

厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
OECD プログラムにおいて TG と DA を開発するための AOP に関する研究

平成30年度 分担研究報告書

非遺伝毒性発がんの免疫組織化学染色による評価法確立

研究分担者 チョウ ヨンマン

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 病理部 室長

研究要旨

非遺伝毒性の発がん機序には、prolactin (PRL) や甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone : TSH)、thyroxine (T4) を含む各種ホルモンレベルの増加と関連しているものが多い。近年、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) では試験法ガイドライン (TG : Test Guideline) 408 のげっ歯類を用いた 90 日間反復投与毒性試験において、triiodothyronine (T3)、T4 や TSH などの測定を決定したことから、各種ホルモンレベル測定の重要性は認識されているが、より感度の高い測定方法、あるいは、血清以外を用いたホルモンの解析方法が必要と考えられる。30 年度においては、ラットを用いてホルモン濃度が亢進している陽性臓器の病理組織標本のサンプルセットを作製するとともに、既存のサンプルを用いて染色条件を検討した。その結果、雌雄の aminotriazole (AMT) 群及び propylthiouracil (PTU) 群で T3 及び T4 の有意な低値、aminogluthethimide (AGT) 群で副腎皮質刺激ホルモン (Adrenocorticotrophic hormone、ACTH) の有意な高値が認められ、作製したサンプルセットが今後の検討に有用であることが示された。AMT 群、PTU 群及び AGT 群の全例で甲状腺の肥大/過形成並びにコロイドの枯渇が認められた。AMT 群及び PTU 群の全例で副腎皮質の萎縮が、AGT 群の全例で副腎皮質のびまん性空胞化が認められた。正常ラットの甲状腺における T4、calcitonin 並びに下垂体における ACTH、PRL の免疫染色条件を確立した。今後は染色可能な抗体を増やすと共に映像解析ソフトを用いた輝度の測定及びハウスキーピング・タンパクによる標準化の方法を確立し、陽性細胞の輝度データが、実際の血液中ホルモン濃度と相関するか検討を進める。

A. 研究目的

非遺伝毒性の発がん機序には、prolactin (PRL) や甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone : TSH)、thyroxine (T4) を含む各種ホルモンレベルの増加と関連しているものが多い。有害性発現経路 (AOP : Adverse Outcome Pathway) には、一つの標的分子への作用 (Molecular Initiating Event, MIE) 及び重要な事象 (Key Event, KE) が測定可能であることが必須とされているこ

とから、血中 PRL、TSH 及び T4 は非遺伝毒性の発がん機序における MIE 又は KE になり得ると考えられる。更に近年、経済協力開発機構 (Organisation for Economic Co-operation and Development : OECD) では試験法ガイドライン (TG : Test Guideline) 408 のげっ歯類を用いた 90 日間反復投与毒性試験において、triiodothyronine (T3)、T4 や TSH などの測定を決定したことから、毒性の意義やヒトへの外挿性を考慮する上でも、

重要な指標ではあるが、通常の方法 (ECLIA)によるホルモンの測定にホルモンの測定には0.4~0.5 mlの血清が必要であり、ラットでは可能であるが、マウスでは困難である。より感度の高い測定方法、あるいは、血清以外を用いたホルモンの解析方法が必要と考えられる。

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機序に関連する、PRL、TSH、T4を含む各種ホルモンレベルの簡便な定量的検出法の確立を試みる。通常動物実験で得られる標本から検討可能な免疫染色を用いて検討を進める。30年度においては、ラットを用いてホルモン濃度が亢進している臓器の病理組織標本のサンプルセットを作製するとともに、既存のサンプルを用いて染色条件を検討した。

B. 研究方法

既存のラット甲状腺及び下垂体のホルマリン固定、パラフィン包埋サンプルを用いて、ACTH (Peninsula社 #T-4002、rabbit polyclonal)、prolactin (Abcam社 #ab183967、rabbit monoclonal、clone EPR19386)、thyroxin (Novusbio社 #NB110-7978、mouse monoclonal、clone XM212)、calcitonin (GeneTex社 #GTX28553、rabbit polyclonal)、TSH (BIO-RAD社 #8924-1709、rabbit polyclonal)、triiodothyronine (MyBioSource社 #MBS2025743、mouse monoclonal)及び β -actin (Sigma-Aldrich社 #A2228-100UL mouse monoclonal、clone AC-74)抗体の免疫染色条件(希釈倍率、抗原賦活化有無及び条件)を検討した。

動物実験は基礎食 (Basal diet) 群、1000 ppm aminotriazole (AMT) 群、20 ppm vitamin D₃ (VD3) 群、50 ppm propylthiouracil (PTU) 群、500 ppm phenobarbital (PB) 群、6000/1500 ppm aminogluthimide (AGT) 群、10 ppm estradiol (E2) 群の7群を設置した。AMT、PTUは飲水、VD3、PB、AGT、E2は混餌投与した (Fig. 1)。投与量は過去に報告さ

れている短・中期試験の最大耐量に基づき設定した。6週齢SDラット(雌雄各群5匹)に被験物質を経口投与し、29-30日目にイソフルラン吸入麻酔下にて後大動脈からの採血後、放血し、解剖した。肝臓、腎臓、甲状腺、下垂体、卵巣、精巣及び副腎は重量測定を行い、それらに加え脾臓及び子宮についてホルマリン固定後、パラフィン包埋切片、HE標本を作製し、病理組織学的検討を行った。

血液学的検査として、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン量(HGB)、ヘマトクリット値(HCT)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球色素量(MCH)、平均赤血球色素濃度(MCHC)、網状赤血球比率(RET)、血小板数(PLT)、白血球数(WBC)を、白血球分類においては好中球(NEUT)、リンパ球(LYMPH)、単球(MONO)、好酸球(EO)、好塩基球(BASO)の各比率を多項目自動血球計数装置(ProCyte DX、IDEXX laboratories)により測定および算出した。

血清生化学的検査として、総タンパク(TP)、アルブミン/グロブリン比(A/G)、アルブミン(ALB)、総ビリルビン(T-BIL)、グルコース(GLU)、トリグリセリド(TG)、総コレステロール(T-CHO)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE)、ナトリウム(Na)、クロール(Cl)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、無機リン(IP)、アスパラギン酸トランスアミナーゼ(AST)、アラニントランスアミナーゼ(ALT)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ(γ -GT)の各項目を測定した。また、T3、T4、TSH、ACTH、卵巣刺激ホルモン(Follicle stimulating hormone、FSH)、黄体化ホルモン(Luteinizing hormone、LH)、PRL、estradiol、progesterone、testosteroneなどの血清中濃度測定を実施した。

統計解析

データはMicrosoft Excelにより集計し

Basal diet 群を基準とした Dunnett の検定を行い、 $p<0.05$ を有意とした。図標中には、 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ で有意差の程度を示した。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌及び飲水投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてイソフルランの吸入麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物実験、飼育および管理に当たっては、「国立医薬品食品衛生研究所動物実験に関する指針」に従い、動物の愛護に十分配慮して行った。

