

厚生科学研究費補助金

生活安全総合研究事業

「繁殖影響、体内動態等に関する調査研究」

平成10年度

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

平成11年4月

試験表題

- ・ノニルフェノールのラットを用いる2世代繁殖試験
- ・ブチルベンジルフタレートのラットを用いる2世代繁殖試験
- ・メトキシクロルのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験
- ・タモキシフェンのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験
- ・エチニルエストラジオールのラットにおける28日間反復経口投与毒性試験

平成10年度 厚生科学研究費補助金研究（生活安全総合研究事業）

「ノニルフェノールのラットを用いる2世代繁殖試験」

【目 次】

	頁
要約-----	1
緒言-----	4
方法-----	5
1. 被験物質-----	5
2. 使用動物および飼育方法-----	5
3. 投与検体の調製-----	6
4. 投与量、投与方法および群構成-----	6
5. 観察および検査-----	7
5-1. 親動物 (P) -----	7
5-2. F1 出生児 -----	10
5-3. 生殖能力試験-----	12
6. データ解析法-----	15
結果-----	16
1. 親動物 (P) -----	16
1-1. 雄動物-----	16
1-2. 雌動物-----	22
2. F1 出生児 -----	29
2-1. 哺育期所見-----	29
2-2. 離乳後の所見-----	31
2-3. F1 動物の生殖能力 -----	33
2-4. F2 出生児所見 -----	36
2-5. 生殖能力試験終了雄の所見-----	36
考察-----	39

Index

Tables 1 ~ 85

Figures 1 ~ 39

試験結果概要表

【要 約】

Sprague-Dawley 系 [Crj:CD (SD) IGS, SPF] 雌雄ラットの交配前（雄では 12 週間、雌では 2 週間）および交配期間（2 週間）ならびに雄では交配期間終了後 3 週間、雌では妊娠期間を通して分娩後 21 日まで、さらに F₁ 出生児では生後 22 日（離乳日）から剖検前日まで、ノニルフェノール（以下 NP と略記）の 0、2、10、50 および 250 mg/kg を経口投与し、親動物および F₁ 動物に対する生殖発生毒性について検討した。成績は、以下のように要約される。

なお、250 mg/kg 投与群では交配前の投与期間中に全身状態の悪化を示す動物が多数認められたため、交配を中止し、剖検した。したがって、250 mg/kg 投与群については交配前までの一般状態、体重、摂餌量および性周期について記載した。

1. 親動物所見（250 mg/kg 投与群）

250 mg/kg 投与群の雄では、交配前の投与期間中に排便量減少、削瘦、活動性低下、体温低下、立毛等の全身状態の悪化が認められ、5 匹を切迫屠殺した。同群の雌でも、投与第 1 週に上記と同様の全身状態の悪化が認められ、4 匹が死亡し、12 匹を切迫屠殺した。このため、250 mg/kg 投与群の動物は、交配を中止し、生存動物もすべて剖検した。体重については、雄では投与期間中増加抑制が認められた。摂餌量では、250 mg/kg 投与群の雌雄において低下した。雌の性周期については、250 mg/kg 投与群において、投与開始後、全例（25 匹）が変化し、うち 23 例が単発情あるいは無発情となった。

2. 親動物所見（50 mg/kg 以下の投与群）

50 mg/kg 以下の投与群には雌雄とも死亡動物は認められなかった。一般状態の変化としては、投与直後に一過性の流涎が 50 mg/kg 投与群の雌雄で観察された。体重は、50 mg/kg 投与群において雄では増加抑制が認められたが、雌にはいずれの時期にも NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。摂餌量には、雌雄ともに NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

器官重量では、50 mg/kg 投与群の雄では肝臓および腎臓重量の高値、胸腺重量の低値が、雌では卵巢重量の低値が認められた。組織学検査では、50 mg/kg 投与群において雌雄ともに小葉中心性の肝細胞肥大が認められ、雄では eosinophilic body の出現程度が軽減した。

雌雄の血中ホルモン濃度、精子検査、性周期、交配、妊娠、着床および分娩・哺育に関しては、NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

