

図5 E RaKl mouse子宮、胎盤における血管新生制御遺伝子の発現

妊娠10.5日目の胎盤(DP)、子宮(U)における遺伝子発現を網羅的に解析した(Percellome methodを適用)データからAdm, Cyr61, Vegfaの発現を抽出し示した。青バーは野生型、赤バーはE RaKl homoのデータ。左側が子宮(U), 右側が胎盤(DP)。Admは子宮、胎盤共に低下傾向、Cyr61は胎盤で低下傾向、Vegfaには発現差が無かった。

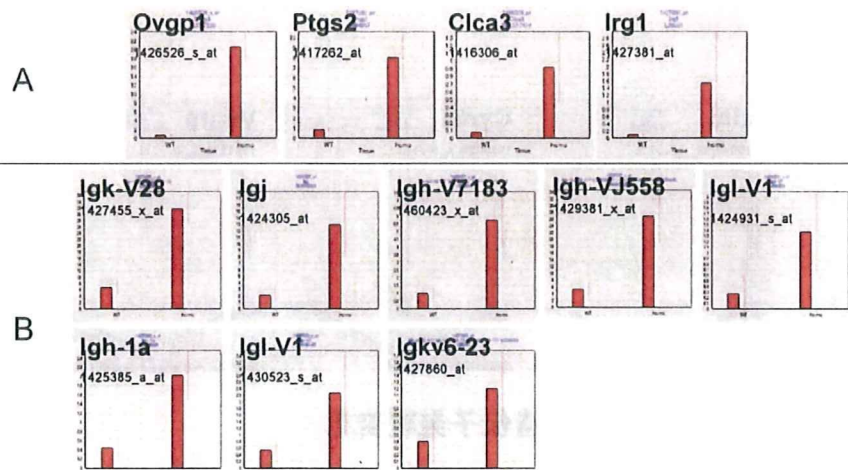


図6 E RaKl mouse子宮において発現上昇を示した遺伝子群

妊娠10.5日目の子宮における網羅的遺伝子発現解析により、E RaKl mouseにおいて発現上昇している遺伝子を抽出した。Aは特に発現上昇が大きい4遺伝子。BはImmunoglobulin遺伝子群。

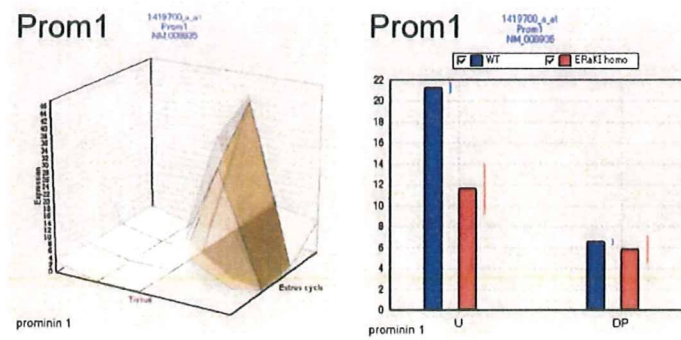


図7 Prominin1発現変化

性周期データでProminin1の発現が発情期をピークに変動していることが見出された(左図)。ERaKIでの発現を検討した結果、子宮で発現が半減していた(右図)。

14. 確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた
内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

分担研究者 高木 篤也

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 室長

研究要旨

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことである。内分泌かく乱化学物質は神経系、特に行動に対して持続的な影響を及ぼすことが報告されており、本研究班でも特に重視されている。一方で、内分泌かく乱化学物質が細胞、分子レベルでいかなる作用を及ぼして神経系形成・発達をかく乱し、行動に影響を及ぼすかについては不明な点が多い。そこで本研究テーマでは、神経系形成・発達において中心的な役割を果たす神経幹細胞を標的に据えた解析を行い、暴露により引き起こされる作用に関する情報を収集し確定試験開発に役立てる。本年度は、神経幹細胞分化マーカー発現を定量的に解析する In-cell western 法を導入し、BPA (Bisphenol A) の作用を検討した。その結果、BPA に神経幹細胞からのアストロサイト分化マーカーGFAP の発現を低下させる作用があることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の神経系形成・発達に対する作用を明らかにするための基盤支援研究を行うことが本研究の目的である。本研究では、具体的な生体内標的として、神経幹細胞を取り上げる。その理由は、齧歯類をモデルにした研究で、行動に持続的な影響が生じる暴露時期が胎児期および新生児期であることが示されていること、この時期は神経幹細胞が増殖、成熟し、ニューロンやグリアなどの神経系細胞を生み出す時期であり、神経幹細胞が生体内で特に重要な役割を果たしていることが明らかであるためである。実際、この時期に母親がストレスを受けるとグルココルチコイド等のホルモンの作用を介して神経系の正常な

発達が影響を受け、ストレス過敏反応などを始めとする成熟後の行動影響が現れることが多く報告されている。その際に神経幹細胞が影響を受けており、ストレスを受けると神経幹細胞の増殖が妨げられることも報告されている。すなわち、母親を取り巻く環境の胎児神経幹細胞を標的とした影響が、子の成熟後の行動影響として現れる可能性が指摘されている。

以上、内分泌かく乱化学物質が行動影響を示す胎児期、新生児期に標的となる細胞として、その時期の主役である神経幹細胞を取り上げる必要があると考え、本研究を進めている。

B. 研究方法

<マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）：自己複製能定量系>

マウス C57BL/6 胎生 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、培養系に移す。培養培地 (N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地(シグマ社製品を主に使用)にインスリン、progesterone、putrescine、apoptosis factor、selenite Na を添加したもの)) には bFGF (10ng/ml) および EGF (25 ng/ml) を添加したものをを用い、96well plate (コーニング社低接着 plate) 1well 当たり 4000 個/100 μ L の密度から生細胞を播種する。7 日間培養し、単細胞から形成される細胞増殖塊 (ニューロスフェア) の数を数え、播種細胞数に対してプロットした。

<マウス胎児神経幹細胞培養（ニューロスフェア培養）：分化能定量系>

マウス C57BL/6 胎生 11.5 日または 14.5 日目の胎児より、終脳を分離し単細胞化した後、N2/DMEM/F12 (フェノールレッド不含の DMEM/F12 培地(シグマ社製品を主に使用)にインスリン、progesterone、putrescine、apoptosis factor、selenite Na を添加したもの)) に bFGF (10ng/ml) を添加した培地を用い、ポリ-L-オルニチンおよびフィブロネクチンでコーティングした培養皿にて培養する。胎生 11.5 日由来細胞は 96well plate に 1×10^4 個/well/200 μ L 播き、胎生 14.5 日由来細胞は 4×10^6 個/dish/6mL を 9cm 径 dish に播いた。胎生 14.5 日由来細胞は bFGF 補充及び培地交換を行いつつ 4 日間培養し、神経幹細胞を増殖させ

たのち、機械的に培養皿から分離し、96well plate に 1×10^4 個/well/200 μ L 播いた。LIF 10ng/mL 存在下、BPA を濃度を振って添加し、4 日間後 4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定した後、抗 GFAP 抗体及び IRDye800CW ラベルされた抗 rabbit IgG 抗体を用いて免疫染色した。同時に DNA を SYTO60 で染色し、Odyssey を用いて蛍光量を測定し、DNA 当たりの GFAP 発現量として定量化した。

