

## 5. 2 世代繁殖毒性試験報告書

- フタル酸ジエチル -

## フタル酸ジエチルのラットを用いた繁殖試験

## 1. 要約：

フタル酸ジエチル(DEP)は、プラスチック添加剤の一つであり、酢酸セルロース、メタクリル酸、酢酸ビニル及びポリスチレン用可塑剤、ならびに香料の保留剤として用いられている<sup>1)</sup>。DEPは、エストロゲン受容体への結合性はみられておらず<sup>2), 3)</sup>、組み換え酵母スクリーン及びヒト乳ガン細胞を用いる細胞増殖試験で弱いながらエストロゲン様作用を持つことが報告されている<sup>4)</sup>が、内分泌かく乱作用を有するか否かは不明である。

DEP を 0, 600, 3000 及び 15000 ppm(雄；0, 43, 210, 1083 mg/kg/day：雌；0, 54, 261, 1336 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 Crj:CD(SD) IGS 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。

親動物の一般状態、体重及び摂餌量には、投与期間を通して、各用量群のいずれの世代の雌雄親動物にも、DEP 投与に関連する変化は認められなかった。体重増加量に、15000 ppm 群の F0 雌親動物において哺育 0-21 日に高値が認められたが、この変化は F1 雌親動物には認められなかった。繁殖能力に関する指標では、F0 及び F1 世代の親動物の正常性周期率、発情期間隔、交尾率、受胎率、出産率、妊娠期間、着床数、分娩率、精巢の精子頭部数、精巢上体の精子運動率、精巢上体の精子数、ならびに異常形態精子の出現率には、いずれの用量群においても DEP 投与に関連する変化は認められなかった。F1 雄親動物の包皮分離達成の平均日齢及び達成日の体重には、各用量群と対照群の間で有意な差はみられなかった。一方、F1 雌親動物の膣開口が 15000 ppm 群で対照群と比較して有意に遅延した。膣開口日体重に有意な差はみられなかったが、離乳時点の子宮重量に有意な低値が認められたことを考えると、被験物質投与に関連する可能性を否定できないと考えられた。臓器重量では、15000 ppm 群においてのみ、F0 及び F1 世代とも雌雄親動物の肝臓の絶対重量または相対重量に有意な高値、F0 雄親動物の副腎及び精巢上体の絶対重量に有意な低値が認められた。予備試験では肝臓重量の高値に加えて前立腺重量の低値も認められており、重量変化の一因として肝臓のステロイド代謝酵素活性の亢進が考えられたので、F0 雄親動物のすべての用量群の肝臓について P-450 分子種(CYP1A1/2, CYP2B1, CYP3A2, CYP4A1)の含有量を測定した。その結果、15000 ppm 群で CYP4A1 及び CYP3A2 含量に有意な増加が認められた。CYP3A ファミリーはテストステロン及びプロゲステロンの 6 位を水酸化する<sup>5)</sup>ことから、これらのステロイドホルモンの代謝に影響を及ぼしているか否かを確認するため、F0 雄親動物について血清中テストステロン及びプロゲステロン濃度を測定した。その結果、3000 及び 15000 ppm 群においてテストステロン濃度に有意な低値がみられ、テストステロンの代謝が亢進していることが示唆された。剖検ならびに生殖器、内分泌器官及び肝臓の病理組織学的検査では、いずれの用量群においても DEP 投与に関連すると考えられる変化は認められなかった。

仔動物の一般状態では、F1 及び F2 雌雄仔動物のいずれにも DEP 投与によると考えられる変化は認められなかった。仔動物の体重増加は 15000 ppm 群において抑制され、体重は、F1 雌仔動物で哺育 4 日から 21 日に、F1 雄仔動物、F2 雌雄仔動物で哺育 21 日に有意な低値が認められた。F1 及び F2 仔動物の出産仔数、性比、肛門生殖突起間距離、生存率及び反射反応性検査成績には、DEP 投与に関連する変化は認められなかった。哺育仔の発育分化は、耳介開展、切歯萌出及び眼瞼開裂の各指標に、15000 ppm 群で F1 及び F2 哺育仔の雄または雌で遅れが観察された。哺育途中で死亡した仔動物、哺育 4 日に選抜されなかった仔動物及び離乳仔の剖検では、F1 及び F2 雌雄仔動物のいずれにも DEP 投与の影響と考えられる変化は認められなかった。離乳仔の臓器重量では、3000 ppm 群において、F1 雌仔動物の副腎の絶対重量及び F2 雌仔動物の子宮の相対重量に有意な低値がみられた。15000 ppm 群では、肝臓の相対重量に F1 及び F2 雌雄仔動物ともに有意な高値がみられた。また同群では、F1 及び F2 雌雄仔動物の胸腺の絶対重量及び相対重量、F2 雄仔動物の脾臓の絶対重量及び相対重量に有意な低値が認められ、免疫系への影響が示唆された。しかし、これらの臓器に病理組織学的な異常は認められなかった。F1 及び F2 雌雄仔動物の副腎の絶対重量、ならびに F1 雄仔動物の前立腺の絶対重量に有意な低値がみられた。さらに、子宮に、F1 雌仔動物で絶対重量、F2 雌仔動物で絶対重量及び相対重量ともに有意な低値が認められた。

以上のことから、F0 及び F1 親動物に対する影響に関して、フタル酸ジエチルの 15000 ppm は、肝臓重量の増加及び肝臓の代謝酵素活性の亢進がみられる用量であるが、この変化は異物に対する生物学的反応と考えられた。

内分泌系に対する影響として、15000 ppm 群の F0 雄親動物において、ステロイドホルモンの代謝に関わる P-450 分子種である CYP3A2 含量の増加が肝臓で認められ、3000 及び 15000 ppm 群の F0 雄親動物において、テストステロンの血清中濃度の低下がみられた。これらの変化は、F0 及び F1 親動物の妊娠・出産・哺育に 15000 ppm の用量まで影響はみられなかったことから、その他の繁殖機能に影響を及ぼさない軽度のものであると考えられた。

F1 及び F2 仔動物に対して、3000 ppm は、離乳時に雌の副腎及び子宮重量の低値が認められるが、その後の成長及び繁殖能力には影響しない用量である。15000 ppm は、哺育期間中の仔動物の体重増加を抑制し、さらに離乳時に雄または雌の肝臓重量の高値、胸腺、脾臓、副腎、前立腺及び子宮重量の低値が認められる用量であると考えられた。

したがって、本試験条件下では、フタル酸ジエチルを 2 世代にわたってラットに投与した場合、親動物に対する影響に関して、無影響量(NOEL)は 3000 ppm(雄；210 mg/kg/day：雌；261 mg/kg/day 相当)であり、無毒性量(NOAEL)は 15000 ppm(雄；1083mg/kg/day：雌；1336 mg/kg/day 相当)である。仔動物の発生・発育に対する無影響量は 600 ppm(雄；43 mg/kg/day：雌；54 mg/kg/day 相当)であり、無毒性量は 3000 ppm(雄；210 mg/kg/day：雌；261 mg/kg/day 相当)である。一方、親動物の繁殖能力に対する影響に関しては、内分泌系に対する影響が 3000 ppm 以上の用量で認められたものの、妊娠・出産・哺育に影響を及ぼさない軽度のものであるこ

とから，無影響量は 600 ppm(雄；43 mg/kg/day：雌；54 mg/kg/day 相当)であり，無毒性量は 15000 ppm(雄；1083mg/kg/day：雌；1336 mg/kg/day 相当)であると結論される。

