

厚生労働科学研究費補助金
労働安全衛生総合研究事業

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～平成16年度 総合研究報告書

主任研究者 山本 静護

平成17(2005)年3月

I. 総合研究報告

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

厚生労働科学研究費補助金（労働安全衛生総合研究事業）
（総合）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

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）、および（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、次の研究を実施した。

（Ⅰ）単回経口投与による毒性および体内負荷量に関する研究（平成 14 年度）

（Ⅱ）生殖発生毒性に関する研究（平成 15 年度）

（Ⅲ）経気道投与による毒性および体内負荷量に関する研究（平成 16 年度）

（Ⅰ）単回経口投与による毒性および体内負荷量に関する研究

2,3,7,8-四臭化ジベンゾ-パラ-ジオキシン（以下、TBDD）を Crj:Wistar ラット雌雄に 300、100、30、10 および 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （対照群：溶媒のみ）単回強制経口投与し、投与後 2 日、7 日および 36 日にそれぞれ 5 匹の動物を解剖し、その生体影響および体内負荷量を経時的に検索した。その結果、(1)胸腺、肝臓および脾臓への臓器毒性が明らかとなり、過去の報告 (Ivens ら 1992 年) とも良く一致していた。さらに、(2) TBDD の生体影響の新たな知見として、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、および③ 1 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が明らかとなった。

（Ⅱ）生殖発生毒性に関する研究

TBDD を親動物（妊娠 8 日の母動物）に 100、10、1 および 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ （対照群：溶媒のみ）単回強制経口投与し、母動物、胎児および出生児への影響と TBDD の親と児への体内負荷量を検索した。その結果、①母動物には、体重増加の抑制、血小板数の減少、肝組織変化、死産等、②胎児には全身浮腫、子宮内死亡、胎児重量と胎盤重量の低下、外表および内臓奇形（全身性浮腫、口蓋裂、水腎症および心室中隔欠損）、骨格変異や骨化の遅延、内臓変異等、③出生児には、上顎切歯の萌出と眼瞼開裂の早期化、血液学的パラメーターの低下、甲状腺ホルモン(T4)の低下と甲状腺刺激ホルモンの増加、肝臓中の誘導酵素群の増加、肝細胞質の空胞化、前立腺重量の低下等が認められた。さらに、④TBDD 体内負荷量測定の結果、TBDD の胎盤移行と乳汁移行が確認された。これらの所見はいずれも従来全く報告されていない新知見であり、臭素化ダイオキシンには、塩素化ダイオキシン類と類似した生体影響があることが初めて見出された。

(Ⅲ) 経気道投与による毒性および体内負荷量に関する研究

動物への吸入暴露代替法としての経気道投与技術を用いて、臭素化ダイオキシンの単回気管内投与毒性に関する研究を行った。すなわち、TBDD を Crj:Wistar ラット雌雄に 1.2、0.455 および 0 μ g/kg (対照群：溶媒のみ) を一回気管内投与し、投与後 2 日および 7 日にそれぞれ 3 匹の動物を解剖し、その生体影響および体内負荷量を検索した。その結果、(1) 肝臓、脂肪の TBDD 濃度は投与後 2 日目では経口投与の結果と比較的よく一致した。(2) 肺の TBDD 濃度は 2 日と 7 日ともほぼ同じ値であり、その後の推移については、比較的長い期間肺に残留する可能性が考えられた。(3) 肝臓重量の増加が投与後 7 日に認められ、経口投与と類似した生体影響が認められた。以上から、TBDD の気管内投与による生体影響および体内負荷量の挙動は、経口投与のそれと類似していることが示唆された。

本研究で TBDD について得られた主な毒性データとこれまで報告されている TCDD の毒性データを比較して、下記の結論を得た。

- 1) TBDD によるラットの致死量は TCDD とほぼ同等であり、TCDD と同様に死亡までの期間が長いという特徴がみられた。死因については、TCDD では言及した報告がないが、TBDD による死因は血液凝固系の障害による出血死である可能性が示された。
- 2) 免疫系への影響として、TBDD は TCDD と同様に胸腺への影響が示されたが、影響のみられる用量は TCDD に比較して高かった。
- 3) 造血機能の抑制による血液系への影響がみられ、その用量は TCDD に近似していた。
- 4) 肝臓への影響として、肝臓重量の増加、肝ミクロゾーム酵素 (AHH、ECOD および EROD) の誘導が起き、これらの変化は発生する用量ともに TCDD と類似していた。また、病理組織学的変化も TCDD と同様にみられたが、TBDD は単回投与にもかかわらず、TCDD の長期間投与と類似した肝細胞の変化が認められた。
- 5) 妊娠動物への投与により、胎児の死亡、体重の低値、外表異常および内臓奇形が誘発され、TCDD の胎児への影響に類似していたが、ラットでは報告されていない口蓋裂や水腎症の発生もみられた。一方、TBDD を投与した母親から生まれた児には、身体発達の早期化、肝臓の空胞化および酵素 (AHH、ECOD、EROD および UDPGT) の上昇がみられ、TCDD の出生児への影響とは異なっていた。

結論として、TBDD の生体内挙動は気管内投与と経口投与で類似していた。また臓器毒性、生殖発生毒性は多くの点で TCDD に類似していたが、TCDD にはみられない影響も認められた。

