

4. 2 世代繁殖毒性試験報告書

2,4-ジクロロフェノール

2,4-ジクロロフェノールのラットを用いた繁殖試験

1. 要約：

2,4-ジクロロフェノール(2,4-DCP)は、主として染料や除草剤の中間体として製造される化合物である¹⁾。また、飲料水の消毒や汚水の脱臭工程で、フェノールと塩素が自然反応して形成される場合もあると報告されている²⁾。2,4-DCPはウシのエストロゲン受容体とは結合せず³⁾、ヒトのエストロゲン受容体とも結合しない⁴⁾。また、組換え培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイではエストロゲン応答配列(ERE)依存的な遺伝子の転写活性化を起こさないと報告されているが⁴⁾、酵母ツーハイブリッドアッセイ及びヒト乳ガン細胞を用いる細胞増殖試験においては、極めて弱いながらもエストロゲン活性が報告されている^{5), 6)}。しかし、ラットに対する明らかな生殖毒性や催奇形性は認められておらず^{2, 7)}、現時点ではこの物質が内分泌かく乱作用を有するか否か明らかでない。

2,4-DCPを0, 500, 2000及び8000 ppm(雄に対して0, 33.4, 134, 543 mg/kg/day; 雌に対して0, 49.1, 194, 768 mg/kg/day相当)の濃度で混合した飼料を1群当たり雌雄各24匹のWistar Hannoverラットに2世代にわたって摂取させ、親動物の繁殖能力と仔動物の発生・発育に及ぼす影響を検討した。

2,4-DCPの親動物に対する影響は、2000及び8000 ppm投与群で用量反応関係を伴って観察された。すなわち、2000 ppm投与群ではF0雌親動物の摂餌量が投与第8週から9週にかけて有意に低下し、これを反映して、投与0-9週及び0-10週の値として算出した体重増加量にも対照群と比較して有意な低値が認められた。この投与群では、F1雌親動物の体重増加量も妊娠0-14日の値が有意に低かった。しかし、雄においては被験物質投与に関連すると解釈される変化は何も認められず、雌についてもその他の指標に変化は観察されなかった。一方、8000 ppm投与群では、F0及びF1世代の雌雄の親動物に臨床所見として下腹部被毛の汚染が高頻度に観察され、雌雄の親動物の体重、体重増加量及び摂餌量は、F0世代の雄親動物を除いていずれも試験期間を通じて対照群の値より有意に低かった。

8000 ppm投与群では、下腹部被毛汚染と共にF0及びF1雄親動物の腎臓の相対重量に有意な高値が観察され、F0雄親動物の剖検では腎盂拡張の出現率も有意に高かった。そこで、対照群を含む各群からF0及びF1世代の雄親動物を無作為に10匹ずつ選抜して、病理組織学的検査を実施した。しかし、これらの変化と被験物質投与との関係を明らかにすることはできなかった。

親動物の繁殖と仔動物の発育に対する2,4-DCPの影響は、2000 ppm以上の投与群で用量反応関係を伴って観察された。高用量群である8000 ppm投与群では、F0世代の親動物の生殖能力に異常はみられなかったものの、雌雄のF1哺育仔の体重が哺育7日以降

一貫して低く，発育分化の指標である眼瞼の開裂にも明らかな遅延が認められた。一方，F1世代の親動物として選抜されなかったF1雌離乳仔の剖検では，体重の有意な低値にも関わらず子宮重量の絶対値の有意な増加が認められた。さらに，F1親動物として選抜された雌では性成熟の僅かな早期化，着床数の有意な低下及び出産仔数の僅かな低下が観察され，これらの動物から得られたF2哺育仔についても，哺育期間中における低体重，発育遅延及び雌離乳仔における子宮重量の増加がF1哺育仔と同様に観察された。

2000 ppm投与群では，F1離乳仔の子宮重量の僅かな増加と，F1雌親動物における膣開口日齢，着床数及び出産仔数の僅かな低下が観察された。これら所見は，いずれも8000 ppm投与群でみられたものと同様の变化であるものの，F1離乳仔の子宮重量を除いては統計学的な有意差を伴わないごく僅かな変化であった。500 ppm投与群では，親動物の繁殖と仔動物の発育に関する各指標に，被験物質の投与に起因する悪影響は観察されなかった。

今回の試験において8000 ppm投与群の雌に観察された所見のうち，離乳時における子宮重量の増加，性成熟の僅かな早期化（膣開口日齢の僅かな低下と開口時体重の有意な低値），及び着床数と出産仔数の低下は，いずれもエストロゲン様作用を持つメトキシクロールの2世代繁殖試験でより明瞭に観察されている変化であった⁸⁾。しかし，この化合物のエストロゲン受容体に対する親和性はそれ程強くないことが既に報告されており^{3) 6)}，今回の試験と平行して実施した卵巢摘出雌ラットを用いた子宮増殖アッセイにおいても，この化合物に子宮増殖作用は認められていない^{9) 10)}。これらの事実を考えると，2,4-DCPは直接的にエストロゲン受容体を介さない機序で子宮重量の増加や性成熟の早期化，あるいは着床数の低下を引き起こすものと推察されるが，現在のところその詳細な機序は不明である。

今回の試験では，対照群を含む各群における雌親動物で哺育仔を離乳した後の臨床所見として観察された乳腺の膨隆の出現頻度が，全ての投与群で対照群の値を有意に上回った。F0世代の雌親動物の観察から，この所見は離乳の翌日から数日間継続して観察された後，徐々に退行する性質のものであることが明らかとなった。そこで，F1母動物は哺育仔を離乳した翌日に安楽死させて剖検した。また，対照群と8000 ppm投与群の母動物からそれぞれ10匹を無作為に選抜して乳腺の病理組織学的検査を実施すると共に，全ての個体についてプロラクチンを含む種々のホルモンの血中濃度を測定した。観察の結果，これらの個体では全例に乳汁の貯留が認められ，対照群と8000 ppm投与群の動物の間に質的な差を検出することはできなかった。また，対照群と各投与群の母動物の間でプロラクチンを含む種々のホルモンの血中濃度に差はみられず，この所見の発生機序や内分泌系の関与の有無あるいは毒性学的意義を明らかにすることはできなかった。

以上の結果から，2,4-DCPの親動物に対するに関して，500 ppm（雄に対して33.4

mg/kg/day , 雌に対して49.1 mg/kg/day相当)の用量は無毒性量 (NOAEL) であり , 2000 ppm (雄に対して134 mg/kg/day ; 雌に対して194 mg/kg/day相当)の用量は最小中毒量 (MTD) であると判断される。また , 2,4-DCPは生殖毒性を有することが判明したが , 親動物の繁殖と仔動物の発生・発育に及ぼす影響に関する無毒性量 (NOAEL) は2000 ppmであると結論される。

2. 検体名及び純度：2,4-ジクロロフェノール (2,4-DCP) , 純度 99.7%
(和光純薬工業株式会社 , Lot No. SEH1980)
3. 試験実施機関：財団法人 残留農薬研究所
4. 試験目的：新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) の研究プロジェクトである「化学物質の内分泌かく乱効果に対する評価及び試験法の開発事業」の一環として、2,4-ジクロロフェノールを混合した飼料を 2 世代にわたってラットに摂取させ、親動物の繁殖能力と仔動物の発生・発育に及ぼす影響を検索することを目的とした。
5. 試験動物：SPF Wistar Hannover (BrlHan:WIST@Jcl)ラット (日本クレア株式会社) , 1 群雌雄各 24 匹 , F0 親動物は投与開始時 5 週齢
6. 投与期間：投与開始から仔動物の離乳まで , F0 及び F1 親動物ともに , 雄で約 17 週間 , 雌で約 18 週間。
(2000 年 10 月 3 日 ~ 2001 年 6 月 23 日)。
7. 投与方法：被験物質を 0, 500, 2000 及び 8000 ppm の濃度で基礎飼料 (NIH-07M) に混合して , 動物に給与した。
8. 投与用量の設定理由：被験物質の投与量は , 2,4-ジクロロフェノールのラットにおける繁殖毒性試験：用量設定試験 (財団法人残留農薬研究所で実施) の結果に基づいて設定した。用量設定試験では , 2,4-ジクロロフェノールを 0 (基礎飼料のみ) , 500 , 1000 , 5000 及び 10000 ppm の濃度で混合した飼料を , 1 群当たり雌雄各 8 匹の Wistar Hannover ラットに交配前 3 週間ならびに妊娠及び哺育期間を通じて摂取させ , 親動物の繁殖能力と仔動物の成長に及ぼす影響について検討した。親動物に対する一般毒性的影響は , 1000 ppm 以下の投与群では何も認められなかった。5000 ppm 投与群では , 雄に対する影響は明らかではなかったものの , 育成期間中における雌の体重増加量と摂餌量が対照群の値より有意に低かった。また , F1 仔動物を離乳した後の雌に , 剖検所見として乳腺の膨隆 (軽度) が 4 例観察された。10000 ppm 投与群では被験物質投与の影響がより強く認められ , 試験期間中における雌雄の体重増加量及び摂餌量はいずれも有意に抑制された。また , 乳腺の膨隆が 5 例の雌に観察され , その程度は 5000 ppm 投与群の雌にみられたものより重篤であった。この投与群では , 雌の下垂体及び卵巣の重量が対照群の

