

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

臭素化ダイオキシン類の毒性評価に関する研究

平成 14 年度 総括研究報告書

主任研究者 山本 静護

平成 15(2003)年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書	
臭素化ダイオキシン類の毒性評価に関する研究	1
山本静護	

臭素化ダイオキシン類の毒性評価に関する研究

主任研究者 山本 静護

中央労働災害防止協会 日本バイオアッセイ研究センター 副所長

研究要旨

臭素化ダイオキシンによる労働者の健康障害を防止する施策を行うための基礎データを得ることを目的として、臭素化ダイオキシン類の（１）労働現場における暴露形態に合わせた経気道投与による毒性（動物への吸入暴露代替法としての経気道投与技術の開発・検討を含む）、及び（２）塩素化ダイオキシン類との毒性比較に必要な経口投与による毒性（臓器毒性や生殖毒性等）を評価するための研究を３年計画で行う。

本年度は単回経口投与による急性毒性、臓器毒性、内分泌機能への影響、体内負荷量の測定等の研究及び吸入暴露代替法として経気道投与技術の開発・検討を行った。

臭素化ダイオキシンの単回経口投与による生体影響として、胸腺、肝臓及び脾臓への臓器毒性が確認された。さらに、新たな知見として、①肝臓と血液系、特に血液凝固能への毒性が主な死因であること、②骨髄にも顕著な毒性影響がみられること、③単回投与でも時間の経過とともに毒性影響が強くなる遅延性の毒性が起きることを見出した。

経気道投与技術の開発・検討においては、①動物種は、経口投与研究と合わせる、投与成功率が良好、血液等の生体サンプル量が確保できる等の検討結果よりラットが選定された。②確実な気管内挿管操作及び投与溶液の投与を可能とするイソフルランの吸入麻酔法が有効であった。③投与方法は、液体気管内投与器具を使用した液体気管内噴霧法が最も良好であった。

これらの成果は、本研究の最終目的「臭素化ダイオキシンによる労働者の健康障害を防止する施策を行うための基礎データを得ること」の達成に繋がるものである。

I. 臭素化ダイオキシン (TBDD) のラットに対する単回経口投与毒性

A. 研究目的

臭素化ダイオキシンによる労働者の健康障害を防止する施策を行うための基礎データを得ることを目的として、臭素化ダイオキシン類と塩素化ダイオキシン類との毒性比較に必要な経口投与による毒性（臓器毒性や生殖毒性等）を評価するための研究を3年計画で行う。平成14年度は、臓器毒性、内分泌機能、体内負荷量等に関する急性的影響及び次年度以降の生殖毒性研究実施のための基礎データを得ることを目的として臭素化ダイオキシンの単回経口投与による研究を実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質

2, 3, 7, 8-四臭化ジベンゾ-パラ-ジオキシン (TBDD) (CAS No. : 50585-41-6、白色顆粒状、純度98%)はCambridge Isotope Laboratories, Inc. から入手し（入手後冷暗所で保管）、研究に使用した。

2. 使用動物

生後4週齢のCrj:Wistarラット(SPF)雌雄を、日本チャールス・リバー株式会社（筑波飼育センター：茨城県新治郡八郷町大字上林955）から購入し、検疫及び馴化を各1週間行

い、6週齢で被験物質を投与した。

群の構成及び各群の使用動物数は雌雄とも、溶媒のみを投与する0 (control) 群（以下、対照群と記載。）1群及び被験物質投与群4群（以下、300 μ g/kg、100 μ g/kg、30 μ g/kg、10 μ g/kg と記載。）の合計5群を設け、1群当たりの動物を15匹とした。また、各群ともに投与後2日、7日及び36日にそれぞれ5匹の動物を解剖（定期解剖動物）することとした。各群への動物の割り当ては体重を指標とし、偏りを小さくする群分け法（層別体重平均法）により実施した。

動物は、温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、換気回数 12 ± 1 回/時間、明暗サイクル12時間に制御された飼育チャンバー内で、ステンレス製網ケージに個別に収容し、固型飼料（ γ 線照射滅菌）（オリエンタル酵母工業（株）千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港8-2）及び飲料水（市水）（秦野市水道局供給）を自由に摂取させて飼育した。

3. 被験物質の投与量及び調製・投与方法

TBDDの投与用量は、体重1kg当たり300、100、30及び10 μ gの4用量とした。

投与溶液は、まずTBDDをトルエンに溶解し、各設定濃度（ μ g/mL）になるようにコーン油を加え、マグネチックスターラで混合して調製した。この調製は、投与直前に、紫外線の影響を避けるため黄色灯下で実施した。

投与は、前日（夕方）から絶食したラットに胃ゾンデ（ラット用）を用いて投与溶液を単回強制経口投与した。投与容量は、群構成時の体重 1kg 当たり 5mL とした。

投与の方法及び用量の設定理由は、当該被験物質の生体への影響の基礎データを得るため強制経口投与とし、遅延的な毒性による死亡が文献で確認されているため、観察期間は 36 日間とした。投与用量は Ivens らの報告*を参考に決定した（*: Toxicology, 73 (1992) 53-69）。

4. 観察・検査等

(1) 一般状態の観察及び体重測定

動物の生死確認は、毎日1回、また一般状態の詳細な観察は、投与後 2、4、7、10、14、21、28及び36日に行った。

体重測定は、投与後 2、4、7、10、14、21、28、36日目に行った。また、死亡動物については、解剖搬出時にも体重測定を行った。

(2) 血液学的検査

投与後2日、7日及び36日の定期解剖動物について、赤血球数、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)、網赤血球比、血小板数、白血球数、白血球分類の検査を行った。

また、投与後36日の定期解剖動物については、プロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の検査も行った。

(3) 血液生化学的検査

投与後2日、7日及び36日の定期解剖動物に

ついて、総蛋白、アルブミン、A/G比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、GOT、GPT、LDH、 γ -GTP、CPK、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リン、血清中の蛋白分画（アルブミン、 α 1-グロブリン、 α 2-グロブリン、 β -グロブリン、 γ -グロブリン）の検査を行った。