A. 研究目的

電気製品、OA機器、建材等にはプラスチックが多用されているが、家電製品の発火事件以降、プラスチック製品に発火防止のため臭素系難燃剤が使用されるようになり、現在ではほとんどのプラスチック製品に難燃剤が入っている。臭素化ダイオキシン類は、これらのプラスチック製品廃棄処分時の燃焼、リサイクル過程での粉碎あるいは製造過程における加熱成型によって非意図的に生成するとされており、労働環境や一般環境の臭素化ダイオキシン類による汚染が社会的問題になっている。

また、ダイオキシン類対策特別措置法（平成11年7月16日、法律第105号）、附則の第2条において、臭素系ダイオキシンにつき、人の健康に対する影響の程度等に関する調査研究を推進し、その結果に基づき必要な措置を講ずるものとされており、それに本研究は資するものである。

臭素化ダイオキシン類による労働者の健康障害を防止する施策を効率的に行うためには、臭素化ダイオキシン類の毒性、特に1)労働現場における暴露形態に合わせた吸入経気道暴露による毒性および2)塩素化ダイオキシン類による毒性の中で最も感受性が高い生殖発生毒性を把握する必要がある。

そこで、これらの毒性を評価するためのデータを得ることを目的とし、以下の3つの研究を実施した。

- (I) 単回経口投与による毒性および体内負荷量に関する研究（平成14年度）
- (II) 生殖発生毒性に関する研究（平成15年度）
- (III) 経気道投与による毒性および体内負荷量に関する研究*（平成16年度）

注）(III)での経気道投与技術については、当該研究に先立ち、その技術開発を平成14年度および平成15年度に実施した（詳細は各年度の総括研究報告書を参照）。

前述の3つの研究成果と塩素化ダイオキシン類で集積された情報とを比較することにより、臭素化ダイオキシン類の生体影響を総合的に考察した。

B. 研究方法

(I) 単回経口投与による毒性および体内負荷量に関する研究（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（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）、研究に供した。

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、検疫および馴化を各1週間行い、6週齢で被験物質を投与した。

群の構成は、雌雄とも、溶媒のみを投与する対照群1群および被験物質投与群4群（以下、300 μ g/kg 群、100 μ g/kg 群、30 μ g/kg 群、10 μ g/kg 群と記載。）の合計5群とし、各群の使用動物数は1群当たり15匹とした。また、各群ともに投与後2日、7日および36日にそれぞれ5匹の動物を解剖（定期解剖）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）および飲料水（市水）（秦野市水道局供給）を自由に摂取させ、飼育した。

3. 被験物質の投与量および調製・投与方法

TBDD の投与用量は、体重 1kg 当たり 300, 100, 30 および 10 μg 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 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) 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。

投与の方法およ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) 一般状態の観察および体重測定

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 および 36 日に行った。

体重測定は、投与後 2, 4, 7, 10, 14, 21, 28 および 36 日に行った。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, 7 および 36 日の定期解剖動物全例から採血した血液について、総合血液学検査装置 (ADVIVA 120 : パイエル社) および血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA : オムロン(株)) を用いて、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、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、全自動血液凝固

測定装置 (Sysmex CA-5000 : シスメックス(株)) を用いて、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, 7 および 36 日の定期解剖動物全例の血漿について自動分析装置 (日立 7070 : (株) 日立製作所) を用いて、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, 7 および 36 日の定期解剖動物中、雌雄とも各群 3 匹 (36 日雌は 2 匹) の血清について、ARVOSX マルチラベルカウンターにより次の甲状腺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 および 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)

なお、これらの酵素活性は、(株) 三菱化学安全科学研究所に依頼して測定した。

(6) 体内負荷量の測定

投与後 2 日 (対照群、30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群 および 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群) および投与後 7 日と 36 日 (100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群と 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群) 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、肝臓および脂肪組織を採取し、TBDD の未変化

体濃度を測定した。

なお、これらの組織中のTBDD未変化体濃度は、島津テクノリサーチ㈱に依頼して測定した。

(7) 病理学的検査

雌300 μ g/kg群の死亡動物3匹および投与後2日（雌雄各5匹）、7日（雌雄各5匹）および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した。

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、脊椎の器官、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 μ g/kg群を基準群として、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Dunnett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Dunnett（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%および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。

(II) 生殖発生毒性に関する研究（方法）

1. 被験物質

被験物質の2,3,7,8-四臭化ジベンゾ-パラ-ジオキシンは、Cambridge Isotope Laboratories, Inc.より購入した。

各濃度のTBDD溶液は、TBDDをごく少量のトルエンに溶解し、さらに各設定濃度になるようにコーン油を加え、マグネチックスターラを用いて混合、投与液量が5mL/kg体重になるように調製した。TBDDは紫外線による分解が速いため（Buser et al.1988, Neupert et al.1988）、溶液の調製を投与直前に黄色灯下で行った。TBDD溶液中に含まれる被験物質の含量は、島津テクノリサーチ㈱に測定を依頼し、確認した。

