An Evaluation Method for Hematological and Clinico-biochemical Values in Aged F 344 Rats on Chronic Toxicity Tests such as Long-term Inhalation Studies on the Effects of Diesel Exhaust

Kazuhito MAEJIMA and Sumi NAGASE*

*Japan Automobile Research Institute, 2530 Karima, Tsukuba-shi, Ibaraki 305,
and* Sasaki Institute, 2-2 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101, Japan*

(Received 12 September 1989/ Accepted 27 December 1989)

To determine the chronic toxicity of diesel exhaust, 2,150 F 344 rats were made to inhale various dilutions of exhaust under specific pathogen-free conditions for 16 hours a day, 6 days a week, for 30 months. Ten experimental groups, each with 120 male and 95 female 5 week-old rats, were set up and 14 males and 9 females were usually sacrificed for measurement of the 51 hematological and clinico-biochemical parameters at 7, 13, 19, and 25 months of age, respectively. These parameters were also examined in all surviving rats after 30 months of exhaust inhalation. In this experiment, no remarkable change in any of the parameters was observed in the periodic examinations. Therefore, tendencies of change in parameters were examined by comparing histograms for control and experimental groups. For the reference histograms, we used the values obtained from 144 males and 116 females aged 13–31 months. The first histogram was based on data from 1,352 rats, and the range from the minimum to the maximum value was divided into eight parts. When almost all the values were centered on a peak in the first histogram, this peak was divided into a further eight parts in the second histogram. Histogram evaluation clarified the differences between the control and experimental groups better than general statistical methods such as Student's t-test.

長期毒性試験（ディーゼル排ガス長期吸入試験） における高齢 F 344 ラットの血液学的・ 臨床生化学的検査値の一評価法

前島 一仁・長瀬 すみ*

財団法人日本自動車研究所第一研究部

*財団法人佐々木研究所化学部

定期的な血液学的・臨床生化学的検査は、長期間の毒性試験などでは不可欠な事項とされている [6]。著者らは、ディーゼル排ガスの健康影響を調査する目的で、慢性毒性試験を中心とした30か月間の長期吸入実験を実施し [1, 4, 9]、その間6か月ごとにラットの血液学的・臨床生化学的検査を行った。しかし、実験開始後1年を過ぎた頃より、血液学的・臨床生化学的性状（以後、血液性状

と呼称）に異常値を示す個体が出現し始め、吸入期間の延長とともに平均値による実験群間の比較が難しくなる項目が増加した。また、実験期間中に切迫検査されたラットは、血液データの得られたラットの約30%に達した。一方、各定期検査では、ディーゼル排ガスによる血液性状への強い、あるいは特異的な影響があまりみられなかった。そこで、著者らは、ディーゼル排ガスの吸入

による影響を血液データの得られた全てのラットを用いて全体的な傾向を把握することとした。

本研究では、これらの考えをもとに、高齢 F 344 ラットの血液性状をヒストグラム（一定の範囲の測定値を示した動物の出現頻度）で評価する方法について検討した。

材料と方法

1. ディーゼル排ガスの長期吸入実験：ディーゼル排ガスの長期吸入実験は、以下の方法で実施した。直接噴射式の大型ディーゼルエンジン（排気量11ℓ, HD 系列）および渦流室式の小型ディーゼルエンジン（排気量1.8ℓ, LD 系列）より発生させたディーゼル排ガス（以下、排ガス）は、各々の希釈トンネル内で清浄空気により希釈し、各吸入チャンバに導入した [7]。吸入チャンバには、内容積が3.1m³で排ガスが水平方向に流れる横層流方式のタイプを計10基用いた [8]。

各吸入チャンバ内には、標準的な飼育用ラック（集団飼育用20ケージ／ラック、ケージサイズ：400(H)×280(W)×180(D) mm, 最大6匹／ケージ）をそれぞれ2台ずつ収納し、1台に雄ラットを、他の1台に雌ラットを収容した。

