

ful by these and other investigators including the ventral prostate (Deanesly and Parkes, 1936; Dingemans et al., 1935; Korenchevsky, 1932; Korenchevsky et al., 1932, 1933a,b), the seminal vesicles and coagulating glands (Deanesly and Parkes, 1936; Dingemans et al., 1935; Korenchevsky, 1932; Korenchevsky et al., 1932, 1933a,b), the preputial glands (Bülbring and Burn, 1935; Korenchevsky, 1932; Korenchevsky et al., 1932, 1933a,b), Cowper's glands (Wainman and Shipounoff, 1941), and the glans penis (Bülbring and Burn, 1935; Dingemans et al., 1935; Korenchevsky, 1932; Korenchevsky et al., 1932, 1933a,b). In the 1940s, it was discovered that the levator ani and bulbocavernosus muscles also responded to androgens, but in a differential way from the other tissues (Wainman and Shipounoff, 1941; Eisenberg et al., 1949; Eisenberg and Gordan, 1950). The basis for this differential sensitivity is the presence of 5 $\alpha$ -reductase in most accessory tissues of the male reproductive tract, but its absence in the muscle complex (Di Salle et al., 1994). The capabilities of the assay were demonstrated in 1953 by Hershberger et al. when they analyzed the response of the ventral prostate, seminal vesicles and coagulating glands, and the levator ani without the bulbocavernosus muscle to a number of active chemicals, including estrogens and progesterones (Hershberger et al., 1953).

In the 1970s and 1980s, with the discovery of the androgen receptor and the first compounds such as cyproterone acetate that were antagonists of the receptor, the assay was modified to address antagonistic activity. Briefly, a set dose of a reference agonist was coadministered to several groups of animals to whom a set of doses of the purported antagonist was also administered. This modified system was successfully used by several investigators for assaying androgen antagonists (Peets et al., 1973; Raynaud et al., 1980, 1984; Wakeling et al., 1981).

Therefore, based upon the recommendation of scientific workshops, both the US Endocrine Disrupter Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) (USEPA, 1998) and the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment Group (EDTA) of the OECD (OECD, 2000) have proposed this assay as a Tier-1 screen to identify possible reproductive and developmental toxicants acting through androgen agonist and antagonist mechanisms.

The OECD Phase 1 validation program for the Hershberger assay was completed in 2001. In this phase, a standardized protocol using the ventral prostate, the seminal vesicles with coagulating glands, the levator ani and bulbocavernosus muscle complex (LABC), Cowper's glands, and the glans penis was successfully tested against a reference androgen compound, testosterone

propionate (TP), and a reference antagonist, flutamide (OECD, 2002). The OECD proposed a Phase 2 validation program using additional androgen agonistic and antagonists as the next step to validate the assay, but the final results of Phase 2 studies were not opened by the OECD.

Recently, the OECD conducted a Phase 3 validation program as a final blind study using coded agonistic and antagonistic chemicals (OECD, 2003). In Phase 3, the coded test substances were to be used to investigate the reliability of the assay, including a demonstration of the protocol's transferability among laboratories and the reproducibility of the protocol's results. Three Japanese laboratories participated in the Phase 3 validation study using four coded agonistic test substances and seven antagonistic substances. The participation of the laboratories in the OECD Phase 3 validation study was performed as part of a national validation program in Japan.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Laboratories

The three participating Japanese laboratories were: the Chemicals Evaluation and Research Institute (CERI); the Food Drug Safety Center; and the Japan Bioassay Research Center. Each laboratory performed the study in compliance with the principles of Good Laboratory Practice guidelines.

### 2.2. Test substance

All coded test substances except for TP were sent to each laboratory from a centralized chemical repository at TNO, Zeist, the Netherlands. TP and corn oil as vehicles were prepared in each laboratory. The coded substances A, B, L and E were used in the agonistic version, and F, G, I, C, K, D and H were used in the antagonistic version. We did not receive any information regarding the coded substances before all tests were started.

### 2.3. Animals

Laboratory details regarding rat strain, age of castration, age at start of dosing, day of autopsy, animal diet, and the number of animals housed per cage are summarized in Table 1. Two laboratories used Crj:CD (SD) rats castrated at 6-weeks old, and the test substances were administered 1 week after castration. One laboratory used Brl Han: WIST Jcl (GALAS) rats castrated at 6-weeks old, and the test substances were administered 2 weeks after castration. In all the laboratories, the rats were weighed, weight-ranked, and assigned randomly to each of the experimental and control groups after they had recovered from their operation. Body weight and clinical signs were recorded daily throughout the study. Rats were provided with water and



Table 1

Laboratory detail for rat strain, age of castration, age at start of dosing, day of autopsy, animal diet, and the number of animals housed per cage

Lab	Rat strain	Age of castration	Age at start of dosing	Day of autopsy	Diet	Number of rats per cage
1	Brl Han: WIST Jcl (GALAS) <sup>a</sup>	6-weeks old	8-weeks old	10-weeks old	MF <sup>b</sup>	3
2	Crj:CD (SD) <sup>c</sup>	6-weeks old	7-weeks old	9-weeks old	CE-2 <sup>d</sup>	1
3	Crj:CD (SD) <sup>c</sup>	6-weeks old	7-weeks old	9-weeks old	CRF-1 <sup>d</sup>	1

<sup>a</sup> Clear Japan Inc., Tokyo, Japan.<sup>b</sup> Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan.<sup>c</sup> Charles River Japan, Kanagawa, Japan.<sup>d</sup> Clear Japan Inc.

a commercial diet ad libitum. The animals were kept under SPF conditions. All animals were cared for according to the principles outlined in the guide for animal experimentation prepared by The Japanese Association for Laboratory Animal Science.

#### 2.4. Administration

We performed each test according to the protocol proposed by the OECD (OECD, 2000, 2002, 2003). Each test substance was orally administered via a stomach tube for 10 consecutive days at approximately the same time each day. A vehicle control group receiving only corn oil was used in both versions. For the antagonistic version, 0.2 mg/kg/day of TP was coadministered each day by subcutaneous injection in the dorsal region after the oral administration of each chemical. The volume of the corn oil solution containing the TP was 0.5 ml/kg. In the agonistic version, a positive control group of animals received TP injections alone. The group size in all cases was six rats. The volume of the corn oil solutions containing each of the test chemicals was 5 ml/kg. The animals were killed by bleeding from the abdominal vein under deep ether anesthesia approximately 24 h after receiving their final dosage. The five mandatory tissues, the ventral prostate and fluid, seminal vesicle and fluid, LABC, glans penis, and Cowper's gland, were carefully dissected free of adhering fat and weighed to the nearest 0.1 mg. We also weighed the liver in three laboratories, and paired kidney and adrenal weights were measured in one laboratory.

#### 2.5. Statistical analysis

We received the information from the coordinator of this Phase 3 validation after all tests were finished that the participating laboratories received pairs of the test chemicals (i.e. L and E, F and G, I and C, or K and D), so we analyzed the data using the following analytical methods between the vehicle control group and the same chemical groups in the agonistic version, and the TP group and the same chemical groups in the antagonistic version. In addition, coded A and F were nonylphenol, B and G were dinitrophenol, E and L were trenbolone, C and I were *p,p'*-DDE, and D and K were linurone. Body weight and organ weight data were analyzed by Bartlett's test for homogeneity of variance. When the variance

was homogeneous at a significance level of 5%, one-way analysis of variance was performed. If a significant difference was found, the difference between the control group/TP group and each of the dosage groups was analyzed with Dunnett's test. If the variance was not homogeneous, the Kruskal–Wallis test was used. If a significant difference was found, the difference between the control group/TP group and each of the dosage groups was analyzed by the non-parametric Dunnett's test. On the other hand, differences in body weight and organ weight between the control group and the TP group, coded A or B in the agonistic version and between TP group and the group using coded H, G or F in the antagonistic version were assessed for statistical significance by the two-tailed Student's *t*-test. For graphical presentation, the sex accessory organ data were normalized to visually compare the shapes of the responses produced by each laboratory. For this normalization, the control value was set to 100% in the agonistic study, and 100% in the TP without coded compound in the antagonistic study. Analyses of variance were performed on the data from each laboratory and for the pooled laboratory data; these normalized values were not analyzed statistically.

### 3. Results

#### 3.1. Agonistic version

##### 3.1.1. Body weights, clinical observations, and optional organ weights

The body weights and the optional organ weight changes are shown in Table 2. Terminal body weights in rats given L were significantly lower than in rats given vehicle alone in Labs 2 and 3, and tendency towards lowering of the terminal body weights was observed in Lab 1. No abnormal clinical signs were observed in any of the rats that were treated with each substance. The paired kidney weights in rats given substance A and TP were significantly higher than in rats given only the vehicle in Lab 3, and the liver weights in rats given A and TP were also higher than in rats given the vehicle only in Lab 2.



Table 2  
Optional organ weights including the liver, adrenal, and kidney in agonistic version

Lab	Body weights/organ weights	Substances					
		V.C.	A	B	L	E	TP
1	Starting body wt. (g)	214.8 ± 10.6	214.4 ± 11.0	213.1 ± 10.1	219.1 ± 10.5	215.0 ± 8.0	214.9 ± 9.3
	Terminal body wt. (g)	262.9 ± 17.0	250.6 ± 12.0	252.4 ± 12.8	243.7 ± 9.2	249.4 ± 12.9	266.0 ± 12.7
	Liver (g)	10.0 ± 1.1	10.2 ± 1.3	9.6 ± 0.5	11.1 ± 0.7	9.7 ± 0.7	10.1 ± 0.8
2	Starting body wt. (g)	231.0 ± 5.3	227.5 ± 5.0	229.6 ± 6.9	229.1 ± 3.9	226.8 ± 7.9	230.9 ± 6.9
	Terminal body wt. (g)	280.8 ± 7.9	275.9 ± 6.3	285.2 ± 12.4	261.5 ± 7.1*	281.8 ± 15.0	305.6 ± 15.0*
	Liver (g)	11.1 ± 0.6	12.1 ± 0.8*	10.7 ± 1.1	11.5 ± 0.6	11.5 ± 0.9	12.8 ± 1.2*
3	Starting body wt. (g)	257.1 ± 8.9	256.7 ± 8.9	256.0 ± 8.3	257.4 ± 7.9	256.8 ± 10.1	255.0 ± 12.2
	Terminal body wt. (g)	303.2 ± 15.5	297.3 ± 17.6	308.3 ± 14.9	264.6 ± 26.4*	300.8 ± 14.9	320.0 ± 22.7
	Liver (g)	12.9 ± 0.9	14.0 ± 1.9	13.0 ± 1.3	12.2 ± 1.6	13.0 ± 1.3	13.6 ± 2.0
	Adrenals (mg)	58.8 ± 9.3	57.0 ± 9.2	61.5 ± 10.6	49.9 ± 7.8	50.2 ± 5.1	51.0 ± 11.7
	Kidneys (mg)	2110 ± 72	2344 ± 138*	2290 ± 162	2229 ± 226	2189 ± 192	2435 ± 244*

V.C., vehicle control; TP, testosterone propionate. *n* = 6 rats/group/Lab.

\* Significantly different from control group at *P* < 0.05.