値をやや下回った。親動物の繁殖能力に対する影響は、いずれの投与群においても認められなかった。被験物質のF1仔動物に対する影響は、5000 ppm以下の投与群では何もみられなかった。10000 ppm投与群では、哺育中期から後期にかけて哺育仔の体重増加が抑制され、雄では哺育7日以降の全ての体重値が、雌では哺育14日と21日の値が、いずれも対照群の値より有意に低かった。この投与群では、身体発達に関する各指標にも僅かながら低値がみられ、被験物質の仔動物に対する発育抑制作用が示唆された。これらの結果から、2世代繁殖試験における被験物質の投与用量を10000 ppm以上とすると仔動物の発育に及ぼす影響が過大となってF1世代の親動物の選抜に支障を来す恐れがあるため、高用量として8000 ppm程度の用量が適当であると判断された。また、低用量としては500 ppmの用量が適当であることが示唆された。5000 ppm以上の投与群の雌に観察された乳腺の膨隆については、この所見が仔動物の離乳後における乳汁産生の継続を意味するものである可能性が示唆されるため、2世代繁殖試験において乳腺や下垂体の病理組織学的検査を実施するとともに、プロラクチンなどの下垂体ホルモンを定量的に解析することにより、影響の本態を明らかにする必要があると考えられた。

9. 飼育条件

- 9.1 基礎飼料：NIH-07M 粉末飼料（日本クレア株式会社製，Lot no. H7011-YE）を自由摂取させた。
- 9.2 飲料水：殺菌した井戸水を動物に自由摂取させた。
- 9.3 飼育環境：動物を、温度 22 ± 2 ，相対湿度 $55 \pm 15\%$ ，換気回数 10 回/時間，明暗サイクル 12 時間間隔(7 時点灯-19 時消灯)に設定したバリアーシステム飼育室に収容した。育成期間中の動物は、ステンレス製金網床ケージ(W310 × D440 × H230 mm，高島商店)に、雌雄別に 3 匹ずつ群飼した。交配期間中は、簀子及び窓付きアルミニウム製ケージ (TR-360，W260 × D400 × H240 mm，トキワ科学器械株式会社) に雄と雌を 1 匹ずつ収容した。妊娠及び哺育期間中の雌は、巣材（サンフレーク，オリエンタル酵母工業株式会社）を入れたアルミニウム製繁殖用ケージ (TR-358B，W260 × D400 × H200 mm，トキワ科学器械株式会社) に 1 匹ずつ収容して分娩と哺育を行なわせた。交配終了後の雄と哺育終了後の雌は、剖検までの間育成期間中と同様の方法で飼育した。

10. 方法及び試験項目：概要を，表 1. に示す。

10.1 一般状態及び死亡； 個々の動物について，生死，外観，行動等を 1 日 1 回観察した。

10.2 体重及び摂餌量； 雄の体重と摂餌量を，毎週測定した。雌の体重は，育成期間中は毎週，妊娠期間中は妊娠 0，7，14 及び 20 日，哺育期間中は哺育 0，7，14 及び 21 日にそれぞれ測定した。また，これらの期間について摂餌量も測定した。

10.3 交配及び妊娠の確認； 雌雄とも投与第 10 週終了後（F0 世代，15 週齢：F1 世代，13 週齢）から交配を開始した。発情前期の雌を夕刻に雄のケージに移し，1：1 で同居させた。翌日から毎日午前中に膣栓及び膣垢中の精子の有無を調べ，いずれかが認められた場合に交尾が行われたものと判断して，その日を妊娠 0 日とした。交配期間の限度を 2 週間とし，この間に交尾の証拠が得られなかった雌については，交尾経験を有する同群内の別の雄と更に 1 週間同居させた。

妊娠は，出産の有無及び剖検時に着床痕の有無を調べることにより確認した。

F1 親動物は，4 日以内に出産の認められた腹から雌雄の離乳仔を原則として 1 匹ずつ選抜した。この期間内に出産の認められた腹数が 24 腹に満たない群については，無作為に選んだ腹から 2 匹目の F1 仔動物を選抜して，各群の F1 親動物数を 24 匹とした。

10.4 繁殖に関する指標； 親動物の繁殖期間中における観察結果に基づき，次の指標を算出した。

性成熟：雄は包皮分離及び雌は膣開口を指標として，それぞれ生後 35 日及び 27 日から達成日まで毎日個々の動物を観察し，達成日に体重を測定した。

正常性周期率 = 正常性周期を示す雌数 / 検査雌数

発情周期長（最初の発情期から次の発情期の前日までの日数）

交尾率 = 交尾を認めた雄または雌数 / 交配に用いた雄または雌数

受胎率 = 妊娠雌数 / 交尾を認めた雌数

出産率 = 生存仔出産雌数 / 妊娠雌数

妊娠期間（交尾を認めた日から分娩終了までの期間）

着床数（剖検時に着床痕を計数した）

出産仔数

卵巣における原始卵胞数（対照群と高用量群の F1 雌親動物から、各々 10 匹を選抜して検査した）

10.5 精子検査；

雄全例について、剖検時に検査した。

精巣の精子頭部数（血球計算盤を用いて顕微鏡下で計数した）。

精巣上体の精子の数及び運動性（精子自動解析装置（CellSoft™3000，ニューロサイエンス社）を用いて調べた）。

精巣上体の精子の形態（塗抹染色標本を作製し、顕微鏡で各個体 200 個観察して、異常形態精子の出現率を求めた）。

10.6 ホルモンレベル測定；全ての F1 母動物（各群 24 匹）から仔動物を離乳した翌日（出

産後 22 日）に血液を採取して、血清中の LH，FSH，プロラクチン，プロゲステロン及びエストロゲンの濃度を、RIA 法で測定した。測定は、財団法人残留農薬研究所化学部で実施した。

