャムファルマシアバイオテック製の、それぞれの測定キットを用いてエンザイムイムノアッセイ法で、コルチコステロンについてはアマシャムファルマシアバイオテック製の測定キットを用いてラジオイムノアッセイ法で実施した。ただし、テストステロンの測定は、雄についてのみ行った。

(血液学的検査) 前述の血中ホルモン濃度測定のための採血に引き続き、エーテル麻酔下で、定期解剖例全例の腹部大動脈から、抗凝固剤としてクエン酸 Na を用いて採取した血液について、自動血液凝固測定装置 CA-1000(東亜医用電子)を用いて光散乱検出法によりプロトロンビン時間(PT)を測定し、次いで抗凝固剤として EDTA-2K を用いて採血した血液を用いて、以下に示す検査項目について血液学的検査を実施した。すなわち、Coulter Counter Model S-PLUS(コールターエレクトロニクス)を用いて、電気抵抗法で赤血球数(RBC)ならびに平均赤血球容積(MCV)を測定し、吸光度法によって血色素量(Hb)を求めた、また、これらの3者から計算によって、ヘマトクリット値(Ht,  $RBC \times MCV \times 0.001$ )、平均赤血球血色素量(MCH,  $Hb \times 1000 / RBC$ )、平均赤血球血色素濃度(MCHC,  $Hb \times 100 / Ht$ )を求めた。さらに、Coulter Counter Model S-PLUS(コールターエレクトロニクス)を用いて、電気抵抗法で白血球数(WBC)ならびに血小板数を測定した。一方、白血球分類については、血液塗抹標本を Wright-Giemsa 染色し、光学顕微鏡を用いて視算して求めた。

(血液生化学的検査) 前述の血液学的検査のための採血に引き続き、エーテル麻酔下で、腹部大動脈から、抗凝固剤としてヘパリンを用いて採血し、血漿を分離して以下に示す検査項目について血液生化学的検査を実施した。すなわち、遠心方式生化学自動分析装置 COBAS-FARA(ロシュ)を用いて、ピウレット法で総蛋白濃度を、BCG法でアルブミン濃度を、COD・DAOS法で総コレステロール濃度を、グルコキナーゼ G6PDH法でブドウ糖濃度を、ウレアーゼ G l.DH法で尿素窒素濃度(BUN)を、Jaffe法(Rate)でクレアチニン濃度を、GSCC法でALP活性を、IFCC法でGOTならびにGPT活性を、Wroblewski-La Due法でLDH活性を、 $\gamma$ -グルタミル-3-カルボキシ-4-ニトロアニリド基質法で $\gamma$ -GTP活性を、GPO-DAOS法でトリグリセライド濃度を、モリブデン酸直接法で無機リン濃度(Inorg.phos.)を、OCPC法でカルシウム濃度をそれぞれ測定し、総蛋白濃度とアルブミン濃度からA/G比を計算により求めた。

また、全自動電解質分析装置 EA05 (A&T)によるイオン電極法で、ナトリウム、カリウムならびに塩素の各濃度を測定した。

(病理学的検査) 投与第28日以降に生存していた雌のうち、性周期観察の結果、diestrousであると判断された例は、同日、剖検を実施した。また、5日以上持続して同一ステ

一ジの膣スミア像が観察された例は、無発情あるいは連続発情であると判断し、剖検を実施した。スミア像には変化は認められるものの、周期が一定せず、diestrous が認められない例では投与第 33 日の翌日、剖検を実施した。一方、全ての雄は投与第 28 日の翌日剖検した。剖検においては、主要器官・組織の肉眼的観察を実施するとともに、下垂体、甲状腺（上皮小体を含む）、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、精嚢+前立腺、卵巣ならびに子宮（内容物を除く）の重量を測定し、精嚢+前立腺については測定後、精嚢と前立腺を分離し、凝固腺を含む精嚢重量ならびに前立腺（腹葉）重量を個別に測定した。剖検当日の体重を基に比体重値（相対重量）を算出した。

脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、心臓、気管、気管支、肺、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、副腎、胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、精巣、精巣上部、前立腺（背側、腹側）、精嚢、凝固腺、卵巣、卵管、子宮、子宮頸部、膣、乳腺、膀胱、坐骨神経、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、顎下腺、舌下腺ならびに病変部を摘出して、精巣および精巣上部はブアン液で固定し（保存は 70%アルコール溶液を使用した）、その他の器官・組織は 0.1M リン酸緩衝 10%ホルマリン液に固定した後、定期解剖例の溶媒対照群および高用量群では、上記の器官・組織について、組織学検査を実施した。また、精巣、精巣上部、前立腺、精嚢、凝固腺、副腎、腎臓、肝臓、下垂体、卵巣、卵管、子宮、膣、乳腺、甲状腺および上皮小体ならびに胸腺については、全例の病理組織学的検査を実施した。

（精子検査） 雄の定期解剖例のうち 5 匹から、右側の精巣上体内の精子を採取して運動、数および形態を観察した。また、右側精巣内の精子頭部を計数した。精子検査を実施した反対側の精巣および精巣上部については、病理学的検査を実施した。

精子運動能検査：精巣上部の尾部から精子塊を採取し、M199 液（BSA 添加量は 1%とした）中で 5～8 分間培養後、精子運動能解析装置（HTM-IVOS、ハミルトン・ソーン）を用いて運動能を検査した。

精子数測定：精巣および精巣上部（精子運動観察に用いた残り）をホモジナイズし、その希釈液を用いて精子頭部数を計数するとともに、ホモジナイズ液 1 mL 中の精子数を算出した。

精子形態観察：精子運動能検査で作製した精子培養液をスライドグラスに塗抹・風乾し、メタノール固定した。本試験においては、精子運動能検査、精子数測定の結果、被験物質投与によると推定される異常が認められたため、全ての標本についてエオジン・アニリンブルー染色し、約 200 個の精子の形態異常、精子数および異常型を観察し、異常発現率を算出した。

## 8. データの解析法

体重ならびに定期解剖例の血液学検査、生化学検査、血中ホルモン濃度の測定値、精子数、運動精子率および器官重量は、各群ごとに平均値および標準偏差を求めた。次いで、Bartlettの方法により分散の一意性について検定（有意水準：5%）を行い、分散が一意である場合には一元配置型の分散分析を行い、対照群と投与群の間に有意性が認められる（有意水準：5%）場合は、Dunnett法により多重比較を行った。一方、分散が一意でない場合はKruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意性（有意水準：5%）が認められる場合には、Dunnett型の検定法で多重比較を行った。但し、いずれかの群で分散が0となった場合には、Bartlettの検定は行わずにKruskal-Wallisの順位検定を行い、その結果、群間に有意性が認められた場合には、Dunnett型の検定法により多重比較を行った。病理組織所見では、グレード分けしたデータはMann-WhitneyのU検定により、また陽性グレードの合計値はFisherの直接確率の片側検定により、溶媒対照群と各被験物質投与群との間の有意差検定を行った（有意水準：5%）。

## 【結果】

### 1. 一般状態

認められた異常な一般状態を Table 1-1 および 1-2 に示す。雌雄とも全投与期間を通じて、死亡は認められなかった。一般状態の変化として雌雄とも 400 mg/kg 投与群で脱毛が認められ、雄ではさらに消瘦や排便量の減少がみられた。

### 2. 体重

体重の測定結果を Table 2-1 および 2-2 に示す。雌雄とも 100 mg/kg 以上の投与群で、有意に抑制されたが、25 mg/kg 投与群では対照群に比較して差は認められなかった。