- 2 検体名及び純度：フタル酸ジエチル (DEP)，純度 99.8%  
(和光純薬工業株式会社，Lot No. SEM5441)
- 3 試験実施機関：株式会社 化合物安全性研究所
- 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，フタル酸ジエチルを混合した飼料を，ラットに 2 世代にわたって摂取させて，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：Crj:CD(SD) IGS ラット (日本チャールス・リバー株式会社)，1 群雌雄各 24 匹，F0 親動物の投与開始時 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 15 週間，雌で約 17 週間。  
(2000 年 10 月 26 日～2001 年 7 月 10 日)。
- 7 投与方法：被験物質を 0, 600, 3000 及び 15000 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，フタル酸ジエチルのラットにおける 2 世代繁殖毒性試験：予備試験 (株式会社 化合物安全性研究所で実施) の結果に基づいて設定した。予備試験では，フタル酸ジエチルを 0 (基礎飼料のみ)，5000，10000，20000 及び 40000 ppm の濃度で混合した飼料を，1 群当たり雌雄各 8 匹の Crj:CD(SD)IGS ラットに，交配前 4 週間ならびに妊娠及び哺育期間を通して摂取させ，親動物の繁殖能力及び仔動物の成長に及ぼす影響を検討した。その結果，F0 親動物の一般状態の変化として，20000 ppm 群の雄 2 例及び 40000 ppm 群の雌雄各 1 例に血尿が観察された。雌雄の体重は，40000 ppm 群において投与期間を通して低値がみられた。10000 ppm 以上の投与群の雄では，肝臓の相対重量に高値が認められた。20000 ppm 以上の投与群では，前立腺の絶対重量の有意な低値が認められた。親動物の繁殖能力では，40000 ppm 群において妊娠期間に短縮がみられた。F1 仔動物の成長は 20000 及び 40000 ppm 群において抑制され，体重は哺育期間中低値であった。40000 ppm 群では，哺育 4 及び 21 日の仔動物の生存率が著しく低かった。肝臓重量は，すべての投与群の雄離乳仔で低値であった。以上のことから，2 世代繁殖毒性試験の本試験では，仔動物の成長に明らかな影響を及ぼすと予測される 15000 ppm を最高用量とし，以下公比 5 で除して 3000 及び 600 ppm の 3 用量群と基礎飼料のみを同様に投与する対照群を設け，計 4

群を設定した。

9 飼育条件：

- 9.1 基礎飼料；日本クレア株式会社製の粉末飼料，NIH-07M(ロット番号：H7010 または H7020) を金属製給餌器を用いて自由に摂取させた。
- 9.2 飲料水； 札幌市水道水を，自動給水装置または給水器を用いて自由に摂取させた。
- 9.3 飼育環境；動物を温度  $23\pm 3$  ，湿度  $50\pm 20\%$  ，換気回数 10～15 回 / 時間，照明時間 12 時間（8:00～20:00 の人工照明）に調節した動物飼育室で飼育した。
- 9.4 飼育方法；雌雄別にブラケット式金属製金網床ケージ（300W×410D×200H，mm，日本クレア株式会社）に，1 匹収容した。交配時は雄と雌を 1 匹ずつ，哺育期間は 1 腹を収容した。妊娠 17 日から哺育 21 日まで期間中の雌は，巣材として実験動物用床敷（ホワイトフレーク，日本チャールス・リバー株式会社）を使用して分娩と哺育を行なわせた。

10. 方法及び試験項目：概要を，表 1 及び図 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 2 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。雌を夕刻に雄のケージに移し，1：1 で連続同居方式で交配させた。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な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，3 週間とした。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。

10.4 F1 親動物の選抜； 各群の F1 離乳仔から雌雄それぞれ 24 匹を選抜し，F1 世代の親動物とした。離乳仔の選抜は，全群を通じて最も多く出産が見られた日を含むようにして 5 日間の期間中に産した腹から，生後 21 日から 25 日齢で行なった。各腹から各性につき 1 匹の F1 仔動物を選抜し，F1 親動物数が 24 匹に満たない場合は，無作為に選んだ腹から 2 匹目の F1 仔動物を選抜した。

10.5 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

発情期間隔(性周期長)

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 / 交尾を認めた雄または雌数

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)

分娩率(%) = (出産仔数 / 着床数) × 100

出産仔数

- 10.6 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(血球計算盤を用いて顕微鏡下で計数した)。  
 精巣上体の精子運動率(精子運動能解析装置 (HTM-IVOS, Hamilton Thorne research 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て顕微鏡で各個体 200 個観察して，異常形態精子の出現率を求めた)。
- 10.7 肝臓中 P-450 分子種の測定；  
 各群 6 匹の F0 雄親動物の肝臓について肝ミクロソーム画分を調製し，P-450 分子種(CYP1A1/2, CYP2B1, CYP3A2, CYP4A1)の含有量をウエスタンブロッティング法を用いて測定した。測定は財団法人残留農薬研究所で実施した。
- 10.8 ホルモンレベル測定；各群 6 匹の，P-450 分子種含量を測定した同じ F0 雄親動物について，血清中テストステロン及びプロゲステロン濃度を，DPC トータルテストステロンキット及び DPC プロゲステロンを用い，RIA チューブ固相法で測定した。測定は株式会社パナファーム・ラボラトリーズで実施した。
- 10.9 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。  
 肛門生殖突起間距離を，哺育 0 及び 4 日に測定した。  
 性比 = 総雄出産仔数 / 総出産仔数  

$$\text{哺育 0 日生存率(\%)} = (\text{哺育 0 日生存仔数} / \text{出産仔数}) \times 100$$

$$\text{哺育 4 日生存率(\%)} = (\text{哺育 4 日生存仔数} / \text{哺育 0 日生存仔数}) \times 100$$

$$\text{哺育 21 日生存率(\%)} = (\text{哺育 21 日生存仔数} / \text{哺育 4 日に選抜した仔数}) \times 100$$
- 10.10 仔動物の発育分化；各腹の生存哺育仔全例について，下記項目の完成の有無を記録した。各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 1 日～4 日まで  
 切歯萌出；哺育 8 日以降完成するまで  
 眼瞼開裂；哺育 12 日以降完成するまで



- 10.11 仔動物の反射反応性検査；  
各腹の雌雄各 1 例の生存哺育仔について、下記項目の完成した哺育日齢を記録した。  
    正向反射；哺育 4 日以降完成するまで  
    背地走性；哺育 7 日以降完成するまで  
    空中正向反射；哺育 13 日以降完成するまで
- 10.12 臓器重量；  
すべての雌雄の F0 及び F1 親動物について、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。  
すべての腹の雌雄各 1 匹の F1 及び F2 離乳仔について、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、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。  
なお、両側性の臓器は左右の合計を表示した。
- 10.13 剖検；  
すべての親動物は仔動物の離乳後に、哺育期間中に死亡した哺育仔は発見後速やかに、哺育 4 日に間引きされた哺育仔は全例その日に剖検した。F1 離乳仔は F1 世代の親動物を選抜した残りの動物を、F2 離乳仔はすべての動物をそれぞれ 26 日齢で剖検した。
- 10.14 病理組織学的検査；  
対照群及び高用量群のすべての F0 及び F1 親動物ならびに低用量群の性周期の異常が認められた雌、精子検査で異常が認められた雄及び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、視床下部、下垂体、甲状腺、肝臓、副腎、精巣、精巣上部、精嚢、凝固腺、前立腺、卵巣、子宮、膣、及び乳腺の病理組織学的検査を実施した。さらに高用量群で重量変化のみられた腎臓について、対照群と高用量群のすべての F1 雌を検査した。  
離乳仔において高用量群で重量変化のみられた胸腺及び脾臓について、対照群及び高用量群の、胸腺は各群 6 例の F1 及び F2 雌雄離乳仔を、脾臓は各群 6 例の F2 雄離乳仔をそれぞれ検査した。
- 10.15 統計学的解析；  
親動物の体重、体重増加量、摂餌量、発情期間隔、妊娠期間、着床数、分娩率、出産仔数、精巣の精子頭部数、精巣上部の精子運動率及び精子数、異常形態精子出現率、ホルモンレベル、臓器重量、性成熟達成日の日齢と体重、肛門生殖突起間距離、生存率、反射反応性検査の完成日齢及び哺育仔の体重については、まず Bartlett の等分散性検定を行なっ

た。その結果、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。群間に有意差が認められる場合は、Dunnett の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。一方、各群の分散が等しくない場合は、Kruskal-Wallis の順位和検定法を用いて群間の有意差の有無を調べた。群間に有意差が認められる場合は、Mann-Whitney の U 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。なお、哺育仔の雌雄別体重、雌雄別肛門生殖突起間距離及び生存率については、1 腹を標本単位として処理した。発育分化の各観察日齢における同腹哺育仔の完成率については、1 腹を標本単位として Wilcoxon 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。正常性周期率、交尾率、受胎率、出産率及び仔動物の性比については  $2 \times 2$  分割表のカイ二乗検定法を用いた。ただし、いずれかの周辺度数が 10 以下の場合は Fisher の正確確率検定法を用いた。