10.7 仔動物に関する指標；哺育期間中における一般状態を、毎日観察した。

体重を、哺育 0，4，7，14 及び 21 日に個体別に測定した。

F2 哺育仔の肛門生殖突起間距離を、哺育 4 日に測定した。

性比 = 総雄出産仔数 / 総出産仔数

哺育 0 日生存率 (%) = (哺育 0 日生存仔数 / 出産仔数) × 100

哺育 4 日生存率 (%) = (哺育 4 日生存仔数 / 哺育 0 日生存仔数) × 100

哺育 21 日生存率 (%) = (哺育 21 日生存仔数 / 哺育 4 日に選抜した仔数) × 100

10.8 仔動物の発育分化；各腹の生存哺育仔全例について下記の検査を実施して、

観察日齢における同腹哺育仔の完成率を雌雄毎に算出した。

耳介開展（哺育 3 日）

切歯萌出（哺育 11 日）

眼瞼開裂（哺育 14 日）

10.9 仔動物の反射反応性検査；

各腹の生存哺育仔全例について下記の検査を実施して、同腹哺

育仔の反応時間または達成率を雌雄毎に算出した。

正向反射（哺育 7 日，所要時間）

背地走性（哺育 11 日，所要時間）

空中正向反射（哺育 18 日，達成率）

- 10.10 臓器重量； 雌雄の F0 及び F1 親動物の全例について，脳，下垂体，甲状腺，肝臓，腎臓，脾臓，副腎，精巣，精巣上部，精嚢（凝固腺含む），前立腺，卵巣及び子宮の重量を測定した。
F1 及び F2 離乳仔については，全ての腹から雌雄各 1 匹を選抜して，脳，胸腺，脾臓及び子宮の重量を測定した。
両側性の臓器の重量については，左右の平均値を表示した。
- 10.11 剖検； 全ての親動物，哺育期間中に死亡した哺育仔，哺育 4 日に選抜されなかった哺育仔及び次世代の親動物として選抜されなかった離乳仔を，安楽死時に剖検した。母動物の剖検に際し，F0 雌については哺育仔を離乳後に性周期の観察を開始し，発情前期にある個体を離乳後の経過日数にこだわらず（哺育仔を離乳後 2-8 日目）に安楽死させた。F1 雌については，哺育仔を離乳した翌日に性周期にこだわらず安楽死させた。
- 10.12 病理組織学的検査； 対照群と高用量群の F0 及び F1 親動物について，哺育仔を離乳できた雌雄の組を無作為に 10 組選び，生殖器官（卵巣，卵管，子宮，膣または精巣，精巣上部，精嚢，凝固腺及び前立腺），下垂体，甲状腺，副腎及び乳腺を，病理組織学的に検査した。生殖器官と下垂体，甲状腺及び副腎の病理組織学的検査は，対照群を含む各群の交尾または妊娠の証拠が得られなかった雌雄の組についても実施した。さらに，高用量群における F0 及び F1 雄親動物の腎臓については重量の体重比に有意な増加がみられたため，F0 雌親動物の肝臓についてはごく軽微ながらも増加の傾向がみられたので念のため，それぞれ対照群を含む全ての群から無作為に 10 匹を選抜して，これらの臓器の病理組織学的検査を行なった。
対照群を含む全ての群から無作為に選抜した各群 10 匹の F2 雌離乳仔について，子宮の病理組織学的検査を実施した。

10.13 統計学的解析； 親動物の体重，体重増加量及び摂餌量，着床数，精巢の精子頭部数及び精巢上体の精子数，原始卵胞数，産仔数，親動物と仔動物の臓器重量，ならびに哺育仔の肛門生殖突起間距離と体重については，まず Bartlett の等分散性検定を行なった（有意水準 5%）。次に，各群の分散が等しい場合は，一元配置分散分析法を用いて群間の有意差の有無を調べた（有意水準 5%）。群間に有意差が認められる場合は，さらに Dunnett 法または Scheffé 法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%，1% 及び 0.1%）。一方，各群の分散が等しくない場合は，Kruskal-Wallis の順位検定法を用いて群間の有意差の有無を調べた（有意水準 5%）。群間に有意差が認められる場合は，さらに Dunnett 型または Scheffé 型の順位和検定法を用いて投与群と対照群の間の有意差を判定した（有意水準 5%，1% 及び 0.1%）。親動物の臨床所見の出現頻度，正常発情周期の出現頻度，交尾率，受胎率，出産率，剖検所見の出現頻度及び病理組織学的所見の出現頻度，ならびに仔動物の性比と病理組織学的所見の出現頻度については Fisher の直接確率計算法（有意水準 5%，1% 及び 0.1%）を，親動物の性成熟に関する成績，発情周期長，妊娠期間，精巢上体の精子の運動率と正常形態精子の出現頻度，ならびに仔動物の生存率，臨床所見の出現頻度及び剖検所見の出現頻度については Mann-Whitney の U 検定法（有意水準 5% 及び 1%）を，それぞれ用いた。

表 1. 試験の概要

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
F0	育成(10)		動物の一般状態を毎日観察。 体重及び摂餌量を週1回測定。
	交配(3)	雌雄を1:1で同居させた。膣栓または膣垢中の精子の有無により交尾を確認。交尾確認日を妊娠0日とした。	交配前2週間及び交尾確認日まで雌の膣垢を採取して、性周期を観察。
	妊娠(3)		体重(妊娠0,7,14及び20日)及び摂餌量(妊娠0-7,7-14及び14-20日)を測定。
	出産	出産確認日を哺育0日とした。	出産仔,生存仔及び死産仔の性と数を記録。
	哺育(3)	哺育4日に、各腹の哺育仔数を8匹(可能な限り雄4匹,雌4匹)に調整した。	親動物の体重(哺育0,7,14及び21日)及び摂餌量(哺育0-7,7-14及び14-21日)を測定。 哺育0,4,7,14及び21日に生存仔数を数え,哺育仔体重を測定。 仔動物の発育分化観察。 仔動物の反射反応性検査。
F0/F1	離乳	4日以内に出産の認められた腹から雌雄の離乳仔を原則として1匹ずつ選抜し,F1親動物とした。この期間内に出産の認められた腹数が24腹に満たない群については、無作為に選んだ腹から2匹目のF1仔動物を選抜して、各群のF1親動物数を24匹とした。 親動物として選抜されなかったF1離乳仔を安楽死。 哺育仔の離乳後、全ての親動物を安楽死。	親動物の剖検,ならびに脳,下垂体,甲状腺,肝臓,腎臓,脾臓,副腎,精巣,精巣上体,精囊(凝固腺含む),前立腺,卵巣及び子宮の重量測定。雄の精子検査。 離乳仔の剖検,ならびに脳,胸腺,脾臓及び子宮の重量測定。 親動物の生殖器官,下垂体,甲状腺,副腎,肝臓及び腎臓の病理組織学的検査。
F1	育成(10)		動物の一般状態を毎日観察。 体重及び摂餌量を週1回測定。 性成熟:雄は包皮分離,雌は膣開口を観察。
	交配(3)	雌雄を1:1で同居させた。膣栓または膣垢中の精子の有無により交尾を確認。交尾確認日を妊娠0日とした。	交配前2週間及び交尾確認日まで雌の膣垢を採取して、性周期を観察。
	妊娠(3)		体重(妊娠0,7,14及び20日)及び摂餌量(妊娠0-7,7-14及び14-20日)を測定。
	出産	出産確認日を哺育0日とした。	出産仔,生存仔及び死産仔の性と数を記録。

世代	期間(週間)	作業手順	試験項目
	哺育(3)	哺育4日に、各腹の哺育仔数を8匹(可能な限り雄4匹,雌4匹)に調整した。	<p>親動物の体重(哺育0, 7, 14及び21日)及び摂餌量(哺育0-7, 7-14及び14-21日)を測定。哺育0, 4, 7, 14及び21日に生存仔数を数え,哺育仔体重を測定。</p> <p>F2 哺育仔の肛門生殖突起間距離を、哺育4日に測定。</p> <p>仔動物の発育分化観察。</p> <p>仔動物の反射反応性検査。</p>
F1/F2	離乳	全てのF2 離乳仔を安楽致死。哺育仔の離乳後、全ての親動物を安楽死。	<p>親動物の剖検,ならびに脳,下垂体,甲状腺,肝臓,腎臓,脾臓,副腎,精巣,精巣上体,精嚢(凝固腺含む),前立腺,卵巣及び子宮の重量測定。雄の精子検査。F1 雌親動物の血清中ホルモンレベル測定。</p> <p>離乳仔の剖検,ならびに脳,胸腺,脾臓及び子宮の重量測定。</p> <p>親動物の生殖器官,下垂体,甲状腺,副腎,肝臓及び腎臓の病理組織学的検査。</p> <p>F2 雌離乳仔の子宮の病理組織学的検査。</p>

11. 結果及び考察：試験結果の概要を，表 2 に示す。

11.1 親動物に及ぼす影響

11.1.1 一般状態及び死亡（要約表2，Tables 1-3）

いずれの用量群においても，親動物の死亡はみられなかった。

雄親動物については，2000 ppm以下の投与群で異常は特に観察されなかった。8000 ppm投与群では，F0世代では投与第2週以降，F1世代では投与第6週以降に下腹部の被毛汚染が観察され始め，その出現頻度は試験の進行に伴って次第に高くなった。この所見は，ほとんどの動物で試験終了時まで継続して観察された。試験期間中におけるこの所見の累積出現頻度は，いずれの世代においても対照群の値より統計学的に有意に高かった。

雌親動物においても，8000 ppm投与群では雄とほぼ同じ時期から下腹部被毛汚染が観察され始めた。この所見は，数週間継続して観察された後一旦消失し，哺育期後半に再発する傾向を示し，その累積出現頻度はF0及びF1両世代で有意に高かった。また，各投与群において哺育仔を離乳した後の雌に乳腺の膨隆が高頻度に観察され，その出現頻度はいずれの世代においても全ての投与群で対照群の値より有意に高かった。この所見については，仔動物の離乳後に性周期の観察期間を設けたF0世代の雌では離乳後の日数の経過と共に消失する傾向が明らかであったことから，この所見自体は一過性の変化であり，2,4-DCP投与群では授乳期からの回復が僅かに遅延することを示唆するものであると考えられる。