吸入チャンバの平均換気回数は、排ガスの濃度分布を均一に維持するために60回/時とし、この時の気流速度はケージ内で平均6 cm/秒であった [8]。

ラットに対する排ガスの吸入は、1日16時間（17:00～9:00）とし、残りの8時間（9:00～17:00）は清浄空気を吸入させ、1週間に6日吸入させた。なお、両系列の対照群には、清浄空気のみを吸入させた。

2. 実験群と排ガス濃度：実験群は、各群の平均粒子濃

度を用いた呼称とした。Table 1 に実験群および各実験群における主な排ガス成分の30か月間の平均濃度を示す。

3. 供試動物と飼育管理：日本クレア（株）から4週齢で導入した2,150匹の雌雄 F 344/Jcl ラット (SPF) を、1週間の予備飼育後、5週齢より実験に用いた。各実験群とも、雄120匹、雌95匹を使用し、そのうち発がん性試験に雄64匹、雌59匹、慢性毒性試験に雄56匹、雌36匹を用いた。発がん性試験では、30か月間の吸入後（31か月齢）に生存した全ラットを、また、慢性毒性試験では、7, 13, 19および25か月齢時に原則として各群雄14匹、雌9匹を無作為に抽出して定期検査に供した。定期検査の前に異常を観察したラットは、一定の判断基準（体重変化、貧血度、衰弱度などの程度）のもとに切迫検査を行った。

飼料（日本クレア, CE-2）は、121℃、30分の高圧蒸気滅菌したものを不断給餌した。飲水は、逆浸透膜を通して一般水に塩素を添加（残留塩素濃度が0.1 ppm になるように調整）し、最終的に流水殺菌装置を通して自動給水した。吸入チャンバを含む動物飼育区域では、定期的に落下菌検査を実施した。照明は、7:00点灯、19:00消灯の12時間サイクルとし、各吸入チャンバ内の温度は23±2℃、湿度は55±10%に維持した [1]。

4. 試料の採取および測定方法：採血に供するラットは、原則として24時間の絶食を行った。試験紙による尿検査後、エーテルで麻酔したラットの腹部大動脈より、ヘパリン処理したシリンジで2.5～3.0ml 採血した（以後、ヘパリン血と呼称）。続いて同部より採血針で採血スピッツ（マイクロティナ, Becton Dickinson）に0.3ml 採血し（以後、EDTA-2 K 血と呼称）、最後に流出してくる全ての血液を遠沈管に採取した。採血直後

Table 1. Summary of gases and particle concentrations (30 months)

	Group	Particle (mg/m ³)	NO _x (ppm)	NO ₂ (ppm)	SO ₂ (ppm)
	control	0	0.05	0.02	0.06
LD	0.1 mg/m ³	0.1	1.2	0.1	0.4
	0.4 mg/m ³	0.4	4.1	0.3	1.1
	1.1 mg/m ³	1.1	10.1	0.7	2.4
	2.3 mg/m ³	2.3	20.3	1.4	4.7
HD	0.5 mg/m ³	0.5	6.2	0.5	1.0
	1.0 mg/m ³	1.0	13.1	1.0	1.8
	1.8 mg/m ³	1.8	21.7	1.7	2.8
	3.7 mg/m ³	3.7	37.5	3.0	4.6

LD : Light duty diesel engine exhaust

HD : Heavy duty diesel engine exhaust

のヘパリン血は、その一部を血液 pH およびガスの測定に用い、残血は3,000 rpm, 10分間の冷却遠沈を2度繰り返して血漿を分離した。また、遠沈管に採取した血液は、室温に1時間放置後、血漿と同様な方法で血清を分離した [3]。EDTA-2 K 血は、血液学的検査に用いた。

血液学的・臨床生化学的検査項目とその単位、試料の種類、測定法および測定機器を Table 2-A, 2-B に示す。なお、蛋白分画値は、セルロースアセテート膜による電気泳動法で測定した。膜には Titan III を、緩衝液にはイオン強度0.125のトリス・バルビタール・バルビタールナトリウム液を用いて電圧220 V, 泳動時間

