

TABLE 18 Liver Enzyme Activities in PND 21 Pups from Dams Exposed to TBDD on Day 8 of Gestation

	Dose ( $\mu\text{g}/\text{kg b w}$ )		
	0 (Control)	1	10
<b>Male Pups</b>			
No of pups examined	8	8	7
microsomal protein (mg protein/g liver)	25.5 $\pm$ 3.2	25.6 $\pm$ 4.0	28.0 $\pm$ 4.0
ECOD (nmol/mg protein/min)	1.31 $\pm$ 0.11	2.47 $\pm$ 0.46 **	8.63 $\pm$ 1.81 **
EROD (nmol/mg protein/min)	0.10 $\pm$ 0.02	0.79 $\pm$ 0.26 **	2.51 $\pm$ 1.02 **
AHH (nmol/mg protein/min)	0.10 $\pm$ 0.03	0.27 $\pm$ 0.07 **	0.88 $\pm$ 0.08 **
UDPGT (nmol/mg protein/min)	11.0 $\pm$ 2.4	19.5 $\pm$ 4.4 **	128.0 $\pm$ 18.9 **
<b>Female Pups</b>			
No of pups examined	8	8	7
microsomal protein (mg protein/g liver)	20.4 $\pm$ 3.4	22.7 $\pm$ 2.1	27.2 $\pm$ 2.9 **
ECOD (nmol/mg protein/min)	1.35 $\pm$ 0.16	2.31 $\pm$ 0.44 **	9.07 $\pm$ 1.16 **
EROD (nmol/mg protein/min)	0.24 $\pm$ 0.07	1.14 $\pm$ 0.33 **	3.83 $\pm$ 0.85 **
AHH (nmol/mg protein/min)	0.07 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.08 **	0.81 $\pm$ 0.05 **
UDPGT (nmol/mg protein/min)	12.3 $\pm$ 2.4	19.2 $\pm$ 5.4 **	129.7 $\pm$ 19.3 **

Data represent mean  $\pm$  S D

\* Significantly different from control,  $p \leq 0.05$

\*\* Significantly different from control,  $p \leq 0.01$

TABLE 19 Concentrations of TBDD in Liver and Adipose Tissue of Virgin Females and Pregnant/Lactated Females Exposed to 10µg/kg b w TBDD

	Tissue concentration (ng/kg tissue) of TBDD		Liver / Adipose ratio
	Liver	Adipose	
Virgin females			
No of animals examined	3	3	
Days after exposure			
2	32.3 ± 2.9	7.7 ± 0.9	4.19
12	16.0 ± 3.0	20.3 ± 2.5	0.79
35	5.4 ± 0.5	10.4 ± 1.4	0.52
Pregnant / Lactated females			
No of animals examined	3	3	
Days after exposure			
2 (Day 10 of gestation)	29.3 ± 6.7	7.8 ± 1.2	3.76
12 (Day 20 of gestation)	3.0 ± 0.4	10.3 ± 0.6	0.29
35 (Day 21 of lactation)	0.3 ± 0.1	8.4 ± 0.8	0.04

Data of tissue concentration of TBDD represent mean ± S D

TABLE 20 Concentrations of TBDD in Fetuses and Fetal Livers from Dams Exposed to TBDD on Day 8 of Gestation

Maternal dose of TBDD ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ )	Tissue concentration (ng/kg tissue) of TBDD		Liver / Whole ratio
	Liver (pooled)	Whole fetus	
1	0.0098 $\pm$ 0.0013 (3)	0.0118 $\pm$ 0.0045 (3)	0.83
10	0.1400 $\pm$ 0.0200 (3)	0.0947 $\pm$ 0.0155 (3)	1.48
100	7.4 <sup>a)</sup> (2)	1.2367 $\pm$ 0.6458 (3)	5.98

Data represent mean  $\pm$  S.D.