2. 動物および飼育方法

動物は、日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センター生産のWistar系（Crj: Wistar, SPF）ラットを用いた。雄は12週齢、雌は11週齢で購入し、1週間の検疫後、妊娠雌を得るために雌雄1:1で連日同居させた。交尾の確認は膣スミア中の精子の存在、または膣栓の存在により行い、これらの認められた日を妊娠日（妊娠0日）とした。交尾した雌を妊娠0日の体重を基に適正層別方式により25匹ずつ4群に群分けし、それぞれの群の中で、分娩用として8匹、帝王切開用として17匹を用意した。また、TBDDの組織中濃度測定のためのサテライト動物として、3匹の妊娠雌と9匹の未交尾雌（処女雌）を用意した。

投与日より、動物はTBDD管理区域の動物飼育用チャンバー内で飼育し、環境は、温度23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 20%、換気回数12回/時、12時間点灯（8:00~20:00）/12時間消灯（20:00~8:00）で維持された。動物は、妊娠中はステンレス製網ケージで単飼育され、分娩用の動物は妊娠20日に紙パルプ製チップ（ALPHA-driTM、Shepherd Specialty Papers Inc.）を敷いたアルミ製箱型

ケージに移し、飼育した。

動物には、 γ 線照射滅菌した CRF-1 固型飼料（オリエンタル酵母工業(株)）と、フィルターろ過し、紫外線照射した水道水を自由摂取させた。

3. 投与量の設定および投与方法

投与量は、前年度に実施したラットを用いた TBDD の単回経口投与毒性試験（投与量：0, 10, 30, 100, 300 μ g/kg 体重）の結果を基に決定した。前年度の研究結果では 300 μ g/kg 群体重の TBDD 投与で死亡が認められたことから、この投与量では毒性影響が強すぎると判断し、100 μ g/kg 体重を高用量と設定し、以下、公比 10 で減じて、中用量に 10 μ g/kg 体重を、低用量には 1 μ g/kg 体重を設定した。また、投与時期は着床の完了している妊娠 8 日とした。

4. 帝王切開用母動物と胎児の観察および検査

(1) 一般状態観察および体重測定

一般状態観察は毎日行った。体重測定は、妊娠 8（投与直前）、10、15、20 日に行った。

(2) 帝王切開

帝王切開用の母動物は妊娠 20 日に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。肉眼観察の終了後、受胎が確認できた動物については帝王切開により胎児を摘出した。

(3) TBDD 組織中濃度の測定

帝王切開後、10 μ g/kg 群の 3 匹の母動物について肝臓と脂肪組織を採取、重量を測定後、 -20°C で凍結保存した。また、1 μ g/kg 群、10 μ g/kg 群および 100 μ g/kg 群の各 3 匹の母動物から得られた生存胎児を用いて、腹毎に、1 匹の胎児は胎児全体の TBDD 未変化体濃度を、残りの胎児は肝臓を摘出し、腹毎にプールした TBDD 未変化体濃度を測定した。これらの組織中の TBDD 未変化体濃度は、島津テクノリサーチ(株)に測定を依頼した。

(4) 母動物の臓器重量測定および臓器保存

各群 10 匹以上の母動物について、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、脳、甲状腺および下垂体を採取し、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓および脳については湿重量を測定し、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。下垂体と甲状腺は 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した後に周囲組織から切り離して湿重量を測定し、再度、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率（体重比）も算出した。

(5) 病理組織学検査

各群 5 匹の母動物から採取・固定した肝臓を常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

(6) 血液学検査および血液生化学検査

各群 10 匹以上の母動物について、帝王切開時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は、総合血液学検査装置（ADVIVA 120：パイエル社）、全自動血液凝固測定装置（Sysmex CA-5000：シスメックス(株)）および血液細胞自動分類装置（MICROX HEG-120NA：オムロン(株)）により、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン量、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は、自動分析装置（日立 7070：(株)日立製作所）により、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、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、無機リンの各濃度と A/G 比、および GOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPK の各活性値を測定した。

(7) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

各群10匹以上の母動物について、帝王切開時に採血した血液を用いて血清中甲状腺ホルモン濃度の測定を行った。検査はARVOSX マルチラベルカウンターにより、Triiodothyronine (T3)、Thyroxin (T4)、Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) の各濃度を測定した。

(8) 胎児の検査

受胎が確認された母動物のうち対照群15腹、1 μ g/kg群14腹、10 μ g/kg群12腹および100 μ g/kg群13腹の胎児について、生存および死亡数の計数後、生存胎児は性別の確認、体重測定、胎盤重量測定および外表観察を行った。その後、腹単位で生存胎児の半数は内臓検査、残りの半数は骨格検査を行った。

内臓の検査は、胎児を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、さらにブアン固定液で再固定した後、実体顕微鏡下で剖検、観察した。骨格の検査は、胎児を剥皮し、内臓を摘出後エタノールで固定、アリザリンレッドS染色を施した後、実体顕微鏡下で観察した。

なお、母動物の黄体数および子宮の着床痕数を計数し、着床率「(着床痕数/黄体数) × 100; %」および子宮内胚損失率「(死亡・吸収胚数/着床痕数) × 100; %」を算出した。

5. 分娩用母動物の観察および検査

(1) 分娩および哺育

分娩用の母動物は、自然分娩をさせた。分娩の確認は、妊娠20日から分娩の完了まで毎日行い、16時までには分娩が完了した動物は、その日を分娩日(哺育0日)とした。分娩状態を直接観察できた動物については、分娩状態の異常の有無を観察した。また、妊娠0日~分娩日の日数を妊娠期間として算定した。

