

博士論文

胎生期・授乳期に 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)

曝露を受けた雄アカゲザルの生殖能に関する研究

**Investigation of *in utero* and lactational exposure to  
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on reproductive  
ability in male rhesus monkeys**

有 馬 昭 宏

山口大学大学院連合獣医学研究科

(宮崎大学)

2009

# 目 次

	頁
<b>第1章 緒論</b> .....	1
1. ダイオキシンとは .....	1
2. ダイオキシンの化学構造.....	2
3. ダイオキシン類の職業曝露および事故による曝露.....	4
4. ダイオキシン類の毒性 .....	5
5. ダイオキシン類の毒性のメカニズム.....	9
6. ダイオキシン類の毒性当量.....	10
7. ダイオキシン類の耐容一日摂取量.....	11
8. 本研究の目的 .....	13
<b>第2章 TCDD のアカゲザルにおける出生前および出生後の児の発生並びに 母動物の機能に対する影響</b> .....	<b>14</b>
1. 導入 .....	14
2. 材料および方法 .....	15
2.1. 動物 .....	15
2.2. 被験物質およびその投与 .....	16
2.3. 母動物の観察および検査 .....	17
2.4. 血漿中および乳汁中 TCDD 濃度測定.....	18
2.5. 母動物の剖検 .....	18
2.6. 出生児の観察および検査 .....	19
2.7. 出生児の血液学的検査 .....	19
2.8. 出生児の血液生化学検査 .....	20
2.9. 出生児の剖検 .....	20
2.10. 統計解析 .....	21
3. 結果 .....	21
3.1. 母動物の一般状態, 体重, 摂餌量および妊娠期間.....	21
3.2. 血漿中および乳汁中 TCDD 濃度.....	22
3.3. F0 母動物の剖検所見および器官重量 .....	22
3.4. 出生児の生存状況 .....	23
3.5. 出生時の観察, 出生児の体重推移および食欲状態.....	24
3.6. 出生児の血液学的検査 .....	25

3.7.	出生児の血液生化学検査 .....	25
3.8.	出生児が性成熟した段階での剖検所見および器官重量.....	25
4.	考察 .....	26
5.	Tables and Figures .....	30
<b>第3章 胎生期・授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザルの精液性状, 精巣および精巣上体に対する影響</b> .....		64
1.	導入 .....	64
2.	材料および方法 .....	65
2.1.	肛門－生殖器間距離および陰茎長の計測 .....	65
2.2.	精液検査 .....	65
2.3.	精巣および精巣上体の病理組織学的検査 .....	67
2.4.	雄性ホルモンの測定 .....	69
2.5.	統計解析 .....	70
3.	結果 .....	70
3.1.	肛門－生殖器間距離, 陰茎長, 精巣および精巣上体重量.....	70
3.2.	精液性状 .....	71
3.3.	精巣の病理組織検査 .....	72
3.4.	精巣上体の病理組織検査 .....	73
3.5.	雄性ホルモン濃度 .....	74
4.	考察 .....	75
5.	Tables and Figures .....	80
<b>第4章 胎生期・授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザルの前立腺および 精嚢に対する影響</b> .....		89
1.	導入 .....	89
2.	材料および方法 .....	90
2.1.	前立腺および精嚢の病理組織学的検査 .....	90
2.2.	RNA の抽出 .....	91
2.3.	オリゴ DNA マイクロアレイ解析.....	91
2.4.	Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの定量.....	92
2.5.	統計解析 .....	93
3.	結果 .....	94
3.1.	前立腺の病理組織検査 .....	94
3.2.	精嚢の病理組織検査 .....	95

3.3. 前立腺の DNA マイクロアレイ解析結果.....	96
3.4. Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの確認.....	97
4. 考察.....	97
5. Tables and Figures.....	103
第 5 章 総合考察.....	119
第 6 章 要約.....	126
謝辞.....	132
引用文献.....	133

# 第1章

## 緒論

### 1. ダイオキシンとは

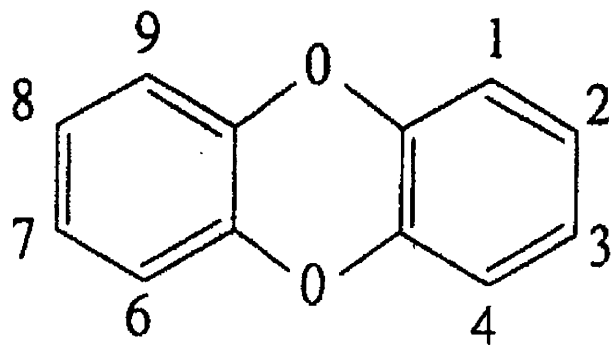
ダイオキシン類がヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは、1980年代から世界的に大きな問題となってきた。ダイオキシン類は多塩化ジベンゾパラジオキシン (polychlorinated dibenzodioxin, PCDD)、多塩化ジベンゾフラン (polychlorinated dibenzofuran, PCDF)、コ・プラナー多塩化ビフェニル (coplanar polychlorinated biphenyl, Co-PCB) からなり、燃焼や化学物質製造の過程等で副産物として生成され、燃焼排ガスや化学物質の不純物として排出され、広く分布するようになった環境汚染物質である。土壌や大気、水中に拡散したダイオキシン類は地球環境を広範囲に移動して、至る所に環境汚染を引き起こしている。PCDDs および PCDFs は難分解性であり、750度以上の高温でないと分解しないので、廃棄物の低温の焼却処理で問題を生じた。また、難水溶解性で微生物によりほとんど生分解されず、脂肪親和性で難代謝性であるため、生物の脂肪組織に蓄積され、生物の食物連鎖で濃縮される。

