

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。死亡児および調整後の余剰児については剖検し、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発達³⁾

各腹雌雄各2匹について、行動発達の指標として、①立ち直り反射、②断崖落下回避反応、③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、①上顎切歯の萌出、②外耳道の開通、③眼瞼の開裂の時期を観察した。

(7) 離乳児の剖検および血中ホルモン濃度測定

各腹とも雌雄各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。高用量群および対照群の10例については、上記重量測定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) 行動試験⁵⁾

各腹雌雄各1匹について、5～6週齢においてオープン・フィールド試験、6～7週齢においてT型水迷路学習試験、7～8週齢において回転ケージによる自発運動量の測定を行った。

(9) 性成熟

生殖能力（後述）を検査する個体について、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、行動試験を終了した各個体および生殖能力試験を実施しない個体は、10週齢にて剖検した。その際、精巣、精巣上体、前立腺腹葉、精囊、卵巣および子宮の重量を測定した。

(10) 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、膣スメアを採取して、性周期を観察した。

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 剖検・病理組織学検査

生殖能力試験を終了した雄動物は、18～19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。高用量群および対照群の10例については、精巣、精巣上体、前立腺、精嚢、凝固腺、肝臓、腎臓、乳腺、甲状腺、下垂体および副腎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（精巣、精巣上体）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。

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〕を測定した。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 母動物 (F1) および出生児 (F2) の観察

母動物 (F1) の観察

イ. 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

ロ. 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。

ハ. 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。

ニ. 剖検

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。高用量群および対照群の10例については、卵巣、子宮、膣、肝臓、腎臓、乳腺、甲状腺、下垂体および副腎の病理組織学検査を実施した。

出生児 (F2) の観察

イ. 一般状態

飼育期間中、毎日1回以上観察した。

ロ. 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。死亡児および調整後の余剰児については剖検し、10%ホルマリン溶液に固定して保存した。

ハ. 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。

ニ. 剖検

生後21日に、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⁶⁾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^{6, 7)}により、陽性グレードの合計値は Fisher の直確率の片側検定により対照群と TPA 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⁸⁾により各群の分散の一樣性について検定を行った。分散が一樣である場合には、一元配置型の分散分析⁸⁾を行い、群間に有意性が認められる場合は、Dunnett 法⁹⁾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樣でない場合には、Kruskal-Wallis の順位検定¹⁰⁾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。

【結 果】

1. 親動物 (P)

1) 一般状態

死亡動物は、いずれの投与群においても観察されなかった。流涎が 100 mg/kg 投与群の雄18例、雌10例、および 500 mg/kg 投与群の雌雄各全例で認められた。流涎は、最も早い動物で投与2日から認められ、いずれの場合も投与直後にのみ観察された。500 mg/kg 投与群では、投与5週から小型の落下プラグがトレー上に観察された。その他、腹部の脱毛が 100 mg/kg 投与群の雌1例に、頸部または頬部の痂皮が対照群の雄1例、20 mg/kg 投与群の雄1例および 500 mg/kg 投与群の雄2例に、鼠けい部の腫瘤が 500 mg/kg 投与群の雌1例にそれぞれ観察された。

2) 体重 (Fig. 1, 2; Tables 1~4)

投与15週以降の体重が雄の 500 mg/kg 投与群において、対照群より有意に低下した。しかし、雄の 100 mg/kg 以下の投与群および雌の BBP 各投与群の体重については、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 摂餌量 (Tables 5~8)

全投与期間を通して、雌雄とも、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

4) 性周期および交配成績 (Tables 9, 10)

投与開始後に性周期が変化した動物が対照群、20 mg/kg および 100 mg/kg 投与群で各1例、500 mg/kg 投与群で2例認められたが、性周期の変化に特定の傾向はみられなかったことから、BBP の影響を示唆する変化ではないと判断した。

交配成績では、20 mg/kg 投与群の受胎率がやや低下したが、BBP 各投与群の交尾率および 100 mg/kg 以上の投与群における受胎率に対照群との差はなかった。また、交尾までの日数およびその間の回帰発情数にも、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

5) 出産率、妊娠期間および着床数 (Table 20)

出産率は、全投与群とも100%であった。妊娠期間および着床数に関しても、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

