

4-エチルビフェニルのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験

Preliminary Reproduction Toxicity Screening Test of 4-Ethylbiphenyl by Oral Administration in Rats

要約

4-エチルビフェニルのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を行い、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。投与量は、300 mg/kgを最高用量とし、以下100, 30および10 mg/kgとした。対照として媒体(コーンオイル)投与群を設けた。なお、各群の使用動物数は雌雄各12例とした。

1. 反復投与毒性

雄においては、いずれの群とも死亡および瀕死例は認められなかった。一般状態では、投与による変化はみられなかった。体重は、100および300 mg/kg群で低値がみられた。摂餌量は、300 mg/kg群で低値がみられた。剖検では、投与による変化はみられなかった。器官重量では、300 mg/kg群で精巣の相対重量の高値がみられた。精子検査では、投与による変化はみられなかった。病理組織学検査では、精巣および精巣上体に投与による変化はみられなかった。

雌においては、死亡例が300 mg/kg群で4例認められた。一般状態では、300 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。体重は、300 mg/kg群では、交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。摂餌量は、100 mg/kg群で交配前に一過性の低値が、300 mg/kg群で交配前および妊娠期に低値がみられた。剖検では、300 mg/kg群の死亡例では、腺胃粘膜暗赤色斑がみられた。生存例では、投与による変化はみられなかった。器官重量では、投与による変化はみられなかった。病理組織学検査では、卵巣に投与による変化はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

精子検査および病理組織学検査では、投与による変化はみられなかった。発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、分娩状態、哺育状態および妊娠黄体数では、投与による変化はみられなかった。妊娠期は、100および300 mg/kg群で延長がみられた。300 mg/kg群では、着床数の低値、着床率および出生率の低値傾向がみられた。

100 mg/kg群では、死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、死産児数の高値、総産出数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率

の低値がみられた。100 mg/kg群では、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値あるいは低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、哺育4日の生存児は1例も得られなかった。300 mg/kg群では、哺育0日に雌雄別体重の低値あるいは低値傾向がみられた。新生児の外表、一般状態および剖検では、投与による変化はみられなかった。

以上のように、4-エチルビフェニルの一般毒性学的無影響量は、雄では100 mg/kg投与により体重に影響が認められたことから30 mg/kg/day、雌では100 mg/kg投与により摂餌量に影響が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では300 mg/kg投与しても精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査成績、交尾率に影響が認められなかったことから300 mg/kg/dayと考えられる。雌では、100 mg/kg投与で妊娠期の延長が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、100 mg/kg投与で死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値傾向がみられたことから30 mg/kg/dayと考えられる。

方法

1. 被験物質および媒体

被験物質の4-エチルビフェニルは、常温において白色塊で、融点以上では無色~わずかにうすい黄色の澄明の液体である[Lot No.8-LOT, 純度:99.71%, 新日鐵化学(株)(東京)]。入手後は、室温・遮光条件下で保管した。なお、投与期間終了後、残余被験物質を再分析し、使用期間中の安定性を確認した。

被験物質は、コーンオイルで溶解して調製した。調製に際して、被験物質の純度による換算は実施しなかった。なお、調製液は、室温・遮光条件下で7日間保存しても安定性に問題のないことが確認されていたため、各濃度の調製液は調製後、室温・遮光条件下で保管し、調製後7日以内に使用した。投与開始日および雄投与終了日に使用した各投与液中の被験物質濃度を確認した結果、被験物質濃度に問題はなかった。

2. 使用動物および飼育条件

8週齢のSprague-Dawley系雌雄ラット[SPF, Crj:CD(SD)IGS]を日本チャールス・リバー(株)から購入した。入手した動物は、5日間の検疫期間およびその後7

日間の馴化期間を設け、一般状態および体重推移に異常がみられず、また性周期観察で異常が認められなかった動物を群分けした。群分けは、コンピュータを用いて体重を層別に分けた後に、無作為抽出法により各群の平均体重および分散がほぼ等しくなるように投与開始日に行った。

動物は、室温20～26℃、湿度40～70%、明暗各12時間(照明:午前6時～午後6時)、換気回数12回/時に維持されている飼育室で飼育した。検疫・馴化期間中はステンレス製ケージを用いて1ケージ当たり5匹までの雌雄別群飼育とし、群分け後はステンレス製ケージを用いて個別飼育した。母動物は、妊娠18日以降オートクレープ処理した床敷(サンフレック、日本チャールス・リバー(株))を入れたプラスチック製ケージで個別飼育し、自然分娩および哺育させた。飼料は固型飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業(株))を、飲料水は水道水をいずれも自由に摂取させた。

3. 投与経路、投与方法、投与量および投与期間

投与経路は、経口投与を選択した。投与に際しては、金属製経口胃ゾンデを取り付けたポリプロピレン製ディスプレイ注射筒を用いて、強制経口投与した。投与液量は、雄では投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。雌では、交配前および交配期間中は投与日あるいは投与日に最も近い測定日の体重を、妊娠期間中は妊娠0、7、14および21日の体重を、授乳期間中は哺育0日の体重を基準とし、5 mL/kgで算出した。