ダイオキシン類は毒性が極めて強く、微量でも生体に影響を与える。生物が食餌から摂取した場合、主に血液、肝臓、筋肉、皮膚、脂肪に分布していく。特に肝臓および脂肪に多く蓄積される[1, 2]。脂肪に蓄積されたたダイオキシン類は、常に血液中の脂肪に結合して体内を循環すると言われている。一般に、ダイオキシン類は代謝されにくく、肝ミクロゾームの薬物代謝酵素によりゆっくりと極性物質に代謝される[3-6]。また、ダイオキシン類は主に糞中に排出され、尿中への排泄は少ないが、代謝および排泄速度には大きな種差があり[7, 8]、これらがダイオキシン類の半減期の種差とも関

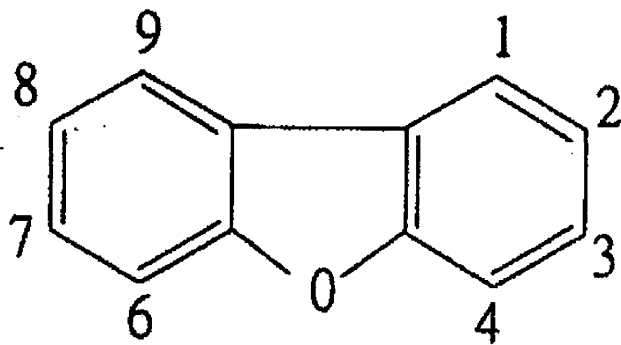
連している[9-11]. さらに, ダイオキシン類は母体から胎児へ移行することが多くの動物実験により示されているが, 胎児の体内濃度が母体より高くなるとの報告はない[12]. また, ダイオキシン類は脂肪親和性であるため母乳中にも分泌され, 乳汁を介して新生児に移行することもわかっている[13].

## 2. ダイオキシンの化学構造

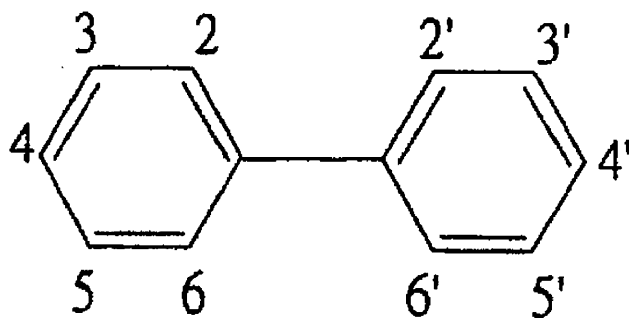
ダイオキシン類の構造式を Fig. 1 に示す. PCDD は 2 つのベンゼン環が酸素 2 個で連結されており, その結合からジオキシンと名付けられた. ベンゼン環にはいろいろな原子, 基が結合することができ, 環境汚染物質として問題になるのはハロゲン原子が結合したもので, 特に塩素が結合した多塩化ジベンゾジオキシンが重要である. ジオキシンには 8 個の塩素置換可能部位があり, その部位には 1~8 の番号が付けられていて, 8 個の同属体と 75 種類の異性体がある. 塩素の数と付く位置によって毒性には大きな差がある. 後述するようにダイオキシンは特定の細胞内受容体を介して毒性を発現する. ダイオキシン以外にも 2 つのベンゼン環が同一平面にある多塩化ジベンゾフラン (PCDF) およびコ・プラナー多塩化ビフェニル (Co-PCB) もこの受容体に結合して類似の毒性を示すので, これらのものも含めてダイオキシン類という用語が用いられる. PCDF にも 8 個の同属体と 135 種類の異性体があり, Co-PCB にも 4 個の同属体と 13 種類の異性体があり, ダイオキシン類には全部で 223 種がある.



**PCDD**



**PCDF**



**Co-PCB**

Fig. 1 ダイオキシン類の化学構造

### 3. ダイオキシン類の職業曝露および事故による曝露

#### 職業曝露

職業曝露の事例としては、農薬の一種である 2,4,5-トリクロロフェノール、およびその誘導体の合成と使用に関わる化学工場内での 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin（以下 TCDD）の曝露による中毒例が知られている。本事例の疫学調査では、高濃度曝露労働者の血中 TCDD 濃度レベルは通常人口集団の血中レベルの 10～100 倍であったと言われている[14]。工場災害事例に共通して認められた非がん症状は、クロルアクネ（塩素ざ瘡）の発生である[15-20]。また、呼吸器がん、非ホジキンリンパ腫などの発生率の上昇を伴った全がん死亡率の上昇が報告されている[21-25]。

#### 事故による曝露

地域的な事故汚染例として、アメリカのタイムズビーチの汚染、イタリアのセブソにおける化学品工場爆発事故等が知られている。セブソにおいて、最も顕著に認められた非がん所見はクロルアクネで、ことに子供に多く観察された[26-28]。災害 10 年以後に発生したがんについて解析すると、男子では直腸がん、リンパ造血系のがん、および白血病、女子では消化器がん、胃がん、リンパ造血系のがん、および多発性骨髄腫でのがん死亡の増加が認められた[29, 30]。また曝露レベルの高い地域の住民で、1997 年 4 月（災害 9 ヶ月後）から翌年 12 月までの間に出産をみた 74 例では、出産児の性が女子に偏っていた[31]。

食品の PCB 汚染による中毒が、日本（1968 年）および台湾（1978 年）において発生している。いずれも熱媒体として用いられた PCB とともに、極少量のダイオキシン類が食用油に混入したことによると言われている[32, 33]。皮膚の色素沈着、爪の変形着色、クロルアクネなどの他に歯の形成異常（早期萌出、永久歯胚欠如など）が知られている[34]。