3. F1 出生児の哺育期所見

F1 出生児の生存性、発育、形態、生後 0 日の肛門生殖突起間距離、行動発達および身体分化には、NP の投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。生後 22 日の剖検、生殖器官の重量、血中ホルモン濃度および生殖器官の病理組織検査には、雌雄とも NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

4. F1 出生児離乳後の所見

離乳後の一般状態の変化として、50 mg/kg 投与群で雌雄とも投与直後の流涎が観察された。

体重については、50 mg/kg 投与群の雌で育成期に体重増加抑制が認められた。雄の体重には NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。摂餌量には雌雄ともに NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

腔開口の時期が、50 mg/kg 投与群で早期化が認められたが、包皮分離の時期には NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

行動試験、10 週齢時の剖検、器官重量には、NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

5. F1 動物の生殖能力所見

性周期および交配成績に、NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

50 mg/kg 投与群において、妊娠期の体重および増加量が低値を示したが、哺育期の体重ならびに摂餌量に NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。妊娠期間、出産率には NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかったが、着床数が 50 mg/kg 投与群において低値を示した。

器官重量では、50 mg/kg 投与群において、雌では卵巢重量が低値を示し、雄では肝臓および腎臓重量が高値を示した。組織学検査では、50 mg/kg 投与群において、雌雄ともに小葉中心性の肝細胞肥大が認められた。

精子検査、雌雄の血中ホルモン濃度には、NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。

6. F2 出生児所見

50 mg/kg 投与群において、F1 母動物の着床数の低下に伴い、産児数、出生児数および生後 4 日の生児数が低値を示したが、生存性、発育および形態には影響は認められなかった。

7. 無影響量

本試験条件下におけるノニルフェノールの親動物に対する一般毒性学的無影響量は、雄では 50 mg/kg 投与群において、投与後の流涎、体重増加抑制、肝臓および腎臓重量の高値、胸腺重量の低値、小葉中心性の肝細胞肥大の発現頻度の増加、eosinophilic body の出現程度の軽減、雌では 50 mg/kg 投与群において、投与後の流涎、卵巣重量の低値が認められたことから、雌雄ともに 10 mg/kg/day、親動物に対する生殖発生毒性学的無影響量は、50 mg/kg 以下の投与群に影響は認められなかったことから、雌雄ともに 50 mg/kg/day と判断される。

F1 出生児に対する一般毒性学的無影響量は、50 mg/kg 投与群の雌雄に投与後の流涎および小葉中心性の肝細胞肥大が、雌では体重増加抑制、卵巣重量の低値が認められたことから、10 mg/kg/day、F1 出生児に対する生殖発生毒性学的無影響量は、50 mg/kg 投与群において膈開口日の早期化、F1 母動物の着床数の低下が認められたことから、10 mg/kg/day と判断される。

F2 出生児に対する生殖発生毒性学的無影響量は、生存性、発育、形態に NP 投与の影響を示唆する変化は認められなかったことから、50 mg/kg/day と判断される。

【緒 言】

ノニルフェノール（以下 NP と略記）は、アルキルフェノール類に属し、界面活性剤、油溶性フェノール樹脂の合成原料、殺虫剤、殺菌剤、酸化防止剤などに広く使用されている。ラットを用いた急性経口投与毒性試験¹⁾では、LD₅₀ 値が 1620 mg/kg であること、NP の 28 日間反復経口投与毒性試験²⁾では、250 mg/kg/day の投与で肝臓、腎臓、膀胱に影響を及ぼすことが知られている。今回、ラットを用いて NP の強制経口投与による 2 世代繁殖試験を行い、本化合物の雌雄動物に及ぼす影響について検討したので、その結果を報告する。

