

もエストロゲン作用に特異的な変化が SF-NIH07 群よりも顕著に認められた (Tables 22, 23).

D. 考察

各種 EDC 候補物質について周産期曝露影響を検索した結果、MXC の 1200 ppm 群で内分泌・生殖系への明らかな影響が認められた。同群では出生時には AGD に変化は認められなかったが、生後 3 週時には精巣及び卵巣が低重量を示し、春期発動期は雌では早期化、雄では遅延を認めた。春期発動期は視床下部-下垂体軸の支配を強く受けることから、MXC の周産期曝露により視床下部あるいは下垂体が影響を受けている可能性が高いと考えられる。EE の 0.5 ppm 曝露例と同様に、1200 ppm MXC 曝露により雄の児動物の内側視索前野領域にみられた GAT-1 の発現低下傾向は、MXC が脳の性分化に対して影響を与えた可能性が示唆される。1200 ppm の MXC 曝露を受けた雌では、性成熟後にも性周期の不規則性及び卵巣、子宮に組織変化が認められ、周産期曝露により内分泌・生殖系に不可逆的な影響の生じることが示された。MXC 曝露例での下垂体のゴナドトロピン産生細胞率の検索により、生後 3 週時に 1200 ppm 群の雄で LH, FSH, PRL 陽性細胞率の低下が認められた。雄では生後から春期発動期 (生後約 6 週) の間、下垂体ホルモン産生細胞数の増加することが知られていることから、これらの陽性細胞率の低下は下垂体の成熟障害ないし遅延を示唆し、同群での春期発動期遅延に対応する所見である可能性が考えられた。一方、雌ではホルモン産生細胞数は生後 3 週前後にピークを示した後に減少することが知られている。本実験での 1200 ppm MXC 群の雌で認められた LH 産生細胞率の減少は、これらの動物に見られた春期発動期の早期化を考慮すると、下垂体成熟の早期化を示唆するものと考えられた。生後 11 週時には、雌で FSH, PRL 産生細胞率が増加しており、性成熟後にも下垂体への影響が持続して、発情期あるいは休止期の延

長や多卵胞性卵巣といった所見に反映されているものと考えられた。また PRL 産生細胞率の増加はこれまでの内分泌・生殖器系の評価で変化の認められていなかった 240 ppm MXC 群においても認められ、その反応は用量に依存していた。この所見の毒性学的な意義は血中ホルモン濃度測定などにより評価されるべきであるが、下垂体の PRL 産生細胞率の評価が EDCs の曝露影響の高感度検出パラメータとなる可能性が示唆された。

一方、EE の 0.5 ppm 曝露例での検索では、生後 3 週目の雌の PRL 陽性細胞の増加が認められたが、生後 11 週目にはいずれの細胞にも変動が認められなかった。生後 11 週の雌では、下垂体重量の増加や前葉のびまん性過形成を認めており、このことは前葉を構成している細胞が全体に増加していることを示唆している。1200 ppm MXC 群の雌との陽性細胞率の差異の原因は明らかではないが、1) エストロゲン作用の強弱による生体影響の差、ないし 2) MXC のエストロゲン作用以外の作用 (抗アンドロゲン作用) を反映している可能性が考えられる。

DINP はポリ塩化ビニル類の可塑剤で、玩具類の塗料に用いられており、この物質の投与によりラットでペルオキシゾーム増殖作用の他、精巣障害の生じることが知られている。本研究では、雄の 20000 ppm 曝露動物で脳の性分化終了時の内側視索前野領域における GAT-1 の発現が低値を示し、この濃度で脳の性分化に対する影響の生じていることが示唆された。ただし、春期発動の時期には対照群との差が認められていず、生後 3 週時での下垂体のゴナドトロピン産生細胞数の変動も明らかではないことから、性的発育を支配する視床下部-下垂体軸に対する影響はあったとしてもごく軽度であると考えられた。一方、生後 3 週時に精巣重量の低下が認められ、生後 11 週目の精巣に軽微ではあるが病理組織学的変化を認めている。この病理変化は、セルトリ細胞の空胞変性と XIV ステージの変性精母細胞の増加から構成されて

いたが、前者については児動物精巣への曝露による影響が残っているものと考えられた。ただし、精子細胞は正常に形成されており、セルトリ細胞の機能は保たれているものと考えられた。後者の変性精母細胞の増加については原因が不明であり、同群の雌で認められた卵巣の黄体数の減少が EE 曝露でも認められる変化であることを考慮すると、軽度の視床下部障害が示唆される。これらの変化については、可逆性も含めた再現性の確認が必要である。

Gen, BA, NP, Tam については、母動物に対する最大耐量と考えられる用量を高用量とし、その 150 までの用量範囲で曝露したが、EE や MXC でみられたような明らかな内分泌・生殖系への影響は認められなかった。Gen においては、春期発動の認められた時の体重は対照群と比較して低値を示したが、春期発動期には対照群との差が認められなかったことから、性的発育を支配する視床下部-下垂体軸は正常に機能しているものと考えられた。

脳の性分化臨界期における SDN-POA を含む内側視索前野領域での遺伝子発現解析については、昨年度報告した EE の他、今年度は real-time RT-PCR 法を用いて MXC, DINP, Gen 曝露例での検索を行ったが、DINP の 20000 ppm や MXC の 1200 ppm の雄で、EE で認められたような GAT-1 の発現低下ないし低下傾向が認められた。その他の化合物では、有意な発現変動は明らかではなかった。エストロゲンに反応して発現変動することが知られている GAT-1 は GABA ニューロン特異的に発現することが知られている。このニューロンは発達過程で興奮性刺激伝達を行うが、成熟するに従い抑制性刺激を伝達するようになる。脳の性分化過程においても、神経細胞領域によって GABA ニューロンの反応性（興奮性ないし抑制性）が雌雄で異なることが指摘されている。当然 GABA の transporter である GAT-1 も性分化過程での神経構築の可塑性の変化に応じて発現調節を受ける可能性がある。本研究では EE で得られたような検出感度での GAT-1 の発現

変動を MXC, DINP, Gen では得ることができなかったが、DINP あるいは MXC の最高用量の曝露を受けた雄動物での GAT-1 の発現低下ないし低下傾向は、内分泌中枢障害が生じていることを示唆しているものと考えられた。

本研究では、脳の性分化終了後における SDN-POA のサイズ測定では、各 EDC 候補物質曝露による影響は認められなかった。昨年度までの研究で、周産期に EE を 0.5 ppm 曝露することにより、児動物の SDN-POA のサイズが雄で減少することを確認している。エストロゲン作用による SDN-POA サイズへの影響については、雌のサイズが大きくなるという報告と、雄のサイズが小さくなるという報告がされている。SDN-POA サイズの雌雄差の原因として、一般的にはエストロゲン作用による神経細胞のアポトーシスの抑制が考えられているが、最近の文献ではエストロゲンは ER β を介してアポトーシスを促進する可能性のあることが報告されている。そこで、雄の SDN-POA サイズの減少は、EE のアポトーシス促進作用を反映している可能性が考えられたため、性分化時期における内側視索前野領域でのアポトーシスを起こしている細胞数を評価指標として検索を行った。しかし、生後 6 日目における検索では、EE の混餌投与による差を検出することができなかった。昨年度に行った生後 9 日目における抗アポトーシス遺伝子の bcl-xL の発現解析においても雌雄ともに EE 曝露による変動は認められなかったことから、持続的な曝露形態では投与期間中に sporadic にアポトーシスの生じている可能性が推定され、脳の性分化過程の一時点だけにおける神経細胞のアポトーシスの検索は、持続的な曝露に起因する性分化障害の検出には不適切であると考えられた。

大豆・アルファルファ由来の phytoestrogen を含む通常の基礎飼料と phytoestrogen を含まない飼料を用いた実験においては、基礎飼料の違いにより性発育パラメータに変動が認められ、外因性ホルモンにより誘発される変化の発現強度も異なることが示された。この原因が

Gen に代表される phytoestrogen の影響によるものか否かは現段階では不明であるが、EDCs などの評価に際しては、目的に応じて適切な飼料を使用することが必要である。もし飼料の違いによるエストロゲン曝露影響の違いが飼料中に含まれる phytoestrogen に起因する場合、食餌中の phytoestrogen 含量が EDC による曝露影響を増強する可能性が考えられる。そこで外因性に曝露した EE と飼料中の phytoestrogen との相乗作用を検討するために、現在 Gen と EE の周産期同時投与の実験を継続中であるが、生後 11 週までの時点で Gen は EE 曝露影響に対して明らかな修飾作用を認めていない。