(4) 血清中のホルモン濃度の測定

投与後2日、7日及び36日の定期解剖動物中、雌雄とも各群3匹（36日雌は2匹）について、次のホルモン濃度の測定を行った。

- ・ Triiodothyronine (T3)
- ・ Thyroxin (T4)
- ・ Thyroid-Stimulating Hormone (TSH)

(5) 肝臓中の誘導酵素量の測定

投与後2日、7日及び36日の定期解剖動物中、雌雄とも各群2匹について、次の肝臓中の誘導酵素量を測定した。

- ・ Ethoxycoumarin O-deethylase (ECOD)
- ・ Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD)
- ・ Aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH)

(6) 体内負荷量の測定

投与後2日（対照群、30 μ g/kg、100 μ g/kg 及び300 μ g/kg）及び投与後7日と36日（100 μ g/kgと300 μ g/kg）の定期解剖動物について、雌雄とも1群あたり2匹について、肝臓及び脂肪組織を採取し、TBDDの未変化体濃度を測定した。

(7) 病理学的検査

雌300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の死亡動物3匹及び投与後2日（雌雄各5匹）、7日（雌雄各5匹）及び36日（雄5匹、雌2匹）の定期解剖動物について次の病理学的検査を行った。

① 剖検観察

② 臓器重量の測定

胸腺、副腎、精巣、卵巣、心臓、肺、腎臓、脾臓、肝臓、脳、甲状腺の湿重量を測定。

③ 病理組織学的検査

骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁腸間膜）、胸腺、脾臓、肝臓、腎臓、下垂体、甲状腺、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膣、脳、脊髄の器官、組織について、ホルマリン固定後、切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡による検査を実施した。

(8) 統計解析

数値データは0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を基準群として、まず、Bartlett法により等分散の予備検定を行い、等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合はDunnnettの多重比較により平均値の検定を行った。分散の等しくない場合には各群を通して測定値を順位化して、Kruskal-Wallisの順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合にはDunnnett（型）の多重比較を行った。各検定は5%の有意水準で両側検定を行い、検定結果は5%及び1%で有意水準を表示した。なお、体内負荷量、肝臓中の酵素量については個別データと平均値を記載し統計処理は行わなかった。

(倫理面への配慮)

- ① 本研究は、動物愛護の観点から当センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。
- ② 本研究は、研究者の安全衛生対策及び周囲環境の汚染防止の観点から、「特定化学物質（2, 3, 7, 8-TBDD）安全管理規定」及び「特定化学物質（2, 3, 7, 8-TBDD）の取扱い管理指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

1. 生死状況、一般状態観察所見及び体重

動物の死亡は、TBDD 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回経口投与した雌で投与後21日、23日及び27日に各1匹みられた。これらの死亡動物については、死亡間際に体重の減少と健康状態の悪化がみられ、23日の死亡例については貧血も認められた。

生存動物については、投与後36日間の観察期間中、雌雄の全投与群で一般状態に投与の影響と思われる所見はみられなかった（表1、表2）。

TBDD投与後4日以降に雄の100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び雌の30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与量に対応した体重増加の抑制がみられた。その抑制は、投与後の時間経過に伴い大きくなった。抑制率は、対照群と比較して、雄では100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：4～6%、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：3～11%、雌では30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：1～12%、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：7～12%、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ：5～14%であった。（表3、表4、図1、図2）

2. 血液学的検査 (表 5, 表 6)

(1) 投与後 2 日定期解剖動物

好酸球比(白血球分類)の低下が、雄では 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌では 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でみられた。

(2) 投与後 7 日定期解剖動物

白血球数の増加(雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、好酸球比(白血球分類)の低下(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、網赤血球の比率の低下(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、血小板数の減少(雄: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)が認められた。

(3) 投与後 36 日定期解剖動物

白血球数の減少(雄: 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、好酸球比(白血球分類)の低下(雄: 30, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、網赤血球の比率の増加(雄: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、血小板数の減少(雄: 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、ヘモグロビン濃度の低下(雌雄とも 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、ヘマトクリット値の低下(雄: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、及び赤血球数の低下(雄: 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)が認められた。

300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の雄の1匹(動物番号1412)は、血液凝固能のパラメーターであるプロトロンビン時間(PT)と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)に測定限界(PT: 110秒、APTT: 220秒)を越える延長がみられ、血液凝固能が極度に低下していることが示された。

3. 血液生化学的検査 (表 7, 表 8)

(1) 投与後 2 日定期解剖動物

総コレステロールの増加(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)及びグルコースの低下(雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)が認められた。

(2) 投与後 7 日定期解剖動物

総コレステロールの増加(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、トリグリセライドの低下(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、グルコースの低下(雌雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、総蛋白の増加(雌雄: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、アルブミンの増加(雄: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、リン脂質の増加(雌: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)及びGOTの増加(雌: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)が認められた。GOTの増加については、雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は特に高い値であった。

(3) 投与後 36 日定期解剖動物

総コレステロールの増加(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、リン脂質の増加(雄: 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、トリグリセライドの低下(雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)及びGOTの増加(雌: 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)が認められた。

病理組織検査で肝臓に顕著な変化が観察された300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の1匹(動物番号1412)は、GOT、GPT、ALP及び γ -GTPが特に高い値を示した。

4. 血清中のホルモン濃度 (表 9, 表 10)

雄では、TSH及びT3は、投与後2日、7日、36日において、すべての投与群で変化は見られなかった。T4は、投与量に対応した減少がみられ、投与後2日及び7日には統計学的(Dunnett検定による)に有意な差(投与後2日では30, 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ともに $p < 0.01$ 、

投与後7日では30 μ g/kg : p<0.05、100、300 μ g/kg : p<0.01) がみられた。

雌では、TSH、T3、T4ともに投与後2日、7日、36日において、すべての投与群で変化はみられなかった。

5. 肝臓中の誘導酵素量 (表11, 表12)

AHHは、雌雄とも、投与後2日、7日、36日において、すべての投与群とも対照群に比べ高い値であった。

ECODは、雌雄とも、投与後2日において、すべての投与群とも対照群と比較して高い値であった。投与後36日の雄10、30 μ g/kg及び雌10、30、100 μ g/kgでは投与後2日の値と比較して低い値であった。