<免疫染色>

チャンバースライドにて培養した細胞を 4%ホルマリン/PBS(-)にて 15 分間固定し、一次抗体(マウス抗 MAP2, ラット抗 GFAP)、二次抗体 (FITC ラベル抗マウス IgG、Cy3 ラベル抗ラット IgG)を用い、蛍光免疫染色した。DNA は Hoechst33342 を用いて染色した。

C. 研究結果

BPA の胎児成熟神経幹細胞アストロサイト分化に対する影響検討

昨年度の研究により、BPA が 10^{-9} M、 10^{-10} M ではニューロスフェア数を増加させ、 10^{-11} M では減少させること、すなわち、神経幹細胞の自己複製に影響を与えることが明らかとなった。今年度はこれを受けて、BPA の神経幹細胞からのアストロサイト分化への影響を解析した。

神経幹細胞は胎児期に、神経細胞にしか分化しない段階から、グリア細胞にも分化しうる段階へと成熟する。胎生 11.5 日の神経幹細胞はアストロサイト分化誘導因子 LIF (Leukemia inhibitory factor) で刺激してもアストロサイト分化を示さないが、胎

生 14.5 日の神経幹細胞は LIF 刺激によりアストロサイト分化を示す。この成熟過程には DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御が関わっていることが示されており、胎生 11.5 日にはアストロサイトマーカーとしても用いられる GFAP のプロモーターに存在する STAT3 結合部位がメチル化されているため、LIF で活性化され核に移行した STAT3 が DNA に結合できずアストロサイトに分化出来ないが、胎生 14.5 日には脱メチル化され分化できるようになることが分かっている。

分化影響を検討するために、マーカートンパク質の発現を定量化できる実験系として、赤外蛍光色素による In-cell western 系を導入した。この系では、96well plate にて培養した細胞をそのまま免疫染色し、タンパク質発現量を定量化することができる。そこで、胎生 11.5 日または 14.5 日の胎児終脳から神経幹細胞を培養し、LIF 存在下、 10^{-13}M ~ 10^{-7}M までの BPA 影響を検討した (図 1)。

胎生 11.5 日由来神経幹細胞は、アストロサイト分化能を持たないことを反映し、LIF による GFAP 発現上昇を示さなかった。一方で、胎生 14.5 日由来神経幹細胞は LIF 濃度依存的に GFAP 発現上昇を示した。

BPA は胎生 11.5 日由来神経幹細胞に対しては影響を示さなかったが、胎生 14.5 日由来神経幹細胞に対しては、濃度依存的に GFAP 発現抑制作用を示した。この結果を免疫蛍光染色顕微鏡観察により形態的に検討したところ、 BPA^{-9}M で確かに GFAP 発現細胞数が減少していることが明らかとなった (図 2)。

D. 考察

本年度は BPA の神経幹細胞アストロサイト分化への影響を検討し、BPA が胎生 14.5 日由来神経幹細胞のアストロサイト分化を抑制する作用を有することを示す結果を得た。一方で、胎生 11.5 日由来神経幹細胞には影響を与えなかった。これらの結果は、BPA が LIF シグナル系に作用し、アストロサイト分化抑制を引き起こす可能性を示唆すると同時に、BPA には胎児神経幹細胞の成熟を早める作用はない可能性を示唆するものと解釈できる。昨年度の検討により、BPA が成熟後神経幹細胞の自己複製に影響を与えることが明らかとなっている。これらの結果を合わせると、BPA には成熟後の神経幹細胞機能に影響を与える可能性があると考えられる。

E. 結論

本研究により確立された神経幹細胞機能定量系を用い、BPA が成熟後の胎児神経幹細胞に影響を与えることが示唆された。それが胎児期のみの一時的な結果なのか、大人になってからの神経幹細胞の性質にも及ぶ影響として残るのか検討する必要があるが、この知見は神経系に関する内分泌かく乱性確定試験法の開発に有用な情報であると考えられる。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Percellome Project による毒性トランスク

リプトミクスの新しい試み、菅野 純、北
嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、
高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、細胞工学、
26、71-77、2007

年会、2005年6月、東京

H. 知的財産所有権の出願、登録状況
特になし

2.学会発表

Percellome 手法を用いたマウス ES 細胞分
化系における分化マーカー遺伝子の発現パ
ターンの解析、高木篤也、北嶋聡、中津則
之、五十嵐勝秀、相崎健一、菅野純、第 33
回日本トキシコロジー学会学術年会、2006
年7月、名古屋

Global gene expression profiling in mouse
embryonic stem cells and embryoid bodies.
A. TAKAGI, S. KITAJIMA, N. NAKATSU,
K. IGARASHI, K. AISAKI AND J. KANNO, 20th
International Congress of Biochemistry
and Molecular Biology, 2006年6月、京
都

Effects of TCDD on mouse embryonic stem
cells in culture. A. Takagi and J. KANNO.
45th Annual Meeting of Society of
Toxicology, USA, 2006年3月

マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマ
イクロアレイ解析、高木篤也、中津則之、
五十嵐勝秀、菅野純、第 28 回日本分子生物
学会、2005年12月、福岡

発生毒性解析のための無血清培地を用いた
マウス ES 細胞培養系の検討、高木篤也、菅
野純、第 32 回日本トキシコロジー学会学術

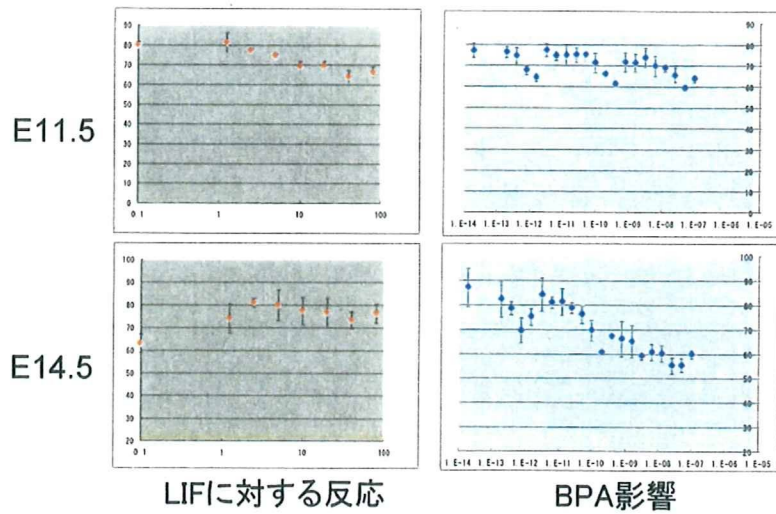


図1 BPAの胎児神経幹細胞からのアストロサイト分化に対する影響

LIF 10ng/mL共存下、 $10^{-13}M \sim 10^{-7}M$ までのBPAのアストロサイト分化影響を調べた。胎生11.5日(E11.5)由来神経幹細胞への影響は認められなかったが、胎生14.5日(E14.5)由来神経幹細胞に於いては、BPAがGFAP発現を抑制する結果が得られた。