### 3. 性周期

性周期観察の結果を Table 3-1 から 3-4 に示す。100 mg/kg 以上の投与群で、角化細胞、有核細胞に白血球が混在する異常な膣垢像を示す動物が 100 mg/kg 投与群で 10 例中 3 例、400 mg/kg 投与群では 10 例中 8 例認められた。また、400 mg/kg 投与群では連続発情している動物が 3 例認められた。

### 4. 血中ホルモン濃度

血中ホルモン濃度の測定結果を Table 4-1 および 4-2 に示す。血中プロラクチン濃度は雌雄とも 100 mg/kg 以上の投与群で増加し、雌では有意差がみられた。今回、当研究所において共同バリデーションプロジェクトで実施した、3 試験の 28 日間反復投与試験の対照群の血中プロラクチン濃度は、雌の 1 例を除いて雄が 18 から 95 ng/mL、雌が 16 から 69 ng/mL であり、雌雄とも 100 mg/kg 以上の投与群では、この範囲を逸脱する動物が複数認められたことから、いずれも影響を受けているものと判断した。血中 FSH 濃度は雄の 100 mg/kg 以上の投与群、雌の 400 mg/kg 投与群で有意に増加した。今回の 3 試験の雌の血中 FSH 濃度は、118 から 343 ng/mL の範囲にあり、雌の 100 mg/kg 投与群の平均値はこれを上回ることから、雌では 100 mg/kg 投与群においても血中 FSH 濃度に影響があったと考えられる。一方、雄の血中テストステロン濃度は、100 mg/kg 以上の投与群で低下した。血中コルチコステロン濃度は、雌雄とも群間に有意差を認めなかった。

### 5. 血液学的検査

血液学的検査結果を Table 5-1 および 5-2 に示す。赤血球数、血色素量ならびにヘマトクリット値の低下が雄の 400 mg/kg 投与群、雌の 100 mg/kg 以上の投与群で認められた。雄ではさらに白血球数の低下が 100 mg/kg 以上の投与群で、血小板の増加が 400 mg/kg 投与群でみられた。プロトロンビン時間には雌雄とも変化は認められなかった。



## 6. 血液生化学的検査

血液生化学的検査結果を Table 6-1 および 6-2 に示す。血糖値の低下が 100 mg/kg 以上の投与群の雌雄で、血中総コレステロール値の低下が投与全群の雌雄で認められ、さらに 100 mg/kg 以上の投与群の雌ではトリグリセライド濃度の増加がみられた。

アルブミン濃度の低下が、100 mg/kg 以上の投与群の雄ならびに 25 mg/kg 以上の投与群の雌で認められ、これに伴って A/G 比の低下が、400 mg/kg 投与群の雄ならびに 25 mg/kg 以上の投与群の雌で認められた。100 mg/kg 投与群の雌ではさらに、総蛋白濃度の有意な低下がみられた。

$\gamma$ -GTP 活性の有意な増加が 400 mg/kg 投与群の雌雄で、GPT 活性の増加が 400 mg/kg 投与群の雄で、それぞれ認められた。

一方、無機リン濃度は 400 mg/kg 投与群の雌で有意差が認められたが、雄には変化が認められず、カルシウム濃度には変化は認められなかった。また、ALP 活性は 100 mg/kg 投与群の雌でのみ有意な増加がみられ、用量依存性のある変化は捉えられなかった。

クレアチニン濃度には 400 mg/kg 投与群の雄で有意な増加が認められたが、雌には変化がみられなかった。また、GOT 活性が 100 mg/kg 投与群の雄で有意に増加したが、400 mg/kg 投与群にはみられず用量依存性の無い変化であった。以上のほか、LDH 活性、尿素窒素濃度、ナトリウム濃度、カリウム濃度ならびに塩素濃度に変化は認められなかった。