11.1.2 体重及び体重増加量（要約表2，Tables 4-7）

500及び2000 ppm投与群における雄親動物の体重及び体重増加量は，いずれの世代においても対照群の値とほぼ同じであった。しかし，8000 ppm投与群における雄親動物の値はいずれの世代においても対照群の値をやや下回り，F0世代においては対照群との差は有意でなかったものの，F1世代では試験期間を通じて対照群の値より有意に低かった。

雌親動物の体重及び体重増加量に関しても，500 ppm投与群の雌親動物に被験物質投与の影響は認められなかった。この投与群では，F0雌親動物の体重増加量が試験開始直後に一過性に低下したが，その後は回復した。2000 ppm投与群では，F0雌親動物の体重増加量が育成期間の終盤に，F1雌親動物の体重増加量は妊娠中期に，それぞれ対照群の値を有意に下回った。8000 ppm投与群では，F0及びF1雌親動物の体重がほぼ全試験期間を通じて対照群の値より有意に低く，体重増加量にもしばしば有意な低値が観察された。

11.1.3 摂餌量（要約表2，Tables 8 and 9）

500 ppm投与群における雌雄親動物の摂餌量は，F0雄親動物の値がしばしば対照群の値を有意に上回ったことを除き，いずれの世代においても対照群の値とほぼ同じであった。2000 ppm投与群では，F0雌親動物の摂餌量が，投与第8週から9週にかけて一時的に低下した。8000 ppm投与群では，F0雄親動物の摂餌量は対照群の値とほぼ同じであったものの，F1雄親動物とF0及びF1雌親動物の摂餌量がほぼ全試験期間を通じて対照群の値より有意に低かった。

11.1.4 繁殖能力（要約表2，Tables 13-17 and 26）

雄親動物の繁殖能力に関しては，8000 ppm投与群のF1雄親動物において性成熟の完了が僅かながら有意に遅延した（包皮分離達成日齢に有意な高値が観察された）ことを除き，被験物質投与の影響はいずれの投与群にも認められなかった。8000 ppm投与群で観察された包皮分離達成日齢の有意な高値に関しても，包皮分離達成時の体重はむしろ対照群の値よりも低いことから，発育遅延を反映した変化であると考えられた。

一方，雌親動物においては，8000 ppm投与群のF1雌親動物で膈開口日齢が僅かに早まり，これらの雌親動物について膈開口時に測定した体重は，対照群の値より有意に低かった。このことは，8000 ppm投与群におけるF1雌親動物の早熟化を示唆するものと思われる。この投与群では，F1雌親動物の着床数と出産仔数に僅かな低値が認められ，着床数の低値については対照群の値との間で統計学的な有意差も観察された。しかし，卵巣における原始卵細胞数は，対照群の値とほぼ同じであった。2000 ppm投与群においても，F1雌親動物の膈開口日齢，着床数及び出産仔数が，対照群の値を僅かに下回った。しかし，いずれの指標に関しても，対照群との差は統計学的に有意なものではなかった。500 ppm投与群では，F0及びF1雌親動物の繁殖成績に，被験物質投与の影響は何も認められなかった。

11.1.5 臓器重量（要約表2，Tables 20-23）

雄親動物の臓器重量に関しては，500及び8000 ppm投与群のF1世代で，下垂体の絶対及び相対重量がいずれも対照群の値より有意に高かった。しかし，いずれの投与群においてもF0世代ではこのような変化は観察されておらず，2000 ppm投与群におけるF1雄親動物の値も対照群の値とほぼ同じであった。また，病理組織学的検査においても特に異常がみられなかったことから，この変化は偶発的な変動であると考えられた。8000 ppm投与群では，この他にF0雄親動物の腎臓とF1雄親動物の脳，腎臓及び精巣の相対重量が，いずれも対照群の値より有意に高かった。しかし，絶対重量には対照群の値との間で有意な差がみられないことから，体重低下と関連した変動と考えられた。

雌親動物については，2000 ppm投与群のF0世代で，副腎重量（絶対重量と相対重量の両者）の有意な低下が観察された。しかし，8000 ppm投与群を含む他の投与群では

このような変化が観察されなかったことから、この変化は偶発的な変動と考えられた。この他に、2000 ppm投与群のF1雌親動物では肝臓の絶対重量が、8000 ppm投与群ではF0雌親動物の卵巣及びF1雌親動物の下垂体、肝臓、腎臓、卵巣及び脾臓の絶対重量が、それぞれ対照群の値より有意に低かった。しかし、これらの臓器の相対重量は対照群の値とほぼ同じであったことから、いずれも体重の低下に起因した変化と判断された。8000 ppm投与群では、その他にF0及びF1雌親動物の脳の相対重量に有意な上昇がみられたが、絶対重量は対照群の値とほぼ同じであったことから、体重低下に起因する変動と考えられた。また、F1雌親動物の子宮の相対重量に有意な高値がみられたが、この投与群では安楽死時（出産後22日）に発情前期であった個体が多かった（対照群で23匹中1匹に対し、8000 ppm投与群では23匹中8匹）ことに起因する変動であると判断された。

11.1.6 剖検及び病理組織学的検査（要約表2，Tables 18, 19, 24 and 25）

8000 ppm投与群のF0及びF1両世代で、下腹部被毛汚染の出現頻度が雌雄とも有意に増加した。また、各群の雌雄の親動物に腎盂拡張が散見され、F0世代では8000 ppm投与群の雄におけるこの所見の出現頻度が対照群の値より有意に高かった。しかし、この所見の出現には、世代間または雌雄間で一定の関係が認められなかった。また、対照群を含む各群からF0及びF1世代の雄を無作為に10匹ずつ選抜して実施した病理組織学的検査では各群で2 - 4匹に腎盂の拡張が観察され、組織学的に観察すれば対照群の動物にも軽度の腎盂拡張が発症していることが判明した。さらに、今回の試験に用いたWistar-Hannover系ラットと起源を同じくするWistar系ラットでは水腎症や腎盂拡張が比較的高頻度で発症することも知られている¹¹⁾ことから、今回の試験においてはこの病変の出現と被験物質投与との関係は明らかではないと判断した。

この他に、雌親動物においては各群で乳腺の膨隆が観察され、哺育仔を離乳後に性周期の観察を開始して発情前期にある個体を離乳後の経過日数にこだわらず（哺育仔を離乳後2- 8日目）に安楽死させたF0世代では8000 ppm投与群でのみ、哺育仔を離乳した翌日に全ての雌親動物を性周期にこだわらずに安楽死させたF1世代では全ての投与群で、それぞれこの所見の出現頻度が有意に増加した。これらの結果は、8000 ppm投与群における仔動物を離乳した後の雌には乳腺退縮が遅延する傾向があるものの、時間の経過に伴っていずれは回復することを示唆するものであると考えられる。

雌親動物の乳腺について、対照群と高用量群からそれぞれ10匹を選抜して、病理組織学的検査を実施した。その結果、哺育仔を離乳した翌日に安楽死させたF1雌親動物では観察した全例に乳汁の貯留が認められ（授乳期からの回復不全と診断された）、対照群と8000 ppm投与群の間に質的な差を検出することはできなかった。

11.1.7 血清中ホルモン測定（特別測定項目；要約表2，Table 27）

哺育仔を離乳した翌日に安楽死させた全てのF1雌親動物について、血清中のLH、FSH、プロラクチン、プロゲステロン及びエストロゲンの濃度をRIA法により測定した。

離乳の翌日に安楽死させた雌の性周期には群間に著しい偏りがみられたため、各群の標本数が比較的揃った発情休止期の個体について詳細に検討した。しかし、いずれのホルモンについても、血清中の濃度に被験物質投与と関連すると思われる変化は認められなかった。