Parentheses indicate the number of litters

<sup>a)</sup> Data indicate mean value (5.0 and 9.8, individually)

TABLE 21 Concentrations of TBDD in Milk and Livers of 21 day old Pups from Dams Exposed to TBDD on Day 8 of Gestation

		Tissue concentration (ng/kg tissue) of TBDD	
Milk in day 4 of lactation			
Maternal dose ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ )			
	10	$2.3 \pm 0.2$	(6)
Liver of 21 day old pup			
Maternal dose ( $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ )			
1	Male	$0.26 \pm 0.10$	(3)
	Female	$0.23 \pm 0.12$	(3)
10	Male	$7.93 \pm 0.51$	(3)
	Female	$6.93 \pm 0.67$	(3)

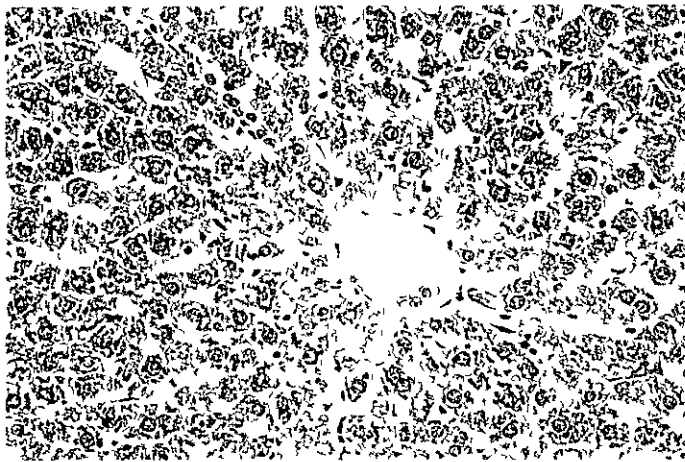


写真 1  
対照群，母動物，肝臓（HE 染色）

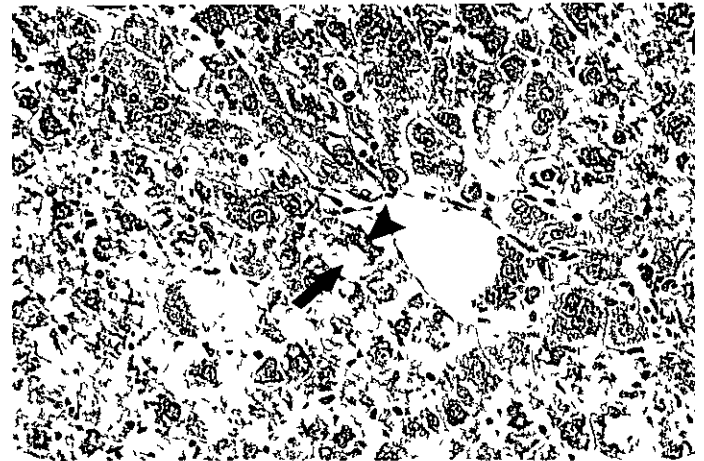


写真 2  
100 μg/kg 群，母動物，肝臓  
肝細胞の好塩基性変化（矢頭）と  
空胞化（矢印）（HE 染色）

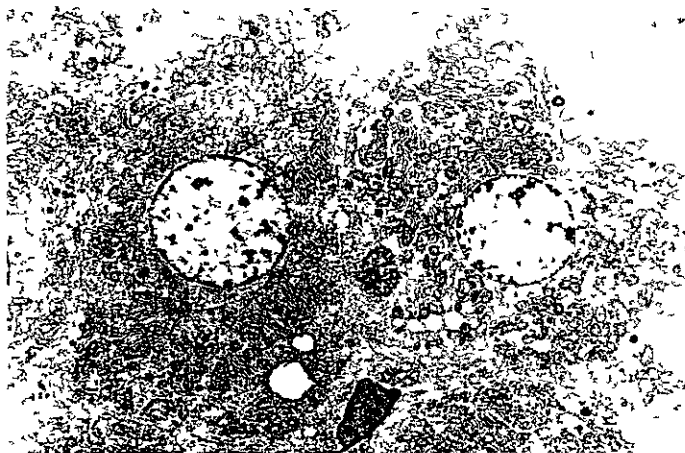


写真 3  
対照群，母動物，肝細胞（透過型電顕像 ×3000）

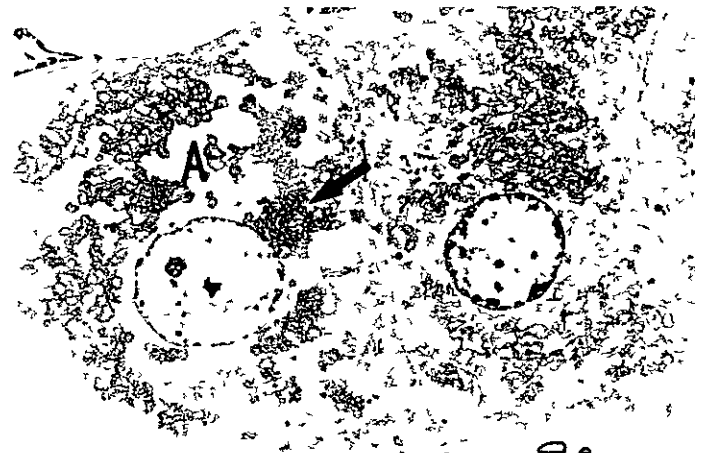


写真 4  
100 μg/kg 群，母動物，肝細胞（透過型電顕像 ×3000）  
粗面小胞体の凝集（矢印）と細胞内小器官密度の低い  
領域（A）の増加

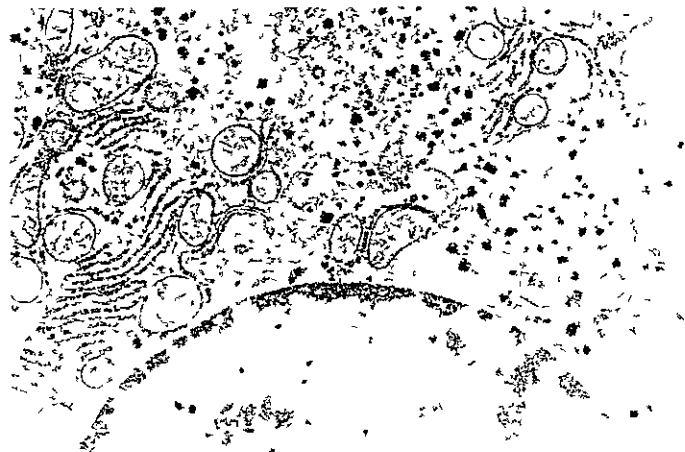


写真 5  
対照群 母動物，肝細胞（透過型電顕像，×14000）

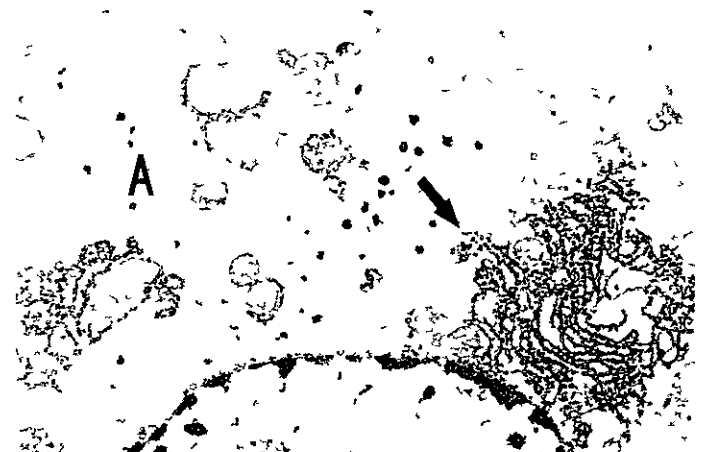


写真 6  
100 μg/kg 群，母動物，肝細胞（透過型電顕像，×14000）  
粗面小胞体の凝集（矢印）と細胞内小器官密度の低い  
領域（A）の増加