#### 4. ダイオキシン類の毒性

ダイオキシン類は、実験動物にさまざまな毒性を示すが、主要なものとしては、肝毒性、免疫毒性、雄性および雌性生殖器関連障害を含む内分泌毒性、催奇形性（口蓋裂、水腎症）、発がん性などが知られている。ここでは、各国の耐容一日摂取量（Tolerable Daily Intake, TDI）の規制値算定の根拠として、しばしば引用されている3つの報告および雌雄生殖器毒性を主として紹介する。

##### ラット慢性毒性・発がん性併合試験

Kocibaら[35]の報告によると、一群50匹の雌雄SDラットにTCDDを1, 10, 100 ng/kg/dayの用量で105週間混餌投与した結果、投与6ヶ月以降に100 ng/kg群の雌雄および10 ng/kg群の雌で体重増加抑制が認められ、100 ng/kg群の雌では死亡もみられた。10 ng/kg以上の群では、非腫瘍性変化として肝臓に多数の炎症性、壊死性変化が特に雌で強く認められ、多核肝細胞と胆管過形成も認められた。腫瘍性変化は、雌雄いずれも100 ng/kg群においてのみ認められ、雌で肝細胞がんおよび肺扁平上皮がん、雄で舌扁平上皮がん、雌雄で硬口蓋および鼻甲介の扁平上皮がんの発生率が有意に上昇した。これらの結果から、NOAELは1 ng/kg/dayと考えられている。

その他に、マウスやラットを用いた長期試験で甲状腺濾胞腺腫、口蓋・鼻甲介・舌および肺の扁平上皮がん、リンパ腫の誘発が、ともに投与量71 ng/kg/day（2年間の連続投与）において認められている[36]。また、発がんメカニズムについては、遺伝子傷害性を検出するための複数の試験系で陰性の結果が得られ、マウスやラットを用いる二段階発がんの試験系でプロモーション作用が証明されている[37]。

### ラット三世代繁殖試験

Murray ら[38]の報告によると、TCDD を 1, 10, 100 ng/kg/day の用量で S D ラット (F0 世代総計, 雄 52, 雌 104) に与えて三世代繁殖試験を行った結果, 100 ng/kg 群での受胎率の著しい低下, 10 ng/kg 群での子宮内死亡, 同腹児数の減少, 生後の体重増加抑制などの変化が F1 世代で認められている。そして, 10 および 100 ng/kg/day はラットの生殖発生毒性に悪影響を及ぼすと結論するとともに, 1 ng/kg/day はいずれの世代にも受胎率, 出生後体重, 新生児生存率に影響を示さないことから NOAEL であると推定した。

### アカゲザルの慢性毒性試験

Rier ら[39]の報告によると, TCDD を飼料に 5 ppt (実測値 126 pg/kg/day, WHO 計算方式 180 pg/kg/day に相当) および 25 ppt (実測値 630 pg/kg/day, WHO 計算方式 900 pg/kg/day に相当) の割合で添加し, それを約 4 年間アカゲザルに与えたところ, 25 ppt 群の 3 匹が重篤な子宮内膜症により死亡した。そこで TCDD 投与終了 10 年後に残りの生存サル全例の腹腔鏡検査法を行い, 子宮内膜症の有無およびその程度の調査研究を行った結果, TCDD の添加濃度に依存して子宮内膜症を有するアカゲザルの頻度および重篤性が有意に増加した。即ち, 対照群および 5 ppt 群, 25 ppt 群に子宮内膜症がそれぞれ 33%, 71%, 86%の頻度でみられ, 重篤度で分類すると中程度以上の子宮内膜症は対照群ではみられなかったのに対し, 5ppt 群, 25ppt 群でそれぞれ 43%, 71%であり, 対照群に比べ有意に高かった。

Rier ら[39]による上記の実験においては, 最小毒性量 (lowest-observed-adverse-effect level, LOAEL) が 126-180pg/kg/day であり, この値が慢性毒性影響とした場合の毒性値として最小になる。しかし, アカゲザルでは子宮内膜症の発生率が背景的に高いこ

と、実験に使用した例数が少ないこと、十分に管理された実験とは言えない飼育環境の不備があるとの理由から、日本の厚生省研究班は「この実験結果を根拠に TDI を設定することは適切ではない」と判断した。その後、直ちにその問題に対応すべく「子宮内膜症等に及ぼすダイオキシンの評価に関する研究」班が設立され、Rier ら[39]による一連のアカゲザルの実験、特に TCDD の子宮内膜症を初めとする生殖器、内分泌臓器障害に対する科学的知見としての妥当性の如何を検討評価した。その結果、1. TCDD に由来する何らかの影響があった可能性は否定できない。2. Rier の論文には科学的に見て不確実な要素が複数存在するの 2 点が指摘され、特に第 2 点に関しては、TCDD 非投与の 10 年間の空白期間中の飼育条件が不明であること、25 ppt 投与群には 2 種類の異なった処置を受けたサルが含まれるが、この事に関する記載・説明がこの論文には無いこと、統計処理に一貫性を欠く部分があることが指摘された。よって、Rier 論文の主旨は棄却できないが、科学的な数値データとしては採用せず、総合的には評価はできないものと結論された[40]。

### 雄性生殖器毒性

精子形成などアンドロジェン依存性性徴への影響：まず注目されるのは雄性性腺に関連した障害である。ウィスコンシン大学の Peterson らのグループは、妊娠 15 日の Holtzman ラットに 64～1000 ng/kg の TCDD を単回経口投与して、出生後の雄児の生殖機能にみられる影響を報告した[41-43]。その結果、精巣重量の減少、精子数の減少、肛門－生殖器間距離（ano-genital distance, AGD）の短縮などの変化が低レベル（64 ng/kg）から認められ、胎生期での TCDD の曝露は脱雄性化を生ずるものと結論された。アメリカ Environmental Protection Agency（EPA）の Linda Birnbaum のグループ[44, 45]は、対象動物として別系統のラットを用いて Peterson らの実験[41-43]を追試