E. 結論

今回検索した EDC 候補物質の周産期曝露による出生児影響を評価したところ、MXC は最高用量で視床下部一下垂体軸に対する直接影響を介した性成熟後の生殖器障害を示すものと考えられた。DINP の最高用量の雌雄の精巣・卵巣に見られた変化については、脳の性分化障害を介した変化かどうかを確定するために更に経時的な観察による確認試験が必要と考えられたが、影響としては軽度であると考えられた。他の化合物については今回の実験条件では内分泌中枢かく乱影響がないものと判断された。

今回の脳の性分化の臨界時期における視床下部神経核での遺伝子発現解析では、EDC 候補物質、特に他のパラメータで明らかな内分泌影響が確認された MXC においても明らかな発現変動を感度良く見出せなかった。今後、化学物質による脳の性分化に対する影響を検索するためには、microarray を利用した標的神経核 (SDN-POA 等)での網羅的遺伝子発現解析法の開発・導入や、脳の性分化の結果生じる神経細胞の可塑性の違いを検出する系の開発が有望と考えられる。

下垂体ホルモン産生細胞率の変動は MXC および EE 曝露群においてのみ認められ、他の検査項目による評価結果と一致していた。特に

PRL 陽性細胞率は、これまでの検査で影響の検出されなかった 240 ppm MXC 曝露群においても変動が認められ、EDCs の周産期曝露の影響を検出する鋭敏なパラメータとなる可能性が考えられる。しかしながら EE 曝露群では、性成熟後での各抗体陽性細胞率の変動は検出されなかったことから、今後より詳細な経時的検討あるいは血中のホルモン濃度との比較などを通じてパラメータとしての有用性を見極める必要があると考えられる。

また、異なる飼料を用いることによって性発育パラメータに変動が認められ、外因性ホルモンによって誘発される変化の発現強度も異なることが示された。その原因は不明であるが、EDCs の評価に際しては、飼料の選択に留意する必要があると考えられる。

個々の EDC 候補物質についての出生児影響の検索結果を Table 24 にまとめた。各々求められた NOAEL は、MXC で 1.9 mg (妊娠時) ~3.8 mg (授乳時) /kg/day (24 ppm in diet), DINP で 306.7 mg (妊娠時) ~656.7 mg (授乳時) /kg/day (4000 ppm in diet), Gen で 66.6 mg (妊娠時) ~113.1 mg (授乳時) /kg/day (1000 ppm in diet) 以上、NP で 270.4 mg (妊娠時) ~455.3 mg (授乳時) /kg/day (3000 ppm in diet) 以上、BA で 231.8 mg (妊娠時) ~384.4 mg (授乳時) /kg/day (3000 ppm in diet) 以上、Tam で 20.5 μ g (妊娠時) ~34.8 μ g (授乳時) /kg/day (0.25 ppm in diet) 以上であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. J. Histochem. Cytochem. (in press).

Shibutani, M., and Uneyama, C.: Methacarn a

fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues. *Methods Enzymol.* (in press).

Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. *Toxicogenomics* (in press).

Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Toyoda, K., Abe, N., Takahashi, N., Hirose, M.: Dose-response study of perinatally exposed ethinylestradiol on the expression of ERE-containing genes in the SDN-POA of neonatal rats. *Endocrinol.* (submitted)

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Hirose, M.: Perinatal exposure effects of methoxychlor, genistein, or diisononylphthalate on endocrine/reproductive organs in rats. *Tox. Sci.* (submitted).

2. 学会発表

渋谷淳, 畠山智香子: PALMを用いたパラフィン包埋微量組織からのRNA, 蛋白質, DNAの解析についてー メタカーン固定法の利用, 第90回日本病理学会総会ランチョンセミナー, 東京, 4月, 2001

榊富直哉, 渋谷淳, 畠山智香子, 中川恵子, 仁保直子, 高橋則行, 小林恒雄, 広瀬雅雄: メトキシクロールの周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器官への影響について, 第28回日本トキシコロジー学会学術年会, 東京, 第28回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: p123 (O12-18), 6月, 2001

畠山智香子, 渋谷淳, 榊富直哉, 高橋則行, 広

瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの多目的な遺伝子発現解析 (第三報), 第60回日本癌学会総会, 横浜, 第60回日本癌学会総会記事: p541 (1870), 10月, 2001

高木広憲, 渋谷淳, 榊富直哉, 畠山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 三森国敏, 広瀬雅雄: DiisononylphthalateおよびGenisteinの周産期曝露によるラットの性成熟および生殖器官への影響について, 第18回日本毒性病理学会, 東京, 第18回日本毒性病理学会講演要旨集: p45 (7), 1月, 2002

榊富直哉, 渋谷淳, 高木広憲, 畠山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: エチニルエストラジオールの周産期曝露により誘発されるラット内分泌・生殖器官の変化に及ぼす実験動物用飼料の影響について, 第18回日本毒性病理学会, 東京, 第18回日本毒性病理学会講演要旨集: p46 (9), 1月, 2002

G. 知的所有権の取得状況

特になし。

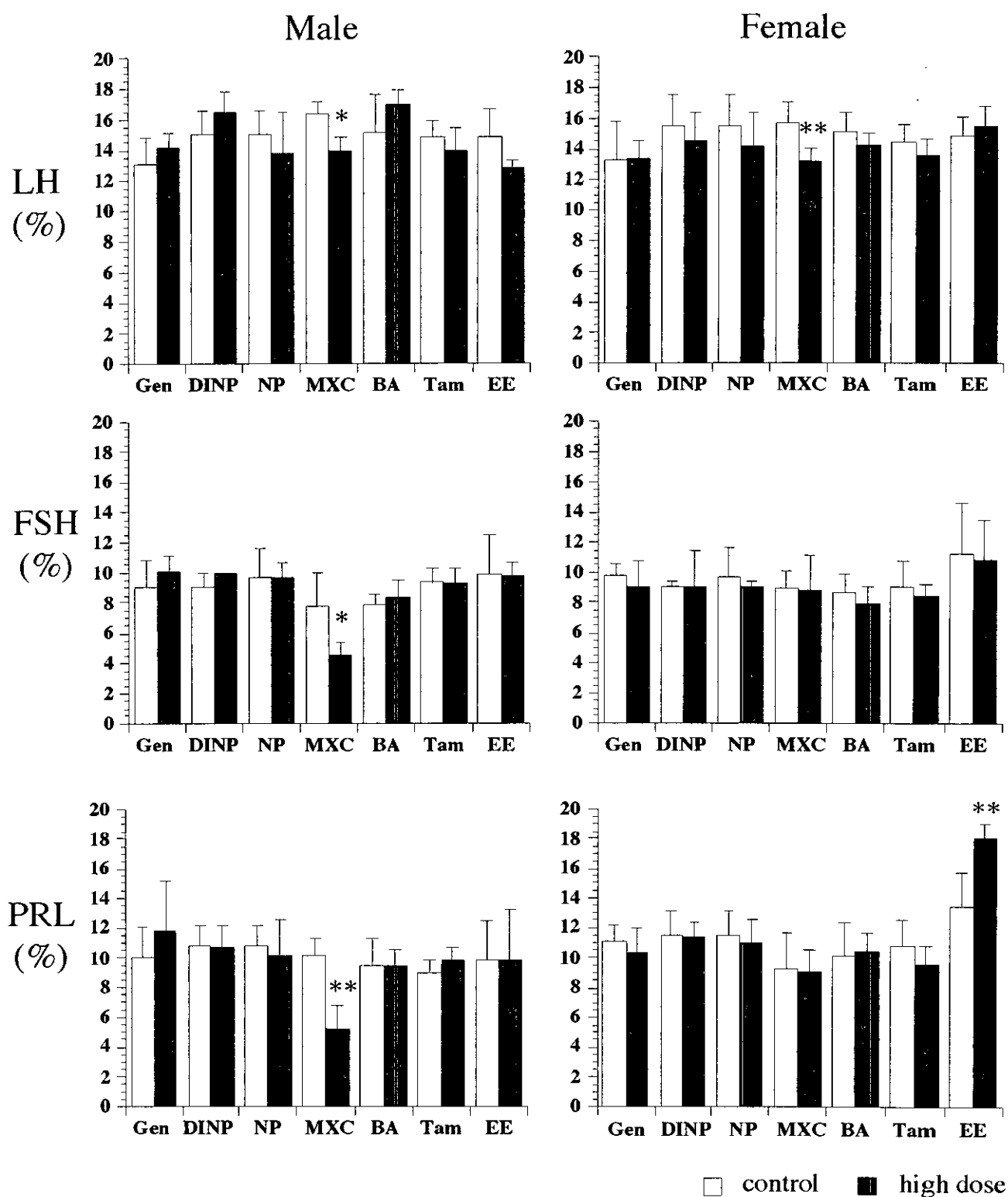


Fig. 1. Ratio of LH, FSH or PRL-positive cells in the anterior pituitary of rats perinatally exposed to EDCs. At week 3.