11.2 仔動物の発生・発育に及ぼす影響

11.2.1 一般状態及び死亡（要約表2，Tables 28 and 29）

F1及びF2世代の哺育仔には、いずれの用量群においても被験物質投与によると考えられる変化は認められなかった。

11.2.2 体重（要約表2，Table 30）

500及び2000 ppm投与群におけるF1及びF2哺育仔の体重は、雌雄とも哺育期間を通じて対照群の値とほぼ同じであった。8000 ppm投与群ではいずれの世代においても雌雄の哺育仔の体重に低値が認められ、哺育7日以降には対照群との差が統計学的に有意であった。

11.2.3 出産仔数，性比，仔動物の生存率，及び肛門生殖突起間距離（要約表2，Tables 15 and 31）

F1及びF2哺育仔の出産仔数，性比，哺育0日，4日及び21日の生存率，ならびにF2哺育仔の肛門生殖突起間距離には、いずれの用量群においても被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

11.2.4 発育分化（要約表2，Table 32）

500及び2000 ppm投与群におけるF1及びF2哺育仔の発育分化は、雌雄とも対照群とほぼ同様に進行した。2000 ppm投与群のF2世代では哺育11日における切歯萌出の確認された雄哺育仔の頻度が対照群の値を有意に下回ったが、8000 ppm投与群における値には対照群との間で有意な差は認められなかったことから、偶発的な変動と考えられた。

一方、8000 ppm群では雌雄の哺育仔の発育分化にやや遅れがみられ、哺育14日における眼瞼開裂の完成率は、いずれの世代においても有意に低かった。この低値は、哺育期間中における哺育仔の体重増加抑制に関連した変化であると考えられた。

11.2.5 反射反応性検査成績（要約表2，Table 33）

正向反射及び背地走性に関しては，500 ppm投与群のF1雌哺育仔と8000 ppm投与群の雌雄のF2哺育仔で，反応時間の有意な短縮が観察された。また，8000 ppm投与群のF1雌哺育仔では，空中正向反射の達成率が有意に低かった。しかし，これらの指標で見られた対照群との差はいずれも僅かであり，世代間あるいは雌雄の間に一定の傾向が認められないことから，いずれも偶発的な変動であると考えられる。

11.2.6 臓器重量（要約表2，Tables 36 and 37）

雄については，8000 ppm投与群におけるF2離乳仔の脳，胸腺及び脾臓の絶対重量に，それぞれ有意な低値が認められた。しかし，脳については体重比（相対重量）で見るとF2離乳仔のみでなくF1離乳仔の値も対照群より有意に高いこと，胸腺及び脾臓については相対重量に有意な差がみられないことから，いずれも体重の低値に起因した見かけ上の変化であると判断された。500及び2000 ppm投与群における雄離乳仔の臓器重量は，いずれの世代においても対照群の値とほぼ同じであった。

雌離乳仔の脳，胸腺及び脾臓の重量についても，雄と同様の傾向が観察された。すなわち，8000 ppm投与群では絶対重量に差がみられなかった脳の重量は相対重量に有意な高値が観察され，絶対重量が有意に低かった胸腺と脾臓については，相対重量で見ると対照群との有意差が消失した。したがって，これらの臓器にみられた変動は，いずれも体重の低値に起因した見かけ上の変化であると考えられた。

一方，雌の子宮重量に関しては，絶対重量及び相対重量のいずれについても，F1世代では2000及び8000 ppm投与群の値が，F2世代では8000 ppm投与群の値が，それぞれ対照群の値より有意に高かった。

11.2.7 剖検及び病理組織学的検査（要約表2，Tables 34, 35 and 38）

哺育途中で死亡したF1またはF2哺育仔，哺育4日に間引きされたF1またはF2哺育仔（間引き仔），ならびにF1親に選抜されなかったF1離乳仔の剖検では，いずれの用量群においても被験物質投与の影響と考えられる変化は認められなかった。F2離乳仔の剖検では，500及び2000 ppm投与群における腎盂拡張の出現頻度が，対照群の値より有意に低かった。しかし，これらの投与群で病変の出現頻度が低下したことについて，その毒性学的意義は明らかでない。

各投与群のF2雌離乳仔を無作為に10匹選抜して実施した子宮の病理組織学的検査では，8000 ppm投与群の7匹の動物で子宮角における上皮細胞丈の増加が観察され，その出現頻度は対照群の値（1/10）より統計学的に有意に高かった。500及び2000 ppm投与群では，この所見は出現しなかった。

11.3 考察及び結論

今回の試験では，2,4-DCPの親動物に対する影響が，2000 及び8000 ppm投与群で

用量反応関係を伴って観察された。すなわち，2000 ppm投与群ではF0雌親動物の摂餌量が投与第8週から9週にかけて有意に低下し，これを反映して，投与0-9週及び0-10週の値として算出した体重増加量にも対照群と比較して有意な低値が認められた。この投与群では，F1雌親動物の体重増加量も妊娠0-14日の値が有意に低かった。しかし，雄親動物においては被験物質投与に関連すると解釈される変化は何も認められず，雌親動物についてもその他の指標に変化は観察されなかったことから，親動物に対する悪影響は極軽微なものと考えられる。一方，8000 ppm投与群では，F0及びF1世代の雌雄の親動物に臨床所見として下腹部被毛の汚染が高頻度に観察され，雌雄の親動物の体重，体重増加量及び摂餌量は，F0世代の雄を除いていずれも試験期間を通じて対照群の値より有意に低かった。したがって，この用量は親動物に対する確実中毒量であると判断される。

8000 ppm投与群では，下腹部被毛汚染の出現に伴ってF0及びF1雄親動物の腎臓重量の体重比に有意な高値が観察され，F0雄親動物の剖検では腎盂拡張の出現率も有意に高かった。そこで，対照群を含む各群からF0及びF1世代の雄親動物を無作為に10匹ずつ選抜して，病理組織学的検査を実施した。しかし，病理組織学的検査では対照群を含む各群の2～4匹が腎盂拡張と診断され，詳細に観察すれば対照群の動物にも軽度ながら腎盂拡張を発症している個体が存在することが判明した。したがって，腎盂拡張の出現と被験物質投与の関係は，現時点では明らかでない。また，投与群の動物においても泌尿器系の臓器に腎盂拡張以外の異常は特に観察されず，下腹部被毛汚染の原因を特定することはできなかった。

親動物の繁殖と仔動物の発育に対する2,4-DCPの影響は，2000 ppm以上の投与群で用量反応関係を伴って観察された。高用量群である8000 ppm投与群では，F0世代の親動物の生殖能力に異常はみられなかったものの，雌雄のF1哺育仔の体重が哺育7日以降一貫して低く，発育分化の指標である眼瞼の開裂にも明らかな遅延が認められた。一方，F1世代の親動物として選抜されなかったF1雌離乳仔の剖検では，体重の有意な低値にも関わらず子宮重量の絶対値の有意な増加が認められた。さらに，F1親動物として選抜された雌では性成熟の僅かな早期化，着床数の有意な低下及び出産仔数の僅かな低下が観察され，これらの動物から得られたF2哺育仔についても，哺育期間中における低体重，発育遅延及び雌離乳仔における子宮重量の増加がF1哺育仔と同様に観察された。これらのことから，この用量は親動物の繁殖と仔動物の発育に対する確実中毒量であると考えられる。

2000 ppm投与群では，F1離乳仔の子宮重量の僅かな増加と，F1雌親動物における膈開口日齢，着床数及び出産仔数の僅かな低下が観察された。これらの所見は，いずれも高用量群である8000 ppm投与群でみられたものと同様の変化であるものの，F1離乳仔の子宮重量を除いては，対照群との間で統計学的な有意差を伴わないごく僅かな変化であった。これらの事実を勘案すると，この用量はラットの繁殖及び仔動物の発生・