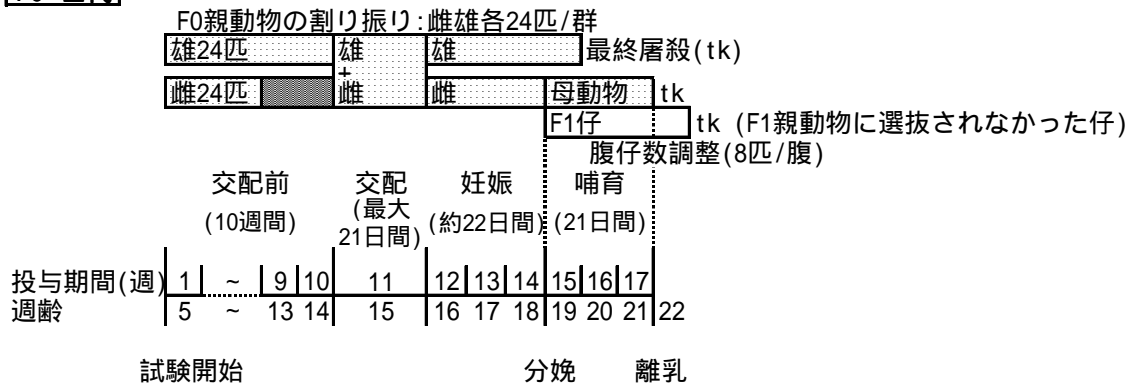
表 1. 試験の概要

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 (1 ; 最長 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。間引きされた哺育仔は全例その日に剖検した。	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。 生存仔数を, 哺育期間中毎日記録。 哺育仔体重を, 哺育 0, 4, 7, 14 及び 21 日に測定。 哺育仔の肛門生殖突起間距離を哺育 0 及び 4 日に測定。 仔動物の発育分化観察(耳介開展を哺育 1~4 日, 切歯萌出及び眼瞼開裂をそれぞれ哺育 8 日及び 12 日以降完成するまで)。 仔動物の反射反応性検査(正向反射, 背地走性及び空中正向反射をそれぞれ哺育 4 日, 7 日及び 13 日以降完成するまで)。

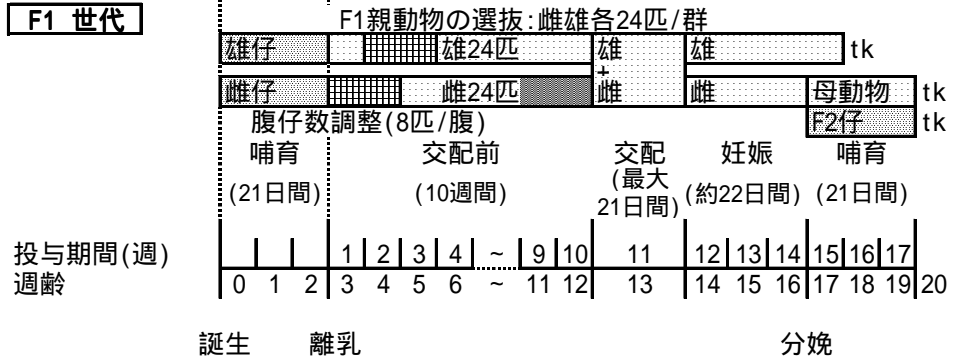
世代	期間（週間）	作業手順	試験項目
F0/F1	離乳	各群の F1 離乳仔から雌雄それぞれ 24 匹を、生後 21 日から 25 日齢で F1 親動物として選抜した。各腹からの選抜仔数を各性につき 1 匹または 2 匹とした。F1 親動物に選抜されなかった F1 離乳仔を 26 日齢で安楽死。哺育仔の離乳後、すべての親動物を安楽死。	親動物全例の剖検及び脳、下垂体、甲状腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣、精巣上部、精嚢(凝固腺含む)、前立腺、卵巣及び子宮の重量測定。雄全例の精子検査。F0 雄各群 6 例の肝臓 P-450 測定及び血清中ホルモンレベル測定。 離乳仔全例の剖検及び各腹雌雄 1 例の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、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測定。対照群及び高用量群の親動物全例の視床下部、下垂体、甲状腺、肝臓、副腎、精巣、精巣上部、精嚢、凝固腺、前立腺、卵巣、子宮、膣及び乳腺の病理組織学的検査。対照群及び高用量群の離乳仔雌雄各 6 例の胸腺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：雄は生後 35 日から包皮分離を、雌は生後 27 日から膣開口を達成するまで観察。達成日の体重を測定。
	交配（1；最長 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。F1 親動物の交配は、兄妹交配を避けて行なった。	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
F1	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。間引きされた哺育仔は全例その日に剖検した。	<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。</p> <p>生存仔数を、哺育期間中毎日記録。</p> <p>哺育仔体重を、哺育0, 4, 7, 14及び21日に測定。</p> <p>哺育仔の肛門生殖突起間距離を哺育0及び4日に測定。</p> <p>仔動物の発育分化観察(耳介開展を哺育1~4日、切歯萌出及び眼瞼開裂をそれぞれ哺育8日及び12日以降完成するまで)。</p> <p>仔動物の反射反応性検査(正向反射、背地走性及び空中正向反射をそれぞれ哺育4日、7日及び13日以降完成するまで)。</p>
F1/F2	離乳	すべてのF2離乳仔を26日齢で安楽死。 哺育仔の離乳後、すべての親動物を安楽死。	<p>親動物全例の剖検及び脳、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。雄全例の精子検査。</p> <p>離乳仔全例の剖検及び各腹雌雄1例の脳、下垂体、甲状腺、胸腺、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。</p> <p>対照群及び高用量群の親動物全例の視床下部、下垂体、甲状腺、肝臓、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、凝固腺、前立腺、卵巣、子宮、膣及び乳腺の病理組織学的検査。</p> <p>対照群及び高用量群の離乳仔雌雄各6例の胸腺及び雄6例の脾臓の病理組織学的検査。</p>

**F0 世代**






**F1 世代**



-  : 投与
-  : 投与せず

試験期間中の検査

-  : 性成熟 ;雄生後35日、雌生後27日から完成まで(各24匹/群)
-  : 性周期(雌24匹/群)
-  : AGD、発育分化、反射反応(F1、F2仔について全例)

試験終了時の検査

- F0雄 | 血清テストステロン、プロゲステロン濃度、肝臓中P450分子種含量(6匹/群)
- F0、F1雄 | 精子検査、剖検、臓器重量(24匹/群)
- F0、F1雌 | 病理組織学的検査(対照群と高用量群で各24匹)
- F0、F1雌 | 剖検、臓器重量(24匹/群)
- F1、F2離乳仔 | 病理組織学的検査(対照群と高用量群で各24匹)
- F1、F2離乳仔 | 剖検(雌雄全例)、臓器重量(雌雄各1匹/腹)

図 1. 2世代繁殖毒性試験のタイムスケジュール

11. 結果及び考察：試験結果の概要を，要約表 2. に示す。

11.1 親動物の繁殖能力等に及ぼす影響について

11.1.1 一般状態及び死亡（要約表2.，Tables 1 and 2）

F0及びF1雌雄親動物のいずれの用量群においてもDEP投与に関連する変化はみられなかった。

DEP投与に関連のない親動物の死亡(安楽死)として，3000 ppm群でF0雄親動物の1例(ケージ内事故による鼻骨骨折)，対照群でF0雌親動物の2例(難産1例，子宮蓄膿症1例)がみられた。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では，F0及びF1雌雄親動物の一般状態に影響を及ぼさないと考えられる。

11.1.2 体重及び体重増加量（要約表2.，Tables 3 to 6）

F0及びF1の親動物に対する影響は15000 ppmの用量のみでみられ，3000ppm以下の群では，用量相関のない偶発的变化としてF0雌親動物の600 ppm群で交配前投与期間の体重，体重増加量に有意な高値がみられたにすぎない。

15000 ppm群では，F0雄親動物には変化はみられなかった。また，F1雄親動物には投与0-1週の体重増加量に有意な高値がみられたが，その後は対照群との間に有意差のない体重推移を示したため，偶発的变化と解された。一方，雌ではF0親動物の哺育0-21日の体重増加量に有意な高値が認められ，正常な哺育を行なうラットでみられる哺育後期の生理的体重減少が抑制されたと推測され，F1哺育仔の哺育21日の生存率が低値傾向を示したことと関連していると考えられた。しかし，F1雌親動物では同様の現象は観察されなかった。

