

ットに投与したときには抗アンドロゲン様作用が認められ、雌ラットに投与したときには血中 17-estradiol 濃度の低下が引き起こされたことが報告されている。また、妊娠後半のラットに投与したときにはアンドロゲン受容体を介さない機構で典型的な抗アンドロゲン作用が発現し、この作用は胚致死作用および生殖器官以外の催奇形性作用より低い量で発現することが示されている。これらのことから、一部のフタル酸エステルはげっ歯類において内分泌かく乱作用を示すと判断することができる。なお、生殖器以外の奇形発現に関しては、その機構が不明であり、内分泌かく乱作用によるものと判断できる証拠は得られておらず、今後の研究の進展が望まれる。

2) データベース構築と 3 次元構造活性相関に関する研究

では、エストロゲン受容体のリガンド結合部位については、PDB で公開されているリガンドとの複合体の X 線結晶解析構造を用いて、内分泌かく乱候補物質とエストロゲン受容体との結合エネルギーの計算を行い、実験から得られた RBA との比較を行った。経験的パラメータを用いる計算方法と異なりフラグメント分子軌道計算法は計算時間がかかるが、精度を上げることができた。フラグメント分子軌道計算から得られた結合エネルギーは、RBA と高い相関を示し、今回行ったフラグメント分子軌道法を用いた分子の 3 次元活性相関解析手法が、内分泌かく乱化学物質のスクリ

ーニングに有用であることが示された。

3) 健康影響に関する情報収集と評価に関する研究では、内分泌かく乱化学物質は、必ずしも受容体経由で影響をおよぼしているものばかりではなく作用メカニズムと定量的なリスクの可能性をあわせて検討し、リスク評価をする必要がある。更に、ヒト以外でみられた影響が、ヒトにあてはまるかについて、作用メカニズム、キネティクス、ダイナミクスおよびヒトと動物実験における暴露レベルの相違について検討する必要がある。

4) 内分泌かく乱化学物質に関する用語集では、これまでの内分泌かく乱化学物質の試験法に関する情報を集約して「内分泌かく乱化学物質の生物試験研究法」を編集し出版した。これらの資料が今後の内分泌かく乱化学物質の試験研究に大いに寄与するものと思われる。

E. 結論

本研究は、内分泌かく乱化学物質の諸課題の内、試験法の開発を中心とした研究を推進し、ごく近い将来、国際協調下、国内諸機関の協力のもとでこの課題に則した、各種実験が行われる際に、速やかに適切な体制をとってこれに応じることができるような、国内の技術的な基盤を整える立場から、国内のこの領域での専門的試験研究者が分担して、経済開発協力機構 (OECD) や、米国環境防護庁関係機関 (EPA・ED-STAC) から提案されている諸試験法の試行的実施と必要に応じ

たそれらの改良、ならびに新規試験法の開発等を総合的に推進することに主眼をおいており、第3年目の本年度は、<試験法開発部門>、<OECD 対応等試験法開発部門>、<新規基盤整備研究部門>、<内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する調査研究部門>の4分野に大別して、研究を実施した。その結果、前年までに基礎的な検討を行った試験法の多くが、新たな試験法として利用価値が高く、注目すべき物であることが明らかにされたほか、国際協力の一環として実施した、OECD プレバリデーション・バリデーション試験の結果を基にして一部の試験法に関しては、ガイドライン化に向けて検討作業を開始した。さらに、内分泌かく乱化学物質の健康影響に関する情報の調査研究成果を基にデータベースを作成し、その一部をインターネットから利用できるシステムを開発するとともに、本研究班の成果物として、「内分泌かく乱化学物質の生物試験研究法」を編集・出版した。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Toxicological Sciences,(200) 56, 156-164, Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats.

. Masako Sato, Kazuyoshi Wada, hideki Marumo, Tetsuji nagao, Kiyoshi Imai, and Hiroshi Ono

2) Reproductive Toxicology, (1999) 13, 303-311, Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate

Tetsuji Nagao, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, Makiko Kuwagata, Kiyoshi Imai

3) Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, (1999) 19, 233-241

Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration

Tetsuji Nagao, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, and Kiyoshi Imai

2. 学会発表

Hormone-mimic chemicals and their possible endocrine disruption development of testing methods" Kiyoshi Imai, The 2nd Congress of Asian Society of Toxicology, Aug. 23-25, 2000

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

Ⅱ. 分担研究報告書

(1) 〈試験法開発部門〉

1. 去勢成熟ラットの前立腺腹葉における細胞動態を指標とした

(抗) アンドロジェン活性評価系の検討

研究者 永井賢司 (株)三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所

研究要旨：ラットの前立腺腹葉は、アンドロジェンに対して鋭敏に応答し、去勢後の前立腺腹葉中のアンドロジェン依存性細胞は、血中テストステロンレベルの減少に伴い、急速にアポトーシスを起こすことが知られている。本研究では、ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスの誘導をフローサイトメーターで解析することにより、迅速かつ簡便な（抗）アンドロジェン活性の評価系を確立する。

A. 研究目的

ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスの誘導をフローサイトメーターで解析することにより、迅速かつ簡便な（抗）アンドロジェン活性の評価系を確立する。

B. 研究方法

被験物質を投与したラットの前立腺腹葉から細胞を単離し（ほとんどが腺上皮細胞）、アポトーシス誘導（DNA断片化）に与える影響をフローサイトメーターで解析し、評価した。また、Propidium iodide による DNA 染色を行い、細胞周期毎のアポトーシス細胞の割合を算出した。

C. 研究結果

(I) AR antagonist である flutamide (FLU : 3, 10 mg/kg), *p,p'*-DDE (DDE : 10, 100

mg/kg), vinclozolin (VIN : 10, 100 mg/kg) を3日間反復皮下投与し、同時に TP (0.3 mg/kg) を皮下投与した。FLU では3 mg/kg 以上の群、DDE および VIN では10 mg/kg 以上の群でアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。(II) AR antagonist である FLU (5 mg/kg) および DDE (50 mg/kg), 5 α -reductase inhibitor である finasteride (FIN : 3, 10 mg/kg) を3日間反復経口投与し、同時に TP (0.3 mg/kg) を皮下投与した。FLU 5 mg/kg 群、DDE 50 mg/kg 群 および FIN 3 mg/kg 以上の群でアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。

D. 考察

(I) いずれの被験物質も前立腺腹葉重量に有意な影響を与えなかった。前立腺

腹葉におけるアポトーシス細胞の割合は、FLU では 3 mg/kg 以上の群、DDE および VIN では 10 mg/kg 以上の群で有意に増加した。FLU 投与群において、3 mg/kg 群では G0/G1-early S 期および S 期からアポトーシス細胞が生じたが、10 mg/kg 群では late S-G2/M 期を含む全ての細胞周期からアポトーシス細胞が生じた。これに対し、DDE および VIN 投与群では、G0/G1-early S 期および S 期からアポトーシス細胞が生じ、100 mg/kg 群においても late S-G2/M 期からは生じなかった。

(2) <AR antagonist>

前立腺腹葉重量において、FLU 5 mg/kg 群では有意な減少がみられたが、DDE 50 mg/kg 群では有意な影響は認められなかった。前立腺腹葉におけるアポトーシス細胞の割合は、FLU 5 mg/kg 群では G0/G1-early S 期および総細胞周期、DDE 50 mg/kg 群では G0/G1-early S 期で有意に増加した。いずれの群も、S 期および late S-G2/M 期では有意な影響は認められなかった。

<5 α -reductase inhibitor>

前立腺腹葉重量において、FIN 投与群に有意な影響は認められなかった。前立腺腹葉におけるアポトーシス細胞の割合は、FIN 10 mg/kg 群の G0/G1-early S 期、late S-G2/M 期および総細胞周期で有意に増加した。AR antagonist とは異なり、5 α -reductase inhibitor は late S-G2/M 期優位にアポトーシスを誘導することが示唆された。