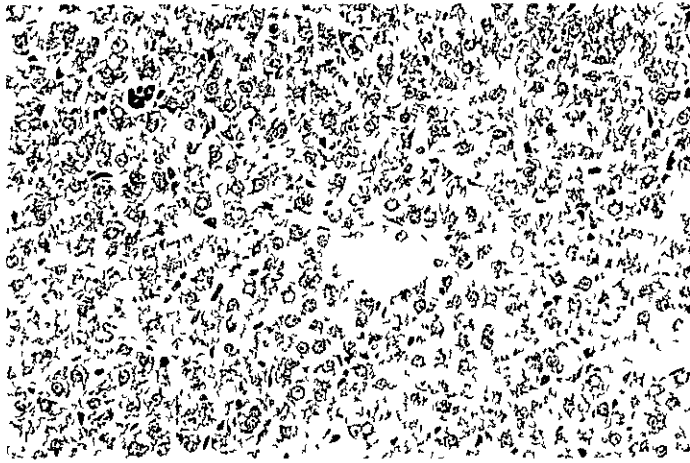


写真 7  
対照群 生後21 齡児 雄， 肝臓 (HE 染色)

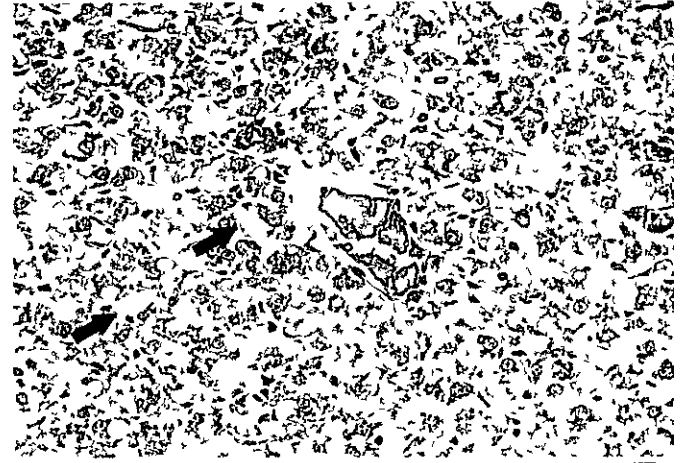


写真 8  
100 μg/kg 群， 生後21 齡児 雄， 肝臓  
肝細胞の空胞変性 (矢印) (HE 染色)

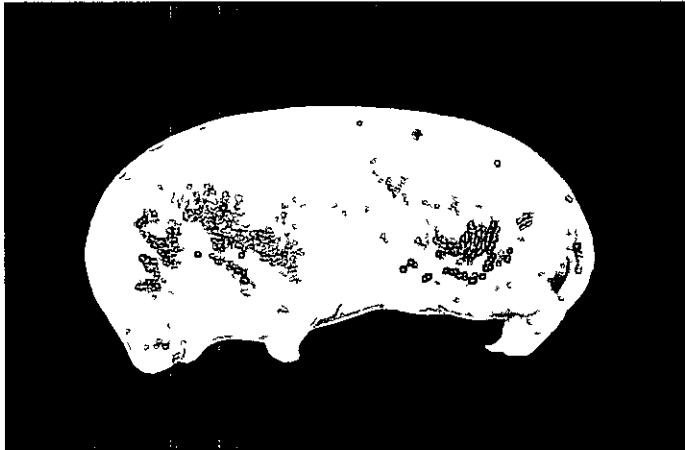


写真 9  
100 μg/kg 群， 胎児  
全身性浮腫



写真 10  
100 μg/kg 群 胎児 上顎  
口蓋裂 (矢印)



写真 11  
100 μg/kg 群， 胎児， 腎臓  
水腎症 拡張した腎盂 (P)



写真 12 (心尖寄り心底で横断 左心室壁は切除)  
100 μg/kg 群， 胎児， 心臓  
心室中隔欠損 (矢印) 心室中隔 (S) 右心室 (V)，  
大動脈 (A)， 肺動脈 (P)

## II 経気道投与技術の開発・検討

### A 研究目的

臭素化タイオキシ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、臭素化ダイオキシシン類の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）を評価するための研究を3年計画で行う。

