

Fig. 3 Effect of ZM 189.154 on uterine weight in uterotrophic screening assay

厚生科学研究補助金（生活安全総合研究事業）

分担研究報告書

子宮肥大試験を用いた内分泌かく乱化学物質の複合作用の検討
および OECD 対応等試験法開発部門プロジェクトー
Bisphenol A のハーシュバーガー試験系に対する作用の検討

分担研究者 金子豊蔵 国立医薬品食品衛生研究所毒性部

研究要旨：前年度予備試験的に実施した広瀬班の経費で実施した実験（いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無の確認：エストラジオール(E2)と B(a)P あるいは TCDD の相乗作用について 1 群 6 匹、7 群構成）に基づき、より低用量の E2 と、より高用量の B(a)P あるいは TCDD による子宮肥大試験での相乗作用試験が現在実施中である。

エストロゲンレセプター(ER)を介する 17β -estradiol (E2)、Aryl hydrocarbhone レセプター(Ahr)を介する TCDD あるいは B(a)P を併用投与し、卵巣摘出(OVX)マウスの子宮肥大を用いて相加あるいは相乗効果を予備試験した。

ハーシュバーガー試験においては、弱いエストロゲン様作動物質である Bisphenol A に関して、去勢雄ラットを用いたハーシュバーガー試験系において U 字型の反応曲線がみられるか否かを確認する。本研究課題については、OECD のハーシュバーガー試験法などに関する対応が遅れたため、実施を一時見合わせていたため、現在本試験の結果がまだ出せていない。ラット去勢 1 週間後より、bisphenol A および Testosteroen Propionate を 14 日間反復皮下投与する。現在、予備試験が終了し、標的臓器の重量測定に際して、臓器の固定を行う方法を採用することとした。現在、本試験の準備中である。

A. 研究目的

卵巣摘出動物の子宮肥大に対する影響を、エストロゲンレセプター(ER)を介する化学物質と、Aryl hydrocarbhone レセプター(Ahr)を介する化学物質の併用投与により相加あるいは相乗効果を検討する。

ハーシュバーガー試験では、Bisphenol A に関して、去勢雄ラットを用いてテストステロンとの間に U 字型の反応曲線がみられるか否かを確認する。

B. 研究方法

1. B(a)P+E2 の子宮肥大作用における複合効果

8 週齢の C57BL/6 マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、1 週間の馴化期間後、9 週齢で卵巣を摘出した。術後 1 週間目より B(a)P および E2 投与を開始した。B(a)P は試験開始日と 8 日後に、E2 は 14 日間反復皮下投与した。

投与用量は、(B(a)P、E2 : $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$) の標記で示す。1 群 (対照群 0, 0)、2 群 (0, 0.45)、3 群 (0, 0.9)、4 群 (10, 0)、5 群 (20, 0)、6 群 (5, 0.225)、7 群 (10, 0.45) である。容量は B(a)P および E2 各 10ml/kg とし、対照群にも同様に溶媒を反復投与した。投与 11 日目より死亡動物が見られたため、投与容量を E2 は 5ml/kg と半分に下げ、B(a)P の溶媒投与は中止した。溶媒は、B(a)P および E2 ともにコーン油に溶解した。E2 最終投与翌日にエーテル麻酔により屠殺後、子宮および膈を取りだし、子宮については、wet 重量と blotted 重量を測定した。

2. TCDD+E2 の子宮肥大作用における複合効果

8 週齢の C57BL/6 マウスを日本エスエルシー（株）より購入し、1 週間の馴化期間後、9 週齢で卵巣を摘出した。術後 1 週間目より投与を開始した。TCDD は試験開始日のみ、E2 は 14 日間反復皮下投与した。

投与量は、(TCDD、E2 : $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc \mu\text{g}/\text{kg}$) の標記で示す。1 群 (対照群 0, 0)、2 群 (0, 0.45)、3 群 (0, 0.9)、4 群 (5, 0)、5 群 (10, 0)、6 群 (2.5, 0.225)、7 群 (5, 0.45) である。容量は TCDD および E2 各 10ml/kg としたが、B(a)P+E2 の試験で溶媒が起因と思われる死亡がみられたため、投与 9 日目より E2 の容量を 5ml/kg と半分に下げ、TCDD の溶媒投与は中止した。

溶媒は、TCDD および E2 ともにコーン油に溶解した。E2 最終投与翌日にエーテル麻酔により屠殺後、子宮および膈を取りだし、子宮については、wet 重量と blotted 重量を測定した。

3. BisphenolA+Testosterone Propionate のハーシュバーク試験系に対する作用の検討

5 週齢の Crj:CD ラット(IGS)を日本チャールスリバーより購入し、1 週間の馴化期間後、精巣を摘出し、術後 1 週間目より投与を開始する。実験は、1 群 6 匹の 7 群で実施する。ビスフェノール A および Testosterone Propionate とともに試験開始日より 1 日 1 回、14 日間反復皮下投与する。投与用量は (BisphenolA, Testosterone Propionate, $\bigcirc \text{mg}/\text{kg}$ 、 $\bigcirc \text{mg}/\text{kg}$) の標記で示した。1 群 (0, 0.5)、2 群 (12.5, 0.5)、3 群 (17.5, 0.5)、4 群 (25, 0.5)、5 群 (35, 0.5)、6 群 (50, 0.5)、および 7 群 (70, 0.5) とする。予備試験ではさらに、8 群 intact(0, 0) および 9 群 castration (対照群 0, 0) のサテライト群を置いた。投与容量は BisphenolA および Testosterone Propionate 各 0.1ml/100gB.W とする。最終投与翌日にエーテル麻酔