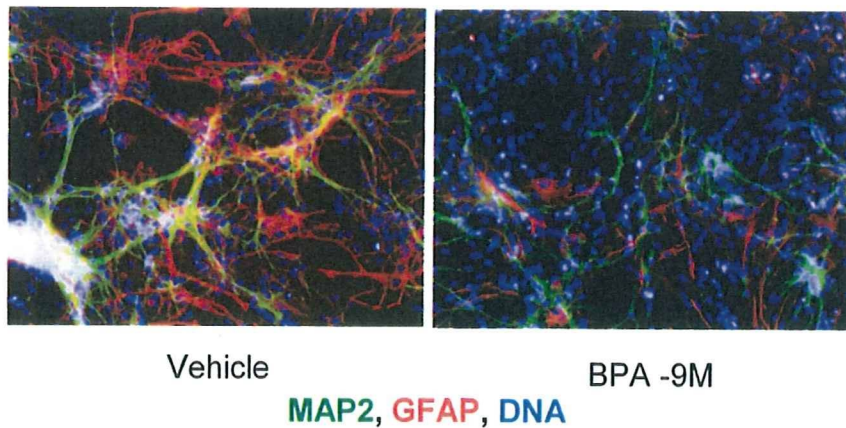


図2 BPAの胎児神経幹細胞からのアストロサイト分化に対する影響

図1で認められたBPAのアストロサイト分化影響を、神経系マーカーを蛍光免疫染色し顕微鏡観察した。胎生14.5日(E14.5)由来神経幹細胞に対し、 $10^{-9}M$ BPAがGFAP発現を抑制する結果が確認された。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発〉

15. Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による

卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

分担研究者 松島 裕子

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 主任研究官

研究要旨

本研究は、げっ歯類の周産期エストロゲン低用量暴露による雌性生殖器の晩発影響を検出する試験系の開発を目的とする。

エストロゲンの哺乳類への影響は、成長した個体と、発生・分化途上の周産期の個体とでは、その効果は著しく異なる。成熟した個体に対しては、微弱な可逆作用でも、周産期の個体に対しては、強力にかつ不可逆的に障害を起こす可能性がある。

周産期における比較的 low 用量暴露の影響を報告したものとして、Newbold らによる CD-1 マウス PND(postnatal day) 1~5 の DES 暴露が、離乳時子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。H16~17 の本研究として Newbold らの追試を行い、そのデータを詳細に解析した結果、周産期 DES 投与により未成熟子宮肥大反応の減弱、子宮内膜 reserve cell hyperplasia の発生、子宮腺の減少、多卵性卵胞の発生がみられた。特に、多卵性卵胞の発生は、周産期 DES 0.001 μ g/kg 皮下投与から対照群に比し有意に増加し、内分泌かく乱化学物質検出の良い指標となると考えられた。一方、CD-1 マウスの対照群にはみられなかった多卵性卵胞が、エストロゲン高感受性である C57BL/6 マウスの対照群全例にみられ、飼料中の植物性エストロゲンが少なからず関与していると考えられた。飼料中植物性エストロゲンの胎生期・新生時期暴露による仔動物への影響を検討した結果、CRF1 は PLD (phytoestrogen low diet) に比し出生時の雌雄仔の体重及び多卵性卵胞の発生が有意に増加した。更に、ヒトの通常暴露経路を想定し、DES の新生児皮下投与を母親への経口投与による経母乳に変え、子宮、卵巣への影響を検討した。

A. 研究目的

本研究はげっ歯類の周産期エストロゲン低用量暴露による雌性生殖器の晩発影響を検出する試験系の開発を目的とする。

低用量で実験を行うことを念頭に基礎データとして①実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物に及ぼす影響を検討する。CRF1 あるいは PLD (phytoestrogen low diet)

を用い、飼料中の植物性エストロゲンの経胎盤・経母乳による多卵性卵胞の発生と、出産・性比・出生時体重等、仔動物への影響を検討する。

また、ヒトの通常の暴露経路を想定し、

②B57BL/6 マウス新生時期 DES 経母乳暴露による雌性生殖器への晩発影響を検討する。

これまでの B57BL/6 マウス新生児 DES 皮下投与を、母親への経口投与による経母乳暴露に変え、子宮、卵巣への晩発影響を検討する。

B. 研究方法

①実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物に及ぼす影響を検討する

5 週齢の雌雄 C57BL/6Crslc (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷直後より交配までの 3 週間 CRF1 あるいは PLD 飼料で飼育した。更に交配後、プラグが確認された雌は妊娠期間及び授乳期間中引き続き CRF1 あるいは PLD 飼料を与えた。給水は水道水、給水瓶はポリカーボネート瓶・シリコン給水蓋、ケージはポリカーボネートケージ、チップは三協ラボソフトチップを用いた。

出生時に、出産数、性比、仔の体重を記録し、仔は雌雄併せて 8 匹/母となるように保育させた。雌性仔は、PND 21 に卵巣を採取し、メタカーンで固定・パラフィン包埋・連続切片・HE 染色を施し、病理組織学的検査を行った。

雄仔は、PND 30 に体重、精巣、精巣上体の重量を測定した。

②B57BL/6 マウス新生時期 DES 経母乳暴露による雌性生殖器への晩発影響を検討する

妊娠 14 日目の C57BL/6CrSlc マウス (日本エスエルシー (株)) を購入し、入荷後すぐに飼料 ; PLD、給水 ; 蒸留水・ガラス瓶・シリコン給水蓋、ケージ ; アルミケージ、床敷き ; 三協ラボソフトチップで飼育した。分娩後、雌性児を 3 あるいは 4 匹/母に分けて保育させた。

PND1~5 の 5 日間 DES の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を母動物に強制経口投与した。更に、DES あるいは EE の $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を PND17~20 (4 日間) あるいは PND17~23 (7 日間) 皮下投与し、最終投与 24 時間後エーテル麻酔下で屠殺した。子宮はホルマリン固定・パラフィン包埋・薄切・HE 染色を施し、病理組織学的に検査した。卵巣はメタカーン固定・パラフィン包埋・連続切片・HE 染色を施し、検鏡した。

C. 研究結果

①実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物に及ぼす影響を検討する

出生時の母親の体重(g、平均 \pm SD)は、CRF1(n=10)が 27.5 ± 0.8 、PLD(n=12)が 27.0 ± 1.1 で、ほぼ同じであった。

出産数/母、雄性仔、雌性仔の数は、CRF1 が 8.7 ± 1.1 、 4.6 ± 1.0 、 4.0 ± 1.4 、PLD が 8.3 ± 1.4 、 4.3 ± 1.7 、 3.7 ± 1.5 であり、ほぼ同じであった。しかし、仔の平均体重(g)は、CRF1 が雄性 1.36 ± 0.12 (n=46)、雌性 1.32 ± 0.12 (n=53)、PLD が雄性 $1.21\pm 0.11^{**}$ (n=41)、雌性 $1.14\pm 0.11^{**}$ (n=44)と、PLD の方が有意に低値であった。

多卵性卵胞の平均発生数 \pm SD は、CRF1(n=11)が 10.09 ± 4.6 、PLD (n=15) $6.07\pm 3.3^*$ と、PLD の方が有意 ($p < 0.012$) に

低値であった。

雄性 PND 30 の CRF1 (n=7)、PLD (n=5)の体重(g)は 15.3 ± 1.28 、 15.5 ± 1.35 、精巣絶対重量(mg)は 79.3 ± 15.84 、 93.6 ± 10.21 ($p < 0.05$)、精巣上体絶対重量(mg)は 18 ± 3.2 、 22.6 ± 1.14 ($p < 0.01$)と PLD で雄性生殖器の重量が高値を示した。