これらの結果から、前立腺腹葉細胞のアポトーシス誘導には細胞周期依存性があり、AR antagonist と 5 α -reductase inhibitor ではそのパターンが異なることが判明した。

E. 結論

AR antagonist および 5 α -reductase inhibitor のいずれも前立腺腹葉細胞に *in vivo* でアポトーシスを誘導したことから、本実験系はアンドロジェン依存性細胞のアポトーシスを指標とした抗アンドロジェン活性評価系として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

去勢ラットの前立腺腹葉におけるアポトーシスを指標とした *in vivo* 抗アンドロジェン活性評価系の検討（第 27 回日本トキシコロジー学会学術年会および第 3 回日本内分泌攪乱化学物質学会研究発表会）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許

なし

2. 実用新案登録

なし

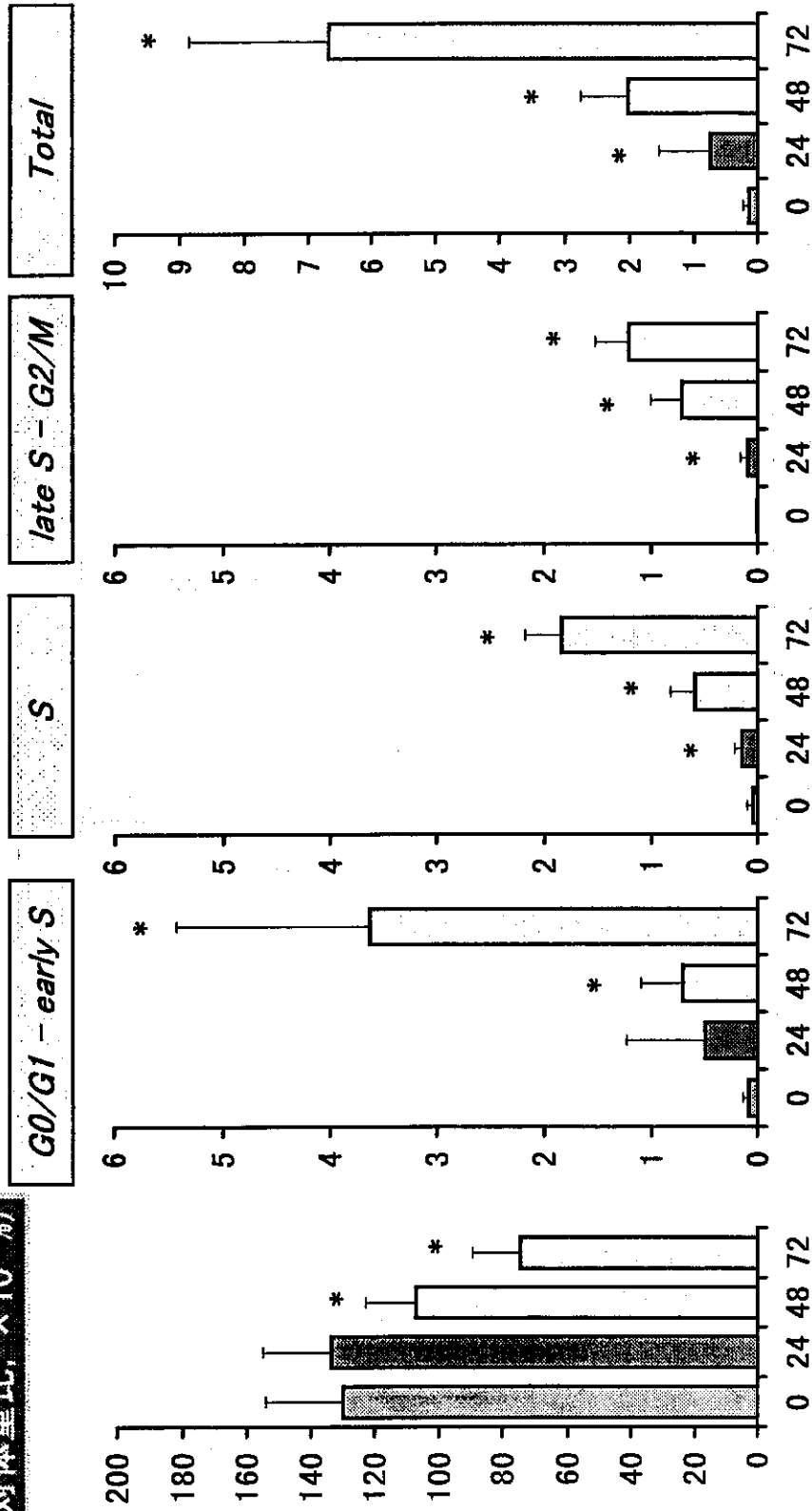
3. その他

なし

【実験 I】 去勢後の前立腺腹葉におけるアポトーシスの経時的変化

前立腺腹葉重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



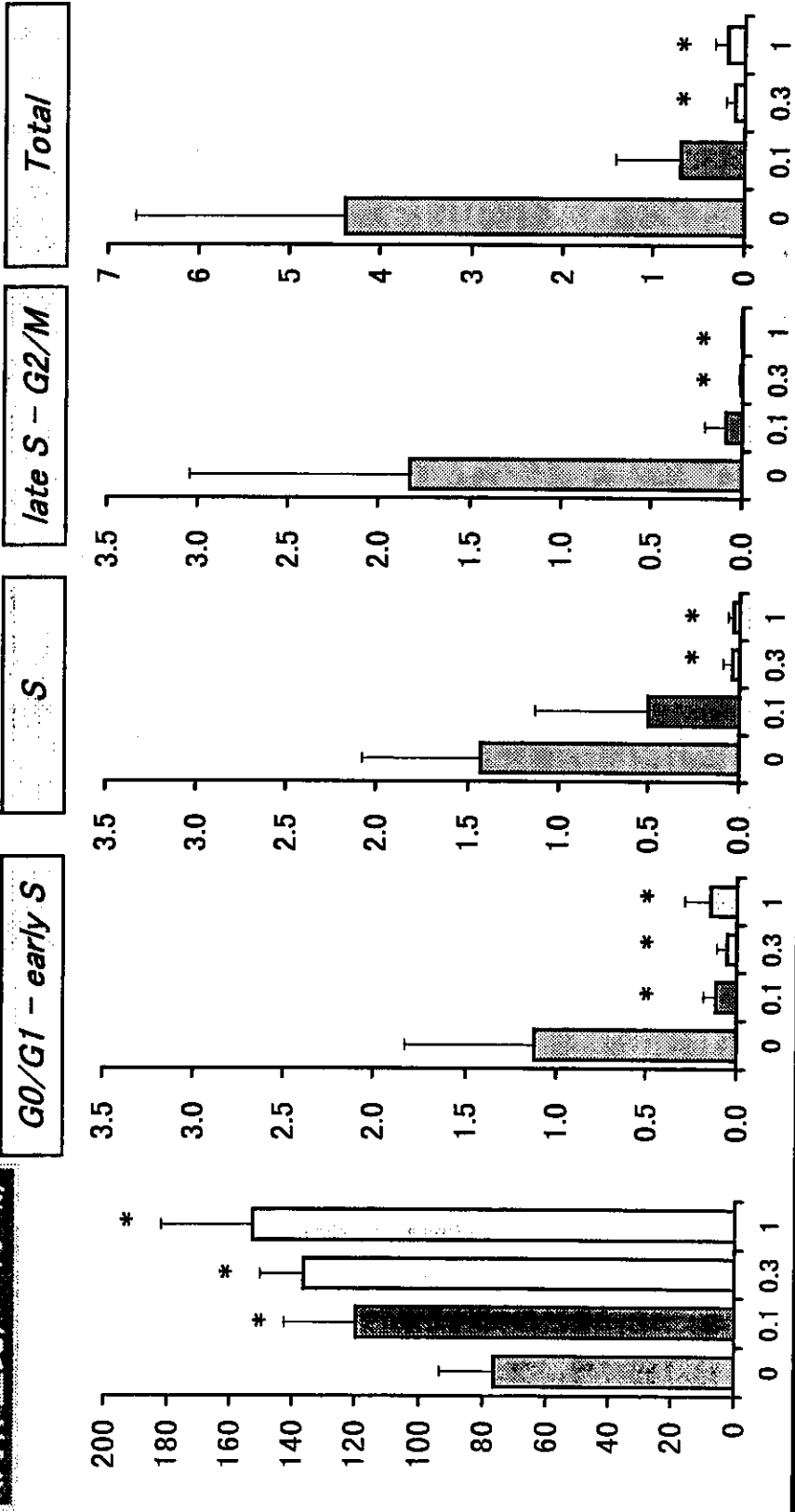
去勢後時間 (hr)