下で屠殺し、臓器を一括して固定後、精囊、前立腺腹側葉、球海綿体筋+肛門挙筋、精巢上体を分離し重量を測定する。これにより、本手法を食品薬品安全センターのデータと比較検討する。

C. 研究結果

上記研究課題については、OECD との対応が決まらず、実施を一時見合わせていたため、現在実施しているところであり、まだ結果が出ていない。前年度の広瀬班の経費で実施していた実験がその予備試験に相当するため、その内容について略記する。いずれも子宮肥大試験による相乗効果の有無についての確認のために実施されたものである。

1. B(a)P+E2 の子宮肥大作用における複合効果

投与期間中死亡がみられた。投与 11 日目 2 群：B(a)+E2 (0, 0.45) 1 匹、投与 12 日目 1 群：(0, 0) 1 匹、4 群：(10, 0) 1 匹、投与 14 日目 4 群：(10, 0) 1 匹、6 群：(5, 0.225) 1 匹と何れも投与直後に全身が弛緩し、対照群にも死亡がみられた。死亡動物の肉眼所見は、投与部位の皮下および腹腔内にコーン油が充満していた。生存動物について、体重の変化は群間による差はなかった。

子宮絶対重量は、B(a)P 投与群は、対照群と変わらなかった。E2 投与群は、0.45 および 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群とも対照群に比し有意な増加を示したが、投与群間ではあまり差がなかった。B(a)P と E2 併用群は、E2 0.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単独投与群と同じ増加を示し、B(a)P による影響はみられなかった (Fig 1)。

2. TCDD+E2 の子宮肥大作用における複合効果

何れの群でも一般状態の変化および死亡はみられなかった。

子宮絶対重量は、TCDD 投与群は、対照群と変わらなかった。E2 投与群は、0.45 および 0.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群とも対照群に比し有意な増加を示したが、投与群間ではあまり差がなかった。TCDD と E2 併用群は、TCDD 高用量群では E2 の効果を阻害したが、低用量群では変化はみられなかった (Fig 2)。

3. ハーシュバーク予備試験では、体重は、精巢摘出 3 日目より有意な増加抑制がみられ、投与終了時まで継続して抑制した。前立腺、球海綿体筋+肛門挙筋。精囊の重量ともに、8 群の精巢摘出し、Testosterone Propionate を投与していない群に比し、何れも投与した群および 7 群の intact 群では重量増加がみられたが、Bisphenol A による影響は顕著にみられなかった。本試験は、現在準備中である。

D. 考察

子宮肥大試験は、投与期間中、対照群にも死亡動物がみられ溶媒に起因するものと考えられた。

B(a)P および TCDD は共に AhR を介するが、E2 による子宮肥大に対する影響は、

TCDD は阻害傾向、B(a)P は無影響であった。

ハーシュバーガー予備試験において、未固定での重量測定は各臓器ともばらつきが大きく、固定後の測定法が有用と結論された。本試験では、採取した臓器をホルマリン固定した後、拡大鏡下でのトリミングを行い、臓器重量を測定することによりこの問題は解決できるものと思われる。

E. 今年度の計画

子宮肥大試験は、前年度は、B(a)P+E2 は E2 の高用量および低用量群共に B(a)P による影響がみられなかったため、今年度は、E2 の用量を抑え、B(a)P についてはより高用量の組み合わせで複合作用が認められるか否か検討する。

更に、TCDD+E2 についても、同様に E2 の用量を抑え、TCDD についてはより高用量の組み合わせで複合作用が認められるか否か検討する。各試験とも溶媒の容量を 1/4 に下げる。

2000 年 3 月中に決定する予定である子宮肥大試験の prevalidation の第 2 段階をようやくスタートし、ハーシュバーガー試験の prevalidation においてもプロトコールに沿った試験を OECD の決議に従って試行する。更に、必要に応じてそれらのプロトコールの改良等に必要な基礎的データの改善を行う。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohno Y, Kaneko T, Inoue T, Morikawa Y, Yoshida T, Fujii A, Masuda M, Ohono T, Hayashi M, Momma J, Uchiyama T, Chiba K, Ikeda N, Imanishi Y, Itagaki H, Kakishima H, Kasai Y, Kurishita A, Kojima H, Matsukawa K, Nakamura T, Ohkoshi K, Okumura H, Saijo K, Sakamoto K, Suzuki T, Takano K, Tani N, Usami M, Watanabe R, : Inter-laboratory validation of the in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients 1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests. *Toxicology in Vitro*, 13, 73-98(1999)

Minegishi K, Suzuki S, Kaneko T, Inoue T, and Takahashi A., Metabolic fate of N,N'-Dimonomethylphenyl-p-phenylenediamine in the 2 year feeding test, *Jpn J Toxicol Environ Health* 44 p.37(1998)

Minegishi K, Suzuki S, Kaneko T, Inoue T, and Takahashi A., Distribution, accumulation and excretion of N,N'-Dimonomethylphenyl-p-phenylenediamine in the 2 year feeding test in rats, *Jpn J Toxicol Environ Health*, 43(6), 336-347(1997)