6) 分娩および哺育状態

分娩状態の観察では、分娩後に膣からの出血が止まらなかった例が 500 mg/kg 投与群に 2 例認められたが、その他の動物に異常は観察されなかった。哺育状態の観察では、異常を示した動物は認められなかった。

7) 剖検所見 (Tables 11、12)

雄：精巣および精巣上体の小型化が対照群および 20 mg/kg 投与群の各 1 例に観察されたが、100 mg/kg 以上の投与群においては雄の生殖器の異常は観察されなかった。また、胸腺の小型化が 20 mg/kg 投与群の 4 例、100 mg/kg 投与群の 2 例、および 500 mg/kg 投与群の 1 例に観察された。その他、甲状腺の片側のみの大型化、肺の灰色小結節、肝臓の横隔膜結節、肝臓の黄色化、暗色域または灰色小斑、腎皮質の陥凹、精囊の結節が 1～2 例に認められたが、BBP 投与の影響を示唆する所見はなかった。

雌：卵巣の小型化が 20 mg/kg 投与群の 1 例（不妊）にみられた。500 mg/kg 投与群では、肝臓の軽度な腫大が 1 例（不妊）、子宮内腔の拡張が 2 例、乳腺に腫瘤が 1 例に観察された。また、胸腺の小型化が対照群および 100 mg/kg 投与群で各 2 例、20 mg/kg 投与群で 1 例、500 mg/kg 投与群で 3 例に観察された。その他、肝臓の横隔膜結節、肝臓の淡色斑、肺の暗色域、胃の暗色点・域、腎臓の退色域、腎皮質の陥凹が各 1 例ずつ認められたが、BBP 投与の影響を示唆する所見はなかった。

8) 器官重量 (Tables 13、14)

雄：肝臓および腎臓重量の有意な増加が、500 mg/kg 投与群において認められた。比体重値では、脳、肺、肝臓および腎臓重量の有意な増加が 500 mg/kg 投与群で認められた。

雌：腎臓重量の有意な増加が 100 mg/kg 以上の投与群で、また卵巣重量の有意な低下が 500 mg/kg 投与群で認められた。比体重値でも、腎臓重量の有意な増加が 100 mg/

kg 以上の投与群で、卵巣重量の有意な低下が 500 mg/kg 投与群で認められた。

9) 病理組織所見 (Tables 15、16)

雄：精巣および精巣上体では、精細管の萎縮および精巣上体の腔内細胞残屑が対照群の 1 例に観察されたが、BBP 投与群に異常はみられなかった。前立腺では、間質のリンパ球浸潤が対照群および 500 mg/kg 投与群の各 4 例に観察された。肝臓では、門脈周囲性の脂肪化が対照群の 3 例にみられた。腎臓では eosinophilic body、皮質の好塩基性尿細管および円柱が対照群および 500 mg/kg 投与群に散見されたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、対照群で腎臓および肺動脈に鉍質沈着が認められた。

雌：卵巣では、閉鎖卵胞の増加が対照群および 500 mg/kg 投与群で各 1 例みられ、卵胞嚢腫が 500 mg/kg 投与群の 1 例で観察された。肝臓では、横隔膜結節および肉芽が対照群で 1 例ずつ観察された。腎臓では、皮質の好塩基性尿細管が対照群および 500 mg/kg 投与群に散見されたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。乳腺では、腺腫が 500 mg/kg 投与群の 1 例、腺腔内細胞残屑を伴った乳腺の萎縮が対照群の 1 例、好中球浸潤が対照群および 500 mg/kg 投与群に 1 例ずつ観察された。その他、対照群の 1 例で甲状腺に胸腺組織の遺残が認められた。

10) 精子検査 (Table 17)

運動精子率および前進運動精子率には、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。また、精巣上体尾部の重量当たりの精子数に関しても、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

11) 血中ホルモン濃度 (Tables 18、19)

雄：F S H の濃度が 100 mg/kg 以上の投与群で有意に増加し、テストステロン、T 3 および T 4 の濃度が 500 mg/kg 投与群で有意に低下した。その他、L H 濃度が 20 mg/kg 投与群で有意に低下し、T S H の濃度が 100 mg/kg 投与群で有意に低下した。

雌：プロラクチンの濃度が 500 mg/kg 投与群で有意に増加し、同群では T 4 の濃度が有意に低下した。その他、T S H の濃度が 20 mg/kg 投与群で有意に増加した。

