

2. 核内転写調節 (PPAR) を介した外因性内分泌攪乱化学物質の生殖毒性作用の機構および安全性の研究

研究者 那須 民江 (信州大学医学部衛生学講師)

研究要旨

di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の繁殖力への影響とその機構について、野生型の SV/129 マウスと同種の peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) -null マウスを用いて検討した。DEHP は市販の固形試料に混ぜ (0.05%)、全実験期間自由摂食させ、2 世代生殖毒性実験を行った。4 週間 DEHP 食を食べさせた後、雄と雌 (F_0) を交配させた。誕生した仔の数、16 週間生存した仔 (F_1) の数、及び性について検討した。 F_0 と同じ年齢に達したところで、 F_1 の雄、雌を交配し、誕生した仔 (F_2) について、 F_1 と同様の観察をした。野生型マウスの DEHP 群は雄雌ともに体重の増加の遅延、PPAR α 標的酵素蛋白 (脂肪酸 β 酸化系酵素) の誘導が観察され、PPAR α が誘導されていることが伺えた。 F_1 において、新生仔の死亡率が増加する傾向が、 F_2 においてはその死亡率が明らかに増加し、殆どが誕生 2 日以内の死亡であった。この死亡率の増加は特に雄マウスに顕著であった。一方、PPAR α -null マウスにおいては DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加はみられなかった。従って、DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加は PPAR α に依存していることが推察された。 F_0 から F_2 までの雄の精巣、雌の卵巣と子宮には形態的異常は認められなかった。野生型マウスの胎仔肝では DEHP による PPAR α 標的酵素遺伝子発現 (脂肪酸 β 酸化系酵素) の誘導は観察されず、雄ではむしろ発現が抑制されていた。DEHP は新生仔マウス肝の PPAR α 標的酵素遺伝子発現にも影響を与えることはなかった。この結果、DEHP 群の雄における新生仔と胎仔肝の PPAR α 標的酵素遺伝子発現の差は対照群より大きく、この違いが DEHP 群の雄新生仔の死亡率の増加の一因かもしれない。

研究者協力者

青山 俊文 (信州大学医学部教授)
福嶋 義光 (信州大学医学部教授)
大村 実 (九州大学大学院医学系研究科助手)
佐々木一敏 (長野県衛生公害研究所主任研究員)
畑 由紀子 (信州大学医学部大学院生)

A. 研究目的

di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP, CAS-No. 117-81-7) は *o*-フタル酸のジエステル化合物 (分子量=390.56) で、若干黄色みを帯びた無色透明の液体である。比較的疎水性であり、揮発性は低い。1930 年代から日本、アメリカで生産が開始され、1994 年にはその生産量は 1 年間に百~4 百万トンと見積もられている。主にポリビニルクロライド (PVC) 製品の可塑性や弾力性を増強するた

めに使用され、この製品には、10~60% (w/w) 程度含有されている。DEHP の疎水性、低揮発性の性質から、環境汚染は少ないとされている。例えば、0.1mm の厚さの PVC シートから 25℃において 27 年間にたった 10%流出したのみであった。しかし、高温や脂溶性物質の存在化ではもっと流出するとみなされており、環境条件によって汚染の程度は広がる可能性がある。

ヒトの曝露形態として、医療 (血液透析)、職業、一般生活環境 (PVC-舗装室内環境、食品、プラスチック製品、玩具、舗道、廃棄物など) が考えられる。Turnbull and Rodricks によると、特別な曝露がない場の DEHP の 1 日の曝露量は 0.1~790 $\mu\text{g/kg} \cdot \text{b.w.}$ であるという。

DEHP はペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体 (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR) に配位し、ペルオキシゾームを誘導するとともに、PPAR 標的遺伝子の発現 (ω -1 酸化、 β -酸化など) に影響を与える。即ち、短期間投与では肝の肥大、種々の酵素活性の増大、CYP4A1 とエポキシドヒドラーゼ、脂肪酸 β -酸化酵素活性の著しい上昇がみられる。一方、長期投与においては生殖器障害、肝障害、腎障害、肝がんが発生する。