2.学会発表

Byung-Il Yoon, yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue, Toyozo Kaneko, The oscillating recovery in cellularity of the bone marrow and CFU-GMs after intraperitoneal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) exposure. 19th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutans and POPs, September 12-17, 1999-Venice, Italy

G.知的所有権の取得状況

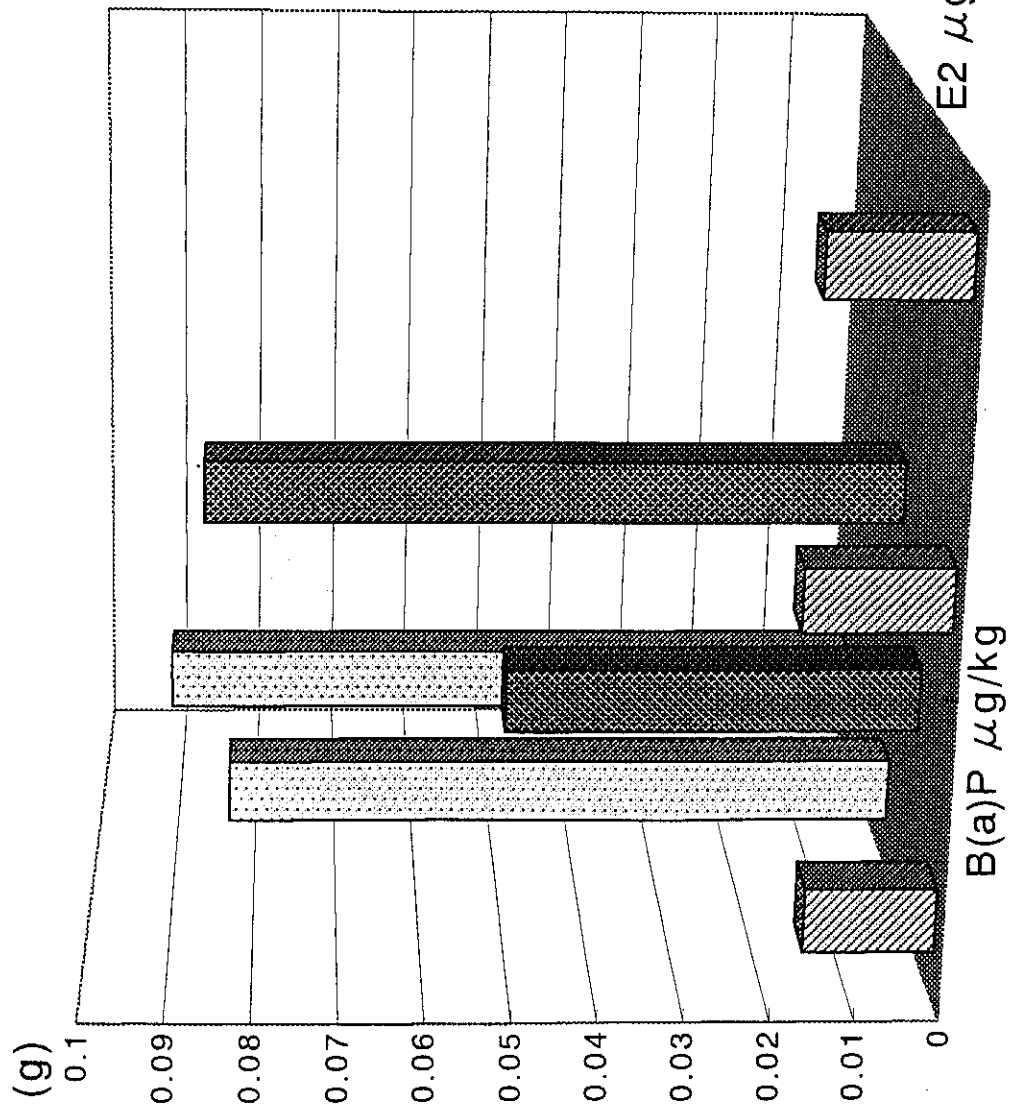
1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

群	B(a)P($\mu\text{g/kg}$)	E2
①	0	0
②	0	0.45
③	0	0.9
④	10	0
⑤	20	0
⑥	5	0.225
⑦	10	0.45
投与頻度	1回/wk	1回/day



B(a)P + E2 (○ $\mu\text{g/kg}$, ○ $\mu\text{g/kg}$)

⑤ (20, 0)

④ (10, 0)

⑥ (5, 0.225)