分娩後は、児動物を21日齢まで授乳、哺育させた。分娩はしたが、哺育する児動物のいない母動物は分娩後21日まで飼育した。

(2) 一般状態観察および体重測定

一般状態観察は毎日行った。体重測定は、妊娠8(投与直前)、10、15、20日、および哺育0(分娩日)、4、7、14、21日に行った。

(3) 剖検

哺育21日(分娩後21日)に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。剖検後、子宮を摘出し、着床痕数を計数した。

(4) TBDD 組織中濃度の測定

剖検後、10 μ g/kg群の3匹の母動物について肝臓と脂肪組織を採取し、重量測定後、-20℃で凍結保存した。

なお、これらの組織中のTBDD未変化体濃度は、島津テクノリサーチ(株)に依頼して測定した。

(5) 臓器重量測定および臓器保存

全動物について、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓、脳、甲状腺および下垂体を採取し、肝臓、腎臓、胸腺、脾臓および脳については湿重量を測定し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定して保存した。下垂体と甲状腺は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した後に周囲組織から切り離して湿重量を測定し、再度、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率(体重比)も算出した。

(6) 病理組織学検査

全動物について、採取・固定後の肝臓を切り出し、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

また、対照群と100 μ g/kg群の各2匹の肝臓について、グルタルアルデヒドおよびオスミウム固定を施し、樹脂包埋後、酢酸ウランにて染色し、透過型電子顕微鏡で病理組織学検査を行った。

(7) 血液学検査および血液生化学検査

全動物について、解剖時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は、総合血液学検査装置 (ADVIVA 120: パイエル社)、全自動血液凝固測定装置 (Sysmex CA-5000: シスメックス(株)) および血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA: オムロン(株)) により、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、フィブリノーゲン量、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は、自動分析装置 (日立7070: (株)日立製作所) により、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、無機リンの各濃度とA/G比、およびGOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPKの各活性値を測定した。

(8) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

全動物について、解剖時に採血した血液を用いて、血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定を行った。検査はARVO_{SX} マルチラベルカウンターにより、Triiodothyronine (T3)、Thyroxin (T4)、Thyroid-Stimulating Hormone (TSH) の各濃度を測定した。

6. 児動物の観察および検査

(1) 一般状態観察および体重測定

出生児は、出生時 (哺育0日) に、雌雄別に産児数 (生存児+死亡児) を調べ、分娩率「(産児数/着床痕数)×100; %」、生児出生率「(出生産児数/着床痕数)×100; %」および出生率「(出生産児数/産児数)×100; %」を算出した。生存児については性比「雄生児数/総生児数」を算出、および外表奇形の有無を観察した。哺育期間中は、毎日、一般状態を観察し、哺育0、

4、7、14日には各腹雌雄別の合計体重を測定、また、哺育21日には個体別に体重を測定した。

なお、哺育4日に同腹児の調整 (原則として1腹当り雌雄各4匹に調整) を行った。

(2) 胃内ミルク中のTBDD濃度の測定

10 μ g/kg群の3腹について、同腹児の調整で間引かれた児動物を、エーテル麻酔下で放血死させ、胃内に残存する乳汁を採取し、腹毎にプールしてTBDDの未変化体濃度を測定した。濃度測定は、島津テクノロジー(株)に依頼した。

(3) 肛門生殖器間距離(AGD)の測定

哺育4日の同腹児の調整後、哺育を継続する全児動物について、肛門生殖器間距離(AGD: 生殖隆起後端と肛門前端的距離)を測定した。

また、AGDを測定した児動物の体重を測定し、体重補正值「 $AGD/\sqrt[3]{\text{体重}}$ 」を算出した。

(4) 行動発達および身体発達の検査

生存している全ての児について、行動発達検査の指標として背地走性 (哺育9日) と空中正向反射 (哺育18日) を、また、身体発達検査の指標として歯牙の萌出 (哺育9日から13日)、眼瞼の開裂 (哺育12日から17日) および乳頭の有無 (哺育12日) の観察を行った。

(5) 剖検

児動物は哺育21日に、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血後、放血致死させ解剖し、器官・組織の肉眼観察を行った。

(6) 肝臓中のTBDD濃度の測定

剖検後、1 μ g/kg群および10 μ g/kg群の各3腹雌雄各1匹の児動物について肝臓を採取し、重量測定後、-20℃で凍結保存した。これらの組織中のTBDD未変化体濃度は、島津テクノロジー(株)に依頼して測定した。

(7) 肝臓中の誘導酵素量の測定

肉眼観察の終了後、各群1腹当り雌雄各1匹の児動物の肝臓を採取し、重量を測定したのちKCl溶液で還流し液体窒素で凍結後、-80℃で保存し、次の誘導酵素を測定した。

- ・ Ethoxycoumarin O-deethylase(ECOD)
- ・ Ethoxyresorufin O-deethylase(EROD)
- ・ Aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)
- ・ Uridine phosphate glucuronyl transferase (UDP-GT)