②B57BL/6 マウス新生時期 DES 経母乳暴露による雌性生殖器への晩発影響を検討する

子宮の reserve cell hyperplasia の発生は、DES あるいは EE 投与群ともみられなかった。マウス個体当たりの多卵性卵胞の平均発生数 \pm SD は、対照群 4 ± 1.4 (n=7)、周産期投与群 6.8 ± 3 *(n=14)と、投与群で有意($p < 0.01$)に増加した。

D. 考察

エストロゲンのほ乳類への影響は、成長した個体と発生・分化途上の周産期の個体とでは、その効果は著しく異なる。成熟した個体に対しては、微弱な可逆作用でも、周産期の個体に対しては、強力にかつ不可逆的に障害を起こす可能性がある。

1960 年代初め、高杉らが、周産期のマウスへのエストロゲン処置が後に膣や子宮頸部の癌の発生を誘発することを見出し、ヒトの母親が妊娠初期に比較的大量の DES を摂取することに対して警鐘を鳴らした。母親が妊娠初期 3 ヶ月に比較的大量の DES に暴露された際に生まれてきた女兒の膣や子宮頸部に 20 歳前後で明細胞癌が発生することの事象のモデルとして、周産期マウス暴露系が確立している。しかし、DES daughter が薬用量に於ける事象であることもあり、

従来の周産期におけるエストロゲン様化学物質の影響を検討した実験の多くが、大量投与による明瞭な影響を対象としており、本班研究で要求される実際のヒトの生活環境から暴露可能な低用量域での研究は少ない。

周産期における比較的低用量暴露の影響を報告したのものとして、Newbold らによるマウス PND1~5 の DES 暴露が、離乳時子宮肥大反応に影響を与えた事例がある。H16~17 の本研究として Newbold らの追試を行い、そのデータを詳細に解析した結果、周産期 DES 皮下投与により未成熟子宮肥大反応の減弱、子宮内膜 reserve cell hyperplasia の発現、子宮腺の減少、多卵性卵胞の発生がみられた。特に、多卵性卵胞の発生は、周産期 DES の $0.001 \mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与群から有意に増加し、内分泌かく乱化学物質検出の良い指標となると考えられた。

一方、遺伝子改変マウスを用いることを念頭に置き C57BL/6 マウスに切り替えたところ、対照群 CD-1 マウスではみられなかった多卵性卵胞が、C57BL/6 マウス対照群の全例にみられた。この事象は、Newbold ら (Biol Reprod 2002) も、Genistein を CD-1 あるいは C57BL/6 マウスに PND1~5 投与した結果、C57BL/6 マウスの方が多卵性卵胞の発生が増加したと報告している。また種々の文献により C57BL/6 はエストロゲンに対して高感受性、CD-1 マウスは低感受性であることが知られている。

Gowtter-Tong H (Environ Health perspect, 1998, 106, 369-373)は、ラット及びマウスの飼料には相当量の植物性エストロゲンが含まれている場合があり、ホルモン作用を調

べる bioassay の結果に重大な影響を及ぼす可能性があると報告している。当研究所で用いている飼育用飼料 CRF1 (オリエンタル酵母 (株)) 中の植物性エストロゲン (配糖体及びアグリコン) の分析を日本食品分析センターに依頼した結果、461mg/kg diet 含まれており、エストロゲン活性の高いアグリコン換算では、300mg/kg diet であった。これを 20g 体重のマウスが 2g/day 飼料摂取したと換算すると、30mg (アグリコン) /kg BW/day 暴露となる。CD-1 マウスにはみられなかった C57BL/6 マウスにおける多卵性卵胞の発生には飼料中の植物性エストロゲン (Genistein、Genistin、Daizein、Daizin 等) が影響の一つであろうと考えられたため、

飼料中の植物性エストロゲンの多卵性卵胞の発生への影響を検討した。CRF1 あるいは PLD を C57BL/6 マウスの交配以前～妊娠期及び授乳期間与える実験を行った結果、多卵性卵胞の発生は、CRF1 (n=11) が 10.09 ± 4.6 個、PLD (n=15) $6.07 \pm 3.3^*$ と有意 ($p < 0.012$) に発生が減少し、通常用いている飼料においてさえ多卵性卵胞の発生を有意に誘発するに十分な量の植物性エストロゲンが含有されていることが確認された。

周産期 DES の $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 経母乳暴露における多卵性卵胞の発生は、対照群 4 ± 1.4 (n=7)、投与群 6.8 ± 3 (n=14) と、有意 ($p < 0.01$) に増加し、DES の $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ はヒトの通常の暴露経路においても内分泌かく乱作用を示すことが確認された。

今回の実験では、飼料を PLD とし、ポリカーボネート給水瓶から BPA を排除するためガラス瓶・シリコン給水蓋を用い、給水

を蒸留水とし、ポリカーボネートケージからアルミケージに変え実験を行ったが、C57BL/6 マウスの多卵性卵胞の発生が 0% となるには至らなかった。これは、飼料中のまだ不明のエストロゲンの存在、床敷等のエストロゲンの影響、その他未知の物が残っているとも考えられる。低用量問題で、あるラボではがみられたが、他のラボでは再現性が得られなかったとの報告があり、再現性の差は、用いられた動物の系統のみならず、飼育環境、飼料、給水も関与していると思われる。特に、低用量を用いる内分泌かく乱化学物質の試験には、環境中の影響因子を出来るだけ排除することが望まれる。

E. 結論

比較的低用量の DES の新生児期暴露が、性成熟過程の雌性生殖器のエストロゲン感受性に変化を及ぼすことに加え、器質的にも影響を及ぼすことが示されたことから、長期観察による機能障害や発がん事象の検出の可能性、投与経路の適正化 等を検討することで、確定試験への対応が可能と成るものと期待される。

F. 健康危惧情報

無し

G. 研究発表

1) 論文発表

無し

2) 学会発表

松島裕子、菅野 純；マウス周産期の低用

量 DES 暴露が遅発性に雌性生殖器に及ぼす影響の検討、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、平成 16 年 6 月（2005）

3. その他

無し

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロゲンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会（東京）、平成 16 年 6 月（2005）

菅野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相崎健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、環境ホルモン評価法の進歩と情報の蓄積、環境ホルモン学会第 15 回公演会、平成 17 年 6 月 2 日（2005）、

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中の植物エストロジェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

山本雅也、松島裕子、五十嵐勝秀、井上 達、菅野 純；子宮におけるエストロジェン反応遺伝子の発現変化の経時的解析、第 124 回日本薬学会年会（大阪・WTC コスモタワー）、平成 16 年 3 月（2004）

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

16. 前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響の エストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

分担研究者 吉村 慎介

財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所 試験研究管理部長

研究要旨

Ethynylestradiol (EE)は *in vitro* でアンドロゲン受容体アンタゴニストであることが示されているが、Hershberger 試験を実施したところ明らかな抗アンドロゲン作用は認められず、むしろアンドロゲン作用を示唆する結果となった。これはEEの有するエストロゲン作用が影響を及ぼしていると考えられることから、エストロゲン作用の遮断を目的に ICI 182,780 (ICI)を併用投与したところ、EEに抗アンドロゲン作用はみられなかったが、精囊+凝固腺重量の増加が抑制され、アンドロゲン作用およびエストロゲン作用を有する Norgestrel (NG)による器官重量増加作用も、ICI 併用投与で軽度に抑制された。