### 3.1.2. Accessory sex organ weights

Five accessory sex organ and total five organ weight changes are shown in Table 3, and normalized organ weight changes are shown in Fig. 1. The accessory sex organ weights of rats given TP only in all laboratories were higher than these of rats given the vehicle

alone, confirming the reliability of this study. Almost all accessory sex organ weights and total five organs in rats given L were higher than in rats given the vehicle in all laboratories. The LABC weights in rats given E was significantly higher than in rats given the vehicle in Lab 2, but the normalized change in this organ was

Table 3  
Mean body weights and mean organ weights in agonistic version

Lab	Body weights/organ weights	Substances					
		V.C.	A	B	L	E	TP
1	Terminal body wt. (g)	262.9 ± 17.0	250.6 ± 12.0	252.4 ± 12.8	243.7 ± 9.2	249.4 ± 12.9	266.0 ± 12.7
	Ventral prostate (mg)	16.8 ± 1.0	17.0 ± 3.2	15.6 ± 3.4	34.1 ± 8.0	14.9 ± 1.2	93.6 ± 11.0*
	Seminal vesicles (mg)	27.9 ± 5.6	26.5 ± 1.9	25.7 ± 4.9	61.2 ± 9.6*	29.0 ± 3.5	190.4 ± 19.1*
	LABC (mg)	136.8 ± 22.2	128.2 ± 19.2	128.3 ± 11.0	298.5 ± 28.1*	141.5 ± 15.2	312.3 ± 26.9*
	Glans penis (mg)	29.5 ± 5.6	29.9 ± 2.8	28.3 ± 7.2	49.8 ± 6.5*	32.6 ± 5.1	64.4 ± 6.0*
	Cowper's glands (mg)	4.1 ± 1.3	4.4 ± 1.4	3.9 ± 1.5	10.3 ± 2.5*	4.5 ± 1.1	20.4 ± 3.5*
	Total of five organs (mg)	215.0 ± 21.3	206.0 ± 23.5	201.9 ± 21.3	453.8 ± 48.3*	222.4 ± 19.0	681.0 ± 42.3*
2	Terminal body wt. (g)	280.8 ± 7.9	275.9 ± 6.3	285.2 ± 12.4	261.5 ± 7.1*	281.8 ± 15.0	305.6 ± 15.0*
	Ventral prostate (mg)	16.0 ± 5.2	19.8 ± 5.1	15.8 ± 6.5	33.4 ± 6.3*	18.4 ± 3.2	121.8 ± 25.6*
	Seminal vesicles (mg)	42.0 ± 14.5	40.9 ± 11.2	38.8 ± 12.2	178.7 ± 60.4*	41.6 ± 11.5	420.4 ± 32.1*
	LABC (mg)	163.6 ± 38.3	178.6 ± 23.5	189.9 ± 30.4	426.8 ± 46.2*	216.3 ± 17.3*	527.5 ± 23.5*
	Glans penis (mg)	44.1 ± 4.3	42.9 ± 2.2	41.8 ± 2.3	58.5 ± 3.7*	45.5 ± 2.5	73.9 ± 3.9*
	Cowper's glands (mg)	5.8 ± 1.3	5.6 ± 1.1	4.4 ± 1.7	10.1 ± 2.6*	5.8 ± 1.8	34.4 ± 8.1*
	Total of five organs (mg)	271.6 ± 51.3	287.8 ± 29.7	290.7 ± 35.3	707.6 ± 104.7*	327.7 ± 14.6	1177.9 ± 35.1*
3	Terminal body wt. (g)	303.2 ± 15.5	297.3 ± 17.6	308.3 ± 14.9	264.6 ± 26.4*	300.8 ± 14.9	320.0 ± 22.7
	Ventral prostate (mg)	22.0 ± 3.1	20.6 ± 1.4	24.0 ± 1.7	43.7 ± 11.5*	26.2 ± 3.8	186.5 ± 48.4*
	Seminal vesicles (mg)	61.2 ± 5.9	58.1 ± 7.0	58.4 ± 8.2	165.5 ± 37.1*	61.2 ± 10.9	431.3 ± 55.1*
	LABC (mg)	191.3 ± 16.0	178.6 ± 25.2	190.7 ± 6.6	452.3 ± 34.5*	221.1 ± 35.8	543.5 ± 83.5*
	Glans penis (mg)	53.0 ± 8.0	54.6 ± 5.4	54.8 ± 5.6	72.9 ± 3.2*	52.0 ± 2.6	95.1 ± 8.0*
	Cowper's glands (mg)	8.5 ± 2.2	7.4 ± 1.8	8.0 ± 1.3	18.2 ± 5.2*	8.8 ± 2.4	37.1 ± 6.6*
	Total of five organs (mg)	336.0 ± 19.9	319.3 ± 29.6	336.0 ± 13.7	752.5 ± 66.4*	369.4 ± 45.8	1293.6 ± 112.7*

V.C., vehicle control; TP, testosterone propionate. *n* = 6 rats/group/Lab.

\* Significantly different from control group at *P* < 0.05.

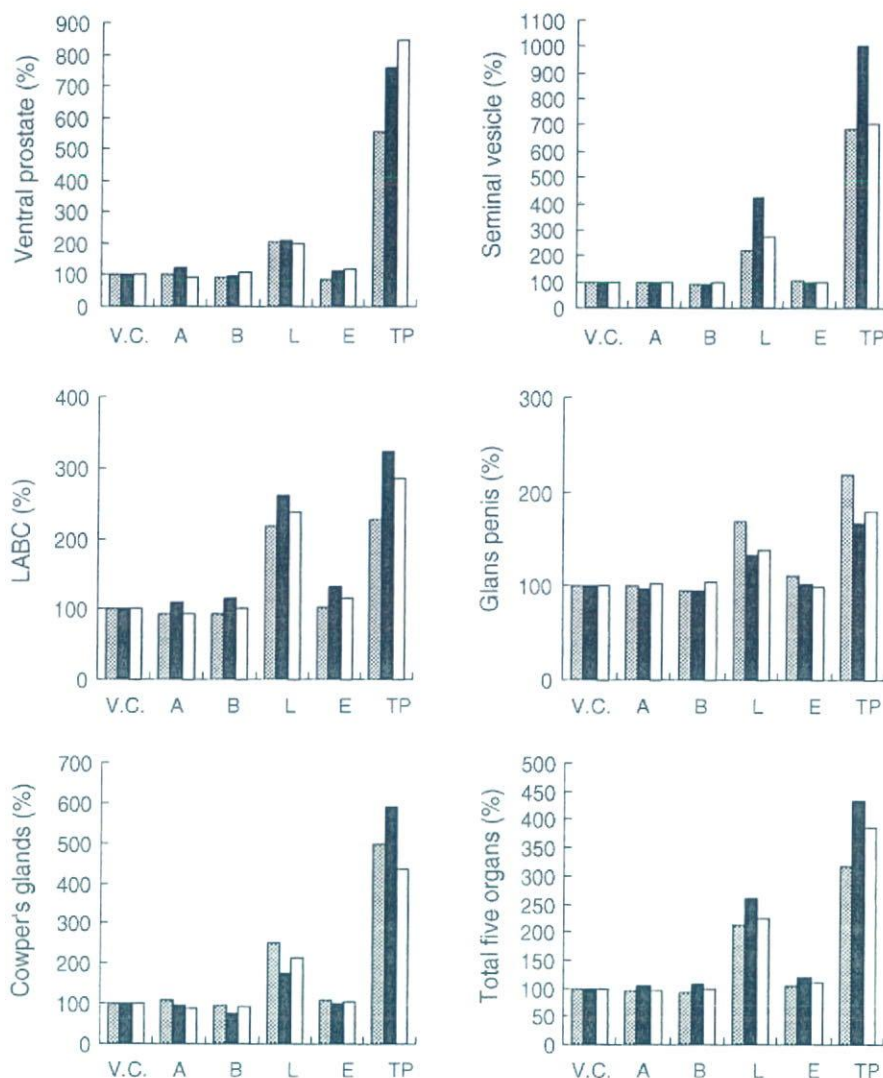


Fig. 1. Organ weights of accessory sex organs in agonistic version. Values from each laboratory were normalized to the control value set equal to 100%. LABC: levator ani and bulbocavernosus muscle; V.C.: vehicle control; A, B, L, and E: coded chemicals; TP: testosterone propionate.  $n=6$  rats/group/Lab (▨, Lab 1; ■, Lab 2; □, Lab 3).

not apparent. Normalized weight changes of the glans penis in rats given coded L showed the weakest response among five organs (Fig. 1).

### 3.2. Antagonistic version

#### 3.2.1. Body weights, clinical general observations, and optional organ weights

The body weight changes and the optional organ weight changes are shown in Table 4. Two rats given I plus TP died with toxic signs such as decreasing body weight, soft feces, reddish urine, and weakness at 7–10 days after the administration in Labs 2 and 3, respectively. The terminal body weights in rats given I plus TP or K plus TP were significantly lower than in rats given TP only in two laboratories. The paired adrenals in rats given K plus TP were significantly higher than in rats

given TP in Lab 3. The liver weights in rats given I plus TP were higher than in rats given TP in all laboratories, and increased liver weights were also observed in rats given C in Lab 1.

#### 3.2.2. Accessory sex organ weights

Five accessory sex organ and total organ weight changes are shown in Table 5, and normalized organ weight changes are shown in Fig. 2. All accessory sex organ weights of rats given H, which is a positive compound, flutamide, plus TP were lower than those of rats given TP, confirming the reliability of this version. Almost all the accessory sex organ weights in rats given I plus TP and K plus TP were significantly lower than in rats given TP in all laboratories. Some accessory sex organ weights in rats given C plus TP and D plus TP were also lower than in the rats given TP. Although the



Table 4  
Optional organ weights including the liver, adrenal, and kidney in antagonistic version

Lab	Body weights/organ weights	Substances									
		V.C.	TP	F	G	I	C	K	D	H	
1	Starting body wt. (g)	216.2 ± 10.9	216.1 ± 8.8	214.9 ± 10.6	216.6 ± 10.8	218.1 ± 12.5	216.5 ± 8.1	216.0 ± 8.2	219.4 ± 11.3	215.2 ± 9.7	
	Terminal body wt. (g)	260.0 ± 17.4	267.4 ± 16.5	263.3 ± 17.8	272.2 ± 9.5	248.7 ± 17.1	266.3 ± 11.7	245.7 ± 11.1*	263.6 ± 11.8	261.5 ± 12.5	
	Liver (g)	10.0 ± 1.0	10.4 ± 0.9	11.3 ± 1.3	10.9 ± 0.9	17.3 ± 1.2*	12.5 ± 0.8*	9.6 ± 0.8	10.4 ± 0.5	10.0 ± 0.8	
2	Starting body wt. (g)	256.8 ± 11.0	258.9 ± 9.2	259.3 ± 11.6	257.6 ± 10.9	256.8 ± 9.6	258.9 ± 10.8	258.0 ± 10.6	258.9 ± 10.7	255.4 ± 12.7	
	Terminal body wt. (g)	313.2 ± 14.7*	331.9 ± 14.3	326.1 ± 16.4	332.2 ± 20.7	270.8 ± 44.6*	329.8 ± 18.7	309.5 ± 13.9*	335.3 ± 15.6	327.4 ± 23.1	
	Liver (g)	13.8 ± 0.7	15.6 ± 2.1	15.8 ± 2.3	15.1 ± 0.9	22.8 ± 3.6*	17.7 ± 1.7	14.1 ± 0.8	15.6 ± 1.4	15.1 ± 2.2	
3	Starting body wt. (g)	254.1 ± 13.8	254.4 ± 13.6	255.1 ± 12.3	255.1 ± 12.4	255.6 ± 13.1	255.3 ± 14.7	255.2 ± 14.9	254.3 ± 15.9	254.6 ± 16.6	
	Terminal body wt. (g)	303.3 ± 16.4	314.7 ± 20.9	307.0 ± 24.0	317.5 ± 10.9	248.1 ± 62.4*	322.7 ± 23.5	292.7 ± 18.1	310.6 ± 23.1	313.2 ± 24.2	
	Liver (g)	12.9 ± 1.2	13.7 ± 1.7	14.2 ± 1.7	13.7 ± 0.5	18.6 ± 2.5*	16.0 ± 1.3	13.0 ± 0.9	12.8 ± 1.4	13.5 ± 2.5	
	Adrenals (mg)	57.0 ± 10.8	49.5 ± 8.3	54.3 ± 12.5	58.0 ± 5.9	55.5 ± 3.6	56.6 ± 3.5	63.2 ± 7.0*	56.5 ± 7.8	55.5 ± 7.7	
	Kidneys (mg)	2106 ± 212	2207 ± 228	2316 ± 273	2342 ± 34	2152 ± 216	2329 ± 197	2236 ± 132	2184 ± 198	2195 ± 201	

V.C., vehicle control; TP, testosterone propionate. Each substance was coadministered with 0.2 mg/kg TP. *n* = 6 rats/group/Lab.