結論：DEPは15000 ppmの用量において，F0雌親動物の哺育後期における生理的体重減少を抑制させることが示された。しかし，F1雌親動物には同様の影響を及ぼさない。

11.1.3 摂餌量（要約表2.，Tables 7 and 8）

F0及びF1の親動物に対する影響として，3000 ppm以下の各群では，用量相関のない偶発的变化としてF0雌親動物の3000 ppm群で投与9及び10週，妊娠0-7日及び7-14日に有意な低値がみられたのみである。

15000 ppm群では，F0雌雄親動物には変化はみられなかったが，F1雌雄親動物の各群で投与第1週に有意な高値が認められたが，その後の期間には変化はみられず，DEP投与による影響とは考えがたい。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では，F0及びF1雌雄親動物の摂餌量に影響を及ぼさないと考えられる。

## 11.1.4 繁殖能力（要約表2. , Tables 13, 14, and 16）

親動物の繁殖能力に関する指標のうち、以下についてはF0及びF1親動物のいずれの用量群においてもDEP投与に関連する変化は認められなかった。

正常性周期率，発情期間隔，雌雄の交尾率，雌雄の受胎率，出産率，着床数，分娩率，精巢の精子頭部数，精巢上体の精子数及び精子運動率，包皮分離（達成日齢及び達成時体重：F1親動物のみ）。

## 1)平均妊娠期間（要約表2. , Table 13）

F1雌親動物の15000 ppm群において対照群と比較して統計学的に有意な短縮がみられたが，個々の値(22または23日)はいずれもこの系統のラットの正常な妊娠期間の範囲内にあることから，偶発的な変動と考えられた。

## 2)精子の形態検査（要約表2. , Table 15）

F0雄親動物の3000 ppm群ならびにF1雄親動物の3000及び15000 ppm群においてTailless精子の出現率に有意な高値がみられた。この変化については，精巢の精子頭部数，精巢上体の精子運動能及び精子数，精巣及び精巣上体の病理組織学的検査においてDEP投与による異常が認められなかったことから，毒性学的意義は低いと考えられた。

## 3)性成熟（膣開口）（要約表2. , Table 16）

F1雌親動物の膣開口に15000 ppm群で対照群と比較して有意な遅延がみられた。膣開口時体重に有意な差はみられなかったが，離乳時に測定した子宮の絶対重量に有意な低値がみられていることから，被験物質投与の影響を否定できないと考えられる。

結論：15000 ppm群のF1雌親動物で，膣開口の有意な遅延がみられた。離乳時の子宮の絶対重量の低値と合わせて考えると，被験物質投与の影響である可能性を否定できない。しかし，妊娠，分娩に関する他の繁殖指標に変化はみられていないことから，DEPは15000 ppmまでの用量では，F0及びF1の雌雄親動物の繁殖能力に影響を及ぼさないと考えられる。

## 11.1.5 臓器重量（要約表2. , Tables 21 and 22）

F0及びF1親動物に対する影響は15000 ppm群のみにみられ，3000 ppm以下の群では用量相関性のない甲状腺の絶対及び相対重量の有意な高値が認められたにすぎない。

15000 ppm群では，F0及びF1世代とも雌雄の肝臓の絶対重量または相対重量に有意な高値，F0雄の副腎及び精巣上体の絶対重量に有意な低値が認められた。予備試験では肝臓重量の高値に加えて前立腺重量の低値も認められており，DEP投与による影響であり，重量変化の一因として肝臓のステロイド代謝酵素活性の亢進が考えられた(後述)。この他，同群では，F1雄親動物の副腎の相対重量に有意な低値，F1雌親動物の腎臓の絶対重量及び相対重量に有意な高値がみられた。しかし，これらの変化は，世代間に一貫性がなく，病理組織学的検査でもDEP投与に関連すると考えられる変化が認められなかったことから，毒性学的意義は低いと考えられた。



結論：DEPは15000 ppmの用量で、F0及びF1の雌雄親動物ともに肝臓重量を増加させる。一方、F0雄親動物の副腎及び精巣上体の絶対重量に有意な低値が認められた。このほか、本試験で雌の腎臓に重量の変動がみられたが、DEP投与との関連は明らかではない。

#### 11.1.6 肝臓中P-450の測定（特別測定項目）（要約表2.，Table 17）

F0雄親動物の全用量群の肝臓について、肝ミクロソーム画分を調製し、P-450分子種（CYP1A1/2，CYP2B1，CYP3A2，CYP4A1）の含有量をウエスタンブロッティング法を用いて測定した。

3000 ppm以下の各群には変化は認められなかった。15000 ppm群ではCYP4A1及びCYP3A2含量に有意な増加が認められた。すなわち、DEP大量投与によるP-450の誘導が肝臓重量の増加の一因であることが示唆された。CYP4A1は、ペルオキシゾーム増殖剤により誘導されるP-450分子種である<sup>6)・7)</sup>ことから、DEPはペルオキシゾーム増殖作用を持つ可能性が考えられる。一方、CYP3Aファミリーはテストステロン及びプロゲステロンの6位を水酸化する<sup>5)</sup>ことから、これらのステロイドホルモンの代謝に影響を及ぼしているか否かを確認するため、さらにF0雄親動物の血清中テストステロン及びプロゲステロン濃度を測定することとした。

結論：DEPは15000 ppmの混餌投与により、雄の肝臓において一部のP-450(CYP4A1，CYP3A2)を増加させる。同用量の雌雄にみられた肝臓重量の増加はP-450の誘導に関連しているものと考えられた。

#### 11.1.7 血清中ホルモン測定（特別測定項目）（要約表2.，Table 18）

F0雄親動物の全用量群について、血清中テストステロン及びプロゲステロン濃度をRIA法により測定した。

3000及び15000 ppm群においてテストステロン濃度に有意な低値がみられた。肝臓中CYP3A2含量の増加と合わせて考えると、肝臓でのテストステロン代謝が亢進していることが推察される。この変化は、3000 ppm群における値の方が15000 ppm群の値より低く、用量相関性はみられなかった。テストステロンは精巣内で精子形成に参与する<sup>8)</sup>とされているが、これらの用量群では、精巣及び精巣上体の精子数、重量または病理組織学的検査で異常は認められず、雄の交尾率及び受胎率に影響はみられなかったことから、この変化は繁殖能力に影響を及ぼさない軽度のものであると考えられた。

一方、プロゲステロン濃度には、各用量群と対照群の間で有意な差はみられなかった。

結論：DEPは3000 ppm以上の用量の混餌投与により、雄で血清中テストステロン濃度の低下を生じたが、この作用は生殖器官の器質的变化、繁殖機能に影響を及ぼすものではなかった。また、血清中テストステロンの低下の一因としては、肝臓中CYP3A2含量の増加との関連性から、肝臓でのテストステロン代謝の亢進によることが推定される。11.1.8 剖検及び病理組織学的検査（要

約表2. , Tables 19, 20, 23, and 24 )

剖検では、F0及びF1雌雄親動物の妊性の認められなかった個体を含めて、いずれの用量群においてもDEP投与に関連すると考えられる変化は観察されなかった。15000 ppm群で実施した生殖器、内分泌器官及び肝臓の病理組織学的検査結果にも、異常は観察されなかった。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では、F0、F1雌雄親動物の剖検ならびに生殖器、内分泌器官及び肝臓の病理組織学的検査結果に影響を及ぼさないと考えられる。

## 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 25 and 26）

F1及びF2仔動物ともいずれの用量群においてもDEP投与によると考えられる変化は認められなかった。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では、F1及びF2仔動物の雌雄の一般状態に影響を及ぼさないと考えられる。

### 11.2.2 体重（要約表2. , Table 27）

15000 ppm群においてのみ、F1及びF2仔動物の雌雄とも哺育期間中の体重増加が抑制され、体重は、F1雌仔動物で哺育4～21日に、F1雄仔動物、F2雌雄仔動物で哺育21日に対照群と比較して有意な低値であった。