投与開始日の週齢は雌雄とも10週齢であり、体重範囲は雄が321～354 g、雌が245～269 gであった。

投与量は、4-エチルピフェニルのラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾の結果により決定した。すなわち、死亡例が1000 mg/kg群で雄4/10例と雌1/10例、500 mg/kg群で雄1/5例認められた。また、500 mg/kg以上の群で体重および摂餌量の低値がみられた。しかし、100 mg/kg群では、肝臓、腎臓および胃に病理組織学変化がみられるものの、重篤な変化は認められなかった。そこで、当試験では、ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験において死亡例の認められた500 mg/kgと重篤な変化は認められなかった100 mg/kgの中間量に相当する300 mg/kgを最高用量とし、以下公比約3により100、30および10 mg/kgとした。また、対照として媒体(コーンオイル)のみを同容量投与する群を設けた。1群の動物数は雌雄それぞれ12例とした。

投与期間は、雄では交配前14日間とその後36～38日間(精子検査に3日間必要なため、雄の剖検を3日間に分けて実施)の合計50～52日間とし、雌では交配前14日間、交配期間中(最長14日間)、妊娠期間中および哺育3日までの合計41～45日間とした。なお、投与開始日を投与1日とした。

4. 観察および検査項目

1) 雄

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。

(2) 体重測定

体重は、1週間に2回測定した。

(3) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間および交配期間終了後に1週間に2回測定した。

(4) 剖検

最終投与の翌日(投与51～53日)に各群の各4例をエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、精巣、精巣上体および精巣上体の尾部重量を測定した。精巣および精巣上体の頭部は、ブアン液で2～3時間固定後、90%アルコールに再固定した。前立腺および精囊は、20%中性緩衝ホルマリンで固定した。

(5) 精子検査

右精巣上体の尾部は、37℃に加温した精子培養液(0.5%牛血清アルブミン加Medium 199)中で分割し、精子原液を作製した。この精子原液を用いて精子の活動性、精子の生存性および精子の形態の各検査を実施した。

精子の活動性は、精子原液を精子培養液で希釈し、約30分間培養(培養条件:37℃、5%炭酸ガス、95%空気)後にHTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて、活動精子率を算出するとともに、活動精子について基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度および頭部の横切り回数を算出した。

精子の生存性として、加藤らの方法²⁾に従い、マイクロウェルプレート内で精子原液を精子培養液にて約2～3倍希釈した後、Calcein acetoxy methyl esterとEthidium homodimer-1とで約2時間培養・染色(培養条件:37℃、5%炭酸ガス、95%空気)した後、蛍光顕微鏡下で精子を生存精子、途中死亡精子と死滅精子に分類し、生存精子率と生き残り精子率を求めた。なお、生存、途中死亡および死滅精子の判定は、頭部～尾部にかけて緑色の蛍光発色が認められるものを生存精子、頭部には赤色の蛍光発色が、尾部には緑色の蛍光発色が認められるものを途中死亡精子、頭部には赤色の蛍光発色が認められるが、尾部には蛍光発色が認められないものを死滅精子とした。

精子の形態は、精子原液をスライドガラスに塗抹し、10%中性緩衝ホルマリンで固定後、1%エオジン染色液で染色し、顕微鏡下で観察した。

精子数は、左精巣上体尾部を0.1% Triton X-100中でホモジナイズ後、HTM-IVOS(Hamilton Thorne Research)を用いて算出した。なお、左精巣上体尾部1g当たりの精子数も算出した。

(6) 病理組織学検査

対照群および300 mg/kg群の精巣および精巣上体の頭部についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

2) 雌

(1) 一般状態

一般状態および死亡の有無は、投与前・後の1日2回観察した。

死亡例は、発見後速やかに剖検した。

(2) 性周期

性周期は、投与開始日から交尾確認日あるいは交配期間終了日まで毎日1回観察した。なお、発情期が連続2日間にわたって観察された場合は1回として発情回数を計数した。

(3) 体重測定

体重は、交配開始前14日間および交配期間中は1週間に2回、妊娠期間中は妊娠0, 7, 14および21日に、哺育期間中は哺育0および4日にそれぞれ測定した。

(4) 摂餌量測定

摂餌量は、交配開始前14日間までは1週間に2回、妊娠期間中は妊娠2, 9, 16および21日に、哺育期間中は哺育4日に測定した。

(5) 交尾不成立雌

交尾不成立雌は、交配期間終了後にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床の有無を確認した。

(6) 分娩状態の観察

交尾雌は自然分娩させ、分娩状態の異常の有無、分娩終了の確認を妊娠21日から妊娠25日の午前10時まで毎日行った。午前10時に分娩が終了していた場合、その日を哺育0日とした。

(7) 妊娠25日までに分娩しなかった動物

妊娠25日までに分娩しなかった雌は、エーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

(8) 哺育状態の観察および剖検

母動物は、哺育状態を哺育4日まで毎日観察し、新生児が全例死亡した日あるいは哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検し、着床数および妊娠黄体数を数え、卵巣の重量を測定した。

(9) 病理組織学検査

対照群および300 mg/kg群の卵巣ならびに死亡例の剖検で異常の認められた器官・組織(300 mg/kgの2例の胃)についてHE染色組織標本を作製し、病理組織学検査を実施した。

3) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

14日間投与した雌雄を同一群内で1対1に組み合わせて同居交配した。交配期間は14日を限度として、交尾を確認するまでの連続同居交配とした。

交尾確認は毎朝はば一定時刻に行い、膣垢内に精子または膣栓を確認した雌を交尾成立動物として、その日を妊娠0日として起算した。

4) 児動物

(1) 出産時の観察

出産時に総出産児数と性、死産児数、新生児数および外表異常の有無を観察した。

(2) 児動物の観察

児動物は、一般状態および死亡の有無を毎日1回観察した。

(3) 体重測定

体重は、哺育0日(出生日)および4日に測定した。

(4) 剖検

生存児は、哺育4日にエーテル麻酔下で腹大動脈から放血致死させた後に剖検した。

5. 統計解析

統計解析は以下に示したように、対照群と各投与群の間で行い、危険率を5%とした。

体重、摂餌量、器官の絶対重量および相対重量、精子検査、発情回数、交尾所要日数、妊娠期間、妊娠黄体数、着床数、着床率、総出産児数、死産児数、新生児数、分娩率、児の産出率、出生率、哺育4日の生存児数、新生児の4日の生存率、性比および外表異常の出現率は、各群で平均値および標準偏差を算出した。その後、Bartlett法による等分散性の検定を行い、等分散の場合には一元配置法による分散分析を行い、有意ならばDunnett法により行った。一方、等分散と認められなかった場合は、順位を利用した一元配置法による分析(Kruskal-Wallisの検定)を行い、有意ならば順位を利用したDunnett型の検定法により行った。

交尾率、受胎率および産出率は、 χ^2 検定により行った。

結果

1. 反復投与毒性

1) 雄に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡および瀕死例は、いずれの群でも認められなかった。

一般状態観察において、対照群および10 mg/kg群では異常はみられなかった。30 mg/kg群では、投与30日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。100および300 mg/kg群では、投与2日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。

(2) 体重推移(Fig. 1)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与18~49日に体重の有意な低値がみられた。

300 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~49日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量(Fig. 2)

10, 30および100 mg/kg群では、対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与3~10日に摂餌量の有意な低値がみられた。