\* Significantly different from TP group at *P* < 0.05.

LABC weight in rats given G plus TP was significantly lower than that in the TP group in Lab 2, the normalized change of this organ was not so apparent. The total of the five accessory sex organ weights in rats given I plus TP and K plus TP was lower than in rats given TP in all laboratories. The seminal vesicle weight changes in rats given I plus TP and K plus TP were most sensitive among the five organs (Fig. 2).

#### 4. Discussion

Japanese laboratories performed the validation studies of Phase 2 using methyltestosterone, vinclozolin, and *p,p'*-DDE as a part of the national validation program with the result that the Hershberger assay proposed by the OECD was suggested to be a good screening assay to detect androgen agonistic and antagonistic effect (Yamasaki et al., 2003a).

We also performed the Hershberger assay using coded chemicals as part of a national validation Phase 3 as the next step for the OECD guideline process of this assay. The weights of all the accessory sex organs from the experimental animals in all the laboratories exhibited significantly the same changes in the agonistic version; almost all organ weights increased in the rats given coded substance L, and no organ showed any response in rats given coded substances A and B. We received the information from the coordinator of this validation study after all tests were finished that a group of L and E was the same compound and a dose of L was higher than that of E, and that A and B were reported to have no agonistic properties and L and E were a weak agonistic compound. In addition, the normalized weights of all the tissues treated with coded substances in each assay fell within narrow ranges. Therefore, we think that the Hershberger assay is a good screening assay for detecting the androgen agonistic effects of chemicals. The findings that the terminal body weights in rats given coded L were depressed in all laboratories and no body weight changes were detected in rats given coded substance E in all laboratories means that a dose of L was a toxic level and a dose of E had no observed effect. The androgen agonistic effects were detected by the administration of toxic level in this study, but weak agonistic and antagonistic properties of some weak chemicals were detected when non-toxic level doses were administered (Yamasaki et al., 2003a,b).

In the antagonistic version, almost all the sex accessory organs decreased in rats given coded substances I plus TP and K plus TP in all laboratories compared with each organ weight in the rats given TP only, and some organ weights also decreased in the coded substance C



Table 5  
Mean body weights and mean organ weights in antagonistic version

Lab	Body weights/organ weights	Chemicals	V.C.										
			TP	F	G	I	C	K	D	H			
1	Terminal body wt. (g)		267.4 ± 17.4	263.3 ± 17.8	272.2 ± 9.5	248.7 ± 17.1	266.3 ± 11.7	245.7 ± 11.1*	263.6 ± 11.8	261.5 ± 12.5			
	Ventral prostate (mg)		14.4 ± 1.5*	82.0 ± 7.7	85.9 ± 19.3	28.3 ± 5.9*	78.9 ± 14.6*	41.4 ± 5.9*	80.6 ± 10.7*	24.9 ± 3.6*			
	Seminal vesicles (mg)		23.8 ± 3.1*	191.4 ± 40.0	185.7 ± 33.5	35.5 ± 6.2*	144.5 ± 29.1	60.6 ± 8.2*	154.7 ± 32.5	28.2 ± 3.8*			
	L-ABC (mg)		119.0 ± 7.0*	307.8 ± 40.0	302.3 ± 29.4	125.7 ± 13.4*	280.7 ± 29.7	155.8 ± 21.8*	302.9 ± 40.4	148.3 ± 18.6*			
	Glans penis (mg)		29.4 ± 2.9*	61.9 ± 5.5	61.2 ± 2.1	32.0 ± 3.9*	53.6 ± 3.3*	41.7 ± 6.4*	64.5 ± 6.1	30.3 ± 4.2*			
	Cowper's glands (mg)		3.2 ± 1.3*	20.1 ± 1.7	16.2 ± 3.5	4.9 ± 0.8*	16.4 ± 1.9	8.3 ± 1.8*	18.1 ± 3.3	4.7 ± 1.3*			
	Total of five organs (mg)		189.9 ± 10.6*	663.2 ± 81.3	651.2 ± 65.6	226.5 ± 20.6*	573.9 ± 62.2	307.7 ± 25.4*	620.8 ± 74.6	236.3 ± 24.2*			
	Terminal body wt. (g)		313.2 ± 14.7*	326.1 ± 16.4	332.2 ± 20.7	270.8 ± 44.6*	329.8 ± 18.7	309.5 ± 13.9*	335.3 ± 15.6	327.4 ± 23.1			
	Ventral prostate (mg)		17.7 ± 2.7*	135.0 ± 12.9	129.0 ± 31.5	28.0 ± 8.9*	126.5 ± 40.0	61.6 ± 25.7*	115.5 ± 26.3	28.2 ± 8.9*			
	Seminal vesicles (mg)		47.5 ± 8.4*	405.9 ± 69.8	439.7 ± 68.7	77.8 ± 26.4*	352.5 ± 80.3*	177.7 ± 43.8*	357.1 ± 40.3*	65.9 ± 11.2*			
L-ABC (mg)		217.7 ± 25.2*	539.6 ± 53.0	529.9 ± 32.2*	218.1 ± 39.6*	496.4 ± 71.6*	336.0 ± 46.3*	532.4 ± 56.5	235.9 ± 29.0*				
Glans penis (mg)		49.9 ± 2.9*	75.6 ± 5.9	75.2 ± 2.1	49.8 ± 1.7*	71.7 ± 2.5	63.9 ± 6.2*	73.0 ± 3.3	49.7 ± 2.0*				
Cowper's glands (mg)		5.7 ± 0.9*	28.5 ± 5.6	31.0 ± 2.6	10.5 ± 3.8*	30.9 ± 6.5	22.9 ± 9.1	25.7 ± 6.2	10.4 ± 3.4*				
Total of five organs (mg)		338.4 ± 29.0*	1184.6 ± 97.1	1204.6 ± 115.7	384.2 ± 71.6*	1078.0 ± 174.3*	662.0 ± 111.1*	1103.7 ± 89.4*	390.0 ± 29.6*				
3	Terminal body wt. (g)		303.3 ± 16.4	307.0 ± 24.0	317.5 ± 10.9	248.1 ± 62.4	322.7 ± 23.5	292.7 ± 18.1	310.6 ± 23.1	313.2 ± 24.2			
	Ventral prostate (mg)		20.7 ± 3.5*	142.0 ± 34.5	132.8 ± 20.1	36.2 ± 9.4*	107.2 ± 17.8*	67.8 ± 24.5*	133.6 ± 24.2	39.8 ± 5.2*			
	Seminal vesicles (mg)		53.9 ± 5.2*	437.1 ± 120.5	411.6 ± 59.7	73.9 ± 7.9*	323.7 ± 59.0	159.6 ± 45.0*	317.1 ± 62.3*	76.3 ± 10.8*			
	L-ABC (mg)		193.1 ± 11.3*	460.2 ± 84.7	494.4 ± 50.1	165.4 ± 35.5*	396.4 ± 50.9*	262.6 ± 47.8*	452.4 ± 64.2	221.8 ± 51.5*			
	Glans penis (mg)		50.9 ± 3.8*	86.3 ± 7.9	89.6 ± 7.6	60.2 ± 7.3*	83.9 ± 4.3	73.2 ± 10.0*	90.2 ± 6.1	60.8 ± 3.4*			
	Cowper's glands (mg)		8.3 ± 2.8*	37.5 ± 11.1	33.4 ± 5.3	9.3 ± 2.5*	23.5 ± 5.9*	20.9 ± 4.6*	34.8 ± 6.7	12.0 ± 3.8*			
	Total of five organs (mg)		326.9 ± 21.3*	1163.1 ± 217.1	1161.6 ± 84.1	345.0 ± 57.2*	934.7 ± 130.1*	584.2 ± 90.7*	1028.0 ± 110.7*	410.7 ± 61.4*			

V.C., vehicle control; TP, testosterone propionate. Each substance was coadministered with 0.2 mg/kg TP. *n* = 6 rats/group/Lab.

\* Significantly different from TP group at *P* < 0.05.

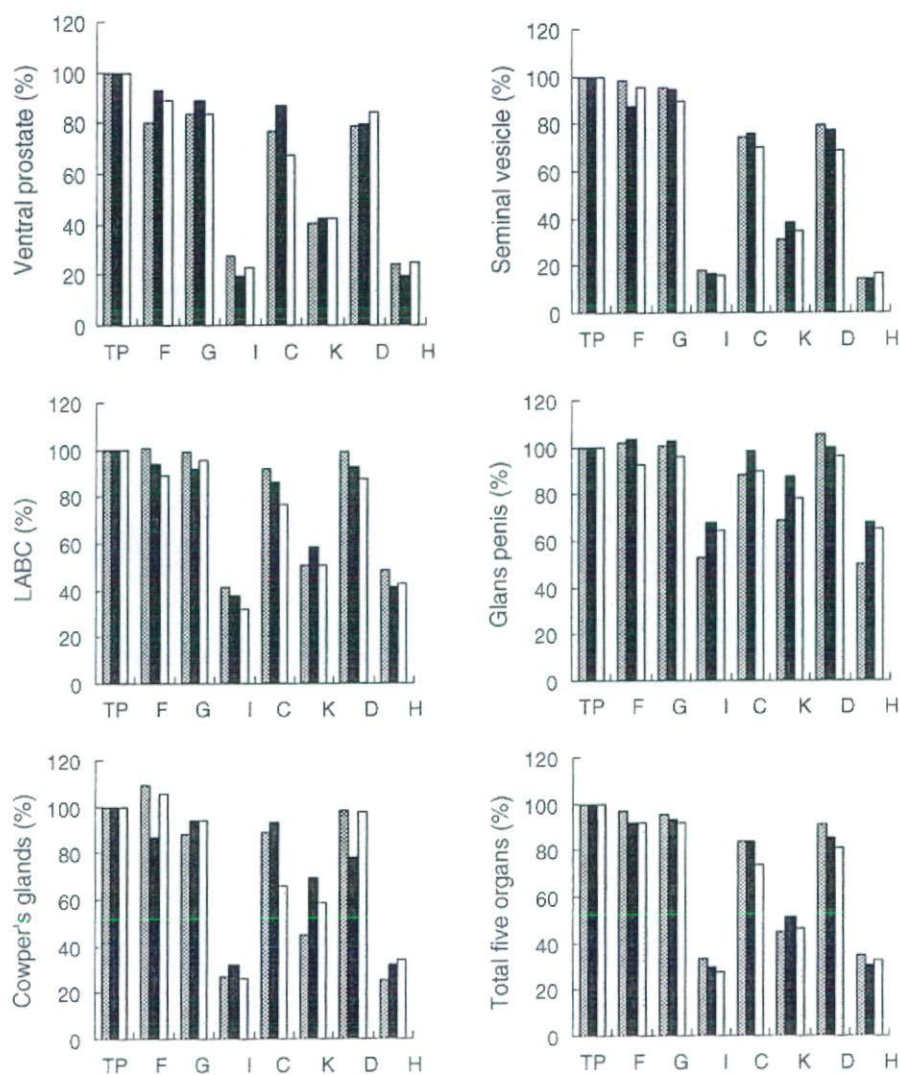


Fig. 2. Organ weights in antagonistic version. Values from each laboratory were normalized to the value of TP group set equal to 100%. LABC: levator ani and bulbocavernosus muscle; F, G, I, C, K, D, and H: coded chemicals; TP: testosterone propionate.  $n=6$  rats/group/Lab (▨, Lab 1; ■, Lab 2; □, Lab 3).