動物への吸入暴露代替法として、少量の被験物質を安全且つ効率的に暴露するための経気道投与法の開発 検討を行う。この経気道投与法では、体内負荷量の算出に際し、全身暴露法では推定値としてしか得られない投与量を正確に把握することが出来る。

前年度は、TBDDの経気道投与に用いる動物種及び投与方法・器材の選定等を目的とした投与技術の基礎的検討を行い、1) 動物種は、ラットを選定し、2) 麻酔法は イソフルランを使用した吸入麻酔法が有効であり、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との結論を得た。

これに基づき本年度は、経気道投与に用いる媒体、投与回数、投与量の検討を行い、その結果に基づいた投与方法で、色素を投与して被験物質の肺内における拡散 分布状況を確認した。

### B 研究方法

#### 1 使用動物

動物は、BirHan WIST@Jcl(GALAS)ラット雄を日本クレア株式会社から購入し、15～17週齢で使用した。

#### 2 麻酔方法

イソフルラン吸入麻酔法によった。

小動物用吸入麻酔器（株イソハン、TK-4）を使用し、イソフルラン（株ダイナボット、吸入麻酔剤フォーレン）を動物の正向反射および接触反応が消失するまで吸入させた。

#### 3 投与方法及び投与器材

液体気管内噴霧法で動物の気管内に投与した。

##### ① 器材

・液体気管内投与器具（株イナリサーチ、マイクロスプレーヤー）

液体用スプレー管（株イナリサーチ）

② ①の器材を使用し、気管内に媒体を含む溶液を噴霧した。

#### 4 媒体の選択と検討

TBDDは水に不溶のため、TBDDを溶解するための媒体の選択、およびその溶液と水とを懸濁するための界面活性剤(Tween80)の混合率の検討を行った。媒体は本年まで経口投与に使用したトルエン及び比較的毒性の低いエタノールを比較した。

#### 5 投与回数及び投与量の検討

投与回数は1日1回投与で、単回、隔日3日(合計3回)、3日間連続(合計3回)の3種類とした。

投与量は1日1回、隔日3日(合計3回)で体重1kg当たり0.5mL及び1.0mLとした。

#### 6 肺内における拡散状況の確認

青色色素(アルシアンブルー)を添加した投与液を動物に投与し、約 60 分後に肺を摘出し確認した。

### (倫理面への配慮)

本研究は、実験動物の適正な取扱いの観点から、当センターの「動物実験に関する指針」に基づき試験を実施した。

## C 研究結果

### 1 媒体、投与量、投与回数を選択

#### (1)媒体の選択

トルエンと界面活性剤(Tween80)を 1:1 に混合した溶液を、水でトルエンが所定濃度になるように希釈した調製液を使用した。トルエン 20% 溶液(水:トルエン:Tween80=3:1:1)を体重 1kg 当たり 0.5mL で動物に 1 回投与した結果、投与直後に動物は死亡したため、次にトルエン濃度を 14% (同 5:1:1)に下げて投与したが、20% 溶液同様に動物は死亡した。以降、同様に濃度を順次下げて 10% 溶液(同 8:1:1)、5% 溶液(同 18:1:1)を投与したが、いずれのトルエン濃度においても動物は死亡した。

一方、トルエンと同様にエタノールと界面活性剤(Tween80)を 1:1 に混合した溶液を、水でエタノールが 20% 溶液(水:エタノール:Tween80=3:1:1)になるように希釈した調製液を使用し、体重 1kg 当たり 0.5mL で動物に 1 回投与した結果、1 週間後まで動物の死亡はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。また 投与後の体重に低下はみられず、1 週間後の体重は投与開始時の 102~104% を示した(Table 1)。さらに 肺の剖検で異常は認められなかった。