Note. Mean \pm SD, n = 8, *: p < 0.05 (vs 0 hr group, t test)

【実験Ⅱ】 Testosterone propionate に対する反応 (皮下投与)

前立腺重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



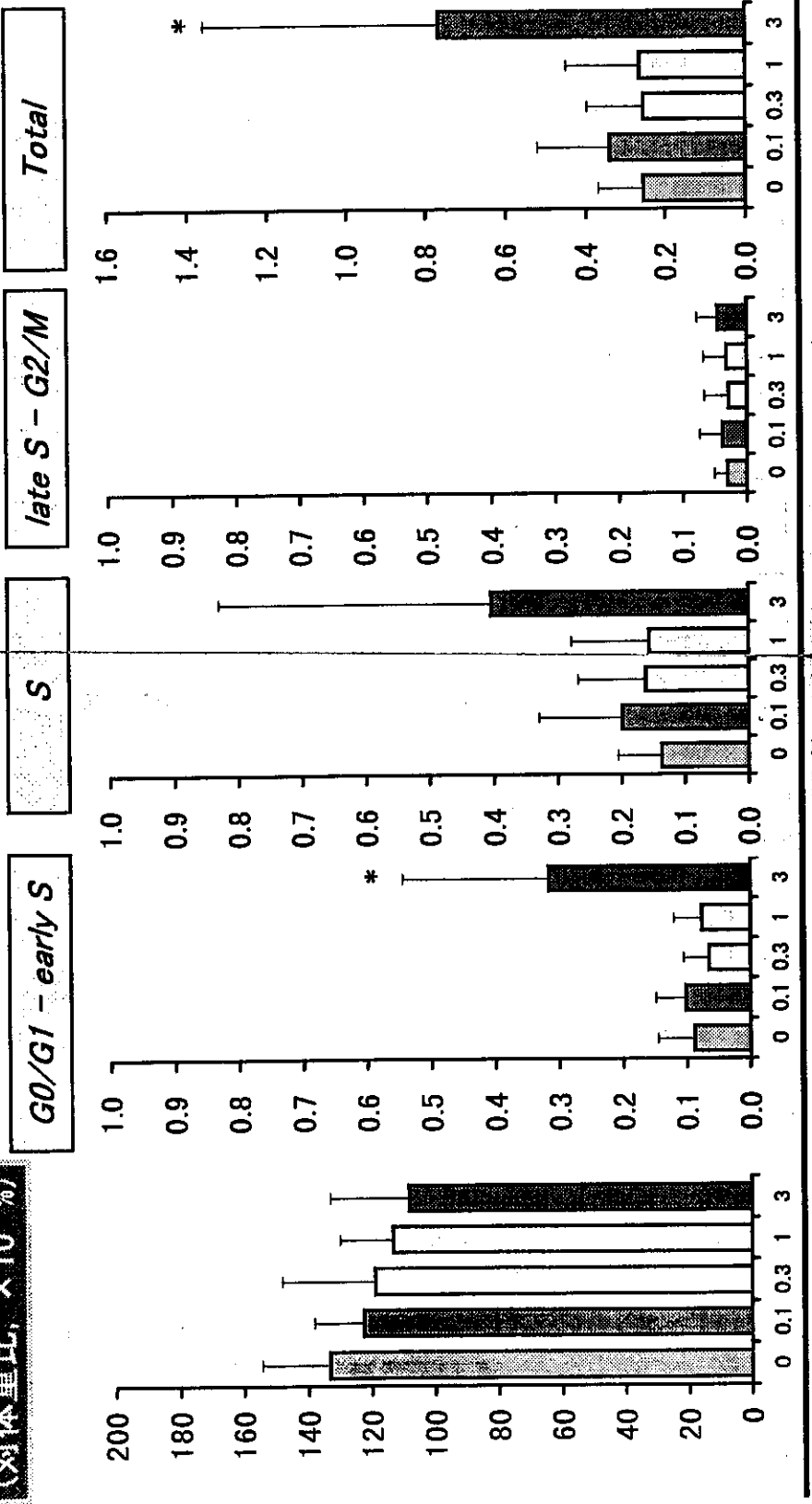
Testosterone propionate (mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 8, *: p < 0.05 (vs Vehicle group, Dunnett's test)

【実験Ⅲ】 Flutamide に対する反応 (皮下投与) ①

前立腺重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



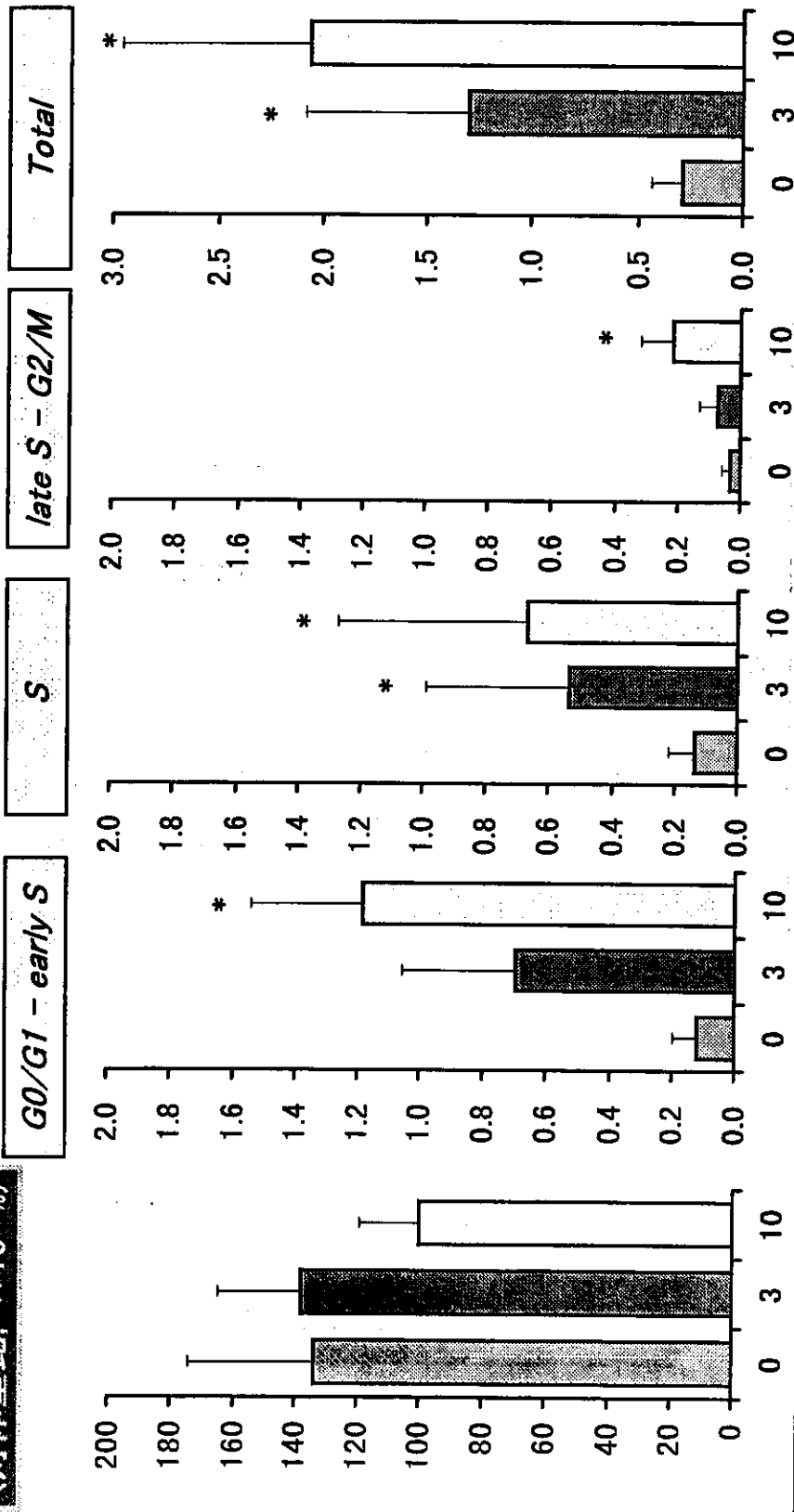
Flutamide (mg/kg/day) + TP (0.3 mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 8, *: p < 0.05 (vs Vehicle group, Dunnett's test)