## 7. 病理学的検査

### 1) 剖検所見

剖検所見を Table 10-1 および 10-2 に示す。精巣および精巣上体は 400 mg/kg 投与群の 8 例ならびに 100 mg/kg 投与群の 5 例で小型化が認められた。また、前立腺では 400 ならびに 100 mg/kg 投与群の各 9 例で、精囊では 400 mg/kg 投与群の全例ならびに 100 mg/kg 投与群の 9 例でそれぞれ小型化が認められ、その内 100 mg/kg 投与群の 1 例では、精囊の一侧に浮腫様の領域が観察された。さらに、100 mg/kg 投与群の 1 例では一侧の精巣上体頭部に結節がみられた。

卵巣では 400 mg/kg 投与群の 2 例で小型化が認められ、その内 1 例では子宮角の一侧に嚢胞が観察された。また、100 mg/kg 投与群の 1 例の子宮には内腔の拡張がみられた。

腎臓は 400 mg/kg 投与群の雄の 1 例でモザイク様を呈した淡色域がみられ、雌の 1 例では腫大かつ軟化し皮質に淡色域がみられた。この内、雌の例では陰部の被毛に汚れが観察された。この他、対照群の雄で腎盂の拡張、雌では被膜の癒着がみられた例もあった。

副腎では 400 mg/kg 投与群の雌 1 例に淡色化が認められた。

その他、雄の対照群で肺の暗赤色点および肝臓の横隔膜結節がみられたほか、雌の 100 および 400 mg/kg 投与群では脱毛が観察された。

## 2) 器官重量

器官重量の測定結果を Table 7-1 および 7-2 に、その最終体重当たりの相対重量を Table 8-1 および 8-2 に示す。100 mg/kg 以上の投与群では、精巣、精巣上体、精嚢と前立腺を合わせた副生殖腺重量ならびに凝固腺を含む精嚢重量および前立腺腹葉の重量のいずれも低下した。これらの器官重量のうち、副生殖腺、精嚢ならびに前立腺の重量は、相対重量にも有意な低下が認められた。精巣および精巣上体重量は 400 mg/kg 投与群でのみ有意であった。一方、雌では卵巣重量が 100 mg/kg 以上の投与群で有意に低下し、相対重量にも 400 mg/kg 投与群で有意な低下が認められた。

肝臓重量は雄の 100 mg/kg 以上の投与群で有意な低下が認められたが、雌では 400 mg/kg 投与群で有意に増加しており、相対重量を求めると、雄では 400 mg/kg 投与群で、雌では 100 mg/kg 以上の投与群でそれぞれ有意な増加が確認された。

下垂体重量は、雄の 100 mg/kg 以上の投与群ならびに雌の 25 mg/kg 以上の投与群で有意に低下したが、相対重量は雌の 400 mg/kg 投与群でのみ有意な低下が認められた。雄では 25 mg/kg 以上の投与群で有意に増加がみられた。

甲状腺重量には、雌雄とも差は認められなかった。相対重量は雄では 100 mg/kg 以上の投与群で有意な増加がみられたが、低体重の影響による偶発的な差と考えられた。

腎臓重量は雄の 100 mg/kg 以上の投与群で有意な低下が認められたが、相対重量を求めると、雌雄とも 400 mg/kg 投与群で有意に増加していた。

副腎重量は雄の 400 mg/kg 投与群で有意な増加が認められたが、雌では認められなかった。相対重量は雄の 100 mg/kg 以上の投与群、雌の 100 mg/kg 投与群では有意な増加が認められた。

子宮重量には差は認められなかった。相対重量を求めると、100 mg/kg 投与群で有意な増加がみられたが、400 mg/kg 投与群には差は認められなかった。400 mg/kg 投与群では 10%近い低体重であったことを考えあわせるとメトキシクロルの投与によって子宮重量は増加の傾向にあった可能性が考えられるが、明確ではなかった。