発育に及ぼす影響に関するほぼ最大耐量である（無毒性量と解釈することが可能である）と考えられる。

500 ppm投与群では，親動物の繁殖と仔動物の発育に関する各指標に，被験物質の投与に起因する悪影響は観察されなかった。

今回の試験において8000 ppm投与群の雌に観察された所見のうち，離乳時における子宮重量の増加，性成熟の僅かな早期化（膣開口日齢の僅かな低下と開口時体重の有意な低値），及び着床数と出産仔数の低下は，いずれもエストロゲン作用を持つメトキシクロールの2世代繁殖試験でより明瞭に観察されている変化であった⁸⁾。しかし，この化合物のエストロゲン受容体に対する親和性はそれ程強くないことが既に報告されており^{3 6)}，今回の試験と平行して実施した卵巢摘出雌ラットを用いた子宮肥大試験においても，この化合物に子宮増殖作用は認められていない^{9 10)}。これらの事実から2,4-DCPは何らかの機序で雌ラットの血中エストロゲン濃度を上昇させる作用を持つことが示唆されたため，F2哺育仔を離乳した翌日にF1母動物を安楽死させて血液を採取し，エストロゲンを含む種々のホルモンについて血中濃度を測定した。しかし，各群の標本数が比較的均一であった発情休止期の雌を対象として詳細に検討したものの，これらのホルモン濃度に対照群と各投与群の間で有意な差を検出することはできなかった。性成熟前後の日齢の雌ラットでは，膣開口の有無に関わらず，子宮重量と血中エストロゲン濃度の間に正の相関性が存在することが示唆されており¹²⁾，今後は性成熟前の離乳仔を材料に用いたホルモン測定実験を実施するなどの検討が期待される。

今回の実験では，対照群を含む各群における雌親動物で哺育仔を離乳した後の臨床所見として乳腺の膨隆が観察され，この所見の出現頻度は全ての投与群で対照群の値を有意に上回った。F0世代の雌親動物を約1週間にわたって詳細に観察したところ，この所見は離乳の翌日から数日間継続して観察された後，徐々に退行する性質のものであった。また，2,4-DCPの投与用量とこの所見の出現頻度の間には，正の相関関係があるように見受けられた。これらの観察結果に基づいて，F1母動物は哺育仔を離乳した翌日に安楽死させて剖検した。また，対照群と8000 ppm投与群の母動物からそれぞれ10匹を無作為に選抜して乳腺の病理組織学的検査を実施すると共に，全ての個体について乳汁産生と関連の深いプロラクチンの血中濃度を測定した。観察の結果，これらの個体では全例に乳汁の貯留が認められ，授乳期からの回復不全（回復の遅れ）と診断された。しかし，対照群と8000 ppm投与群の動物の間に，病理組織学的に質的な差を検出することはできなかった。また，対照群と各投与群の母動物の間でプロラクチンを含む種々のホルモンの血中濃度に差はみられなかったため，この所見の発生機序や内分泌系の関与の有無あるいは毒性学的意義を明らかにすることはできなかった。これらのことから，対照群の動物においても仔動物の離乳直後には乳腺の退縮が不十分で乳汁の残留がみられるものの，この所見は時間の経過と共に消失するものと判断

された。また、2,4-DCP投与群においても対照群の動物と同様の回復傾向がみられたこと、及び、哺育成績には異常が何も認められなかったことから、この所見の発現が被験物質の悪影響を意味するものではないと考えられる。

以上の結果から、2,4-DCPの親動物に対する影響に関して、500 ppm(雄に対して33.4 mg/kg/day、雌に対して49.1 mg/kg/day相当)の用量は無毒性量(NOAE)であり、2000 ppm(雄に対して134 mg/kg/day;雌に対して194 mg/kg/day相当)の用量は最小中毒量(MTD)であると判断される。また、2,4-DCPは生殖毒性を有することが判明したが、親動物の繁殖と仔動物の発生・発育に及ぼす影響に関する無毒性量(NOAE)は2000 ppmであると結論される。

12. 参考文献

- 1) U.S. National Library of Medicine (2001) Hazardous Substances Data Bank (HSDB).
- 2) Exon, J.H., Henningsen, G.M., Osborne, C.A., and Koller, L.D. (1984) Toxicologic, pathologic, and immunotoxic effects of 2,4-dichlorophenol in rats. J. Toxicol. Environ. Health, 14, 723-730.
- 3) Kramer, V.J., and Giesy, J.P. (1999) Specific binding of hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites and other substances to bovine calf uterine estrogen receptor: structure-binding relationships. Sci. Total Environ., 233, 141-161.
- 4) CERl (化学物質評価研究機構) (2001a) 平成12年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究、環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書。
- 5) Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S., and Utsumi, H. (2000) Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. J. Health Sci., 46, 282-298.
- 6) Jones, P.A., Baker, V.A., Irwin, A.J.E., and Earl, L.K. (1998) Interpretation of *in vitro* proliferation response of MCF-7 cells to potential oestrogens and non-oestrogenic substances. Toxicol. in Vitro, 12, 373-382.
- 7) Rodwell, D.E., Wilson, R.D., Nemecek, M.D., and Mercieca, M.D. (1989) Teratogenic assessment of 2,4-Dichlorophenol in Fisher 344 rats. Fundam. Appl. Toxicol., 13, 635-640.
- 8) 青山博昭(2001)農薬の内分泌攪乱作用検出のためのアプローチ 日本農薬学会誌 26, 271-276.
- 9) 2,4-ジクロロフェノールの卵巣摘出雌ラットにおける子宮増殖試験 (IET 00-0067) : 最終報告書, 財団法人 残留農薬研究所
- 10) CERl (化学物質評価研究機構) (2001b) 平成11年度新エネルギー・産業技術総合開発機構委託業務化学物質の内分泌攪乱効果に関する評価及び試験法の開発報告書。
- 11) 鈴木勝士 (1991) 水腎症ラット, 腎と透析特集号: 腎疾患モデル31: 27-30.
- 12) Noda, S., Sawaki, M., Shiraishi, K., Yamasaki, K., and Yamaguchi R. (2002) Age-related changes of genital systems in the female Crj:CD(SD) IGS rats. J. Vet. Med. Sci., 64, 315-319.

表2. 試験結果の概要

世代		親動物：P (F0)				仔動物：F1					
投与量 (ppm)		0	500	2000	8000	0	500	2000	8000		
動物数	雄	24	24	24	24	24	24	24	24		
	雌	24	24	24	24	24	24	24	24		
被験物質摂取量 (mg/kg/day)	雄	*	32.1	128	511	*	34.6	140	574		
	雌	*	48.6	190	749	*	49.5	197	786		
死亡または屠殺	雄	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24		
	雌	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24		
一般状態	雄	被毛汚染	0/24	0/24	0/24	17/24	0/24	0/24	0/24	12/24	
	雌	被毛汚染	0/24	0/24	0/24	20/24	0/24	0/24	0/24	22/24	
		乳腺腫隆 ⁱ⁾	0/23	9/24	7/24	14/24	2/23	13/22	15/22	18/23	
体重増加量 (g)	雄	全試験期間	302 ± 37	307 ± 34	298 ± 34	290 ± 44	384 ± 31	380 ± 39	377 ± 41	354 ± 32	
	雌	育成期間	123 ± 16	115 ± 14 ^{a)}	114 ± 11 ^{b)}	104 ± 12 ^{c)}	169 ± 22	171 ± 16	169 ± 13	156 ± 12 ^{b)}	
		妊娠期間	110 ± 11	109 ± 15	104 ± 14	100 ± 14	106 ± 13	102 ± 11	92 ± 22 ^{d)}	86 ± 15 ^{d)}	
		哺育期間	23 ± 15	17 ± 16	23 ± 14	23 ± 11 ^{e)}	26 ± 13	19 ± 12	21 ± 11	23 ± 9 ^{f)}	
摂餌量 (g)	雄	全試験期間	17.7? 21.1	18.0? 22.4 ^{g)}	18.3? 21.6	16.7? 21.2 ^{h)}	12.1? 23.5	12.3? 22.9	12.2? 23.2	11.3? 21.7 ⁱ⁾	
	雌	育成期間	14.3? 16.8	14.0? 16.2	13.8? 15.7 ^{b)}	13.3? 15.3	11.1? 16.9	10.9? 16.5	11.1? 16.3	10.9? 14.6 ^{c)}	
		妊娠期間	16.3? 20.3	15.4? 20.5	15.7? 19.7	15.6? 18.9	15.3? 21.8	15.1? 20.9	13.3? 20.8	13.2? 18.4	
		哺育期間	36.1? 68.3	35.4? 64.2	35.6? 61.4	30.1? 58.6	37.4? 67.9	35.2? 64.6	33.7? 60.5	29.9? 57.4	
繁殖能力	雄	性成熟	包皮分離達成日齢	*	*	*	*	41.2 ± 1.4	41.2 ± 1.5	41.3 ± 1.6	42.2 ± 1.4
		達成時体重 (g)	*	*	*	*	179.3 ± 12.0	179.3 ± 11.7	179.5 ± 13.4	171.1 ± 12.6	
		交尾率	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	23/24	24/24	
		精子数 (× 10 ⁶)	精巢	236 ± 31	232 ± 25	241 ± 31	228 ± 24	247 ± 26	237 ± 26	255 ± 24	236 ± 27
			精巢上体尾部	137 ± 24	146 ± 29	144 ± 37	146 ± 32	152 ± 29	152 ± 23	163 ± 41	169 ± 29
		精子運動率 (%)	79.9 ± 6.9	80.5 ± 6.0	77.5 ± 5.2	80.5 ± 6.7	79.9 ± 5.6	79.1 ± 6.0	78.6 ± 6.5	79.4 ± 5.1	
		正常形態精子率 (%)	99.0 ± 0.7	98.8 ± 0.9	98.6 ± 1.3	98.8 ± 0.9	98.7 ± 0.8	98.8 ± 0.8	98.4 ± 1.4	98.6 ± 1.1	
	雌	性成熟	膣開口日齢	*	*	*	*	32.2 ± 2.1	32.7 ± 1.3	31.7 ± 2.3	31.5 ± 2.1
		膣開口時体重 (g)	*	*	*	*	108.0 ± 10.5	109.5 ± 7.8	102.2 ± 12.8	95.2 ± 11.4	
		正常性周期	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	
		性周期長 (日)	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.2	4.0 ± 0.1	4.4 ± 1.8	4.1 ± 0.4	4.1 ± 0.3	4.0 ± 0.1	4.1 ± 0.4	
		交尾率	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	24/24	
		受胎率	23/24	24/24	24/24	24/24	23/24	22/24	23/24	23/24	
		出産率	23/23	24/24	24/24	24/24	23/23	22/22	22/23	23/23	
		妊娠期間	22.1	22.1	22.1	21.9	22.1	22.0	22.0	22.1	
		着床数	13.1 ± 1.4	12.8 ± 1.7	12.0 ± 2.6	11.7 ± 2.8	12.7 ± 1.8	12.8 ± 2.5	10.8 ± 3.8	10.2 ± 3.1	
		出産仔数	12.3 ± 1.2	11.9 ± 1.9	11.3 ± 2.5	10.9 ± 2.9	11.7 ± 2.1	11.7 ± 2.1	10.4 ± 3.5	9.3 ± 3.2	
卵巣における原始卵胞数	*	*	*	*	271 ± 75	*	*	291 ± 69			

