

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）

「ブチルベンジルフタレート（BBP）のラットを用いる2世代繁殖試験」

【目 次】

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. 投与量および投与方法	6
5. 観察および検査	7
6. データ解析法	14
結果	15
1. 親動物 (P)	15
2. 出生児 (F1)	18
3. 出生児 (F2)	23
考察	24
文献	28
概要表	30
Figs. 1~4	
Tables 1~69	

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出生児は生後22日（離乳日）から剖検前日まで、ブチルベンジルフタレート（以下 BBP と略記）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。

1. 親動物所見

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。500 mg/kg 投与群の雄においては軽度な体重増加抑制が認められたが、雌の体重推移および雌雄の摂餌量には、BBP の影響は認められなかった。その他、性周期、交配成績、妊娠、着床および分娩に関しては、BBP の影響を示唆する変化はなかった。剖検時の器官重量測定では、肝臓重量の増加が雄の 500 mg/kg 投与群で、腎臓重量の増加が雄の 500 mg/kg 投与群および雌の 100 mg/kg 以上の投与群で、卵巣重量の低下が 500 mg/kg 投与群でそれぞれ認められた。しかし、病理組織検査では、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。剖検時に実施した精子検査では、異常値は認められなかったが、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 以上の雄および 500 mg/kg 投与群の雌で、T 3 および T 4 濃度の低下が 500 mg/kg 投与群の雄でそれぞれ認められた。

2. F1動物所見

出生時の体重低下が、100 mg/kg 以上の投与群で認められた。また、500 mg/kg 投与群の哺育児体重は、哺育期間を通して対照群より低値であったが、哺育児の生存率には BBP の影響を示唆する変化は認められなかった。哺育0日に測定した肛門生殖突起間距離は、500 mg/kg 投与群の雄で短縮し、500 mg/kg 投与群の雌で延長した。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なかった。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 投与群で認められたが、血中ホル

モン濃度測定では BBP の影響を示唆する変化はなかった。離乳後は、一般状態の変化として投与直後の流涎が 500 mg/kg 投与群で観察され、体重の増加抑制が雄の 100 mg/kg 以上の投与群および雌の 500 mg/kg 投与群で認められ、雄の 500 mg/kg 投与群では摂餌量の低下もみられた。性成熟の指標とした腔開口の時期に BBP の影響は認められなかったが、包皮分離の時期は 500 mg/kg 投与群で遅延した。10週齢の剖検では、雄の生殖器および副生殖器の萎縮が 500 mg/kg 投与群で散見され、同群では精巣上体、精囊および卵巣重量が低下した。その他、回転ケージにより測定した自発運動量の増加が雌の 500 mg/kg 投与群で認められたが、オープン・フィールド試験および水迷路学習試験においては、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。

性周期の観察では、BBP 投与群で不規則周期を示した動物が少数例認められたが、交尾率、交尾までの日数およびその間の回帰発情数に、対照群と BBP 各投与群との間に差はなかった。受胎率については、対照群、20 および 500 mg/kg 投与群で 72.7~77.8% と低値であった。妊娠動物の出産率は、全投与群とも 100% であり、妊娠期間および着床数、さらには分娩および哺育状態に関しても、BBP の影響を示唆する変化は認められなかった。

交配終了雄の剖検では、精巣の小型化が 500 mg/kg 投与群で観察され、精巣および副生殖器の重量が低下した。病理組織検査では、精細管の片側性萎縮および精巣上体管内の精子減少が 500 mg/kg 投与群で増加したが、卵巣および子宮には異常は認められなかった。剖検時の運動精子率および前進精子率は 500 mg/kg 投与群でやや低下したが、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、LH および T4 の各濃度が、雄の 500 mg/kg 投与群で低下したが、雌においては各ホルモン濃度に対照群と BBP 各投与群との間に有意差は認められなかった。

3. F2動物所見

総産児数および児の生存率には、BBP の影響を示唆する変化は認められなかった。哺育児体重は、500 mg/kg 投与群において低下傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。出生児の形態観察では、生後21日の剖検で精巣の小型化が 500 mg/kg 投与群の 1 例に認められたが、BBP の影響を示唆する異常はなかった。

4. 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。

【緒 言】

ブチルベンジルフタレート（以下 BBP と略記）は、フタル酸エステル類に属し、プラスチックの可塑剤として食器、床壁用タイル、塗料用、ペースト用、人造皮革、室内装飾品などに広く使用されている。近年、環境中に残留したフタル酸エステル類が、弱いエストロゲン活性を示し、生物の繁殖に悪影響を及ぼすことが報告されている¹⁾。BBP は、急性経口投与毒性試験でのLD₅₀値がラットは 2330 mg/kg、マウスは 4170 mg/kg であること²⁾、OECD化学物質試験法ガイドライン421 に準じた試験で 500 mg/kg/day 以上を経口投与すると生殖毒性を示すことが報告されており³⁾、経口投与によるラットの器官形成期投与試験においては 750 mg/kg/day 以上を投与すると胎児死亡と奇形が増加することも報告されている⁴⁾。本試験では、内分泌攪乱物質の健康影響に関する調査研究に係わる事業の一環として、ラットを用いて BBP の経口投与による2世代繁殖試験を行い、本化合物の親動物およびF1動物の生殖能力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。