【実験Ⅲ】 Flutamide に対する反応 (皮下投与) ②

前立腺腹葉重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



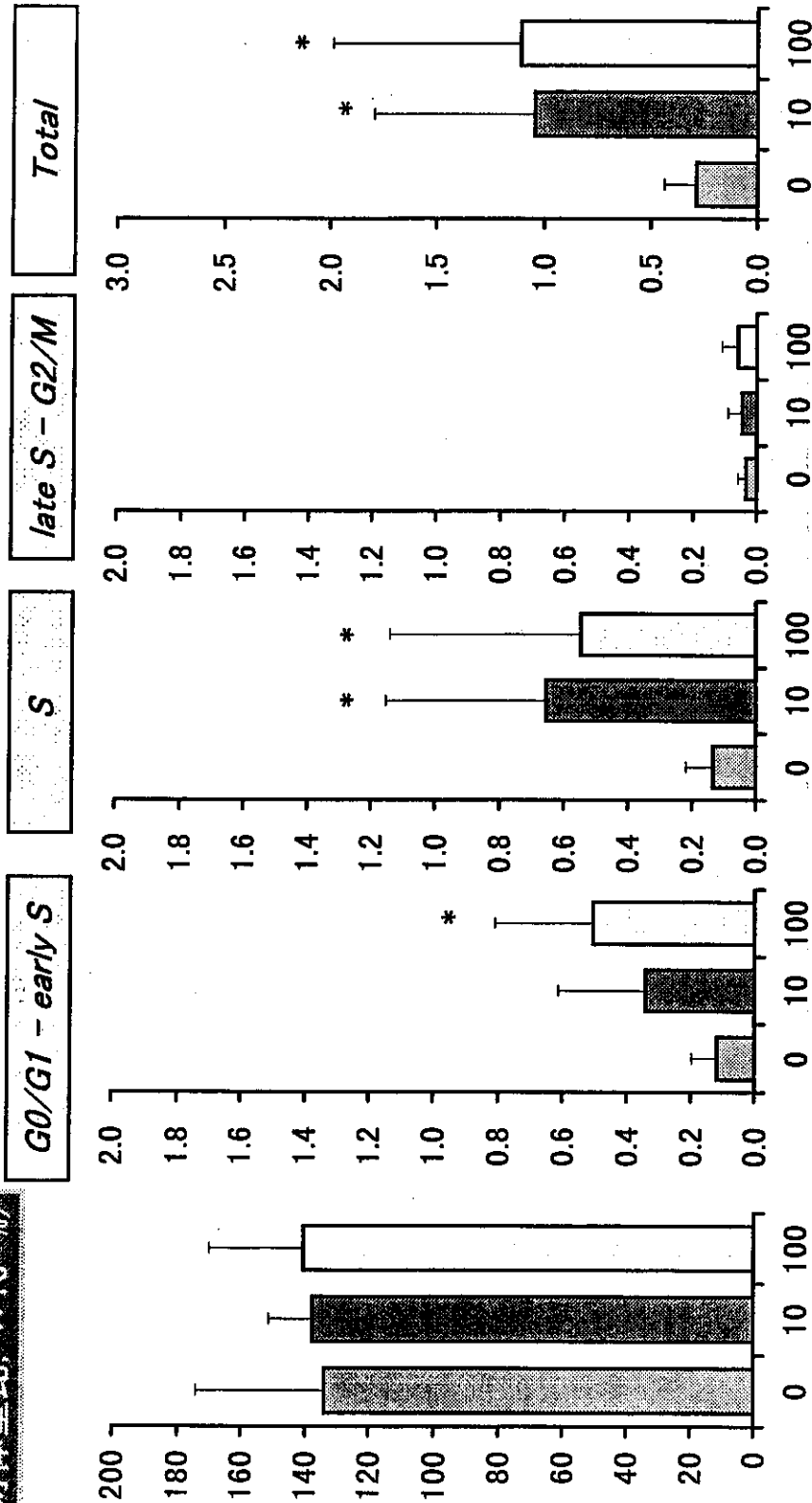
Flutamide (mg/kg/day)+TP (0.3mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 6, * p < 0.05 (vs Vehicle+TP group, Dunnett's test)

【実験Ⅲ】 p,p'-DDE に対する反応 (皮下投与)

前立腺重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



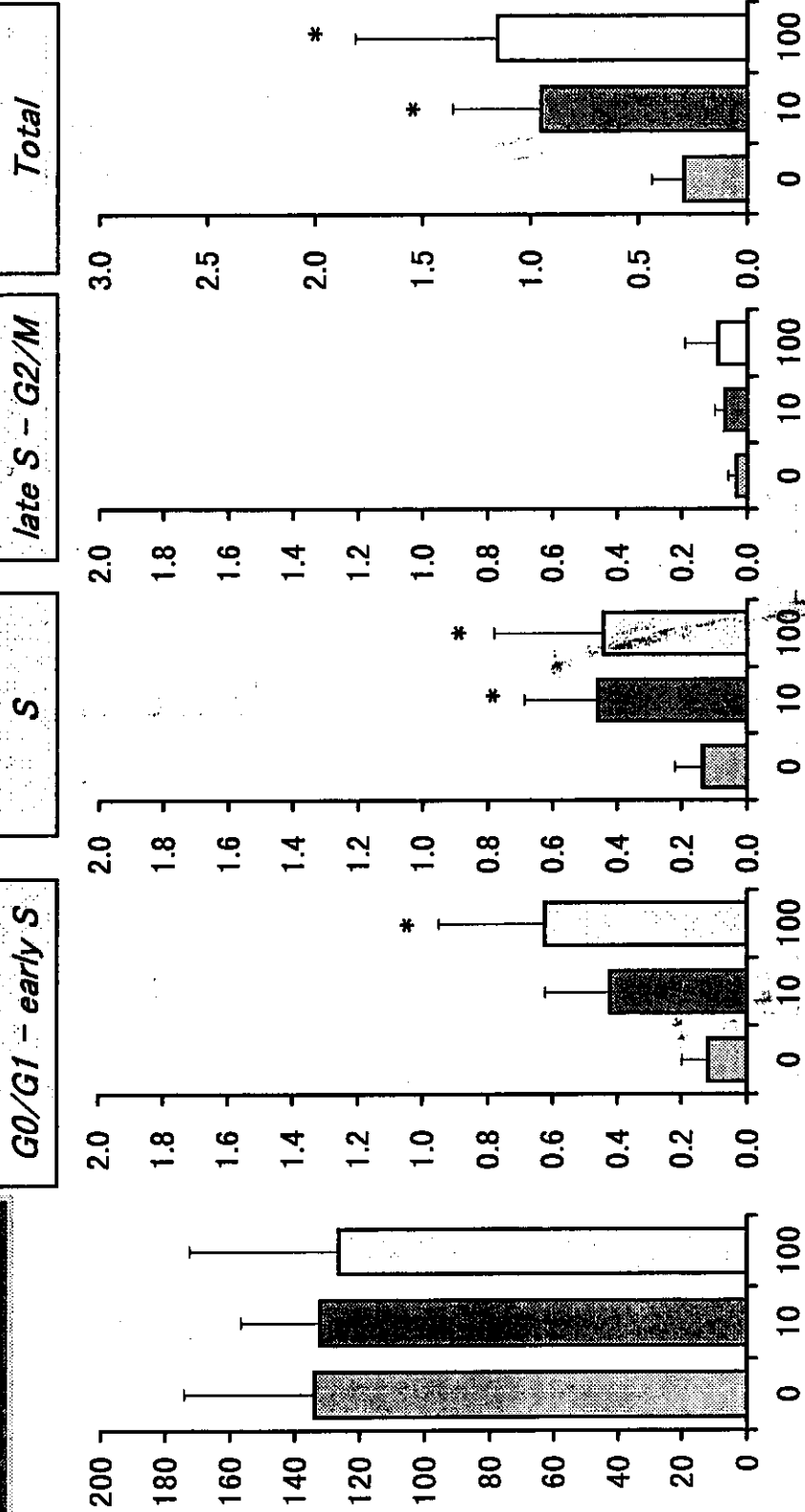
p,p'-DDE (mg/kg/day)+TP (0.3 mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 6, *; p < 0.05 (vs Vehicle+TP group, Dunnett's test)