C. 研究結果

C.1. 免疫染色条件確立 (Fig. 2)

既存のラット甲状腺及び下垂体のサンプルを用いて、ACTH (下垂体、抗原賦活化：クエン酸緩衝液 pH6.0 (関東化学)、Autoclaving 121°C 15min、希釈倍率：x16,000)、prolactin (下垂体、抗原賦活化：Antigen retrieval solution pH9.0 (Dako)、Autoclaving 121°C 15min、希釈倍率：x8,000)、T4 (甲状腺、抗原賦活化：クエン酸緩衝液 pH6.0 (関東化学)、Autoclaving 121°C 15min、希釈倍率：x2,000) 及び calcitonin (甲状腺、抗原賦活化：クエン酸緩衝液 pH6.0 (関東化学)、Autoclaving 121°C 15min、希釈倍率：x200) 抗体の免疫染色条件を確立した。ACTH は下垂体前葉の好塩基性細胞と中間葉細胞が、PRL は下垂体前葉の好酸性細胞が、T4 は甲状腺濾胞上皮と一部の腺腔内のコロイドが、calcitonin は甲状腺 C 細胞が陽性を示した。

C.2. 一般状態および死亡動物

29-30 日間の試験期間を通じ、死亡動物は認められなかったが、6000 ppm AGT 群で著しい体重増加抑制が認められ、投与量を 1500 ppm に変更した。

C.3. 体重および摂餌量 (Fig. 3)

雌雄 AGT 雄及び雄 E2 群において、投与 1 週目以降、雌雄 VD3 群及び雄 PTU 群において、投与 2 週目以降、雌雄の AMT 群及び雌の PTU 群において、投与 3 週目以降、Basal diet 群に比較して有意な体重増加抑制が認められた。投与 1 週目の雄 PB 群及び 2 週目の雌 E2 群において Basal diet 群に比較して各々有意な体重増加及び減少認められた。摂餌量については、雌雄 AGT 群で、投与 2 週間、低い傾向が認められ、飲水量については、雌雄 VD3 群で、投与 2 週間、高い傾向が認められた。

C.4. 血液学的、血清生化学的及びホルモン濃度検査 (Table 1、2、3)

血液学的検査では、雄の AMT、VD3 及び PTU 群で MCHC の増加及び RET 及び PLT の低下が認められた。AMT 群で RBC、HGB 及び HCT、VD3 群で RBC、PTU 群で HGB、BASO 及び AGT 群で RET の増加が認められた。PTU 群の WBC、AGT 群の RBC、HGB 及び HCT の低下が認められた。雌の AMT 及び PTU 群で MCHC の増加及び RET の低下が認められた。AMT 及び VD3 群で MCV、PTU 群で PLT、PB 群で BASO、AGT 群で MCHC の低下が認められた。AGT 群で MCV 及び RET の増加が認められた。

血清生化学的検査において、雄 AMT 及び PTU 群の ALB、T-CHO、BUN、CRE の増加及び TG 及び IP の低下が認められた。AMT 群で T-BIL、ALT、VD3 群で Ca、PTU 群で TP、PB 群で IP、AGT 群で T-CHO、 γ -GT の増加が認められた。VD3 群で TG 及び K、PTU 群で K、AGT 群で TG、Cl、K、E2 群で AST の低下が認められた。雌の AMT、PTU 群で BUN、CRE の増加及び IP の低下が認められた。AMT、VD3 及び AGT 群の TG の有意な低下が認められた。VD3 群の TP、ALB、AGT 群の Cl、K、AST、E2 群の Na の低下及び VD3 群の Ca 及び AGT 群の T-CHO、 γ -GT の増加が認められた。

血清中のホルモン濃度検査において、雌雄 AMT 及び PTU 群の T3、T4 の有意な低下及び AGT 群の ACTH の有意な増加が認められた。雄 E2 群で T3、T4 の増加及び AGT 群で T3 の低下が認められた。何れの群の TSH も測定限界以下 (0.005 μ IU/mL) であった。

C.5. 臓器重量 (Table 4)

雌雄の AMT 群及び PUT 群の甲状腺、PB 群の肝臓の絶対・相対重量の増加が認められた。雌雄の AMT 群及び PUT 群の副腎、肝臓、腎臓の絶対重量の減少、VD3 群の下垂体及び肝臓の絶対重量の減少が認められた。雌雄 AMT 群の肝臓の相対重量の減少及び VD3 群の副腎、腎臓の相対重量の増加が認められた。雄 AMT 群、VD3 群、PTU 群、AGT 群及び E2 群の精巣の相対重量の増加が認められた。雄 E2 群の副腎の絶対重量増加及び AGT 群の下垂体、腎臓、E2 群の肝臓、腎臓の絶対重量の減少が認められた。雄 AMT 群、PTU 群の下垂体、AGT 群の副腎及び肝臓、E2 群の副腎の相対重量の増加が認められた。雌 AGT 群の甲状腺の絶対・相対重量の増加が認められた。雌 AGT 群の肝臓絶対重量、腎臓の相対重量の増加が認められた。VD3 群の卵巣絶対重量の低下、PTU 群の副腎、肝臓の相対重量の低下が認められた。

C.6. 病理組織学的検索 (Fig. 4, Table 5)

雌雄の AMT 群、PTU 群及び AGT 群の全例において、甲状腺濾胞上皮の肥大、過形成、コロイドの枯渇及び下垂体前葉細胞の肥大・空胞化が認められた。雌雄の AMT 群及び PTU 群の全例において、副腎皮質の萎縮が認められ、AGT 群の全例において、副腎皮質の空胞化が認められた。雌雄 PB 群の全例において、甲状腺濾胞上皮の肥大が認められた。雄の PB 群の 5 例中 4 例で下垂体前葉細胞の肥大及び空胞化が観察された。雌の PB 群の 5 例中 1 例で下垂体

前葉細胞の肥大が認められた。雄 AMT 群の 5 例中 1 例で副腎皮質の過形成が認められた。雄 VD3 群の 5 例中 1 例で嚢胞及びラトケ嚢遺残が観察された。

D. 考察

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機序に関連する、PRL、TSH、T4 を含む各種ホルモンレベルの簡便な定量的検出法の確立を試みており、30 年度においては、ラットを用いてホルモン濃度が亢進している臓器の病理組織標本のサンプルセットを作製するとともに、既存のサンプルを用いて染色条件を検討した。

既存のラット甲状腺及び下垂体のサンプルを用いて、ACTH (下垂体前葉細胞)、PRL (下垂体前葉細胞)、T4 (甲状腺濾胞上皮)、calcitonin (甲状腺 C 細胞) 抗体の免疫染色条件を検討したところ、各々標的とする細胞に陽性反応が認められたことから、上記 4 つの抗体について免疫選諸条件の確立が出来た。実験動物に用いられる免疫染色用の抗体は多く知られているが、ホルモンの抗体は数が少ない (Furukawa S et. al., J Toxicol Pathol. 2016;30:79-107)。定量的検出法の確立を考慮すると入手が容易でホルマリン固定・パラフィン包埋標本に確実に染まる抗体が望ましい。