した。500 ng/kg/day を妊娠 6～15 日に経口投与された Long Evans ラットでは、精巣上体での精子数が、性成熟到達期で 58% と低下し、成熟期では 30% に減少していた他、程度は小さいながらも AGD の短縮がみられ、Peterson らの実験結果はほぼ追認された形となった。

血中の雄性ホルモン濃度およびそのレセプター数などの変化：Peterson らのグループは、上述の実験[41-43]において同時に測定した血漿テストステロン濃度に変化がみられたため、雄の脱雄性化や LH 分泌パターンの雌性化をテストステロンの変動で説明した。しかし、先の EPA の Long-Evans ラットの実験[44, 45]では、テストステロン値に変化はみられず、精細管、前立腺、精巣上体のアンドロゲン・レセプターの数でも変化がなかったため、発症機序についての両者の判断は乖離した結果となった。一方、Bjerke ら[46]の追試実験では、妊娠中に 700 ng/kg 以上の TCDD を曝露して得られた出生児は、Peterson らの実験結果[41-43]と同様の傾向を示した。Bjerke らは、この結果から、胎生期もしくは授乳期に TCDD を曝露すると生殖器官のテストステロンに対する反応性が変化すること、その結果、雄の行動の一部脱雄性化（雌性化）が引き起こされるものとの推論した[46]。

### 雌性生殖器毒性

ダイオキシン類が、受胎率の低下、出生児の低体重および性周期の変調などを惹起するという実験結果は、Murray らによって系統的に研究されている[38]。また、妊娠 15 日の母ラットに TCDD を単回経口投与して、200 ng/kg 以上の用量で雌児動物における生殖器の形態異常がみられている[47]。その他、500 ng/kg/日以上の器官形成期 TCDD 投与によって、ラットに腎形成異常[48]、マウスに口蓋裂や水腎症[48, 49]などの催奇形性が引き起こされることが報告されている。

## 5. ダイオキシン類の毒性のメカニズム

ダイオキシン類の毒性のメカニズムは、十分に解明されているとは言えないものの、様々な毒性発現に共通するメカニズムとして、アリール炭化水素受容体 (arylhydrocarbon receptor, AhR) との結合が指摘されている[50]. ダイオキシン類に起因する毒性や催奇形性が, AhR を持たないマウスでは観察されないという結果が得られており[51-53], ダイオキシン類の毒性は細胞内にある AhR を介して発現していることを示唆している.

AhR の存在は古くから予測されていたが, そのクローニングの報告は 1991~1992 年である[54, 55]. AhR は, 通常, 熱ショック蛋白 (Hsp90) と結合しているが, ダイオキシン類との結合により Hsp90 を解離し, AhR 核内移行因子 (Ah-receptor nuclear translocator, Arnt) と会合する[50]. 会合した AhR-Arnt のヘテロ・ダイマーは, エストロゲン・レセプター (estrogen receptor, ER) 遺伝子上流域の生体異物応答配列 (xenobiotic responsive elements, XRE) に結合する[50]. この XRE は CYP1A1 遺伝子上に見出された CAC-GCNA/T をコンセンサス配列とし[56], その後, CYP1A2, グルタチオン S-トランスフェラーゼなど種々の薬物代謝酵素の転写調節領域に見出され, ダイオキシン類が薬物代謝酵素系の発現制御を行っている証拠とされている. 興味深いことに, このコンセンサス配列は, AhR との結合に際して ER 遺伝子上位から見出された DRE (dioxin responsive elements) と特異的かつ競合的であった[57]. AhR-Arnt 複合体は, DRE の制御領域のエンハンサーへの ER の結合をブロックするという報告があり[58], またダイオキシン類は AhR を介して核内の ER レベルを下げ, エストロゲン作用機構を抑制するという報告もある[59]. これらは, ダイオキシン類のエストロゲン抑制作用の少なくとも一部を説明する所見と考えられる.

ダイオキシン類が AhR を介してその作用を発現する時, そのタンパク質は前述の

ようにリガンドによって賦活化される転写活性化因子として機能し、さらに、AhRは細胞質内でもチロシンのリン酸化など二次メッセンジャーの制御因子として作用しており、炎症や細胞分化に関与する遺伝子への関与も考えられている[60-62]。なお、ダイオキシン類による発ガン性は、直接的に遺伝子を傷つけるのではなく、他の発ガン物質による発ガン作用を促進する、いわゆるプロモーション作用によるとされている[37]。ダイオキシン類の発ガン作用や、内分泌攪乱作用を始めとする様々な影響に対するAhRの関与の詳細なメカニズムについては、なお今後の研究を待たねばならないが、ダイオキシン類がAhRと結合することが、毒性発現のうえで重要な位置を占めていることは明らかである。

## 6. ダイオキシン類の毒性当量

一般に、化学物質による毒性発現は、一日当たりの曝露量よりも血中濃度や、体内に存在する量(体内負荷量)に依存している。したがって、ダイオキシン類のように、高い蓄積性を有し、体内からの消失半減期に著しい種差の認められる化学物質のヒトにおける毒性を、毒性試験の結果に基づいて評価する場合には、動物での投与量や摂取量をそのままヒトに当てはめることは、必ずしも適切ではないと言われている。