ERODは、雌雄とも、投与後2日において、すべての投与群とも対照群と比較して高い値であった。投与後36日では、雌雄とも、投与後2日の値と比較して低い値であった。

AHH、ECOD及びERODとも、各投与群の増加の程度には群間差が少なかった。

なお、AHH及びECODの二種類の誘導酵素量に性差が見られた。

6. 体内負荷量 (表13, 表14)

(1) 肝臓

投与後2日は、雄では30 μ g/kg : 67.5ng/g、100 μ g/kg : 250ng/g、300 μ g/kg : 585ng/g、雌では30 μ g/kg : 46ng/g、100 μ g/kg : 200ng/g、300 μ g/kg : 710ng/gであった。

投与後7日は、雄では100 μ g/kg : 215ng/g、300 μ g/kg : 465ng/g、雌では100 μ g/kg : 160ng/g、300 μ g/kg : 450ng/gであった。

投与後36日は、雄では100 μ g/kg : 41.5ng/

g、300 μ g/kg : 120ng/g、雌では100 μ g/kg : 44.5ng/g、300 μ g/kg : 86.5ng/gであった。

(2) 脂肪

投与後2日は、雄では30 μ g/kg : 46.5ng/g、100 μ g/kg : 125ng/g、300 μ g/kg : 440ng/g、雌では30 μ g/kg : 33.5ng/g、100 μ g/kg : 140ng/g、300 μ g/kg : 515ng/gであり、ほぼ投与量に対応した値を示した。

投与後7日は、雄で100 μ g/kg : 200ng/g、300 μ g/kg : 500ng/g、雌で100 μ g/kg : 210ng/g、300 μ g/kg群 : 545ng/gであった。

投与後36日は、雄で100 μ g/kg : 39ng/g、300 μ g/kg : 120ng/g、雌で100 μ g/kg : 61.5ng/g、300 μ g/kg : 120ng/gであった。

7. 病理学的検査

(1) 剖検所見 (表15)

投与後2日及び7日の定期解剖動物では、雌雄とも特記すべき変化は認められなかった。

投与後36日の定期解剖動物では、雄300 μ g/kgの1匹(動物番号1412)は、右上肢の皮下から筋肉に出血、肝臓に黒色斑が観察された。また、死亡した雌300 μ g/kgの動物3匹は、いずれも胸腺が萎縮し、内2匹は頭蓋腔と脊髓腔や、皮下(頸部)、鼻腔に出血がみられた。

(2) 臓器重量 (表16, 表17)

① 投与後2日定期解剖動物

雄では、胸腺の実重量と体重比の低下(30 μ g/kg以上)と肝臓の実重量と体重比の増加(30 μ g/kg以上)が認められた。

雌では、肝臓の実重量と体重比の増加(30 μ g/kg以上)が認められた。

② 投与後7日定期解剖動物

雄では、胸腺の実重量と体重比の低下 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、肝臓の実重量と体重比の増加 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、甲状腺の実重量と体重比の増加 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。

雌では、胸腺の実重量と体重比の低下 ($30, 100 \mu\text{g}/\text{kg}$)、及び肝臓の実重量の増加 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) と体重比の増加 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。

③ 投与後36日定期解剖動物

雄では、胸腺の実重量と体重比の低下 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、肝臓の実重量の増加 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) と体重比の増加 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) 及び脾臓の体重比の増加 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。

雌では、胸腺の実重量の低下 ($30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) と体重比の低下 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) 及び肝臓の体重比の増加 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。

(3) 病理組織所見

① 死亡動物 (表18)

雌 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ の試験途中死亡動物 (3匹) には、脳、脊髄、皮下組織、鼻腔、肝臓、骨髄、胸腺、脾臓及び肺に病変が観察された。

脳、脊髄、皮下組織、鼻腔に出血がみられ、特に脳や脊髄の出血が死因になったと考えられた。

肝臓は、肝細胞の形状に異常が認められ、肝細胞の配列が不整になり、肝細胞が管状に配列する像がみられた。また、中心性の線維化や炎症細胞の浸潤も認められた。さらに、2匹にはpeliosis、すなわち類洞が巣状に拡

張する変化が観察された。

骨髄には造血組織の減少と骨髄組織の線維化がみられた。また、骨組織の肥厚も観察された。胸腺には、顕著な萎縮、すなわちほぼ全域の皮質からリンパ球の消失がみられた。脾臓には、白脾髄の軽度な萎縮がみられた。また、肺には、鬱血や水腫が認められた。

② 投与後2日定期解剖動物 (表19, 表22)

雌雄とも、肝臓に、投与による影響が認められた。

肝細胞の軽度な好塩基性化 (好塩基性化は肝細胞の細胞質内に粗大な好塩基性斑が増加する所見であり、肝小葉の中心域に目立っていた。) が $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の全ての投与群に認められた。

③ 投与後7日定期解剖動物 (表20, 表23)

雌雄とも、肝臓、骨髄及び胸腺に投与による影響が認められた。

肝臓には、雌雄共通に投与後2日と同様の肝細胞の軽度な好塩基性化 (雌雄の全投与群)、肝小葉の中心域の肝細胞の軽度な腫大 (雄: $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌: 全投与群) 及び細胞質内封入体 (雌雄の $300 \mu\text{g}/\text{kg}$) が認められた (封入体は肝細胞内にエオジンに染まる滴状物で、その大きさは赤血球より大きいものがあつた。)。また、雌では肝小葉の中心域に多く観察された単細胞壊死と中心静脈の周囲の線維化 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。

骨髄には、大腿骨端部に造血組織の軽度な減少 (雌雄の $300 \mu\text{g}/\text{kg}$) が認められた。

胸腺には、萎縮 (雌雄の $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ の全て

の動物と雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の1匹) が認められた。その程度は、雄では軽度(皮質の厚さがやや狭くなっているもの) から、中等度(皮質にリンパ球が無くなった部分があるもの) までみられた。また、雌では100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の2匹にリンパ球の核崩壊を示す像がみられた。

④ 投与後 36 日定期解剖動物(表 21, 表 24)