(4) 剖検

いずれの群とも、異常はみられなかった。

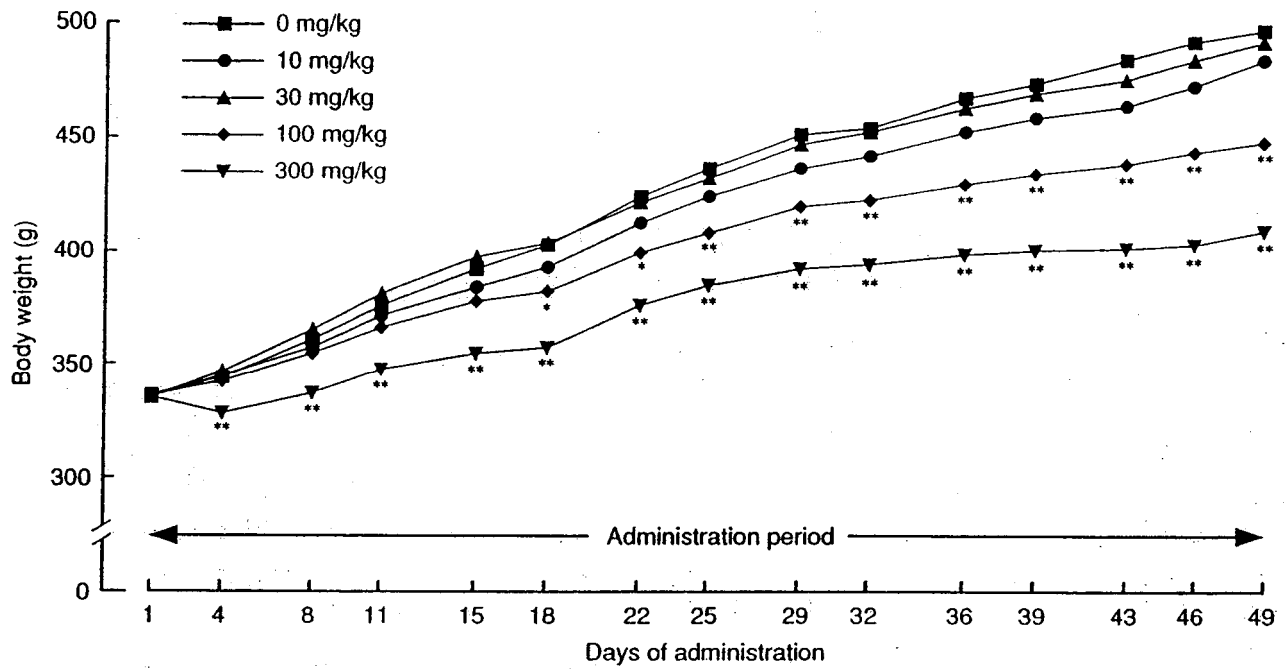


Fig. 1 Body weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

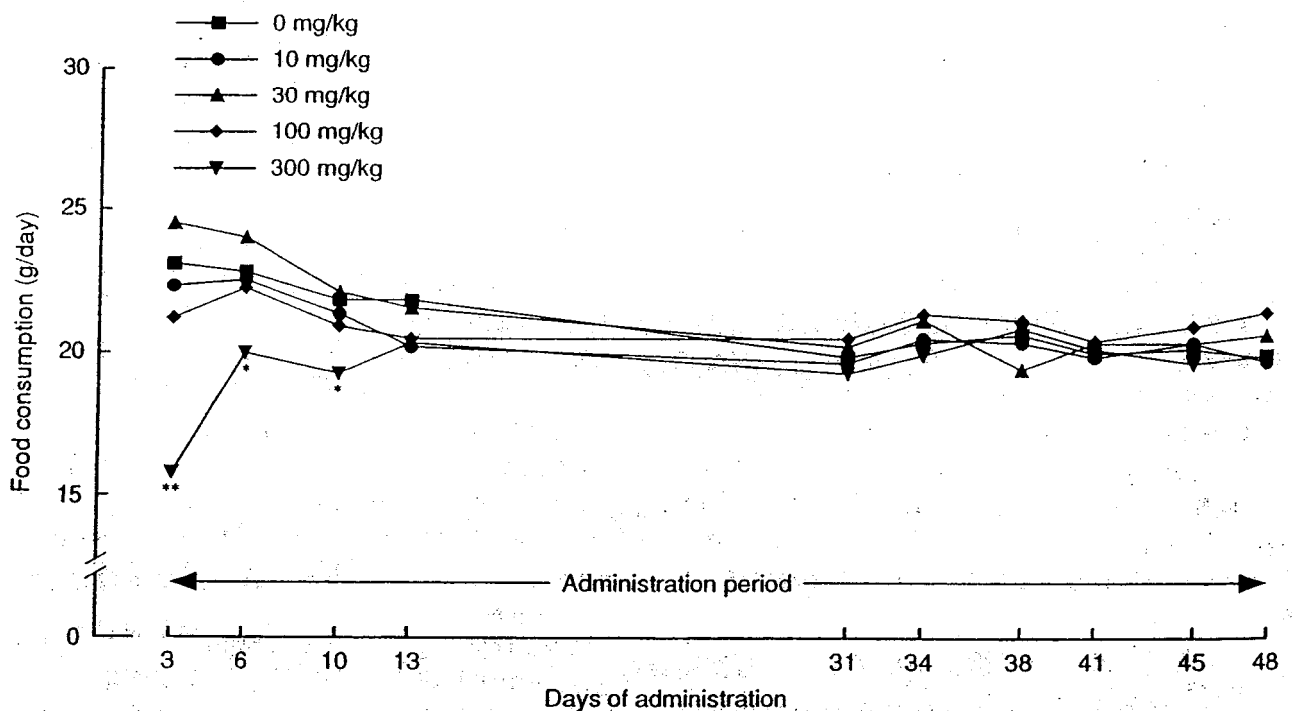


Fig. 2 Food consumption of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

(5) 器官重量 (Table 1)

剖検日の体重において、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、10および30 mg/kg群では対照群

と比べて精巣および精巣上体の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて精巣上体の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。300 mg/kg群では、対照群と比べて精巣の相対重量の有意な高値がみられた。また、300 mg/kg群では、対照群と比べて精

巢上体の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。

(6) 精子検査 (Table 2)

各投与群とも、対照群と比べて活動精子率、基準点移動速度、最短距離移動速度、総移動速度、頭部の横切り回数、奇形精子率、生存精子率、生き残り精子率、精子数、左精巢上体尾部1g当たりの精子数に有意差はみられなかった。

(7) 病理組織学検査 (Table 3)

精巣:対照群では、グループ3の精細管にステップ19精子細胞の残留が1例みられた。300 mg/kg群では、異常はみられなかった。

精巢上体(頭部):対照群および300 mg/kg群とも、異常はみられなかった。

2) 雌に及ぼす影響

(1) 一般状態

死亡は、300 mg/kg群で4例認められた。死亡例では、自発運動の低下、体温低下、被毛の汚れおよび一過性の流涎がみられた。

生存例の一般状態観察において、対照群、10および30 mg/kg群では異常はみられなかった。100 mg/kg群では、投与4日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。300 mg/kg群では、投与2日以降の投与後に一過性の流涎がみられた。その他に、300 mg/kg群で体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。

(2) 体重推移 (Fig. 3)

交配開始前において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与4~15日に体重の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠0~21日に体重の有意な低値がみられた。

哺育期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の体重にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0日に体重の有意な低値がみられた。

(3) 摂餌量 (Fig. 4)

交配開始前において、10および30 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて投与6日に摂餌量の有意な低値がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて投与3および6日に摂餌量の有意な低値がみられた。

妊娠期間中において、30および100 mg/kg群では対照群と比べていずれの測定日の摂餌量にも有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠21日に摂餌量の有意な低値がみられた。なお、10 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠21日に摂餌量の有意な低値がみられたが、投与量に依存した変化ではなかった。

哺育期間中において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べて摂餌量に有意差はみられなかった。

(4) 剖検

生存例においては、いずれの群とも異常はみられなかった。

死亡例においては、300 mg/kg群で鼻口周囲の被毛の汚れが1例、腺胃粘膜暗赤色斑が2例みられた。

(5) 器官重量 (Table 4)

剖検日の体重において、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて剖検日の体重の有意な低値がみられた。

器官重量において、10、30および100 mg/kg群では対照群と比べて卵巣の絶対ならびに相対重量に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて卵巣の相対重量の有意な高値がみられたが、対照群との体重差による変化と考えられる。

(6) 病理組織学検査

卵巣:対照群および300 mg/kg群とも、異常はみられなかった。

2. 生殖発生毒性

1) 親動物の生殖発生に及ぼす影響

(1) 発情回数、交尾率および受胎率 (Table 5)