2. 出生児 (F1)

1) 生存性 (Table 20)

生後4日の生存率が500 mg/kg 投与群で有意に低下したが、産児数、児の産出率、出生率、生後0日の生存率、性比および離乳率には対照群とBBP各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 哺育児体重 (Table 21)

出生日の哺育児体重が、100 mg/kg 以上の投与群で有意に低下した。また、500 mg/kg 投与群では生後4日以降も哺育児体重が対照群より低値で推移し、生後14および21日の値が対照群より有意に低下した。

3) 肛門生殖突起間距離 (Table 22)

出生日に計測した肛門生殖突起間距離は、500 mg/kg 投与群の雄で有意に短く、同群の雌で有意に長かった。

4) 行動発達および身体的分化 (Tables 23、24)

行動発達の検査では、断崖落下回避反応の完成時期が、100 mg/kg 投与群の雄で有意に遅れたが、その他の指標に有意差は認められなかった。

身体発達の検査では、切歯萌出の時期が500 mg/kg 投与群の雄で有意に早く、外耳道開通の時期が20および100 mg/kg 投与群で、眼瞼開裂の時期が20 mg/kg 投与群で、それぞれ有意に遅かった。

5) 形態 (Tables 25~28)

生後0日における生存児の外表観察では、100 mg/kg 投与群の1例に軽度の全身浮腫が観察された。死亡児および生後4日の余剰児の剖検では、異常は認められなかった。生後22日の剖検では、精巢上部頭部の欠損が500 mg/kg 投与群の3例、肝臓と横隔膜の癒着および胸腺の萎縮が500 mg/kg 投与群の各1例、腎盂拡張が100 mg/kg 投与群の1例に認められた。

6) 離乳児の器官重量 (Tables 29、30)

雄：精巣および精巣上体重量の有意な低下が、500 mg/kg 投与群において認められ、同群では前立腺および精嚢重量が低下傾向を示した。比体重値についても、500 mg/kg 投与群では、精巣の有意な低下が認められた。

雌：卵巣重量の有意な低下が 500 mg/kg 投与群で認められた。比体重値では、子宮重量の有意な増加が 500 mg/kg 投与群で認められた。

7) 離乳児の病理組織所見 (Tables 31、32)

離乳児の生殖器官について実施した病理組織検査では、精細管の重度な萎縮とライデッヒ細胞の増加が 500 mg/kg 投与群の 1 例にみられ、さらに同群では精母細胞の減少の認められる例が有意に増加した。また、同群では精祖細胞の減少が 3 例に認められた。雌については、BBP の投与に関連したと考えられる変化は認められなかった。

8) 離乳児の血中ホルモン濃度 (Tables 33、34)

雄：F S H の濃度が 500 mg/kg 投与群で、T S H の濃度が 100 mg/kg 以上の投与群でそれぞれ有意に低下し、T 3 の濃度が 20 mg/kg 投与群で有意に増加した。テストステロン、L H および T 4 の各濃度に有意差は認められなかった。

雌：T 3 濃度が 100 mg/kg 以上の投与群で有意に低下したが、プロラクチン、L H、F S H、T S H、T 4 およびエストラジオールの各濃度に有意差は認められなかった。

9) 離乳後の一般状態

死亡動物は、いずれの投与群においても観察されなかった。流涎が、500 mg/kg 投与群の雌雄全例に観察された。その他、背部の痂皮が 500 mg/kg 投与群の雄 1 例に認められた。

10) 離乳後の体重 (Fig. 3、4 ; Tables 35~38)

雄では、生後21~35日の体重が 500 mg/kg 投与群で有意に低下し、さらに同群では、生後63日以降の体重が対照群より有意に低下した。

雌では、生後21および28日の体重が 500 mg/kg 投与群で有意に低下し、生後56日～70日の体重が対照群より有意に低下した。妊娠期および分娩後の体重については、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

11) 離乳後の摂餌量 (Tables 39～42)

雄では、生後23～24日の摂餌量が 500 mg/kg 投与群で有意に低下したが、その他の期間で測定した摂餌量には対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

雌では、生後23～24日の摂餌量が 20 mg/kg 投与群で有意に増加し、分娩後 9～10日の摂餌量が 500 mg/kg 投与群で有意に低下した。

12) 行動試験

(1) オープン・フィールド試験 (Tables 43、44)