なお、本試験は、「OECD 化学物質試験法ガイドライン 416 / 2 世代繁殖試験」(1998 年 9 月) に準じて実施した。

【方 法】

1. 被験物質

ノニルフェノール (英名: Nonylphenol、以下 NP と略記) は、CAS No.: 25154-52-3、分子量: 220.35、分子式: $C_{15}H_{24}O$ 、比重: 0.951 (20/4°C) の刺激臭のある無色～淡黄色の高粘性の液体である。また、オルト、メタ、パラ異性体の混合物であるが、多くはパラ異性体である。

本試験には、三井化学株式会社より購入した NP (ロット番号: C1085、純度: 99.0%以上) を用いた。使用した被験物質については、試験開始前および試験終了後に秦野研究所において原体の分析を実施し、投与期間中の安定性を確認した。被験物質は使用時まで冷暗所で保管した。

2. 使用動物および飼育方法

試験には、Sprague-Dawley(SD)系 [Crj:CD(SD)IGS, SPF] ラットを、雄は 5 週齢、雌は 8 または 9 週齢にて、日本チャールス・リバー株式会社 (雄: 厚木飼育センター、雌: 筑波飼育センター) から購入し、使用した。購入した動物は、飼育環境への馴化と検疫を兼ねて入荷後 1 週間以上、予備飼育した。その間、毎日、一般状態を観察して、異常が認められた動物は試験から除外した。なお、雌は投与開始の 2 週間前から毎日膣スメアを採取し、性周期が規則正しく回帰した動物のみを試験に供した。雄は 6 週齢、雌は 13 週齢時 (いずれも投与開始日) に体重を測定し、体重別層化無作為抽出法により群分けし、雌雄とも 1 群 25 匹からなる 4 群に分けた。これらの雌雄には、油性フェルトペンにより尾に個体識別番号を示す番号を記入した。また、各飼育ケージには、群ごとに色の異なる動物カードに試験計画番号および個体識別番号を記入して掛けた。出生児に関しては、必要に応じて油性フェルトペンまたは入れ墨法により尾あるいは四肢にマークをして個体を識別した。

動物は、基準温度 $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、基準湿度 50~65%、換気回数約 15 回/時、照明 12 時間 (7 時~19 時点灯) に設定された飼育室で、金属製ケージ (220w×270d×190h mm) に 1 匹ずつ (交配時は 2 匹/ケージ) 収容し、固型飼料 (CE-2、日本クレア株式会社) および水道水 (秦野市水道局給水) を自由に摂取させて飼育した。ただし、交尾が確認された雌については、妊娠 18 日から分娩後 10 日まで、金属製床板を敷いて紙パルプ製チップ (ALPHA-dri 加商株式会社) を供給した。供給した飼料、水道水および紙パルプ製チップには、試験に支障をきたす可能性のある混入物はなかった。また、紙パルプ製チップおよび飼料については各ロットごとに、水道水については試験期間中 3 回、ゲニステインおよびダイゼインの含有の有無について (財) 日本食品分析センターで分析した。

3. 投与検体の調製

NP は水に不溶であることから、媒体はコーン油を選択した。投与検体は、NP を各濃度ごとに秤量し、コーン油（製造番号：V8P6862、V9A8239、V9F1531、ナカライテスク株式会社）に溶解して調製した。調製した検体は窒素置換し、冷蔵、遮光の条件下で保存し、調製後 10 日以内に使用した。

本試験に先立ち、調製検体の安定性試験を秦野研究所で実施した結果、被験物質の 0.1 および 12.5% (w/v) 溶液の、冷蔵、遮光条件下での 10 日間の安定性を確認した。投与期間初期に調製した各濃度の投与検体中の被験物質の含量測定を実施した結果、いずれの検体についても、所定濃度の規定範囲内にあることを確認した。なお、本投与検体は溶液であることから、均一性試験は実施しなかった。