plus TP and D plus TP groups. No changes were detected in rats given coded substances F and G. These findings demonstrate that coded substances I, C, K, and D had antagonistic properties and coded substances F and G had no antagonistic properties. We accepted the information; substances F and G were negative compounds, I, C, K, and D were weak antagonistic compounds, and H was a positive control compound, flutamide; the groups of substances I and C, or K and D were the same compound, and dose levels of I and K were higher than those of C and D. We also received the information that C and I were *p,p'*-DDE and D and K were linurone. The ventral prostate and glans penis in Lab 1, the seminal vesicle and LABC in Lab 2, and the ventral prostate, LABC and Cowper's glands in Lab 3 were significantly affected in the rats given coded substance C plus TP. In addition, the ventral prostate in Lab 1 and seminal

vesicle in Labs 2 and 3 were significantly affected in rats given coded substance D plus TP. The differential effects across laboratories were observed in rats given coded C plus TP and D plus TP. We found that the most sensitive organ among the five accessory sex organs was the prostate and/or seminal vesicle in our previous validation Phase 2 study, and in the Hershberger assays using various chemicals (Yamasaki et al., 2003a,b). The ventral prostate and/or seminal vesicle were responded with or without significant differences in rats given coded substances C plus TP and D plus TP, so we determined that coded C and D have androgen antagonistic properties. On the other hand, the LABC weight in rats given coded substance G plus TP was significantly lower than that in the TP group in Lab 2, but the normalized change of this organ was not so apparent. Therefore, the Japanese data in this study demonstrated that the Hershberger assay



is considered to be a good screening assay for detecting the androgen antagonistic effects of chemicals. The findings that some animals died in rats given coded substance I and decreased body weights were detected in rats given K and I, and the liver weights increased in rats given I means the coded substances I and K were at a toxic dose level. In addition, the liver weights increased in rats given C in one laboratory, so a dose of C may be at a toxic level. The general toxicity is considered to be important for this assay, because a 10% change in terminal weight is suggested to affect some Hershberger assay endpoints (Marty et al., 2003).

In conclusion, we performed the OECD validation study Phase 3 using coded chemicals. All five accessory sex organs responded with statistically significant changes in weight within a narrow window in the agonistic and antagonistic versions, and no false positive or false negative results were observed in this study. Therefore, the Japanese studies support the Hershberger assay as a reliable and reproducible screening assay for the detection of androgen agonistic and antagonistic effects.

## Acknowledgments

This study was supported by the grant by the Ministry of Economy, Trade and Industry, the Ministry of Health, Labour and Welfare, and Ministry of the Environment in Japan.

## References

- Bülbring, E., Burn, J.H., 1935. The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85, 320–333.
- Deanesly, R., Parkes, A.S., 1936. Comparative activities of compounds of the androsterone-testosterone series. *Biochem. J.* 30, 291–303.
- Di Salle, E., Briatico, G., Giudici, D., Ornati, G., Panzeri, A., 1994. Endocrine properties of the testosterone 5 $\alpha$ -reductase inhibitor tur-osteride (FCE 26073). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 48, 241–248.
- Dingemans, E., Fried, J., Laquer, E., 1935. Differences between male hormone extracts from urine and from testes. *Nature* 135, 184.
- Eisenberg, E., Gordan, G.S., 1950. The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 99, 38–44.
- Eisenberg, E., Gordan, G.S., Elliott, H.W., 1949. Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45, 113–119.
- Hershberger, L.G., Shipley, E.G., Meyer, R.K., 1953. Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 83, 175–180.
- Korenchevsky, V., 1932. The assay of testicular hormone preparations. *Biochem. J.* 26, 413–422.
- Korenchevsky, V., Dennison, M., Schalit, R., 1932. The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem. J.* 26, 1306–1314.
- Korenchevsky, V., Dennison, M., Kohn-Speyer, A., 1933a. Changes produced by testicular hormone in normal and in castrated rats. *Biochem. J.* 27, 557–579.
- Korenchevsky, V., Dennison, M., Kohn-Speyer, A., 1933b. On the assay and the absorption of testicular hormone dissolved in oil. *Biochem. J.* 27, 778–782.
- Marty, M.S., Johnson, K.A., Carney, E.W., 2003. Effect of feed restriction on Hershberger and pubertal male assay endpoints. *Birth Defects Res. (Part B)* 68, 363–374.
- McLachlan, J.A., 1993. Functional toxicology: a new approach to detect functionally active xenobiotics. *Environ. Health Perspect.* 101, 386–387.
- McLachlan, J.A., Korach, K.S., 1995. Estrogens in the environment: global health implications. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl. 7), 3–4.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 1998. Report of the first meeting of the OECD endocrine disrupter testing and assessment (EDTA) working group.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2000. The second meeting of the OECD validation management group (VMG) for the screening and testing of endocrine disrupters.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2002. Final OECD report of the work towards the validation of the rat Hershberger assay: Phase I, androgenic response of testosterone propionate, and anti-androgenic effects of flutamide. Task force on endocrine disrupters testing and assessment (EDTA) of the test guidelines program.
- Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD), 2003. The fourth meeting of the OECD validation management group (VMG) for the screening and testing of endocrine disrupters.
- Peets, E.A., Henson, M.F., Neri, R., 1973. On the mechanism of the anti-androgenic action of flutamide ( $\alpha$ - $\alpha$ -trifluoro-2-methyl-4'-nitro-m-propionoluidide) in the rat. *Endocrinology* 94, 532–540.
- Raynaud, J.P., Bouton, M.M., Moguilewsky, M., Ojasoo, T., Philibert, D., Beck, G., Labrie, F., Mornon, J.P., 1980. Steroid hormone receptors and pharmacology. *J. Steroid Biochem.* 12, 143–157.
- Raynaud, J.P., Bonne, C., Moguilewsky, M., Lefebvre, F.A., Bélanger, A., Labrie, F., 1984. The pure anti-androgen RU 23908 (Anandron®), a candidate of choice for the combined anti-hormonal treatment of prostatic cancer: a review. *Prostate* 5, 299–311.
- USEPA, 1998. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) final report. EPA/743/R-98/003.
- Wainman, P., Shipounoff, G.C., 1941. The effects of castration and testosterone propionate on the striated perineal musculature in the rat. *Endocrinology* 29, 975–978.
- Wakeling, A., Furr, B.J.A., Glen, A.T., Hughes, L.R., 1981. Receptor binding and biological activity of steroidal and non-steroidal anti-androgens. *J. Steroid Biochem.* 15, 355–359.
- Yamasaki, K., Sawaki, M., Ohta, R., Okuda, H., Katayama, S., Yamada, T., Ohta, T., Kosaka, T., Owens, W., 2003a. OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyl-testosterone, vinclozolin and *p,p'*-DDE. *Environ. Health Perspect.* 111, 1912–1919.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Imatanaka, M., Shinoda, K., Takatsuki, M., 2003b. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 95–115.



# マウスを用いる子宮肥大試験

太田 亮<sup>1</sup>, 田面喜之<sup>2</sup>, 宮原 敬<sup>2</sup>, 丸茂秀樹<sup>1</sup>

## The Mouse Uterotrophic Assay

Ryo OHTA<sup>1</sup>, Yoshiyuki TAZURA<sup>2</sup>, Takashi MIYAHARA<sup>2</sup>, Hideki MARUMO<sup>1</sup>

The mouse uterotrophic assay was attempted in ovariectomized mice using ethinyl estradiol as a reference compound and the result was comparable with the rat uterotrophic assay. Ovariectomized mice were exposed to bisphenol A and twenty other selected chemicals by gavage or subcutaneous injection according to the protocol drafted by the OECD Validation Management Group for the Screening. The results demonstrated that bisphenol A had potency not only of estrogenicity but also of anti-estrogenicity, and that ten of the twenty chemicals revealed either estrogenic or anti-estrogenic activity on the uterus of mice. These results support the mouse uterotrophic assay as a useful screening method for detection of estrogenic and anti-estrogenic compounds.

### 緒言

子宮肥大試験 (Uterotrophic assay) は、エストロゲン活性を調べるための *in vivo* 試験系として、1930年代から用いられてきた古い手法であるが、現在は、内分泌かく乱化学物質のスクリーニング試験法としての応用が期待され、OECDなどが中心となって、その有用性を確認する作業 (バリデーション作業) が国際レベルで進められている<sup>1-3)</sup>。OECDが提唱している子宮肥大試験のガイドライン案では、「嚙菌類を用いる子宮肥大試験」となっているが、これまで実施されてきたOECDバリデーション作業は、ラットのみである<sup>1-3)</sup>。一方、同じ嚙菌類でもマウスはこれまで子宮肥大試験に使用されてこなかったが、マウスはラットに比べて体が小さく、子宮も著しく軽量なため、重量測定の前処理などに熟練を要することや、測定値に正確性を欠くことなどが敬遠される主な理由と考えられる。しかしながら、マウスには、被験物質量がラットの約1/10で済むことや、飼育スペースが節約できること、遺伝子発現変化に関する情報が多いことなど利点も多く、将来、マウスが子宮肥大試験に使用される可能性

は高いと考えられる。そこで、本稿では、マウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、エチニルエストラジオール (EE) 投与による子宮重量増加をマウス-ラット間で比較した結果と、ビスフェノールA (BPA)、さらには、エストロゲン様作用が疑われている種々の化学物質について実施したマウス子宮肥大試験の結果を紹介する。

### 材料および方法

#### 実験1. EE投与による子宮重量増加の用量反応性

実験は、OECDバリデーション作業のプロトコル案<sup>1)</sup>に準拠して、幼若マウスを用いる3日間経口投与方法、幼若マウスを用いる3日間皮下投与方法、卵巣摘出マウスを用いる7日間経口投与方法および卵巣摘出マウスを用いる7日間皮下投与方法の4種類を実施した。動物は、ICR系雌マウス (日本チャールス・リバー、横浜) を用い、本館飼育室内で、ペパークリーン (日本エスエルシー、浜松) を入れたTPX樹脂製ケージに収容し、固型飼料 (CE-2, 日本クレア、東京) および水道水を自由摂取させて飼育した。EE (純度99.0%, 和光純薬工業、大阪) は、少量のエタノールに溶解後、コーン油で所定の濃度に調製して、投与した。EEの投与量は、幼若マウスの経

1 Safety Testing Laboratory

2 Animal Husbandry Unit



口投与方法では0.3～150  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、皮下投与方法では0.1～50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、卵巣摘出マウスの経口投与方法では0.3～100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、皮下投与方法では0.03～10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の範囲に設定し、対照群の動物にはコーン油のみを投与した。投与は、幼若マウスの場合には哺育19日から、卵巣摘出マウスの場合には8週齢から開始し、1群当たりの例数は5～6とした。投与した動物は、最終投与の約24時間後に頸椎脱臼し、速やかに放血致死させた。その際、子宮は膣とともに摘出し、実体顕微鏡下で脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は、子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度、重量を測定した (blotted weight)。得られたデータは一元配置の分散分析で解析し、有意性が認められた場合には、対照群を基準群としてDunnnettの多重比較検定を行った。なお、本稿ではblotted weightのみを指標とした。

## 実験2. BPAの卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験

実験は、OECDバリデーションプロトコル案<sup>1)</sup>の卵巣摘出動物を用いる7日間皮下投与方法に準拠して行い、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用を調べた。動物は、6週齢で卵巣を摘出し

たC57BL/6J系マウス (日本エスエルシー) を動物繁殖研究所 (茨城) から入手し、膣スミアで性周期が回帰していないことを確認した後、8週齢で試験に供した。動物の飼育条件は、実験1と同様にした。BPA (純度99.0%、和光純薬工業) は、メノウ乳鉢で破碎後、少量のエタノールに溶解し、コーン油で調製した。EEは、実験1と同様に調製した。群構成は、表1に従い、BPAの投与量は10～300  $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ の範囲に設定した。陰性対照群の動物には、コーン油を皮下投与した。陽性対照群の動物には、実験1の結果のED<sub>10</sub>～ED<sub>20</sub>に相当する0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを皮下投与し、抗エストロゲン作用を調べる試験系では、ED<sub>60</sub>～ED<sub>70</sub>に相当する0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを併用皮下投与した。1群当たりの匹数は6とした。子宮重量の測定およびデータの解析は、実験1と同様にした。ただし、陽性対照群と陰性対照群の比較については、Studentの*t*検定を用いた。