A. 研究目的

アンドロゲンあるいは抗アンドロゲン物質に対する Hershberger 試験は、*in vitro* における情報を必ずしも反映しないことが判明しつつある。これは、アンドロゲン受容体に影響を及ぼす濃度において、無視できない程度のエストロゲン受容体活性化が同時に起きている可能性があるためと考えられる。本研究では、*in vitro* から予測されるアンドロゲンあるいは抗アンドロゲン反応が *in vivo* の雄性生殖器系において適切に観察されない状況における *in vivo* におけるシグナル伝達のクロストークを検討する。

B. 研究方法

1) EE の抗アンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

5 週齢で購入した Cr1:CD(SD) 雄ラットを 1 週間予備飼育後、麻酔下で精巣および精巣上体を摘出した。さらに 1 週間後から 10 日間、コーン油に溶解した 0 (溶媒のみ) あるいは 3 mg/kg の ICI を皮下投与後、それぞれ EE を 0、0.1 および 1 mg/kg の用量で毎日強制経口投与したのち、全例に 0.2 mg/kg の Testosterone propionate (TP)を

毎日皮下投与した。毎日、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を行い、10 日間の投与翌日に麻酔下で放血屠殺して剖検し、肝臓重量を測定したほか、前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋、陰茎亀頭および尿道球腺の重量を 0.1 M リン酸緩衝 10%ホルマリン溶液で固定後に測定した。体重、摂餌量、器官重量については EE 0 mg/kg 投与群と各 EE 投与群との間で多重比較を行った。

2) さらに高用量 EE の抗アンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

EE の Hershberger 試験における毎日の投与に先立ち、3 mg/kg の ICI を皮下投与した。EE の投与量は 0、10 および 30 mg/kg とし、ICI を投与しない EE 投与群と比較した。TP は 0.2 mg/kg を皮下投与した。その他は 1) の試験と同様の方法で実施した。

3) NG のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

ICI の 3 mg/kg を皮下投与後、NG の 0、30 および 100 mg/kg を経口投与し、ICI を投与しない NG 投与群と比較した。TP は投与

せず、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

4) EE のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験

EE の 0 (対照群)、0.1、1、10 および 30 mg/kg を経口投与した。ICI および TP は投与せず、その他は 1) の Hershberger 試験と同様の方法で実施した。

C. 研究結果

1) EE の抗アンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定 (Table 1-1、1-2)

一般状態に顕著な変化はなかった。体重は EE 投与により低値を示し、0.1 および 1 mg/kg の両投与群で有意差を示した。ICI 併用群では、EE 1 mg/kg 投与群に体重の有意な低値がみられたが、EE 0.1 mg/kg 投与群に有意な差は認められなかった。摂餌量についても同様であった。

(2) 器官重量の測定 (Table 1-3、1-4)

解剖時の体重は、ICI を併用しない EE 0.1 および 1 mg/kg 両投与群で有意な低値を示した。ICI 併用群では EE 1 mg/kg 投与群に体重の有意な低値がみられたが、EE 0.1 mg/kg 投与群に有意差はみられなかった。前立腺腹葉では、EE 0.1 mg/kg 投与群の絶対重量に有意な低値がみられたが、EE 1 mg/kg 投与群に有意差はなく、相対重量に有意差はみられなかった。ICI 併用群では前立腺腹葉の絶対および相対重量に低下傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。精囊+凝固腺では、EE 1 mg/kg 投与群の相対重量に有意な高値がみられたが、ICI 併用群ではむしろやや低下した。陰茎亀頭でも EE 1 mg/kg 投与群の相対重量に有意な高値がみられたが、ICI 併用群では有意な差はみられなかった。肝臓では EE 1 mg/kg 投与群および ICI を併用投与した EE 1 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示

した。肛門挙筋+球海綿体筋および尿道球腺重量に有意な変化はなかった。

2) さらに高用量 EE の抗アンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定 (Table 2-1、2-2)

一般状態に顕著な変化はなかった。体重および摂餌量は EE 10 および 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。ICI を併用投与した EE 10 mg/kg 投与群の 1 例は、試験途中から体重および摂餌量の急激な減少がみられたことから異常例と判断して試験データから除外した。

(2) 器官重量の測定 (Table 2-3、2-4)

解剖時の体重は EE 10 および 30 mg/kg 両投与群で有意な低値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。前立腺腹葉の絶対重量は EE 30 mg/kg 投与群、ICI を併用投与した EE 10 および 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はみられなかった。肛門挙筋+球海綿体筋の絶対重量は EE 10 および 30 mg/kg 投与群、ICI を併用投与した EE 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが、相対重量に有意な差はみられなかった。陰茎亀頭では EE 30 mg/kg 投与群の絶対重量が有意な低値を、EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示したが、ICI を併用投与した群に有意差はみられなかった。尿道球腺では ICI を併用投与した EE 30 mg/kg 投与群の絶対重量が有意な低値を示したが、相対重量に有意差はみられなかった。肝臓では EE 10 および 30 mg/kg 投与群の絶対および相対重量が有意な高値を示し、ICI 併用投与群でも同様であった。精囊+凝固腺重量に有意な差はなかった。

3) NG のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する ICI の併用効果

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定 (Table 3-1、3-2)

一般状態に顕著な変化はなく、NG 投与による体重および摂餌量への影響はみられなかった。

(2) 器官重量の測定 (Table 3-3、3-4)

NG 100 mg/kg 投与群では尿道球腺の相対重量および肝臓の絶対重量を除く各器官の絶対および相対重量が有意な高値を示したが、30 mg/kg 投与群に有意な変化はなかった。ICI の併用投与群では尿道球腺に有意な増加はみられず、他の副生殖器に有意な高値がみられたが、その程度は ICI を併用投与しない群より軽度であった。ICI の併用投与群では肝臓の絶対および相対重量に有意な変化はみられなかった。

4) EE のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験

(1) 一般状態観察、体重および摂餌量測定 (Table 4-1、4-2)

一般状態に顕著な変化はなかった。体重および摂餌量は EE 1、10 および 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示し、EE 0.1 mg/kg 投与群では摂餌量に有意な低値を示す日が見られた。

(2) 器官重量の測定 (Table 4-3、4-4)

解剖時の体重は EE 1、10 および 30 mg/kg 投与群で有意な低値を示した。前立腺では EE 30 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示し、精嚢+凝固腺では EE 30 mg/kg 投与群の絶対および相対重量、EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。肛門挙筋+球海綿体筋は EE 1 mg/kg 以上の投与群で絶対重量の有意な低値がみられたが、相対重量に有意差はみられなかった。陰茎亀頭では EE 10 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を、肝臓では EE 10 および 30 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。尿道球腺重量に有意な変化はみられなかった。

D. 考察

EE は *in vitro* の試験結果から抗アンドロゲン作用を示すことが予想されるが、抗アンドロゲン作用を検出する Hershberger 試験では器官重量の低下はみられず、精嚢+凝固腺ではむしろ有意な増加がみられた。本年度に行ったアンドロゲン作用を検出する Hershberger 試験では、前立腺および精嚢+凝固腺で重量増加がみられ、アンドロゲン作用を示唆する結果となった。これらは EE の有するエストロゲン作用が影響を及ぼしていると考えられることから、エストロゲン作用の影響を除外するために抗エストロゲン剤である ICI を併用投与した結果、精嚢+凝固腺重量の増加は抑制された。しかし、抗アンドロゲン作用を示す程度の低下はなかった。