TCDD以外のダイオキシン類による毒性発現もAhR依存性であると考えられており、この考えに基づき、TCDDを1とした毒性等価係数(TEF: Toxic Equivalency Factor)が設定されている。さらに、複合曝露の際の毒性強度は、曝露された各ダイオキシン類のTEF値に個々の曝露量(m)を乗算したものを総和して、TCDDの毒性強度に換算した毒性等量(TEQ: Toxic Equivalent)を得ることで求められる。TEQの算出式は以下の通りである。 $TEQ = \sum m \times TEF$

## 7. ダイオキシン類の耐容一日摂取量

TDI（耐容一日摂取量）とは、長期にわたり体内に取り込むことにより健康影響が懸念される化学物質について、その量まではヒトが一生にわたり摂取しても健康に対する有害な影響が現れないと判断される一日当たりの摂取量である。WHO は当面、この水準が耐用し得るものとして、4 pgTEQ/kg/day を最大耐容摂取量と考え、究極的な目標としてはヒトの摂取レベルを 1 pgTEQ/kg/day 未満に低減していくことが適当としている。日本では、1999 年 6 月に中央環境審議会、生活環境審議会、食品衛生調査会の合同委員会が、当面の TDI として 4 pgTEQ/kg/day を提言した[63]。その算定基準を Fig. 2 に示した。TDI は、実験動物での LOAEL である 86 ng/kg において、ヒトでもこの体内負荷量に達すると毒性が発現すると仮定し、これにヒトと実験動物での半減期の違い[9-11]、個体差などを勘案しての 10 倍の不確実係数（いわゆる安全係数）を考慮して算出されている。この TDI の数値（4 pgTEQ/kg/day）は行政的規則などの基本となる社会的に重要なものである。

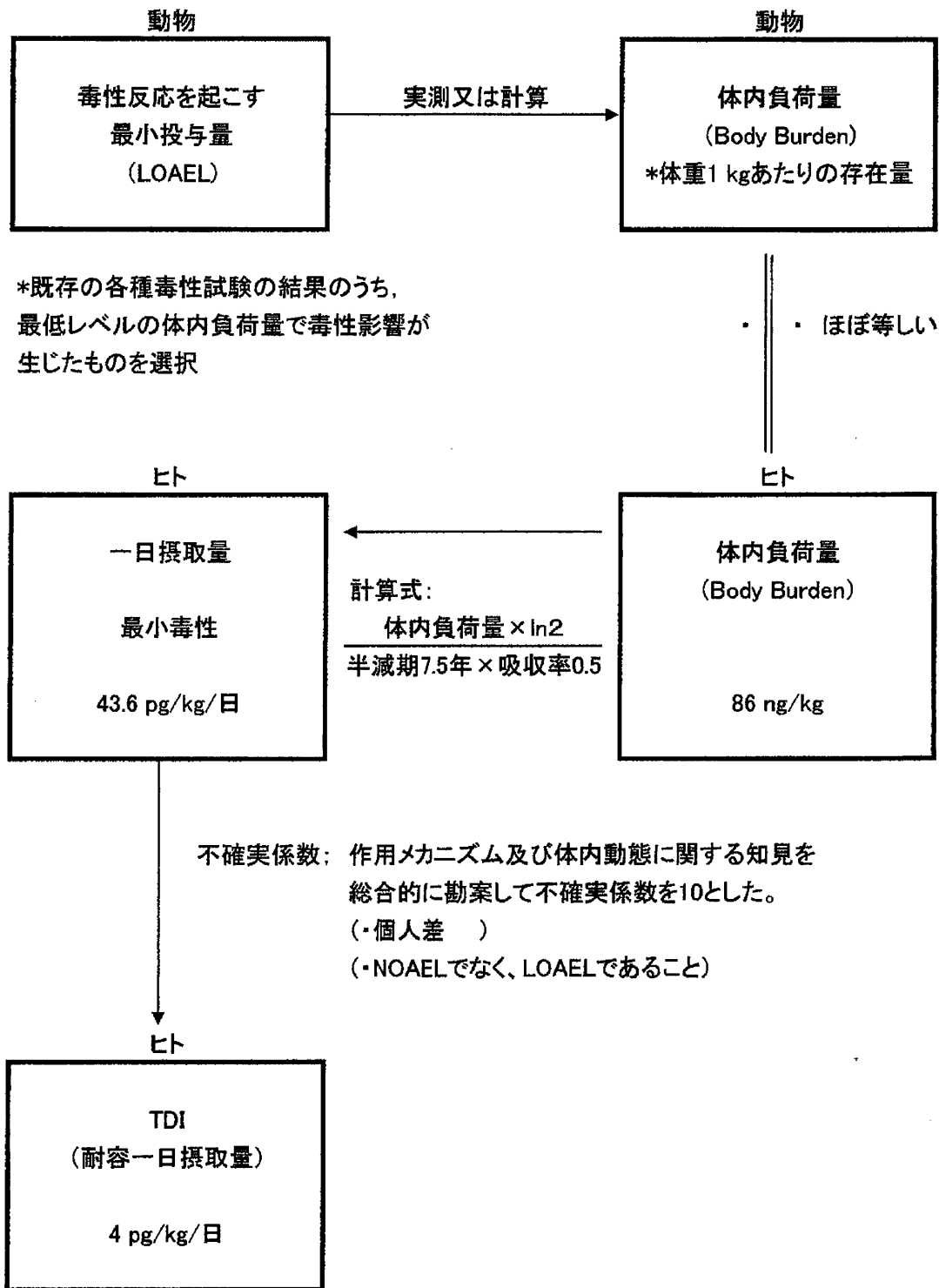


Fig. 2 体内負荷量を用いたダイオキシンの TDI の算定

(中央環境審議会等, 1999 より改編)