45分の条件で泳動し、ボンソー S で染色した。染色した Titan III は、デンストメータ（ヘレナ研究所）により各蛋白分画値を算出した。

5. ヒストグラム：各群のヒストグラムは、血液データの得られた全てのラット（定期検査：雄578匹、雌437匹、切迫検査：雄164匹、雌173匹、計1,352匹；全供試ラットの約63%）より、雌雄別に各項目ごとの最大値と最小値を求め、その間を8クラスに等分割し、それぞれの値の範囲に相当するラットの分布を求める方法で作成した。これを1次ヒストグラムとした。1次ヒストグラムにおいて、分布がある1クラスに集中した場合は、その

Table 2- A. Parameters and methods for hematology and clinico-biochemistry

Sample	Parameter	Abbreviation	Units	Method	Instrument
<i>Clinico-biochemical analysis</i>					
Plasma	Glutamic oxalacetic transaminase	GOT	(IU/ℓ)	Karmen method	TBA-380
	Glutamic pyruvic transaminase	GPT	(IU/ℓ)	"	
	Lactate dehydrogenase	LDH	(IU/ℓ)	Wröblewski LaDue method	
	α -hydroxybutyrate dehydrogenase	HBD	(IU/ℓ)	Rosalki method	
	Creatine phosphokinase	CPK	(IU/ℓ)	Oliver method	
Serum	Alkaline phosphatase	ALP	(IU/ℓ)	GSCC method	
	Leucine aminopeptidase	LAP	(IU/ℓ)	Nagel method	
	Cholinesterase	CHE	(IU/ℓ)	DTNB method	
	Amylase	AMY	(U/dℓ)	Enzymatic method	
	Blood urea nitrogen	BUN	(mg/dℓ)	UV-Rate method	
	Creatinine	CRTN	(mg/dℓ)	Jaffé method	
	Total bilirubin	T-Bil	(mg/dℓ)	Jendrassik method	
	Glucose	Glu	(mg/dℓ)	Enzymatic method	
	Triglyceride	TRG	(mg/dℓ)	GPO method	
	Total cholesterol	T-CHO	(mg/dℓ)	Enzymatic method	
	Free cholesterol	F-CHO	(mg/dℓ)	"	
	Low density lipoprotein	LDL	(mg/dℓ)	Heparin-Ca method	
	High density lipoprotein	HDL	(mg/dℓ)	Enzymatic method	
	Pospholipid	P-L	(mg/dℓ)	"	
	Calcium	Ca	(mg/dℓ)	OCPC method	
	Magnesium	Mg	(mg/dℓ)	Xylidyl blue method	
	Inorganic phosphorus	IP	(mg/dℓ)	Molybdenum blue method	
	Sodium	Na	(mEq/ℓ)	Electrode method	Na-K analyzer
	Potassium	K	(mEq/ℓ)	"	"
	Chloride	Cl	(mEq/ℓ)	"	Chloride meter
	Total protein	TP	(g/dℓ)	Refract method	Refractometer
	Albumin	Alb	(%)	Cellulose acetate	Auto scanner
	α_1 -globulin	α_1 -G	(%)	electrophoresis	flur vis and
	α_2 - "	α_2 -G	(%)		quick quant III
	α_3 - "	α_3 -G	(%)		
	β - "	β -G	(%)		
	γ - "	γ -G	(%)		