除草剤である AMT を投与した群において、雌雄 T3、T4 の低値、甲状腺重量の高値、甲状腺濾胞上皮の肥大、過形成、コロイドの枯渇、下垂体前葉細胞の空胞化及び副腎皮質の萎縮が認められた。AMT はラットにおいて抗甲状腺作用を示すことが知られており、甲状腺ホルモン、甲状腺濾胞上皮の病変は AMT 投与の影響と考えられた (Jukes TH et. al., Science 1960;132:296-7)。下垂体の病変は T3、T4 の低下に影響を受けた向甲状腺細胞に起因したと考えられるが、血清中の TSH の濃度が測定限度以下であったことで変化の確認が出来なかったことから、検出感度の優れた方法で再検討を行う必要があ

ると考えられた。TSH に加え、FSH、LH、PRL 及び testosterone の再検討も望ましい。甲状腺機能低下症は副腎皮質の萎縮及び副腎皮質ホルモン産生抑制を誘導することが知られている (Jukes TH et. al., J Embryol Stem Cell Res 2018;2:1-5)。AMT と共にチロシン残基とヨウ素結合を阻害することで甲状腺作用を示す、甲状腺機能亢進症治療薬 PTU を投与したラットにおいて、AMT 投与群と殆ど同じ甲状腺ホルモン濃度、臓器重量及び病理組織学的所見が認められた。抗てんかん薬である PB は肝ミクロソーム酵素を誘導し甲状腺障害作用を示す。PB 投与群では雌雄ラットの肝臓絶対・相対重量の増加及び甲状腺濾胞上皮に肥大、雄ラットの下垂体前葉細胞に空胞化及び肥大が認められた。雌の下垂体において、明らかな病変が認められなかったのは PB の薬力学における性差の可能性が考えられた (Hoffman A et. al., 大・空胞化及び副腎皮質の萎縮が認められた。AGT は下垂体前葉 ACTH 産生細胞の過形成を誘導することが知られている (Zak M et. al., Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol 1985;49:93-106)。AGT は ACTH 産生細胞のみならず、性腺刺激ホルモン分泌細胞及び向甲状腺細胞を刺激し、過形成を誘導することから、甲状腺等の病変も誘発したと考えられる。

性ホルモンである E2 を投与したラットにおいて、雄 T3、T4 の高値が認められた。下垂体の明らかな病理組織学的所見が認められなかった原因は、摂餌量の低下による被験物質のばく露量の減少傾向であると考えられた。

今後は染色可能な抗体を増やすと共に映像解析ソフトを用いた輝度の測定及びハウスキーピング・タンパクによる標準化の方法を確立し、陽性細胞の輝度データが、実際の血液中ホルモン濃度と相関するか検討を進める予定である。

E. 結論

本分担研究では、非遺伝毒性の発がん機

Pharmaceutical Research 1989;6:976-81)。T3、T4 及び TSH を標的とするサンプルセットの作製は遂行できた。

高カルシウム血症を誘導することで甲状腺 C 細胞に過形成を誘導する VD3 を投与した群では雌雄の血清中 Ca 濃度の有意な増加が認められたものの、甲状腺 C 細胞の明らかな病理組織学的所見は認められなかった。1 ヶ月以上 VD3 を投与した実験の結果から、高カルシウム血症にもかかわらず、VD3 中毒が原因で甲状腺 C 細胞の肥大・過形成が認められないとの報告があった (Martin Lacave I et. al., J Endocrinol Invest 1998;21:102-8)。

副腎皮質抑制薬 AGT を投与した雌雄ラットにおいて、血清 T3 の低下又は低下傾向、血清 ACTH 濃度の増加、甲状腺重量の増加又は増加傾向、甲状腺濾胞上皮の肥大・過形成、コロイドの枯渇、下垂体前葉細胞の肥大に関連する、PRL、TSH、T4 を含む各種ホルモンレベルの簡便な定量的検出法の確立を試みる。30 年度においては、病理組織標本のサンプルセットを作製するとともに、既存のサンプルを用いて染色条件を検討した。ラット甲状腺及び下垂体のサンプルを用いて、ACTH (下垂体前葉細胞)、PRL (下垂体前葉細胞)、T4 (甲状腺濾胞上皮)、calcitonin (甲状腺 C 細胞) 抗体の免疫染色条件を確立した。又、明らかなホルモン濃度の変動及び病理組織学的病変を示すサンプルセットを作製することが出来たが、一部のホルモンは検出感度の優れた方法での再検討が望まれた。今後は染色可能な抗体を増やすと共に映像解析ソフトを用いた輝度の測定及びハウスキーピング・タンパクによる標準化の方法を確立し、陽性細胞の輝度データが、実際の血液中ホルモン濃度と相関するか検討を進める。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

なし

F.2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

G.1. 特許取得

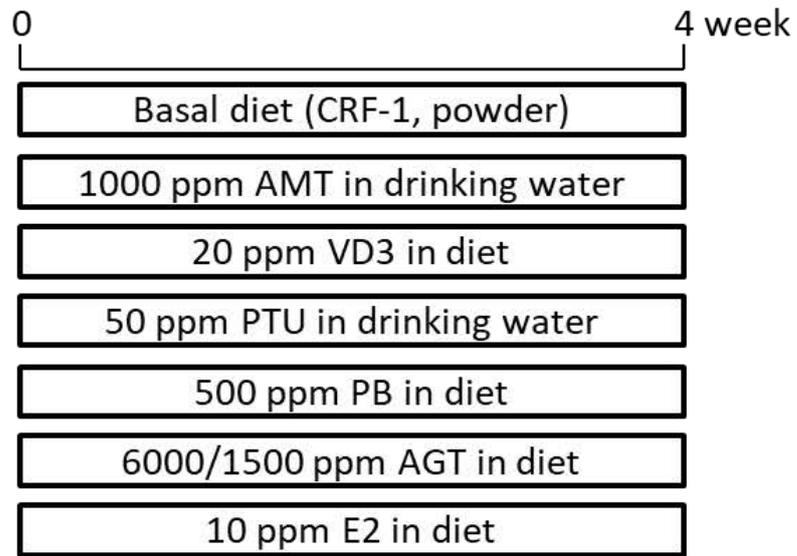
なし

G.2. 実用新案登録

なし

G.3.その他

なし



Animal 6-week old male and female SD rats (n=5/sex/group)