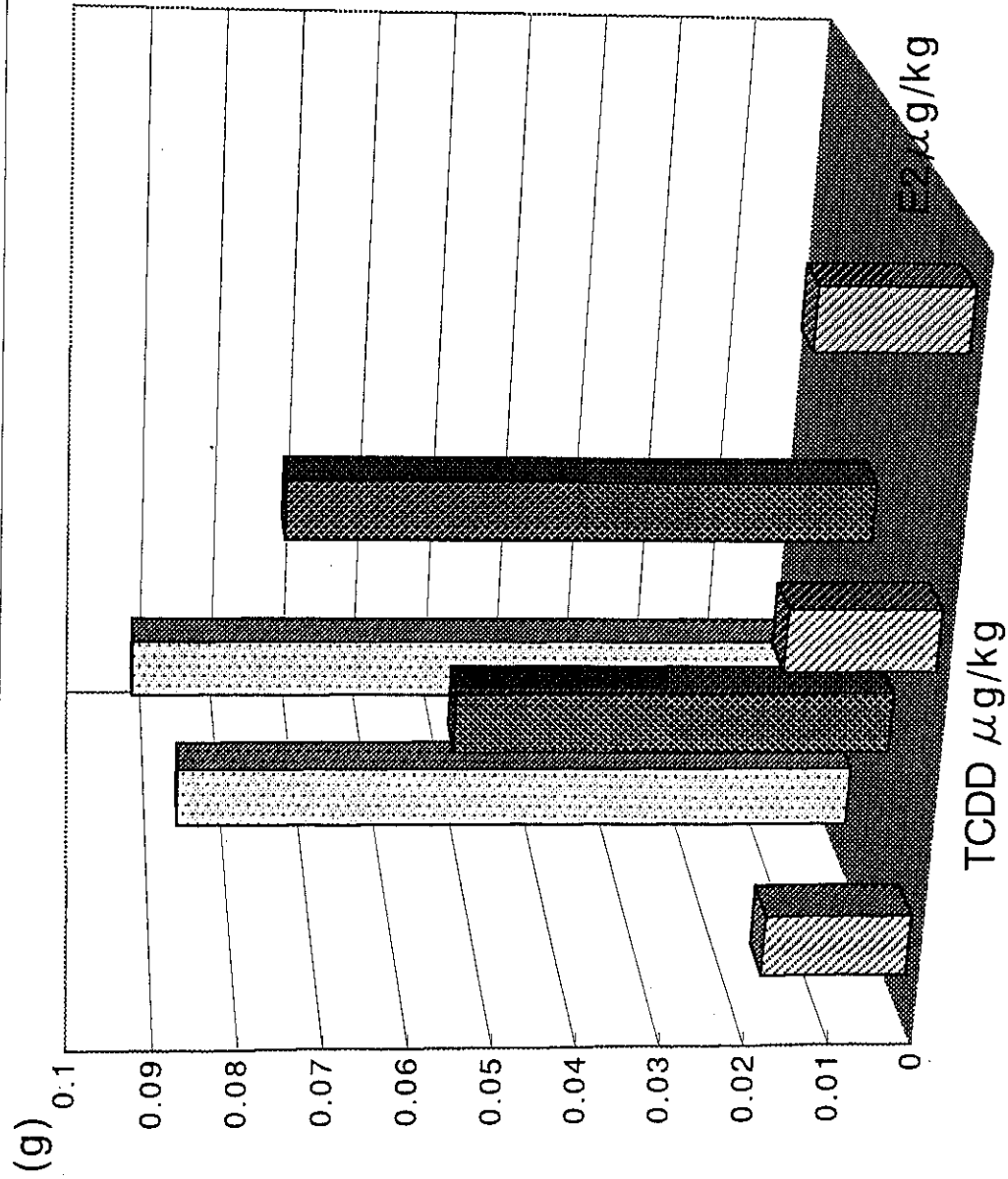
① (0, 0)

② (0, 0.45)

③ (0, 0.9)

Fig.1 B(a)P+E2:Uterus weight/absolute

群	TCDD($\mu\text{g}/\text{kg}$)	DES
①	0	0
②	0	0.3
③	0	0.6
④	5	0
⑤	10	0
⑥	2.5	0.15
⑦	5	0.3
投与頻度	1回/2wk	1回/day



TCDD+DES(\circ $\mu\text{g}/\text{kg}$, \circ $\mu\text{g}/\text{kg}$)

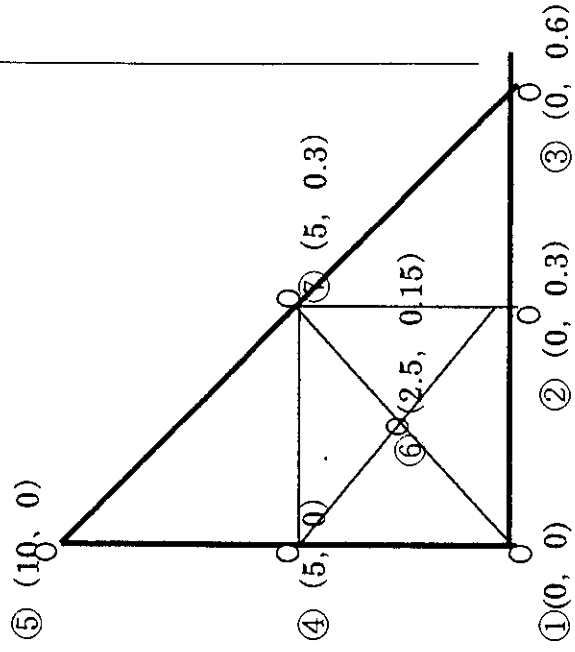


Fig.2 TCDD+E2: Uterus weight/absolute

分担研究報告要旨

OECD ガイドライン 407:28 日反復投与毒性試験法の適用に関する研究

分担研究者 広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 部長

研究要旨

OECD Test Guideline 407 Enhanced 案に基づき、弱いエストロゲン作用を有する Nonylphenol Methoxychlor を用いてラット 28 日間反復投与毒性試験を実施した。その結果、臓器重量、性周期観察、精巣上体における精子検査はエストロゲン作用のマーカーになり得るが、精巣の精子検査は有用なマーカーにはならないことが示唆された。また、エチニルエストラジオール及びテストステロンを投与した肝における α_2 -globulin の発現の変動を解析し、ホルモン作用の新たなパラメーターとしての可能性を検討した。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質のスクリーニングと安全性評価を目的としたラット 28 日間反復投与毒性試験法 "OECD Test Guideline 407 enhanced" 案の有用性を検証するための実験として、すでにホルモン作用の強い物質についての検討を終えたが、弱い物質での検討はほとんどなされていない。今回の研究では弱いエストロゲン作用を有する Nonylphenol と Methoxychlor を用い、試験法の有用性を検証するための実験を行った。また、内分泌影響を高感度に検出できる新規パラメーター候補の一つとして、ラットの雄に特異的に発現し、多数のホルモンにより転写制御を受けることが知られている蛋白質である α_2 -globulin に着目して、性ホルモン投与による肝臓でのその蛋白質と RNA の発現量の変動を解析した。