Table 2- B. Parameters and methods for hematology and clinico-biochemistry

Sample	Parameter	Abbreviation	Units	Method	Instrument
<i>Hematological analysis</i>					
Blood with EDTA-2K	Erythrocyte count	RBC	($\times 10^6/\mu\ell$)	Laser-ray method	ELT-8
	Leucocyte count	WBC	($\times 10^3/\mu\ell$)	"	
	Platelet count	PLT	($\times 10^3/\mu\ell$)	"	
	Hematocrit	HCT	(%)	"	
	Hemoglobin concentration	HGB	(g/dℓ)	Cyanmethemoglobin modified method	
	Mean corpuscular volume	MCV	(fℓ)	Calculation	
	Mean corpuscular hemoglobin	MCH	(pg)	" "	
<hr/>					
<i>Blood pH and gas analysis</i>					
Blood with heparin sodium	Blood pH	pHa		Electrode method	Corning 158
	Carbon dioxide partial pressure	PaCO ₂	(mmHg)	"	
	Oxygen partial pressure	PaO ₂	(mmHg)	"	
	Bicarbonate	HCO ₃ ⁻	(mmol/ℓ)	Calculation	
				Oxygen saturation	O ₂ SAT (%)
<hr/>					
<i>Urinalysis</i>				Dipsticks	Uropaper
Urine	Urinary pH				
	Protein				
	Urobilinogen				
	Glucose				
<hr/>					
Body weight at exsanguination		BW	(g)		

中をさらに8クラスに等分割し、2次ヒストグラムを作成した。なお、LD, HD 両系列の吸入実験は同時に行われ、さらに両系列の対照群とも吸入チャンバの形状や飼育環境条件などには差を認めなかった[1]ことから、本研究での対照群の血液学的・臨床生化学的測定値は、両系列の対照群の値を合わせたものを用いた。

6. 評価法の比較：毒性試験などで、対照群と実験群との間の評価によく用いられる Student's t-test (以後、平均値法と呼称) と本研究でのヒストグラムによる方法 (以後、ヒストグラム法と呼称) とをいくつかの項目について比較した。なお、ヒストグラムでは、最小値側 (左側) をクラス1とし、最大値側 (右側) をクラス8とした。

成 績

1. 検査ラットの月齢分布および死亡率の推移

1.1 検査ラットの月齢分布

対照群における各項目の加齢に伴う概括的な変動パ

ターン(13か月齢時の平均値を1とした時の経時変化)と、各変動パターンに相当する項目を Fig. 1 に示す。変動パターンは、13か月齢から31か月齢にかけて以下の6つのパターンに分類された。

①：加齢に伴って大きく上昇し、31か月齢時には13か月齢時のほぼ2倍以上となる項目で、WBC (♂, ♀) などにみられた。②：加齢に伴って若干上昇する傾向を示す項目で、PLT (♂, ♀) などにみられた。③：加齢に伴って若干上昇するが、後半には逆に低下する傾向を示す項目で、Glu (♂, ♀) にみられた。④：③と逆のパターンで、加齢に伴って若干低下するが、後半には上昇する傾向を示す項目で、GOT (♂, ♀) などにみられた。⑤：加齢に伴って若干低下する傾向を示す項目で、RBC (♂, ♀) などにみられた。⑥のパターンは、加齢に伴う大きな変動を示さない項目で pHa (♂, ♀) などにみられた。

加齢に伴う変動を示す①～⑤の項目では、各群間で採血時の月齢分布に極端なアンバランスが生じた場合、ヒストグラムによる解析を誤る可能性がある。そこで、検

* Values of 13 month-old : 1

Pattern	Parameter
①	WBC(♂, ♀), T-CHO(♂), F-CHO(♂), TRG(♂, ♀), LDL(♂, ♀), LDH(♀), HBD(♀), T-Bil(♂), α_2 -G(♂, ♀), α_3 -G(♂, ♀), γ -G(♂)
②	PLT(♂, ♀), PaCO ₂ (♀), HCO ₃ ⁻ (♀), CPK(♂, ♀), CHE(♂), AMY(♀), BUN(♂), T-Bil(♀), T-CHO(♀), F-CHO(♀), P-L(♂, ♀), HDL(♂, ♀), α_1 -G(♂, ♀), γ -G(♀), BW(♀)
③	Glu(♂, ♀)
④	GOT(♂, ♀), GPT(♂), LDH(♂), HBD(♂), ALP(♂, ♀),
⑤	ALB(♂, ♀), RBC(♂, ♀), HGB(♂, ♀), HCT(♂, ♀), LAP(♂, ♀), CHE(♀), BW(♂)
⑥	MCV(♂, ♀), MCH(♂, ♀), MCHC(♂, ♀), pHa(♂, ♀), PaCO ₂ (♂), PaO ₂ (♂, ♀), HCO ₃ ⁻ (♂), O ₂ SAT(♂, ♀), AMY(♂), CRTN(♂, ♀), GPT(♀), BUN(♀), Ca(♂, ♀), Mg(♂, ♀), IP(♂, ♀), Na(♂, ♀), K(♂, ♀), Cl(♂, ♀), TP(♂, ♀), β -G(♂, ♀),