4. 投与量、投与方法および群構成

投与経路は、OECD 化学物質試験法ガイドラインに準じてラット用胃管による強制経口投与とした。投与量は、投与量設定のための予備試験（試験計画番号：R-98-002）の結果をもとに設定した。すなわち、雌雄ラットに NP の 0、10、50 および 250 mg/kg/day を交配前 2 週間、交配期間（1 週間）、さらに雌では妊娠期間を通して分娩後 13 日まで経口投与した結果、250 mg/kg/day 投与群において雌雄ともに体重増加抑制、肝臓、腎臓重量の増加が認められ、さらに雌では、受胎率の低下、産児数の減少が認められた。50 mg/kg/day 投与群では、NP の投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。これらのことから、本試験では、雌雄動物に影響を及ぼす投与量と考えられる 250 mg/kg を高用量に設定し、以下公比 5 で除して中用量には 50 mg/kg を、低用量には 10 mg/kg を設定した。しかし、250 mg/kg 投与群において、雌では投与開始後 2 週間以内に体重減少、全身状態の悪化を呈して 4 例が死亡し、12 例が瀕死状態となった。雄でも投与 8~12 週齢に 4 例が瀕死状態となったため、250 mg/kg 投与群の雌雄動物については、交配前に剖検した。このため、新たに 2 mg/kg 投与群を設けた。対照群には、NP の媒体であるコーン油を投与した。

投与期間は、雄に対しては交配前 12 週間、交配期間（最長 2 週間）を通して剖検前日まで、雌に対しては交配前 2 週間、交配期間（最長 2 週間）および妊娠期間を通して分娩後 21 日（分娩日 = 分娩後 0 日）まで、F₁ 出生児は離乳日（生後 22 日）から剖検前日までとし、1 日 1 回、9 時から 15 時の間に投与した。投与容量は、体重 1kg 当たり 2 mL とし、雌雄とも最新の測定体重を基に算出した。ただし、妊娠中の雌は妊娠 0 日（交尾確認日）、分娩後の雌は分娩後 0、4、7、14 日の体重を基準に算出した。

各群の投与量、投与容量、調製濃度および動物番号は次の通りである。

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (w/v%)	動物番号	
					雄	雌
1	コーン油	0	2	0	MX01001~MX01035	FX01001~FX01035
2	NP	10	2	0.5	MX02001~MX02025	FX02001~FX02025
3	NP	50	2	2.5	MX03001~MX03025	FX03001~FX03025
4	NP	250	2	12.5	MX04001~MX04025	FX04001~FX04025
5	NP	2	2	0.1	MX05001~MX05025	FX05001~FX05025

雌の動物番号は、交配前に「FB」に変更した（例：FX01001 → FB01001）。

5. 観察および検査

5-1. 親動物（P）

1) 一般状態

飼育期間中は毎日1回、投与期間中は毎日2回以上観察した。

2) 体重測定

投与期間中に週2回測定した。また、交尾が確認された雌では妊娠0、4、7、14、20日、さらに分娩が確認された雌では、分娩後0、4、7、14、20日に測定した。

3) 摂餌量測定

投与期間中（交配期間を除く）に週2回測定した。また、交尾が確認された雌では妊娠1~2、7~8、13~14、19~20日、さらに分娩した雌では分娩後3~4日、6~7日、9~10日の摂餌量を測定した。

4) 性周期

投与開始2週間前（11週齢時）から交配開始後、交尾が確認されるまで、毎日午前中に腔スメアを採取し、腔垢塗沫標本を作製して腔垢像により性周期を観察した。腔垢像は発情前期、発情期、発情休止期に分類した。性周期の型は、投与前2週間および投与開始後2週間の各観察期間内に少なくとも2回以上の発情期像を示した雌のうち、規則的に4日あるいは5日ごとに発情が回帰した

ものを4日周期(4-day)あるいは5日周期(5-day)とし、4日と5日の間隔が混在して発情を回帰した動物は4/5日周期(4/5-day)に、発情期を1日しか示さなかった動物は単発情(monoestrus)に、発情期を示さなかった動物は、無発情(anestrus)に、これらに分類されないものは不正性周期(irregular)とし、各型の性周期を示す動物の頻度を求めた。また、単発情および無発情以外の動物について平均発情回帰回数を算出した。