NG は *in vitro* でアンドロゲン受容体アゴニストであることが示されており、Hershberger 試験でもアンドロゲン作用が確認されたが、同時にエストロゲン作用を有している。ICI の併用投与により、有意差は同様に認められたが器官重量の増加が軽減された。このことから、NG による雄性副生殖器の重量増加作用には、NG の有するエストロゲン作用も加わっていることが考えられる。

以上のように、ICI の併用投与でも Hershberger 試験で EE に抗アンドロゲン作用はみられなかったが、精嚢+凝固腺の重量増加は抑制され、NG による器官重量増加も抑制されたことから、Hershberger 試験の結果にエストロゲン作用が影響する可能性が示唆された。

E. 結論

ICI を併用投与した EE および NG の Hershberger 試験の結果から、Hershberger 試験にエストロゲン作用が影響する可能性が示唆された。しかし、*in vitro* から推察される EE の抗アンドロゲン作用はみられなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Yoshimura, S., Yamaguchi, H., Konno, K., Ohsawa, N., Noguchi, S., Chisaka, A.: Hypospadias and incomplete preputial separation in male rats induced by prenatal exposure to an anti-androgen, flutamide. J. Toxicol. Pathol. 17: 113-118 (2004)

Yoshimura, S., Yamaguchi, H., Konno, K., Ohsawa, N., Noguchi, S., Chisaka, A.: Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals. J. Toxicol. Pathol. 18: 141-157 (2005)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

無し

Table 1-1

Effect of ICI 182,780 on the mean body weight (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										Final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	227.4 ± 11.3 (6)	235.1 ± 11.4 (6)	242.4 ± 8.4 (6)	249.8 ± 13.3 (6)	256.5 ± 12.6 (6)	261.9 ± 13.9 (6)	270.5 ± 15.1 (6)	280.4 ± 15.6 (6)	286.1 ± 14.8 (6)	294.2 ± 16.1 (6)	300.8 ± 15.7 (6)
ICI 0 & EE 0.1 & TP 0.2	227.5 ± 8.7 (6)	229.1 ± 7.7 (6)	235.3 ± 9.7 (6)	238.2 ± 8.5 (6)	242.9 ± 9.2 (6)	246.8 ± 8.1 (6)	253.6 * ± 6.8 (6)	260.7 * ± 7.3 (6)	266.7 * ± 6.9 (6)	272.3 * ± 6.7 (6)	277.5 * ± 6.4 (6)
ICI 0 & EE 1 & TP 0.2	228.5 ± 8.0 (6)	232.5 ± 8.9 (6)	236.3 ± 9.5 (6)	235.0 ± 10.7 (6)	235.8 * ± 11.0 (6)	236.9 ** ± 10.3 (6)	241.1 ** ± 12.0 (6)	244.8 ** ± 13.5 (6)	248.4 ** ± 15.4 (6)	251.1 ** ± 13.5 (6)	254.6 ** ± 15.9 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	227.2 ± 11.1 (6)	232.4 ± 12.7 (6)	239.7 ± 13.2 (6)	244.9 ± 12.6 (6)	250.3 ± 13.2 (6)	257.4 ± 12.9 (6)	264.1 ± 15.0 (6)	273.4 ± 14.2 (6)	278.9 ± 13.4 (6)	286.0 ± 15.4 (6)	292.1 ± 16.1 (6)
ICI 3 & EE 0.1 & TP 0.2	225.7 ± 9.7 (6)	230.7 ± 10.4 (6)	237.3 ± 10.1 (6)	243.5 ± 10.7 (6)	248.6 ± 11.2 (6)	255.3 ± 10.3 (6)	262.9 ± 11.3 (6)	271.2 ± 11.2 (6)	278.9 ± 10.5 (6)	284.8 ± 11.1 (6)	291.0 ± 11.7 (6)
ICI 3 & EE 1 & TP 0.2	226.7 ± 8.7 (6)	230.2 ± 9.3 (6)	232.4 ± 8.8 (6)	233.2 ± 8.6 (6)	237.8 ± 9.0 (6)	241.7 ± 10.9 (6)	248.5 ± 11.7 (6)	254.9 ± 14.2 (6)	260.0 # ± 13.6 (6)	265.3 # ± 16.1 (6)	270.0 # ± 17.7 (6)

Table 1-2

Effect of ICI 182,780 on the mean food intake (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	23.0 ± 2.0 (6)	21.5 ± 1.2 (6)	21.0 ± 2.0 (6)	21.0 ± 2.1 (6)	21.6 ± 2.0 (6)	20.6 ± 1.8 (6)	20.9 ± 1.7 (6)	23.0 ± 2.2 (6)	22.6 ± 1.9 (6)	22.4 ± 1.3 (6)	22.7 ± 1.9 (6)
ICI 0 & EE 0.1 & TP 0.2	23.3 ± 1.1 (6)	16.5 ** ± 1.4 (6)	18.2 * ± 1.6 (6)	18.9 ± 2.0 (6)	19.4 ± 3.6 (6)	18.4 ** ± 0.9 (6)	18.5 * ± 1.1 (6)	20.1 * ± 1.2 (6)	21.1 ± 1.4 (6)	20.6 ± 1.8 (6)	20.0 * ± 1.0 (6)
ICI 0 & EE 1 & TP 0.2	23.3 ± 1.3 (6)	17.1 ** ± 1.8 (6)	15.5 ** ± 1.7 (6)	14.1 ** ± 1.4 (6)	15.0 ** ± 0.9 (6)	15.2 ** ± 0.7 (6)	14.4 ** ± 1.6 (6)	16.0 ** ± 1.8 (6)	17.6 ** ± 1.6 (6)	16.0 ** ± 1.7 (6)	16.7 ** ± 2.1 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	22.8 ± 2.0 (6)	20.9 ± 2.7 (6)	20.7 ± 2.3 (6)	20.1 ± 2.4 (6)	20.2 ± 1.7 (6)	19.7 ± 1.7 (6)	19.5 ± 2.7 (6)	21.8 ± 2.0 (6)	21.3 ± 1.3 (6)	21.1 ± 2.2 (6)	21.3 ± 2.1 (6)
ICI 3 & EE 0.1 & TP 0.2	24.8 ± 3.5 (6)	20.3 ± 2.5 (6)	20.2 ± 1.9 (6)	20.8 ± 2.8 (6)	20.1 ± 1.8 (6)	19.7 ± 2.0 (6)	20.2 ± 2.6 (6)	21.4 ± 2.2 (6)	21.8 ± 1.4 (6)	21.2 ± 2.1 (6)	21.4 ± 1.2 (6)
ICI 3 & EE 1 & TP 0.2	22.6 ± 1.0 (6)	17.5 ± 4.0 (6)	15.5 ## ± 0.9 (6)	15.4 # ± 2.3 (6)	17.6 # ± 1.4 (6)	17.1 # ± 1.6 (6)	17.3 ± 1.2 (6)	18.1 # ± 2.4 (6)	19.2 ± 2.0 (6)	19.0 ± 2.1 (6)	18.5 # ± 2.1 (6)

ICI, ICI 182,780

EE, ethynylestradiol

TP, testosterone propionate

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from ICI 0 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

#, ##, significantly different from ICI 3 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (#, p<0.05; ##, p<0.01)