/ および / : 統計的に有意な高値 / 低値 (それぞれ p 0.05 および p 0.01)。* : 検査せず。

a) 投与0? 2週のみ有意な低下。b) 育成期間の後半? 終盤に有意な低下。c) ほぼ育成期間を通じて有意な低下。d) 妊娠中期? 後期に有意な低下。e) 哺育前期? 中期に有意な低下。

f) 哺育中期のみ有意な低下。g) 育成期間中にしばしば有意な増加。h) 投与第1週のみ有意な低下。i) ほぼ試験期間を通じて有意な低下。j) 離乳仔の得られた雌のみを評価の対象とした。

表 2. 試験結果の概要 (続き-1)

世代		親動物：P (F0)				仔動物：F1						
投与量 (ppm)		0	500	2000	8000	0	500	2000	8000			
動物数		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌			
親動物	臓器重量	雄	絶対重量 (mg)	脳	2120±80	2104±87	2117±71	2090±75	2113±80	2107±75	2103±67	2058±82
				下垂体	11.2±1.9	10.7±2.4	11.4±1.4	10.5±1.3	10.3±1.5	11.9±1.5	10.2±1.2	11.3±1.3
				腎臓	1311±120	1345±118	1347±128	1384±147	1354±94	1372±158	1341±148	1382±134
			精巣	1865±177	1844±157	1838±134	1809±147	1919±138	1865±144	1949±144	1870±148	
			相対重量	脳	0.490±0.034	0.480±0.030	0.494±0.034	0.499±0.052	0.470±0.035	0.474±0.046	0.478±0.043	0.502±0.037
				下垂体 (x10 ⁻³)	2.60±0.48	2.43±0.50	2.66±0.30	2.50±0.35	2.28±0.30	2.66±0.31	2.32±0.29	2.74±0.23
		腎臓		0.302±0.017	0.306±0.015	0.313±0.019	0.328±0.025	0.300±0.023	0.306±0.026	0.302±0.019	0.336±0.025	
		雌	絶対重量 (mg)	脳	1931±69	1932±80	1929±74	1929±74	1885±56	1871±67	1884±70	1864±65
				下垂体	15.0±1.6	14.3±2.1	14.7±1.2	14.1±2.2	14.0±1.8	13.4±1.7	13.6±1.2	12.5±1.6
				肝臓	12231±1071	11990±1326	11769±1313	12342±1545	14778±1307	13974±1047	13577±1237	13067±1792
			相対重量	副腎	47.9±5.9	43.9±6.3	42.7±5.8	45.3±5.5	46.5±7.5	43.9±5.8	44.6±5.3	42.9±4.6
				腎臓	1066±80	1028±89	1025±57	1068±108	1087±87	1038±90	1037±71	1001±103
	子宮			575±273	527±90	514±71	501±90	484±54	506±152	544±117	614±199	
	雌	絶対重量 (mg)	卵巣	59.3±6.3	57.5±7.5	58.4±7.4	53.2±7.5	49.2±5.4	50.0±6.1	48.1±6.1	40.9±6.7	
			脾臓	604±71	598±104	596±62	599±91	623±155	589±66	606±52	518±67	
			脳	0.728±0.045	0.740±0.037	0.744±0.037	0.771±0.048	0.638±0.038	0.645±0.046	0.657±0.037	0.712±0.044	
		相対重量	下垂体 (x10 ⁻³)	5.66±0.64	5.43±0.59	5.66±0.50	5.62±0.71	4.72±0.51	4.61±0.51	4.75±0.39	4.76±0.46	
			肝臓	4.60±0.23	4.57±0.30	4.53±0.42	4.91±0.40	4.99±0.34	4.81±0.27	4.73±0.39	4.97±0.48	
			副腎 (x10 ⁻²)	1.80±0.20	1.67±0.17	1.64±0.19	1.81±0.20	1.57±0.21	1.51±0.17	1.56±0.19	1.64±0.20	
	雌	相対重量	腎臓	0.401±0.023	0.393±0.019	0.395±0.019	0.426±0.035	0.367±0.024	0.356±0.019	0.361±0.021	0.381±0.028	
			子宮	0.217±0.105	0.201±0.033	0.198±0.027	0.200±0.031	0.164±0.022	0.175±0.053	0.190±0.043	0.233±0.068	
			卵巣 (x10 ⁻²)	2.238±0.270	2.193±0.216	2.246±0.262	2.124±0.298	1.662±0.161	1.719±0.193	1.672±0.193	1.558±0.225	
	剖検所見	雄	下腹部 / 外陰部 : 被毛汚染	腎臓 : 腎盂拡張	0/24	1/24	2/24	5/24	2/24	3/24	3/24	4/24
				腎臓 : 腎盂拡張	0/24	0/24	0/24	1/24	1/24	2/24	2/24	6/24
下腹部 / 外陰部 : 被毛汚染			0/24	0/24	0/24	13/24	0/24	0/24	0/24	23/24		
雌		腎臓 : 腎盂拡張	腎臓 : 腎盂拡張	0/24	0/24	0/24	1/24	1/24	2/24	2/24	6/24	
			乳腺 : 膨隆	1/24	0/24	1/24	8/24	2/24	13/24	16/24	18/24	
		腎臓 : 腎盂拡張	2/10	2/10	3/10	3/10	3/10	2/10	4/10	2/10		
病理組織学的所見	雌	乳腺 : 授乳期からの回復不全	3/10	*	*	6/10	10/10	*	*	10/10		
	ホルモンレベル ^{a)}	雌	LH (ng/mL)	*	*	*	*	1.75±0.32	1.71±0.23	2.02±1.30	1.38±0.14	
FSH (ng/mL)			*	*	*	*	5.00±0.27	5.40±0.92	5.67±0.87	5.67±1.03		
Prolactin (ng/mL)			*	*	*	*	3.32±1.03	3.70±2.07	6.12±4.09	3.68±1.49		
Progesterone (ng/mL)			*	*	*	*	10.78±8.26	6.23±2.99	10.24±5.72	5.35±2.32		
17β-Estradiol (pg/mL)			*	*	*	*	7.76±4.79	12.79±4.74	10.86±10.93	10.10±4.96		