Fig. 1. Pattern of aged-related changes in hematological and clinico-biochemical values in F 344 rats aged from 13 to 31 months

査ラットの月齢分布について検討を加えた。

対照群の雄（雌）の定期検査数と切迫検査数の全検査数に対する比率は、それぞれ13～17か月齢で19.4%と1.4%（14.7%, 2.6%），18～22か月齢で19.4%と6.9%（15.5%, 9.5%），23～27か月齢で13.9%と6.9%（8.6%, 8.6%），28～31か月齢で20.1%と11.8%（31.0%, 9.5%），全体では72.9%と27.1%（69.8%, 30.2%）であった。

これに対し、最高濃度群の3.7mg/m³群では、同様に13～17か月齢；18.1%, 1.4%（13.5%, 1.9%），18～22か月齢；19.4%, 6.9%（9.6%, 1.9%），23～27か月齢；19.4%, 8.3%（11.5%, 11.5%），28～31か月齢；20.8%, 5.6%（42.3%, 7.7%），全体では77.8%, 22.2%（76.9%, 23.1%）であり、3.7mg/m³群と同

様他の実験群においても対照群との間に著しい差異は認められなかった。

1. 2 死亡率の推移

発がん性試験に用いたラット（HD 系列）の群別死亡率の推移を Fig. 2（雄）と Fig. 3（雌）に示す。対照群の雌雄は、いずれも19か月齢で約5%，25か月齢で約20%の死亡率を示した。その後、雌雄とも死亡率の急激な上昇がみられ、31か月齢では約70%の死亡率であった。これに対し、実験初期の3.7mg/m³群の雌では、7か月齢頃より死亡するラットが数例みられ、他の実験群よりやや低く推移した。しかし、16か月齢頃より死亡するラットの数は他の群との間に差がみられなくなり、31か月齢では死亡率63%で対照群との間に差はみられなかった。その他の実験群（LD 系列を含む）では、死亡率

Fig. 2. Cumulative mortality curves of male F 344 rats exposed to heavy duty diesel engine exhaust for 30 months ○: control group (fresh air) ■: 0.5 mg/m³ group (particle: 0.5 mg/m³, NO₂: 0.5 ppm, SO₂: 1.0 ppm) ▼: 1.0 mg/m³ group (particle: 1.0 mg/m³, NO₂: 1.0 ppm, SO₂: 1.8 ppm) ▲: 1.8 mg/m³ group (particle: 1.8 mg/m³, NO₂: 1.7 ppm, SO₂: 2.8 ppm) ●: 3.7 mg/m³ group (particle: 3.7 mg/m³, NO₂: 3.0 ppm, SO₂: 4.6 ppm)

Fig. 3. Cumulative mortality curves of female F 344 rats exposed to heavy duty diesel engine exhaust for 30 months. Marks and experimental groups are the same as those for Fig. 1.