PPAR には α 、 β (δ) γ の 3 種のサブタイプがあり、それぞれ特徴的な臓器分布を有す。例えば、精巣には PPAR β が多く発現しているが、PPAR α の発現は弱く、PPAR γ は殆ど検出されない。また、卵巣の卵胞には PPAR α と β がかなり高い濃度で発現しているが、 γ の発現は弱い。

DEHP の生殖毒性に関する報告は多い。Ward らは精子形成の低下、精巣上体に巨大細胞の出現をマウスで確認している。Lamb らはマウスを用いた研究から、精子数の減少、異常精子数の増加、精子運動性の低下に加えて、繁殖力の低下を報告している。これらの報告に反して、Kurata らはマーモセットを用いた研究で、DEHP によるペルオキシゾームの誘導も生殖障害も認められなかったと報告している。以上の結果は DEHP による生殖障害、特に繁殖力への影響、は比較的低濃度で観察され、ペルオキシゾームの増殖、換言すれば、PPAR α の誘導に関連していることを示唆する。

最近、PPAR α -null mice が米国 NIH の Gonzalez 博士のグループによって開発され、PPAR α の核内受容体としての役割の解明に有効であることが証明された。私どもも、この動物種を用いて、トリクロロエチレンの代謝物であるトリクロロ酢酸によるペルオキシゾームの誘導が PPAR α に支配されており、この誘導がトリクロロエチレンの肝がん発生と関連する可能性を明らかにした。即ち、この動物種を用いた研究がトリクロロエチレンのリスク評価に有用であることが判明した (Nakajima T. et al., 2000)。本研究は DEHP

による繁殖力への影響が核内受容体である PPAR α に制御されているかを明らかにし、その機構を解明し、リスク評価の知見を得ることを目的に計画された。

B. 研究方法

1) 実験動物

動物実験はすべて信州大学中央実験動物施設の動物実験ガイドラインに沿って行われた。雌雄の野生型 SV/129 マウス (Wild-type mice) と PPAR α -null mice (KO mice) を使用した。動物は温度、湿度、明暗が管理されたクリーンルームで市販の固形飼料と水を自由に与えられながら飼育された。それぞれの雄と雌を交配し、仔が 12 週齢に達したところで、0.05% DEHP 含有固形飼料に切り替えられた。この餌で 4 週間飼育したところで、雄、雌 (この群を F_0 とした) を交配した (図 1)。実験期間中、対照群以外のすべてのマウスはなんらかの形で (餌、経胎盤、母乳) DEHP 曝露を受けた。 F_1 が 16 週齢に達したところで、雄と雌を再び交配した。

F_0 は 36 週齢で、 F_1 と F_2 は 16 週齢で解剖した。 F_1 、 F_2 の新生仔の生存数を求め、生存率を計算した。生殖器の障害の情報を得るために、精巣、精巣上体、精のう腺 (雄)、卵巣、子宮 (雌) を、PPAR α の誘導を検索するために肝を、性ホルモンおよび脂質代謝 (トリグリセライド) の情報を得るために血清を採取した。

残りの F_2 の雄雌を交配し、18~19 日目の胎仔と生後 2 ヶ月目の新生仔マウスを解剖し、肝を採取してトリグリセライドレベルを測定すると共に、DNA を抽出し、性の決定に使用した。

2) 病理的観察

採取された精巣はブアン固定、他の臓器 (子宮、卵巣) は 10% 緩衝ホルマリン固定をし、所定の方法で病理標本を作成し、0.05% DEHP の臓器障害性を顕微鏡下で検討した。

3) 血清性ホルモン

0.05%DEHP 曝露による繁殖力の低下と性ホルモンレベルとの関係を明らかにするために、血清テストステロンおよびエストラジオールのレベルが測定された（三菱化学ピーシーエルに委託）。