B. 研究方法

7 週齢の Cj:CD (SD) IGS 系ラット各実験雌

雄各 80 匹を 1 群 10 匹の各 8 群に分け、Nonylphenol (東京化成) はコーン油に混じて 0、10、50、250mg /kg、Methoxychlor (Sigma 社) もコーン油に混じり 0、20、100、500mg/kg 体重の用量で強制経口投与した。雄は投与回数を 28 回とし、最終投与の翌日に全生存動物を屠殺した。雌は膻スメア法にて 14 日目より性周期を観察し、28 回投与の翌日から 4 日の間で発情静止期に相当する日に屠殺、或いは性周期の異常を認めた場合は 28 回投与の翌日に屠殺し、いずれも屠殺前日まで投与を継続した。最高用量には MTD に相当するよう用量を設定した。基礎食はオリエンタル酵母社製 CRF-1 を用いた。主な検査項目として、第 4 週の投与後に感覚機能、握力、自発運動等、その他、体重、臓器重量、血液、血液生化学、血清ホルモン、精子および病理組織学的検査を行った。

α_2 -globulin 解析のためには、7 週齢の雄ラット各群 5 匹にエチニルエストラジオール (EE) 0.5, 5, 50 μ g/kg、雌ラットにテストステロ

ンプロピオン酸 (TP) 1, 10, 100mg/kg をそれぞれ 2 週間にわたり連日強制経口投与した。EE 及び TP の最高用量は文献的に明らかなホルモン作用を示す濃度にし、公比を 10 として 3 用量を設定することにより、低用量域での α 2u-globulin レベルの変動に注目して検索を行った。さらに溶媒投与群及び投与開始 2 日前に精巣又は卵巣を摘出したうえでホルモンを投与した群、肝毒性物質であるアセトアミノフェン (AAP) を 1.25% 混餌投与した群 (雄) を設けた。実験終了時に解剖し、臓器重量の測定、血液生化学検査、血中性ホルモン濃度の測定、肝組織中の α 2u-globulin 及び albumin の Western blotting による検出を行った。さらに肝組織中の α 2u-globulin mRNA 発現量を Northern blotting により検索した (Figure 1)。

(倫理面への配慮)

「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日)」及び「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 55 年 3 月 27 日)」に準じ、動物に対する苦痛を出来る限り少なくした。

C. 研究結果

Nonylphenol 投与群：投与期間中に 250mg/kg 群の雌 1 例が死亡した。また、投与延長期間中に 250mg/kg 群の雌 1 例が死亡し、1 例が瀕死状態となったため安楽死させ途中剖検を行った。自発運動量、感覚機能等に投与による影響は認められなかった。体重は 250mg/kg 群の雄では投与 24 及び 27 日に増加抑制傾向が認められ、250mg/kg 群の雌では投与 27 日に 0mg 群の 261.5 \pm 13.5g に対し 232.0 \pm 33.2g と減少を示したが、いずれも有意差はなかった。性周期検査では 250mg/kg 群で対照群と比較して発情回数の有意な増加また、それに伴い性周期の短縮もみられた (Table 1)。血液学的検査では 250mg/kg 群の雄でヘモグロビン量及びヘマトクリット値の減少、雌で赤血球数、ヘモグロビン量、ヘマトクリット値及び MCV の減少、MCHC 及び血小板数の増加が認められた。血液生化学的検査では 250mg/kg 群の雄でトリグリセライド及びグルコースの減少、 γ -GTP の増加並びに BUN の増加傾向、雌では A/G 比及びグルコースの減少、GPT、 γ -GTP、BUN、無機

リン及びナトリウムの増加並びに ALP の増加傾向が認められた。50mg/kg 群の雌でもグルコースの減少及び無機リンの増加が認められたほか、クロールの減少も認められた。精子検査では精巣、精巣上体尾部とも Nonylphenol 各群と対照群の間で精子数、運動性、奇形率に投与による明らかな影響はみられなかった (Table 2)。剖検所見では、250mg/kg 群の雌 7 例に腎の灰白色点が観察された。投与期間終了時の相対臓器重量は、甲状腺では 50mg/kg 以上の群の雄で増加、肝臓及び腎臓では 250mg/kg 群の雌雄で増加が認められた。副腎では 250mg/kg 群の雌で増加し、精嚢及び前立腺腹葉では 250mg/kg 群で減少が認められた (Tables 3-1, 3-2)。その他の検査は現在進行中である。