#### (2) 投与量及び投与回数検討

投与回数 エタノール 20% 溶液(水:エタノール

トル Tween80=3:1:1)を体重 1kg 当たり 0.5mL で単回投与した結果、動物に全く異常は認められなかった(前項、媒体の選択を参照)。また 20% 溶液を体重 1kg 当たり 0.5mL で隔日 3 日(合計 3 回)投与した結果、動物の死亡はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。3 回投与後の体重は投与開始時の 97~99% を示した(Table 2)。さらに、肺の剖検で異常は認められなかった(写真 1)。さらに、20% 溶液を体重 1kg 当たり 0.5mL で動物に、3 日間連続(合計 3 回)投与した結果、動物の死亡はみられず、一般状態にも異常は認められなかった。3 回の投与後の体重は投与開始時の 96~98% を示した(Table 3)。なお、肺の剖検で異常は認められなかった。

投与量 エタノール 20% 溶液(水:エタノール Tween80=3:1:1)を体重 1kg 当たり 0.5 mL 及び 1.0mL で動物に隔日 3 日(合計 3 回)投与した。その結果、0.5 mL では前述したように動物に異常は全く認められなかった。一方、1.0mL 投与では 1 回の投与後から全動物(4 匹)に不整呼吸がみられ、2 匹の動物では投与 1 日後に死亡した。3 回の投与後まで生存した 2 匹の動物では、不整呼吸が継続してみられ、体重は投与開始時の 93~95% を示した(Table 4)。なお、肺の剖検で全葉に赤色斑が認められた(写真 2)。

### 2 拡散 分布状況の確認

青色色素(アルシアンブルー)を添加したエタノール 20% 溶液(水:エタノール Tween80=3:1:1)を体重 1kg 当たり 0.5mL で動物に 1 回投与した。投与後 60 分に肺を摘出し、肉眼的に肺の状態を観察した。その結果、肺全葉にアルシアンブルーの沈着を示す青色斑が観察され、液体が肺内に投与されたことが確認された。また青色斑は肺各葉にひまん性に認められたことから、投与された液体は肺内に拡散され、分布に偏りは少なかった(写真 3、4)。



## D 考察

トルエンは 20% 溶液(水 トルエン Tween80=3 1 1)で動物が投与直後に死亡したことから、順次トルエン濃度を下げて投与したが、5% 溶液(水 トルエン Tween80=18 1 1)でも動物の死亡がみられたため、トルエンは気管内投与溶液の媒体には使用できないと判断した。

一方、エタノールは 20% 溶液(水 エタノール Tween80= 3 1 1)を体重 1kg 当り 0.5mL で 1 回投与した結果、動物は 1 週間以上生存し、一般状態に異常はみられず、体重も増加し、肺の剖検で異常が認められなかったことから、気管内投与溶液の媒体として使用可能と考えた。

エタノールの投与回数は、単回投与、隔日 3 日(合計 3 回)投与及び 3 日間連続(合計 3 回)投与ともに動物の死亡はみられず、体重の推移に差はなく、一般状態にも異常は認められず、さらに肺の剖検でも異常は認められなかった。このことから、投与溶液の投与回数は単回、隔日 3 回及び連日 3 回のいずれも可能と考えた。

エタノールの投与量は、20% 溶液(水 エタノール Tween80=3 1 1)を 1 日 1 回、体重 1kg 当り 1mL を投与した結果、動物に死亡がみられたのに対して、体重 1kg 当り 0.5mL では死亡はみられず、体重抑制が軽度なことから 1 日 1 回、体重 1kg 当り 0.5mL が適切と考えた。

投与物質の拡散 分布状況を検討するため、青色色素を添加したエタノール 20% 溶液を投与した結果、肺の各葉に青色斑が認められ 分布に偏りも少なかったことから、溶液が適切に投与されたと考えた。

## E 結論

TBDD の経気道投与法を検討した結果、以下の結論が得られた。

- 1)液体気管内噴霧法により、被験物質は肺に適切に投与され、各葉へ拡散 分布する。
- 2)媒体は、エタノールが適切であると判断し、投与溶液のエタノール濃度は 20%とする。
- 3)投与量は 1 日 1 回、体重 1kg 当たり 0.5mL が適切である。
- 4)次年度実施試験の投与量に対応して、投与回数は単回、隔日 3 回及び連日 3 回のいずれも選択可能である。