なお、これらの酵素活性は、(株)三菱化学安全科学研究所に依頼して測定した。

(8) 臓器重量測定および臓器保存

1腹当り雌雄各2匹の児動物について、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣（卵管を除く）、腹側前立腺、精囊、骨髄（大腿骨）、腸間膜リンパ節を採取した。脳、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣（卵管を除く）は湿重量を測定後、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定・保存した。また、腹側前立腺と精囊は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、周囲組織から切り離し、湿重量を測定し、再度、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定・保存した。

なお、動物の最終体重に対する各臓器の湿重量の比率（体重比）も算出した。

(9) 病理組織学検査

1腹当り雌雄各1匹の児動物について、採取・固定後の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、精巣、精巣上体、子宮、卵巣、腹側前立腺、精囊、骨髄（大腿骨）、腸間膜リンパ節を切り出し、常法に従ってパラフィン切片とし、ヘマトキシリン・エオジン染色を行って病理組織標本を作製し、光学顕微鏡で病理組織学検査を行った。

(10) 血液学検査および血液生化学検査

1腹当り雌雄各1匹の児動物について、解剖時に採血した血液を用いて血液学検査および血液生化学検査を行った。血液学検査は、総合血液学検査装置（ADVIVA 120：バイエル社）および血液細胞自動分類装置（MICROX HEG-120NA：オムロン(株)）により、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、白血球数および白血球分類を測定した。血液生化学検査は、自動分析装置（日立7070：(株)日立製作所）により、総蛋白、アルブミン、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、リン脂質、尿素窒素、無機リンの各濃度とA/G比、およびGOT、GPT、LDH、ALP、 γ -GTP、CPKの各活性値を測定した。

(11) 血清中の甲状腺ホルモン濃度の測定

1腹当り雌雄各2匹の児動物について、解剖時に採血した血液について、血清中の以下のホルモン濃度をARVOSx マルチラベルカウンターにより測定した。

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

7. サテライト動物の設定

妊娠動物と未妊娠動物の組織中 TBDD 濃度の経時的变化を比較するために、妊娠雌を3匹、未妊娠雌（処女雌）を9匹用意した。妊娠雌の3匹は妊娠8日の投与2日後（妊娠10日）に、処女雌の9匹は、投与2日後、12日後（妊娠雌の妊娠20日に相当）および35日後（分娩後21日に相当）に、エーテル麻酔下で放血致死させ、肝臓と脂肪組織を採取し、重量を測定後、 -20°C で凍結保存した。これらの組織中のTBDD未変化体濃度は島津テクノリサーチ(株)に依頼して測定した。

8. 統計解析

体重、臓器重量、血液学検査、血液生化学検査およびホルモン検査などの各データは、最初に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

より平均値の差の検定を行った。また、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 Dunnett 型の多重比較を行った。

胎児の外表、骨、内臓異常の発生数については χ^2 検定を対照群と各投与群間で行った。

各検定は 5% の有意水準で両側検定を行い、検定結果を表示する場合には 5% および 1% の有意水準の表示を行った。

(Ⅲ) 経気道投与による毒性および体内負荷量に関する研究 (方法)

1. 被験物質

被験物質の 2,3,7,8-四臭化ジベンゾ・パラ・ジオキシンは、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. より購入した。

2. 溶液の調製および投与

TBDD はエタノール(和光純薬(株)製、試薬特級)と Tween80 (ICN Biomedical INC 製)の 1:1 混合溶液に溶解し、それに水 3 容を加え TBDD150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を作った。さらに各設定濃度になるように水:エタノール:Tween80(3:1:1)溶液を加え、マグネチックスターラ (井内盛栄堂(株)製 HS-360) を用いて混合した。

なお、TBDD は紫外線による分解が速いため (Buser et al.1988, Neupert et al.1988)、溶液の調製を投与直前に黄色灯下で行った。

TBDD 溶液中に含まれる被験物質の含量は、島津テクノリサーチ(株)に測定を依頼し、確認した。

TBDD 投与量は、雌雄ともに 1.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重、0.455 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重および 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重 (対照群:溶媒のみ投与) とし、各群 6 匹の動物に 1 回気管内投与した。

3. 動物および飼育方法

動物は、10 週齢, SPF Crj: Wistar ラット雌雄 (日本チャールス・リバー(株)筑波飼育センター生産) を用いた。

動物は TBDD 管理区域の動物飼育用チャンパー内でステンレス製単飼 5 連網ケージに収容し飼育した。飼育環境は、温度 23 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 \pm 20%、換気回数 12 回/時、照明 12 時間点灯 (8:00~20:00) / 12 時間消灯 (20:00~8:00) とした。

飼料は、 γ 線照射滅菌した CRF-1 固型飼料 (オリエンタル酵母工業(株)) とし、飲水はフィルター過し、紫外線照射した水道水とし、それぞれ自由摂取させた。

4. 観察、測定および検査

(1) 一般状態観察および体重測定

投与後 7 日間、毎日、動物の一般状態を観察し、投与直前および投与後 2、4、7 日に体重を測定した。

(2) 剖検および臓器重量の測定

投与後 2 日および 7 日に各群 3 匹の動物をエーテル麻酔下で解剖し、全例について剖検し、肝臓、腎臓、脾臓、肺、胸腺の重量を測定した。

(3) 血液学的検査

投与後 2 日および 7 日の定期解剖動物全例の血液について、総合血液学検査装置 (ADVIVA 120: パイエル社)、全自動血液凝固測定装置 (Sysmex CA-5000: シスメックス(株)) および血液細胞自動分類装置 (MICROX HEG-120NA: オムロン(株)) を用いて、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、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、網赤血球比、プロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間、血小板数、白血球数、白血球分類を検査した。