## 実験3. 化学物質の卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験

実験は、OECDバリデーションプロトコル案<sup>1)</sup>に準拠して、卵巣摘出マウスを用いる7日間経口投与方法と卵巣摘出マウスを用いる7日間皮下投与方法で行った。動物の系統、飼育条件等は、実験2と同様にした。実験に供した化学物質は、以

表1 群構成

Group \ Evaluation	Estrogenic action	Anti-estrogenic action
Negative control	Vehicle	Vehicle plus EE <sup>b)</sup>
Low dose	Test substance	Test substance plus EE <sup>b)</sup>
Medium low dose	Test substance	Test substance plus EE <sup>b)</sup>
Medium high dose	Test substance	Test substance plus EE <sup>b)</sup>
High dose	Test substance	Test substance plus EE <sup>b)</sup>
Positive control	EE <sup>a)</sup>	Not applicable

EE: エチニルエストラジオール

a): 皮下投与方法では0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与、経口投与方法では6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 経口投与

b): 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与



下の通りであり、いずれも構造活性相関や、*in vitro* 試験系の結果などからホルモン活性を有すると疑われた20物質を選択した：2-[ビス(4-ヒドロキシフェニル)メチル]ベンジルアルコール (CAS No. 81-92-5, 東京化成工業, 東京), 6-ジングロール (CAS No. 23513-14-6, 和光純薬工業), ロスマリン酸 (CAS No. 20283-92-5, Aldrich Chemical, Milwaukee, WI), フェノールフタレイン (CAS No. 77-09-8, シグマアルドリッチジャパン, 東京), 2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン (CAS No. 131-55-5, THBP, 和光純薬工業), *N*-ヘプチル4-ヒドロキシベンゾエイト (CAS No. 1085-12-7, 東京化成工業), マラカイトグリーンベース (CAS No. 510-13-4, Sigma Chemical, St. Louis, MO), ニューフクシン (CAS No. 3248-91-7, ICN Biomedicals, Irvine, CA), テトラゾリウムバイオレット (CAS No. 1719-71-7, Sigma Chemical, St. Louis, MO), アルファナフトールベンゼイン (CAS No. 6948-88-5, 和光純薬工業), プラバスタチン (CAS No. 81093-37-0, 和光純薬工業), フィゾスチグミン (CAS No. 57-64-7, シグマアルドリッチジャパン), コルヒチン (CAS No. 64-86-8, 和光純薬工業), ノルジヒドログアイアレティック酸 (CAS No. 500-38-9, ICN Biomedicals, Irvine, CA), レセルピン (CAS No. 50-55-5, 和光純薬工業), フェンブコナゾール (CAS No. 114369-43-6, ジーエルサイエンス, 東京), *o*-クレゾールフタレイン (CAS No. 596-27-0, 和光純薬工業), *N,N'*-ジフェニル-*p*-フェニレンジアミン (CAS No. 74-31-7, 和光純薬工業), 1,3-ジニトロベンゼン (CAS No. 99-65-0, 和光純薬工業), ピグメントオレンジ (CAS No. 12236-62-3, 国立医薬品食品衛生研究所, 東京)。

本試験に先立ち、まず、投与量を設定するための毒性予備試験を実施した。すなわち、C57BL/6J系雌マウスを用いて100, 300および1000 mg/kg/dayの投与群を設け、各群3匹に3日間反復投与し、死亡が認められなかった最高用量を子宮肥大試験の最高用量とした。100 mg/kg/day投与群でも死亡が認められた場合は、さらに低い用量を設定して、死亡が認められない

用量を求めた。化学物質は、コーン油または注射用水で所定の濃度に調製した。群構成は、表1に従い、各物質とも公比約3とし、4用量を設定した。陰性対照群の動物には、溶媒のみを投与した。陽性対照群には、経口投与法では6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを経口投与し、皮下投与法では0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを皮下投与した。抗エストロゲン作用を調べる試験系では、経口投与法、皮下投与法のいずれの場合も、0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のEEを併用皮下投与した。1群当たりの匹数は6とした。子宮重量の測定およびデータの解析は、実験2と同様にした。子宮および膈は、必要に応じて病理組織学的検査を実施した。

## 結果

**実験1**：幼若マウスを用いた場合、EE投与により、経口投与法 (図1A) では30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上、皮下投与法 (図1B) では1  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群において、子宮重量が対照群より有意に増加した。一方、卵巣摘出マウスを用いた場合、経口投与法 (図2A) では10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上、皮下投与法 (図2B) では0.3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上のEE投与群において、子宮重量が対照群より有意に増加した。

**実験2**：BPA単独投与群では、BPAの用量が増加するに従って子宮重量が増加し、100および300 mg/kg投与群で有意差が認められた (図3A)。一方、BPAとEEの併用投与群では、BPAの用量が増加するに従って子宮重量が低下し、100および300 mg/kg投与群において、有意差が認められた (図3B)。

**実験3**：マウスを用いて化学物質の子宮肥大試験を実施した結果、エストロゲン作用あるいは抗エストロゲン作用のいずれかを示した物質は、20物質中10物質 (50%)であった (図4A)。そのうち、抗エストロゲン作用のみを示した物質は6物質 (60%)、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方を示した物質は4物質 (40%)、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった (図4B)。投与経路を比較すると、経口と皮下の両方で作用がみられた物質は5物質 (50%)、皮下のみが3物質 (30%)、経口のみが2物質 (20%)であった (図4C)。子宮重量を変化させ



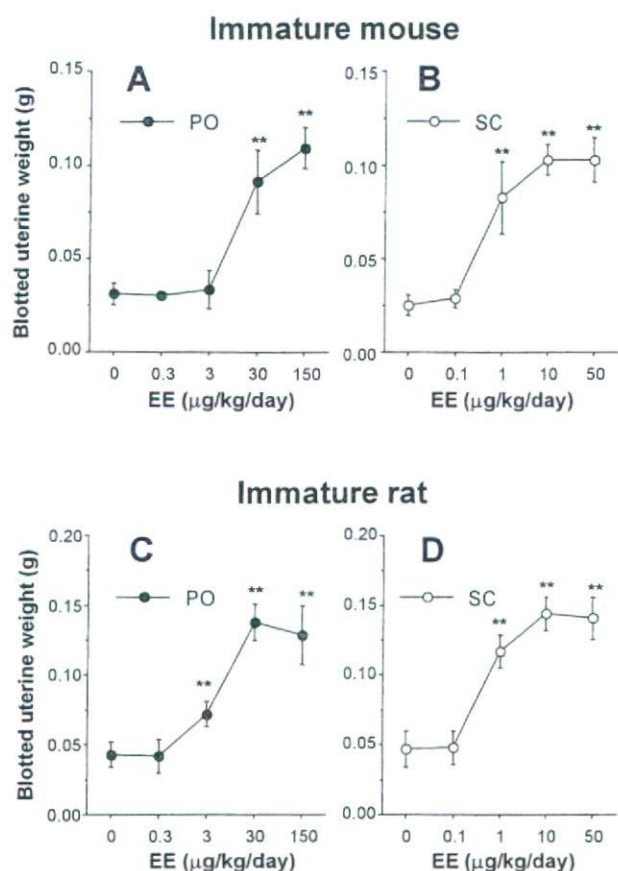


図1 幼若動物のエチニルエストラジオール (EE) 投与による子宮重量増加の用量反応性

幼若動物にEEを投与し、最終投与の24時間後に測定した子宮重量(平均±標準偏差)を示す。

A: 幼若マウスを用いる3日間経口投与方法 (PO)

B: 幼若マウスを用いる3日間皮下投与方法 (SC)

C: 幼若ラットを用いる3日間経口投与方法 (PO)

D: 幼若ラットを用いる3日間皮下投与方法 (SC)

マウスの系統はICR, ラットの系統はSprague-Dawley. 1群当たりの例数は5~6.

\*, \*\* は0 μg/kg群と比較して有意差 (p<0.05, p<0.01) があることを示す。

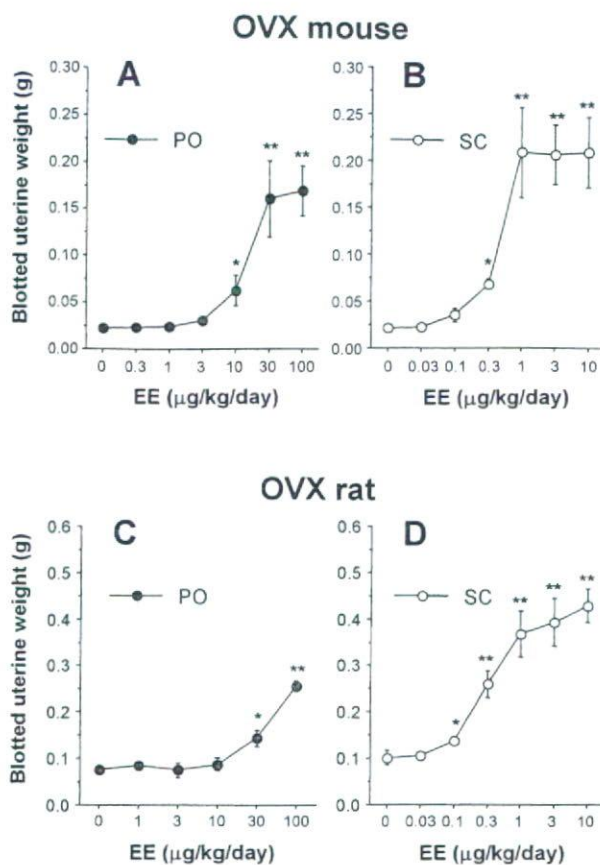


図2 卵巣摘出 (OVX) 動物のエチニルエストラジオール (EE) 投与による子宮重量増加の用量反応性

卵巣摘出動物にEEを投与し、最終投与の24時間後に測定した子宮重量(平均±標準偏差)を示す。

A: 卵巣摘出マウスを用いる7日間経口投与方法 (PO)

B: 卵巣摘出マウスを用いる7日間皮下投与方法 (SC)

C: 卵巣摘出ラットを用いる7日間経口投与方法 (PO)

D: 卵巣摘出ラットを用いる7日間皮下投与方法 (SC)

マウスの系統はICR, ラットの系統はSprague-Dawley. 1群当たりの例数は6.