雌雄の肝臓、骨髄、胸腺、脾臓及び筋肉、雌の皮下組織に投与による影響が認められた。

肝臓には、肝細胞の軽度な好塩基性化と腫大(雌雄の全投与群) がみられた。雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の1匹(動物番号1412) は、中心性の線維化があり、また、配列が不整になり、肝細胞が管状や嚢胞状に配列する像がみられた。雌では中心性の線維化(30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、多核化、すなわち5個以上の核を持つ肝細胞(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) がみられた。300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の生存動物2匹は、肝細胞の配列が不整になり、肝細胞が管状に配列する像がみられた。肝細胞の配列不整は100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも1匹に認められた。

骨髄には、造血組織の減少(雌雄の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) が認められた。この所見の程度は、軽度(大腿骨端部に造血組織の減少が認められるもの)、中等度(骨髄組織のほぼ全体に造血組織の減少が認められるもの) 及び重度(骨髄組織全体に造血組織の強い減少が認められるもの) であり、重度な減少は300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ にみられた。また、造血組織の減少がみられる動物には、骨髄組織の線維化や骨組織の肥厚も観察された。

胸腺には、萎縮(雌雄の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)

が認められた。雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と雌の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ には皮質の1/2以上の部分からリンパ球が消失する重度な萎縮を示す動物がみられた。

脾臓には、雄では髄外造血(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、雌では白脾髄の萎縮と髄外造血(300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) が観察された。

剖検観察で皮下出血がみられた雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の1匹(動物番号1412) には皮下組織と筋肉に出血が確認された。

雌雄ともに、腎臓、リンパ節、脳、脊髄、上皮小体、下垂体、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膈及び乳腺には特記すべき変化は認められなかった。

なお、甲状腺には空胞変性(雄:100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に1匹、雌:30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ に1匹) が観察されたが、この所見は使用ラットに特有な自然発生的変化であり、TBDDの投与の影響とは考えられなかった。

D. 考察

1. 生死状況、一般状態観察所見及び体重

動物の致死作用及びTBDD投与量に対応した体重増加の抑制作用に性差がみられた。この性差は、TBDDを10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ をWistar系ラットに単回経口投与した28日間試験報告(Ivens等, 1992年) にもみられた。しかし、この報告では、動物の死亡は雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び雌の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ にみられ、死亡例の体重は投与後減少した。

我々の研究結果は、Ivens等の報告とくらべ、TBDDの投与影響が低かった。その原因として

は、使用動物の投与時体重が高かったこと、飼育形態の違い、すなわちステンレス製網ケージ（ケージ床が網）を使用し、一方Ivens等らはプラスチック製の箱型ケージ（中に木屑を入れている。）を使用していることが考えられた。

2. 血液系への影響

TBDDの投与により、血液学的検査で血小板、赤血球及び白血球への影響がみられ、病理組織学的には骨髄での造血低下が認められた。

血小板数の低下は雌雄ともに投与7日後からみられ、血小板数の低下がみられる用量は雄では100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌では30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上であった。赤血球については、赤血球数や、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値の低下が、雌雄とも投与36日後に30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で認められた。なお、網赤血球の比率は、投与7日後に低下が認められたが、投与36日後では増加していた。白血球については、白血球数の減少が投与36日後に雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と雌の100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で認められた。なお、各白血球の比率は、後述する好酸球以外には変化が認められなかった。骨髄には、病理組織検査で造血低下、すなわち造血組織の減少が観察された。造血低下は、雌雄とも投与7日後から300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群に軽度な変化が認められた。投与36日後には100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の群に変化がみられ、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量では骨髄組織全体に造血組織の強い減少が観察される動物もあり、時間経過とともに増強することが示された。

IvensらのTBDDの単回投与の報告でも、赤血球、血小板、及び白血球の減少が指摘されているが、その変化は僅かであると述べられて

いる。また、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の死亡動物に消化管の出血、生存動物では1匹に前肢と精巣上体に出血が観察され、病理組織検査で骨髄に細胞数の減少がみられないことから、血液細胞のパラメーターの変化はこれらの組織の出血に起因した変化であると考察している。

本研究では、赤血球と血小板の減少が明らかに認められ、特に血小板の減少は顕著であり、投与36日後の雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では対照群の30%になっていた。病理学的検査では、雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の死亡動物に脳や脊髄、皮下組織、鼻腔の出血がみられた。また、雄の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の1匹にみられた皮下組織の出血、血液凝固能の低下の原因は、血小板の減少が主因と考えられた。脳や脊髄の出血は死亡動物の死因になりえる変化であり、血小板の減少がその原因であった可能性があるかと推察した。また、赤血球と血小板の減少の原因については、Ivensらの報告と異なり、病理組織学的に骨髄での造血組織の減少が明らかに認められることから、骨髄での造血低下が主因になっていると考察した。

3. 免疫系臓器への影響

TBDDの投与により、胸腺の萎縮が認められた。また、白血球分類では好酸球比の低下も示された。

胸腺の重量低下は雄では投与2日後から、また雌では投与7日後から認められ、重量低下がみられる用量は雌雄とも30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上であった。病理組織学的には胸腺の皮質からのリンパ球の消失や核崩壊を示す像が、雌雄とも投与7日後から100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で観察された。特に投与後36日には重度な萎縮がみられ

た。IvensらのTBDDの単回投与の報告でも、胸腺重量が投与用量に対応して低下すること、また、病理組織学的には33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ から胸腺萎縮の初期像がみられ、皮質からの明らかなリンパ球の消失が100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量からみられることが記載されている。本研究の結果はIvensらの報告と一致しており、胸腺への影響に関するIvensらの記載が確認された。なお、Ivensらは、脾臓に関しても33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からリンパ球の消失が観察されたと報告している。しかし、本研究では脾臓の重量低下は認められず、病理組織学的でも雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群にのみ投与36日後に白脾髄の萎縮がみられただけであった。

また、白血球分類により好酸球比の低下を認めた。好酸球比の低下は雌雄とも投与2日後から投与36日後までみられ、この変化は雄では30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌は10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までの用量で認められた。好酸球の数は正常値が低く、その減少の意味は明らかでない。しかし、好酸球はアレルギーとの関連がある細胞であり、TBDDの免疫機能への影響を考慮する上で注目する必要がある変化と考える。