結論：DEPは15000 ppmの混餌投与により、哺育期間中の体重増加を、F1及びF2仔動物の雌雄とも抑制すると考えられる。

### 11.2.3 出産仔数、性比、仔動物の生存率、肛門生殖突起間距及び反射反応性検査成績

（要約表2. , Tables 13, 28, and 32 to 34）

F1及びF2仔動物の出産仔数、性比、哺育0日、4日及び21日の生存率、肛門生殖突起間距離ならびに反射反応性検査成績には、いずれの用量群においてもDEP投与と関連した変化は認められなかった。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では、F1及びF2仔動物の出産仔数、性比、肛門生殖突起間距、生存率及び反射反応性検査成績に影響を及ぼさないと考えられる。

### 11.2.4 発育分化（要約表2. , Tables 29 to 31）

F1及びF2仔動物の雄または雌で、15000 ppm群において耳介開展、切歯萌出及び眼瞼開裂の各指標に遅れが観察され、哺育期間中の体重の低値に関連した遅延と考えられた。

結論：DEPは15000 ppmの混餌投与により，哺育仔の発育分化を遅延させると考えられる。

#### 11.2.5 剖検（要約表2.，Tables 35 and 36）

哺育途中で死亡したF1またはF2仔動物，哺育4日に間引きされたF1またはF2仔動物，ならびにF1親に選抜されなかったF1離乳仔，またはF2離乳仔の剖検では，いずれの用量群においてもDEP投与の影響と考えられる変化は認められなかった。

結論：DEPは15000 ppmまでの用量では，雌雄のF1及びF2哺育仔に肉眼的な病変を誘発しなかった。

#### 11.2.6 臓器重量及び病理組織学的検査（要約表2.，Tables 37，38 and 39）

F1及びF2離乳仔の臓器重量は，600 ppm群で，用量相関性または世代間の一貫性がない変化として，F1雄仔動物の肝臓の相対重量の有意な低値がみられた。

3000 ppm群でF1雌仔動物の副腎の絶対重量及びF2雌の子宮の相対重量の有意な低値がみられ，これらの変化は15000 ppm群でも認められた。

15000 ppm群では，F1及びF2仔動物とも雌雄の肝臓の相対重量に有意な高値が認められた。また同群では，F1及びF2雌雄仔動物の胸腺の絶対重量及び相対重量，F1雄仔動物の脾臓の絶対重量，F2雄仔動物の脾臓の絶対重量及び相対重量が有意な低値であり，免疫系への影響が示唆された。そこで胸腺は重量変化のみられたF1及びF2雌雄離乳仔について，脾臓は重量変化のみられたF2雄離乳仔について，それぞれ病理組織学的変化の有無を検索したところ異常は認められなかった。F1及びF2雌雄仔動物の副腎の絶対重量，ならびにF1雄仔動物の前立腺の絶対重量に有意な低値がみられ，ステロイド代謝へ影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに，子宮重量に，F1雌仔動物で絶対重量，F2雌仔動物で絶対重量及び相対重量ともに有意な低値がみられ，DEPのエストロゲン受容体への結合性はin vitro試験<sup>2)</sup>及びin vivo試験<sup>3)</sup>においても認められていないことから，この変化は内在性エストロゲンの合成抑制または分解促進による可能性が考えられた。この他同群では，体重の低値に伴う二次的な変化として，F1雄仔動物の腎臓，F1雌仔動物の脳，腎臓及び甲状腺，F2雌の腎臓の絶対重量の有意な低値，ならびにF1雄仔動物の脳，下垂体及び精囊，F1雌仔動物の脳，F2雌仔動物の脳の相対重量の有意な高値がみられた。

結論：DEPは3000 ppmの用量において，F1雌仔動物の副腎の絶対重量及びF2雌仔動物の子宮の相対重量を低下させた。15000 ppmの用量において，肝臓の相対重量をF1及びF2仔動物の雌雄ともに増加させた。また，胸腺はF1及びF2雌雄仔動物とも，脾臓はF2雄仔動物で重量が低下し，免疫系への影響が示唆されたが，病理組織学的な変化は認められなかった。F1及びF2雌雄仔動物の副腎の絶対重量，ならびにF1雄仔動物の前立腺の絶対重量に有意な低値がみられ，ステロイド代謝へ影響が示唆された。さらに，雌の子宮重量にF1及びF2仔動物とも低下がみられ，内在

性エストロゲンの合成抑制または分解促進による可能性が考えられた。

### 11.3 NOEL（無影響量）に関する考察

以上のことから，F0 及び F1 親動物に対する影響に関して，フタル酸ジエチルの 15000 ppm は，肝臓重量の増加及び肝臓の代謝酵素活性の亢進がみられる用量であるが，この変化は異物に対する生物学的反応と考えられた。

内分泌系に対する影響として，15000 ppm 群の F0 雄親動物において，ステロイドホルモンの代謝に関わる P-450 分子種である CYP3A2 含量の増加が肝臓で認められ，3000 及び 15000 ppm 群の F0 雄親動物において，テストステロンの血清中濃度の低下がみられた。これらの変化は，F0 及び F1 親動物の妊娠・出産・哺育に 15000 ppm の用量まで影響はみられなかったことから，その他の繁殖機能に影響を及ぼさない軽度のものであると考えられた。

F1 及び F2 仔動物に対して，3000 ppm は，離乳時に雌の副腎及び子宮重量の低値が認められるが，その後の成長及び繁殖能力には影響しない用量である。15000 ppm は，哺育期間中の仔動物の体重増加を抑制し，さらに離乳時に雄または雌の肝臓重量の高値，胸腺，脾臓，副腎，前立腺及び子宮重量の低値が認められる用量であると考えられた。

したがって，本試験条件下では，フタル酸ジエチルを 2 世代にわたってラットに投与した場合，親動物に対する影響に関して，無影響量(NOEL)は 3000 ppm(雄；210 mg/kg/day：雌；261 mg/kg/day 相当)であり，無毒性量(NOAEL)は 15000 ppm(雄；1083mg/kg/day：雌；1336 mg/kg/day 相当)である。仔動物の発生・発育に対する無影響量は 600 ppm(雄；43 mg/kg/day：雌；54 mg/kg/day 相当)であり，無毒性量は 3000 ppm(雄；210 mg/kg/day：雌；261 mg/kg/day 相当)である。一方，親動物の繁殖能力に対する影響に関しては，内分泌系に対する影響が 3000 ppm 以上の用量で認められたものの，妊娠・出産・哺育に影響を及ぼさない軽度のものであることから，無影響量は 600 ppm(雄；43 mg/kg/day：雌；54 mg/kg/day 相当)であり，無毒性量は 15000 ppm(雄；1083mg/kg/day：雌；1336 mg/kg/day 相当)であると結論される。

## 12. 参考文献

- 1) 13398の化学商品, 化学工業日報社, 東京, 1998, pp . 1017-1021.
- 2) Blair, R.M., Hong, F., William, S.B., Bruce, S.H., Stacey, L.D., Carrie, L.M., Weida, T., Leming, S., Roger, P., and Daniel, M.S. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, 2000; 54: 138-153.
- 3) フタル酸ジエチルの卵巣摘出成熟雌ラットを用いた皮下投与による子宮増殖アッセイ ( S R 0 0 0 0 7 ) : 最終報告書, 株式会社 化合物安全性研究所, 2001 .
- 4) Harris, C.A., Henttu, P., Parker, M.G., Sumpter, J.P. The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.*, 1997; 105: 802-811.
- 5) Niwa, T., Yabusaki, Y., Honma, K., Matsuo, N., Tatsuta, K., Ishibashi, F. and Katagiri, M.: Contribution of human hepatic cytochrome P450 isoforms to regioselective hydroxylation of steroid hormones. *Xenobiotica*, 28, 539-547, 1998.
- 6) Bell, D.R. and Elcombe, C.R. Induction of acyl-CoA oxidase and cytochrome P450 IV A1 RNA in rat primary hepatocyte culture by peroxisome proliferators. *Biochemical Journal*, 280, 249-253, 1991.
- 7) Okita, R.T. and Okita, J.R. Effects of diethyl phthalate and other plasticizers on laurate hydroxylation in rat liver microsomes. *Pharmaceutical Research* 9, 1648-1653, 1992.
- 8) 山田盛男・宮地秀樹, . 生殖細胞の形成, 精子形成のホルモン制御. Markert, C.L., 山村雄一 監修, 性 . 中山書店, 東京, 1979:87-95 .