\*, \*\* は0 μg/kg群と比較して有意差 (p<0.05, p<0.01) があることを示す。



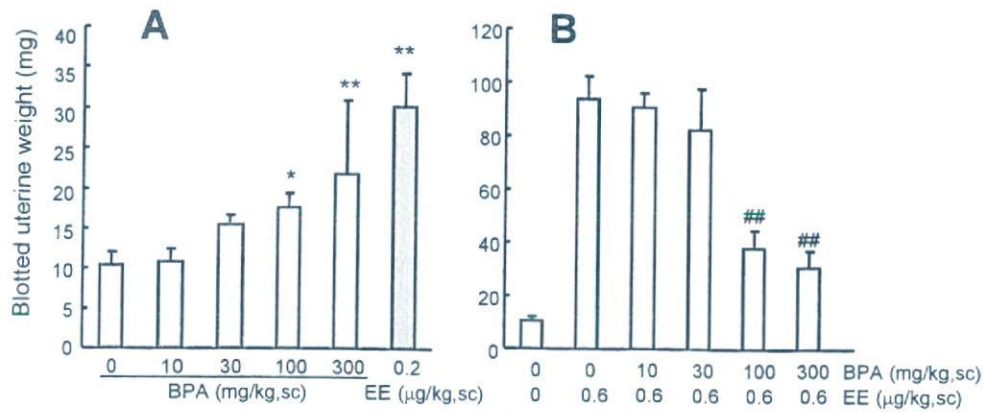


図3 ビスフェノールA (BPA) の卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験

卵巣摘出マウスにBPAを7日間皮下投与し、最終投与の24時間後に測定した子宮重量 (平均±標準偏差) を示す。A: エストロゲン作用を確認する試験, B: 抗エストロゲン作用を確認する試験。

マウスの系統はC57BL/6J。1群当たりの例数は6。

\*, \*\* は0 mg/kg群と比較して有意差 (p<0.05, p<0.01) があることを示す。

#, ## は0 mg/kg BPAと0.6 μg/kg エチニルエストラジオール (EE) の併用投与群と比較して有意差 (p<0.05, p<0.01) があることを示す。

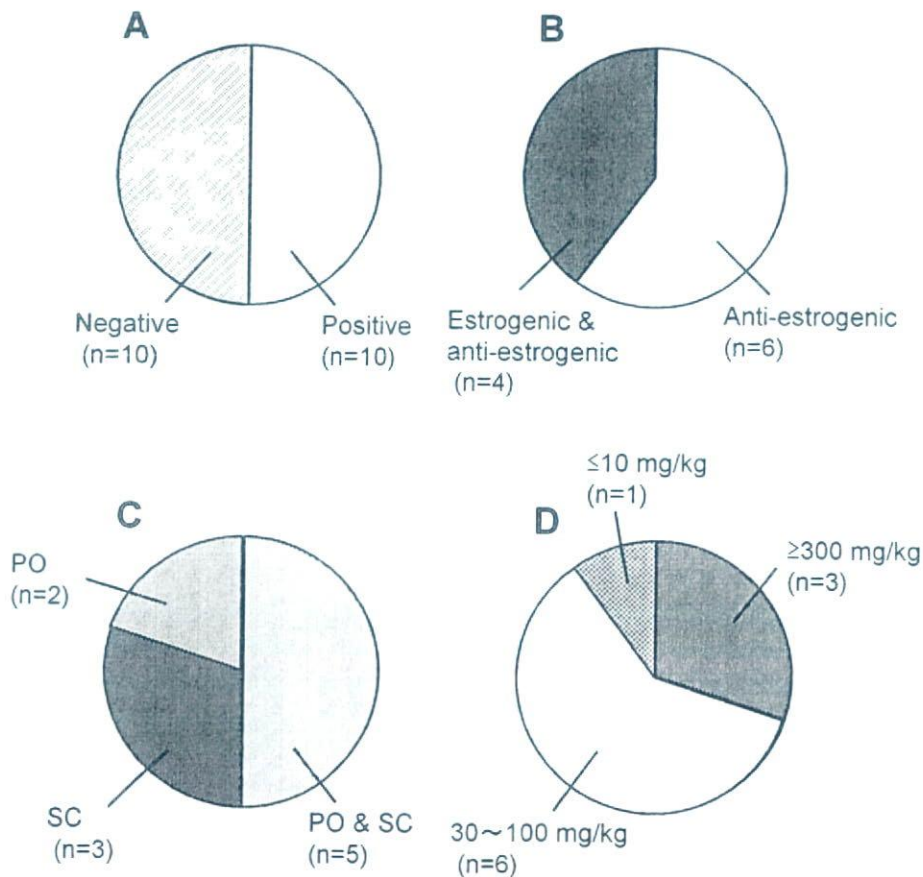


図4 化学物質の卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験

卵巣摘出マウスを用いて20の化学物質について、7日間経口投与方法および7日間皮下投与方法で子宮肥大試験を実施し、結果を集計した。A: 子宮重量に変化がみられた物質の割合, B: 子宮重量に変化がみられた物質を作用別に分類, C: 子宮重量に変化がみられた物質を投与別に分類, D: 子宮重量に変化がみられた物質を最小有効用量で分類。

マウスの系統はC57BL/6J。POは経口投与, SCは皮下投与。



る最小有効用量は、300～1000 mg/kgが3物質（30%）、30～100 mg/kgが6物質（60%）、10 mg/kg以下が1物質（10%）であった（図4D）。図5には、THBPの経口投与方法による子宮肥大試験の結果を示し、表2にはその時採取した子宮および膣の病理組織学的検査の結果を示した。THBP単独投与群では、1000 mg/kg投与群で子宮重量が有意に増加し（図5A）、THBPとEEの併用投与群では、1000 mg/kg投与群で子宮重量が有意に低下した。病理組織像では、300 mg/kg以上の投与群で子宮内膜、腺上皮および筋層、さらには膣の粘膜上皮に陽性対照群と同様の変化がみられた。

## 考察

実験1のEE投与によるマウス子宮肥大試験の結果を、以前実施したSprague-Dawley系ラットを用いた子宮肥大試験<sup>4)</sup>の結果と比較したところ、幼若動物の場合、EEに対する感度は、経口投与方法ではラットの方がやや高いが（図1C）、皮下投与方法では差のないことがわかった（図1D）。一方、卵巣摘出動物の場合、EEに対する感度は、経口投与方法ではラットの方が低く（図2C）、皮下投与方法ではラットの方が高いことがわかった（図2D）。エストロゲンに対する子宮の反応には、系統差がラット<sup>5)</sup>およびマウス<sup>6)</sup>で報告されていることから断定はできないが、今回の試験結果からは子宮肥大試験の感度にラット-マウス間の本質的な差はないと推察される。

マウス子宮肥大試験の問題点として、子宮が著しく小さいことから、重量を測定する前の脂肪除去や膣切断などに熟練を要すると考えられたが、今回の試験結果から、実体顕微鏡を用いることで、この問題点への対応は可能であると判断した。

実験2のBPA単独投与群では、用量に依存して子宮重量が増加したことから、BPAのエストロゲン作用がマウスにおいて確認された。また、今回の子宮重量を増加させる最小有効用量（100 mg/kg）は、BPAを卵巣摘出ラットに皮下投与した際の最小有効用量<sup>4)</sup>と一致したことから、BPAに対する子宮肥大試験の感度にもラット-マウス間の差はないと推定される。一方、BPAとEEの

併用投与群では、子宮重量が低下したことから、BPAの抗エストロゲン作用も確認された。これは、エストロゲン活性の弱いBPAがエストロゲン活性の強いEEの作用を阻害したものと推察されるが、実験3の化学物質の中にもエストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方を示す物質がみられており、山崎ら<sup>7)</sup>も幼若ラットを用いた子宮肥大試験において、18物質中10物質にみられることを報告している。

実験3において、20の化学物質についてマウス子宮肥大試験を実施した結果、化学物質の半数に子宮重量の変化がみられたが、そのうち、エストロゲン作用のみを示した物質はなかった。このことから、化学物質の子宮肥大試験では、エストロゲン作用と抗エストロゲン作用の両方が確認できるように群構成を設定することが必要と考えられる。また、投与経路についても、約半数の物質は皮下のみ、あるいは経口のみで子宮重量に変化がみられたことから、経口と皮下の両方を実施することが望ましいと考えられる。なお、子宮重量を変化させる最小有効用量は、ほとんどが30 mg/kg以上であり、毒性が強い化学物質では、低用量から他の毒性が発現し、子宮肥大試験では変化が見えにくい傾向にあった。

マウスの子宮および膣の病理組織学的検査は、ラットに比べて標本作製が難しいと予想されたが、ホルマリン固定時に子宮を適度に伸展させたことで、標本が作製し易くなった。また、子宮重量の変化との相関も高く、ラットでみられた所見とほぼ同じ像を観察することができた。子宮および膣の組織像には明らかに系統差がみられることから、子宮肥大試験での組織観察には、種や系統間でグレード付けが異なる事態は避けられないと考えられる。しかしながら、病理組織検査は、子宮重量の変化がエストロゲン活性によるものであることを確認する重要な手段であることには変わりはないと考えられる。

本稿では、マウスを用いる子宮肥大試験の検証を目的として、EE投与によるマウス子宮重量増加の用量反応性、BPAやその他種々の化学物質について実施したマウス子宮肥大試験の結果を紹介し、マウス子宮肥大試験は、ラット子宮肥大試験と同様にエストロゲン作用や抗エストロゲン作



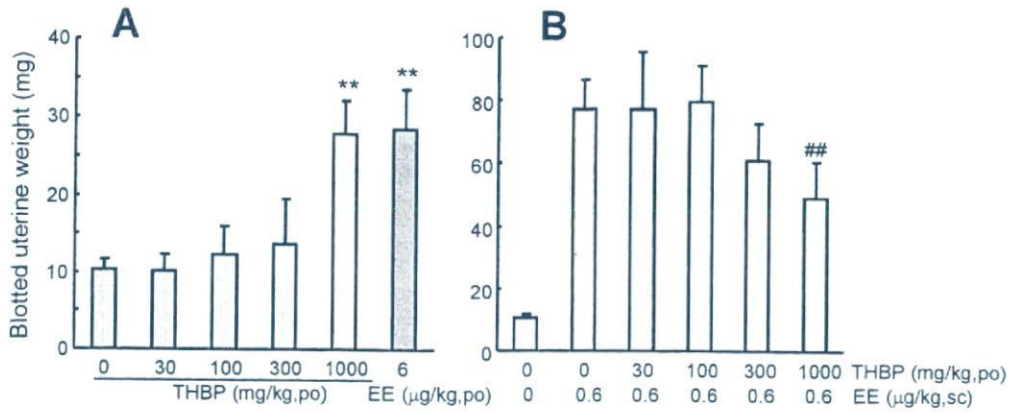


図5 2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン (THBP) の経口投与方法による卵巣摘出マウスを用いた子宮肥大試験

卵巣摘出マウスにTHBPを7日間経口投与し、最終投与の24時間後に測定した子宮重量 (平均±標準偏差) を示す。A: エストロゲン作用を確認する試験, B: 抗エストロゲン作用を確認する試験。

マウスの系統はC57BL/6J。1群当たりの例数は6。

\*, \*\* は0 mg/kg群と比較して有意差 (p<0.05, p<0.01) があることを示す。

## は0 mg/kg BPAと0.6 µg/kg エチニルエストラジオール (EE) の併用投与群と比較して有意差 (p<0.01) があることを示す。

poは経口投与, scは皮下投与。

表2 2,2',4,4'-テトラヒドロキシベンゾフェノン (THBP) の子宮肥大試験における病理組織検査結果

Findings	THBP (mg/kg)	Estrogenic action					Antagonistic action					
		0	30	100	300	1000	0	30	100	300	1000	
	EE (µg/kg)	0	0	0	0	0	6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Uterus												
Luminal epithelial cell												
Hypertrophy		-	-	-	±	±	±	++	++	++	++	+
Mitosis		-	-	-	-	+	+	±	±	±	±	±
Vacuolation		-	-	-	±	+	+	++	++	++	+	++
Glandular epithelial cell												
Hypertrophy		-	-	-	-	±	±	++	++	++	++	+
Vacuolation		-	-	-	-	+	±	±	±	±	±	±
Endometrial stroma												
Edema		-	-	-	-	-	-	±	±	±	±	-
Hypertrophy		-	-	-	±	±	±	++	++	++	++	+
Cellular infiltration, eosinophil		-	-	-	-	±	±	++	++	++	++	++
Myometrium												
Hypertrophy		-	-	-	-	±	±	++	++	++	++	++
Vagina												
Epithelium												
Comification		-	-	-	-	±	±	++++	++++	++++	++++	++
Thickening		-	-	-	±	+	+	++++	++++	++++	++++	++