なお、Ivensらは白血球分類の検査を行っていない。

4. 血清中のホルモン濃度

雄のT4が投与後2日、7日で低値を示した。TCDD類では、Ahレセプターを介して肝臓でUGT1が誘導され、T4はグルクロン酸抱合体となって胆汁から排出されやすくなり、そのため血中T4が減少し、フィードバック機構が働いて結果として甲状腺への影響が現れると推察されている。今回のTBDDの投与でもT4の減

少に対応して肝臓酵素の誘導があり、また、甲状腺の臓器重量（体重比）のわずかな増加も見られている。しかし、TSH、T3の増加や甲状腺組織の変化はなかった。

5. 肝臓中の誘導酵素量

AHH、ECOD及びERODはすべての投与群で高値を示し、増加の程度は各投与群とも同程度であった。投与後2日、7日、36日でその値は同じ範囲で継続したが、最少投与量群の10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でもすでにこれらの酵素の誘導がみられることはTBDDの毒性発現を考える上で重要であると思われた。肝臓での体内負荷量の測定から、100、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与後36日でもTBDDが存在している事を確認しており、極少量のTBDDの曝露でも一定量の酵素が誘導され、持続する事が示された。TCDDで知られている様にTBDDの投与によりAhレセプターとの結合を介してこれらの酵素が誘導されたものと推察した。ECODについては雄の10、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、また、雌の10、30、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で、ERODについては雌雄とも全投与群で経時的に肝臓中のTBDD濃度の減少に対応した減少傾向を示したが、投与後36日でもそれぞれの酵素量に対照群の値までの回復はみられなかった。

6. 体内負荷量

投与後2日の肝臓中及び脂肪中のTBDDは雌雄共に投与量に対応した値を示した。それぞれの臓器中濃度を比較すると肝臓中の濃度は脂肪中の濃度よりやや高い値を示した。

肝臓中のTBDD濃度は100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ とともに投与後7日、36日と徐々に減

少しだが、投与後 36 日においても投与後 2 日に比較して約 10~20%が残留していた。一次式を仮定して横軸に時間、縦軸に肝臓中の TBDD 濃度を取り、各解剖日ごとの濃度をプロットすると良い直線性が得られ、One-Compartment Model の適用が可能であると考察された。この結果をもとに TBDD の肝臓中の半減期を求めると雌雄で大きな差はなく 11 日~15 日の値が得られた。

脂肪中の TBDD 濃度は 100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも投与後 7 日に最大値を持ち、投与後 36 日で雄では肝臓中濃度とほぼ同じ値を、雌では肝臓中濃度よりやや高い値を示し、肝臓中の TBDD の挙動とやや異なっており、投与後 36 日においても投与後 2 日に比較して約 25~50%が残留していた。Ivens らは 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ をラットに単回経口投与した時の肝臓と脂肪中の TBDD 濃度を投与後 2 日(雄)と 28 日(雌雄)に測定している。この報告によると投与後 2 日の肝臓中の濃度は脂肪中の濃度よりもやや高い値を示し、今回の結果と同様な傾向を示した。しかし、投与後 2 日の雄のそれぞれの臓器中濃度の絶対量を比較すると、肝臓中濃度が 53ppb、脂肪中濃度が約 20ppb で、今回の試験結果の約 20%程度であった。さらに投与後 28 日の脂肪中の TBDD 濃度は検出限界以下と報告しており、本研究の投与後 36 日の結果はより高い蓄積量であった。

7. 肝臓への影響

TBDD の投与により、肝臓に臓器重量の増加と病理組織学的変化が認められ、血液生化学的検査パラメーターの変化も示された。

投与 2 日後には、臓器重量の増加、病理組

織学的変化が認められた。臓器重量の増加は雌雄とも 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量まで認められた。重量の増加の程度は、雄の 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は対照群に対し 1.3 倍、300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも 1.4 倍、雌は 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 1.3 倍であり、投与用量間の差が少ない。病理組織学的にも、投与後 2 日には肝細胞に軽度な好塩基性化、すなわち肝細胞の細胞質内に粗大な好塩基性斑が増加する所見が、雌雄とも 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量までみられた。Ivens らは、TBDD を単回投与した後 28 日目に検査した結果、肝細胞の空胞化や腫大とともに細胞質の好塩基性がみられ、この所見は小胞体の変化による結果であろうと指摘している。本研究では、肝細胞の細胞質の好塩基性が投与後 2 日からすでに発現し、この時期には肝細胞に他の所見が認められないことから、この変化が TBDD の肝臓に対する影響の初期変化であると推察した。また、この変化は本研究の最低用量である 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも発現し、臓器重量の変化と同様に好塩基性化の程度は高用量群から低用量群まで軽度であり、用量間の差が少なかった。また、血液生化学的検査では、雄に 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で総コレステロールの増加が認められた。

投与後 7 日には、臓器重量の増加とともに、より明瞭な病理組織学的変化や血液生化学的検査パラメーターの変化が認められた。臓器重量の増加は雌雄とも 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。重量の増加の程度は、雌雄とも 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも 1.3 倍であり、投与後 2 日の重量増加と比較して差がなかった。これに対し、病理組織学的には好塩基性化とともに、肝細胞の腫大や細胞質内封入体の出現が雌雄とも認められ、雌では単細胞壊死及び線維化の発

生もみられた。好塩基性化は、投与後 2 日と同様に雌雄とも $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上でみられ、程度も軽度であった。これに加えて、投与後 7 日の肝臓には肝細胞の軽度な腫大が肝小葉の中心域にみられた。この変化が認められる用量は、雄では $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌では $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量であり、雌においてはより低用量まで肝細胞の腫大が発生した。また、雌では、肝小葉の中心域にみられた単細胞壊死と線維化という肝細胞の傷害性変化が $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で発生し、雌の感受性が高いことが示された。このように、肝小葉の中心域が TBDD による影響を受けやすいことが示され、Ivens らの報告とも一致していた。さらに、雌雄とも $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ で肝細胞に細胞質内封入体が出現する所見については、Ivens らも $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ で同様の所見を見出し、空胞に赤血球が含まれているものと考察している。本研究で観察された細胞質内封入体は Ivens らの報告にある「エオジンに染まる物質を含む空胞」に相当する所見と考えられるが、封入体の大きさは赤血球より大きいものがあり、赤血球とは異なる物質であると推察した。血液生化学的検査では、雄では総コレステロールの増加が $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、総蛋白とアルブミンの増加が $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。雌では総コレステロールとリン脂質の増加が $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、総蛋白の増加が $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。また、雌では GOT の増加が $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められ、特に $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ は顕著に高い値であり、病理組織学的検査の結果と同様に、TBDD による肝臓への傷害性変化は雌で感受性が高く、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ の用量まで肝臓への傷害性変化があると推察された。