【実験Ⅲ】 Vinclozolin に対する反応 (皮下投与)

前立腺腹葉重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



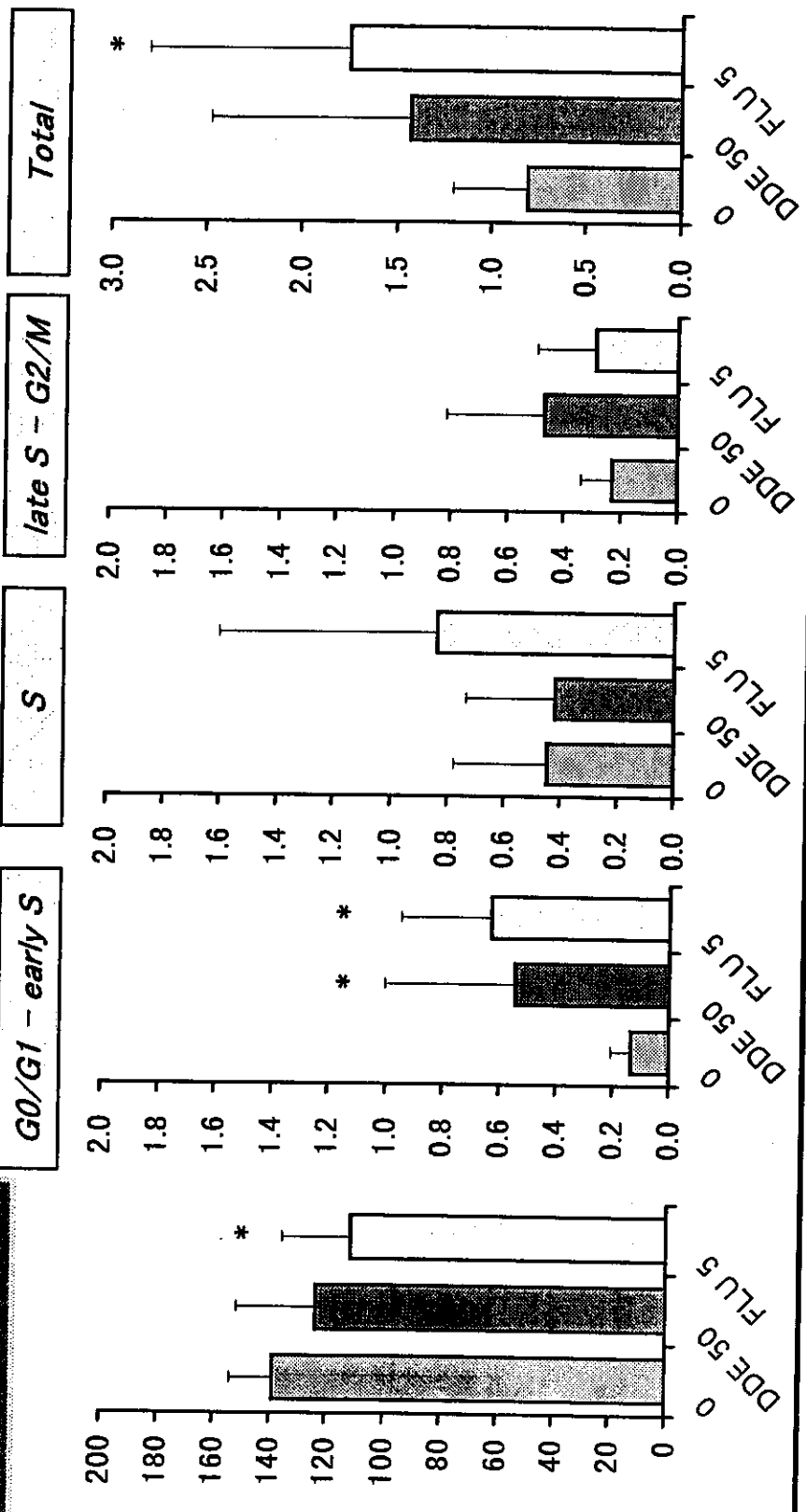
Vinclozolin (mg/kg/day)+TP (0.3mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 6, *: p < 0.05 (vs Vehicle+TP group, Dunnett's test)

【実験Ⅳ】 Flutamide および *p,p'*-DDE に対する反応（経口投与）

前立腺腺葉重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



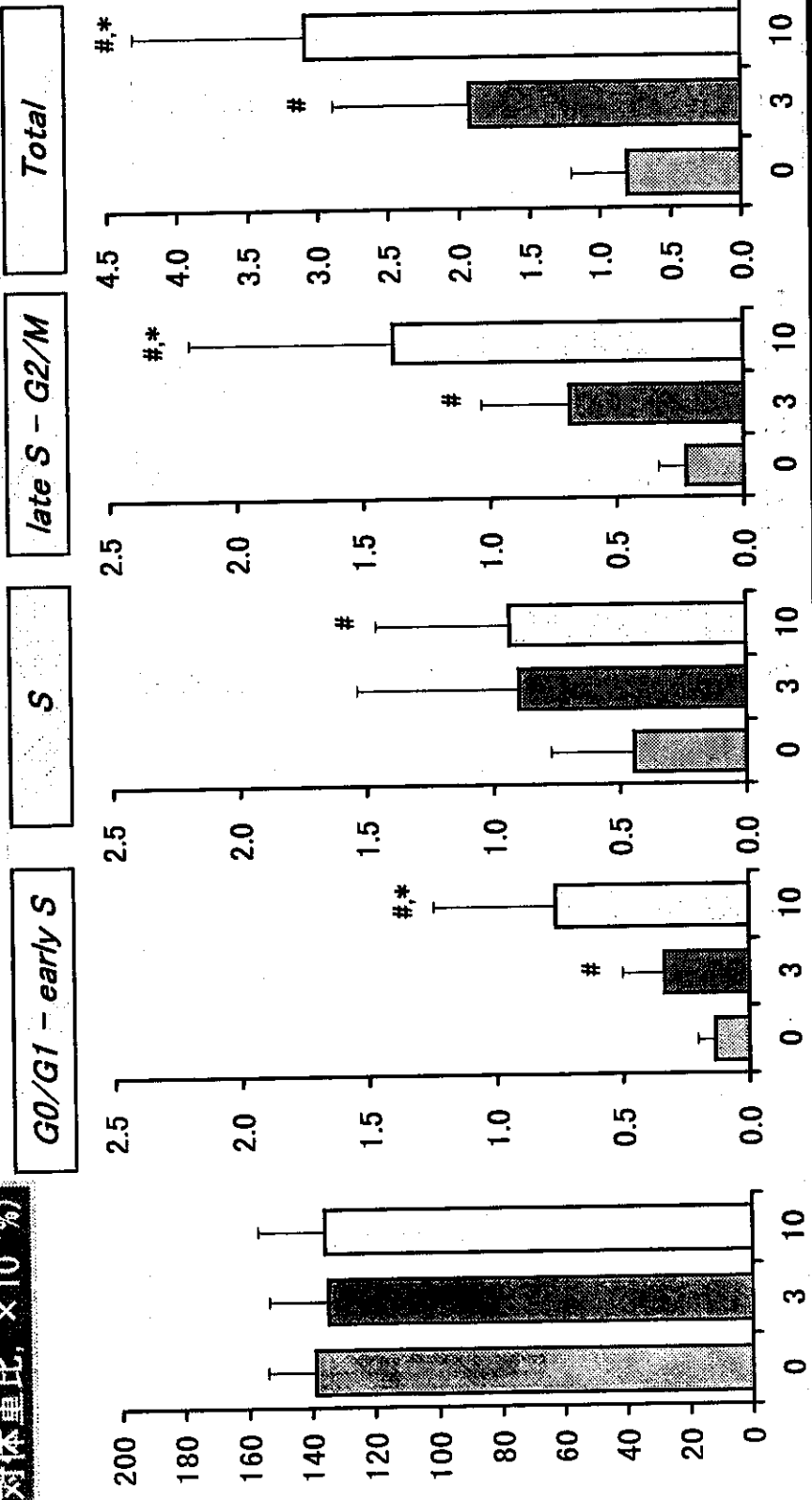
Test compound (mg/kg/day)+TP (0.3 mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 8, *: p<0.05 (vs Vehicle+TP group, t test)