Figure 1. 実験デザイン

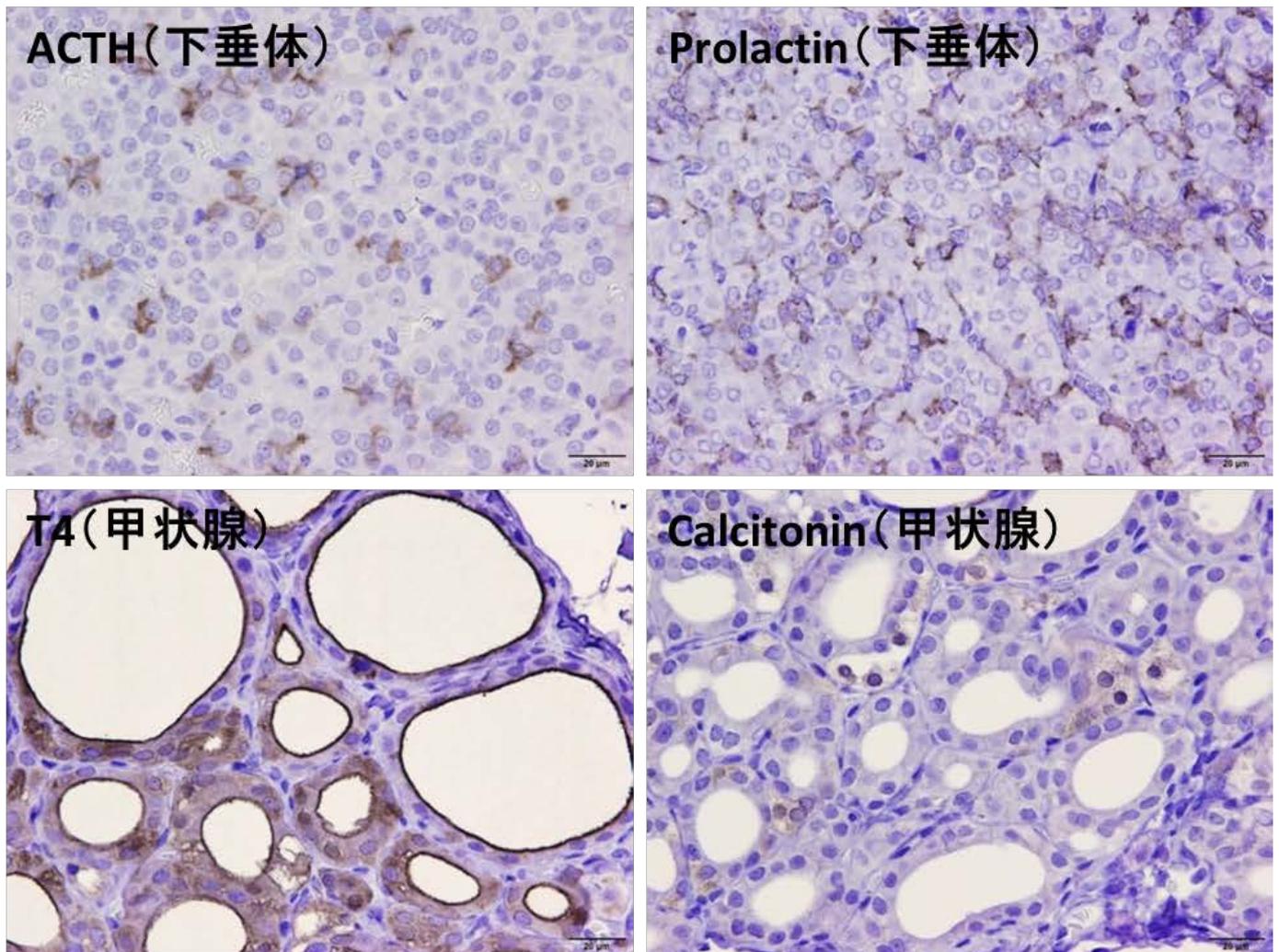


Figure 2. 既存サンプルを用いた免疫染色

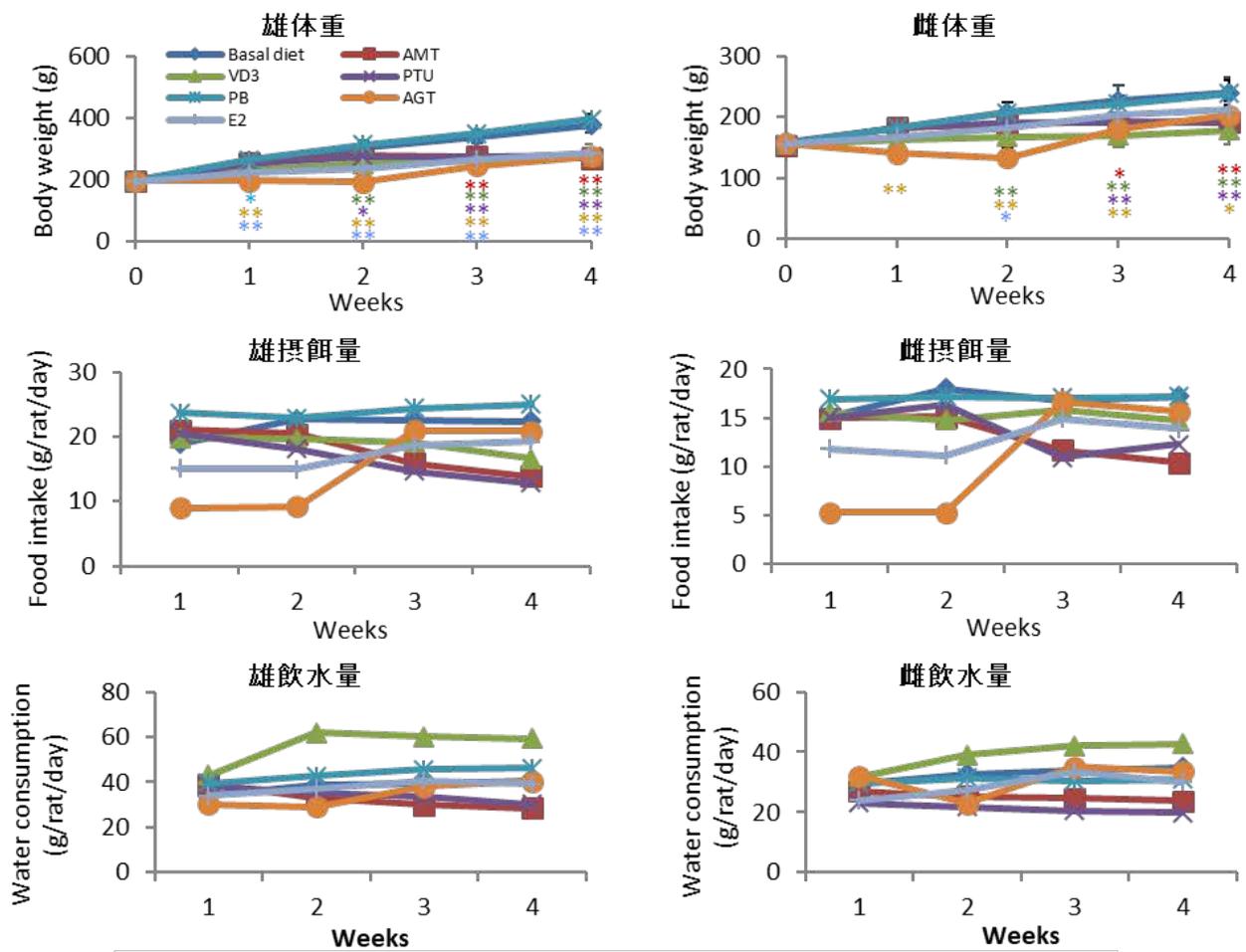


Figure 3. 体重、摂餌量、飲水量

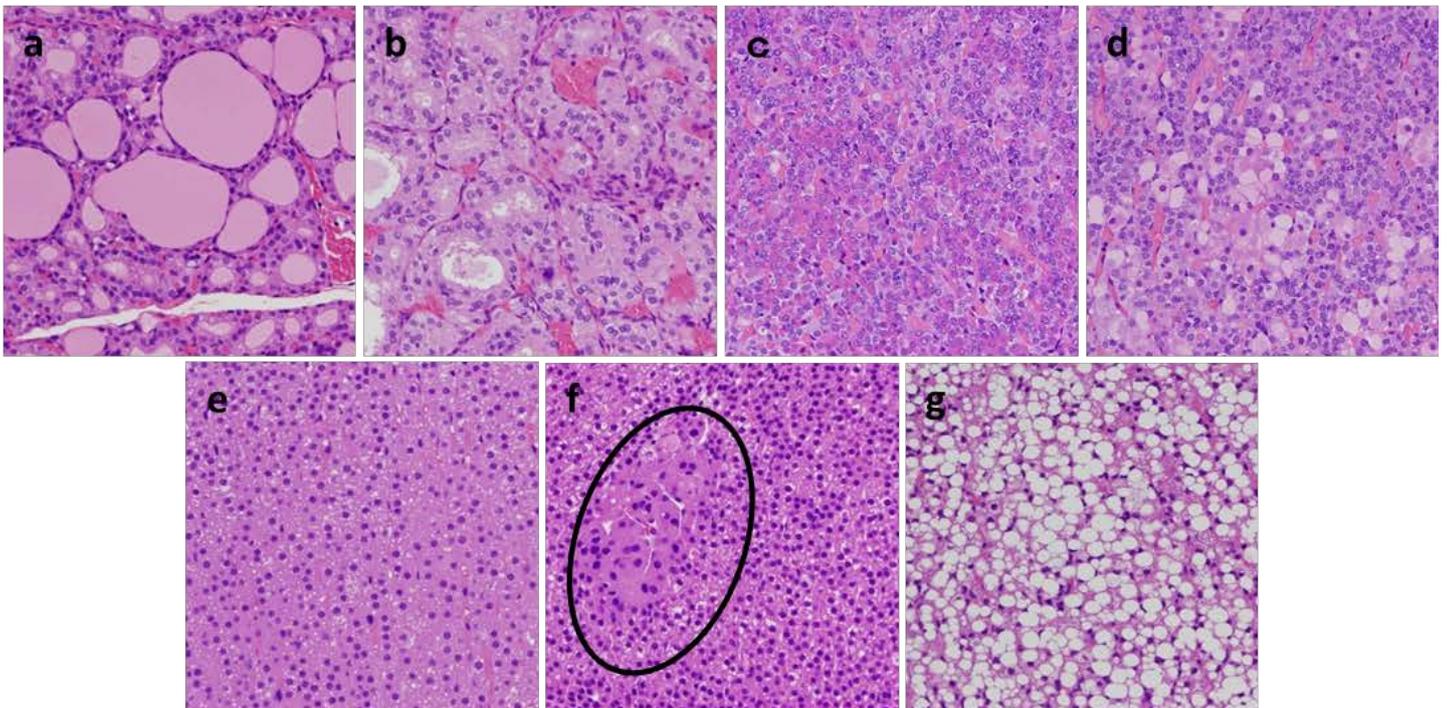


Figure 4. 病理組織像

- a 正常甲状腺 (対照群)、b 甲状腺の肥大、過形成及びコロイドの枯渇 (AMT群)、
 c 正常下垂体 (対照群)、d 下垂体前葉の空胞化 (AMT群)、
 e 正常副腎皮質 (対照群)、f 副腎皮質過形成 (円内) 及び萎縮 (AMT群)、g 副腎皮質の空胞化 (AGT群)