4) 性の決定

マウスの胎仔、新生仔は、生殖器の発達が未熟なため、肉眼的に性別を判定することが困難である。そこで、胎仔、新生仔の組織から、DNA を抽出し、Y 番染色体上の雄性決定遺伝子である *Sry* gene を PCR 法で確認することで、胎仔、新生仔の性の決定とした。胎仔、新生仔の肝組織から QIA amp DNA Mini Kit (QIAGEN 社製) を用いて DNA の抽出を行った。Y-specific target sequence として *Sry* gene を、control sequence として muscle-specific regulatory factor である myogenin を使用し、Yano (1993) の方法に従いプライマーを設定した。次に、PCR system PE9700 (Perkin Elmer 社製) にて 35 回増幅した後、PCR product を、2.5%アクリルアミドゲルで電気泳動し確認した。即ち、*Sry* gene および myogenin が陽性の場合を雄、myogenin のみ陽性の場合を雌とした。

5) PPAR α の誘導

ペルオキシゾームの増殖および脂肪酸 β 酸化系酵素は PPAR α に強く制御されている (Aoyama et al. 1998)。投与された DEHP が親、胎仔、新生仔マウス肝の PPAR α を誘導し、ペルオキシゾームおよびミトコンドリア脂肪酸 β 酸化系酵素を誘導しているかを評価するために、Western blot 分析を行った。親および胎仔、新生仔の肝蛋白を電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。各種抗体（ペルオキシゾーム酵素抗体として、peroxisomal thiolase, PT; peroxisomal bifunctional protein, PH; D-type bifunctional protein, DBF に対する抗体およびミトコンドリア β -酸化系酵素抗体として極長鎖アシル CoA 合成酵素、

VLACS; 極長鎖アシル CoA 脱水素酵素、LVCAD; 長鎖アシル CoA 脱水素酵素 LCAD; 中鎖アシル CoA 脱水素酵素、MCAD; 短鎖アシル CoA 脱水素酵素、SCAD に対する抗体、前信州大学医学部教授橋本 隆教授より供与された) を用いて、それぞれの酵素の発現を調べ、脂質代謝と PPAR α の誘導の指標とした。

6) 肝および血清のトリグリセライドの測定

DEHP による PPAR α の誘導、これに伴う脂肪酸 β 酸化系酵素の誘導の肝と血清のトリグリセライドレベルへの影響を評価した。肝のトリグリセライドは脂肪をクロロホルム-メタノールで抽出後、血清は抽出操作なしに、和光のトリグリセライド測定キット（トリグリセライドGテストワコー）を使用して測定した。

C. 研究結果

1) 0.05%DEHP による PPAR α の誘導

DEHP による肝のペルオキシゾームの誘導を知るために、3 種のペルオキシゾーム酵素レベルを western blot 分析で解析した。雄雌共に、16 週齢、36 週齢の成熟マウス肝において、DEHP 投与群の検討した酵素 (PT, PH, DBF) の発現量は対照群より多く、ペルオキシゾームが誘導されていることが判明した。これに反して、妊娠マウスと出産後のマウスを除けば、DEHP 群と対照群の間にはミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系の酵素の発現量に差は認められなかった。一方、PPAR α -null マウスにおいては DEHP 処理によるこれらの酵素の誘導は観察されなかった。

野生型マウス胎仔肝においては、ペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差が見られ、雄の発現量は雌の約 2 倍であった。このような現象は PPAR α -null マウス胎仔肝では観察されず、PPAR α が胎仔肝の酵素発現量の性差を決定している可能性が伺えた。

野生型の妊娠マウスへの DEHP 投与は、

雄雌胎仔肝のペルオキシゾーム酵素と雌のミトコンドリア系酵素の発現には影響をあたえないが、雄のミトコンドリア系酵素の発現量を低下させた。しかし、新生仔マウス肝においては、雌雄両者の間にこれらの酵素の発現量に差は認められず、親マウスの DEHP 処理の影響も殆ど認められなかった。以上から、次の結論を得た。

- ① 0.05% DEHP は野生型成熟マウスおよび親マウス（妊娠マウス、産褥マウス）肝のペルオキシゾーム系酵素を誘導する。
- ② 0.05% DEHP は新生仔肝のペルオキシゾーム系酵素およびミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素には殆ど影響を与えず、野生型雄の胎仔肝のミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素の発現量をむしろ低下させる。この結果、野生型雄の DEHP 処理群では胎仔と新生仔の間にミトコンドリアの脂肪酸 β 酸化系酵素発現量の差異がみられる（胎仔<新生仔）。
- ③ 野生型マウス胎仔肝におけるペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差が見られ、雄>雌である。
- ④ PPAR α -null マウスにおいてはペルオキシゾーム系酵素とミトコンドリア系酵素発現量に性差も認められず、DEHP 処理による影響もない。