交配前の投与期間(14日間)の発情回数は、各投与群とも対照群と比べて有意差はみられなかった。

対照群の1組を除いた全例で交尾が確認された。交尾所要日数は、各投与群とも対照群との間に有意差はみられなかった。また、交尾率にも、各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

不受胎雌は、300 mg/kg群で2例みられた。しかし、受胎率には各投与群と対照群との間に有意差はみられなかった。

(2) 妊娠期間、分娩状態、妊娠黄体数、着床率および出産率 (Table 6)

妊娠期間は、10および30 mg/kg群では対照群と比べて有意差はみられなかった。100および300 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠期間の有意な延長がみられた。

分娩状態において、対照群、10、30および100 mg/kg群ではいずれの母動物とも異常はみられなかった。300 mg/kg群の3例では、哺育0日に出産児が全例死亡したため、新生児は得られなかった。

10、30および100 mg/kg群では、対照群と比べて妊娠黄体数、着床数および着床率に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて着床数の有意な低値および着床率の低値傾向がみられた。

出産率は、対照群、10、30および100 mg/kg群では100%であった。300 mg/kg群では、3母動物で新生児が得られなかったため出産率は50.0%であり、対照群と比べて有意差はないものの低値であった。対照群および各投与群とも、哺育状態に異常はみられなかった。

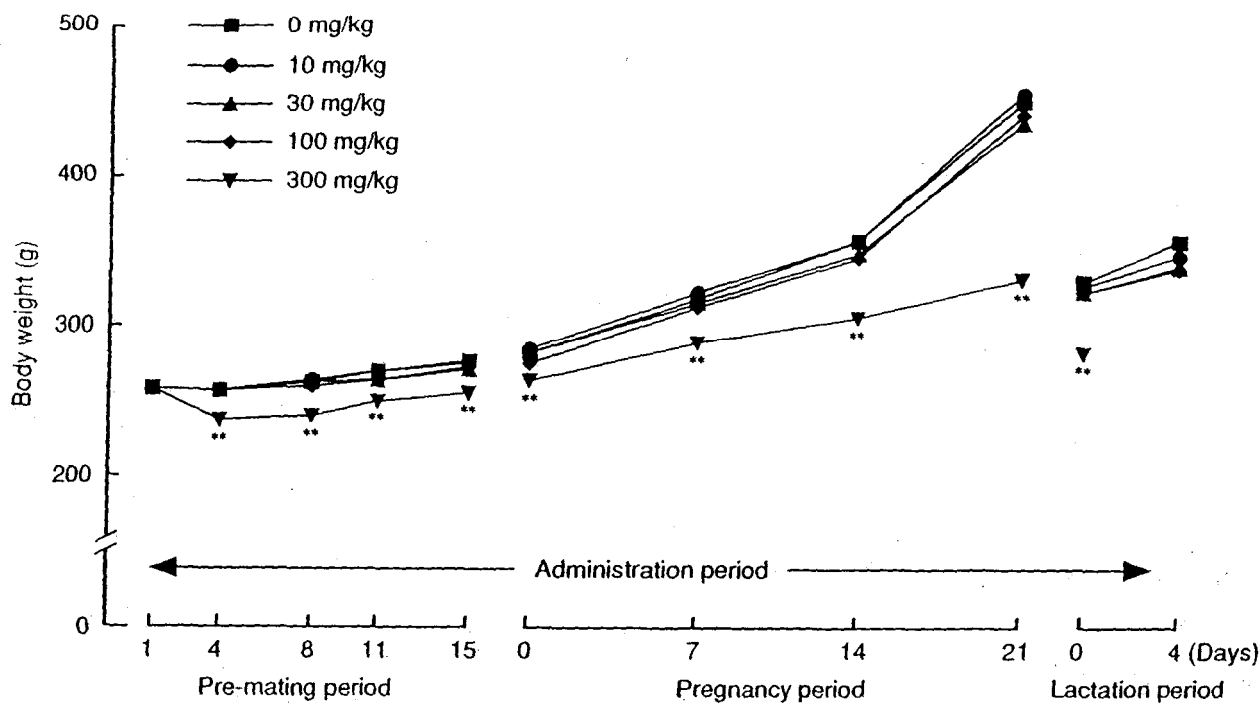


Fig. 3 Body weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (** $p < 0.01$)