Table 1. Hematology data for SD rats

		Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2
<i>Male</i>								
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
RBC	$\times 10^6/\mu\text{l}$	7.4 ± 0.3	$8.5 \pm 0.5^{**}$	$8.2 \pm 0.6^*$	8.1 ± 0.6	7.5 ± 0.3	$6.5 \pm 0.4^*$	7.5 ± 0.3
HGB	g/dL	14.0 ± 0.4	$15.9 \pm 0.7^{**}$	15.2 ± 0.9	$15.3 \pm 0.6^*$	14.2 ± 0.3	$12.6 \pm 0.8^*$	14.4 ± 0.8
HCT	%	42.2 ± 1.8	$46.3 \pm 2.4^*$	44.4 ± 2.1	44.5 ± 2.3	42.4 ± 1.2	$38.3 \pm 2.4^*$	42.3 ± 2.7
MCV	fL	56.9 ± 1.0	54.7 ± 1.7	54.2 ± 1.9	54.9 ± 1.9	56.8 ± 1.4	59.2 ± 6.4	56.7 ± 2.4
MCH	pg	19.0 ± 0.3	18.8 ± 0.7	18.5 ± 0.6	18.9 ± 0.6	19.0 ± 0.4	19.6 ± 2.0	19.2 ± 0.7
MCHC	g/dL	33.3 ± 0.4	$34.4 \pm 0.3^{**}$	$34.2 \pm 0.5^*$	$34.3 \pm 0.7^{**}$	33.5 ± 0.3	33.0 ± 0.6	33.9 ± 0.3
RET	%	3.2 ± 0.3	$0.4 \pm 0.1^{**}$	$1.9 \pm 0.7^{**}$	$0.6 \pm 0.2^{**}$	3.0 ± 0.5	$5.4 \pm 0.4^{**}$	2.8 ± 0.5
PLT	$\times 10^3/\mu\text{l}$	977.2 ± 127.7	$793.6 \pm 92.0^*$	$650.2 \pm 140.7^{**}$	$757.4 \pm 60.6^*$	1037.6 ± 67.2	943.6 ± 133.1	1013.0 ± 67.2
WBC	$\times 10^3/\mu\text{l}$	6.4 ± 2.3	4.2 ± 2.4	4.3 ± 1.2	$2.7 \pm 1.3^*$	5.3 ± 2.3	4.1 ± 1.0	3.5 ± 1.7
Differential cell count								
NEUT	%	14.7 ± 5.7	13.9 ± 2.9	14.2 ± 5.6	12.7 ± 3.5	13.3 ± 5.1	11.1 ± 2.6	14.5 ± 3.8
LYMPH	%	81.3 ± 6.2	80.7 ± 2.4	81.2 ± 6.3	83.0 ± 4.1	82.6 ± 5.4	83.4 ± 3.8	81.0 ± 4.5
MONO	%	3.0 ± 0.7	3.2 ± 0.7	3.2 ± 0.7	2.4 ± 1.0	3.1 ± 1.0	4.5 ± 1.3	3.1 ± 0.9
EO	%	0.9 ± 0.3	1.9 ± 1.4	1.4 ± 0.8	1.3 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.6 ± 0.1	1.3 ± 0.4
BASO	%	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.1	$0.6 \pm 0.3^*$	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.3	0.2 ± 0.2
<i>Female</i>								
No. of animals		5	5	5	5	5	5	5
RBC	$\times 10^6/\mu\text{l}$	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.3	7.6 ± 0.6	7.1 ± 0.3	7.1 ± 0.4	6.4 ± 0.7	7.3 ± 0.1
HGB	g/dL	14.0 ± 0.6	13.3 ± 0.4	14.3 ± 1.0	13.5 ± 0.4	13.4 ± 0.9	12.9 ± 1.2	13.8 ± 0.5
HCT	%	40.5 ± 1.6	37.5 ± 0.9	40.8 ± 3.1	38.0 ± 1.1	39.3 ± 2.9	38.5 ± 3.4	40.0 ± 1.4
MCV	fL	56.8 ± 1.5	$53.2 \pm 1.2^*$	$53.7 \pm 0.7^*$	53.9 ± 2.2	55.2 ± 1.4	$60.4 \pm 2.9^*$	54.9 ± 1.7
MCH	pg	19.7 ± 0.7	18.8 ± 0.4	18.9 ± 0.4	19.2 ± 0.7	18.8 ± 0.5	20.1 ± 0.6	18.9 ± 0.4
MCHC	g/dL	34.6 ± 0.3	$35.4 \pm 0.3^{**}$	35.1 ± 0.4	$35.5 \pm 0.3^{**}$	34.1 ± 0.3	$33.4 \pm 0.5^{**}$	34.4 ± 0.5
RET	%	2.5 ± 0.6	$0.6 \pm 0.3^*$	1.9 ± 0.5	$0.6 \pm 0.2^{**}$	2.4 ± 1.0	$4.3 \pm 1.8^*$	2.1 ± 0.7
PLT	$\times 10^3/\mu\text{l}$	993.2 ± 122.4	899.0 ± 183.0	815.0 ± 237.4	$656.6 \pm 129.7^{**}$	905.6 ± 87.8	881.4 ± 45.3	1035.0 ± 83.7
WBC	$\times 10^3/\mu\text{l}$	3.9 ± 2.6	3.2 ± 0.8	3.3 ± 1.7	2.6 ± 0.3	2.7 ± 1.2	3.1 ± 1.7	2.5 ± 0.5
Differential cell count								
NEUT	%	11.9 ± 7.5	7.7 ± 1.7	12.9 ± 3.7	13.1 ± 6.5	8.7 ± 4.7	9.9 ± 4.7	11.9 ± 4.3
LYMPH	%	83.5 ± 8.2	88.2 ± 2.2	82.6 ± 4.2	83.2 ± 7.5	85.5 ± 2.7	84.1 ± 7.4	83.5 ± 4.1
MONO	%	2.8 ± 0.8	2.4 ± 0.7	2.7 ± 0.7	2.2 ± 0.5	3.6 ± 0.4	3.9 ± 1.1	2.7 ± 0.3
EO	%	1.2 ± 0.4	1.4 ± 0.7	1.6 ± 0.8	1.2 ± 0.7	2.1 ± 2.4	1.8 ± 2.1	1.8 ± 0.6
BASO	%	0.6 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	$0.1 \pm 0.3^*$	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2

Values are mean \pm S.D.

*, **: Significantly different from the Basal diet group at $p < 0.05$ and 0.01 , respectively.