試行 1 日における移動距離の有意な増加および試行 2 日における潜時の有意な減少が、100 mg/kg 投与群の雄で認められた以外に、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(2) 複合 T 型水迷路学習試験 (Tables 45、46)

試行 2 日の第 2 試行における移動距離が、500 mg/kg 投与群の雌で有意に減少した以外に、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

(3) 自発運動量測定 (Tables 47、48)

自発運動量の有意な増加が、500 mg/kg 投与群の雌で認められた。

13) 性成熟 (Tables 49～52)

雄の性成熟の指標とした包皮分離の日齢は、500 mg/kg 投与群で有意に遅れた。雌の性成熟の指標とした膣開口の日齢は、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。10週齢時の剖検では、精巣、精巣上体または精嚢の萎縮が 500 mg/kg 投与群の 2 例、腎盂拡張が対照群の雄 1 例、100 mg/kg 投与群の雄 2 例および 500 mg/kg 投与群の雄 3 例に認められ、水腎および子宮の拡張が 500 mg/kg 投与群の雌各 1 例に認められた。剖検時の器官重量測定では、精巣上体、精嚢および卵巣の実重量が 500 mg/kg 投与

群で有意に低下し、精巣重量の低下傾向が 500 mg/kg 投与群でみられた。

14) 性周期および交配成績 (Tables 53、54)

不規則な性周期を示した動物が 20 mg/kg 投与群に 3 例、100 mg/kg 投与群に 1 例認められた。交尾率には、BBP の影響を示唆する変化はみられなかったが、受胎率は 100 mg/kg 投与群以外は、対照群を含む各投与群で 72.7~77.8%と低値を示した。交尾までの日数およびその間の発情数に、対照群と BBP 各投与群との間に有意差はなかった。

15) 出産率、妊娠期間および着床数 (Table 64)

出産率は、全投与群とも 100%であった。妊娠期間および着床数に関しても、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

16) 分娩および哺育状態

分娩状態の観察では、異常は認められなかった。哺育状態の観察では、分娩後 3~4 日に哺育児のミルクスポットが消失した例が 100 mg/kg 投与群の 1 例でみられた以外は、異常は認められなかった。

17) 剖検所見 (Tables 55、56)

雄：精巣の小型化が 500 mg/kg 投与群の 6 例に観察され、同群ではさらに、精巣上体の小型化または欠損が 4 例、精巣の腫大が 1 例、前立腺の小型化が 1 例で観察された。その他、腎盂拡張が対照群および 20 mg/kg 投与群で各 2 例、500 mg/kg 投与群で 1 例に、腎臓の嚢胞、腎臓の腫大、脾臓の分裂がそれぞれ 1 例ずつ観察されたが、BBP 投与の影響を示唆する所見ではなかった。

雌：腎盂拡張が対照群で 2 例、BBP 各投与群で各 1 例に観察され、胸腺の小型化が対照群の 1 例、腎皮質の退色が 100 mg/kg 投与群の 1 例、肺の赤色点が 500 mg/kg 投与群の 1 例に認められた。

18) 器官重量 (Tables 57、58)

雄：心臓、脾臓、精巣、精巣上体、前立腺、前立腺+精嚢の重量が 500 mg/kg 投与

群において有意に低下した。比体重値では、脳、肺、肝臓、腎臓、甲状腺および下垂体重量が 500 mg/kg 投与群で有意に増加した。

雌：いずれの器官重量に関しても、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

19) 病理組織所見 (Tables 59、60)

雄：精巣および精巣上体では、精細管の片側性萎縮が 500 mg/kg 投与群で有意に増加し、重度なものは生殖細胞の消失および浮腫を伴っていた。また、同群では精巣上体管内の精子減少が有意に増加した。前立腺では、対照群および 500 mg/kg 投与群で間質および被膜下に単核細胞の浸潤が観察されたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。肝臓では、門脈周囲性の脂肪化が対照群の 2 例にみられたのみであった。腎臓では、対照群および 500 mg/kg 投与群に eosinophilic body、皮質の好塩基性尿細管、鉍質沈着および円柱がみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。その他、甲状腺に胸腺組織の遺残が対照群の 1 例で認められた。