表 2. 試験結果の概要

世代		親動物：F0(P)				仔動物：F1					
投与量 (ppm)		0	600	3000	15000	0	600	3000	15000		
親動物数	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	*	40	197	1016	*	46	222	1150		
	雌	*	51	255	1297	*	56	267	1375		
親動物	死亡または屠殺	雄	0/24	0/24	1/24	0/24	0/24	0/24	0/24		
	雌	2/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24	0/24		
一般状態	雄	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					
	雌	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					
体重増加量(g) [Mean ± S.D.]	雄	全試験期間	427.8 ± 62.5	416.8 ± 55.9	428.3 ± 32.3	403.9 ± 51.8	536.2 ± 48.4	535.5 ± 59.4	548.8 ± 74.7	552.5 ± 65.5 <sup>d)</sup>	
	雌	育成期間	150.7 ± 22.6	161.1 ± 22.1 <sup>a)b)</sup>	145.0 ± 18.6	147.2 ± 16.9	243.4 ± 27.4	250.3 ± 28.0	248.8 ± 34.2	249.3 ± 23.8	
		妊娠期間	132.3 ± 15.8	132.8 ± 17.3	126.4 ± 21.1	131.1 ± 13.6	137.0 ± 16.8	131.5 ± 21.4	137.1 ± 18.7	136.7 ± 21.8	
		哺育期間	3.5 ± 16.3	-0.5 ± 12.0	7.3 ± 15.0	20.4 ± 11.9 <sup>c)</sup>	-19.7 ± 19.9	-17.3 ± 13.3	-19.4 ± 25.1	-12.2 ± 22.4	
摂餌量(g)	雄	全試験期間	23.55-29.42	24.01-30.01	23.67-29.15	23.38-29.26	13.62-31.17	13.74-31.56	14.57-30.99	14.88-32.50 <sup>g)</sup>	
	雌	育成期間	18.56-20.94	18.65-21.30	17.43-19.64 <sup>d)</sup>	18.09-20.27	13.25-22.46	12.96-23.39	13.47-22.17	13.98-22.23 <sup>g)</sup>	
		妊娠期間	22.40-24.36	22.38-23.98	21.33-22.45 <sup>e)</sup>	22.02-23.26	23.93-25.62	24.28-25.81	23.83-24.65	23.76-25.36	
		哺育期間	38.30-73.16	35.85-74.12	36.29-66.49	38.46-66.56	35.76-65.77	36.19-69.33	34.58-65.66	36.14-64.16	
繁殖能力 [Mean ± S.D.]	雄	性成熟	包皮分離達成日齢	*	*	*	*	42.5 ± 1.8	43.0 ± 2.7	42.4 ± 1.8	42.6 ± 1.7
		包皮分離時体重(g)	*	*	*	*	232.3 ± 19.5	226.7 ± 14.6	232.1 ± 23.4	230.6 ± 18.7	
		交尾率	23/24	23/24	24/24	24/24	24/24	24/24	21/24	23/24	
		受胎率	22/23	22/23	24/24	23/24	23/24	23/24	20/21	22/23	
		精子数	精巢(x10 <sup>6</sup> )	230.65 ± 50.83	212.26 ± 70.20	215.83 ± 27.15	215.85 ± 33.50	226.85 ± 46.90	223.35 ± 41.87	225.23 ± 31.00	217.00 ± 36.11
			精巢上体尾部(x10 <sup>6</sup> )	250.40 ± 50.17	230.96 ± 64.80	253.78 ± 40.52	242.02 ± 47.12	260.40 ± 41.83	246.29 ± 37.34	246.54 ± 32.36	254.94 ± 40.51
		精子運動率(%)	84.58 ± 8.26	81.09 ± 21.02	85.13 ± 10.50	85.12 ± 7.92	92.69 ± 5.33	90.59 ± 9.97	90.21 ± 8.16	91.78 ± 6.54	
		異常形態精子率(%)	0.73 ± 0.61	5.35 ± 19.69	1.26 ± 0.96	0.69 ± 0.76	0.60 ± 0.53	0.83 ± 0.72	1.31 ± 0.84	1.52 ± 1.18	
	雌	性成熟	膣開口日齢	*	*	*	*	30.0 ± 1.5	31.1 ± 2.2	30.7 ± 2.0	31.7 ± 2.1
		膣開口時体重(g)	*	*	*	*	105.0 ± 13.3	108.4 ± 11.5	108.3 ± 9.1	110.3 ± 12.2	
		正常性周期率	23/24	23/24	22/24	24/24	23/24	24/24	20/24	21/24	
		発情期間隔(性周期長)(日)	4.03 ± 0.09	4.07 ± 0.23	4.05 ± 0.21	4.10 ± 0.41	4.11 ± 0.23	4.22 ± 0.37	4.10 ± 0.19	4.12 ± 0.27	
		交尾率	24/24	23/24	24/24	24/24	24/24	24/24	23/24	24/24	
		受胎率	23/24	22/23	24/24	23/24	23/24	23/24	22/23	23/24	
		出産率	22/23	22/22	24/24	22/23	23/23	23/23	22/22	23/23	
		妊娠期間(日)	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.1 ± 0.3	22.4 ± 0.5	22.3 ± 0.5	22.3 ± 0.6	22.1 ± 0.3	
着床数	14.7 ± 1.8	15.0 ± 1.7	14.9 ± 2.0	14.8 ± 2.1	14.3 ± 2.5	14.3 ± 3.2	14.9 ± 2.7	14.7 ± 2.5			
分娩率(%)	94.33 ± 6.67	91.27 ± 8.82	93.78 ± 4.97	94.90 ± 7.23	91.33 ± 11.07	93.68 ± 8.42	91.82 ± 13.25	89.80 ± 17.89			
出産仔数	13.9 ± 2.0	13.7 ± 2.0	14.0 ± 2.1	14.0 ± 2.2	13.0 ± 2.8	13.5 ± 3.5	13.9 ± 3.1	13.3 ± 3.5			

a) 投与 0-4、0-5 週に有意な高値(p 0.01)。b) 投与 0-8、0-9 週に有意な高値(p 0.05)。c) 哺育 0-21 日に有意な高値(p 0.01)。d) 投与 9、10 週に有意な低値(p 0.05)。

e) 妊娠 0-7、0-14 日に有意な低値(p 0.05)。f) 投与 0-1 週に有意な高値(p 0.01)。g) 投与 1 週に有意な高値(p 0.05)。

/ 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。

表 2. 試験結果の概要 (続き - 1)