## 8. 本研究の目的

以上のように、ダイオキシンは生体に様々な障害作用を及ぼすが、動物の種・系統によりその感受性、毒性には大きな差があり、半減期も大きく異なる[9-11]。このため、げっ歯類などでの LOAEL 体内負荷量からヒトの TDI を求めてよいか、疑問が残る。また、毒性に対する感受性は、生後よりも胎生期に高いと言われている[41-47, 64-66]。そこで、我々は厚生労働省科学研究補助金を得て、よりヒトに近いと考えられるサルを用いて、現行の日本での TDI の妥当性を検討することとなった。本研究の目的は、現行 TDI 算定の基礎となった 86 ng/kg の約 1/3 量および 3 倍量に相当する 30 並びに 300 ng/kg を、体内負荷量がほぼ一定となるように算出された条件で、妊娠アカゲザルに TCDD を負荷し、その次世代に対する影響を検討することである。その中でも最も高い関心を集めた雄性生殖能および雄性生殖器毒性に対する影響に関する研究を行った。

今回の一連の実験は厚生労働省科学研究費の補助を受けて 1999 年に開始したものである。また、本実験は、株式会社新日本科学 安全性研究所の動物実験委員会により承認されており、当委員会の動物実験倫理指針（1999 年）に従って実施した。

## 第 2 章

# TCDD のアカゲザルにおける出生前および出生後の児の発生 並びに母動物の機能に対する影響

### 1. 導入

ダイオキシン類がヒトの健康に重大な影響を及ぼすことは、1980 年代から世界的に大きな問題となってきた。ダイオキシン類は実験動物にさまざまな毒性を示すが、主要なものとしては、肝毒性、免疫毒性、雄性および雌性生殖器関連障害を含む内分泌毒性、催奇形性（口蓋裂、水腎症）、発がん性などが知られている[35-49]。

日本における現行のダイオキシンおよびダイオキシン類に対する TDI は 4 pg TEQ/kg/day である[63]。この値は実験動物（主にげっ歯類）における LOAEL から算出されている。妊娠 15 日のラットに 200 ng/kg の TCDD を単回経口投与したところ、腔糸遺残、陰核裂などの雌性生殖器形態異常がみられ[47]、この時の母動物の体内負荷量は 86 ng/kg と見積もられている。このラットの試験で導き出された 86 ng/kg の体内負荷量に相応するヒトの 1 日摂取量は 43.6 pg/kg/day と導き出され、その値に不確実係数の 10 を適用し、ヒトの TDI である 4 pg TEQ/kg/day は設定された。しかし、ヒトの TCDD の半減期（8.7 年）[9]とげっ歯類の半減期（12.0～17.4 日）[10, 11]の間には大きな隔たりがあり、げっ歯類の LOAEL 体内負荷量からヒトの TDI を推定して良いものか疑問が残る。

また、TCDD の毒性に対する感受性は、生後よりも胎生期に高いと言われている[41-47, 64-66]。ラットにおける母動物への TCDD 曝露は、成獣雄ラットへ直接 TCDD 曝露をした際と類似の生殖器の異常を雄出生児へも引き起こすが[64-66]、その時の

LOAEL は、経胎盤あるいは授乳によって TCDD 曝露を受けた出生児[41-47]の方が、成獣[64-66]のものよりもかなり低い。したがって、ヒトの健康リスクアセスメントの観点からは、TCDD 曝露を直接受けた世代 (F0) のみならず、次世代 (F1) の TCDD の影響を評価することは意義深いと考えられる。

そこで、我々は厚生労働省科学研究補助金を得て、よりヒトに近いと考えられるサルを用いて、現行の日本での TDI の妥当性を検討することとなった。本研究の目的は、現行 TDI 算定の基礎となった 86 ng/kg の約 1/3 量および 3 倍量に相当する 30 並びに 300 ng/kg の濃度の TCDD を、体内負荷量がほぼ一定となるように算出された条件で妊娠アカゲザルに曝露させ、その次世代に対する影響を検討することである。妊娠アカゲザルには、30 あるいは 300 ng/kg の濃度の TCDD を妊娠 20 日に皮下投与し、その後 30 日ごとにその 5%量を維持量として分娩後 90 日まで投与した。TCDD 曝露を受けた母動物によって自然分娩および哺育された出生児は、性成熟に達するまで飼育した。本章では、TCDD 曝露を受けたアカゲザルにおける出生前および出生後の一般的な発生に対する影響（出生児の雄性生殖器への影響については、第 3 および 4 章で述べる）並びにその時の母動物の生殖機能に対する影響について述べる。

## 2. 材料および方法

### 2.1. 動物

入手後 1 ヶ月間の検疫済みで、健康状態に問題なく、規則的な月経周期を示す中国産の雌アカゲザル (*Macaca mulatta*, Purpose-bred, 年齢 4~10 歳, 体重 3.53~6.40 kg) を用いた。動物は、設定温度: 26°C, 設定湿度: 50%, 換気回数: 15 回/時間, 照明: 1 日 12 時間 (午前 6 時~午後 6 時) の人工照明に調整された株式会社新日本科学 安全性研究所 (鹿児島) の霊長類試験区域において、USDA 基準に適合したステンレス

製ケージ（680 mm × 700 mm × 770 mm）で個別飼育した。固型飼料（Teklad Global Certified 25% Protein Primate Diet, Harlan Sprague Dawley Inc., Indianapolis, USA）を1日当たり約144 g 与え、水道法水質基準に適合した水を自動給水装置で自由に摂取させた。また、動物福祉および栄養補助の観点から、リンゴあるいはさつまいもを適宜与えた。