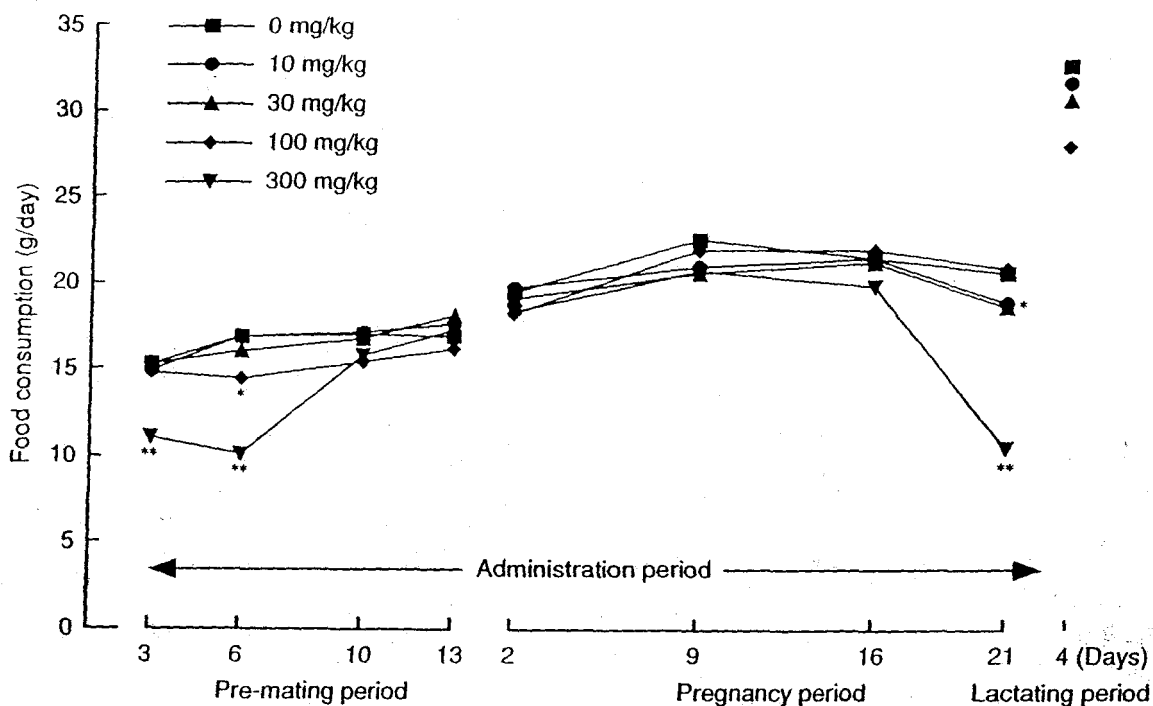


Fig. 4 Food consumption of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

2) 児動物に及ぼす影響

(1) 分娩率および出生率 (Table 6)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べて総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率および出生率に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、対照群と比べて死産児数の有意な高値、

児の産出率および出生率の有意な低値、哺育0日の新生児数の低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、対照群と比べて死産児数の有意な高値、総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率の有意な低値がみられた。

(2) 児動物の一般状態および生存率 (Table 6)

10および30 mg/kg群では、対照群と比べて哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率に有意差はみられなかった。100 mg/kg群では、哺育1日までに全新生児が死亡した母動物が1例みられ、哺育4日の生存児数の有意な低値および新生児の4日の生存率の低値傾向が認められた。300 mg/kg群では、3母動物とも哺育2日までに全新生児が死亡したため、哺育4日の生存児が得られず、新生児の4日の生存率は0%であり、対照群と比べて有意差がみられた。

新生児の外表観察では、いずれの群とも異常はみられなかった。

児動物の一般状態では、いずれの群とも異常はみられなかった。

(3) 児動物の体重推移 (Table 6)

10, 30および100 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0および4日の雌雄別体重に有意差はみられなかった。300 mg/kg群では、対照群と比べて哺育0日の雌雄別体重の低値傾向がみられた。

(4) 児動物の剖検

対照群, 10, 30および300 mg/kg群では、異常はみられなかった。100 mg/kg群では、腎盂拡張が1例みられたが、他の投与群で認められないことから偶発例と考えられる。

考察

4-エチルピフェニルのラットを用いる経口投与簡易生殖毒性試験を行い、雌雄親動物の生殖能力および児動物の発生・発育に及ぼす影響について検討した。

雄に関しては、死亡および瀕死例はいずれの群にも認められなかった。一般状態では、30, 100および300 mg/kg群で投与後に一過性の流涎がみられたが、被験物質の刺激性に基づく変化と判断され、毒性症状とはみなさなかった。体重において、100および300 mg/kg群で低値がみられた。また、摂餌量においては、300 mg/kg群で低値がみられた。剖検、器官重量、精子検査、精巣および精巣上体の病理組織学検査において投与による影響は認められなかった。なお、ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾でも、500 mg/kg以上の群で体重および摂餌量の低値がみられている。

雌に関しては、300 mg/kg群で妊娠末期に4例が死亡した。300 mg/kg群では、一部の例で妊娠末期に体温低下、自発運動の低下、立毛、被毛の汚れおよび軟便がみられた。なお、一般状態観察において、雄の場合と同様に100および300 mg/kg群で認められた流涎は毒性症状とはみなさなかった。体重において、300 mg/kg群で交配前、妊娠期および哺育期に低値がみられた。摂餌量において、100 mg/kg群で交配前に一過性の低値、300 mg/kg群で交配前および妊娠期に低値がみられた。しかし、生存例の剖検所見、器官重量および卵巣の病理組織学検査において投与による影響はみられなかった。なお、300 mg/kg群の死亡例の剖検において、腺胃粘膜暗

赤色斑がみられたが、該当部位の病理組織学検査では異常が認められなかったことから、軽微な変化と考えられる。ラットを用いる28日間反復経口投与毒性試験¹⁾では、死亡例が1000 mg/kg群で雄4/10例と雌1/10例、500 mg/kg群で雄1/5例認められており、妊娠動物の方が4-エチルピフェニルの毒性は強く発現する可能性がある。