試験は、卵巣摘出マウスを用いる7日間経口投与方法による。

マウスの系統はC57BL/6J。

エストロゲン作用のエチニルエストラジオール (EE) は経口投与, 抗エストロゲン作用のEEは皮下投与。



用を有する化学物質を検出する試験系として利用できることを示した。

## 謝辞

最後に、本稿の連名者以外で、この研究に携わった者の氏名を掲載し、謝意を表す。野口聡、田子和美、代田真理子、臼見憲司、加藤博康、横田俊二、関 剛幸、大澤徳子、千坂亜希子、今野和則、永田伴子、堀内伸二、稲田浩子、三枝克彦。この研究は、平成13年および14年度厚生労働省厚生労働科学研究費の補助により実施した。

## 文献

- 1) Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., Owens, W.: The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. *Environ. Health Perspect.* **109**: 785-794 (2001)
- 2) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W.: The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: Coded single-dose studies. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1550-1558 (2003)
- 3) Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W.: The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: Dose-response studies. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1530-1549 (2003)
- 4) 太田 亮, 今井 清: ラットを用いる子宮重量試験とハーシュバーガー試験, *アニテックス* **13**: 24-32 (2001)
- 5) Diel, P., Schmidt, S., Vollmer, G., Janning, P., Upmeier, A., Michna, H., Bolt, H.M., Degen, G.H.: Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch. Toxicol.* **78**: 183-93 (2004)
- 6) Ashby, J., Owens, W., Odum, J., Tinwell, H.: The intact immature rodent uterotrophic bioassay: Possible effects on assay sensitivity of vomeronasal signals from male rodents and strain differences. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1568-70 (2003)
- 7) Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Sawaki, M., Imatanaka, N., Shinoda, K., Takatsuki, M.: Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* **183**: 93-115 (2003)



## 特集 環境化学物質の作用メカニズムを解き明かす

## トキシコゲノミクスの新展開

## Percellome プロジェクトによる 2,3,7,8-TCDD - 2,3,7,8-TCDF 比較

An Attempt for Adding a New Dimension to Toxicogenomics Research : 2,3,7,8-TCDD-2,3,7,8-TCDF Comparison Trial in The Percellome Project

菅野 純 相崎健一 五十嵐勝秀 北嶋 聡 中津則之 児玉幸夫 高木篤也

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Satoshi Kitajima, Noriyuki Nakatsu, Yukio Kodama, Atsuya Takagi

Percellome トキシコゲノミクスはマイクロアレイという数万遺伝子の発現レベルを一気に測定するハイスループット技術を利用し、全遺伝子のカスケード解明を最終目標としつつ、従来に比べてより早く安くかつ正確な毒性評価系の確立を目指すものである。筆者らはこのような次世代の毒性評価・予測技術を開発するために、細胞1個当たりの mRNA コピー数を測定する Percellome 法を開発した。今までに 90 以上の化学物質についての網羅的遺伝子発現情報を得て、なお追加中である。本稿では環境化学物質の一例としてダイオキシンの分子毒性に関わる知見を紹介する。

**key words**

Percellome Project, 遺伝子発現カスケード, 分子毒性学

**i** 菅野 純 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 E-mail: kanno@nihs.go.jp

1985年東京医科歯科大学大学院医学研究科博士課程修了。人体病理学、実験病理学専攻。国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長を経て、2002年より同部長。内分泌攪乱関連などの分子毒性学研究。Percellome トキシコゲノミクスプロジェクトなどを厚生労働所掌業務の一環として有機的に推進。

相崎健一、五十嵐勝秀、北嶋 聡、中津則之\*、児玉幸夫、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  
\*現(独)医薬基盤研究所 基盤的研究部

## はじめに

毒性学は生体 (Biosphere) と外来性物質 (Chemosphere) との相互作用を研究する分野であり、目的は“ヒトの安全”である。日常遭遇する化学物質 (生活化学物質、環境化学物質、医薬品や食品を含む) が摂取された際の安全性を担保するため (毒性評価) に、人体実験が困難な場合、身代わりとしての実験動物の毒性所見をヒトに外挿することが行われてきた。これは両者が基本的に同等の生体反応を示すという前提に基づいている。そして、酵素、膜、DNA など比較の普遍的かつ基本的な標的が主な検討対象となってきた。現在の分子毒性学は、生体反応メカニズムに踏み込み、受容体、転写因子などとの選択的結合によるシグナル伝達障害などの標的特異性の高いものや、エピジェネティックな発現影響なども直接的な対象とするようになり、基礎分子生物学と直結する時代に入っている。古い話ではあるもののいまだに分子機構の解明が完結していないサリドマイドの催奇形性問題、あるいは、最近の健常人ボランティアに対するバイオ医薬品 (治療薬) の微量投与がその全員を集中治療室送りにした事件は、種差問題の解決を含む分子毒性評価法の確立の重要性と、その現状を示していると考えられる。

## I. トキシコゲノミクス

分子毒性メカニズム解析のためのツールの1つに mRNA を対象とするトキシコゲノミクスがあり、見落としのない網羅性が要求される毒性学では全遺伝子のカスケード解明がそ

の最終目標となる。これにより従来に比べて早く安く正確な毒性評価を目指すことができる。そして、種差・個体差、一生涯の反応性を修飾する胎生期・周産期影響、あるいは複合作用などを包括的に扱う際には、生命科学の各分野との緊密な連携が必須となる。また、従来の毒性学に対してのトキシコゲノミクスは、例えとしては光学顕微鏡に対しての電子顕微鏡のような立場にあると考えられる。電子顕微鏡が広く用いられるようになるには、教科書や図譜が必要であったように、トキシコゲノミクスの実用化にはある程度の量のデータの蓄積と解析のための基礎研究 (関連分野との連携を含む) が必要である。そこで、筆者らは、情報の互換性を確保するために細胞1個当たりの mRNA 発現コピー数を得る Percellome 手法を開発した。これを基盤としたプロジェクトを展開中であり、今までに 90 以上の化合物についてのデータを蓄積し、その解析ツールを開発している。

## II. Percellome 法

原理は単純で、サンプルの細胞数を測る代わりに DNA 濃度を精密に計測し、それをもとに外部標準 mRNA (スパイク RNA) を細胞1個当たり決まった分子数だけそのサンプルに添加し、そして RNA 抽出・測定に移る。スパイク RNA の測定値を基準に、サンプルの各 RNA の測定値を細胞1個当たりのコピー数に換算する<sup>1)~3)</sup>。これにより、実験操作、試薬やマイクロアレイのロット差などによる系統誤差を相殺するという本来の目的が果されるほか、測定過程における各種の異常が高感度に検出されることから、品質管理精



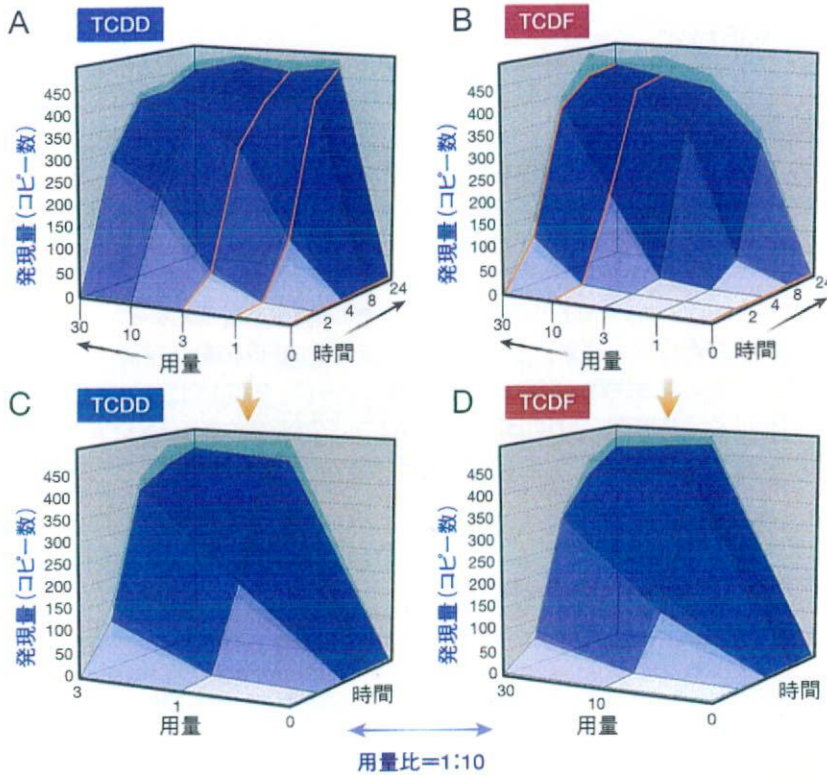


図1. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：  
TEF依存遺伝子の抽出法(1)

TCDDおよびTCDFの単回経口投与をC57BL/6雄マウスに行った。用量は両実験とも0(溶媒対照), 1, 3, 10, および30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ とし、投与後2, 4, 8, および24時間後に肝を採取しマイクロアレイ解析を行った(両動物実験は1カ月を隔てて、国立医薬品食品衛生研究所、環境保全型動物実験施設内にて厳重管理の下に実施された)。代表例としてcytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp1a1; Affymetrix probe ID 1422217\_a\_at)を示す。

A: TCDDによるCyp1a1の発現変動のSurface(反応曲面)表示。  
B: TCDFによるCyp1a1の発現変動のSurface表示。丁度、用量について10倍ずれた反応を示している。  
C: TCDDの3, 1, 0から作製したSurfaceとD: TCDFの30, 10, 0から作製したSurfaceが形状および発現値ともにはほぼ完全に一致している。このような遺伝子をTEF依存性とした。

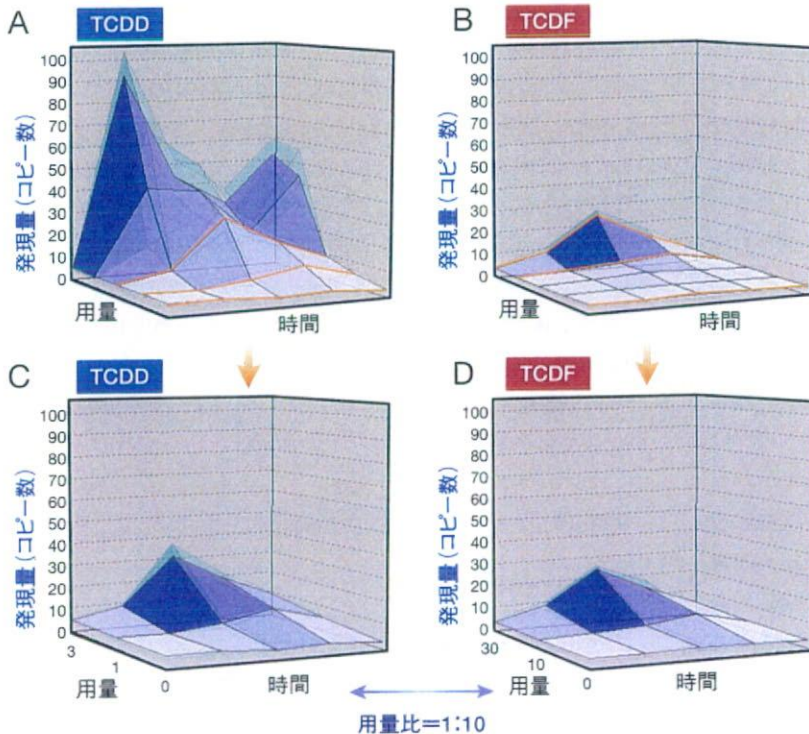


図2. TCDDとTCDFのPercellomeデータ：  
TEF依存遺伝子の抽出法(2)

TEFに従うもう1つの例としてTCDD-inducible poly (ADP-ribose) polymerase (Tiparp; 1452160\_at)を示す。A, B, C, Dは図1と同様の表示。AとBを比較すると一見違った反応をしているようだが、CとDを比較するとTEF依存性であることがわかる。

度の向上が図られている。例えば、高密度マイクロアレイで問題となるプローブの飽和によるダイナミックレンジの狭小化の検証・回避に役立っている。新世代Affymetrix GeneChipにおいて高発現遺伝子プローブが容易に飽和し高用量域で定量性を失う現象は、一般的なデータ標準化手法