雌：卵巣および子宮に異常は認められなかった。肝臓では、肉芽が対照群の 1 例に観察された。腎臓では、対照群および 500 mg/kg 投与群に好塩基性尿細管が皮質にみられたが、両群間に頻度および程度の差はなかった。また、鉍質沈着および腎盂拡張が対照群のみで観察された。その他、胸腺の萎縮が対照群の 1 例、甲状腺に胸腺組織の遺残が 500 mg/kg 投与群の 1 例で認められた。

20) 精子検査 (Table 61)

運動精子率、前進運動精子率および精巣上体尾部の重量当たりの精子数に関しても、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

21) 血中ホルモン濃度 (Tables 62、63)

雄：テストステロン、LH および T 4 の各濃度が 500 mg/kg 投与群で有意に低下した。その他、T 3 の濃度が 20 および 100 mg/kg 投与群で有意に増加した。FSH および TSH の各濃度に対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

雌：プロラクチン、LH、FSH、TSH、T3、T4 およびエストラジオールの各濃度に対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. 出生児 (F2)

1) 生存性 (Table 64)

産児数、児の産出率、出生率、生後0日の生存率、性比、生後4日の生存率および離乳率には、対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

2) 哺育児体重 (Table 65)

500 mg/kg 投与群の哺育児体重は、哺育期間を通して低値で推移したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

3) 形態 (Tables 66~69)

哺育0日における生存児の外表観察では、矮小児が500 mg/kg 投与群の1例に、索状尾、鎖肛が500 mg/kg 投与群の1例に観察された。死亡児の観察では腎盂拡張が20 mg/kg の2例に認められたが、生後4日の余剰児の剖検では、異常は認められなかった。生後21日の剖検では、精巣の小型化が対照群、100 および 500 mg/kg 投与群の各1例に認められた。その他、腎盂拡張が対照群の3例、20 mg/kg 投与群の1例、100 mg/kg 投与群の7例に、また胸腺に赤色点が100 mg/kg 投与群の1例に観察された。

【考 察】

Sprague-Dawley 系雌雄ラットの交配前および交配期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 動物は離乳日（生後 22 日）から剖検前日まで、BBP の 0、20、100 および 500 mg/kg を経口投与し、親動物および F1 動物に対する生殖毒性について検討した。

1. 親動物（P）に対する影響

いずれの投与群においても死亡例はみられなかった。一般状態の変化としては、投与直後に一過性の流涎が 100 mg/kg 以上の投与群で観察された。流涎はいずれも投与直後にしかみられなかったことから、中枢性の変化ではなく、BBP の刺激性によって惹起された変化と推定される。その他、500 mg/kg 投与群の雄で投与 5 週以降に落下プラグが観察された。100 mg/kg 以下の投与群においては同様の変化はみられていないことから、被験物質の影響を示唆するものと推察されるが、その機序は不明であった。

体重の増加抑制は 500 mg/kg 投与群の雄において認められたが、雌の体重推移および雌雄の摂餌量には、BBP 投与の影響は認められなかった。BBP の投与による体重増加抑制は、OECD 化学物質試験法ガイドライン 421 に準じた試験³⁾においても認められていることから、本試験でみられた変化も BBP の影響と考えられるが、投与 15 週以降の体重が有意に抑制されたことから、その毒性は軽度なものと判断される。性周期、交配成績、妊娠および分娩に関しては、BBP の影響を示唆する変化は認められなかった。

剖検時の器官重量測定では、腎臓重量の増加が 100 mg/kg 以上で、肝臓重量の増加および卵巣重量の低下が 500 mg/kg 投与群でみられたが、病理組織学検査では BBP の投与に起因したと考えられる所見はなかった。卵巣重量の低下については、江馬らがラットの妊娠初期に 2.0% の BBP を飲水投与した実験で報告¹¹⁾ しており、着床数の減少および血中プロジェステロン濃度の低下も報告されている。しかしながら、本実験においては着床数の減少はみられなかった。剖検時に採取した血液のホルモン濃度測定では、テストステロン濃度の低下が 500 mg/kg 投与群で、F S H 濃度の増加が 100 mg/kg の雄および 500 mg/kg 投与群の雌雄でみられた。F344 ラットに BBP を混餌投与した試験¹²⁾ においても、血中テストステロン濃度の低下と F S H および L H 濃度の増加がみられ、さらに精巣重量の低下と精細管の萎縮が報告されていることから、本試験でみられた血中ホルモ