【実験IV】 Finasteride に対する反応（経口投与）

前立腺腹葉重量
(対体重比, $\times 10^{-3}\%$)

TUNEL index (%)



Finasteride (mg/kg/day) + TP (0.3 mg/kg/day)

Note. Mean \pm SD, n = 8, #: $p < 0.05$ (t test), *: $p < 0.05$ (Dunnett's test)

2. 新規 *in vivo* スクリーニング法開発のための研究 — α_{2u} -globulin の生体内動態と Endocrine disrupter screening 法への応用—

所属：財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

研究者名： ○武吉正博、佐脇正邦、野田修二、山崎寛治

研究要旨： OECD enhanced 407 Test guideline に従って合成女性ホルモンとして使用されている ethynylestradiol (EE) を低用量 (15、75、375 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) で雄ラットに 28 日間投与した実験、LH-RH antagonist である Antide を動物に投与した実験、Hershberger assay protocol に準じて行った実験において血清 AUG レベルは Bisphenol A や Diethylstilbestrol を用いた実験においても同様に精巢の萎縮性変化を示さない動物においても血清 AUG の低下が観察されており、血清 AUG は化学物質の内分泌系に対する影響を類推する上で有用な指標となるものと思われた。一方、LH-RH antagonist の投与によって血清 AUG は用量依存的な低下を示し、外科的或いは Antide を用いて化学的に去勢を行った動物に対して testosterone propionate を投与した実験において血清 AUG レベルの増加傾向がみられ、Hershberger assay protocol に準じて行った実験においても testosterone propionate を投与による AUG の誘導が観察されていることから、*in vivo* では AUG の生合成に男性ホルモンが重要な因子となっているものと推察された。以上の結果から、血清 AUG は Estrogen 作用物質の投与によって低下することが、これまでの実験で確認されているが、Estrogen 作用物質のみでなく LH-RH antagonist の投与によっても減少することから、視床下部-下垂体-性腺軸の攪乱に関しても捕らえることが可能であると思われた。*in vivo* における Androgen の AUG 遺伝子の発現誘導機構や Estrogen による AUG 遺伝子の発現抑制機構には未だ不明な点もあり、AUG 測定の意味を明確にするためにも今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにする必要があるが、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法の開発は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

A. 研究目的

ELISA 法によるラット血清中の α_{2u} -globulin (AUG) の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter (EDs) screening 法への応用の可能性について検討する。

相対湿度 55 \pm 10%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯-19 時消灯) に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ (165 W_300 D_150 H mm、トキワ科学器械株式会社) に個別飼育した。

B. 方法

Ethynylestradiol (EE) 投与による影響

1) 使用動物

動物は日本チャールス・リバー株式会社 (日野飼育センター、〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735) で生産された Crj: CD (SD) IGS ラット (SPF) を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 23 \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 、

2) 被験物質の調製及び投与

Ethynylestradiol (EE, 和光純薬工業) を購入し、olive oil を媒体として 15、75、375 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量で 28 日間反復強制経口投与を行った。

3) 剖検及び血清の採取

28 日間の投与期間終了後、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3000 rpm、10

分遠心分離し血清を採取し、血清 AUG 及び血清ホルモン (T3, T4, TSH, Testosterone, FSH, LH, Prolactin, Estradiol) レベルを測定した。また、精巣、精巣上体、腹葉前立腺、背側葉前立腺、精囊について重量測定を行った。

4) 抗体固相化プレートの作製

Affinity 精製抗 α_{2u} -globulin (AUG) 抗体を 50mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) を用いて 5 μ g/ml に調製した後、ポリスチレン製 ELISA プレート (Immulon 200, Greiner) の well 内に 100 μ l を加え 4 $^{\circ}$ C、一夜放置後、25%BlockAce でブロッキングを行った。

5) 血清 AUG の測定

血清は 0.5%Tween 20 含有 Tris buffered saline (TBS-Tween, pH 7.2) で 500-1000 倍に希釈した後、抗体固相化プレートに添加し、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、TBS-Tween で希釈した酵素標識抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。プレートを 3 回洗浄した後、*o*-phenylenediamine、 H_2O_2 を基質として発色させ、1N H_2SO_4 を加えて反応を停止した後、SpectraMAXTM (Molecular Devices Inc.) を用い、650 nm を参照波長として 490 nm の吸光度を測定し、既知の抗原を反応させた際の標準曲線から血清中 AUG 濃度を推定した。

6) 病理組織学的検査

採取した精巣についてブアン液にて固定した後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して光学顕微鏡的に検査を行った。

LH-RH antagonist 投与による影響の解析

1) 使用動物

動物は日本チャールス・リバー株式会社 (日野飼育センター) で生産された Crj: CD (SD) IGS ラット (SPF) を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、相

対湿度 55 \pm 10%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔 (7 時点灯-19 時消灯) に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ (165 W_300 D_150 H mm、トキワ科学器械株式会社) に個別飼育した。

2) 処置

LH-RH antagonist、Antide (SIGMA Chemical Company) を購入し、蒸留水: プロピレングリコール (2:1) 混液を媒体として使用した。6 週齢時に Antide を 0, 1, 3, 10mg/kg の用量で単回皮下投与を行い、8 週齢時に採血を行って血清 AUG レベルの変化を観察した。また、6 週齢時に外科的に去勢を行った動物及び 6 週齢時に Antide 10mg/kg を単回皮下投与した動物に対して Testosterone propionate (TP) を 0.3mg/kg/day の用量で 10 日間皮下投与を行い、外科的去勢及び化学的去勢動物に対する男性ホルモン (Testosterone propionate) 投与の血清 AUG レベルへの影響について検討を行った。

Hershberger assay protocol における血清 AUG の測定意義に関する検討

Hershberger assay は男性ホルモン作用物質検出系として開発が進められている試験法であるが、本試験法の Endpoint として血清 AUG が使用可能か否かについて検討を行った。動物は 6 週齢で外科的に去勢を行った後、10 日間にわたって Testosterone propionate を 0.02, 0.1, 0.5mg/kg/day の用量で 10 日間投与した後、剖検を行い、副生殖腺重量の測定と共に血清 AUG レベルの変動を観察した。

C. 結果

Ethinylestradiol (EE) 投与による影響 (Tables 1 and 2, Fig. 1)