親動物の生殖発生に対しては、前述したように10, 30, 100および300 mg/kg群とも精子検査成績、精巣、精巣上体および卵巣に病理組織学変化は認められなかった。発情回数、交尾率、交尾所要日数、受胎率、妊娠黄体数、分娩状態および哺育状態では、投与に起因する変化はみられなかった。しかし、100および300 mg/kg群では、妊娠期間の延長がみられた。また、300 mg/kg群では、着床数の低値、出産率および着床数の低値傾向がみられた。10および30 mg/kg群では、妊娠期間、着床数、着床率および出産率に投与に起因する変化はみられなかった。

児動物に対しては、10および30 mg/kg群では総出産児数、死産児数、哺育0日の新生児数、性比、分娩率、児の産出率、出生率、一般状態、哺育4日の新生児数、哺育4日の生存率に投与による影響はみられなかった。100 mg/kg群では、死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値あるいは低値傾向がみられた。300 mg/kg群では、死産児数の高値、総出産児数、哺育0日の新生児数、分娩率、児の産出率および出生率の低値がみられ、哺育4日の生存児は1例も得られなかった。新生児の外表観察において、投与に関連した変化はみられなかった。児動物の体重では、10, 30および100 mg/kg群では対照群との間に差はみられなかった。300 mg/kg群では、哺育0日の雌雄別体重の低値あるいは低値傾向がみられた。児動物の剖検では、投与に起因する変化はみられなかった。

以上のように、4-エチルピフェニルの一般毒性学的無影響量は、雄では100 mg/kg投与により体重に影響が認められたことから30 mg/kg/day、雌では100 mg/kg投与により摂餌量に影響が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。また、生殖発生毒性学的な無影響量は、雄では300 mg/kg投与しても精子検査成績、精巣および精巣上体の病理組織学検査成績、交尾率に影響が認められなかったことから300 mg/kg/dayと考えられる。雌では100 mg/kg投与で妊娠期間の延長が認められたことから30 mg/kg/dayと考えられる。児動物では、100 mg/kg投与で死産児数の高値、児の産出率および出生率の低値、哺育0日の新生児数、哺育4日の生存児数および新生児の4日の生存率の低値傾向がみられたことから30 mg/kg/dayと考えられる。

文献

- 1) 大原直樹ほか, 化学物質毒性試験報告, 7, 608 (1999).
- 2) M. Kato et al., *Congenital Anomalies*, 35, 394 (1995).

連絡先

試験責任者：古橋忠和

試験担当者：牧野浩平，内藤一嘉，藤村高志，
木村 均

(株)日本バイオリサーチセンター 羽島研究所

〒501-6251 岐阜県羽島市福寿町間島6-104

Tel 058-392-6222 Fax 058-392-1284

Correspondence

Authors: Tadakazu Furuhashi (Study director)

Kohei Makino, Kazuyoshi Naito,

Takasi Fuzimura and Hitoshi Kimura

Nihon Bioresearch Inc.

6-104, Majima, Fukuju-cho, Hashima, Gifu, 501-

6251, Japan

Tel +81-58-392-6222 Fax +81-58-392-1284

Table 1 Organ weight of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)		0	10	30	100	300
Number of males		12	12	12	12	12
Body weight	(g)	502.3±39.9	491.8±20.5	498.8±23.9	453.2±36.5**	411.7±25.1**
Testes	(g)	3.568±0.340	3.503±0.269	3.563±0.413	3.558±0.270	3.607±0.288
	(g%)	0.714±0.097	0.715±0.061	0.714±0.086	0.788±0.059	0.878±0.049**
Epididymides	(g)	1.250±0.073	1.290±0.098	1.261±0.116	1.262±0.070	1.151±0.118
	(g%)	0.250±0.023	0.264±0.023	0.253±0.022	0.279±0.026*	0.279±0.024*

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (* p <0.05, ** p <0.01).

Table 2 Observation of sperm in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)		0	10	30	100	300
Number of males		12	12	12	12	12
Sperm motion parameters						
After 30 min. incubation						
Motility ratio (%)		88.50±7.46	86.79±3.68	86.88±4.19	88.38±3.18	88.33±2.42
Path velocity (μ m/s)		160.99±16.47	163.03±6.87	160.95±4.48	165.85±7.88	164.34±9.23
Straight line velocity (μ m/s)		115.93±15.93	119.69±5.96	117.60±6.25	119.92±6.44	118.03±8.14
Curvilinear velocity (μ m/s)		367.77±31.58	376.40±12.37	363.23±12.29	381.67±15.55	381.93±20.57
Beat cross frequency (Hz)		31.11±1.35	30.84±0.89	30.25±2.22	31.14±1.28	32.63±1.64
Morphology of sperm						
Abnormal ratio (%) ^a		3.72±2.80	4.31±3.37	4.66±4.12	2.78±0.98	2.73±1.02
Viability (%) ^b		99.20±1.21	98.35±2.12	98.34±2.27	99.09±0.61	99.25±0.57
Survivability (%) ^c		87.08±3.86	85.03±4.69	84.98±7.55	86.60±3.48	84.18±3.47
Number of sperms in left cauda epididymis ($\times 10^6$)		265.51±52.70	274.13±38.27	272.24±56.87	271.93±41.72	227.70±43.55
Number of sperms/g (left cauda epididymis) ($\times 10^6$)		883.81±131.49	879.64±67.73	885.38±161.62	894.24±122.03	858.48±94.28

Each value shows mean±S.D.

a) (Number of abnormal sperms/300 sperms) \times 100.

b) (Number of live sperms+number of dead sperms during the 2 hrs. incubation)/300 sperms \times 100.

c) (Number of live sperms after the 2 hrs. incubation/300 sperms) \times 100.