/ および / : 統計学的に有意な高値 / 低値 (それぞれ p 0.05 および p 0.01)。* : 検査せず。

a) : 離乳の翌日 (出産後 22 日) に採血した F1 雌のうち、発情休止期であった個体の平均値を評価した。標本数は、0, 500, 2000 および 8000 ppm 投与群で、それぞれ 10, 7, 10 および 7 匹であった。

表2. 試験結果の概要(続き-2)

世代		親動物：P (F0)				仔動物：F1					
投与量 (ppm)		0	500	2000	8000	0	500	2000	8000		
腹数		23	24	24	24	23	22	22	23		
仔動物	生存率 (%)	哺育0日	99.3	99.5	99.3	99.0	99.5	99.0	99.7	99.7	
		哺育4日	100	100	99.1	98.6	99.2	99.6	98.2	100	
		哺育21日	99.5	100	99.5	100	100	100	100	98.9	
		一般状態	哺育0日? 21日	雌雄とも、異常は特に認められなかった				雌雄とも、異常は特に認められなかった			
	体重 (g)	雄	哺育0日	6.1±0.4	6.2±0.4	6.2±0.4	6.1±0.5	6.2±0.6	6.1±0.4	6.2±0.4	6.4±0.7
			哺育7日	18.8±1.7	18.7±1.6	19.0±1.1	17.5±1.4	19.1±1.9	18.8±1.5	19.1±1.3	17.6±1.7
			哺育21日	59.8±3.9	57.7±4.5	57.9±3.2	50.0±3.6	59.2±4.2	57.8±3.1	57.5±3.2	50.4±5.2
		雌	哺育0日	5.8±0.4	5.9±0.4	5.9±0.4	5.7±0.5	5.9±0.5	5.8±0.4	5.8±0.5	6.0±0.6
			哺育7日	18.3±1.6	18.2±1.4	18.5±1.0	16.9±1.5	18.5±1.8	18.3±1.3	18.2±1.4	17.1±1.3
			哺育21日	57.9±3.1	56.1±3.7	55.7±2.7	48.4±3.4	57.0±4.4	55.2±2.7	54.9±3.6	48.7±4.5
肛門生殖突起間距離 (mm, 哺育4日)		雄	*	*	*	*	4.97±0.34	4.83±0.35	4.91±0.31	4.92±0.50	
		雌	*	*	*	*	2.26±0.23	2.25±0.23	2.29±0.27	2.31±0.21	
発育分化 (完成率, %)	雄	耳介展開 (哺育3日)	100.0±0.0	99.3±3.4	99.5±2.3	96.8±15.9	100.0±0.0	98.4±5.1	100.0±0.0	97.2±9.6	
		切歯萌出 (哺育11日)	97.8±7.2	97.3±9.4	94.2±16.5	91.7±19.0	97.8±7.2	95.5±12.5	88.3±17.2	93.3±13.9	
		眼瞼開裂 (哺育14日)	91.3±20.8	89.6±23.8	92.8±13.1	51.7±37.2	89.1±29.0	95.5±12.5	91.7±22.7	50.5±42.5	
	雌	耳介展開 (哺育3日)	100.0±0.0	98.1±5.2	99.3±3.4	98.0±7.3	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	99.1±4.3	
		切歯萌出 (哺育11日)	98.9±5.2	99.0±5.1	96.5±9.5	92.6±23.0	95.7±12.3	93.9±13.9	85.2±26.3	93.2±13.8	
		眼瞼開裂 (哺育14日)	94.6±13.0	97.6±8.3	96.9±8.4	65.3±26.5	93.5±22.9	98.9±5.3	95.5±21.3	52.3±44.6	
反射反応 ^{a)}	雄	正向反射 (哺育7日, 秒)	2.5±1.9	2.0±0.5	3.0±2.7	2.2±1.6	1.8±0.4	2.0±0.6	1.8±0.9	1.7±0.8	
		背地走性 (哺育11日, 秒)	14.0±5.9	12.0±4.6	12.5±5.3	12.9±6.5	16.5±5.5	15.7±6.0	14.7±6.2	13.5±6.5	
		空中正向反射 (哺育18日, %)	88.4±13.7	86.8±16.7	81.1±21.5	82.3±15.0	82.7±12.7	80.9±19.1	79.7±26.4	76.1±14.6	
	雌	正向反射 (哺育7日, 秒)	2.5±1.7	2.5±1.5	3.2±2.1	2.6±1.6	3.2±2.8	2.8±2.8	2.1±1.1	2.5±1.9	
		背地走性 (哺育11日, 秒)	16.3±5.2	12.7±4.8	14.1±5.5	13.2±7.0	19.4±6.5	18.3±6.4	16.6±4.7	12.8±6.0	
		空中正向反射 (哺育18日, %)	91.0±11.5	85.6±14.0	85.8±19.6	80.7±15.2	80.8±16.8	83.2±12.4	82.8±13.5	82.0±18.6	
臓器重量	雄	絶対重量 (mg)	脳	1537±47	1537±58	1549±39	1527±77	1563±51	1547±50	1549±32	1512±48
			胸腺	262±44	275±64	266±46	233±35	306±40	309±50	288±48	252±44
			脾臓	279±47	290±61	276±46	270±42	315±41	312±42	302±36	280±42
		相対重量	脳	2.00±0.16	2.08±0.31	2.04±0.17	2.17±0.15	1.91±0.11	1.93±0.10	1.93±0.14	2.07±0.18
			胸腺 (x10 ⁻²)	33.8±3.8	36.4±7.5	34.6±4.7	33.0±4.3	37.2±4.2	38.5±5.3	35.8±4.8	34.1±5.1
			脾臓 (x10 ⁻²)	36.2±5.5	38.5±6.7	36.0±5.0	38.2±4.9	38.4±5.2	38.9±4.7	37.7±4.8	38.0±4.8
	雌	絶対重量 (mg)	脳	1560±42	1484±48	1490±65	1481±38	1501±54	1492±47	1487±52	1463±41
			胸腺	264±30	262±44	267±43	233±30	289±35	298±35	270±29	242±39
			脾臓	269±45	264±40	274±48	236±35	282±46	268±40	271±33	238±27
		相対重量	子宮	59.1±13.5	62.3±17.5	74.1±23.2	83.7±13.0	69.9±16.6	69.7±15.2	71.6±10.3	83.9±13.5
			脳	2.06±0.13	2.06±0.15	2.08±0.17	2.23±0.14	1.96±0.12	1.99±1.99	2.00±0.09	2.16±0.12
			胸腺 (x10 ⁻²)	36.1±4.4	36.2±5.4	37.1±4.7	34.9±3.1	37.6±3.9	39.7±4.9	36.5±4.0	35.5±4.3
		脾臓 (x10 ⁻²)	36.7±6.0	36.6±5.5	38.1±6.0	35.4±4.8	36.6±4.5	35.5±4.5	36.6±4.7	35.0±3.3	
		子宮 (x10 ⁻²)	8.05±1.64	8.65±2.44	10.31±3.04	12.64±2.16	9.13±2.13	9.25±1.80	9.65±1.37	12.33±1.83	

/ および / : 統計学的に有意な高値/低値 (それぞれ p 0.05 および p 0.01)。* : 検査せず。

a): 正向反射および背地走性については完了時間, 空中正向反射については達成率を評価した。

表 2. 試験結果の概要 (続き-3)

世代		親動物：P (F0) 仔動物：F1				親動物：F1 仔動物：F2				
投与量 (ppm)		0	500	2000	8000	0	500	2000	8000	
腹数		23	24	24	24	23	22	22	23	
剖検所見	間引き仔 ^{a)}	腎盂拡張	0/100	0/94	1/82	0/74	0/83	0/80	0/64	1/50
		その他の臓器	異常は特に認められなかった				異常は特に認められなかった			
	離乳仔	腎盂拡張	13/135	13/144	12/138	14/135	22/182	8/176	4/159	11/163
	離乳仔	その他の臓器	異常は特に認められなかった				異常は特に認められなかった			
病理組織学的所見	子宮角：上皮細胞丈の増加	*	*	*	*	1/10	0/10	0/10	7/10	

/ および / : 統計学的に有意な高値 / 低値 (それぞれ p 0.05 および p 0.01)。* : 検査せず。

a) : 哺育 0-4 日に死亡した仔を含む。