2) 0.05% DEHP の繁殖力への影響

野生型マウスにおいて、1 親当たりの誕生した新生仔の数は F2 において減少傾向を示したが、有意差は認められなかった（表 1）。一方、16 週齢まで生存した仔の数は明らかに減少し、生存率は対照群の 96.2% に対して 52.8% であった。新生仔の死亡は殆ど 2 日以内に観察された。興味深いのは生存した仔マウスの性をみると、雌の方が雄より圧倒的に多く、対照群の性比（雌：雄）1：0.83 に対し、DEHP 群は F1 で 1：1.4、F2 で 1：1.8 であった。一方、PPAR α -null マウスにおいては、DEHP 曝露の生まれてくる仔の数や生存率への有意な影響は観察されなかった。しかし、F2 において性比に若干の影響が観察

され、対照群の性比 1：0.91 に対し、DEHP 群は 1：1.35 であった。

野生型マウスにおいて観察された DEHP による生存率の低下、特に雄の生存率の低下が、雌より雄の死亡率が高いことに起因するか否かを検討するために、妊娠 18～19 日目胎仔と生後 2 日目の新生仔の数と性について検討した。表 2 に示すように、野生型マウスでは、対照群と DEHP 群の間に妊娠 18～19 日目の胎仔期の性比の差は認められなかった。一方、誕生 2 日目の性比は対照群 1：0.95 に対し、DEHP 群は 1：1.89 であった。同様に、PPAR α -null マウスにおいても DEHP 群の新生仔の性比は雌>雄であった。以上から次の結論が得られた。

- ① DEHP は F₂ における繁殖力を著しく低下させる。これは野生型マウスにのみ誕生直後の死亡率の増加として観察され、PPAR α -null マウスでは観察されない。
- ② DEHP は野生型の雄の死亡率を高め、性比に影響を与える。これは野生型マウスに特徴的に見られるが、PPAR α -null マウスでも若干観察される。

3) 0.05% DEHP の血清性ホルモンへの影響

雄対照群において、いずれの週齢（16 週齢、36 週齢）においても PPAR α -null マウスのテストステロン濃度は野生型の 1/6 から 1/10 であり、エストラジオール濃度も低値を示す傾向であった。DEHP は野生型雄マウスのテストステロン濃度を約 1/3 に低下させたが、エストラジオール濃度には影響を与えなかった。一方、DEHP は雄 PPAR α -null マウスのテストステロンやエストラジオール濃度に影響を与えなかった。

雌の性ホルモン（エストラジオール）は性周期に左右される。今回の研究では性周期をマッチさせていないので参考値である。対照群において、野生型と PPAR α -null マウスの間に血清エストラジオール濃度の差は認められなかった。DEHP 投与は野生型においてのみエストラジオール濃度を上昇させた。

以上の結果から、次の結論が得られた。

- ① 雄の PPAR α -null マウスのテストステロン濃度は野生型より低い
- ② 0.05%DEHP は野生型マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させる

4) 0.05%DEHP の生殖器障害性について
DEHP 投与はいかなる世代 (F₀, F₁, F₂) においても、野生型、PPAR α -null マウスの雄の生殖器 (精巣、精巣上体、精のう腺)、雌の生殖器 (卵巣、子宮) の体重当たりの重量比率に影響を与えなかった。同様に、DEHP 曝露による精巣、卵巣、子宮に病理学的変化も認められなかった。以上の結果より、0.05% DEHP は雄、雌の生殖器に対する障害性を示さないといえる。

- 5) 0.05%DEHP の肝および血清トリグリセライド濃度への影響について

肝や血清のトリグリセライド濃度は PPAR α に強力に調節されているので、DEHP による野生型親マウス肝 PPAR α の誘導がトリグリセライド濃度に与える影響を検討した。0.05%DEHP は妊娠マウス肝、授乳期母マウス肝 (2 日目) および成熟雌マウス肝のトリグリセライドには影響を与えなかった。驚いたことに、妊娠後期の親マウス血清トリグリセライド濃度を 1.5 倍に上昇させた。授乳期母マウス血清トリグリセライド濃度は DEHP 群の方が低く、成熟雌マウスにおいても低い傾向を示した。