Percentage of LH, FSH or PRL-positive cells were calculated by counting numbers of immunoreactive cells in 1000 anterior pituitary cells. The difference between high dose group and respective control group was evaluated by student-t test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

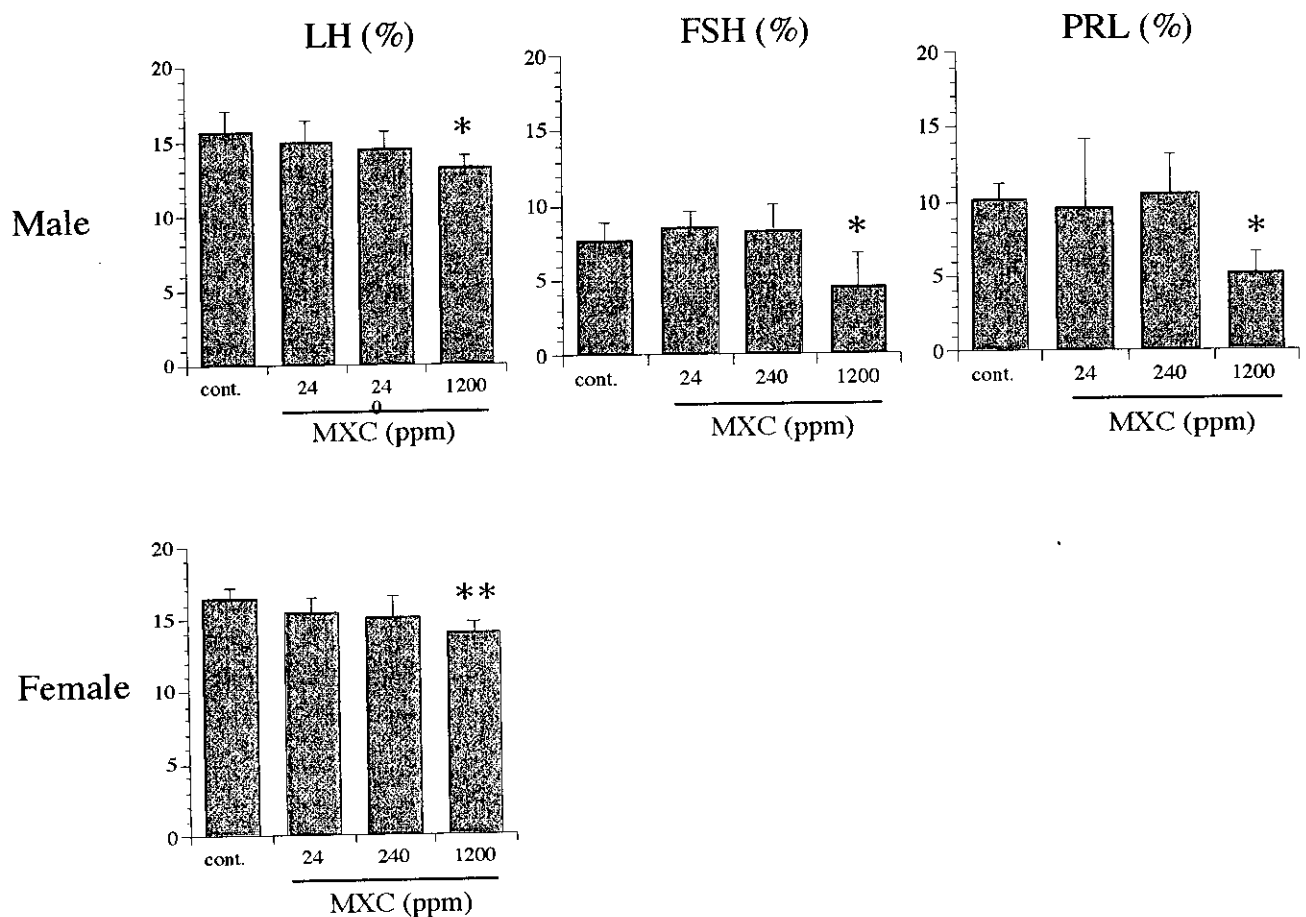


Fig. 2. Dose response analysis of changes in ratio of LH, FSH or PRL-positive cells in the anterior pituitary of rats perinatally exposed to MXC. At week 3.

The pituitary of pups from all MXC groups were examined for LH, FSH or PRL-immunoreactivity to confirm the dose-response of changes observed at 1200 ppm. The differences between control and each MXC group were evaluated by Dunnett's test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

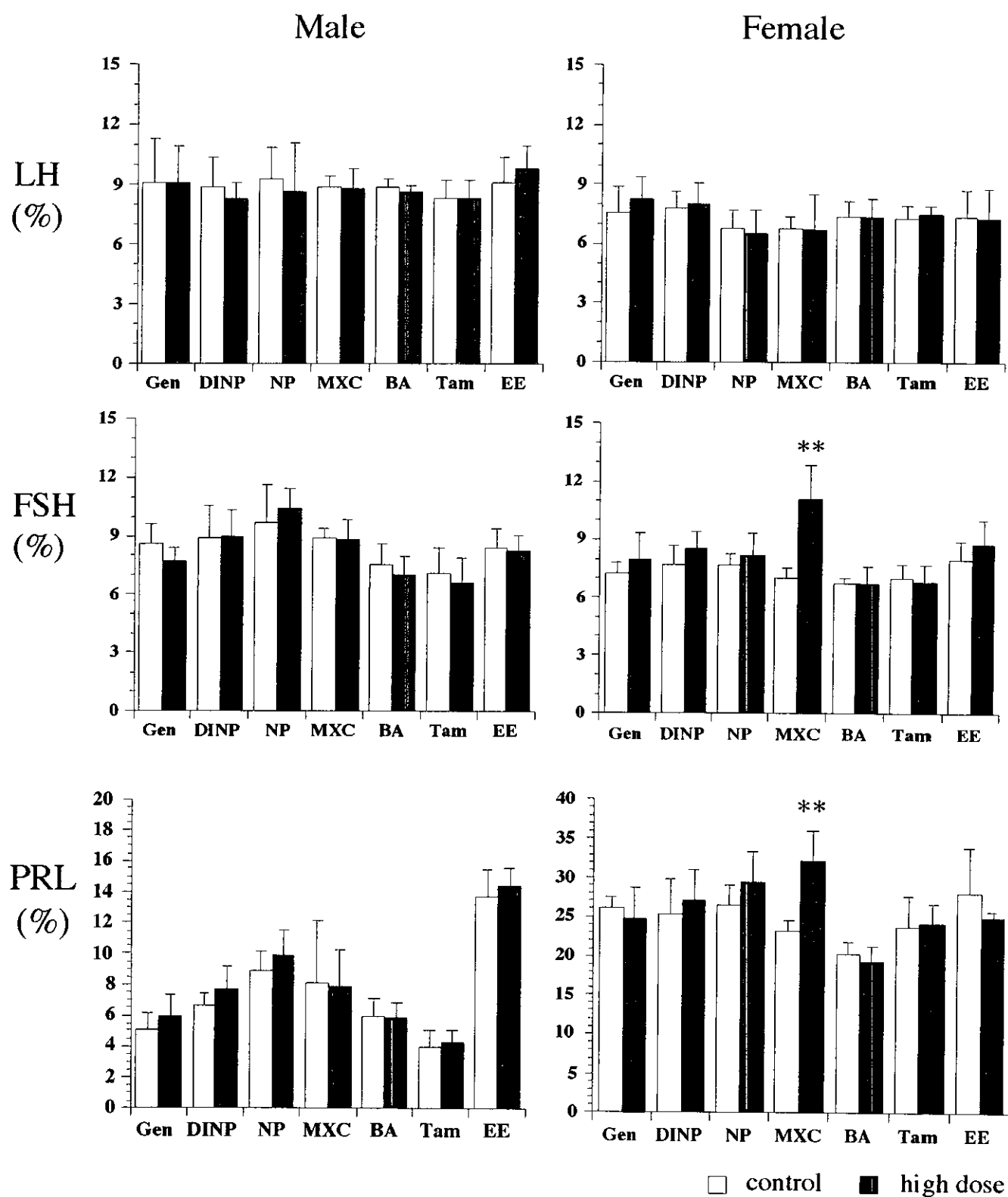


Fig. 3. Ratio of LH, FSH or PRL-positive cells in the anterior pituitary of rats perinatally exposed to EDCs. At week 11.