Table 3 Histopathological findings of male rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0						300					
	N ^a	A ^b	±	+	2+	3+	N	A	±	+	2+	3+
Incidence and grade												
Findings												
Testis	[12] ^c						[12]					
Retention, spermatid, group 3, seminiferous tubule	11	1	1	0	0	0	12	0				

Grade of histopathological findings; ±: slight, +: mild, 2+: moderate, 3+: marked.

a) No abnormality detected.

b) Abnormality detected.

c) Examined number of males.

No remarkable changes were seen in the epididymis.

Table 4 Organ weight of female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of females	12	12	12	12	8
Body weight (g)	356.7±22.1	346.8±18.8	340.0±18.0	335.6±18.1*	284.3±21.3**
Ovaries (mg)	101.38±10.29	107.16±12.70	106.98±14.05	105.35±15.01	119.55±22.29
(mg%)	28.48±3.17	31.03±4.36	31.52±4.39	31.38±4.05	42.30±8.79**

Each value shows mean±S.D.

Significantly different from control (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

Table 5 Number of estrous cases and reproductive performance of male and female rats in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of females	12	12	12	12	12
Number of estrous cases before mating (14 days)					
Mean±S.D.	3.4±0.7	3.3±0.5	3.3±0.5	3.4±0.5	2.9±0.5
Number of pairs	12	12	12	12	12
Number of pairs with successful copulation	11	12	12	12	12
Copulation index (%) ^a	91.7	100.0	100.0	100.0	100.0
Number of conceiving days					
Mean±S.D.	1.8±0.9	2.4±1.2	2.9±1.4	2.2±1.1	2.5±1.6
Conceiving days 1-5	11	12	12	12	11
Conceiving days ≥6	0	0	0	0	1
Number of pregnant females	11	12	12	12	10
Fertility index (%) ^b	100.0	100.0	100.0	100.0	83.3
Number of dead pregnant females	0	0	0	0	4
Number of live pregnant females at delivery	11	12	12	12	6
Number of pregnant females with live pups	11	12	12	12	3

a) (Number of pairs with successful copulation/number of pairs)×100.

b) (Number of pregnant females/number of pairs with successful copulation)×100.

Table 6 Observation of pups in preliminary reproduction toxicity screening test of 4-ethylbiphenyl by oral administration

Dose (mg/kg)	0	10	30	100	300
Number of dams	11	12	12	12	6
Length of gestation (days)	22.18±0.40	22.50±0.52	22.50±0.67	22.83±0.39**	23.00±0.00**
Corpora lutea	17.0±1.9	17.5±2.5	17.8±2.0	16.6±1.8	14.3±3.1
Implantation scars	16.0±1.5	15.9±1.5	16.3±1.8	15.9±2.0	12.2±2.8**
Implantation index (%) ^{a)}	94.6±7.5	91.8±8.9	91.8±10.7	96.0±5.2	85.3±13.6
Gestation index (%) ^{b)}	100.0	100.0	100.0	100.0	50.0
Pups born	15.3±1.8	15.4±1.4	15.3±1.1	14.8±2.7	7.0±3.7**
Stillbirths	0.1±0.3	0.4±0.7	0.3±0.5	2.1±3.8**	6.3±3.3**
Live pups born	15.2±2.0	15.0±1.5	15.0±1.4	12.8±3.9	0.7±0.8**
Sex ratio ^{c)}	1.11±0.42	1.21±0.64	1.06±0.49	1.44±1.49	0.00 (2)
Delivery index (%) ^{d)}	95.4±6.0	96.8±3.3	94.3±5.2	92.7±9.2	58.3±25.1*
Birth index (%) ^{e)}	94.7±7.9	94.3±4.9	92.6±4.7	80.3±22.3*	5.0±5.9**
Live birth index (%) ^{f)}	99.3±2.4	97.3±4.2	98.2±3.3	87.0±22.7*	8.2±10.6**
Live pups on day 4 of lactation	14.8±2.1	15.0±1.5	14.7±1.8	11.7±4.6*	0.0±0.0** (3)
Viability index (%) ^{g)}	97.5±4.3	100.0±0.0	97.6±3.6	86.3±27.9	0.0±0.0** (3)
External anomalies (%) ^{h)}	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0 (3)
Body weight of pups (g)					
Male					
Day 0	6.69±0.59	7.01±0.39	6.96±0.48	6.75±0.51	5.40 (1)
4	11.30±1.45	11.63±1.12	11.14±1.22	10.45±1.22(11)	—
Female					
Day 0	6.40±0.69	6.68±0.31	6.62±0.57	6.44±0.51	5.05 (2)
4	10.83±1.51	11.01±0.89	10.56±1.39	10.10±1.17(11)	—

Each value shows mean±S.D. per dam.

Figures in parentheses indicate number of dams.

Significantly different from control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

a) (Number of implantation scars/number of corpora lutea)×100.

b) (Number of dams with live pups/number of pregnant dams)×100.

c) Number of male pups born/number of female pups born.

d) (Number of pups born/number of implantation scars)×100.

e) (Number of live pups born/number of implantation scars)×100.

f) (Number of live pups born/number of pups born)×100.

g) (Number of live pups on day 4/number of live pups born)×100.

h) (Number of pups with external anomalies/number of live pups)×100.