の推移に对照群との差異はみられなかった。実験初期にみられた 3.7mg/m³ 群 (雌) の数匹の死亡例は、死亡直前に急激な体重減少を示した以外、病理組織学的にも特別な異常所見は認めなかった。

実験期間中, Sendai virus と Mycoplasma pulmonis は全供試ラットの 31%, Tyzzer's organism は 18%, Corynebacterium kutscheri, Salmonella typhimurium, Mouse hepatitis virus および Mouse adenovirus は 11% について血清反応による微生物学的検査を実施したが、全例とも陰性であった。また、吸入チャンバを含む動物飼育区域での平均落下菌数は、1時間あたり 3 個/1 シャーレ以下であり、微生物学的に良好な環境であった [2]。

2. 評価法の比較

2.1 平均値法とヒストグラム法が比較的対応した変化を示している例

3.7mg/m³ 群と对照群 (雌) の γ -グロブリンの推移を Fig. 4 に示す。31 か月齢における定期検査では、3.7 mg/m³ 群が对照群よりやや低い値を示したが、13, 19 および 25 か月齢時の定期検査ではいずれも 3.7mg/m³ 群が对照群より高く、しかも 13 および 25 か月齢時では統計学的にも有意な差が認められた。一方、この両群の γ -グロブリンのヒストグラムを Fig. 5 に比較した。对照群は、クラス 1 にメインピークを持つ分布を示したのに対し、3.7mg/m³ 群ではクラス 3 にメインピークが移行し、平均値法と同様に对照群に対する明らかな増加傾向が認められた。

本実験では、この γ -グロブリンのように両評価法でほぼ同様な傾向を示した項目が比較的多く認められた。

2.2 平均値法では明確な変化を把握できない例

(1) 1.0mg/m³ 群、3.7mg/m³ 群および对照群 (雌) の血清総蛋白質の推移を Fig. 6 に示す。13 か月齢時において 3.7mg/m³ 群が对照群に比べ有意な減少を示した以外特に著しい変化は見られないと一般的には判断するケースであろう。しかし、この 3 群の血清総蛋白質のヒストグラムを Fig. 7 に比較すると、对照群と 1.0mg/m³ 群はクラス 6 にメインピークを持つほぼ同じ分布を示したのに対し、3.7mg/m³ 群ではメインピークがクラス 5 に移行し、3.7mg/m³ 群の血清総蛋白質は、对照群に比べ明らかに減少していることが認められた。

(2) 0.1mg/m³ 群、2.3mg/m³ 群および对照群 (雌) のクレアチンホスフォキナーゼ活性の推移を Fig. 8 に示す。25 か月齢時の 2.3mg/m³ 群で有意な上昇がみられた以外顕著な変化が認められない項目であり、しか

Fig. 4. Changes in serum γ -globulin concentration in 13-to 31-month-old F 344 male rats in the control and 3.7 mg/m³ groups. Columns and bars represent means $\pm$ S. D. **: $p < 0.01$; significantly different from the control. □ : control, ■ : 3.7 mg/m³

Fig. 5. Distributions of serum γ -globulin concentration in 13-to 31-month-old F 344 male rats in the control (upper, n : 142) and 3.7 mg /m³ (bottom, n : 71) groups

Fig. 6. Changes in serum total protein concentration in 13-to 31-month-old F 344 female rats in the control, 1.0 mg/m³, and 3.7 mg/m³ groups. Columns and bars represent means $\pm$ S. D. **: $p < 0.01$; significantly different from the control □ : control ▨ : 1.0 mg/m³ ■ : 3.7 mg/m³

Fig. 7. Distributions of serum total Protein concentration in 13-to 31-month-old F344 female rats in the control (upper, n : 113), 1.0 mg/m³ (middle, n : 58), and 3.7 mg/m³ (bottom, n : 52) groups

Fig.8. Changes in plasma creatine phosphokinase activity in 13-to 31-month-old F 344 female rats in the control, 0. 1mg/m³, and 2. 3 mg/m³groups. Columns and bars represent means $\pm$ S. D. * : p < 0. 05 ; significantly different from the control □ : control ▨ : 0. 1 mg/m³ ■ : 2. 3 mg/m³