Methoxychlor 投与群：投与期間中、500mg/kg 投与群の雄 1 例が投与 10 日に死亡したが、投与過誤による死亡と考えられた。自発運動量は 500mg/kg 投与群で対照群と比べ雄で 14%、雌で 25% 低かった。体重は雄では、100 及び 500mg/kg 投与群の投与期間中の体重増加量 (投与 0-27 日) は、対照群と比べそれぞれ 49 及び 73% 低く、体重増加抑制の程度は比較的強かった。性周期観察の結果、100 及び 500mg/kg 投与群でそれぞれ 3/10 例及び 9/10 例が正常な性周期を示さず、これらの投与群では性周期回数減少と性周期間隔の延長がみられ、500mg/kg 投与群の変化は統計学的に有意であった (Table 4)。血液生化学検査では、雄で 100 及び 500mg/kg 投与群にグルコースの有意な低値 (対照群平均と比べそれぞれ 14、17% 減) がみられ、更に 500mg/kg 投与群では GPT 及び γ -GTP 活性の有意な高値 (それぞれ 55 及び 113% 増)、アルブミン量及び A/G 比の有意な低値 (それぞれ 3 及び 9% 減) 並びにリン脂質の有意な高値 (25% 増) がみられた。なお、雌については検査未了である。精子検査では、精巣 1g 当たりの精子数には対照群と各用量群との間に差はなかったが、500mg/kg 投与群の精巣上体尾部 1g 当たりの精子数は対照群より有意に少なかった。運動精子率は 500mg/kg 投与群の運動精子率はやや低かったが、有意差はなかった。奇形精子率では対照群と各用量群との間に明らかな差はなかった (Table 5)。各臓

器の相対重量は、下垂体では 100mg/kg 以上投与群の雄で増加し、甲状腺重量も 500mg/kg 投与群雄で増加した。肝臓では雌雄の 500mg/kg 投与群、腎臓及び副腎でも雄の 100mg/kg 以上、雌の 500mg/kg 投与群で有意に高かった。精嚢、前立腺（腹葉＋背側葉）では 100mg/kg 以上の投与群で有意に低く、精巣及び精巣上体でも 500mg/kg 投与群で減少傾向を示した。卵巣では 500mg/kg 投与群で有意な減少が認められたが、子宮重量に変動はみられなかった (Tables 6-1, 6-2)。その他の検査については現在進行中である。

α 2u-globulin に関しては、実験終了時の体重は AAP 群と雄の精巣摘出/EE50 μ g/kg 群で対照群より減少、雌の卵巣摘出/TP100mg/kg 群で増加した以外に群間で明らかな変動を認めなかった (Table 7)。臓器相対重量については、精巣を摘出した雄の精巣上体、前立腺及び凝固腺と、卵巣を摘出した雌の子宮以外では群間に差はなかった (Tables 7, 8)。血中性ホルモンレベルは、TP 投与の雌でエストロゲン (E2) 値の軽度の低下がみられたものの、採血が投与の一日後だったためかテストステロン (T) 値は群間に大きな差はなかった (Table 9)。血液生化学的には雄では EE50 μ g/kg 群での総コレステロールの低下、雌では TP100mg/kg 群で総蛋白質量の低下と GOT の増加がみられた。肝組織中の α 2u-globulin 蛋白質は、雄で発現し、EE 投与によりその発現量に明らかな変動を認めなかったものの、精巣摘出/EE50 μ g/kg 群で著しい減少を認めた (Figures 3, 4)。一方、雌では TP100 mg/kg 群と卵巣摘出/TP100mg/kg 群でのみ発現が確認された (Figures 3, 4)。アルブミン蛋白質量には群間で大きな差は見られなかった (Figure 4)。 α 2u-globulin mRNA 量は雌では蛋白質の場合と同様に TP100mg/kg 群と卵巣摘出/TP100mg/kg 群でのみ発現が確認された。雄では α 2u-globulin mRNA 量は低濃度の EE 投与で有意に増加していたが、GAPDH mRNA で補正すると、同様の傾向が見られるものの群間に差はみられなくなった (Figures 5, 6)。

D. 考察

Nonylphenol では 250mg/kg 投与群の雌で性

周期の短縮、副腎重量の増加、雄では精嚢及び前立腺腹葉で重量の減少が認められ、高用量群で何らかのホルモン作用のあることが示唆された。また、雌では 250mg/kg 投与群で腎重量、BUN の増加および肉眼的な灰白色点が観察され、腎毒性を示唆する所見も得られた。さらに、50mg/kg 以上の投与群での雄では甲状腺重量が有意に増加し、新たに本物質が弱いながら甲状腺に対しても影響を及ぼしている可能性が示された。

Methoxychlor では 100mg/kg 体重以上の用量で雄の生殖器と雌の性周期及び卵巣に影響が認められた。雄の生殖器に対する影響として、100 及び 500mg/kg 投与群で精嚢及び前立腺重量が減少し、500mg/kg 投与群では更に精巣及び精巣上体重量の減少がみられた。精子検査の結果、500mg/kg 投与群において精巣上体尾部の精子数が減少し、運動精子率もやや低かった。雌では、投与 14 日以降 2 週間にわたって性周期を観察した結果、100 及び 500mg/kg 投与群で正常な性周期を示さない個体がみられ、特に 500mg/kg 投与群ではほとんどの個体が正常より長い周期であった。また、卵巣重量が 100 及び 500mg/kg 投与群で減少した。これらの雌の生殖器に対する Methoxychlor 影響は、Methoxychlor のエストロゲン作用を介したものと推定された。一方、雄では 100 及び 500mg/kg 投与群では比較的強い体重増加抑制がみられ、精嚢、前立腺等の重量減少が栄養学的要素によることも考えられるが、下垂体や副腎ではかなり相対重量が増加しており、エストロゲン作用を介した影響である可能性も否定できない。いずれの試験においてもまだホルモンや病理組織学的検査が進行中であるが、子宮以外の臓器重量の変動に比べ、精子検査、特に精巣の精子数、運動性と形態は鋭敏なマーカー出ないことが示唆された。