5) 交配

交配は、同群内の雌雄を1対1で連続同居方式とし、交配期間は最長2週間とした。交尾の確認は、毎朝、膣スミア中の精子の存在および膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠0日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率 $[(\text{交尾確認動物数}/\text{交配動物数})\times 100]$ 、受胎率 $[(\text{妊娠動物数}/\text{交尾確認動物数})\times 100]$ 、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

6) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の観察は観察可能な動物について行った。分娩の確認は毎日17時までに行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日(分娩後0日)として妊娠期間(妊娠0日~分娩日の日数)を算出し、出産率 $[(\text{生児出産雌数}/\text{妊娠雌数})\times 100]$ を求めた。分娩後は、哺育状態を毎日観察した。

7) 病理学検査

雄動物は、投与第17週の13時から15時の間に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血し、剖検した。その際、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上部、前立腺+精嚢、前立腺腹葉、精嚢、甲状腺および下垂体の重量を測定し、精巣および精巣上部はブアン液に、その他の器官および異常が認められた器官は10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。高用量群(50 mg/kg 投与群)および対照群の10例については、精巣、精巣上部、前立腺腹葉、精嚢、凝固腺、乳腺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、膀胱、胸腺、副腎、下垂体、上皮小体および甲状腺の病理組織学検査を実施し、高用量群の動物で異常が認められた器官については、その他の投与群の10例についても病理組織学検査を実施した。剖検時に異常が認められた器官(胃)についても病理組織学検査を実施した。

分娩が確認された母動物は分娩後 22 日、出産予定日を過ぎても分娩しなかった雌動物は妊娠 25 日相当日以降、交尾が確認されなかった雌動物は同居期間終了後 6 日以上経過した後に、それぞれ 13 時から 15 時の間にペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血し、剖検した。その際、子宮については着床痕を数えた。また、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、卵巣、子宮、甲状腺および下垂体については器官重量を測定し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。高用量群 (50 mg/kg 投与群) および対照群の 10 匹については、卵巣、卵管、子宮、子宮頸、膣、乳腺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胸腺、膀胱、副腎、上皮小体、甲状腺および下垂体の病理組織学検査を実施し、高用量群の動物で異常が認められた器官については、その他の投与群の 10 匹についても病理組織学検査を実施した。

8) 精子検査

雄動物は、剖検時に片側の精巣上体尾部を用いて精子検査を実施した。原則として、右側の精巣上体尾部より精子を採取後、培養液で希釈し、HTM-IVOS (Hamilton-Thorne)を用いて運動精子率〔(運動精子数/検査精子数)×100〕および前進精子率〔(前進精子数/運動精子数)×100〕を測定した。運動精子率を測定した精巣上体尾部は、凍結保存した。精子数の検査は、凍結保存した精巣上体尾部を解凍後、ホモゲナイズした精液を Modified IDENT Stain kit (Hamilton-Thorne)により染色し、HTM-IVOS により精巣上体尾部の重量当たりの精子数を求めた。

9) ホルモン濃度測定

剖検時に採取した血液は、血清を分離して凍結保存後、テストステロン (雄のみ)、エストラジオール (雌のみ)、プロラクチン (雌のみ)、黄体形成ホルモン (LH)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、トリヨードサイロニン (T₃)、サイロキシシン (T₄)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)の各濃度を以下に示すキットを用いて測定した。

測定項目	方法	キット名	製造者
テストステロン	EIA (ヒト用)	Active Testosterone EIA	Diagnostic Systems Laboratories
エストラジオール	EIA (ヒト用)	Active Estradiol EIA	Diagnostic Systems Laboratories
プロラクチン	EIA (ラット用)	ラット PRL EIA システム	Amersham Pharmacia Biotech
LH	EIA (ラット用)	ラット LH EIA システム	Amersham Pharmacia Biotech
FSH	EIA (ラット用)	ラット FSH EIA システム	Amersham Pharmacia Biotech
TSH	EIA (ラット用)	ラット TSH EIA システム	Amersham Pharmacia Biotech
T ₃	EIA (ヒト用)	Active Total T ₃ EIA	Diagnostic Systems Laboratories
T ₄	EIA (ヒト用)	Active Thyroxine (T ₄) EIA	Diagnostic Systems Laboratories