投与後 36 日には、高用量の TBDD を投与された動物に、顕著な病理組織学的変化や血液生化学的検査パラメーターの変化が認められた。臓器重量の増加が認められる用量は、雄は $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌は $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上になり、低濃度での重量増加がみられなくなった。これに対し、病理組織学的には肝細胞の軽度な好塩基性化と腫大が雌雄とも $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。これに加えて、雌には中心性の線維化が $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、肝細胞の多核化が $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上でみられ、 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ は生存動物と死亡動物に肝細胞の配列異常等、顕著な変化が認められた。また、死亡動物には peliosis や炎症細胞の浸潤も観察された。雄は、 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ の 1 匹に肝細胞の配列異常や中心性の線維化がみられたただけであった。雌は、投与後 7 日でも GOT の増加が $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上でみられ、この用量まで肝臓に傷害性の変化があると推察したが、中心性の線維化はこの時期には $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量でのみ観察された。投与後 36 日では中心性の線維化が $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で多くの動物に観察されており、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で肝臓の傷害性の変化が起きることが病理組織学的にも確認された。Ivens らは、TBDD の単回投与の報告で、peliosis の前段階と考えられる類洞の拡張が、雄の $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量でみられたと記載している。本研究でも $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ で雌の死亡動物に peliosis の発生が認められており、Ivens らの記載が確認された。さらに、本研究では、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上に肝細胞の多核化、 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ では肝細胞の配列異常が発生することを見出した。特に配列異常が顕著な部位では肝細胞が管状に配列する像が観察されており、肝臓

の基本的な構築から逸脱していた。肝細胞の多核化や配列異常の所見は TBDD による肝細胞の傷害では再生した肝細胞に正常とは異なるものが出現している可能性を示唆するものであり、TBDD の肝臓への影響を評価する上で注目する必要がある変化と考えた。血液生化学的検査パラメーターについては、総コレステロールとリン脂質の増加が、雄では $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上、雌では $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。また、病理組織検査で肝臓に顕著な変化が観察された雄 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ の 1 匹で GOT、GPT、ALP 及び γ -GTP が高い値を示した。雌では GOT の増加が $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。

E. 結論

TBDD の単回経口投与により、雌 $300\mu\text{g}/\text{kg}$ の 3 匹が観察期間の後期に死亡し、それらには体重減少と健康状態の悪化がみられた。生存動物では、投与後 4 日以降、雄の $100, 300\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び雌の $30, 100, 300\mu\text{g}/\text{kg}$ で投与量に対応した体重増加の抑制がみられたが、一般状態への影響はみられなかった。

血液系への影響として、血小板と骨髄での造血低下が投与後 7 日からみられ、36 日には赤血球と白血球も減少した。血小板の減少は顕著であり、死亡動物にみられた脳や脊髄などの出血の原因となった可能性がある。また、血液系への影響の主因は骨髄での造血低下であると考察した。血液系への影響は雌雄とも $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で認められた。

免疫系臓器への影響として、胸腺に投与後 2 日から重量低下、7 日には皮質からのリンパ

球の消失や核崩壊がみられた。胸腺への影響は雌雄とも $30\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量で認められた。また、白血球分類で好酸球比の低下が示された。

血清中のホルモン濃度 (TSH、T4、T3) の測定では、雄の T4 のみが低値を示した。

臓器中の誘導酵素 (AHH、ECOD、EROD) 量の測定では、各酵素量ともにすべての投与群で高値を示し、観察期間を通してその値は同じ範囲で継続した。

体内負荷量の測定では、肝臓中及び脂肪中の TBDD は雌雄共に投与量に対応した値を示した。それぞれの臓器中濃度を比較すると TBDD の肝臓中の濃度は脂肪中の濃度よりやや高い値を示したが、観察期間終了後では脂肪中の濃度が高かった。

肝臓には臓器重量の増加、病理組織学的変化及び血液生化学的検査パラメーターの変化がみられた。TBDD 投与後 2 日後から臓器重量の増加と肝細胞の軽度な好塩基性化、総コレステロールの増加が認められた。投与後 7 日には、より明瞭な病理組織学的変化 (肝細胞の腫大、細胞質内封入体の出現、雌では単細胞壊死と線維化) や血液生化学的検査パラメーターの変化 (リン脂質、総蛋白の増加、雌では GOT の増加) がみられた。さらに、投与後 36 日には肝細胞の配列異常や多核化が主に雌の $300\mu\text{g}/\text{kg}$ に発生した。肝臓への影響は雌雄とも $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で認められた。

生殖系臓器 (精巣、精巣上体、卵巣、子宮、膣及び乳房) や腎臓への影響は認められなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