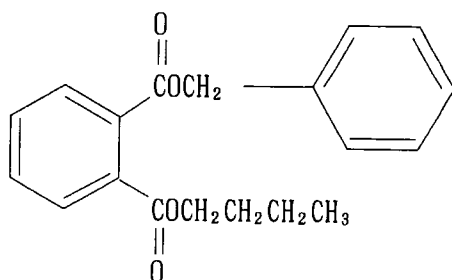
なお、本試験は、「OECD化学物質試験法ガイドライン416／2世代繁殖試験」（1998年9月）に準じて実施した。

【方 法】

1. 被験物質

ブチルベンジルフタレート（以下 BBP と略記）は、英名は butyl benzyl phthalate であり、CAS No. 85-68-7、分子量：312.37、分子式： $C_{19}H_{20}O_4$ 、比重：1.1 の微黄色透明の液体である。BBP の構造式を以下に示す。

構造式：



本試験には、東京化成工業株式会社より購入した BBP（ロット番号：GF02、純度：98.0%）を用いた。使用したロットの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化学試験室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。なお、被験物質は、使用時まで被験物質保管室にて室温で保管した。

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（注）。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

(注)	動物入荷日	雄	1998年10月28日 (Lot M1)、1998年11月4日 (Lot M2)
		雌	1998年12月22日 (Lot F1)、1998年12月22日 (Lot F2)
入荷匹数		雄	53匹 (Lot M1)、57匹 (Lot M2)
		雌	53匹 (Lot F1、9週齢)、57匹 (Lot F2、8週齢)
入荷時体重		雄	129.9 ~ 146.7 g (Lot M1)、110.5 ~ 125.2 g (Lot M2)
		雌	185.0 ~ 216.5 g (Lot F1)、174.7 ~ 196.0 g (Lot F2)
投与開始日		雄	1998年11月9日 (Lot M1)、1998年11月16日 (Lot M2)
		雌	1999年1月18日 (Lot F1)、1999年1月25日 (Lot F2)
投与開始体重		雄	241.1 ~ 268.1 g (Lot M1)、216.1 ~ 244.6 g (Lot M2)
		雌	243.4 ~ 321.3 g (Lot F1)、258.8 ~ 324.3 g (Lot F2)

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ミアを採取し、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 ± 1 ℃、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)に制御された飼育室で、金属製ケージ(220w×270d×190h mm)に1匹ずつ(交配時および離乳後の育成期は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。なお、飼育期間中の飼育環境および、供給した飼料、水道水、紙パルプ製チップ等には、試験評価に影響を及ぼすと考えられる異常および混入物はなかった。

3. 投与検体の調製

BBP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、BBP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。

本試験に先立ち、被験物質の1.0および25.0%(w/v)の調製検体について、安定性試験を実施した結果、冷蔵、遮光条件下で11日間の安定性が確認されたことから、調製した検体は、冷蔵、遮光の条件下で保存し、調製後11日以内に使用した。なお、投与期間初期に調製した各濃度の検体については、含量測定試験を実施した結果、いずれの調製検体についても、所定濃度の規定範囲内にあることを確認した。

4. 投与量および投与方法

投与経路は、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-98-003)の結果をもとに設定した。すなわち、雌雄ラットにBBPの0、20、100および500 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21日まで経口投与した結果、500 mg/kg/day 投与群において雌雄ともに肝臓、腎臓および甲状腺重量の増加が認められたが、100 mg/kg/day 投与群では、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ことから、高用量には 500 mg/kg を設定し、公比 5 で除して中用量には 100 mg/kg を、低用量には 20 mg/kg を設定した。対照群には、BBP 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）、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）までとし、さらにF1動物は、離乳日（分娩後22日）から剖検前日まで投与した。投与は 1 日 1 回、9時から15時の間に行った。投与容量は、体重 1 kg 当たり 2 mL とし、雌雄とも最新の測定日の体重を基に算出した。ただし、雌については、妊娠中は妊娠 0 日、分娩後は分娩後 0、4、7、14日の体重を基準に算出した。

各群の投与量、投与容量および、調製濃度は以下の通りである。

群	被験物質	投与量 (mg/kg)	投与容量 (mL/kg)	濃度 (w/v%)
1	コーン油	0	2	0
2	BBP	20	2	1
3	BBP	100	2	5
4	BBP	500	2	25

5. 観察および検査

1) 親動物 (P)

(1) 一般状態

飼育期間中、毎日 1 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）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。

(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、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。

(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〔(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。

(7) 剖検・病理組織学検査

雄動物は、投与18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日以上経過した後のそれぞれ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。高用量群および対照群の10例については、卵巣、子宮、腔、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。

(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〕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。

(9) 血中ホルモン濃度測定

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）、甲状腺ホルモン（T3、T4）、甲状腺刺激ホルモン（TSH）の各濃度を測定した。

2) 出生児 (F1)

(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⁵⁾

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、精嚢、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意性について検定を行った。分散が一意である場合には、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意でない場合には、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。