Percentage of LH, FSH or PRL-positive cells were calculated by counting numbers of immunoreactive cells in 1000 anterior pituitary cells. The difference between high dose group of each EDC and respective control group was evaluated by student-t test. ** $p < 0.01$.

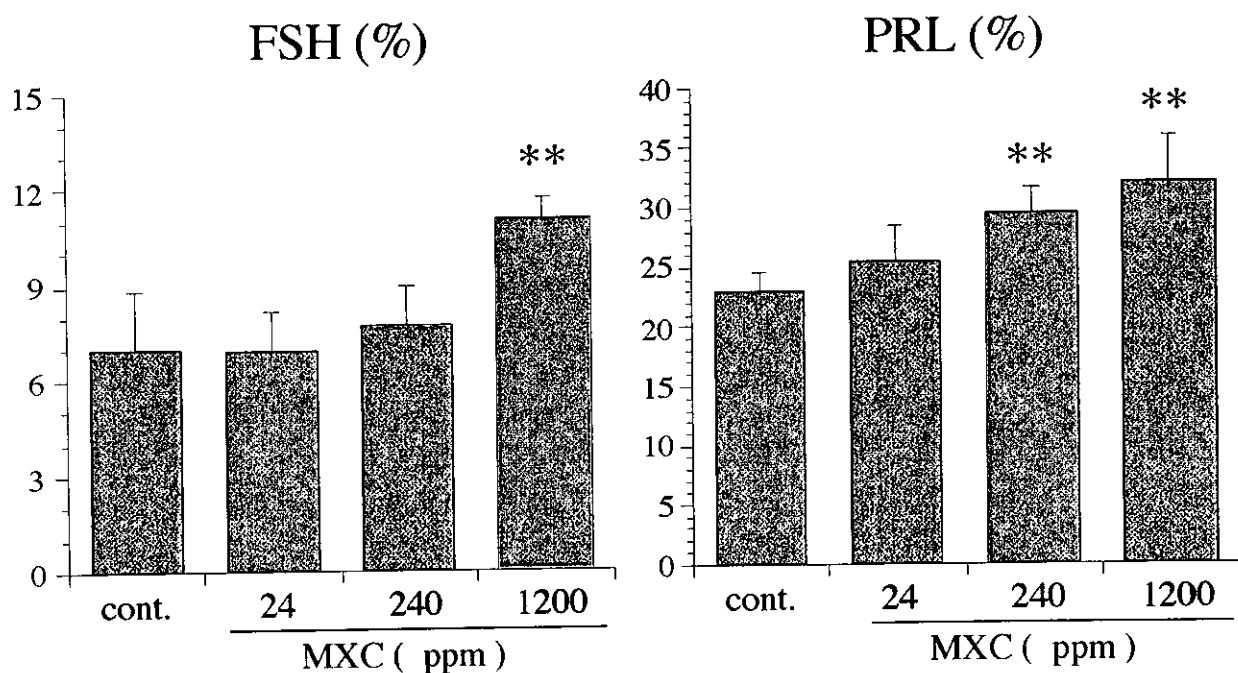


Fig. 4. Dose response analysis of changes in ratio of FSH or PRL-positive cells in the anterior pituitary of female rats perinatally exposed to MXC. At week 11.

The pituitary of female pups from all MXC groups were examined for FSH or PRL-immunoreactivity to confirm the dose-response of changes observed at 1200 ppm. The differences between control and each MXC group were evaluated by Dunnett's test. **, $p < 0.01$.

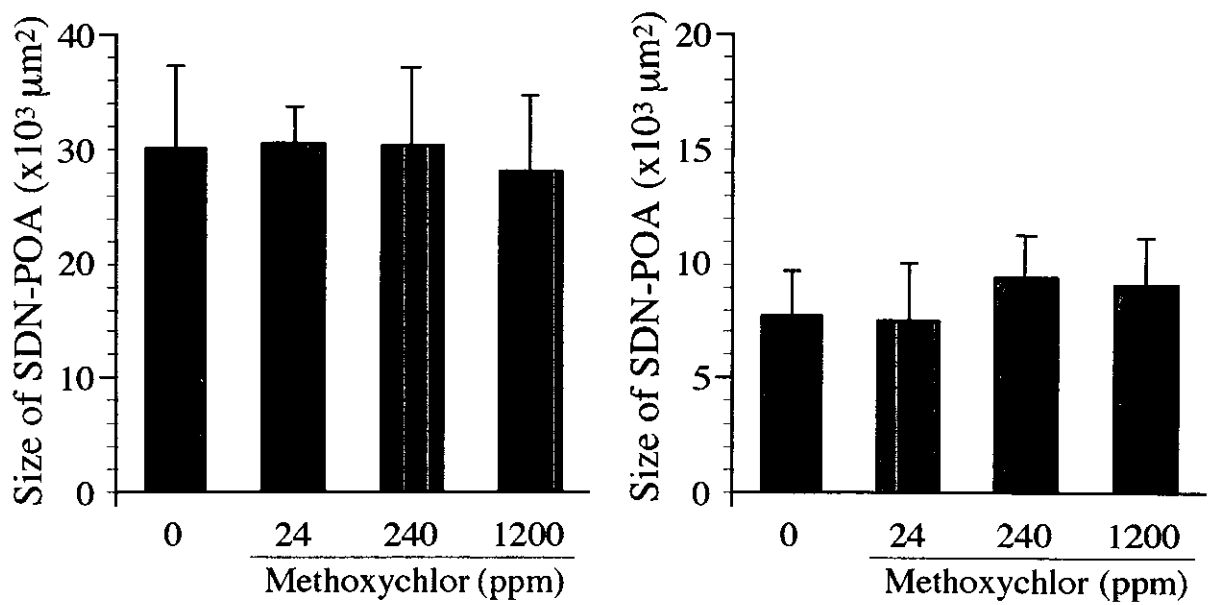


Fig. 5. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to methoxychlor at 11 weeks of age.

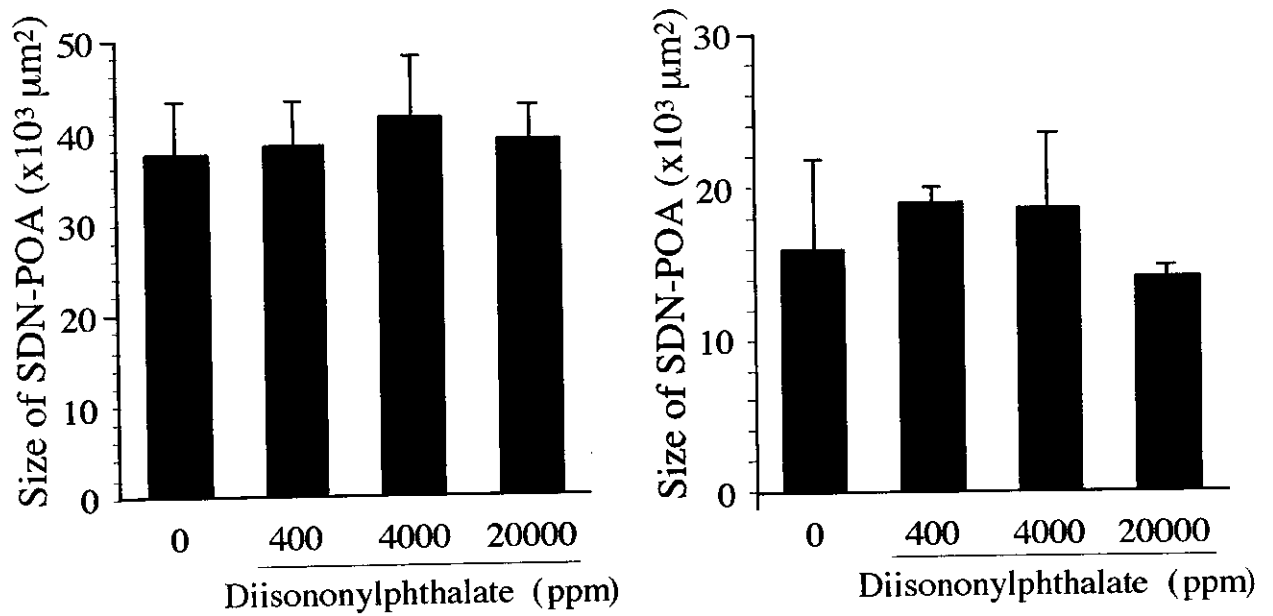


Fig. 6. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to diisononylphthalate at 3 weeks of age.