Table 2. Serum biochemistry data for SD rats

	Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2
<i>Male</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
TP (g/dL)	5.7 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.3	6.5 ± 0.2 **	5.8 ± 0.4	6.1 ± 0.4	5.9 ± 0.2
A/G	2.4 ± 0.3	2.7 ± 0.6	2.6 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.2	2.4 ± 0.3	2.2 ± 0.3
ALB (g/dL)	4.0 ± 0.1	4.4 ± 0.3 *	4.2 ± 0.2	4.5 ± 0.2 **	3.9 ± 0.3	4.3 ± 0.3	4.1 ± 0.1
T-BIL (mg/dL)	0.05 ± 0.01	0.09 ± 0.02 **	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
GLU (mg/dL)	160.2 ± 21.0	130.6 ± 15.2	185.8 ± 34.2	188.6 ± 34.7	182.0 ± 31.0	169.8 ± 16.2	204.2 ± 45.2
TG (mg/dL)	151.2 ± 68.6	33.4 ± 18.5 **	69.6 ± 17.4 *	59.4 ± 9.6 *	83.2 ± 48.3	45.8 ± 28.5 **	121.8 ± 50.1
T-CHO (mg/dL)	60.6 ± 6.1	134.6 ± 11.4 **	77.8 ± 16.6	99.0 ± 15.9 **	75.6 ± 4.6	89.8 ± 22.8 **	47.8 ± 4.4
BUN (mg/dL)	18.5 ± 1.6	28.0 ± 2.5 **	17.7 ± 2.7	22.8 ± 3.1 *	17.1 ± 2.2	17.8 ± 3.2	16.4 ± 2.1
CRE (mg/dL)	0.26 ± 0.01	0.36 ± 0.02 **	0.23 ± 0.04	0.33 ± 0.03 **	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.03	0.26 ± 0.03
Na (mEq/L)	144.2 ± 1.1	145.2 ± 1.1	144.8 ± 1.3	145.2 ± 1.3	144.4 ± 1.8	145.4 ± 1.1	142.2 ± 2.2
Cl (mEq/L)	104.6 ± 2.4	107.0 ± 1.0	103.0 ± 1.2	105.0 ± 2.5	104.2 ± 2.2	99.8 ± 3.0 **	102.6 ± 1.8
K (mEq/L)	5.1 ± 0.3	4.7 ± 0.2	4.5 ± 0.3 *	4.6 ± 0.1 *	5.1 ± 0.3	4.1 ± 0.6 **	4.7 ± 0.2
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.1	9.8 ± 0.2	14.0 ± 0.7 **	10.2 ± 0.1	10.6 ± 0.2	10.5 ± 0.3	10.2 ± 0.2
IP (mg/dL)	6.9 ± 1.2	5.6 ± 0.5 *	6.7 ± 0.4	5.3 ± 0.4 **	8.1 ± 0.6 *	7.2 ± 0.4	7.5 ± 0.7
AST (IU/L)	118.2 ± 26.8	142.8 ± 23.1	94.8 ± 24.0	99.0 ± 34.9	89.4 ± 15.6	89.8 ± 14.1	74.0 ± 9.0 *
ALT (IU/L)	36.6 ± 2.5	74.8 ± 13.9 **	35.2 ± 5.7	59.8 ± 39.4	38.0 ± 2.9	35.2 ± 4.2	33.0 ± 6.9
ALP (IU/L)	1012.0 ± 62.8	1140.4 ± 201.3	919.6 ± 363.0	674.4 ± 60.0	1043.4 ± 523.1	743.4 ± 119.3	842.6 ± 201.4
γ-GT (IU/L)	<3	4.4 ± 2.2	<3	<3	<3	5.8 ± 2.3 **	<3
<i>Female</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
TP (g/dL)	6.4 ± 0.2	6.4 ± 0.3	5.6 ± 0.2 **	6.5 ± 0.3	6.1 ± 0.3	6.1 ± 0.5	6.1 ± 0.2
A/G	2.6 ± 0.4	2.2 ± 0.1	2.7 ± 0.4	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.0	2.6 ± 0.3	2.4 ± 0.3
ALB (g/dL)	4.6 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.1 ± 0.2 **	4.4 ± 0.3	4.4 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2
T-BIL (mg/dL)	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.02
GLU (mg/dL)	177.2 ± 43.4	157.2 ± 33.6	185.2 ± 39.9	190.8 ± 31.8	168.0 ± 24.7	160.6 ± 14.2	191.0 ± 34.9
TG (mg/dL)	94.2 ± 51.2	31.0 ± 13.5 **	37.2 ± 10.4 **	51.6 ± 12.9	61.0 ± 17.4	21.0 ± 7.5 **	58.2 ± 36.2
T-CHO (mg/dL)	69.4 ± 17.8	85.6 ± 7.2	94.2 ± 24.8	81.6 ± 20.2	79.4 ± 9.6	117.0 ± 34.7 **	53.2 ± 7.9
BUN (mg/dL)	19.0 ± 3.2	31.9 ± 5.5 **	15.2 ± 3.7	29.4 ± 1.3 **	17.3 ± 2.5	14.2 ± 2.5	16.4 ± 1.9
CRE (mg/dL)	0.28 ± 0.03	0.42 ± 0.03 **	0.29 ± 0.03	0.42 ± 0.02 **	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.01	0.26 ± 0.01
Na (mEq/L)	142.6 ± 0.5	142.0 ± 1.2	142.6 ± 1.3	142.0 ± 1.0	140.8 ± 1.6	143.4 ± 0.9	139.8 ± 0.8 **
Cl (mEq/L)	102.8 ± 1.8	103.6 ± 1.5	101.8 ± 1.5	103.4 ± 2.3	102.4 ± 0.5	100.0 ± 1.4 *	101.0 ± 1.2
K (mEq/L)	4.5 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.1 ± 0.4	4.2 ± 0.1	4.7 ± 0.5	3.8 ± 0.3 **	4.6 ± 0.3
Ca (mg/dL)	10.3 ± 0.3	10.0 ± 0.5	12.9 ± 0.8 **	9.9 ± 0.4	10.1 ± 0.2	10.4 ± 0.2	10.0 ± 0.3
IP (mg/dL)	6.3 ± 0.9	5.1 ± 0.3 *	6.2 ± 0.5	4.9 ± 0.2 *	6.2 ± 1.0	6.3 ± 0.7	7.0 ± 0.7
AST (IU/L)	107.4 ± 11.7	110.4 ± 11.1	99.2 ± 22.4	84.0 ± 11.1	96.6 ± 18.0	79.6 ± 10.3 *	94.0 ± 8.7
ALT (IU/L)	39.0 ± 7.3	48.2 ± 19.3	38.0 ± 10.2	33.2 ± 1.9	38.4 ± 2.7	34.6 ± 9.1	38.2 ± 3.3
ALP (IU/L)	863.2 ± 201.9	856.4 ± 182.8	808.0 ± 175.9	679.8 ± 281.0	603.6 ± 146.6	573.0 ± 99.2	593.8 ± 192.5
γ-GT (IU/L)	<3	3.2 ± 0.4	<3	<3	<3	7.0 ± 4.7 *	<3

Values are mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the Basal diet group at p < 0.05 and 0.01, respectively.

Table 3. Serum hormone concentrations for SD rats

	Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2
<i>Male</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
T3 (ng/mL)	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.1 **
T4 (µg/dL)	4.5 ± 0.9	0.4 ± 0.0 **	4.1 ± 1.0	0.4 ± 0.0 **	4.1 ± 0.4	3.8 ± 2.1	6.4 ± 0.8 *
TSH (µIU/mL)	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
ACTH (pg/mL)	74.0 ± 36.0	26.0 ± 9.1	43.1 ± 13.5	73.5 ± 71.7	56.8 ± 17.7	216.0 ± 126.6 **	68.1 ± 40.5
FSH (mIU/mL)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
LH (mIU/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
PRL (ng/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Estradiol (pg/mL)	11.9 ± 3.3	20.5 ± 6.9	11.8 ± 4.0	13.9 ± 1.5	11.6 ± 3.5	20.4 ± 6.3	19.4 ± 11.8
Progesterone (ng/mL)	6.5 ± 3.6	5.1 ± 1.8	3.6 ± 0.9	7.5 ± 3.5	3.0 ± 1.3	5.9 ± 3.0	4.0 ± 1.4
Testosterone (ng/mL)	3.1 ± 2.2	4.5 ± 3.2	3.3 ± 2.2	6.0 ± 8.0	5.1 ± 3.1	4.0 ± 0.9	0.4 ± 0.5
<i>Female</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
T3 (ng/mL)	0.9 ± 0.2	0.4 ± 0.0 **	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.1 **	1.0 ± 0.1	0.7 ± 0.2 *	1.1 ± 0.1
T4 (µg/dL)	3.2 ± 1.1	0.4 ± 0.0 **	4.0 ± 0.9	0.4 ± 0.0 **	2.9 ± 0.6	3.0 ± 1.5	4.5 ± 0.8
TSH (µIU/mL)	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005	<0.005
ACTH (pg/mL)	56.4 ± 33.3	62.2 ± 40.6	97.2 ± 40.2	48.5 ± 12.5	86.6 ± 48.3	162.6 ± 43.2 **	28.4 ± 10.9
FSH (mIU/mL)	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
LH (mIU/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
PRL (ng/mL)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
Estradiol (pg/mL)	20.2 ± 4.9	18.5 ± 5.4	10.4 ± 0.8	22.7 ± 11.4	20.8 ± 9.2	22.1 ± 8.9	21.7 ± 6.9
Progesterone (ng/mL)	16.3 ± 9.0	11.8 ± 6.9	12.9 ± 4.7	23.7 ± 15.3	17.8 ± 14.4	7.4 ± 4.2	7.2 ± 5.2
Testosterone (ng/mL)	<0.03	<0.03	<0.03	0.03 ± 0.01	<0.03	1.71 ± 0.51	<0.03

Values are mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the Basal diet group at p < 0.05 and 0.01, respectively.