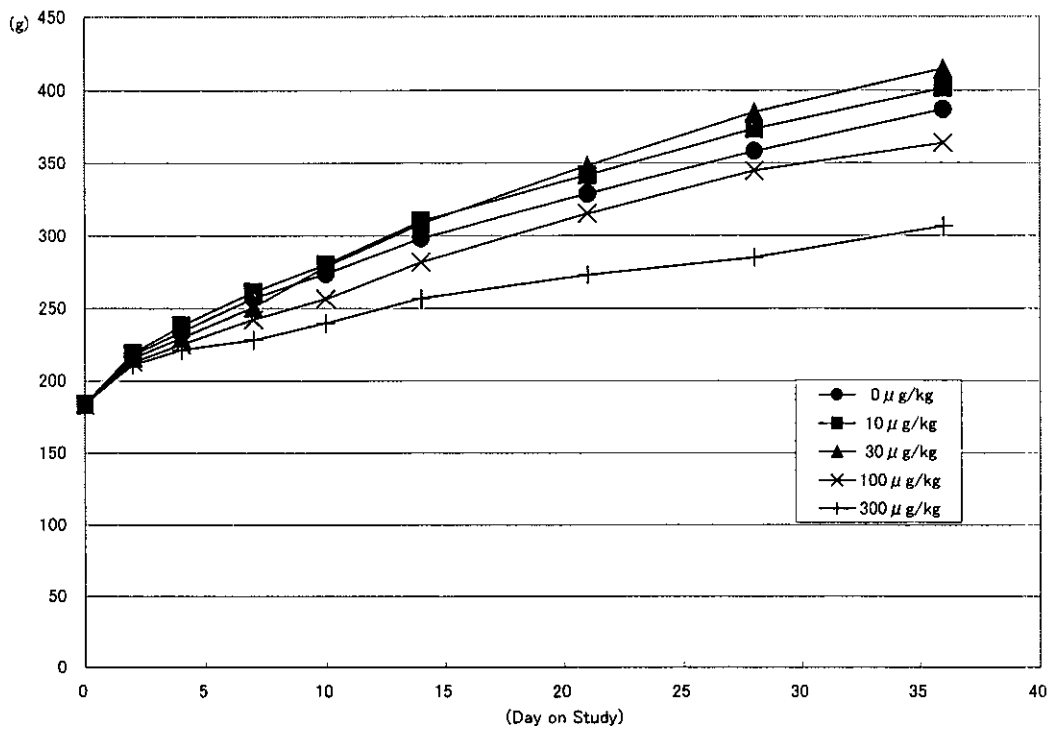
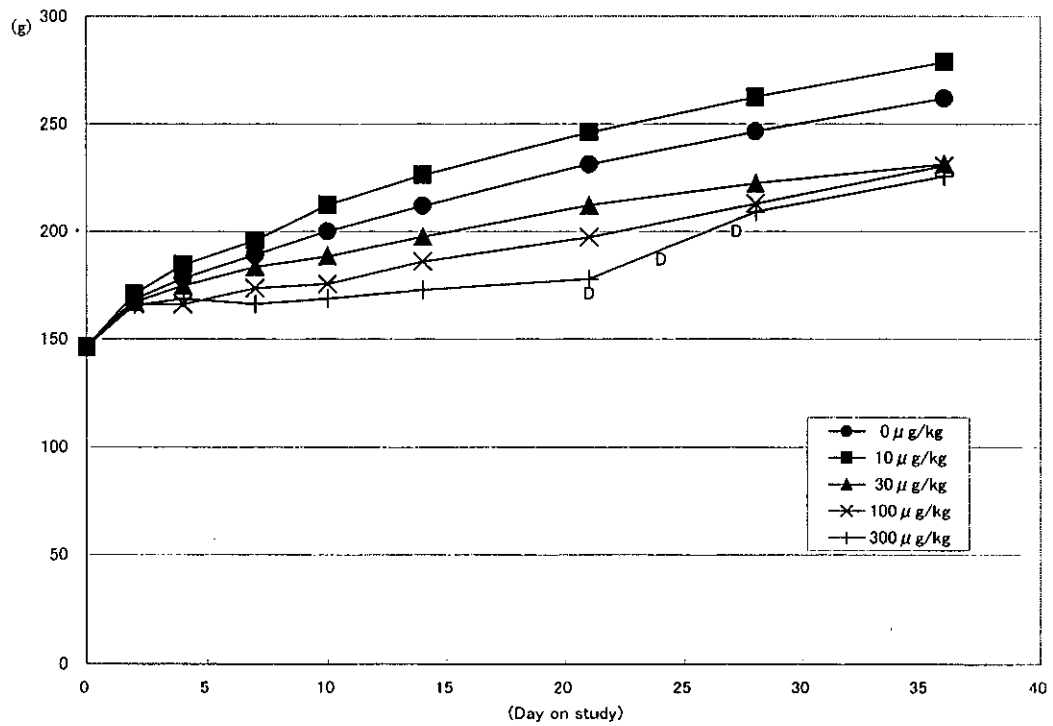


図 1 体重の推移(雄)



D は動物の死亡を示す

図 2 体重の推移(雌)

表 1 生死狀況、一般狀態 (雄)

Items		Male				
		0(control)	10 μ g/kg	30 μ g/kg	100 μ g/kg	300 μ g/kg
Dead Animals	0-2d	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Numbers	2-7d	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	7-36d	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Survival Animals	0-2d	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
Numbers	2-7d	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	7-36d	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5
Clinical Signs		none	none	none	none	none

表2 生死狀況、一般狀態 (雌)

Items		Female				
		0(control)	10 μ g/kg	30 μ g/kg	100 μ g/kg	300 μ g/kg
Dead Animals	0-2d	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
Numbers	2-7d	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
	7-36d	0/5	0/5	0/5	0/5	3/5
Clinical Signs					死後発見(21d)←	2413
					立毛,自発運動減少,貧血(21d)、死後発見(23d)←	2415
					自発運動減少,呼吸緩除(26d)、死後発見(27d)←	2412
Survival Animals	0-2d	15/15	15/15	15/15	15/15	15/15
Numbers	2-7d	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
	7-36d	5/5	5/5	5/5	5/5	2/5
Clinical Signs		none	none	none	none	none

表3 体重(雄)

Experimental date	Male					
	0(control)	10 μ g/kg	30 μ g/kg	100 μ g/kg	300 μ g/kg	
	g (n): %	g (n): %	g (n): %	g (n): %	g (n): %	
0d	183 (15): 100	183 (15): 100	183 (15): 100	183 (15): 100	183 (15): 100	
2d	217 (15): 100	219 (15): 101	215 (15): 99	213 (15): 98	211 (15): 97	
4d	234 (10): 100	238 (10): 102	229 (10): 99	225 (10): 96	221 (10): 94	
7d	257 (10): 100	261 (10): 102	250 (10): 97	242 (10): 94	228 (10): 89	**
10d	274 (5): 100	280 (5): 102	278 (5): 101	256 (5): 93	240 (5): 88	**
14d	298 (5): 100	310 (5): 104	308 (5): 103	282 (5): 95	257 (5): 86	*
21d	329 (5): 100	341 (5): 104	348 (5): 106	315 (5): 96	273 (5): 83	*
28d	358 (5): 100	373 (5): 104	385 (5): 108	344 (5): 96	285 (5): 80	**
36d	387 (5): 100	401 (5): 104	414 (5): 107	364 (5): 94	306 (5): 79	**