Fig.10. Changes in plasma glutamic pyruvic transaminase activity in 13-to 31-month-old F344 female rats in the control and 0. 4mg/m³ groups. Columns and bars represent means $\pm$ S. D. □ : control ■ : 0. 4 mg/m³

Fig.9. Distributions of plasma creatine phosphokinase activity in 13-to 31-month-old F 344 female rats in the control (upper, n : 113), 1.0 mg/m³ (middle, n : 61), and 3. 7 mg/m³ (bottom, n : 66) groups

Fig.11. Distributions of plasma glutamic pyruvic transaminase activity in 13-to 31-month-old F344 female rats in the control (upper, n : 87), and 0. 4 mg/m³ (bottom, n : 56) groups

も、1次ヒストグラムでも差がみられなかった。しかし、Fig. 9に示す2次ヒストグラムで比較すると、0.1 mg/m³群では対照群との間に差が見られないものの、2.3 mg/m³群ではメインピークがクラス2に移行し、対照群に対する上昇傾向が認められた。

(3) 0.4 mg/m³群と対照群(雌)のGPT活性の推移をFig. 10に示す。各定期検査時において0.4 mg/m³群と対照群の間には統計学的に有意な差を認めず、また、全体的な傾向も把握できない項目である。しかし、Fig. 11に示す2次ヒストグラムで比較すると、対照群がクラス2にメインピークを持つ分布を示していたのに対し、0.4 mg/m³群では、メインピークがクラス4に移行しており、対照群に対する若干の上昇傾向を認めた。

考 察

長期間にわたる毒性試験での血液学的・臨床生化学的な評価では、特に実験後期における評価が問題となる場合が多い[5]。その大きな原因として、動物の加齢に伴う個体差(測定値のバラツキ)の拡大をあげることができる。自然発生腫瘍[10]は、その個体差を拡大させる重要な要因の一つであろう。全ての血液学的・臨床生化学的測定項目が個体差の少ない推移を示す場合には、統計学的な検定も信頼の高いものになる。しかしながら、動物の加齢に伴って個体差が拡大した場合には、平均値だけで群間の差を評価することは、被験物質の生体への影響に対する判断を誤らせる可能性もある。また、統計学的手段としてよく使用される棄却検定も、高齢ラットへの適用は考えさせられる。長期の慢性毒性試験などでは、老化の影響と被験物質の影響が絡み合って解釈の困難な場面に直面することも少なくなく、安易な統計処理を行うことは慎重であるべきである。

一方、各定期検査の間に切迫検査した動物の評価の問題もあげられる。特に2年以上の実験において切迫検査された動物の比率が大きくなった場合には、定期検査動物と切迫検査動物を合わせて評価する方法も同時に検討する必要があるだろう。

著者らはこれらの条件を満たす方法として、SPF環境下で1年～2年半飼育した高齢F344ラットから得られた血液性状に関するデータをヒストグラムの形で整理し、このヒストグラムのパターンの変化で比較する方法を検討した。

その結果、本実験ではFig. 4, 5に示したγ-グロブリンのように、平均値による評価とヒストグラムによ

る評価とがほぼ同じ傾向を示すものが比較的多くみられたが、Fig. 10に示したGPT活性のように、平均値による比較では傾向すらも把握できない項目もすくなくみられた。しかも、このGPT活性は、1次ヒストグラムではその傾向が把握できず、2次ヒストグラムにおいて、すなわち大部分のラットが示す値の範囲での比較においてのみその差が確認できた。

定期検査で得られる各測定項目の平均値による評価法は、統計学的処理を行いやすいことと、増加(上昇)あるいは減少(低下)などの変化の推移を把握するにはよい方法である[11]。しかし、途中で切迫検査に供された動物や統計学的有意差が認められないような場合の評価には、難点があると考えられる。

一方、ヒストグラムによる評価法では、対照群と実験群の死亡率に顕著な差が無いこと、また、検査動物数がある程度必要であるなどの条件を要する。しかしながら、本吸入実験のように被験物質の直接的な影響による、強いあるいは特異的な変化があまり見られないような場合には、定期検査と切迫検査の動物を合わせて検討し、被験物質の影響を全体的に把握する方法も有効な評価法の一つであると考えられる。