世代			親動物 : F0(P)				仔動物 : F1		親動物 : F1		仔動物 : F2	
投与量 (ppm)			0	600	3000	15000	0	600	3000	15000		
親動物数			雄	24	24	24	24	24	24	24	24	
			雌	24	24	24	24	24	24	24	24	24
親動物	臓器重量 <sup>a)</sup> [Mean ± S.D.]	雄	絶対重量	肝臓(g)	18.971 ± 3.049	18.036 ± 2.434	18.821 ± 1.956	19.368 ± 2.512	19.279 ± 2.411	19.603 ± 2.880	20.145 ± 3.312	21.936 ± 4.053
				甲状腺(mg)	27.04 ± 3.09	26.54 ± 4.86	28.23 ± 5.74	26.60 ± 6.46	25.35 ± 5.15	26.96 ± 5.01	29.83 ± 5.40	26.85 ± 5.12
				副腎(mg)	56.6 ± 9.1	54.5 ± 7.5	52.2 ± 7.7	49.9 ± 7.6	60.5 ± 6.2	60.1 ± 9.1	56.7 ± 8.3	56.7 ± 5.9
				精巢上体(g)	1.302 ± 0.130	1.230 ± 0.176	1.292 ± 0.077	1.235 ± 0.105	1.276 ± 0.149	1.277 ± 0.132	1.319 ± 0.105	1.285 ± 0.094
		相対重量(%)	肝臓	3.23 ± 0.24	3.13 ± 0.29	3.21 ± 0.28	3.44 ± 0.23	3.19 ± 0.32	3.24 ± 0.28	3.26 ± 0.29	3.53 ± 0.35	
			甲状腺(x10 <sup>-3</sup> )	4.64 ± 0.56	4.62 ± 0.73	4.80 ± 0.90	4.72 ± 1.03	4.19 ± 0.79	4.49 ± 0.92	4.88 ± 0.98	4.37 ± 0.89	
			副腎(x10 <sup>-3</sup> )	9.69 ± 1.41	9.53 ± 1.45	8.89 ± 1.24	8.89 ± 1.25	10.03 ± 0.95	9.97 ± 1.31	9.26 ± 1.42	9.21 ± 0.94	
			精巢上体	0.225 ± 0.027	0.218 ± 0.044	0.221 ± 0.017	0.222 ± 0.026	0.212 ± 0.026	0.213 ± 0.031	0.216 ± 0.028	0.210 ± 0.021	
	雌	絶対重量	肝臓(g)	12.956 ± 2.086	12.950 ± 1.488	12.995 ± 1.442	14.438 ± 1.756	13.428 ± 1.332	14.139 ± 2.208	14.033 ± 1.745	14.889 ± 1.617	
			腎臓(g)	2.231 ± 0.269	2.263 ± 0.179	2.233 ± 0.189	2.325 ± 0.204	2.262 ± 0.218	2.279 ± 0.194	2.324 ± 0.241	2.466 ± 0.225	
		相対重量(%)	肝臓	4.14 ± 0.57	4.11 ± 0.54	4.23 ± 0.44	4.57 ± 0.52	4.12 ± 0.27	4.28 ± 0.54	4.21 ± 0.39	4.52 ± 0.39	
			腎臓	0.713 ± 0.068	0.715 ± 0.053	0.728 ± 0.054	0.735 ± 0.047	0.696 ± 0.056	0.691 ± 0.059	0.698 ± 0.060	0.750 ± 0.063	
	剖検所見	雄	全臓器	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				
		雌	全臓器	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				
肝臓中 P-450 分子種含量 <sup>b)</sup> (p mol/mg protein)	雄	CYP3A2	55.6 ± 20.5	62.2 ± 18.5	33.2 ± 13.1	92.0 ± 15.4	*	*	*	*		
		CYP4A1	13.7 ± 3.1	15.0 ± 6.9	11.5 ± 2.6	62.8 ± 19.2	*	*	*	*		
ホルモンレベル <sup>b)</sup> (ng/mL)	雄	テストステロン	2.525 ± 1.225	1.810 ± 0.460	0.503 ± 0.258	1.262 ± 0.656	*	*	*	*		
		プロゲステロン	2.662 ± 2.514	3.605 ± 2.496	5.980 ± 2.996	3.082 ± 0.941	*	*	*	*		
病理組織学的 所見	雄	肝臓・生殖器官・下垂体・副腎	異常なし	*	*	異常なし	異常なし	*	*	異常なし		
	雌	肝臓・生殖器官・下垂体・副腎	異常なし	*	*	異常なし	異常なし	*	*	異常なし		
		腎臓	*	*	*	*	異常なし	*	*	異常なし		

a) 両側性の臓器は左右の合計を表示。

b) 検査動物数 : F0 雄親動物について、各群 6 例。

/ 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。

表 2. 試験結果の概要 (続き - 2)

世代		親動物 : F0(P)				仔動物 : F1		親動物 : F1		仔動物 : F2			
投与量 (ppm)		0	600	3000	15000	0	600	3000	15000	0	600		
腹数	雄	22	22	24	22	23	23	22	23	23	23		
	雌	21	22	23	21	23	23	21	22	21	22		
仔動物	性比 (雄出産仔数 / 総出産仔数)		0.544	0.465	0.507	0.490	0.510	0.510	0.523	0.482			
	生存率 (%)	哺育 0 日	97.57	98.82	97.78	97.20	96.24	98.60	97.92	98.57			
		哺育 4 日	97.77	96.24	97.24	97.71	96.34	97.80	99.37	98.09			
		哺育 21 日	97.73	95.45	90.63	88.07	94.02	96.74	98.86	99.46			
一般状態	雄	哺育 0 日-21 日				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			
	雌	哺育 0 日-21 日				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			
体重 (g) [Mean ± S.D.]	雄	哺育 0 日	6.85 ± 0.74	6.97 ± 0.64	6.99 ± 0.75	6.70 ± 0.66	7.06 ± 0.52	6.99 ± 0.72	6.85 ± 0.69	6.76 ± 0.56			
		哺育 4 日	10.62 ± 1.39	10.10 ± 1.40	10.50 ± 1.86	9.66 ± 1.36	11.39 ± 1.83	10.60 ± 1.51	10.68 ± 1.22	10.80 ± 1.57			
		哺育 7 日	17.36 ± 2.37	15.63 ± 2.61	16.00 ± 3.77	15.30 ± 3.24	18.26 ± 3.01	17.47 ± 2.66	18.07 ± 1.53	17.83 ± 2.21			
		哺育 14 日	35.56 ± 3.75	33.62 ± 3.31	33.37 ± 6.00	32.17 ± 4.76	36.47 ± 6.39	36.13 ± 3.86	36.82 ± 3.06	36.39 ± 3.48			
		哺育 21 日	59.03 ± 7.70	56.81 ± 6.59	55.13 ± 9.53	48.10 ± 4.81	60.86 ± 9.50	61.40 ± 6.87	60.56 ± 4.53	53.75 ± 4.85			
	雌	哺育 0 日	6.55 ± 0.69	6.54 ± 0.68	6.54 ± 0.72	6.26 ± 0.59	6.63 ± 0.64	6.53 ± 0.68	6.44 ± 0.47	6.29 ± 0.40			
		哺育 4 日	10.21 ± 1.38	9.55 ± 1.51	9.93 ± 1.62	9.10 ± 1.13	10.76 ± 2.07	9.94 ± 1.39	9.99 ± 0.94	9.98 ± 1.09			
		哺育 7 日	16.67 ± 2.40	15.40 ± 2.76	15.43 ± 3.18	14.39 ± 2.74	17.05 ± 3.69	16.80 ± 2.37	17.14 ± 1.70	16.74 ± 1.59			
		哺育 14 日	34.33 ± 3.77	33.27 ± 4.07	32.78 ± 4.50	30.00 ± 6.06	35.10 ± 6.42	35.07 ± 3.92	35.71 ± 2.92	34.80 ± 2.72			
		哺育 21 日	56.27 ± 6.58	55.38 ± 7.05	53.77 ± 7.21	45.85 ± 4.46	58.17 ± 9.41	58.72 ± 6.23	58.16 ± 4.23	51.51 ± 4.16			
		肛門生殖突起 間距離 (mm) [Mean ± S.D.]	雄	哺育 0 日	3.670 ± 0.306	3.722 ± 0.293	3.834 ± 0.351	3.564 ± 0.280	3.634 ± 0.292	3.595 ± 0.168	3.640 ± 0.201	3.650 ± 0.237	
		雌	哺育 0 日	1.758 ± 0.207	1.667 ± 0.218	1.672 ± 0.234	1.774 ± 0.216	1.763 ± 0.111	1.731 ± 0.089	1.765 ± 0.091	1.736 ± 0.089		
哺育 4 日	2.769 ± 0.337	2.703 ± 0.250	2.721 ± 0.344	2.738 ± 0.327	2.927 ± 0.232	2.894 ± 0.218	2.902 ± 0.215	2.881 ± 0.202					
発育分化 (完成率, %)	雄	耳介開展	哺育 2 日/3 日	40.5/98.1	45.1/92.2	47.7/92.9	14.9 /82.4	53.3/88.3	47.4/85.9	33.6/95.5	23.1 /94.2		
			切歯萌出	哺育 10 日/11 日	4.9/37.2	13.6/45.1	17.5/49.2	23.5 /65.5	18.6/50.1	25.3/60.7	11.9/35.0	15.6/44.6	
			哺育 12 日/13 日	70.3/93.6	72.0/90.9	79.4/96.5	85.2/96.6	92.2/98.9	75.5/91.9	77.2 /92.0	79.0/96.4		
		眼瞼開裂	哺育 13 日/14 日	8.2/70.3	9.1/62.8	4.2/56.5	11.5/47.6	18.5/63.6	24.0/68.0	15.9/62.4	10.9/65.2		
			哺育 2 日/3 日	39.1/97.3	46.3/86.2	44.4/93.3	17.8 /82.8	55.0/86.2	42.7/91.6	35.3/95.9	20.5 /93.6		
		雌	耳介開展	哺育 10 日/11 日	12.9/43.0	23.9/62.8	29.2/61.0	30.7/65.2	25.0/58.1	23.9/51.8	14.7/47.4	16.8/52.5	
	哺育 12 日/13 日			77.2/100	78.7/95.9	90.6/96.9	80.3/93.2	92.4/100	72.5 /90.2	84.4/96.7	82.0 /96.6		
	眼瞼開裂		哺育 13 日/14 日	16.8/76.9	22.0/75.0	14.2/70.1	13.6/48.9	28.8/66.3	21.7/76.1	15.5/68.3	9.1 /80.0		
		哺育 15 日	100	95.5	99.0	88.6	91.7	97.8	98.1	98.0			
	反射反応 (完成日齢) [Mean ± S.D.]	雄	正向反射		4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0		
			背地走性		7.7 ± 0.9	7.3 ± 0.6	7.4 ± 0.8	7.5 ± 1.0	7.2 ± 0.4	7.5 ± 0.9	7.4 ± 0.5	7.5 ± 0.7	
			空中正向反射		16.2 ± 1.3	16.5 ± 1.3	16.2 ± 1.7	16.2 ± 1.8	16.3 ± 1.2	16.1 ± 1.4	16.1 ± 1.4	15.6 ± 1.4	
雌		正向反射		4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.3	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.4	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0		
		背地走性		7.3 ± 0.6	7.6 ± 1.1	7.3 ± 0.6	7.5 ± 0.9	7.4 ± 0.6	7.1 ± 0.3	7.5 ± 0.7	7.1 ± 0.4		
		空中正向反射		16.2 ± 1.5	16.2 ± 1.3	16.3 ± 2.0	16.3 ± 2.2	16.4 ± 0.9	16.5 ± 1.0	16.0 ± 1.4	16.2 ± 1.6		