ン濃度の変化は BBP の投与に起因した変化と推定される。しかし、本試験では LH 濃度の増加、精巣重量の低下および精巣の病理組織学的変化は認められなかった。また、剖検時に実施した精子検査でも、精子の運動性および精子数に BBP の影響と考えられる変化は認められなかった。その他、T 3 および T 4 濃度の低下が 500 mg/kg 投与群の雄でみられた。フタル酸エステル類の肝臓への影響としてペルオキシゾームの増加と薬物代謝酵素の誘導が知られており、同群では肝臓重量が増加していることから薬物代謝酵素誘導による T 3 および T 4 の代謝亢進の可能性が疑われた。

2. 出生児 (F1) に対する影響

出生時の体重低下が、100 mg/kg 以上の投与群で認められた。ラットの器官形成期に BBP の 500、750 および 1000 mg/kg を経口投与した試験⁴⁾では、750 mg/kg 以上の投与群において、胎児の子宮内死亡率の増加、胎児体重の低下、さらには胎児の骨格異常が報告されていることから、本実験でみられた出生時体重の低下も、BBP の胎生期投与により誘発された可能性が考えられる。しかし、本実験においては出生児の形態異常は観察されなかった。500 mg/kg 投与群の哺育児の体重は、哺育期間を通して対照群より低値であったが、哺育児の行動発達および身体発達の検査では、BBP 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。したがって、100 mg/kg 以上の BBP は哺育児の成長を抑制するものの、行動発達および身体発達には影響を及ぼさないと推察された。出生日に測定した肛門生殖突起距離が、500 mg/kg 投与群の雄で短縮し、雌で延長した。この結果は、BBP がエストロゲン受容体あるいはアンドロゲン受容体を介して、性ホルモンの産生に直接影響を与えるのではなく、肝臓におけるホルモンの不活化亢進により性分化に異常を来した可能性が考えられる。また、生後22日の器官重量測定では、精巣および卵巣重量の低下が 500 mg/kg 投与群でみられ、精巣の組織学的検査では生殖細胞の減少が確認された。妊娠および泌乳期に BBP を 1 ppm の割合でに飲水投与した実験¹³⁾では、肛門生殖突起距離に明らかな影響はみられていないが、同じフタル酸エステルに属するジブチルフタレートでは、ラットの器官形成期投与により雄産児の肛門生殖突起距離が短縮し、出生児の精巣重量が低下したことが報告されている。本実験の結果から、BBP の 500 mg/kg を妊娠および泌乳期に経口投与すると、出生児の性分化に影響を及ぼすことが示唆された。

離乳後は、一般状態の変化として 500 mg/kg 投与群で親世代と同様に投与直後の流

涎が観察された。離乳後の体重については、哺育中に体重低下がみられた 500 mg/kg 投与群においても順調に体重は増加し、6～7 週齢には各投与群間に体重差はみられなくなった。しかし、8 週齢以降は 100 mg/kg 投与群の雄および 500 mg/kg 投与群の雌雄で体重増加抑制が再び認められ、500 mg/kg 投与群の雄では摂餌量の低下もみられた。これらの変化は、離乳後の投与に起因した BBP の影響と推定される。性成熟の指標とした包皮分離が 500 mg/kg 投与群で遅延した。同群では、10 週齢で剖検した動物の精巣上体、精囊および卵巣重量の低下も認められたことから、これらの変化も BBP 投与の影響と考えられるが、腔開口の時期に BBP 投与の影響は認められなかった。その他、回転ケージにより測定した自発運動量が 500 mg/kg 投与群の雌で増加した。エストロゲン様の作用を示すと考えられているメトキシクロルを投与した雌ラットにおいても回転ケージによる自発運動量の増加が報告¹⁴⁾ されていることから、BBP の性分化に関連した神経系への影響が疑われるが、オープン・フィールド試験および水迷路試験では、BBP 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。