Table 1-3

Effect of ICI on the absolute organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)	Liver (mg)
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	300.8 ± 15.7 (6)	129.4 ± 12.2 (6)	341.2 ± 34.0 (6)	574.2 ± 59.0 (6)	68.1 ± 4.7 (6)	36.7 ± 6.4 (6)	13732.4 ± 798.8 (6)
ICI 0 & EE 0.1 & TP 0.2	277.5 * ± 6.4 (6)	99.2 * ± 20.2 (6)	339.3 ± 78.0 (6)	504.2 ± 48.0 (6)	63.6 ± 2.5 (6)	30.5 ± 4.8 (6)	14021.2 ± 487.5 (6)
ICI 0 & EE 1 & TP 0.2	254.6 ** ± 15.9 (6)	111.3 ± 21.9 (6)	406.7 ± 48.2 (6)	502.8 ± 63.9 (6)	63.3 ± 2.4 (6)	31.9 ± 3.3 (6)	14799.6 ± 1578.4 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	292.1 ± 16.1 (6)	127.5 ± 13.2 (6)	337.2 ± 25.1 (6)	532.3 ± 33.6 (6)	64.7 ± 4.5 (6)	35.0 ± 5.3 (6)	12597.6 ± 1368.6 (6)
ICI 3 & EE 0.1 & TP 0.2	291.0 ± 11.7 (6)	110.5 ± 11.5 (6)	312.8 ± 84.7 (6)	485.0 ± 67.4 (6)	63.2 ± 3.5 (6)	29.6 ± 7.8 (6)	12813.6 ± 773.1 (6)
ICI 3 & EE 1 & TP 0.2	270.0 # ± 17.7 (6)	107.3 ± 27.8 (6)	294.6 ± 44.8 (6)	484.6 ± 40.1 (6)	62.9 ± 4.0 (6)	29.5 ± 6.9 (6)	12795.5 ± 1285.6 (6)

Table 1-4

Effect of ICI on the relative organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)	Liver (mg/g)
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	300.8 ± 15.7 (6)	0.431 ± 0.045 (6)	1.139 ± 0.149 (6)	1.911 ± 0.202 (6)	0.227 ± 0.020 (6)	0.123 ± 0.027 (6)	45.650 ± 0.703 (6)
ICI 0 & EE 0.1 & TP 0.2	277.5 * ± 6.4 (6)	0.357 ± 0.067 (6)	1.218 ± 0.255 (6)	1.815 ± 0.145 (6)	0.229 ± 0.012 (6)	0.110 ± 0.016 (6)	50.549 ± 2.186 (6)
ICI 0 & EE 1 & TP 0.2	254.6 ** ± 15.9 (6)	0.440 ± 0.102 (6)	1.597 ** ± 0.160 (6)	1.970 ± 0.163 (6)	0.249 * ± 0.012 (6)	0.126 ± 0.017 (6)	58.005 ** ± 3.007 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	292.1 ± 16.1 (6)	0.438 ± 0.051 (6)	1.161 ± 0.150 (6)	1.825 ± 0.120 (6)	0.222 ± 0.019 (6)	0.120 ± 0.019 (6)	43.053 ± 2.907 (6)
ICI 3 & EE 0.1 & TP 0.2	291.0 ± 11.7 (6)	0.380 ± 0.041 (6)	1.068 ± 0.256 (6)	1.664 ± 0.201 (6)	0.217 ± 0.011 (6)	0.101 ± 0.024 (6)	44.019 ± 1.722 (6)
ICI 3 & EE 1 & TP 0.2	270.0 # ± 17.7 (6)	0.397 ± 0.096 (6)	1.094 ± 0.172 (6)	1.797 ± 0.132 (6)	0.234 ± 0.025 (6)	0.109 ± 0.023 (6)	47.330 # ± 2.700 (6)

ICI, ICI 182,780

EE, ethynylestradiol

TP, testosterone propionate

BC muscle, bulbocavernosus muscle

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from ICI 0 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

#, significantly different from ICI 3 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (#, p<0.05)

Table 2-1
Effect of ICI 182,780 on the mean body weight (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity-detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										Final
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	246.5 ± 6.9 (6)	252.0 ± 6.2 (6)	260.3 ± 6.2 (6)	264.6 ± 7.7 (6)	271.8 ± 8.1 (6)	282.3 ± 7.8 (6)	289.8 ± 7.1 (6)	299.9 ± 8.3 (6)	308.2 ± 9.1 (6)	317.8 ± 12.2 (6)	324.3 ± 13.6 (6)
ICI 0 & EE 10 & TP 0.2	242.0 ± 6.0 (6)	247.4 ± 6.8 (6)	248.5 ± 7.6 (6)	246.6 ** ± 6.6 (6)	247.4 ** ± 6.7 (6)	247.9 ** ± 7.3 (6)	251.3 ** ± 8.0 (6)	253.6 ** ± 9.4 (6)	255.6 ** ± 11.2 (6)	258.0 ** ± 12.6 (6)	259.5 ** ± 13.0 (6)
ICI 0 & EE 30 & TP 0.2	247.0 ± 7.9 (6)	251.0 ± 11.8 (6)	250.1 ± 12.0 (6)	245.6 ** ± 10.3 (6)	246.4 ** ± 11.8 (6)	246.0 ** ± 12.7 (6)	247.3 ** ± 14.2 (6)	248.9 ** ± 15.7 (6)	250.3 ** ± 16.3 (6)	251.9 ** ± 17.8 (6)	253.5 ** ± 17.9 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	244.1 ± 4.5 (6)	250.2 ± 5.6 (6)	259.0 ± 5.6 (6)	264.6 ± 6.6 (6)	271.0 ± 7.2 (6)	277.9 ± 9.1 (6)	285.1 ± 9.2 (6)	291.7 ± 9.6 (6)	300.7 ± 11.1 (6)	305.8 ± 10.3 (6)	313.3 ± 12.1 (6)
ICI 3 & EE 10 & TP 0.2	246.3 ± 8.6 (5)	253.4 ± 11.0 (5)	251.5 ± 11.8 (5)	251.1 # ± 13.2 (5)	251.4 ## ± 11.4 (5)	253.6 ## ± 13.0 (5)	253.9 ## ± 13.7 (5)	259.4 ## ± 12.5 (5)	262.3 ## ± 14.3 (5)	264.6 ## ± 15.2 (5)	267.1 ## ± 16.2 (5)
ICI 3 & EE 30 & TP 0.2	244.4 ± 6.8 (6)	253.7 ± 7.6 (6)	252.5 ± 6.6 (6)	250.2 # ± 4.9 (6)	251.6 ## ± 6.9 (6)	253.1 ## ± 6.4 (6)	255.4 ## ± 7.1 (6)	257.3 ## ± 7.6 (6)	260.6 ## ± 6.1 (6)	260.8 ## ± 7.6 (6)	260.8 ## ± 9.4 (6)