## 3) 病理組織学検査所見

病理組織学検査所見を Table 11-1 および 11-2 に示す。精巣では 400 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の 7 例ならびに 25 mg/kg 投与群の 2 例で精細管の萎縮が認められ、この内 400 および 100 mg/kg 投与群の精細管では、壊死や変性に陥った精母細胞が観察された (Photo 1)。400 mg/kg 投与群における変化は、100 mg/kg 投与群に比較して程度が増強していた。また、400mg/kg 投与群の 6 例ならびに 100 mg/kg 投与群の 3 例の精細管では精子細胞および精子の減少が認められ、この内、大半の例では精子細胞の変性が、3 例では多核巨細胞が観察された。精細管の萎縮の程度が他の例と比較して重度な例ではステップ 9 以降の精子細胞 (elongate spermatid) の減少が明らかで、精細管内に精子はほとんどみられず生殖上皮層には空胞が認められた。一方、精細管の萎縮の程度が軽度な例では、精母細胞の変化は精子形成サイクルのステージ VII および VIII に限局していた。さらに、

400 および 100 mg/kg 投与群の全例ではライディヒ細胞の萎縮が観察され、400 mg/kg 投与群の萎縮の程度は 100 mg/kg 投与群と比較して増強していた。その他、25 mg/kg 投与群で精細管の萎縮がみられた内の 1 例にも多核巨細胞が観察された他、100 mg/kg 投与群の 1 例の動脈周囲にリンパ球浸潤がみられた。

精巣に萎縮がみられた例の内 400 mg/kg 投与群の 8 例、100 mg/kg 投与群の 4 例の精巣上体では管腔内に細胞残屑がみられ、管腔内の精子数も減少しており、特に 400 mg/kg 投与群の 4 例の管腔内には精子はほとんど認められなかった。また、100 mg/kg 投与群の 1 例の一侧に精子肉芽腫が認められた。

前立腺および凝固腺は 400 および 100 mg/kg 投与群の全例が、精囊は 400 mg/kg 投与群の全例ならびに 100 mg/kg 投与群の 9 例がそれぞれ内容液の減少を伴い萎縮していた。いずれの器官においても 400 mg/kg 投与群における萎縮の程度は、100 mg/kg 投与群と比較して増強していた。この他、100 および 25 mg/kg 投与群ならびに対照群の前立腺の間質にリンパ球浸潤がみられ、この内少数例では、上皮内にリンパ球および形質細胞が浸潤していた。

卵巣では 400 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の 4 例、25 mg/kg 投与群および対照群の各 1 例に閉鎖卵胞の増加が認められた。この内、400 mg/kg 投与群の全例ならびに 100 mg/kg 投与群の 3 例では黄体数の減少が認められ、特に、400 mg/kg 投与群の 4 例、100 mg/kg 投与群の 1 例では、明らかな黄体はほとんど観察されなかった (Photo 2)。この他、400 mg/kg 投与群では変性した卵子の鉍質沈着、100 mg/kg 投与群および対照群では卵胞嚢胞がみられた。

子宮では 400 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の 5 例の腔上皮細胞に肥大がみられた (Photo 3)。また、各群の一部の動物では腔上皮細胞および子宮腺上皮細胞に細胞残屑を含む空胞がみられた。この所見は発情期には通常認められる像であるが、400 mg/kg 投与群では他の群と比較して程度の強い例が増加していた。一方、100 および 25 mg/kg 投与群ならびに対照群の多数例に観察された腔上皮細胞の分裂像は、400 mg/kg 投与群では 1 例にのみ認められ、子宮内膜および筋層の好酸球浸潤も全例にみられたが、400 mg/kg 投与群では他の群と比較して程度の軽い例が増加する傾向が認められた。また、子宮内腔の拡張は 100 mg/kg 投与群において例数および程度が他の群と比較して増加していた。その他、400 mg/kg 投与群の 1 例では子宮筋層内に嚢胞が認められ、その内層は単層円柱上皮であった。この所見は内容から、被験物質投与による影響ではないものと判断した。また、400 mg/kg 投与群の 1 例では腔上皮の限局性の扁平上皮化生がみられたが、所見が限局的であることから被験物質による影響ではないものと判断した。この他、25 mg/kg 投与群で内膜のリンパ球浸潤が 1 例に認められた。