今回、内分泌作用の新たなパラメーター候補の一つとして、性ホルモン投与後の肝における α 2u-globulin 発現の変動について検討した結果、14 日間の連日経口投与では、血中性ホルモン (E2, T) 値に明らかな変動を認めなかったものの、雄の EE 低用量群で予想に反して α 2u-globulin mRNA レベルの増加を認めた。 α 2u-

globulin は androgen によりその転写活性が増加し、estrogen で抑制されると考えられていたが、雄で両ホルモンの存在下では反応が複雑になる可能性が示された。 $\alpha 2u$ -globulin の発現制御はエストラジオール単独でも濃度や時間によって抑制と増強の両方の作用を示すなど複雑であることから (J. Mol. Endocrinol., 20, 141-150, 1998)、この結果の確認には腎に蓄積する $\alpha 2u$ -globulin 量を Western blotting にて検討することが必要であると考えられた。

1. 特許取得なし.
2. 実用新案登録なし.
3. 実用新案登録なし.

F. 研究発表 :

1. 論文発表

Toyoda K, Shibutani M, Tamura T, Koujitani T, Uneyama C, Hirose M. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft-protocol for the “enhanced OECD Test Guideline 407” for screening for endocrine disrupting chemicals. Submitted to Archives of Toxicology.

2. 学会発表

豊田和弘、渋谷淳、田村啓、糀谷高敏、畝山智香子、広瀬雅雄、ラット 28 日間反復投与試験法 “OECD Guideline 407 enhanced” 確立のための Flutamide を用いた予備的検討。第 26 回日本トキシコロジー学会学術年会、1999 年 7 月、札幌、要旨集 27 頁

中村英明、西川秋佳、今沢孝善、古川文夫、宮内慎、池田尚子、広瀬雅雄、ラット 28 日間反復投与試験法 “enhanced OECD test guideline 407” 確立のための 17α -methyltestosterone を用いた予備的検討。第 16 回日本毒性病理学会、2000 年 1 月、東京、要旨集 74 頁

畝山智香子、渋谷淳、宮崎恵子、二保直子、武吉正博、豊田和弘、広瀬雅雄、性ホルモン投与による肝細胞内 $\alpha 2u$ -globulin 発現レベルの検索 : Enhanced OECD Test Guideline 407 の新規パラメーターとしての可能性について。第 16 回日本毒性病理学会、2000 年 1 月、東京、要旨集 75 頁

G. 知的所有権の取得状況

Table 1. Estrous cycle of female rats treated with nonylphenol

Dose (mg/kg)	No.of rats	Count of estrus (times)							Mean count	Mean duration (day)	
		0	1	2	3	4	5	6			≥7
0	10	0	0	0	3	5	5	0	0	3.9 ± 0.7	4.0 ± 0.0
10	10	0	1	0	2	6	1	0	0	3.6 ± 1.1	3.5 ± 1.3
50	10	0	0	0	2	5	1	0	2	4.5 ± 1.4	4.0 ± 0.4
250	10	0	0	1	1	0	3	0	5	6.5 ± 2.9*	3.4 ± 0.8*

Values are count of estrus and estrous cycle on day 14-28 of treatment

*P<0.05

Table 2. Sperm analysis of male rats treated with nonylphenol

Dose (mg/kg)	No. of rats	Sperm No. ($\times 10^6/\text{g}$)		Motility (%)	Abnormal sperms (%)
		Tail of epididymis	Testis		
0	5	708.8 \pm 58.9	13.5 \pm 2.6	98.6 \pm 1.3	1.2 \pm 0.6
10	5	714.8 \pm 58.9	12.0 \pm 1.8	94.3 \pm 2.8*	1.5 \pm 0.7
50	5	722.1 \pm 93.7	11.0 \pm 1.5	96.3 \pm 3.4	1.3 \pm 0.9
250	5	699.7 \pm 73.5	11.9 \pm 1.7	94.7 \pm 3.0*	1.3 \pm 0.6

Table 3-1. Final body and relative organ weights of rats treated with nonylphenol

Sex and dose (mg/kg bw)	Final body wt. (g)	Pituitary (mg/100g bw)	Thyroids (mg/100g bw)	Liver (g/100g bw)	Kidneys (g/100g bw)	Adrenals (mg/100g bw)	Seminal vesicle (g/100g bw)
Male							
0	438.9±24.5	2.8±0.2	6.2±1.2	3.86±0.25	0.67±0.06	13.3±2.4	0.37±0.04
10	447.1±22.8	2.7±0.3	6.2±1.3	3.83±0.30	0.67±0.05	13.5±2.3	0.34±0.03
50	437.4±31.1	2.8±0.2	7.7±1.0*	3.78±0.28	0.71±0.04	13.6±2.4	0.38±0.06
250	416.3±23.4	3.0±0.3	7.8±1.5*	4.52±0.28**	0.87±0.14**	14.7±2.3	0.29±0.04**
Female							
0	266.2±17.0	5.5±0.7	7.3±1.1	3.72±0.32	0.68±0.04	25.0± 3.1	
10	261.3±16.5	5.5±0.4	6.9±0.8	3.83±0.31	0.68±0.05	25.4± 3.4	
50	260.0±16.9	5.9±0.6	7.1±0.7	3.88±0.12	0.72±0.03	26.8± 2.7	
250	246.2±38.5	5.7±0.9	8.4±1.6	4.54±0.26**	1.34±0.45**	34.1±11.2*	