雌アカゲザルは排卵期と考えられる月経発来後12, 13 および14日の3日間、性成熟した雄動物（年齢5歳以上、体重5 kg以上）と交配させた。目視下で交尾行動を確認し、3日間の交配期間の中間日（月経発来13日）を妊娠0日と定義した。妊娠18日相当日に塩酸ケタミン（50 mg/mL 水溶液, 0.1~0.2 mL/kg, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA）の筋肉内投与による麻酔下で、超音波診断装置（SSD-2000 および SSD-500, アロカ株式会社, 東京）を用いて妊娠確認を行った。子宮内に胎のうが確認された動物を妊娠動物とみなし、1群あたり約20匹を媒体投与群（対照群）、30 ng/kg TCDD 曝露群（30 ng/kg 群）および300 ng/kg TCDD 曝露群（300 ng/kg 群）の3群に振り分けた。

母動物は児を自然分娩させ、児の出生日を生後0日と定義した。新生児は、母動物と同居させ、約1年後に離乳させた。離乳後は性成熟に達するまで個別に飼育し、最終的に7歳の冬に剖検した。母動物については最終投与から約4年後に剖検を行った。なお、動物からの排泄物等については周辺環境への影響を考慮して細心の措置を取った。すなわち、飼育器材の洗浄液は全て活性炭を通した後、排水した。実験に使用したディスプレイ製の器具、動物の死体、動物からの糞尿、血液サンプル等は全て回収し、800°C以上の高温にて焼却した。

## 2.2. 被験物質およびその投与

TCDD [ロット番号：110899, 純度：98%（ガスクロマトグラフィー）] は、カナ

ダの Wellington Laboratories Inc. (Ontario, Canada) から入手した。それを媒体 [トルエン/DMSO (1:2, v/v) 混合液] を用いて 300 ng/ml の濃度に調製した。その溶液は関東化学株式会社 (東京) によって調製され、最終濃度をガスクロマトグラフィーによって確認した。

初回投与として、妊娠 20 日の母動物の背部皮下に、0 (媒体), 30 あるいは 300 ng/kg の TCDD を注入した。不確実な TCDD の曝露・吸収を避けるために、経口投与ではなく、皮下投与を選択した。その後、望ましい体内負荷量を維持するために、30 日おきに 1.5 ng/kg あるいは 15 ng/kg の TCDD (すなわち初回投与の 5%量) を妊娠期間中およびその後分娩 90 日まで追加投与した。対照群には高用量群と同量の媒体を同期間投与した。低用量にはラット LOAEL 体内負荷量 (86 ng/kg) [47] の約 1/3 にあたる 30 ng/kg を、高用量には約 3 倍にあたる 300 ng/kg を設定した。維持量投与計画 (頻度および投与量) は、アカゲザルにおける TCDD の半減期が約 1 年であることを根拠に計算、設定された[67]。

### 2.3. 母動物の観察および検査

一般状態を投与日は 1 日 2 回 (投与前および投与後 1~2 時間)、非投与日は 1 日 1 回観察した。全母動物は自然分娩させ、分娩日および分娩状態を記録し、妊娠期間 (妊娠 0 日から母動物の出生児哺育を確認した日までの期間) を算出した。

体重は、妊娠 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 および 140 日並びに分娩 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 および 90 日に電子天秤 (EP-41KA あるいは HP-40K, 株式会社エー・アンド・デイ, 東京) を用いて測定した。

摂餌量は、給餌個数 (1 個 12 g×12 個) と残餌個数から、1 日あたりの摂餌量を毎日算出した。

#### 2.4. 血漿中および乳汁中 TCDD 濃度測定

妊娠 80 日および 140 日，分娩後 90 日並びに最終投与後 12 ヶ月に，アカゲザル母動物の大腿静脈からヘパリン加注射筒を用いて，約 15 mL/個体（血漿量として約 7 mL/個体）を採取した．血液は遠心分離（3000 r.p.m.，15 分間）し，得られた血漿は測定まで凍結状態で保存（-20°C）した．そのうち，対照群 6 例，30 ng/kg 群 8 例および 300 ng/kg 群 16 例のサンプルを株式会社島津テクノリサーチ（京都）に送付し，ガスクロマトグラフィー質量分析法にて血漿中 TCDD 濃度を測定した．

乳汁採取に際し，母動物を塩酸ケタミン（50 mg/mL 水溶液，0.1～0.2 mL/kg）の筋肉内投与によって麻酔し，児を少なくとも 3 時間，親から離れた．その後，乳房周囲を温かい濡れタオルで清拭し，周辺から乳頭部に向けて柔らかく圧迫した（目視下で血液の混入がみられた場合は破棄した）．乳汁採取は分娩後 30～35 日にかけておよび 85～90 日にかけて行い，総量として約 5 mL/個体を数日にかけて採取した．プールした乳汁は測定まで凍結状態で保存（-20°C）した．そのうち，各群 5 例のサンプルを株式会社島津テクノリサーチに送付し，ガスクロマトグラフィー質量分析法にて乳汁中 TCDD 濃度を測定した．

#### 2.5. 母動物の剖検

最終投与から約 3.5～4.5 年経過した 2004 年 1 月～12 月にかけて順次，剖検を行った．ペントバルビタールナトリウム水溶液（64.8 mg/mL，東京化成工業株式会社，東京）を 0.4 mL/kg の容量で前腕橈側皮静脈に投与し，麻酔下で放血後に剖検した．肉眼的異常の有無を確認した後，下垂体，甲状腺（左右），副腎（左右），卵巣（左右），胸腺，顎下腺（左右），脾臓，肺，肝臓，腎臓（左右），子宮の重量を電子天秤（HF-3000 あるいは HR-200，株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した．

## 2.6. 出生児の観察および検査

出生時(生後1日)に全例について生死, 性別および口腔内を含む外形を観察した。その後, 一般状態を生後90日までは1日2回, それ以降は剖検まで毎日1回観察した。