(4) 血液生化学的検査

投与後 2 日および 7 日の定期解剖動物全例の

血漿について、自動分析装置（日立 7070：(株)日立製作所）を用いて、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、トリグリセライド、リン脂質、GOT、GPT、LDH、ALP、 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、無機リンを検査した。

(5) 体内負荷量の測定

投与後 2 日および 7 日に 1 群あたり雌雄各 3 匹について、肺(右中葉以外)、肝臓(左葉)および脂肪組織(腎臓周囲)を採取し、TBDD の未変化体を測定した（分析依頼先：島津テクノロジー(株)）。

5. 統計解析

体重、臓器重量、血液学検査および血液生化学検査などの各データは、最初に 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 Dunnett の多重比較により平均値の差の検定を行った。また、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 Dunnett 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、検定結果を表示する場合には 5% および 1% の有意水準の表示を行った。

(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および周囲環境の汚染防止の観点から当センターの「特定化学物質（2,3,7,8-TBDD）安全管理規定」および「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

(I) 単回経口投与による毒性および体内負荷量に関する研究（結果）

1. 生死状況、一般状態観察所見および体重

動物の死亡は、TBDD 300 μ g/kg を単回経口投与した雌で投与後 21 日、23 日および 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(I)-1, 表(I)-2)。

TBDD 投与後 4 日以降に雄の 100, 300 μ g/kg 群および雌の 30, 100, 300 μ g/kg 群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 μ g/kg 群：4~6%，300 μ g/kg 群：3~11%，雌では 30 μ g/kg 群：1~12%，100 μ g/kg 群：7~12%，300 μ g/kg 群：5~14%であった。(表(I)-3, 表(I)-4, 図(I)-1, 図(I)-2)

2. 血液学的検査（表(I)-5, 表(I)-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 μ g/kg 群、雌では 10, 30, 100 μ g/kg 群でみられた。

(2) 投与後 7 日定期解剖動物

白血球数の増加(雌：100 μ g/kg 群以上)、好酸球比(白血球分類)の低下(雄：30 μ g/kg 群以上、雌：100 μ g/kg 群以上)、網赤血球の比率の低下(雄：30 μ g/kg 群以上、雌：100 μ g/kg 群以上)、血小板数の減少(雄：100 μ g/kg 群以上、雌：30 μ g/kg 群以上)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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群、雌：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、好酸球比（白血球分類）の低下（雄：30, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群、雌：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、網赤血球の比率の増加（雄：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、血小板数の減少（雄：300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群、雌：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、ヘモグロビン濃度の低下（雌雄とも30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、ヘマトクリット値の低下（雄：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上、雌：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、および赤血球数の低下（雄：300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群、雌：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）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(I)-7, 表(I)-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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）およびグルコースの低下（雌：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上、雌：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、トリグリセライドの低下（雄：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上、雌：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、グルコースの低下（雌雄：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、総蛋白の増加（雌雄：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、アルブミンの増加（雄：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、リン脂質の増加（雌：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）および GOT の増加（雌：30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）が認められた。

GOT の増加については、雌の300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上、雌：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、リン脂質の増加（雄：

30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上、雌：10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）、トリグリセライドの低下（雌：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）および GOT の増加（雌：100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群以上）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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の1匹（動物番号1412）は、GOT、GPT、ALP および γ -GTP が特に高い値を示した。

4. 血清中のホルモン濃度（表(I)-9, 表(I)-10）

雄では、TSH および 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 日および 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ともに $p < 0.01$ 、投与後 7 日では 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群： $p < 0.05$ 、100, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群： $p < 0.01$ ）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(I)-11, 表(I)-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較べ高い値であった。

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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および雌 10, 30, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では投与後 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 および 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 および ECOD の 2 種類の誘導酵素量に性差が見られた。

6. 体内負荷量 (表(I)- 13, 表(I)- 14)

(1) 肝臓

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

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

投与後36日は、雄では100 μ g/kg群: 41.5ng/g、
300 μ g/kg群: 120ng/g、雌では100 μ g/kg群:
44.5ng/g、300 μ g/kg群: 86.5ng/gであった。

(2) 脂肪

投与後2日は、雄では30 μ g/kg群: 46.5ng/g、
100 μ g/kg群: 125ng/g、300 μ g/kg群: 440ng/g、
雌では30 μ g/kg群: 33.5ng/g、100 μ g/kg群:
140ng/g、300 μ g/kg群: 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群: 200ng/g、
300 μ g/kg群: 500ng/g、雌で100 μ g/kg群:
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群: 39ng/g、
300 μ g/kg群: 120ng/g、雌で100 μ g/kg群:
61.5ng/g、300 μ g/kg群: 120ng/gであった。

7. 病理学的検査

(1) 剖検所見 (表(I)- 15)