## 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

Table 1 気管内投与による体重の変化

水 エタノール Tween80=3 1 1, 単回投与  
投与量 0.5mL/kg 体重

日数	投与日	体重g (指数)	
		動物番号 5016	動物番号 5019
0	投与	415 g ( 100 )	410 g ( 100 )
1	---	415 g ( 100 )	412 g ( 100 )
2	---	410 g ( 99 )	413 g ( 101 )
7	---	422 g ( 102 )	425 g ( 104 )

Table 2 気管内投与による体重の変化

水 エタノール Tween80=3 1 1, 隔日3日(合計3回)投与  
投与量 0.5mL/kg・体重

日数	投与日	体重g (指数)			
		動物番号 5022	動物番号 5023	動物番号 5024	動物番号 5025
0	投与	417 g ( 100 )	445 g ( 100 )	395 g ( 100 )	401 g ( 100 )
1	---	424 g ( 102 )	433 g ( 97 )	389 g ( 98 )	388 g ( 97 )
2	投与	421 g ( 101 )	432 g ( 97 )	390 g ( 99 )	394 g ( 98 )
3	---	415 g ( 100 )	429 g ( 96 )	391 g ( 99 )	392 g ( 98 )
4	投与	411 g ( 99 )	433 g ( 97 )	389 g ( 98 )	393 g ( 98 )
5	---	409 g ( 98 )	431 g ( 97 )	388 g ( 98 )	396 g ( 99 )

Table 3 気管内投与による体重の変化

水 エタノール Tween80=3 1 1 3日間連続 (合計3回) 投与  
投与量 0.5mL/kg 体重

日数	投与日	体重g (指数)			
		動物番号 5030	動物番号 5031	動物番号 5032	動物番号 5033
0	投与	424 g ( 100 )	385 g ( 100 )	460 g ( 100 )	414 g ( 100 )
1	投与	417 g ( 98 )	387 g ( 101 )	437 g ( 95 )	409 g ( 99 )
2	投与	409 g ( 96 )	384 g ( 100 )	432 g ( 94 )	402 g ( 97 )
3	---	410 g ( 97 )	379 g ( 98 )	440 g ( 96 )	402 g ( 97 )

Table 4 気管内投与による体重の変化

水 エタノール Tween80=3 1 1, 隔日3日(合計3回)投与  
投与量 1mL/Kg BW

日数	投与日	体重g (指数)			
		動物番号 5026	動物番号 5027	動物番号 5028	動物番号 5029
0	投与	436 g ( 100 )	447 g ( 100 )	393 g ( 100 )	361 g ( 100 )
1	---	416 g ( 95 )	447 g ( 100 )	378 g ( 96 )	341 g ( 94 )
2	投与	Dead	Dead	379 g ( 96 )	339 g ( 94 )
3	---			375 g ( 95 )	334 g ( 93 )
4	投与			375 g ( 95 )	342 g ( 95 )
5	---			375 g ( 95 )	337 g ( 93 )