a) 両側性の臓器は左右の合計を表示。

/ 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) ; 低値傾向。



表 2. 試験結果の概要 ( 続き - 3 )

世代			親動物 : F0 ( P )				仔動物 : F1				親動物 : F1				仔動物 : F2					
投与量 ( ppm )			0		600		3000		15000		0		600		3000		15000			
腹数			雄		22		22		24		22		23		23		22		23	
			雌		21		22		23		21		23		23		21		22	
仔動物	臓器重量 <sup>a)</sup> [Mean ± S.D.]	雄	絶対重量	肝臓(g)	3.905 ± 0.473	3.705 ± 0.422	3.829 ± 0.683	3.753 ± 0.513	3.890 ± 0.692	3.894 ± 0.538	4.005 ± 0.439	4.221 ± 0.527								
				腎臓(g)	0.994 ± 0.101	1.016 ± 0.121	0.989 ± 0.155	0.894 ± 0.084	0.977 ± 0.136	0.999 ± 0.124	0.994 ± 0.090	0.918 ± 0.101								
				脾臓(g)	0.358 ± 0.053	0.342 ± 0.053	0.357 ± 0.073	0.318 ± 0.037	0.349 ± 0.061	0.325 ± 0.060	0.353 ± 0.063	0.298 ± 0.058								
				脳(g)	1.621 ± 0.048	1.635 ± 0.067	1.631 ± 0.092	1.594 ± 0.082	1.655 ± 0.100	1.663 ± 0.062	1.667 ± 0.050	1.641 ± 0.063								
				下垂体(mg)	3.39 ± 0.44	3.40 ± 0.48	3.48 ± 0.59	3.30 ± 0.58	3.41 ± 0.74	3.50 ± 1.00	3.53 ± 0.61	3.27 ± 0.60								
				胸腺(mg)	352.2 ± 47.6	340.3 ± 71.5	354.5 ± 87.8	270.4 ± 52.4	367.1 ± 64.0	375.2 ± 60.9	357.6 ± 54.1	292.0 ± 53.8								
				副腎(mg)	25.6 ± 3.1	26.3 ± 3.0	24.0 ± 3.7	22.5 ± 4.3	25.3 ± 5.2	24.6 ± 2.8	24.6 ± 3.1	22.0 ± 3.8								
				前立腺(mg)	40.0 ± 10.2	40.0 ± 9.3	39.9 ± 9.0	32.3 ± 9.2	42.9 ± 12.5	43.5 ± 10.0	42.8 ± 10.5	37.8 ± 8.8								
				精囊(mg)	19.6 ± 3.0	19.7 ± 3.5	20.2 ± 4.5	19.7 ± 3.6	20.0 ± 4.9	18.7 ± 3.9	19.1 ± 3.5	18.0 ± 3.1								
				雌	絶対重量	肝臓(g)	3.410 ± 0.539	3.148 ± 0.427	3.198 ± 0.629	3.004 ± 0.388	3.410 ± 0.490	3.460 ± 0.429	3.525 ± 0.426	3.675 ± 0.273						
						腎臓(g)	0.945 ± 0.097	0.924 ± 0.111	0.930 ± 0.139	0.787 ± 0.089	0.915 ± 0.101	0.924 ± 0.100	0.908 ± 0.071	0.842 ± 0.059						
						脳(g)	1.598 ± 0.071	1.589 ± 0.084	1.597 ± 0.085	1.520 ± 0.105	1.610 ± 0.079	1.613 ± 0.064	1.605 ± 0.067	1.597 ± 0.064						
						胸腺(mg)	362.4 ± 50.0	353.4 ± 53.6	361.7 ± 59.1	254.6 ± 44.9	370.1 ± 63.1	372.0 ± 58.9	347.8 ± 61.6	299.5 ± 48.7						
						甲状腺(mg)	7.75 ± 1.49	7.43 ± 1.12	7.40 ± 1.01	6.67 ± 1.03	7.89 ± 1.53	8.09 ± 1.75	8.16 ± 1.66	7.32 ± 1.23						
		副腎(mg)	25.8 ± 4.6			25.8 ± 4.2	22.8 ± 3.4	20.6 ± 3.5	23.6 ± 4.3	23.0 ± 3.3	23.3 ± 3.4	20.3 ± 3.3								
		子宮(mg)	58.8 ± 11.5			60.9 ± 15.4	63.1 ± 16.1	45.8 ± 10.9	63.3 ± 22.0	55.7 ± 14.4	52.4 ± 9.9	46.3 ± 10.8								
		相対重量(%)	肝臓			4.22 ± 0.26	4.03 ± 0.34	4.09 ± 0.37	4.60 ± 0.23	4.15 ± 0.29	4.17 ± 0.32	4.23 ± 0.34	4.81 ± 0.26							
			腎臓			1.18 ± 0.05	1.18 ± 0.09	1.20 ± 0.08	1.21 ± 0.09	1.12 ± 0.07	1.12 ± 0.08	1.09 ± 0.05	1.10 ± 0.06							
			脳			2.00 ± 0.17	2.05 ± 0.18	2.08 ± 0.24	2.35 ± 0.22	1.99 ± 0.26	1.96 ± 0.18	1.94 ± 0.14	2.10 ± 0.12							
			胸腺(x10 <sup>-3</sup> )			451 ± 48	455 ± 70	467 ± 61	389 ± 47	451 ± 47	448 ± 50	418 ± 61	391 ± 54							
			甲状腺(x10 <sup>-3</sup> )			9.72 ± 2.07	9.59 ± 1.74	9.63 ± 1.54	10.31 ± 1.76	9.70 ± 1.89	9.80 ± 2.08	9.84 ± 2.02	9.60 ± 1.57							
			副腎(x10 <sup>-3</sup> )			32.0 ± 4.8	33.1 ± 4.9	29.6 ± 4.3	31.5 ± 3.7	28.8 ± 4.3	27.9 ± 3.4	28.1 ± 3.6	26.7 ± 4.3							
			子宮(x10 <sup>-3</sup> )			74.2 ± 18.0	78.3 ± 18.8	81.0 ± 17.8	69.9 ± 13.8	76.3 ± 22.5	66.7 ± 13.2	63.0 ± 10.1	60.6 ± 13.8							
		剖検所見	雄	全臓器	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											
			雌	全臓器	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	雄	胸腺 <sup>b)</sup>	異常なし	*	*	異常なし	異常なし	*	*	異常なし								
				脾臓 <sup>c)</sup>	*	*	*	*	異常なし	*	*	異常なし								
			雌	胸腺 <sup>b)</sup>	異常なし	*	*	異常なし	異常なし	*	*	異常なし								

a) 両側性の臓器は左右の合計を表示。

b) 検査動物数 : F1 および F2 仔動物について、対照群および 15000 ppm 群各 6 例。

c) 検査動物数 : F2 仔動物について、対照群および 15000 ppm 群各 6 例。

/ 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。