子宮に腔上皮細胞の肥大がみられた例の一部では、腔において上皮の角化あるいは粘液細胞化を伴う上皮層の肥厚が認められた (Photo 4)。400 mg/kg 投与群の上皮は全例が角化し、その内 1 例が粘液細胞化を伴っていたのに対し、100 mg/kg 投与群の上皮は 5 例が

粘液細胞化を呈し、その内1例では角化を伴っていた。

乳腺は雄においては400 mg/kg 投与群で観察を行った全例ならびに100 mg/kg 投与群の9例に萎縮が認められ、400 mg/kg 投与群における萎縮の程度は100 mg/kg 投与群と比較して増強していた。雌の乳腺には変化が認められなかった。

副腎では雄の400 mg/kg 投与群の全例ならびに100 mg/kg 投与群の6例に、雌の400 mg/kg 投与群の全例、100 mg/kg 投与群の7例ならびに25 mg/kg 投与群および対照群の各1例に、皮質束状帯細胞の肥大が認められ、雌雄とも400 mg/kg 投与群における変化の程度は他の群と比較して増強する傾向がみられた。

腎臓では400 mg/kg 投与群の雄全例、雌9例の皮質に好塩基性尿細管および近位尿細管上皮の空胞変性が認められた。好塩基性尿細管は各群の雌雄に認められたが400 mg/kg 投与群では他の群と比較して程度の強い例が認められ、この内の雄2例、雌3例では髓質や乳頭部にも観察された。また、400 mg/kg 投与群では、雄5例、雌8例で皮質の遠位尿細管、髓質や乳頭部の集合管の拡張がみられ、雌の1例では皮質の近位尿細管にも拡張が認められた。これらの例の管腔内には、細胞残屑や好中球が認められたほか、好中球の浸潤が乳頭部の管腔外にも波及している例が認められた。その他、皮質あるいは乳頭部に鉍質沈着、間質のリンパ球浸潤ならびに腎盂の拡張がみられた。

肝臓では雌雄の400 mg/kg 投与群の全例、雌の100 mg/kg 投与群の5例に小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、雌の400 mg/kg 投与群における変化の程度は100 mg/kg 投与群と比較して増強する傾向が認められた。この他、雌では限局性の壊死巣、限局性の肝細胞の脂肪変性、横隔膜結節の被膜に限局性の線維化がみられた。

脾臓では雌雄のほとんどの動物で髓外造血および褐色色素の沈着がみられたが、各群間に頻度および程度の差は認められなかった。

肺では各群の雌雄に限局性の泡沫細胞の集簇や動脈の鉍質沈着がみられたが、各群間で頻度および程度に差は認められなかった。また、雌雄の少数例で好酸球浸潤、リンパ球や好中球の限局性浸潤ならびに限局性の出血が、雌の少数例で骨化生ならびに胸膜の限局性の線維化がみられた。

その他、雌の心臓で限局性の心筋変性／線維化が、雌雄の甲状腺で異所性の胸腺組織がみられた。

脳、下垂体、脊髄、眼球、甲状腺、上皮小体、気管、気管支、胸腺、胃、腸管、卵管、膀胱、坐骨神経、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、大腿骨骨髓、顎下腺ならびに舌下腺および剖検時脱毛が観察された皮膚に、異常は認められなかった。

## 8. 精子検査

精子検査の結果をTable 9に示す。100 mg/kg 以上の投与群では、精巣上体中の精子数の用量依存的な減少が認められたが、精巣中の精子頭部数は減少傾向が認められるものの、有意差は認められなかった。400 mg/kg 投与群においては、運動精子率の平均値が低下し、