性周期に関しては、BBP 投与群で不規則周期を示した動物が少数例みられたが、交尾率、交尾までの日数およびその間の発情数に、対照群と BBP 各投与群との間に差は認められなかった。受胎率は、対照群、20 および 500 mg/kg 投与群で 72.7～77.8% と低値を示した。500 mg/kg 投与群においては、交配終了後の雄動物の剖検で、精巣重量の低下および精巣の小型化が認められていることから、同群の受胎率の低下は BBP 投与により誘発された精巣障害による可能性も否定できないが、対照群および 20 mg/kg 投与群においては精巣の異常は認められなかった。F1 出生児の妊娠および分娩に関しては、BBP 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。交配終了後の雄の剖検では、既に述べた通り 500 mg/kg 投与群で精巣の小型化が認められ、精巣および副生殖器の重量が低下した。病理組織学検査では、精細管の萎縮および精巣上体管内の精子の減少が 500 mg/kg 投与群で観察された。卵巣および子宮に関しては剖検時に異常は認められず、剖検時の精子検査でも BBP の影響は認められなかった。血中ホルモン濃度の測定では、テストステロン濃度の低下と T4 濃度の低下が 500 mg/kg 投与群でみられ、これらの変化は親世代 (P) においても認められていることから、BBP 投与に起因した変化と推定されるが、親世代でみられた FSH 濃度の増加は認められず、雄においてのみ LH 濃度の低下がみられた。

3. 出生児 (F2) に対する影響

産児数が 500 mg/kg 投与群で若干低下したが、児の生存率には BBP 投与の影響は認められなかった。哺育児体重は、500 mg/kg 投与群において、哺育期間を通して低値で推移したが、対照群との間に有意差はなかった。哺育 0 日における生存児の外表観察では、矮小児が 500 mg/kg 投与群の 1 例に、索状尾および鎖肛が同群の 1 例に観察され、生後 21 日の剖検では、精巣の小型化が対照群、100 および 500 mg/kg 投与群の各 1 例で認められたが、BBP の影響を強く示唆する形態の異常は観察されなかった。

5. 無影響量

以上の成績から、本試験条件下におけるブチルベンジルフタレートの親動物および F1 動物に対する生殖発生毒性に係わる無影響量はいずれも 20 mg/kg/day と判断される。

【文 献】

- 1) Jobling, S., Reynolds, T., White, R., Parker, M. G., Sumpter, J. P.: A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizer, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect* 103 : 582-587 (1995).
- 2) National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH).
Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS).
- 3) Piersma, A. H., Verhoef, A., Dortant, P. M.: Evaluation of the OECD 421 reproductive toxicity screening test protocol using butyl-benzyl-phthalate. *Toxicology* 99 : 191-197 (1995).
- 4) Ema, M., Itami, T., Kawasaki, H.: Teratogenic evaluation of butyl benzyl phthalate in rats by gastric intubation. *Toxicol. Lett.* 61 : 1-7 (1992).
- 5) 水谷正寛: トキシコロジーフォーラム 6 : 476-488 (1983).
- 6) 石居進: 「生物統計学入門」, 培風館, 東京 (1992).
- 7) 丹後俊郎: 「医学への統計学」 (古川俊之 監修), 朝倉書店, 東京 (1985)
- 8) 佐久間昭: 「薬効評価—計画と解析」, 東京大学出版会, 東京 (1977).
- 9) Dunnett, C. W.: New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20 : 482-491 (1964).
- 10) Kruskal, W. H., Wallis, W. A.: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J. Amer. Statist. Assoc.* 47 : 583-621 (1952).
- 11) Ema, M., Miyawaki, E., Kawashima, K.: Reproductive effects of butyl benzyl phthalate in pregnant and pseudopregnant rats. *Reprod. Toxicol.* 12 : 127-132 (1998).
- 12) Agarwal, D. K., Maronpot, R. R., Lamb, J. C., Kluwe, W.M.: Adverse effects of butyl benzyl phthalate on the reproductive and hematopoietic systems of male rats. *Toxicology* 35 : 189-206 (1985).
- 13) Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P. A., Odum, J. Paton, D., Millward, S. W., Tittensor, S., Brooks, A. N.: Normal sexual development of rats exposed to butyl benzyl phthalate from conception to weaning. *Regul. Toxicol.*

Pharmacol. 26 : 102-118 (1997).

- 14) Gray, L. E., Ostby, J. S., Ferrell, J. M., Sigmon, E. R., Goldman, J. M. :
Methoxychlor induces estrogen-like alterations of behavior and the
reproductive tract in the female rat and hamster: Effects on sex behavior,
running wheel activity, and uterine morphology. Toxicol. Appl. Pharmacol.
96 : 525-540 (1988).