器官重量では高用量群 (375 μ g/kg/day) の腹葉前立腺重量及び中用量 (75 μ g/kg/day) 及び高用量群の背側葉前立腺重量において有意な減少がみられ、血清ホルモン濃度に関しては Prolactin 濃度が中用量群及び高用量群において有意な減

少が観察された。病理組織学的検査の結果、対照群の 2 例に精子肉芽腫、低用量 (15 μ g/kg/day) の 1 例に精細管の萎縮、Leydig 細胞の増生及び精子細胞の減少、高用量群の 5 例に精母細胞の変性、精子放出の抑制などの萎縮性変化が観察された。一方、血清 AUG レベルは高用量群で明らかな低下を示したが、その他の用量群では明白な影響はみられなかった。

LH-RH antagonist 投与による影響の解析 (Figs. 2 and 3)

LH-RH antagonist を 1, 3, 10mg/kg の用量で単回皮下投与した場合、用量依存的な血清 AUG レベルの低下が観察された。また、去勢動物に対する男性ホルモン (Testosterone propionate) の影響を検討した結果、外科的或いは化学的去勢によって血清 AUG レベルは著しく低下した。これらの動物に対して TP を 0.3mg/kg の用量で 10 日間投与した場合、外科的去勢動物に関しては有意な AUG の誘導、chemical castration 群では有意差は認められなかったが、血清 AUG レベルは増加傾向を示した。

Hershberger assay protocol における血清 AUG の測定意義に関する検討 (Figs. 4 and 5)

Hershberger assay は男性ホルモン作用物質或いは抗男性ホルモン作用を検出する手法として現在開発が進められている。血清 AUG レベルの Hershberger 法における生物指標としての意義について検討した結果、高用量群で有意な血清 AUG レベルの増加がみられたが、他の用量では AUG の誘導は観察されず、同時に測定した副生殖腺重量に関しては腹葉前立腺、精囊、包皮腺の重量では全ての群で、球海綿体筋及び肛門挙筋、陰茎龟头では中用量群以上で有意な増加が観察された。

D. 考察

昨年度、Bisphenol A を 40-1000mg/kg の用量で 28 日間投与した際の血清 AUG の変化並びに精巣及び副生殖腺重量を測定した

結果、精巣及び副生殖腺重量に被験物質のエストロゲン作用によると思われる変化はみられなかったが、血清 AUG は用量依存的な減少がみられた。今年度は合成女性ホルモンとして使用されている ethynylestradiol (EE) を低用量 (15, 75, 375 μ g/kg/day) で OECD enhanced 407 Test guideline に従って雄ラットに 28 日間投与し、精巣及び副生殖腺重量の変化、精巣の病理組織学的変化、血清ホルモン及び血清 AUG の変動について検討を行った結果、血清 AUG は高用量 (375 μ g/kg/day) 群で著しい減少が観察されたが、低用量群及び中用量群では変動はみられなかった。器官重量で一方、背側葉前立腺重量及び血清 Prolactin 濃度では中用量 (75 μ g/kg/day) まで有意な減少或いは増加が観察された。病理組織学的検査の結果、対照群の 2 例に精子肉芽腫、低用量 (15 μ g/kg/day) の 1 例に精細管の萎縮、ライディッヒ細胞の増生及び精子細胞の減少、高用量群の 5 例に精母細胞の変性、精子放出の抑制などの萎縮性変化が観察されたが、中用量群では同様の所見を示す例は認められなかったことから、これらは偶発的な変化であり、被験物質の影響によるものではないと推察された。病理組織学的所見においては高用量群の 5 例に精母細胞の変性、精子放出の抑制などの萎縮性変化が観察された。血清 AUG レベルは高用量群では全例で著しい減少が観察され、病理組織学的に明白な変化を示さなかった動物においても減少していた。Bisphenol A や Diethylstilbestrol を用いた実験においても同様に精巣の萎縮性変化を示さない動物においても血清 AUG の低下が観察されており、血清 AUG は化学物質の内分泌系に対する影響を類推する上で有用な指標となるものと思われる。一方、AUG の低下メカニズムに関する検討の一環として LH-RH antagonist である Antide を動物に投与した場合の血清 AUG の変動をみた結果、用量依存的な低下が観察された。Antide は LH-RH と拮抗的に働き、LH の分泌を抑制することによって結果的に精巣における testosterone 合成を阻害する。また、外

科的或いは Antide を用いて化学的に去勢を行った動物に対して testosterone propionate を投与した実験において血清 AUG レベルの増加傾向がみられ、Hershberger assay protocol に準じて行った実験においても testosterone propionate を投与による AUG の誘導が観察されていることから、*in vivo* では AUG の生合成に男性ホルモンが重要な因子となっているものと推察された。

以上の結果から、血清 AUG は Estrogen 作用物質の投与によって低下することが、これまでの実験で確認されているが、Estrogen 作用物質のみでなく LH-RH antagonist の投与によっても減少することから、視床下部-下垂体-性腺軸の攪乱に関しても捕らえることが可能であると思われる。

in vivo における Androgen の AUG 遺伝子の発現誘導機構や Estrogen による AUG 遺伝子の発現抑制機構には未だ不明な点もあり、AUG 測定の意義を明確にするためにも今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにする必要があるが、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法の開発は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

E. 結論

血清 AUG は通常行われる毒性試験の中で測定・評価することが可能であり、Estrogen 作用物質及び視床下部-下垂体-性腺軸の攪乱に関しても捕らえることが可能と思われるため、本蛋白質は Endocrine Disrupter 検出のための新規生物指標として有用と思われる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K.,
Hepatic α_{2u} -globulin mRNA levels
and diethylstilbestrol-associated

testicular atrophy in rats. *Reprod Toxicol.* 2000; 14(4): 355-357.

- Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K.,
Changes in serum α_{2u} -globulin
levels in male rats given
diethylstilbestrol and applicability to
a screening test for endocrine-
disrupting chemicals. *Arch Toxicol.*
2000; 74(1): 48-53.

2. 学会発表

- Takeyoshi, M., Sawaki, M. Yamasaki,
K., Takatsuki, M. Changes in serum
alpha 2u globulin levels in male rats
given diethylstilbestrol and bisphenol
A and its applicability to screening
test for estrogenic chemicals,
EUROTOX annual meeting
(LONDON), 2000
- 武吉正博、佐脇正邦、山崎寛治、
高月峰夫、Diethylstilbestrol 及び
Bisphenol A 投与雄ラットの血清 α
2u-globulin 濃度の変化と女性ホル
モン様作用物質スクリーニング試
験への適用性、内分泌攪乱化学物
質学会研究発表会（横浜）、2000

Table 1-1 Relative weights of reproductive and accessory sex organs in rats administered with Ethynylestradiol for 28 Days

Dose µg/kg/day	Body weight (g)	Testes (mg/100g)	Epididymis (mg/100g)	Ventral prostate (mg/100g)	Dorsolateral prostate (mg/100g)	Seminal vesicle (mg/100g)
Control	420.6±27.8	770.8±69.6	265.1±28.7	125.0±15.2	101.8±17.1	339.0±58.6
15	418.9±23.7	698.3±159.4	251.0±47.7	116.2±25.9	98.2±26.4	332.4±66.5
75	398.2±25.1	779.5±73.7	270.3±22.1	102.7±20.7	79.8±12.5*	288.4±45.1
375	331.6±22.9	734.1±191.5	216.7±77.1	40.1±27.7**	41.9±18.5**	103.3±76.9**

*: Significantly different from the control (P<0.05).