*P<0.05, **P<0.01

Table 3-2. Final body and relative organ weights of rats treated with nonylphenol

Sex and dose (mg/kg bw)	Prostate		Epididymides (g/100g bw)	Testes (g/100g bw)	Ovaries (mg/100g bw)	Uterus (g/100g bw)
	Ventral (g/100g bw)	Dorsolateral (g/100g bw)				
Male						
0	0.15±0.02	0.08±0.02	0.23±0.03	0.71±0.05		
10	0.14±0.02	0.09±0.02	0.24±0.03	0.71±0.07		
50	0.13±0.02	0.09±0.02	0.20±0.02	0.75±0.06		
250	0.12±0.02**	0.08±0.02	0.24±0.02	0.77±0.10		
Female						
0					32.5±4.3	0.17±0.03
10					31.8±4.0	0.18±0.02
50					33.7±4.1	0.18±0.03
250					32.2±5.5	0.19±0.03

**P<0.01

Table 4. Estrous cycle of female rats treated with methoxychlor

Dose (mg/kg)	No. of rats	Count of estrus (day)					Mean count	Mean duration (day)
		0	1	2	3	4		
0	10	0	0	0	6	4	3.4 ± 0.5	4.3 ± 0.4
20	10	0	0	0	4	6	3.6 ± 0.5	4.1 ± 0.3
100	10	0	2	1	6	1	2.6 ± 1.0	4.8 ± 0.9
500	10	1	4	4	1	0	1.5 ± 0.8**	8.0 ± 3.5**

Values are count of estrus and estrous cycle on day 14-28 of treatment

**P<0.01

Table 5. Sperm analysis of male rats treated with methoxychlor

Dose (mg/kg)	No. of rats	Sperm No. ($\times 10^6$ /g)		Motility (%)	Abnormal sperms (%)
		Tail of epididymis	Testis		
0	5	828.0 \pm 117.1	115.6 \pm 15.1	86.8 \pm 4.1	0.4 \pm 0.4
20	5	906.0 \pm 182.3	109.5 \pm 11.1	87.0 \pm 2.9	0.4 \pm 0.4
100	5	832.1 \pm 432.3	118.0 \pm 31.1	84.3 \pm 4.7	0.3 \pm 0.3
500	5	266.5 \pm 269.5*	108.8 \pm 59.6	64.0 \pm 42.7	1.2 \pm 2.2

*P<0.05

Table 6-1. Final body and relative organ weights of rats treated with methoxychlor

Sex and dose (mg/kg bw)	Final body wt. (g)	Pituitary (mg/100g bw)	Thyroids (mg/100g bw)	Liver (g/100gbw)	Kidneys (g/100g bw)	Adrenals (mg/100g bw)	Seminal vesicle (g/100g bw)
Male							
0	440±30	2.9±0.2	4.4±0.7	4.11±0.21	0.71±0.04	14±1	0.34±0.06
20	426±39	2.8±0.3	4.8±0.9	4.21±0.36	0.71±0.06	13±2	0.32±0.03
100	359±28**	3.3±0.2**	5.4±0.5	4.31±0.14	0.79±0.06*	21±4**	0.19±0.05**
500	321±30**	3.4±0.2**	6.2±1.4**	4.84±0.22**	0.93±0.19**	22±3**	0.05±0.02**
Female							
0	259±14	5.4±0.4	5.6±0.7	3.82±0.23	0.71±0.05	24±3	
20	251±15	5.3±0.7	5.8±1.1	3.88±0.22	0.72±0.06	26±3	
100	229±18**	4.9±0.4	6.1±1.0	3.90±0.14	0.75±0.06	27±4	
500	241±20	4.7±0.8	6.1±0.8	4.82±0.31**	0.83±0.06**	29±5*	

*P<0.05, **P<0.01

Table 6-2. Final body and relative organ weights of rats treated with methoxychlor

Sex and dose (mg/kg bw)	Prostate				Epididymides (g/100g bw)	Testes (g/100g bw)	Ovaries (mg/100g bw)	Uterus (g/100g bw)
	Ventral (g/100g bw)	Dorsolateral (g/100g bw)	Combined (g/100g bw)					
Male								
0	0.12±0.02	0.11±0.02	0.22±0.03	0.21±0.01	0.74±0.08			
20	0.12±0.04	0.10±0.03	0.22±0.06	0.22±0.03	0.75±0.08			
100	0.09±0.03	0.08±0.02	0.17±0.03*	0.23±0.02	0.88±0.05**			
500	0.03±0.02**	0.04±0.01**	0.08±0.04**	0.14±0.51	0.65±0.15			
Female								
0						31.6±3.5	0.15±0.02	
20						30.6±5.0	0.16±0.01	
100						30.0±3.7	0.21±0.04**	
500						24.4±4.2**	0.16±0.02	

*P<0.05, **P<0.01