(Significant difference on the test of Dunnett, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

表4 体重(雌)

Experimental date	Female					
	0(control)	10 μ g/kg	30 μ g/kg	100 μ g/kg	300 μ g/kg	
	g (n): %	g (n): %	g (n): %	g (n): %	g n %	
0d	146 (15): 100	146 (15): 100	146 (15): 100	146 (15): 100	146 (15): 100	
2d	168 (15): 100	171 (15): 102	167 (15): 99	166 (15): 99	166 (15): 99	
4d	178 (10): 100	185 (10): 104	175 (10): 98	166 (10): 93	169 (10): 95	*
7d	189 (10): 100	196 (10): 104	183 (10): 97	174 (10): 92	166 (10): 88	**
10d	200 (5): 100	212 (5): 106	189 (5): 95	176 (5): 88	169 (5): 85	**
14d	212 (5): 100	226 (5): 107	197 (5): 93	186 (5): 88	173 (5): 82	**
21d	231 (5): 100	246 (5): 106	212 (5): 92	197 (5): 85	178 (4): 77	**
28d	247 (5): 100	262 (5): 106	222 (5): 90	213 (5): 86	209 (2): 85	a)
36d	262 (5): 100	279 (5): 106	231 (5): 88	230 (5): 88	226 (2): 86	a)

(Significant difference on the test of Dunnett, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)

a) : Number of animals is 2. Statistical analysis was not applied.

表5 血液学的検査(雄)

Items of Examination	Male				
	0(control)	10 μ g/kg	30 μ g/kg	100 μ g/kg	300 μ g/kg
No.of samples 2d	5	5	5	5	5
No.of samples 7d	5	5	5	5	5
No.of samples 36d	5	5	5	5	5
Red blood cell($10^6/\mu$ L) 2d	6.05 \pm 0.23	6.16 \pm 0.14	6.45 \pm 0.45	6.53 \pm 0.53	6.35 \pm 0.63
7d	6.63 \pm 0.25	6.50 \pm 0.46	6.31 \pm 0.40	6.49 \pm 0.26	6.94 \pm 0.65
36d	8.19 \pm 0.49	8.12 \pm 0.46	7.66 \pm 0.24	7.03 \pm 0.80	5.84 \pm 1.25 **
Hemoglobin (g/dL)2d	12.9 \pm 0.4	13.1 \pm 0.3	13.6 \pm 0.5	13.5 \pm 0.7	13.3 \pm 0.7
7d	13.7 \pm 0.2	13.5 \pm 0.7	12.9 \pm 0.6	13.0 \pm 0.4	14.1 \pm 1.4
36d	14.9 \pm 0.7	15.0 \pm 0.4	13.8 \pm 0.7 *	12.5 \pm 1.0 **	10.3 \pm 2.3 **
Hematocrit (%)2d	37.1 \pm 1.2	38.1 \pm 1.0	39.5 \pm 2.7	39.8 \pm 2.7	38.9 \pm 2.5
7d	40.4 \pm 0.7	40.2 \pm 2.2	37.5 \pm 1.9	38.3 \pm 1.7	41.1 \pm 4.1
36d	42.6 \pm 1.9	43.7 \pm 1.9	39.4 \pm 1.3	36.7 \pm 2.9 *	30.8 \pm 6.0 **
MCV (fL)2d	61.4 \pm 2.0	61.9 \pm 1.4	61.3 \pm 0.5	61.0 \pm 1.2	61.4 \pm 2.9
7d	61.0 \pm 1.6	61.8 \pm 1.5	59.5 \pm 1.3	58.9 \pm 1.8	59.3 \pm 2.4
36d	52.0 \pm 1.9	53.9 \pm 1.0	51.5 \pm 2.5	52.4 \pm 2.0	53.0 \pm 2.9
MCH (pg)2d	21.3 \pm 0.6	21.3 \pm 0.4	21.2 \pm 0.9	20.7 \pm 1.0	21.1 \pm 1.4
7d	20.7 \pm 0.6	20.8 \pm 0.8	20.4 \pm 0.5	20.1 \pm 0.3	20.4 \pm 0.9
36d	18.3 \pm 0.4	18.5 \pm 0.5	17.9 \pm 1.0	17.9 \pm 0.5	17.6 \pm 1.2
MCHC (g/dL)2d	34.7 \pm 0.7	34.3 \pm 1.0	34.5 \pm 1.4	34.0 \pm 1.1	34.3 \pm 0.8
7d	33.9 \pm 0.2	33.6 \pm 0.5	34.3 \pm 0.3	34.1 \pm 0.7	34.3 \pm 0.3
36d	35.1 \pm 0.8	34.4 \pm 0.6	34.8 \pm 0.8	34.1 \pm 0.5	33.2 \pm 1.4 **
Platlet ($10^3/\mu$ L)2d	1326 \pm 131	1284 \pm 157	1293 \pm 153	1180 \pm 69	1297 \pm 115
7d	1298 \pm 123	1410 \pm 62	1260 \pm 93	907 \pm 251 **	828 \pm 166
36d	1140 \pm 211	1106 \pm 178	1123 \pm 176	907 \pm 330	510 \pm 339 **
Reticulocyte(%)2d	3.46 \pm 0.52	3.38 \pm 0.81	3.18 \pm 0.29	2.98 \pm 0.36	2.92 \pm 0.36
7d	5.72 \pm 0.79	6.02 \pm 0.54	4.00 \pm 0.82 **	2.86 \pm 0.54 **	2.32 \pm 0.92
36d	2.46 \pm 0.24	2.94 \pm 0.40	2.92 \pm 0.30	5.00 \pm 1.35 **	8.08 \pm 5.47 **

(Significant difference on the test of Dunnett, *: p<0.05, **: p<0.01)