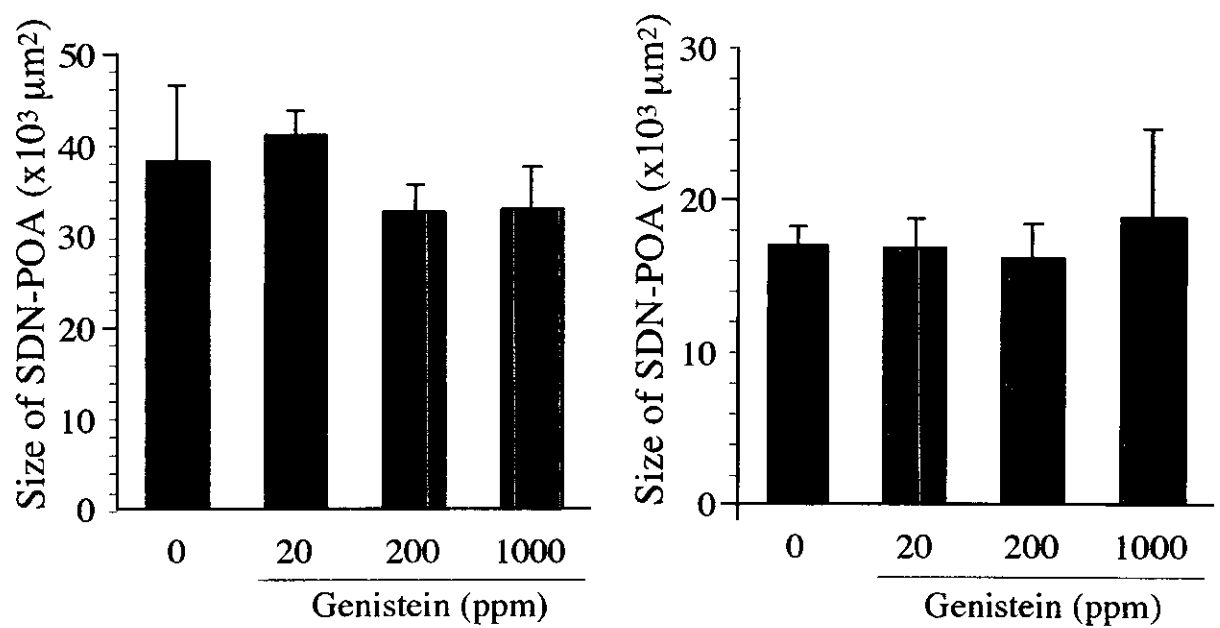


Fig. 7. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to genistein at 3 weeks of age.

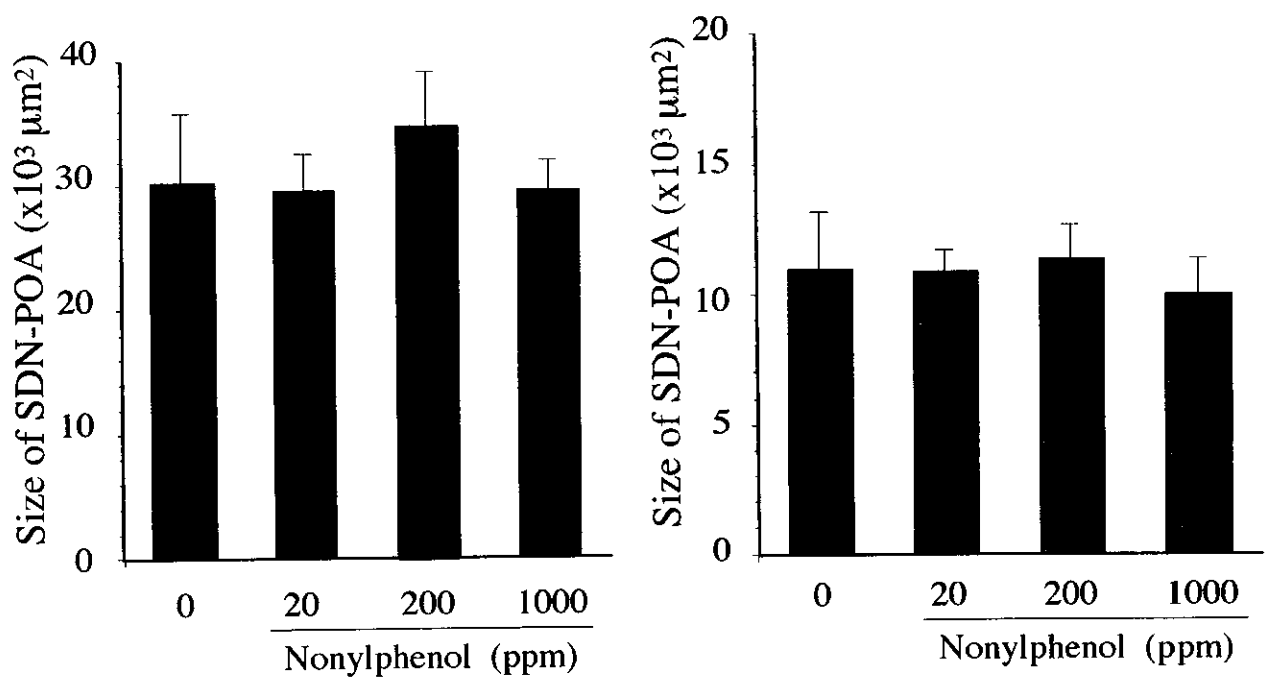


Fig. 8. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to nonylphenol at 11 weeks of age.

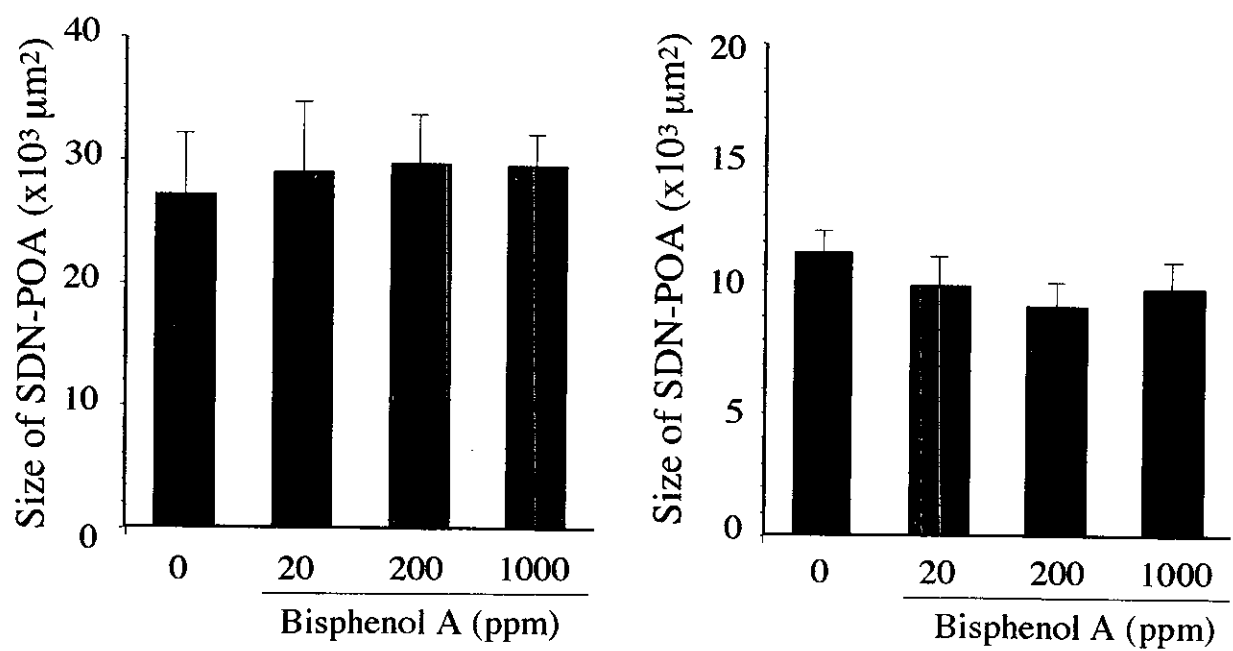


Fig. 9. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to bisphenol A at 11 weeks of age.