PPAR α -null マウスの肝トリグリセライドは野生型より高い傾向を示した。PPAR α -null マウスの血清トリグリセライド濃度は野生型より明らかに高かったが、DEHP 曝露の影響は認められなかった。

D. 考察

0.05%DEHP は雄雌マウスの生殖器に形態的な障害を起こすことなく、繁殖力、とくに雄マウスの生存率に影響を与えることが明らかとなった。この現象は野生型マウスの新生仔期 (殆どが 2 日以内) にのみ死亡率の増加

という形で現れ、PPAR α -null マウスでは観察されなかった。従って、DEHP 投与による新生仔死亡率の増加は PPAR α が関与していると思われる。

野生型マウスで観察された DEHP 投与による新生仔死亡率の増加は F₁ 世代より F₂ 世代においての方が明らかであった。F₀ と F₁ 世代の妊娠マウス F₀ 世代のマウスより発生期の段階から、しかも長期間にわたり DEHP 曝露を受けている。このことが一因かもしれない。

PPAR α の標的遺伝子として脂肪酸 β 酸化系酵素、 ω 水酸化酵素、リポ蛋白代謝酵素遺伝子等が知られている。「DEHP 曝露による新生仔死亡率の増加の一因が脂質代謝異常にある」との仮説をたて、その妥当性について考察した。DEHP 曝露は野生型マウス胎仔肝の脂肪酸 β 酸化系酵素を誘導する事はなく、雄においてはむしろその発現を抑制した。DEHP 曝露は新生仔マウス肝の脂肪酸 β 酸化系酵素も誘導することなく、DEHP の経母乳曝露のこれらの酵素系の発現に対する影響はないものと推察された。この結果、対照群の雄において、胎仔と新生仔肝の間に脂肪酸 β 酸化系酵素の発現に差異がみられないが、DEHP 群においては新生仔肝 > 胎仔肝であった。このような傾向は雌では観察されず、対照群、DEHP 群ともに脂肪酸 β 酸化系酵素の発現は胎仔肝、新生仔肝殆ど同じであった。これらの結果は、雄の野生型マウスにおいては、誕生直後に脂肪酸の酸化が急激に高まることを示す。推測にすぎないが、このことが、新生雄マウスの死亡率の増加の一因かもしれない。実際、野生型において、DEHP 群の雄胎仔肝、2 日齢の雄マウス肝のトリグリセライドは対照群より低かった。

雄 PPAR α -null マウスの血清のテストステロン濃度は野生型の 1/6 から 1/10 であった。さらに、DEHP 曝露は野生型雄マウスにおいてのみテストステロン濃度を低下させた。これらの結果は血清テストステロン濃度も PPAR α に強く支配されていることを示唆する。しかし、今回観察された新生仔雄マウス

の死亡率の増加には直接関係ないと思われる。雄血清テストステロン濃度がどのような機構で PPAR α に支配されているのか、今のところ不明である。

Lamb らはマウスに 0.01%から 0.3%の DEHP を餌に混ぜて与え、繁殖力への影響および雄の生殖器への影響を検討した。DEHP は量-反応的に新生仔の数と生存率の減少を招き、繁殖力を低下させた。この現象は 0.1%の DEHP 曝露濃度で観察された。高濃度の DEHP は精子濃度の低下や運動性を減少させ、異常精子の割合を増加させることも明らかとなった。さらに精巣の萎縮を誘発していた。興味深いことは、対照群の雄と 0.3%DEHP 曝露群の雌を交配しても仔は全く生まれませんが、DEHP 曝露群の雄と対照群の雌を交配すると 20%のマウスが出産をしたことである。DEHP は確かに雄雌の生殖器障害性をもっているが、その影響レベルは雌の方が低いのかかもしれない。即ちこの場合、DEHP の繁殖力への影響は雄よりも雌に原因があると考えられる。