投与後2日および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
群の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群の動物3匹は、いずれも
胸腺が萎縮し、内2匹は頭蓋腔と脊椎腔や、皮下
(頸部)、鼻腔に出血がみられた。

(2) 臓器重量 (表(I)- 16, 表(I)- 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群以上)と肝臓の実重量と体重比の増加
(30 μ g/kg群以上)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群以上)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
 μ g/kg群以上)、肝臓の実重量と体重比の増加
(10 μ g/kg群以上)、甲状腺の実重量と体重比
の増加(10 μ g/kg群以上)が認められた。

雌では、胸腺の実重量と体重比の低下(30、
100 μ g/kg群)、および肝臓の実重量の増加(30
 μ g/kg群以上)と体重比の増加(10 μ g/kg群以
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
 μ g/kg群以上)、肝臓の実重量の増加(100 μ g/kg
群以上)と体重比の増加(30 μ g/kg群以上)お
よび脾臓の体重比の増加(100 μ g/kg群以上)が
認められた。

雌では、胸腺の実重量の低下(30 μ g/kg群以
上)と体重比の低下(100 μ g/kg群以上)および
肝臓の体重比の増加(100 μ g/kg群以上)が認め
られた。

(3) 病理組織所見

① 死亡動物 (表(I)- 18)

雌300 μ g/kg群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、脾臓およ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(I)-19,表(I)-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 μ g/kg群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(I)-20,表(I)-23)

雌雄とも、肝臓、骨髄およ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 μ g/kg群以上、雌:全投与群)および細胞質内封入体(雌雄の300 μ g/kg群)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った。)。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 μ g/kg群以上)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 μ g/kg群)が認められた。

胸腺には、萎縮(雌雄の100 μ g/kg群の全ての動物と雌の300 μ g/kg群の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 μ g/kg群の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(I)-21,表(I)-24)

雌雄の肝臓、骨髄、胸腺、脾臓および筋肉、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 μ g/kg群の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 μ g/kg群以上)、多核化、すなわち5個以上の核を持つ肝細胞(100 μ g/kg群以上)がみられた。300 μ g/kg群の生存動物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 μ g/kg群でも1匹に認められた。

骨髄には、造血組織の減少(雌雄の100 μ g/kg群以上)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)および重度(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 μ g/kg群にみられた。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。

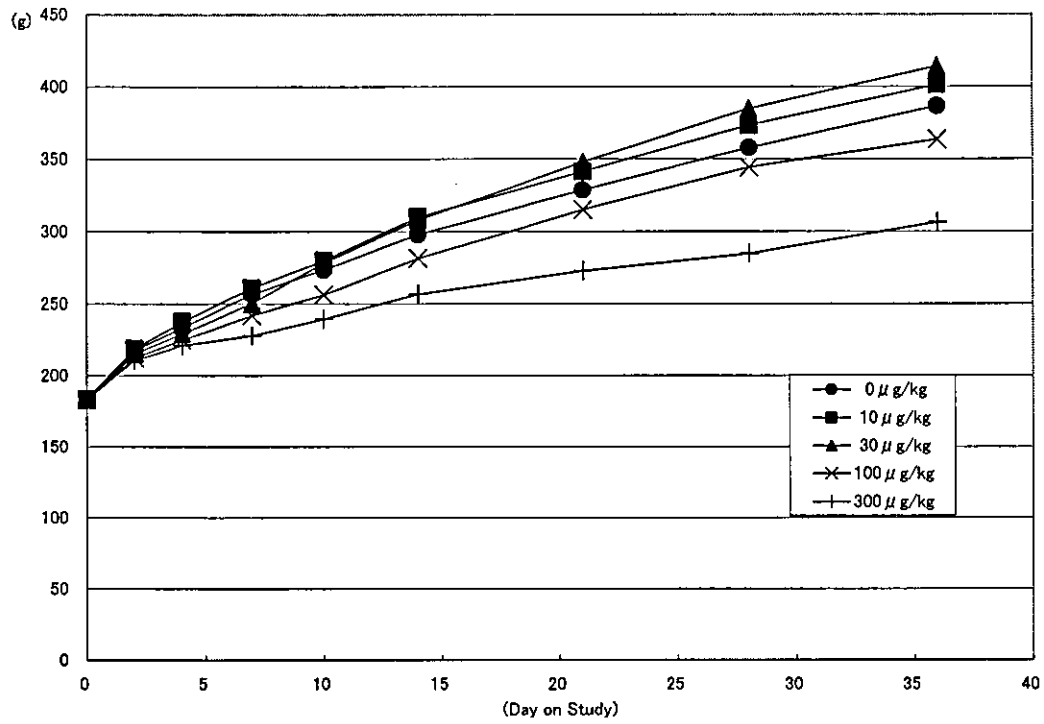
胸腺には、萎縮(雌雄の100 μ g/kg群以上)が認められた。雄の300 μ g/kg群と雌の100 μ g/kg群には皮質の1/2以上の部分からリンパ球が消失する重度な萎縮を示す動物がみられた。