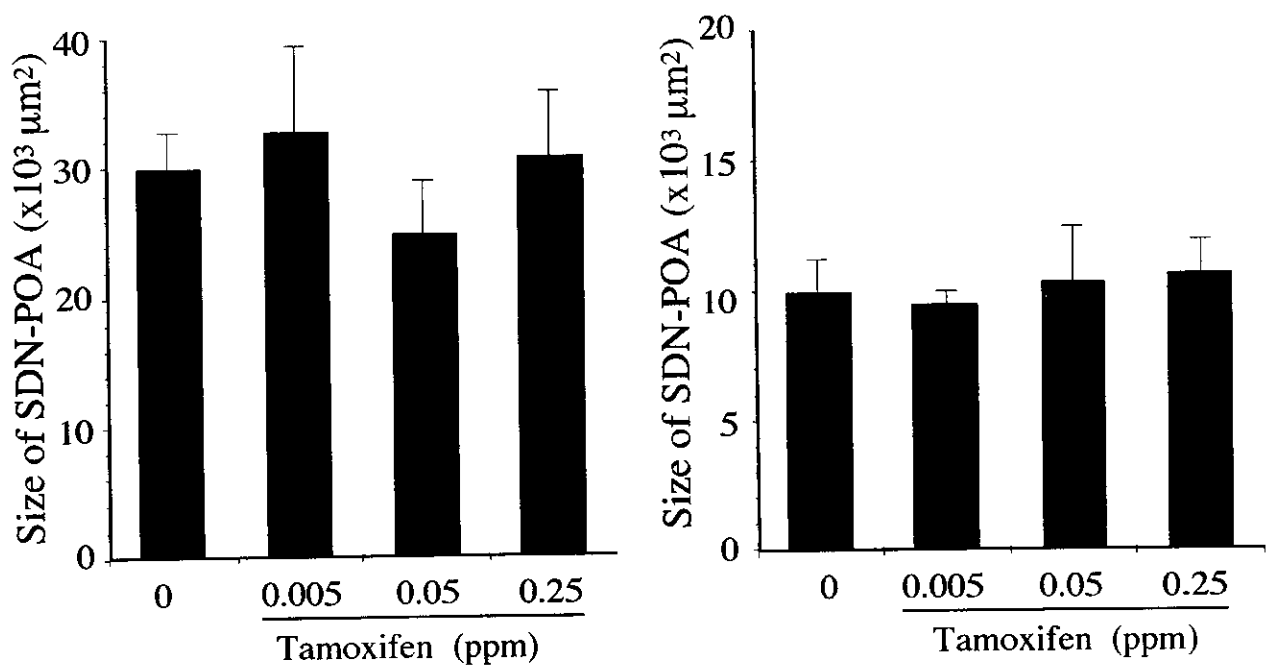


Fig. 10. Size of SDN-POA of pups perinatally exposed to tamoxifen at 11 weeks of age.