Table 2-2
Effect of ICI 182,780 on the mean food intake (g) in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Administration period (day)										
	0-1	1-2	2-3	3-4	4-5	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	25.9 ± 1.6 (6)	22.1 ± 1.2 (6)	23.2 ± 1.6 (6)	21.6 ± 5.3 (6)	21.1 ± 1.8 (6)	23.0 ± 1.6 (6)	23.1 ± 2.2 (6)	23.9 ± 2.3 (6)	23.3 ± 1.0 (6)	24.6 ± 1.1 (6)	23.1 ± 1.0 (6)
ICI 0 & EE 10 & TP 0.2	24.2 ± 1.3 (6)	18.5 ± 3.2 (6)	15.5 ** ± 1.2 (6)	13.1 ± 1.4 (6)	13.5 ** ± 2.0 (6)	12.4 ** ± 1.3 (6)	14.1 ** ± 1.9 (6)	14.2 ** ± 0.4 (6)	13.7 ** ± 1.6 (6)	15.1 ** ± 2.2 (6)	14.9 ** ± 1.3 (6)
ICI 0 & EE 30 & TP 0.2	24.8 ± 2.3 (6)	19.3 ± 3.2 (6)	13.7 ** ± 1.9 (6)	12.2 ± 2.0 (6)	12.2 ** ± 2.9 (6)	11.2 ** ± 2.7 (6)	13.2 ** ± 2.6 (6)	13.1 ** ± 2.9 (6)	13.1 ** ± 1.9 (6)	14.2 ** ± 3.1 (6)	14.2 ** ± 2.7 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	24.8 ± 1.8 (6)	22.6 ± 2.1 (6)	22.8 ± 1.6 (6)	22.1 ± 2.4 (6)	21.8 ± 1.8 (6)	20.7 ± 2.8 (6)	22.7 ± 1.2 (6)	22.4 ± 2.3 (6)	22.7 ± 3.1 (6)	22.2 ± 1.2 (6)	23.6 ± 2.7 (6)
ICI 3 & EE 10 & TP 0.2	25.6 ± 2.5 (5)	19.7 ± 3.5 (5)	15.8 ## ± 1.8 (5)	14.7 ## ± 1.6 (5)	14.9 ## ± 1.3 (5)	14.0 ## ± 1.0 (5)	13.8 ## ± 1.4 (5)	16.6 ## ± 1.9 (5)	15.5 ## ± 2.1 (5)	15.3 ## ± 2.3 (5)	15.1 ## ± 2.3 (5)
ICI 3 & EE 30 & TP 0.2	25.6 ± 2.1 (6)	22.5 ± 2.0 (6)	15.5 ## ± 1.7 (6)	14.3 ## ± 1.2 (6)	15.2 ## ± 1.3 (6)	13.6 ## ± 1.9 (6)	14.3 ## ± 1.8 (6)	14.6 ## ± 2.3 (6)	15.4 ## ± 1.4 (6)	15.4 ## ± 2.0 (6)	14.1 ## ± 2.5 (6)

ICI, ICI 182,780

EE, ethynylestradiol

TP, testosterone propionate

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from ICI 0 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01)

#, ##, significantly different from ICI 3 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (#, p<0.05; ##, p<0.01)

Table 2-3

Effect of ICI on the absolute organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg)	Levator ani & BC muscle (mg)	Glans penis (mg)	Cowper's gl. (mg)	Liver (mg)
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	324.3 ± 13.6 (6)	123.7 ± 7.1 (6)	346.3 ± 16.8 (6)	590.5 ± 47.7 (6)	65.9 ± 2.4 (6)	32.8 ± 5.2 (6)	14126.5 ± 1293.2 (6)
ICI 0 & EE 10 & TP 0.2	259.5 ** ± 13.0 (6)	107.5 ± 12.2 (6)	380.3 ± 66.3 (6)	493.3 ** ± 25.9 (6)	60.9 ± 3.3 (6)	31.3 ± 3.2 (6)	18719.7 * ± 3673.7 (6)
ICI 0 & EE 30 & TP 0.2	253.5 ** ± 17.9 (6)	93.5 ** ± 15.9 (6)	352.5 ± 89.9 (6)	467.6 ** ± 52.0 (6)	58.5 * ± 6.5 (6)	32.6 ± 8.3 (6)	18529.0 * ± 1884.5 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	313.3 ± 12.1 (6)	122.9 ± 8.2 (6)	346.9 ± 63.4 (6)	558.1 ± 17.8 (6)	67.4 ± 3.3 (6)	34.5 ± 5.1 (6)	13254.7 ± 1425.4 (6)
ICI 3 & EE 10 & TP 0.2	267.1 ## ± 16.2 (5)	105.3 # ± 5.5 (5)	377.8 ± 59.8 (5)	505.5 ± 46.6 (5)	58.5 ± 5.9 (5)	33.5 ± 4.2 (5)	15336.0 # ± 1790.0 (5)
ICI 3 & EE 30 & TP 0.2	260.8 ## ± 9.4 (6)	90.2 ## ± 14.2 (6)	340.2 ± 54.2 (6)	448.6 ## ± 39.0 (6)	59.1 ± 8.9 (6)	26.8 ## ± 2.5 (6)	16904.3 ## ± 774.6 (6)

Table 2-4

Effect of ICI on the relative organ weight in Hershberger assay of ethynylestradiol for anti-androgenic activity detection in rats

Group (mg/kg)	Final body weight (g)	Ventral prostate (mg/g)	Seminal v. & Coagulating gl. (mg/g)	Levator ani & BC muscle (mg/g)	Glans penis (mg/g)	Cowper's gl. (mg/g)	Liver (mg/g)
ICI 0 & EE 0 & TP 0.2	324.3 ± 13.6 (6)	0.382 ± 0.030 (6)	1.070 ± 0.071 (6)	1.823 ± 0.153 (6)	0.204 ± 0.014 (6)	0.102 ± 0.020 (6)	43.493 ± 2.360 (6)
ICI 0 & EE 10 & TP 0.2	259.5 ** ± 13.0 (6)	0.415 ± 0.049 (6)	1.474 ± 0.307 (6)	1.907 ± 0.170 (6)	0.235 * ± 0.019 (6)	0.121 ± 0.015 (6)	71.766 ** ± 11.295 (6)
ICI 0 & EE 30 & TP 0.2	253.5 ** ± 17.9 (6)	0.368 ± 0.055 (6)	1.397 ± 0.367 (6)	1.844 ± 0.152 (6)	0.231 ± 0.025 (6)	0.128 ± 0.031 (6)	73.010 ** ± 4.070 (6)
ICI 3 & EE 0 & TP 0.2	313.3 ± 12.1 (6)	0.392 ± 0.015 (6)	1.109 ± 0.211 (6)	1.783 ± 0.082 (6)	0.215 ± 0.011 (6)	0.111 ± 0.020 (6)	42.217 ± 2.964 (6)
ICI 3 & EE 10 & TP 0.2	267.1 ## ± 16.2 (5)	0.396 ± 0.038 (5)	1.419 ± 0.237 (5)	1.894 ± 0.138 (5)	0.219 ± 0.017 (5)	0.126 ± 0.020 (5)	57.350 ## ± 4.427 (5)
ICI 3 & EE 30 & TP 0.2	260.8 ## ± 9.4 (6)	0.346 ± 0.053 (6)	1.303 ± 0.195 (6)	1.721 ± 0.154 (6)	0.227 ± 0.036 (6)	0.103 ± 0.011 (6)	64.853 ## ± 3.223 (6)

ICI, ICI 182,780

EE, ethynylestradiol

TP, testosterone propionate

BC muscle, bulbocavernous muscle

Value, mean ± S.D.; (), number of animals measured

*, **, significantly different from ICI 0 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (*, p<0.05; **, p<0.01);

#, ##, significantly different from ICI 3 mg/kg & EE 0 mg/kg & TP 0.2 mg/kg group (#, p<0.05; ##, p<0.01)