**: Significantly different from the control (P<0.01).

Table 1-2 Serum hormone levels in rats administered with Ethynylestradiol for 28 Days

Dose µg/kg/day	T3 (ng/dl)	T4 (µg/dl)	TSH (ng/ml)	Testosterone (pg/ml)	FSH (ng/ml)	LH (ng/ml)	Prolactin (ng/ml)	Estradiol (pg/ml)
Control	62±5	5.63±0.55	8.5±2.7	5085±3814	173.9±24.7	19.6±4.9	98.1±8.2	4.3±1.9
15	54±16	5.42±1.12	10.2±2.4	6857±3019	188.5±64.8	20.0±5.5	173.1±87.3	4.9±2.4
75	53±8	5.27±0.35	9.5±2.2	4520±1867	152.3±24.2	16.1±3.5	387.0±64.1*	2.5±0.0
375	59±3	6.07±0.42	5.4±1.7	940±1276	147.6±12.3	13.7±1.4	525.9±83.9**	5.5±3.2

*: Significantly different from the control (P<0.05).

**: Significantly different from the control (P<0.01).

Table 2 Histopathological changes in testes and serum AUG levels in male given ethynylestradiol

Desc of EE (µg/kg/day)	Testes					Epididymis					Serum AUG level (µg/ml)
	Animal No.	Atrophy of seminiferous tubules	Leydig cell hyperplasia	Degeneration of spermatocytes	Inhibited spermiation and retention of spermatids	Spermatic granuloma	Degeneration of efferent ductal epithelial cells	Decreased spermatozoa	Atrophy of seminal vesicles		
Control	1									222	
	2									182	
	3									323	
	4									244	
	5					+				150	
	6					+				99	
	7									139	
	8									144	
	9									184	
	10									148	
15	11									194	
	12									217	
	13									258	
	14									305	
	15									236	
	16									104	
	17		++	+				+		214	
	18									124	
	19									117	
	20									146	
75	21									180	
	22									152	
	23									164	
	24									124	
	25									161	
	26									110	
	27									274	
	28									221	
	29									172	
	30									126	
375	31									28	
	32		+	++	+		++	+		14	
	33			++	+		+	++		15	
	34			++	++		+	++		34	
	35			++	++	+	+	++		0	
	36									35	
	37			+	+					5	
	38									0	
	39								+	0	
	40									42	

+:slight, ++:moderate

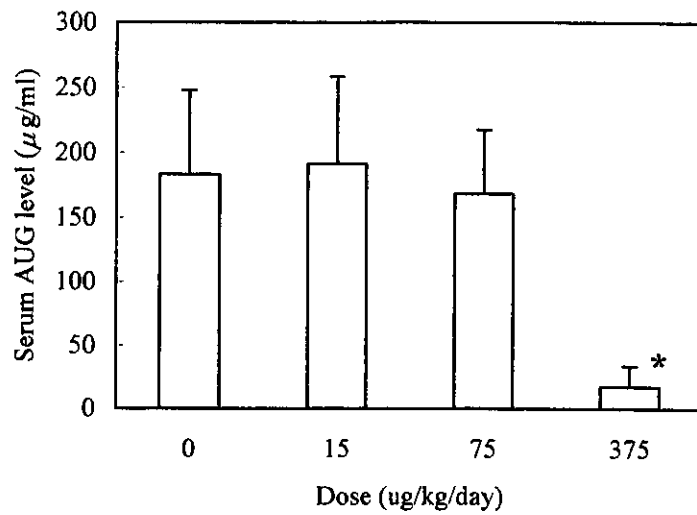


Figure 1 Serum AUG levels in male rats given ethynylestradiol for 28 days
 *: Significantly different from the control (P<0.05)

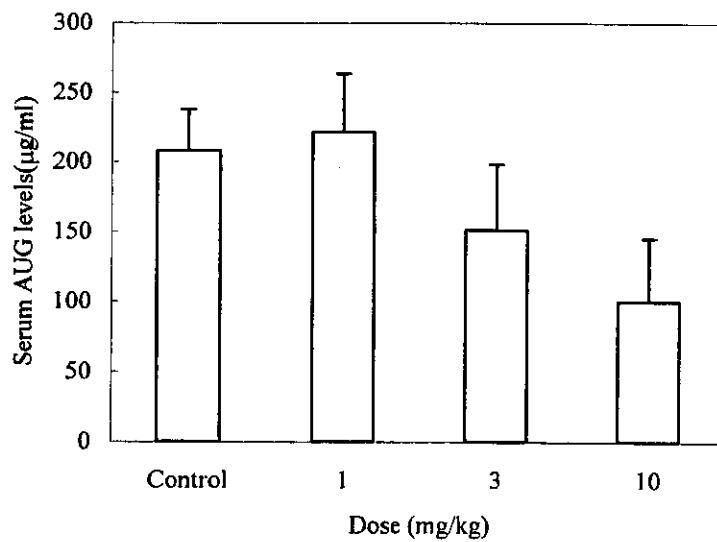


Figure 2 Serum AUG levels in male rats after single injection with LH-RH antagonist, ANTIDE
 Significant dose dependent decrease in serum AUG levels were observed by One-way ANOVA (P<0.05)

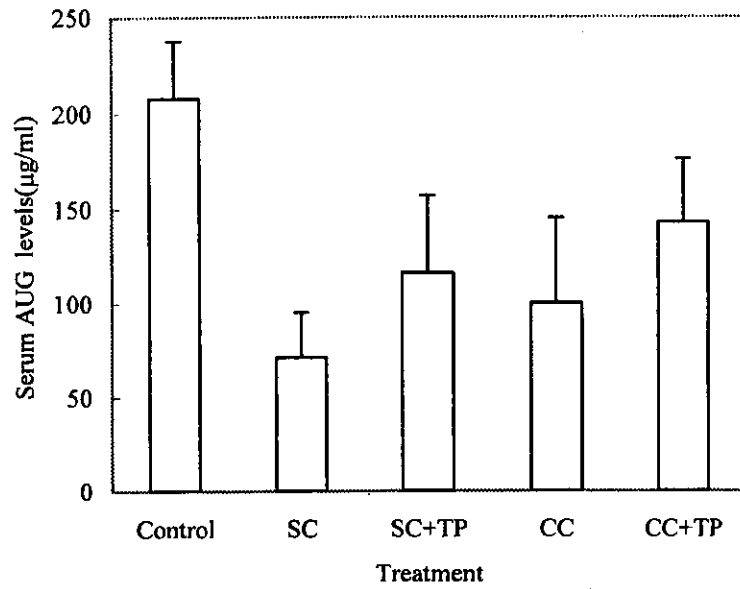


Figure 3 Effect of testosterone propionate on serum AUG levels in surgically or chemically castrated rats
 SC: Surgically castrated, CC: Chemically castrated (Antide)
 TP: Testosterone propionate (0.3 mg/kg x 10 days)

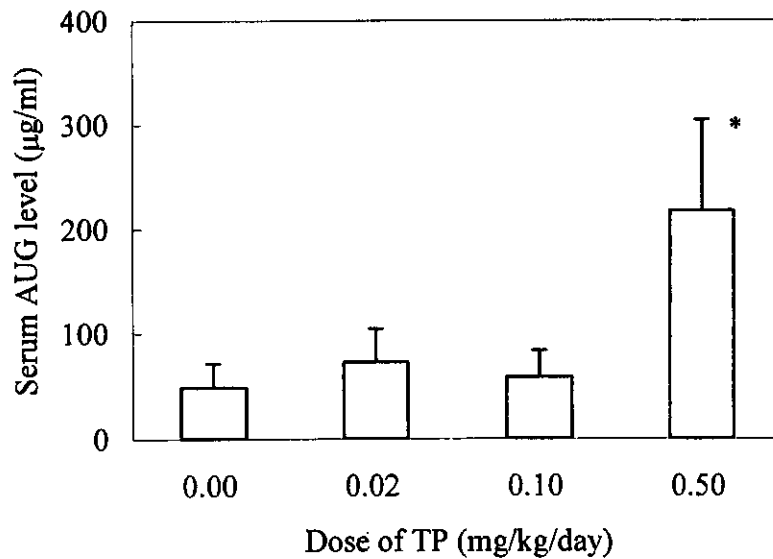


Figure 4 Effect of testosterone propionate injection on serum AUG levels in male rat tested with Hurshberger assay protocol
 *: Significantly different from the control (P<0.05)