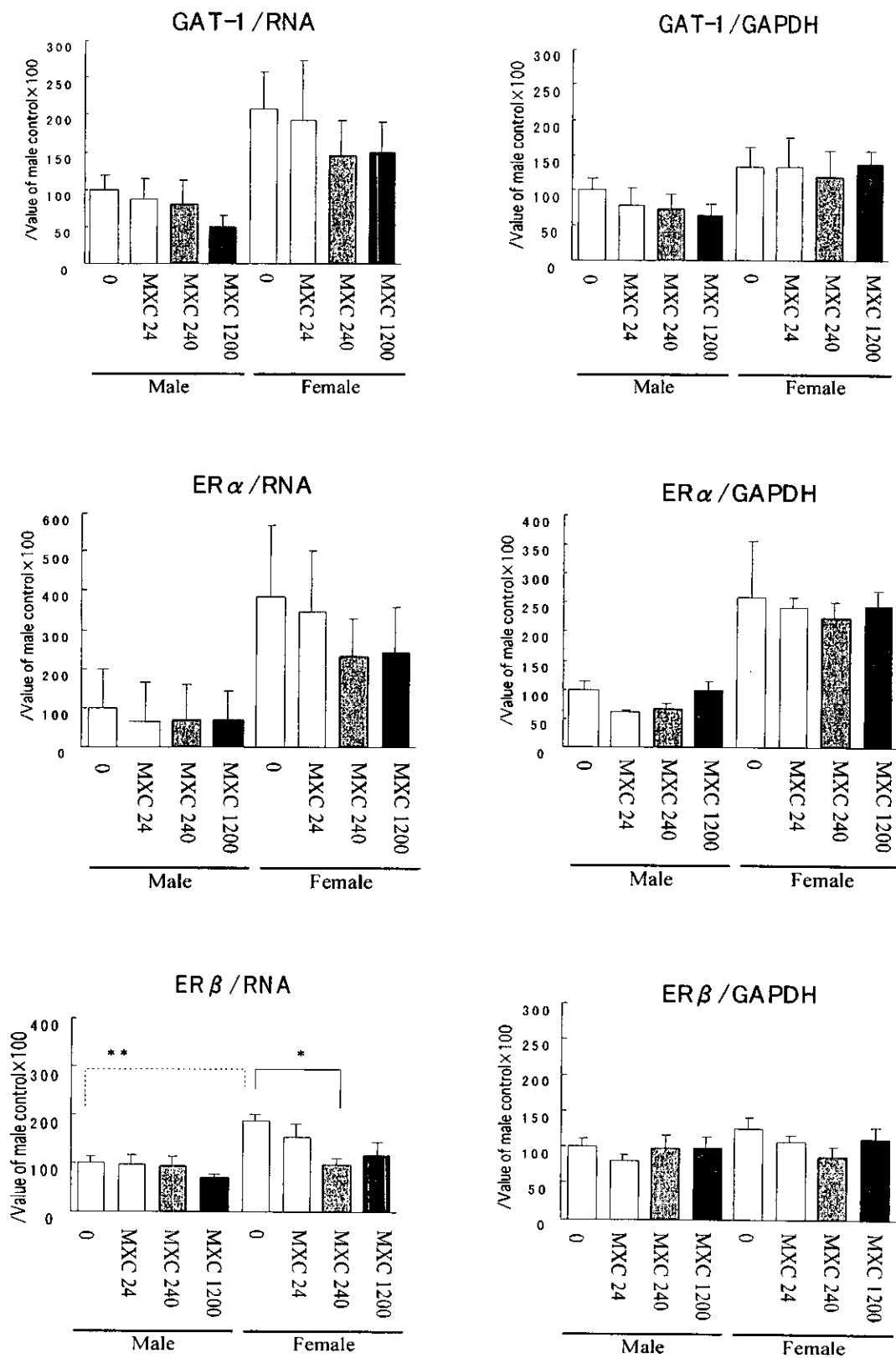


Fig. 11. Methoxychlor 周産期曝露児動物 (P10)の視床下部mPOA領域における遺伝子発現解析

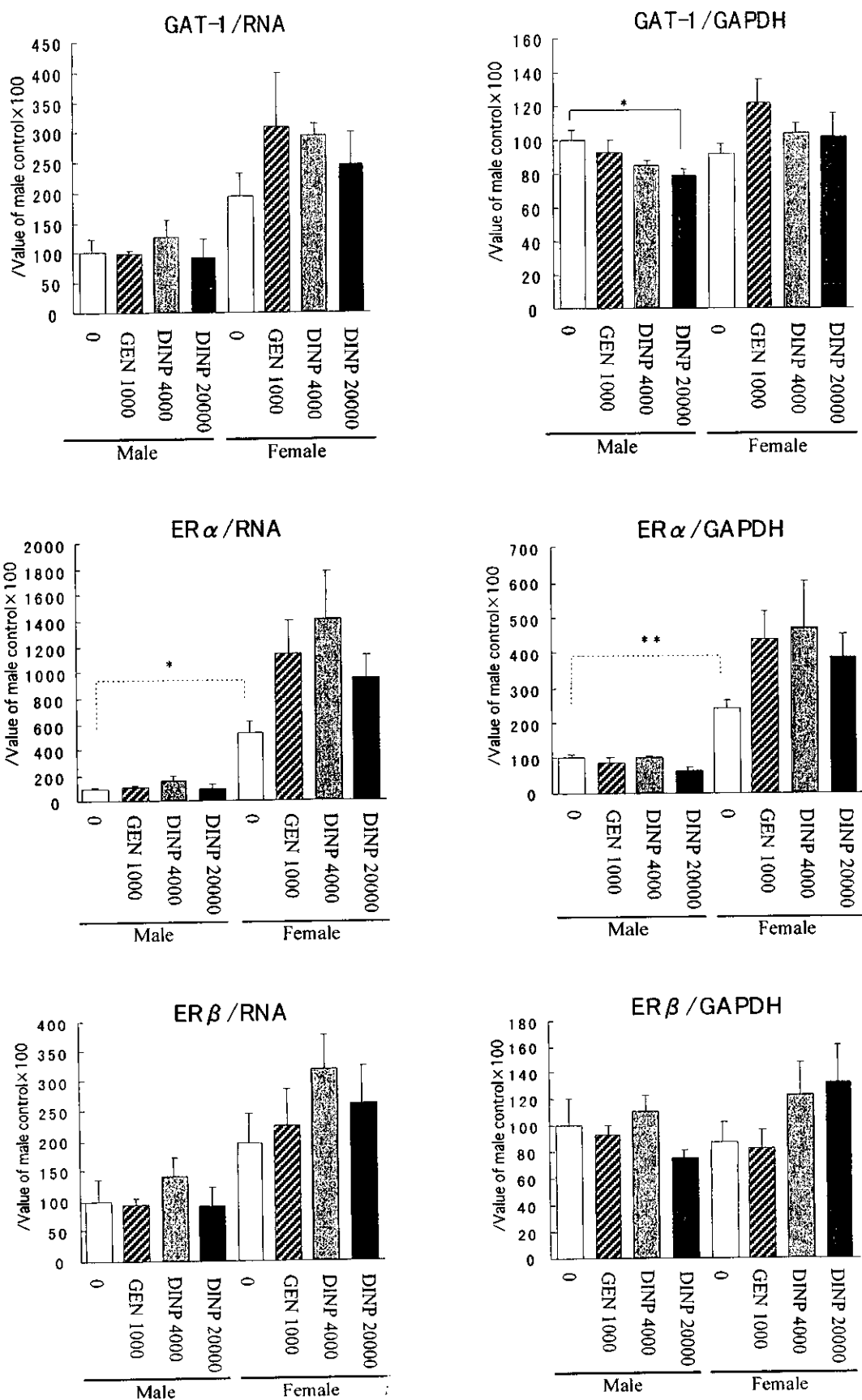


Fig. 12. Genistein 及び DINP 周産期曝露児動物(P10)の視床下部 mPOA 領域における遺伝子発現解析

TABLE 1. Data of Methoxychlor Study -From Birth to Prepubertal Necropsy-

	Methoxychlor (ppm)			
	0	24	240	1200
No. of litters	6	6	5	6
Maternal body weight gain (g/day)				
Gestational period	13.4 ± 1.7*	14.2 ± 1.3	14.2 ± 1.1	9.9 ± 1.8**
Lactational period	5.1 ± 2.4	5.2 ± 2.4	6.2 ± 2.1	5.7 ± 1.5
Maternal food consumption (g/day)				
Gestational period	27.2 ± 2.8	28.4 ± 1.7	28.4 ± 2.5	23.7 ± 3.4
Lactational period	52.7 ± 5.0	54.7 ± 4.9	50.3 ± 5.8	44.3 ± 6.5*
Calculated maternal intake (mg/kg/day)				
Gestational period	0	1.9 ± 0.1	18.7 ± 1.7	81.4 ± 9.0
Lactational period	0	3.8 ± 0.3	35.9 ± 4.9	167.6 ± 18.1
No. of live offspring	13.4 ± 1.2	12.3 ± 1.4	13.0 ± 1.2	12.8 ± 2.7
Body weight, PD2 (g)				
Males	7.3 ± 0.6	7.9 ± 0.8	7.1 ± 0.4	6.6 ± 0.7
Females	6.9 ± 0.6	7.6 ± 0.6	6.6 ± 0.6	6.3 ± 0.8
AGD, PD2 (mm)				
Males	3.0 ± 0.3	3.2 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.0 ± 0.3
Females	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1
Body weight gain (g/day)				
Males				
PD2-PD10	1.6 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.4**
PD10-PD21	2.9 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.2 ± 0.4	2.7 ± 0.4
Females				
PD2-PD10	1.6 ± 0.3	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.4	1.0 ± 0.4**
PD10-PD21	2.9 ± 0.2	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.3	2.9 ± 0.5
Organ weights, prepubertal necropsy				
Males (No. of rats)	5	5	5	5
Body weight (g)	54.6 ± 4.9	59.1 ± 4.4	57.7 ± 7.0	45.6 ± 5.7
Brain				
Absolute (g)	1.49 ± 0.05	1.51 ± 0.14	1.46 ± 0.13	1.40 ± 0.06
Relative (g/100g BW)	2.75 ± 0.25	2.55 ± 0.23	2.55 ± 0.15	3.10 ± 0.31
Adrenals				
Absolute (mg)	20.2 ± 3.10	19.6 ± 4.51	17.0 ± 6.12	15.8 ± 1.64
Relative (mg/100g BW)	37.1 ± 5.30	33.1 ± 6.78	29.3 ± 8.81	34.8 ± 2.77
Testes				
Absolute (g)	0.25 ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.24 ± 0.03	0.17 ± 0.03**
Relative (g/100g BW)	0.47 ± 0.06	0.45 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.38 ± 0.05*
Females (No. of rats)	5	5	5	5
Body weight (g)	52.0 ± 4.0	55.7 ± 3.3	53.3 ± 2.8	48.6 ± 6.3
Brain				
Absolute (g)	1.46 ± 0.08	1.47 ± 0.09	1.47 ± 0.09	1.38 ± 0.05
Relative (g/100g BW)	2.81 ± 0.23	2.65 ± 0.09	2.77 ± 0.12	2.86 ± 0.23
Adrenals				
Absolute (mg)	16.6 ± 2.7	19.6 ± 2.3	19.6 ± 5.5	16.0 ± 4.9
Relative (mg/100g BW)	31.9 ± 4.0	35.3 ± 4.5	36.5 ± 8.2	32.8 ± 9.2
Ovaries				
Absolute (mg)	20.8 ± 4.1	15.2 ± 0.8	18.0 ± 4.1	13.4 ± 6.2
Relative (mg/100g BW)	40.5 ± 10.3	27.3 ± 1.0	34.0 ± 8.8	28.2 ± 14.2
Uterus				
Absolute (g)	30.4 ± 7.2	36.8 ± 20.0	33.0 ± 7.0	31.8 ± 8.1
Relative (g/100g BW)	58.1 ± 10.8	66.7 ± 35.4	61.8 ± 11.8	65.3 ± 14.7