5-2. F1 出生児

1) 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

2) 産児数および死亡児

出生日に産児数（生存児＋死亡児）を調べて、児の産出率〔(産児数/着床痕数)×100〕および出生率〔(生後0日の生存児数/着床痕数)×100〕を求めた。生後0日の生存児は外表を観察し、性別および外表奇形の有無を検査した。

生後1日以降は、毎日、生存児数を調べ、生後4日の生存率〔(生後4日の生存児数/生後0日の生存児数)×100〕および離乳率〔(生後21日の生存児数/同腹児数調整後の生存児数)×100〕を求めた。生後4日に同腹児数を8（原則として雌雄各4匹）に調整し、同腹児数が8以下のものについては調整を行わなかった。死亡児および哺育児数調整後の余剰児については剖検し、異常が認められた器官は10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

3) 肛門生殖突起間距離

生後0日の生存児について、肛門と生殖突起間の距離をノギスを用いて測定した。その際、個別に体重を測定した。

4) 体重

生後0、4、7、14日（雌雄別の litter 重量）および21日（各個体重量）に測定した。生後21日以降は13週齢まで毎週1回（7日間隔）測定した。

5) 摂餌量

雌雄各群とも全例について、生後21日以降、交配前期間に週1回測定した。ただし、2匹/ケージで飼育中の動物については、ケージごとに餌重量を測定し、1匹あたりの摂餌量を算出した。

6) 行動発達および身体的分化

各腹雌雄各2匹について、行動発達の指標として、生後1日から立ち直り反射、生後4日から断崖落下回避反応、生後9日から背地走性の検査を実施し、さらに、身体的分化の指標として、生後7日から上顎切歯の萌出、生後10日から外耳道の開通、生後12日から眼瞼の開裂の時期を観察し

た。

7) 離乳児の剖検およびホルモン濃度測定

各腹とも生後 22 日に雌雄各 2 匹をペントバルビタール麻酔下で採血し、剖検した。その際、精巣、精巣上体、前立腺+精嚢、卵巣および子宮の重量を測定し、精巣、精巣上体、前立腺および精嚢はブアン液に、その他の器官および異常が認められた器官は 10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。高用量群 (50 mg/kg 投与群) および対照群の各 10 例については、上記保存器官の病理組織学検査を実施した。剖検時に採取した血液は、血清を分離して凍結保存し、テストステロン (雄のみ)、エストラジオール (雌のみ)、プロラクチン (雌のみ)、LH、FSH、T₃、T₄、TSH の各濃度を測定した。

8) 行動・機能試験

各群とも各腹雌雄 1 匹について、育成期間中に以下の行動・機能試験を実施した。

(1) オープンフィールド試験

5~6 週齢で検査した。Hall の装置を応用して作製した、直径 150cm、高さ 40cm の円形フィールドの中央に動物を置き、箱で約 20 秒間動物を覆った後、静かに箱を取り除いて動物の行動 1 日 1 回、3 分間、3 日間にわたり観察した。行動観察の指標は、静止時間 (箱を取り除いた時点より中央区画を出るまでの時間、Latency ; 秒)、移動距離 (Ambulation ; cm)、立ち上がり回数 (Raring)、身繕い回数 (Grooming)、排糞数 (Defecation) および排尿回数 (Urination) の 6 項目とし、核項目について連続した 3 日間の変動を調べた。なお、行動の観察と記録には、行動検査用自動解析画像システム (TK-403、(有)ユニコム) を用いた。

(2) T 型水迷路学習試験

6~7 週齢で検査した。6 箇所を選択点を持つ T 型水迷路箱 (縦 150cm、横 150cm、深さ 40cm、水路幅 15cm、直線水路 2 本) を用い、水温 21~22°C の条件下で Biel の方法の変法に従い検査した。第 1 日は、直線水路で連続 5 回予備試行させ、その翌日から連続して 3 日間、ほぼ定刻に T 型水迷路を 1 日 3 回試行させ、ゴールに到達するまでの所要時間および錯誤数を調べた。3 分以内にゴールに到達しなかった場合は、未到達として記録し、データの集計に際しては、その増加の有無を検討した後、無効とした。なお、予備試行のデータは、評価対象から除外した。