脾臓には、雄では髓外造血(100 μ g/kg群以上)、雌では白脾髄の萎縮と髓外造血(300 μ g/kg群)が観察された。

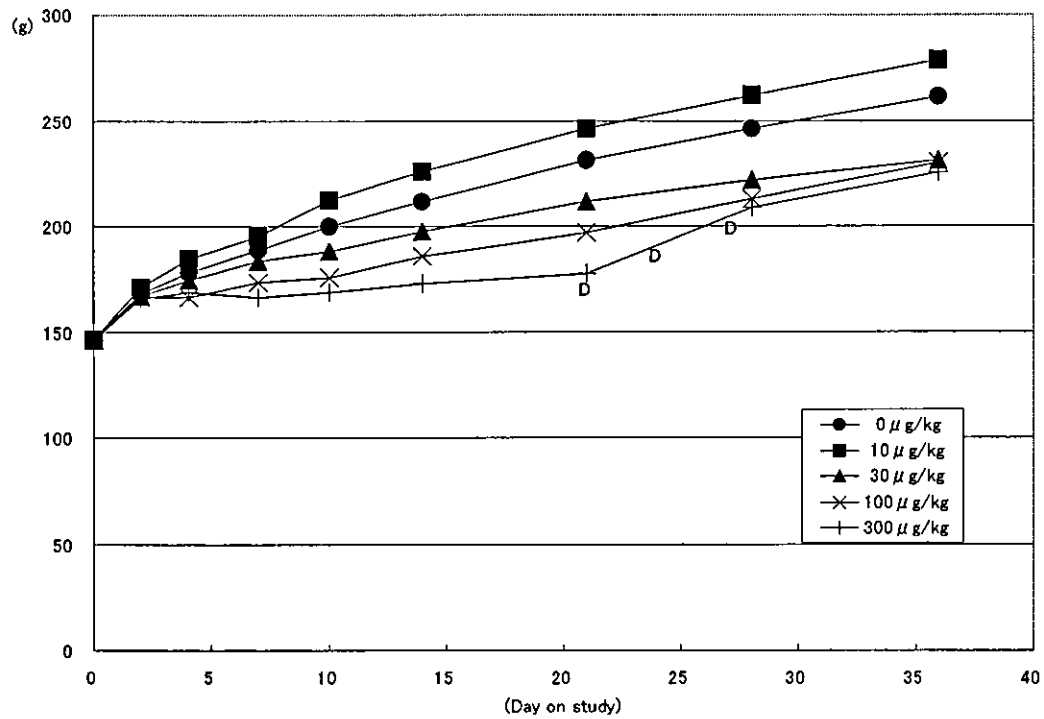
剖検観察で皮下出血がみられた雄の300 μ g/kg群の1匹(動物番号1412)には皮下組織と筋肉に出血が確認された。

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、膈およ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 μ g/kgに1匹、雌:30 μ g/kg群に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。



図(I)-1 体重の推移(雄)



Dは動物の死亡を示す

図(I)-2 体重の推移(雌)

表(I)- 1 生死状況、一般状態 (雄)

Items		Dose (µg/kg b.w.)				
		0(control)	10	30	100	300
Dead Animals	0-2d	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	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
	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(I)- 2 生死状況、一般状態 (雌)

Items		Dose (µg/kg b.w.)				
		0(control)	10	30	100	300
Dead Animals	0-2d	0/15	0/15	0/15	0/15	0/15
	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
	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(I)- 3 体重 (雄)

Experimental date	Dose (µg/kg b.w.)				
	0(control)	10	30	100	300
	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 (15) 100	238 (15) 102	229 (15) 99	225 (15) 96	221 (15) 94
7d	257 (15) 100	261 (15) 102	250 (15) 97	242 (15) 94	228 (15) 89 **
10d	274 (15) 100	280 (15) 102	278 (15) 101	256 (15) 93	240 (15) 88 **
14d	298 (15) 100	310 (15) 104	308 (15) 103	282 (15) 95	257 (15) 86 *
21d	329 (15) 100	341 (15) 104	348 (15) 106	315 (15) 96	273 (15) 83 *
28d	358 (15) 100	373 (15) 104	385 (15) 108	344 (15) 96	285 (15) 80 **
36d	387 (15) 100	401 (15) 104	414 (15) 107	364 (15) 94	306 (15) 79 **

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

表(I)- 4 体重 (雌)

Experimental date	Dose (µg/kg b.w.)				
	0(control)	10	30	100	300
	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 (15) 100	185 (15) 104	175 (15) 98	166 (15) 93 *	169 (15) 95
7d	189 (15) 100	196 (15) 104	183 (15) 97	174 (15) 92 *	166 (15) 88 **
10d	200 (15) 100	212 (15) 106	189 (15) 95	176 (15) 88 *	169 (15) 85 **
14d	212 (15) 100	226 (15) 107	197 (15) 93	186 (15) 88	173 (15) 82 **
21d	231 (15) 100	246 (15) 106	212 (15) 92	197 (15) 85 *	178 (15) 77 **
28d	247 (15) 100	262 (15) 106	222 (15) 90	213 (15) 86 **	209 (15) 85 a)
36d	262 (15) 100	279 (15) 106	231 (15) 88 *	230 (15) 88 *	226 (15) 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(I)-5 血液学的检查(雄)

Items of Examination	Dose ($\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w.)				
	0(control)	10	30	100	300
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($10^6/\mu\text{L}$) 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 ($10^3/\mu\text{L}$)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, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$)