* Mean ± SD

* p < 0.05 compared to controls

**p < 0.01 compared to controls

TABLE 2. Data of Methoxychlor Study – From Puberty to Final Necropsy-

	Methoxychlor (ppm)			
	0	24	240	1200
No of rats	8	8	8	8
Body weight gain (g/day)				
Males				
PD21-PD56	8.1 ± 0.6 *	8.9 ± 0.7	8.5 ± 0.4	7.5 ± 0.9
PD56-PD77	5.3 ± 0.7	6.0 ± 0.9	5.7 ± 0.9	5.6 ± 0.6
Females				
PD21-PD56	5.4 ± 0.4	5.2 ± 0.4	5.2 ± 0.8	5.2 ± 0.3
PD56-PD77	2.9 ± 0.3	2.6 ± 0.7	2.7 ± 0.7	2.6 ± 0.5
Onset of puberty				
Vaginal opening				
Age (day)	33.5 ± 0.9	34.1 ± 1.4	33.3 ± 1.5	31.5 ± 1.1**
Body weight (g)	123.9 ± 11.5	128.4 ± 13.2	115.4 ± 8.5	105.8 ± 12.6*
Preputial separation				
Age (day)	41.3 ± 1.0	40.6 ± 1.3	41.0 ± 1.3	43.3 ± 1.6*
Body weight (g)	203.2 ± 17.2	214.5 ± 20.8	210.4 ± 7.4	193.0 ± 19.6
Estrous cyclicity				
Normal	8/8	8/8	8/8	3/8
Irregular	0/8	0/8	0/8	5/8
Extended estrous	0/8	0/8	0/8	1/8
Extended diestrous	0/8	0/8	0/8	3/8
Persistent diestrous	0/8	0/8	0/8	2/8
Organ weights, final necropsy				
Males (No. of rats)	5	5	5	5
Body weight (g)	480.5 ± 24.9	500.9 ± 42.6	489.3 ± 38.4	463.0 ± 21.5
Brain				
Absolute (g)	2.08 ± 0.10	2.14 ± 0.12	2.07 ± 0.15	1.94 ± 0.11
Relative (g/100g BW)	0.43 ± 0.03	0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.04	0.42 ± 0.04
Pituitary				
Absolute (mg)	13.8 ± 2.8	13.8 ± 1.3	14.4 ± 1.8	13.0 ± 1.6
Relative (mg/100g BW)	2.86 ± 0.48	2.76 ± 0.19	2.96 ± 0.48	2.82 ± 0.40
Adrenals				
Absolute (mg)	53.2 ± 4.7	55.6 ± 12.1	58.8 ± 9.0	52.6 ± 8.9
Relative (mg/100g BW)	11.1 ± 0.7	11.1 ± 2.1	12.0 ± 1.0	11.4 ± 2.4
Testes				
Absolute (g)	3.72 ± 0.38	3.12 ± 0.30**	3.40 ± 0.18	3.17 ± 0.17*
Relative (g/100g BW)	0.78 ± 0.09	0.62 ± 0.03**	0.70 ± 0.07	0.69 ± 0.04
Prostate				
Absolute (g)	0.70 ± 0.07	0.63 ± 0.16	0.54 ± 0.11	0.55 ± 0.08
Relative (g/100g BW)	0.15 ± 0.02	0.13 ± 0.04	0.11 ± 0.02	0.12 ± 0.02
Females (No. of rats)	5	5	5	8
Body weight (g)	306.3 ± 25.7	295.1 ± 24.0	284.9 ± 56.2	293.3 ± 30.4
Brain				
Absolute (g)	1.99 ± 0.05	2.00 ± 0.05	1.92 ± 0.12	1.87 ± 0.12
Relative (g/100g BW)	0.65 ± 0.05	0.68 ± 0.07	0.69 ± 0.10	0.64 ± 0.07
Pituitary				
Absolute (mg)	16.0 ± 1.4	17.4 ± 2.5	16.6 ± 1.7	19.6 ± 4.1
Relative (mg/100g BW)	5.24 ± 0.46	5.93 ± 1.01	5.98 ± 1.14	6.81 ± 1.71
Adrenals				
Absolute (mg)	65.2 ± 6.1	68.0 ± 8.3	69.2 ± 19.0	72.6 ± 7.0
Relative (mg/100g BW)	21.4 ± 2.5	23.1 ± 2.6	24.0 ± 2.5	25.1 ± 4.2
Ovaries				
Absolute (mg)	95.2 ± 11.8	85.4 ± 4.6	94.6 ± 16.4	73.4 ± 15.8*
Relative (mg/100g BW)	31.1 ± 3.1	29.2 ± 3.7	33.4 ± 1.5	25.0 ± 4.4*
Uterus				
Absolute (g)	0.45 ± 0.06	0.48 ± 0.05	0.48 ± 0.08	0.57 ± 0.10
Relative (g/100g BW)	0.15 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03	0.20 ± 0.05

* Mean ± SD

* p < 0.05 compared to controls

** p < 0.01 compared to controls

TABLE 3. Histopathological Findings in Endocrine/Reproductive Organs at 11 weeks in Methoxychlor Study

	Methoxychlor (ppm)			
	0	24	240	1200
Males (No. of rats examined)	(5)	(5)	(5)	(5)
No abnormalities	5	5	5	5
Females (No. of rats examined)	(5)	(5)	(5)	(8)
Ovary				
- Multiple follicular cysts* ($\pm$ /+/+/+/+) ^a	0	0	0	7 (2/1/3/1)
Uterus				
- Endometrial hyperplasia ($\pm$ /+/++)	0	0	0	7 (1/3/3)
- Squamous metaplasia, endometrium (++)	0	0	0	1 (1)
Vagina				
- Mucosal hyperplasia ($\pm$ /+/++)	3 ^b (3/0/0) ^c	1 (1/0/0)	1 (1/0/0)	6 (0/1/5)
- Mucosal degeneration associated with scattered keratinization of epithelia ($\pm$ /+/+/+/+) ^a	0	0	0	4 (1/1/1/1)
Adrenal				
- Diffuse hyperplasia, cortex ($\pm$ /+/++)	3 (0/1/2)	3 (2/1/0)	4 (3/1/0)	8 (0/2/6)
Pituitary				
- Diffuse hyperplasia, anterior lobe	0	0	0	7

^a Grade of the findings; $\pm$, very slight; +, slight; ++, moderate; and +++, severe

^b Total No. of animals with each finding

^c No. of animals in each grade

* Composed mainly of atretic follicles

TABLE 4. Data of Diisononylphthalate Study - From Birth to Prepubertal Necropsy-

	Diisononylphthalate (ppm)			
	0	400	4000	20000
No. of litters	5	5	5	5
Maternal body weight gain (g/day)				
Gestational period	12.3 ± 2.1 [*]	13.3 ± 2.6	14.9 ± 2.4	5.5 ± 1.5**
Lactational period	4.8 ± 1.6	5.2 ± 2.8	5.4 ± 1.5	0.7 ± 2.9*
Maternal food consumption (g/day)				
Gestational period	26.6 ± 2.1	26.8 ± 1.7	26.9 ± 2.1	19.2 ± 2.7**
Lactational period	51.4 ± 4.2	54.2 ± 4.9	54.9 ± 3.8	40.2 ± 5.5**
Calculated maternal intake (mg/kg/day)				
Gestational period	0	30.7 ± 16.3	306.7 ± 12.8	1164.5 ± 152.9
Lactational period	0	66.2 ± 35.2	656.7 ± 35.8	2656.7 ± 462.6
No. of live offspring	11.2 ± 2.9	12.6 ± 1.5	13.0 ± 2.0	9.2 ± 3.3
Body weight, PD2 (g)				
Males	7.7 ± 0.7	7.8 ± 0.7	7.0 ± 0.9	6.5 ± 1.3
Females	7.1 ± 0.3	7.5 ± 0.6	6.6 ± 0.7	6.3 ± 1.6
AGD, PD2 (mm)				
Males	3.3 ± 0.4	3.2 ± 0.3	3.0 ± 0.1	3.0 ± 0.5
Females	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2
Body weight gain (g/day)				
Males				
PD2-PD10	1.8 ± 0.3	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2**
PD10-PD21	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.2
Females				
PD2-PD10	1.8 ± 0.4	1.6 ± 0.3	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.1**
PD10-PD21	2.6 ± 0.4	2.8 ± 0.3	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.4
Organ weights, prepubertal necropsy				
Males (No. of rats)	5	5	5	5
Body weight (g)	88.5 ± 6.4	84.4 ± 3.8	72.6 ± 7.9**	50.6 ± 7.9**
Brain				
Absolute (g)	1.63 ± 0.11	1.59 ± 0.01	1.56 ± 0.08	1.41 ± 0.06**
Relative (g/100g BW)	1.85 ± 0.13	1.89 ± 0.06	2.16 ± 0.22	2.84 ± 0.39*
Adrenals				
Absolute (mg)	20.4 ± 0.5	21.0 ± 2.5	18.0 ± 3.1	16.0 ± 4.7
Relative (mg/100g BW)	23.1 ± 1.3	25.0 ± 3.1	24.7 ± 3.0	31.5 ± 6.9
Testes				
Absolute (g)	0.56 ± 0.02	0.58 ± 0.05	0.44 ± 0.08	0.26 ± 0.06**
Relative (g/100g BW)	0.63 ± 0.03	0.67 ± 0.04	0.61 ± 0.05	0.51 ± 0.05**
Females (No. of rats)	5	5	5	5
Body weight (g)	76.7 ± 4.7	79.6 ± 5.0	75.0 ± 4.3	46.6 ± 2.4**
Brain				
Absolute (g)	1.53 ± 0.08	1.54 ± 0.08	1.54 ± 0.04	1.36 ± 0.02**
Relative (g/100g BW)	2.00 ± 0.06	1.93 ± 0.09	2.06 ± 0.11	2.92 ± 0.12**
Adrenals				
Absolute (mg)	18.4 ± 2.3	20.0 ± 3.5	20.2 ± 2.2	16.0 ± 1.1
Relative (mg/100g BW)	24.1 ± 3.4	25.0 ± 4.7	27.0 ± 2.9	34.4 ± 4.4**
Ovaries				
Absolute (mg)	24.2 ± 2.4	21.0 ± 1.9	21.8 ± 2.3	17.0 ± 2.4**
Relative (mg/100g BW)	34.3 ± 5.5	26.4 ± 2.3	29.1 ± 2.9	30.7 ± 4.9
Uterus				
Absolute (g)	48.4 ± 12.3	52.0 ± 3.1	48.0 ± 5.7	25.4 ± 4.2**
Relative (g/100g BW)	63.3 ± 16.5	65.2 ± 7.5	64.1 ± 8.2	54.8 ± 11.4

^{*} Mean ± SD

^{*} p < 0.05 compared to controls

^{**} p < 0.01 compared to controls