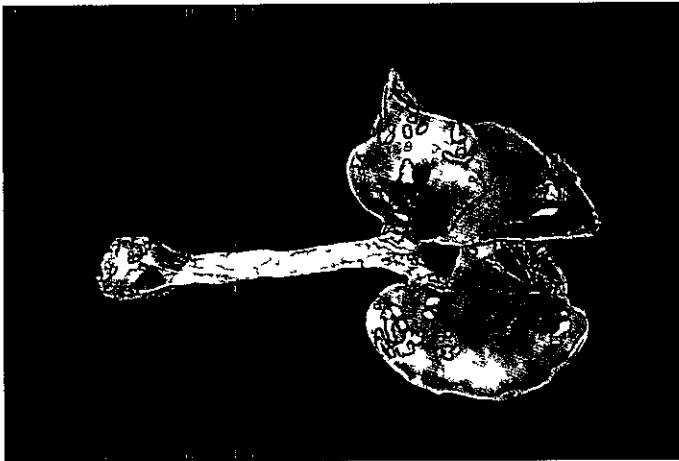


写真 1  
 エタノール20%溶液(水 エタノール Tween80=3 1 1)  
 0.5mL/kg BW, 隔日3日(3回)投与

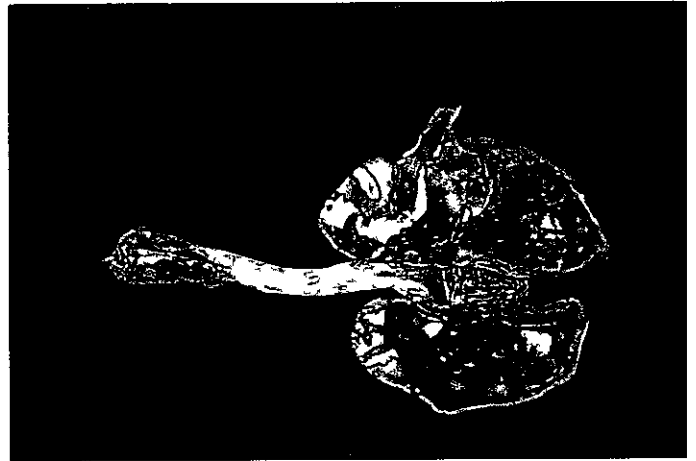


写真 2  
 エタノール20%溶液(水 エタノール Tween80=3 1 1)  
 1mL/kg BW, 隔日3日(3回)投与  
 肺(背側), 赤色斑

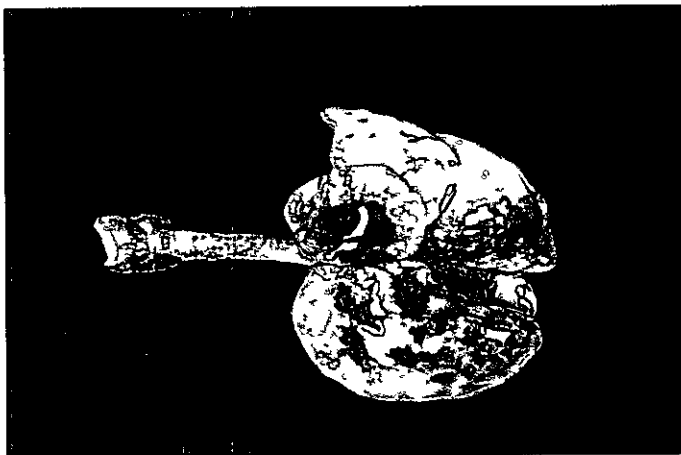


写真 3  
 エタノール20%溶液(水 エタノール Tween80=3 1 1)  
 アルコブール添加 0.5mL/kg BW 単回投与  
 肺(背側), アルコブールがびまん性に沈着

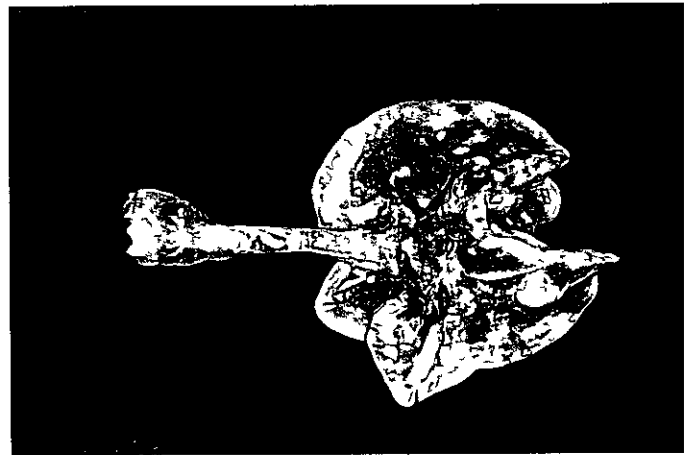


写真 4  
 エタノール20%溶液(水 エタノール Tween80=3 1 1)  
 アルコブール添加, 0.5mL/kg BW, 単回投与  
 肺(腹側), アルコブールがびまん性に沈着