ラットの DEHP の最小影響量はペルオキシゾームの誘導からみた場合、50mg/kg、無影響量は 25mg/kg とされている。発がんという観点からみた場合の最小毒性量は 300mg/kg、無毒性量は 50-100mg/kg と報告されている。今回の実験ではまだ、NOAEL, LOAEL を求めることは出来ないが、仮に生殖毒性（繁殖試験）の LOAEL が 0.05% DEHP 餌とすると、マウスの餌の摂取量からみて、約 80mg/kg の投与量に相当する。種の違いはあるが、ペルオキシゾームの誘導と生殖毒性の最小影響レベルが類似して

いる点が注目される。PPAR の発現には種差がみられ、ヒトでの発現はマウスよりはるかに低いと報告されている。従って、野生型マウスで得られた結果をそのままヒトに外挿することは難しい。ヒトの PPAR の発現が PPAR α -null mice に近い場合は、野生型にみられた様な DEHP の生殖毒性はみられないかもしれない。

今後、濃度を変えた生殖毒性実験を行い、DEHP の NOAEL あるいは LOAEL を設定すると共に、他のプラスチック可塑剤の生殖毒性の比較実験を行う予定である。

E. 結論

0.05%DEHP は新生仔マウスの死亡率を高め、繁殖力を低下させる。この現象は特に雄マウスに特徴的である。この現象には核内受容体の PPAR α が深くかかわっている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 中島民江 PPAR を介した環境ホルモンによる生殖器障害 細胞 31: 239-242, 1999
- 2) Nakajima T, Kamijo Y, Usuda N, Liang Y, Fukushima Y, Kametani K, Gonzalez FJ, Aoyama T. Sex-dependent regulation of hepatic peroxisome proliferation in mice by trichloroethylene via peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α). Carcinogenesis 21: 677-682, 2000.

2. 学会発表

なし

Reproductive toxicity of endocrine-disrupting chemicals and the mechanism via peroxisome proliferator-activated receptor in relation to the risk assessment

Tamie Nasu (Nakajima), Department of Hygiene, Shinshu University School of Medicine, Lecturer

Key word :

di (2-ethylhexyl) phthalate, estradiol, fatty acid β -oxidation enzymes, knockout mice, peroxisome proliferator-activated receptor, reproductive toxicity, testosterone, triglyceride,

Abstract:

Reproductive toxicity of di (2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) and the mechanism were investigated using wild-type Sv/129 mice and peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)-null mice on the same genetic background. A 0.05% DEHP diet was prepared with commercial rodent chow. Mice of the DEHP group were given this diet throughout the experiment, and those of the control group were given the commercial rodent diet without DEHP. Male and female mice (F_0 generation) of control and DEHP groups were mated after four weeks' feeding of each diet, and the number of newborn pups and live pups for 16 weeks and their sex were investigated (F_1 generation). Male and female mice of F_1 generation of DEHP group were again mated at the same age as the F_0 generation, and the number of newborn pups and live pups and their sex of the F_2 generation were also investigated. No significant morphological changes were observed in testis, ovary and uterus of all mice. The growth retardation and induction of PPAR α -target gene products (peroxisomal enzymes) were seen in all male and female wild-type mice with 0.05% DEHP diet, suggesting the induction of PPAR α by the DEHP diet. The DEHP diet tended to decrease the number of live pups per pair in the wild-type mice at the F_1 generation and clearly decreased at the F_2 generation. The death of the pups was seen in the male superiority within two days after birth. In contrast, no significant change in fertility was seen in PPAR α -null mice fed the 0.05%DEHP diet at any generation. These results suggest that the increase in the mortality of newborn pups is closely related to the expression of PPAR α .

The DEHP diet investigated did not induce the PPAR α -target gene products (fatty acid β -oxidation enzymes) in the fetus liver of the wild-type mice; the DEHP diet suppressed the enzyme levels in the male fetus liver. DEHP also did not induce the levels in the liver from the two-day-old newborn mice. This indicates that the difference in the levels of PPAR α -target gene products was significantly larger in the two-day-old wild-type male mice than in those of the fetus mouse liver. The difference may be a cause of the increase in the death of newborn pups.