Table 4. Organ weights for SD rats

	Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2
<i>Male</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	386.3 ± 28.2	268.5 ± 2.2 **	278.8 ± 34.7 **	277.5 ± 24.6 **	398.4 ± 9.0	280.6 ± 18.3 **	292.1 ± 4.40 **
Absolute (g)							
Pituitary	0.015 ± 0.003	0.014 ± 0.002	0.011 ± 0.002 **	0.015 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.012 ± 0.002 *	0.013 ± 0.001
Thyroids	0.024 ± 0.002	0.094 ± 0.030 **	0.022 ± 0.004	0.080 ± 0.021 **	0.027 ± 0.004	0.041 ± 0.008	0.025 ± 0.004
Adrenals	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.01 **	0.06 ± 0.01	0.03 ± 0.00 **	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01 *
Liver	14.0 ± 1.3	7.9 ± 0.5 **	9.8 ± 1.7 **	9.3 ± 1.4 **	18.6 ± 1.2 **	15.1 ± 1.0	11.5 ± 0.9 *
Kidneys	2.9 ± 0.3	1.8 ± 0.1 **	2.7 ± 0.2	1.9 ± 0.2 **	3.0 ± 0.1	2.2 ± 0.4 **	2.2 ± 0.3 **
Testes	3.2 ± 0.2	3.0 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.2	3.2 ± 0.3	3.1 ± 0.3	3.0 ± 0.1
Relative (g%)							
Pituitary	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001 **	0.004 ± 0.001	0.005 ± 0.001 **	0.004 ± 0.000	0.004 ± 0.001	0.004 ± 0.000
Thyroids	0.006 ± 0.001	0.035 ± 0.011 **	0.008 ± 0.001	0.029 ± 0.006 **	0.007 ± 0.001	0.014 ± 0.002	0.009 ± 0.002
Adrenals	0.013 ± 0.001	0.012 ± 0.002	0.021 ± 0.004 **	0.011 ± 0.002	0.014 ± 0.001	0.019 ± 0.003 **	0.021 ± 0.004 **
Liver	3.6 ± 0.2	3.0 ± 0.2 **	3.5 ± 0.2	3.3 ± 0.2	4.7 ± 0.4 **	5.4 ± 0.2 **	3.9 ± 0.3
Kidneys	0.74 ± 0.08	0.67 ± 0.03	0.96 ± 0.12 **	0.68 ± 0.04	0.76 ± 0.03	0.79 ± 0.09	0.77 ± 0.09
Testes	0.84 ± 0.06	1.11 ± 0.06 **	1.06 ± 0.12 **	1.13 ± 0.11 **	0.80 ± 0.06	1.10 ± 0.14 **	1.02 ± 0.04 *
<i>Female</i>							
No. of animals	5	5	5	5	5	5	5
Body weight (g)	248.0 ± 23.0	194.7 ± 11.8 **	180.8 ± 24.6 **	194.8 ± 17.9 **	246.0 ± 22.9	207.6 ± 18.1 *	215.2 ± 16.5
Absolute (g)							
Pituitary	0.017 ± 0.001	0.015 ± 0.002	0.012 ± 0.003 *	0.013 ± 0.003 ^b	0.016 ± 0.003	0.014 ± 0.001	0.014 ± 0.002
Thyroids	0.023 ± 0.003	0.110 ± 0.028 ***	0.020 ± 0.006	0.070 ± 0.008 **	0.026 ± 0.004	0.055 ± 0.014 **	0.019 ± 0.004
Adrenals	0.06 ± 0.00	0.03 ± 0.00 **	0.05 ± 0.01	0.03 ± 0.00 **	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Liver	9.0 ± 0.5	6.2 ± 0.7 **	6.8 ± 1.0 **	6.8 ± 1.0 **	11.0 ± 1.6 *	11.4 ± 0.9 **	8.3 ± 0.8
Kidneys	1.8 ± 0.1	1.3 ± 0.1 **	2.0 ± 0.3	1.3 ± 0.1 **	1.8 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.7 ± 0.2
Ovaries	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.06 ± 0.02 *	0.06 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.02
Relative (g%)							
Pituitary	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.006 ± 0.001	0.007 ± 0.001	0.007 ± 0.001
Thyroids	0.009 ± 0.001	0.056 ± 0.015 **	0.011 ± 0.003	0.036 ± 0.002 **	0.011 ± 0.002	0.027 ± 0.008 **	0.009 ± 0.002
Adrenals	0.025 ± 0.003	0.017 ± 0.001 **	0.029 ± 0.003 *	0.016 ± 0.002 **	0.027 ± 0.004	0.029 ± 0.002	0.025 ± 0.003
Liver	3.6 ± 0.3	3.2 ± 0.2 *	3.7 ± 0.1	3.5 ± 0.2 **	4.5 ± 0.3 **	5.5 ± 0.2	3.9 ± 0.3
Kidneys	0.74 ± 0.06	0.69 ± 0.04	1.10 ± 0.10 **	0.66 ± 0.03	0.75 ± 0.06	0.85 ± 0.03 *	0.80 ± 0.05
Ovaries	0.035 ± 0.006	0.035 ± 0.006	0.032 ± 0.005	0.033 ± 0.006	0.035 ± 0.003	0.054 ± 0.004 **	0.031 ± 0.011

Each value represents the mean ± S.D. a; n=4, b; n=3.

*, **: Significantly different from the Basal diet group at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Table 5. Histopathological findings for SD rats

Organ and lesions	Treatment	Male							Female							
		Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2	Basal diet	AMT	VD3	PTU	PB	AGT	E2	
		No. of animals	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Thyroids																
Hypertrophy, follicular cell	0	5 **	0	5 **	5 **	5 **	0	0	4 ^a ***	0	5 **	5 **	5 **	0		
Hyperplasia, follicular cell	0	5 **	0	5 **	0	5 **	0	0	4 ^a ***	0	5 **	0	5 **	0		
Colloid depletion	0	5 **	0	5 **	0	5 **	0	0	4 ^a ***	0	5 **	0	5 **	0		
Pituitary gland																
Vacuolation, pars distalis	0	5 **	0	5 **	4 *	5 **	0	0	5 **	0	3 ^b *	0	5 **	0		
Hypertrophy, pars distalis	0	5 **	0	5 **	4 *	5 **	0	0	5 **	0	3 ^b *	1	5 **	0		
Cyst	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Rathke's pouch, persistent	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Adrenal glands																
Vacuolation, cortical, increased, diffuse	0	0	0	0	0	5 **	0	0	0	0	0	0	5 **	0		
Hypertrophy, cortical, diffuse	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Atrophy, cortical	0	5 **	0	5 **	0	0	0	0	5 **	0	5 **	0	0	0		

*, **: Significantly different from the Basal diet group at p<0.05 and 0.01, respectively. a; n=4, b; n=3.