(3) 自発運動量

7~8 週齢で検査した。20 チャンネル自発運動量測定装置（回転ケージ：日本ケージ株式会社、記録集計装置：精巧電気株式会社）を用い、給餌、給水条件下で 24 時間のケージ回転数を測定した。

9) 性成熟観察

生殖能力試験（後述）を実施する個体について、膣の開口および包皮分離の時期を観察し、完成日に体重を測定した。また、行動試験を実施した動物および生殖能力試験を実施しない動物は、10 週齢において剖検した。その際、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精嚢、卵巣および子宮の重量を測定した。

5-3. 生殖能力試験

各腹とも雌雄各 1 匹について生殖能力試験を実施した。

1) 性周期

11 週齢から交配開始後、交尾が確認されるまで、毎日午前中に膣スメアを採取し、膣垢塗沫標本作製して膣垢像により性周期を観察した。膣垢像は発情前期、発情期、発情休止期に分類した。性周期の型は、2 週間の観察期間内に少なくとも 2 回以上の発情期像を示した雌のうち、規則的に 4 日あるいは 5 日ごとに発情が回帰したものを 4 日周期 (4-day) あるいは 5 日周期 (5-day) とし、4 日と 5 日の間隔が混在して発情を回帰した動物は 4/5 日周期 (4/5-day) に、発情期を 1 日しか示さなかった動物は単発情 (monoestrus) に、発情期を示さなかった動物は、無発情 (anestrus) に、これらに分類されないものは不正性周期 (irregular) とし、各型の性周期を示す動物の頻度を求めた。また、単発情および無発情以外の動物について平均発情回帰回数を算出した。

2) 交配

13 週齢にて、兄妹交配を避けて同群内の雌雄を 1 対 1 で連続同居方式で交配させた。交配期間は最長 2 週間とした。交尾の確認は、膣スメア中の精子の存在および膣栓の確認により行い、交尾が確認された雌については、その日を妊娠 0 日として起算するとともに、雄から分離して個別に飼育した。交配結果および妊娠の成否により、各投与群における交尾率〔(交尾確認動物数/交配動物数)×100〕、受胎率〔(妊娠動物数/交尾確認動物数)×100〕、同居開始日から交尾確認日までの日数およびその間に回帰した発情期の回数を求めた。

3) 分娩・哺育状態の観察

交尾が確認された雌は、全例を自然分娩させた。分娩状態の観察は観察可能な動物について行った。分娩の確認は毎日17時までに行い、分娩が完了していることを確認した動物については、その日を分娩日（分娩後0日）として妊娠期間（妊娠0日～分娩日の日数）を算出し、出産率〔(生児出産雌数/妊娠雌数)×100〕を求めた。分娩後は、哺育状態を毎日観察した。

4) 病理学検査

生殖能力試験を終了した雄動物は、18週齢時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血し、剖検した。その際、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、精巣、精巣上体、前立腺+精囊、前立腺腹葉、精囊、甲状腺および下垂体の重量を測定し、精巣および精巣上体はブアン液に、その他の器官および異常が認められた器官は10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。高用量群（50 mg/kg 投与群）および対照群の各10匹については、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精囊、凝固腺、乳腺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、膀胱、胸腺、副腎、下垂体、上皮小体および甲状腺の病理組織学検査を実施し、高用量群（50 mg/kg 投与群）の動物で異常が認められた器官については、その他の投与群の各10匹についても病理組織学検査を実施した。