要 約

ディーゼル排ガスの吸入による慢性毒性を調べる目的で、2,150匹のF344ラットに希釈ディーゼル排ガスを1日16時間、週6日の条件で最長30か月間吸入させた。実験群は、雄120匹、雌95匹ずつ計10群を設定し、各群より無作為に抽出した一定数を用いて7, 13, 19および25か月齢時に、51の血液学的・臨床生化学的項目を測定した。また、30か月間の吸入実験が終了した時点で、生存していた全てのラットに対し同様の測定を行った。本実験の後期(13か月齢以降)における対照群と実験群との血液学的・臨床生化学的な差異をより明らかにする目的でヒストグラムによる評価を行った。その結果、ヒストグラムによる評価法は、通常用いられる平均値による評価法に比べ対照群と実験群との間の差をより明確にすることができた。

文 献

- [1] Ishinishi, N., Kuwabara, N., Nagase, S., Suzuki, T., Ishiwata, S., and Kohno, T. (1986). Long-term inhalation studies on effects of exhaust from heavy and light duty engines on F344 rats. *In* Carcinogenic and Mutagenic Effects of Diesel Engine Exhaust, pp 329-348, Ishinishi, N, Koizumi, A., McClellan, R. O., and Stöber, W. (eds.), Elsevier, Amsterdam.

- [2] Maejima, K., Koizumi, S., and Takahashi, H. (1987). Observation on airborne bacteria in JARI laboratory animal facility. *J. Japan Automo. Res. Inst.*, **9**, 216-219.
- [3] Maejima, K., Tamura, K., Murano, M., Nakajima, T., Sueyoshi, Y., Suzuki, T., and Nagase, S. (1987). The effects of diesel exhaust on certain hematological, chemico-clinical parameters and tissue LDH activities in rats. *J. Japan Automo. Res. Inst.*, **9**, 54-57.
- [4] Maejima, K. and Nagase, S. (1989). Hematological and clinico-biochemical studies on F 344 rats inhaled diesel engine exhaust. Proceedings of the 8th World Air Congress 1989. The Netherlands, 2, pp. 149-154. Elsevier, Amsterdam.
- [5] 長瀬すみ・田中寿子 (1976). 実験動物の臨床生化学データ, ソフトサイエンス, 東京.
- [6] 大森義仁 (1981). OECD 化学物質毒性試験指針, 化学工業日報社, 東京.
- [7] Suzuki, T., Nakajima, T., Sueyoshi, Y., and Ito, T. (1985). Aimal exposure facility for diesel engine exhaust emission. *J. Japan Automo. Res. Inst.*, **7**, 238-241.
- [8] Suzuki, T., Nakajima, T., Sueyoshi, Y., and Ito, T. (1985). Design and characteristics of inhalation chamber for animal experiment. *J. Japan Automo. Res. Inst.*, **7**, 281-284.
- [9] Suzuki, T., Nakajima, T., Maejima, K., and Kato, A. (1989). Long-term inhalation studies on the effects of diesel emissions on experimental animals. 18th international congress on combustion engines, CIMAC TIANJIN '89, FISITA SESSION. pp. 29-34, Society of Automotive Engineers of Japan, Inc.
- [10] Takaki, Y., Kitamura, S., Uekusa, T., Honma, S., Aze, Y., Wakabayashi, K., Kuwabara, N., and Fukuda, Y. (1989). Spontaneous tumors in F-344/Jcl rats. *J. Toxicol. Sci.*, **14**, 181-195.
- [11] Tamura, K., Maejima, K., and Nagase, S. (1989). Hematological and clinico-biochemical effects of short-term inhalation of O₃, NO₂, and SO₂ on rats. *J. Japan Automo. Res. Inst.*, **11**, 326-329.