では検出困難であり、Percellome法を用いて初めて直接的に感知することができる。現在、筆者らはサンプルRNA量をメーカー推奨プロトコルの半量にすることなどにより効率的にこれを回避している。



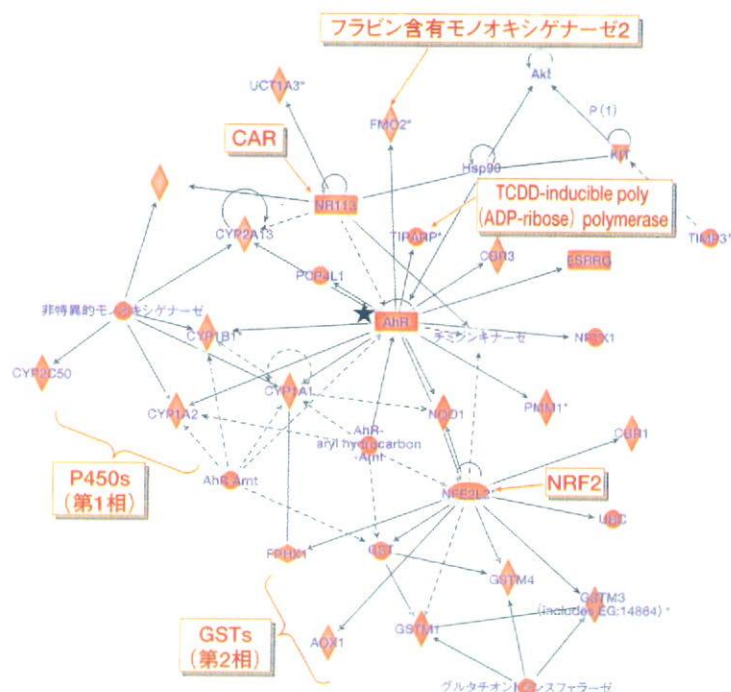


図3. TEF 依存遺伝子の描く Pathway

図1, 2の方法で抽出されたTEF 依存遺伝子約140をIngenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.)に投入し, 得られるPathwayの代表的なものを示す。AhR (★)を中心にNRF2を含む転写因子群を介して, 第1相および第2相の代謝酵素を含むAhR 依存的な遺伝子を認める。

赤色; 計算に投入したTEF 依存遺伝子のうち, このPathwayに含まれるもの。

灰色; Pathwayのメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの。

### III. Percellome Project

マウス肝を中心とした約90化合物(毒性学的情報の豊富なもの)の単回暴露による初期応答遺伝子データベースを構築するとともに, シックハウス症候群<sup>注1</sup>を考慮した低用量域での吸入トキシコゲノミクス, 発生毒性についての胎児トキシコゲノミクス, また*in situ* ハイブリダイゼーションによる局在確認系を立ち上げた。現在, これらに加えて反復暴露による慢性毒性, および多臓器間の関連性を検討する研究を展開中である。データの一部はホームページ(<http://toxicomics.nihs.go.jp/db/>)にて公開中であり, 今後, 内容を拡充する予定である。

ここで, 本プロジェクトにより明らかとなった一般的な注意点について簡単に触れる。それは, 再現性の高いデータを得るためには実験管理を厳重にする必要があるという点である。マウス肝で有意に発現する12,000(いずれかの時点で3コピー/細胞以上)の遺伝子のうち, 概日変動を示す遺

伝子が3,600以上あり, 最大で数十倍以上の発現差が見られる。この変動が実験の邪魔をしないようにするためには, 動物飼育施設の明暗サイクルを2週間以上一定に保ちマウスの概日リズムを安定化し, そのうえで, マウスに検体を投与する時刻, およびサンプルを採取する時刻を±30分以内に限定する必要がある。概日リズムは肺, 腎, 脳, 心, 胸腺などにも明瞭に存在するので, 同様の注意が必要である。培養細胞実験においても細胞密度, 培地交換, シャーレのインキュベーター内の位置, 倒立顕微鏡での観察の影響(操作による培地攪拌による刺激), 多穴プレートでは辺縁と中央の違いなどが, 遺伝子発現データに大きく影響することを観察している。

### IV. Percellome を活かしたデータ解析

Percellome法の絶対量化データの最大の特徴は, 原点(zero)から表示可能なコピー数という“名数”である点にある。基底発現量がわかる, データの四則演算が可能であり, 例えば処置群から溶媒対照群の値を引くことで概日リズムや溶媒による影響を容易に取り除くことができる, などの利点が多い。これらは発現比を用いた解析では問題となる操作であるが, Percellome法であれば自然な処理が可能である。さらに, この性質を利用し, 用量と時間が発現変動を規定するとの前提に基づき, 用量・時間・発現値を三次元直行座標に置いた1つの三次元グラフに反応曲面(Surfaceと呼称)として可視化して, 直感的なデータの把握を実現している。1つの化合物についてGeneChipのプロープセット数に対応する約45,000枚のSurfaceが描出される。この中から生物学的に有意であると考えられるパターンを含む特徴的な発現パターンを効率的に自動的抽出するRSort(Surfaceの凹凸の特徴を解析し, その明瞭さの順にソートする)アルゴリズムを考案, 活用している。また, 別途に独自開発した教師無しクラスタリングアルゴリズム(MADIC<sup>4</sup>)など)を活用して, 発現パターンが類似しているものを網羅的にクラスター化している。2枚のSurfaceの形の類似性を数値化するアルゴリズム(tmf)も開発済みであり, 注目すべき遺伝子の発現パターンを鋳型として同様の発現誘導パターンを呈する遺伝子を自動抽出できるようになっている<sup>5</sup>。

### V. TCDDとTCDFのPercellome比較によるTEF 依存遺伝子および非依存遺伝子の解析アプローチ

ここでは解析例として, TCDD(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin)とTCDF(2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran)の遺伝子発現応答データを比較しTEF(toxicity equivalence

注1 住宅の高気密化や化学物質を放散する建材・内装材の使用などにより, 新築・改築後の住宅やビルにおいて, 化学物質による室内空気汚染などにより, 居住者に生じる様々な健康障害の総称。



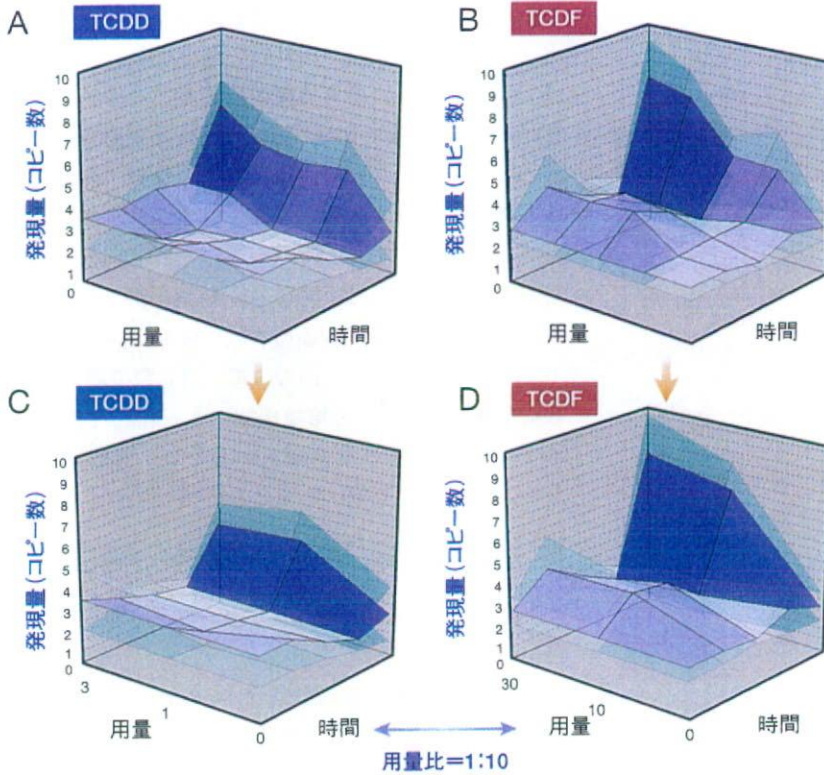


図4. TEF 非依存遺伝子

TEF に従わない遺伝子の一例として、Hectd2 (HECT domain containing 2, 1433944\_at) の Surface を示す。A, B, C, D は図1と同様の表示。2時間目の応答の違いのほか、24時間目の応答が TCDF > TCDD である。

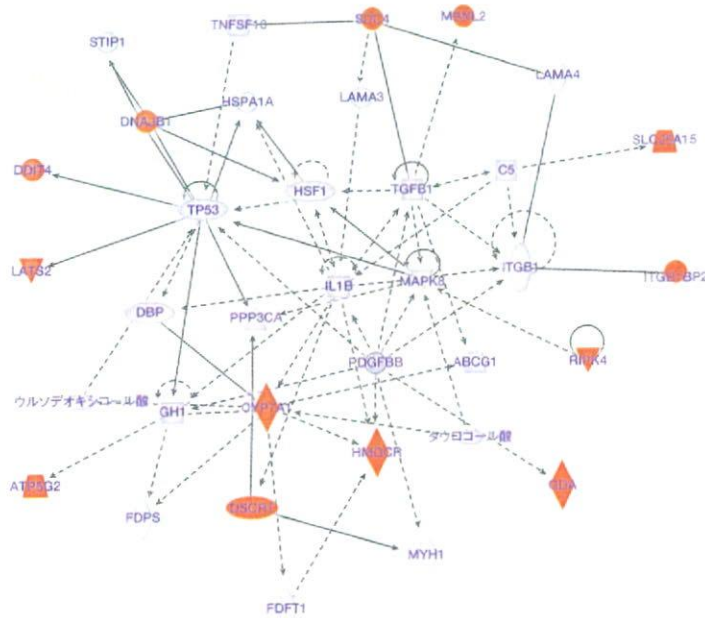


図5: TEF 非依存遺伝子の描く Pathway

図1の方法を利用し抽出されたTEF非依存遺伝子約20をIngenuity Pathways Analysis 5.5 (Ingenuity Systems, Inc.) に投入し、得られるPathwayの代表的なものを示す。AhRは含まれず、p53, TGF-β, MAPK8などが見られる。赤色; 計算に投入したTEF非依存遺伝子のうち、このPathwayに含まれるもの。灰色; Pathwayのメンバーとしてソフトウェアが拾ったもの。

factor)<sup>6)</sup>に従う遺伝子と従わない遺伝子を検討した事例を紹介する。

ダイオキシン類, すなわちダイオキシン, ジベンゾフラン, およびコプラナー-PCBは、そのいずれにもベンゼン環に結合する塩素の数の違う異性体や同族体が多数あり、個々はそれぞれダイオキシンとしての生物活性の強さ、例えば*in vitro*実験系でCyp1a1の発現を誘導する能力に違いがある。他方、環境中では、これらダイオキシン類の同族体などを様々な比率で含む混合物として検出されることから、その生物影響の総体強度を推定するために、個々の同族体の活性を合計して評価することが行われている。その際の強度の単位にTEFが用いられる。TEFは最も活性が強い2,3,7,8-TCDDを1とし、2,3,7,8-TCDFは0.1, 1,2,3,7,8-pentachlorodibenzofuranは0.05, などとして表す。なお、TEFの値は、ほぼ、AhR結合能に比例していることが経験的に知られている。

ダイオキシン毒性は、受容体原性毒性の典型であり、その説明には“AhRノックアウトマウスがダイオキシン投与に対し事実上無反応”であることが用いられる。すなわち、このノックアウトマウスでは、体中に広がったTCDDはそこにある酵素や膜などの生体分子に対して何の影響も与えないことを示している。野生型のマウスがTCDDで死ぬのはAhRが存在するからであり、言い換えれば、AhRからの異常なシグナルによるという