5) 精子検査

雄動物は、剖検時に片側の精巣上体尾部を用いて精子検査を実施した。原則として、右側の精巣上体尾部より精子を採取後、培養液で希釈し、HTM-IVOS (Hamilton-Thorne)を用いて運動精子率〔(運動精子数/検査精子数)×100〕および前進精子率〔(前進精子数/運動精子数)×100〕を測定した。運動精子率および前進精子率を測定した精巣上体尾部は、凍結保存した。精子数の検査は、凍結保存した精巣上体尾部を解凍後、ホモゲナイズした精液を Modified IDENT Stain kit (Hamilton-Thorne)により染色し、HTM-IVOSにより精巣上体尾部の重量当たりの精子数を求めた。

6) ホルモン濃度測定

剖検時に採取した血液は、血清を分離して凍結保存後、テストステロン（雄のみ）、エストラジオール（雌のみ）、プロラクチン（雌のみ）、LH、FSH、T₃、T₄、TSHの各濃度を測定した。

7) F₁母動物およびF₂出生児の観察

(1) F₁母動物の観察

A. 一般状態

飼育期間中毎日1回、投与期間中は毎日2回以上観察した。

B. 体重

交尾雌については、妊娠0、7、14、20日に測定し、分娩後は、分娩後0、4、7、14、21日に測定した。

C. 摂餌量

交尾雌については、妊娠1~2日、7~8日、13~14日、19~20日、さらに分娩した雌では分娩後3~4日、6~7日、9~10日の摂餌量を測定した。

D. 病理学検査

分娩した雌は分娩後21日、出産予定日を過ぎても分娩しなかった雌は妊娠25日相当日以降、交尾が確認されなかった雌は同居期間終了後6日以上経過した後に、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で採血し、剖検した。その際、子宮については着床痕を数えた。また、脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、副腎、胸腺、卵巣、子宮、甲状腺および下垂体については器官重量を測定し、10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。高用量群(50 mg/kg 投与群)および対照群の10匹については、卵巣、卵管、子宮、子宮頸、膣、乳腺、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、肺、胸腺、膀胱、副腎、上皮小体、甲状腺および下垂体の病理組織学検査を実施し、高用量群の動物で異常が認められた器官については、その他の投与群の10匹についても病理組織学検査を実施した。

(2) F₂出生児の観察

A. 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

B. 産児数および死亡児

出生日に産児数(生存児+死亡児)を調べて、児の産出率〔(産児数/着床痕数)×100〕および出生率〔(生後0日の生存児数/着床痕数)×100〕を求めた。生後0日の生存児は外表を観察し、性別お

よび外表奇形の有無を検査した。生後1日以降は、毎日、生存児数を調べ、生後4日の生存率〔(生後4日の生存児数/生後0日の生存児数)×100〕および離乳率〔(生後21日の生存児数/同腹児数調整後の生存児数)×100〕を求めた。生後4日に同腹児数を8(原則として雌雄各4匹)に調整し、同腹児数が8以下のものについては調整を行わなかった。死亡児および哺育児数調整後の余剰児については剖検し、異常が認められた器官は10%ホルマリンに保存した。

C. 体重

生後0、4、7、14日(雌雄別の litter 重量)および21日(各個体重量)に体重を測定した。

D. 剖検

生後21日にすべての出生児をエーテル吸入により致死させ、剖検した。その際、異常が認められた器官は10%中性緩衝ホルマリン液に固定して保存した。

6. データ解析法

交尾率、受胎率および出生児の形態異常出現頻度については Fisher の直接確率検定を行った。病理組織学所見では、グレード分けしたデータは、Mann-Whitney のU検定により、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定により対照群と NP 投与群の間の有意差検定を行った。その他のデータは、個体ごとに得られた値あるいは各腹ごとの平均値を1標本として、先ず Bartlett 法により各群の分散の一様性について検定を行った。分散が一様である場合には、一元配置型の分散分析を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法により多重比較を行った。一方、いずれかの群で分散が0となる場合および分散が一様でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意性が認められる場合には、Dunnett 型の検定法により多重比較を行った。

途中剖検した 250 mg/kg 投与群の剖検日までの体重および摂餌量のデータについては、評価の対象として有意差検定を実施した。また、同群の器官重量、精子検査、ホルモン測定、性周期については参考データとして Table に掲載した。