体重は, 生後1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 110, 130, 150 および180日, その後は3ヵ月に1回, 電子天秤(EP-41KA あるいは HP-40K, 株式会社エー・アンド・デイ)を用いて測定した。離乳前の食欲状態については親と同居していたため評価できなかったが, 離乳後は児の食欲状態(摂餌量)についても観察した。

## 2.7. 出生児の血液学的検査

生後180日およびその後は6ヶ月に1回, アカゲザル出生児の大腿静脈から約1.0 mL/個体を採血し, EDTA-2K で抗凝固処理した全血を使用した。検査項目, 測定方法および使用機器については下表に示した。

検査項目	測定方法	機種*
赤血球数	2角度レーザーフローサイトメトリー法	ADVIA120
白血球数	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
ヘマトクリット値	計算式により算出	
ヘモグロビン濃度	シアンメトヘモグロビン変法	
血小板数	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
MCV	2角度レーザーフローサイトメトリー法	
MCH	計算式により算出	
MCHC	計算式により算出	
網状赤血球数	RNA 染色法によるフローサイトメトリー法	
白血球分類**	ペルオキシダーゼ染色法および 2角度レーザーフローサイトメトリー法	

\*: 総合血液学検査装置 (ADVIA120, バイエル・ダイアグノスティクス, Pittsburgh, USA)

\*\* : 好酸球, 好塩基球, 好中球, 単球, リンパ球および大型非染色細胞に分類

## 2.8. 出生児の血液生化学検査

生後 180 日およびその後は 6 ヶ月に 1 回、アカゲザル出生児の大腿静脈から約 3.0 mL/個体を採血し、室温で 40~60 分間静置後、遠心分離 (3000 r.p.m., 15 分間) して得られた血清を使用した。検査項目、測定方法および使用機器については下表に示した。

検査項目	測定方法	機種*
ASAT	JSCC 標準化対応	JCA-BM8
ALAT	JSCC 標準化対応	
ALP	JSCC 標準化対応	
CPK	JSCC 標準化対応	
総ビリルビン	バナジン酸酸化法	
総蛋白	ビウレット法	
トリグリセリド	GPO・HDAOS 法, グリセリン消去法	
総コレステロール	COD・HDAOS 法	
グルコース	ヘキソナーゼ・G-6-PHD 法	
尿素窒素	ウレアーゼ・GIDH 法	
クレアチニン	クレアチナーゼ・F-DAOS 法	
無機リン	PNP・XDH 法	
Ca	MXB 法	
Na	電極法	
K	電極法	
Cl	電極法	

\* : 自動分析装置 (JCA-BM8, 日本電子株式会社, 東京)

## 2.9. 出生児の剖検

アカゲザルは季節繁殖性を示すため、出生後 7 歳の冬の段階で剖検を実施した (雌: 2007 年 12 月 3 日, 雄 2007 年 12 月 10 日)。ペントバルビタールナトリウム水溶液 (64.8 mg/mL, 東京化成工業株式会社) を 0.4 mL/kg の容量で前腕橈側皮静脈に投与し、麻酔下で放血後に剖検した。肉眼的異常の有無を確認した後、下垂体, 甲状腺 (左右), 副腎 (左右), 精巣 (左右), 卵巣 (左右), 膵臓, 胸腺, 顎下腺 (左右), 脾臓,



脳，肺，肝臓，腎臓（左右），精巣上体（左右），精嚢，前立腺，子宮の重量を電子天秤（HF-3000 あるいは HR-200，株式会社エー・アンド・デイ）を用いて測定した。精巣はブアン液にて固定し，翌日 10 v/v% 中性緩衝ホルマリンに移し変え，保存した。その他の臓器は 10 v/v% 中性緩衝ホルマリンにて，固定・保存した。

## 2.10. 統計解析

MUSCOT 統計解析ソフトウェア（ユックムス株式会社，東京）を用いて検定を行った。F 検定により分散の一樣性の検定を行い，その結果，分散が一樣の場合には Student's t-test を用いて，分散が一樣でない場合には順位変換を行った後 Aspin-Welch t-test を用いて TCDD 曝露群と対照群との平均順位の対比較検定を行った。検定の有意水準は 5% とし，5% ( $P < 0.05$ ) および 1% ( $P < 0.01$ ) の指標で表記した。全ての定量データは Mean  $\pm$  SE (standard error of mean) で表記した。

## 3. 結果

### 3.1. 母動物の一般状態，体重，摂餌量および妊娠期間

母動物の妊娠 0 日の日付，分娩日および妊娠期間を Table 1-1~1-3 に，妊娠および哺育期間中の体重推移を Table 2-1~2-6 に示した。

30 あるいは 300 ng/kg の TCDD を母動物の妊娠期間および哺育期間（妊娠 20 日～分娩 90 日）に曝露させても，いずれの群においても母動物の死亡はみられず，一般状態，体重推移および食欲状態に TCDD 曝露に起因すると考えられる異常はみられなかった。また，母動物の哺育行動および授乳行動についても，いずれの群にも異常はみられなかった。

胎児死亡および流産がみられた母動物を除く平均妊娠期間は，対照群（21 例）が

160.1±1.9 日 (144~171 日) , 30 ng/kg 群 (20 例) では 162.9±1.5 (150~175 日) , 300 ng/kg 群 (18 例) では 165.4±2.2 日 (143~185 日) であり, 対照群と TCDD 曝露群との間に統計学的有意差はみられなかった.

### 3.2. 血漿中および乳汁中 TCDD 濃度

血漿中および乳汁中 TCDD 濃度測定結果をそれぞれ, Table 3 および 4 に示した.

30 ng/kg 群の妊娠 80 日, 140 日および分娩後 90 日の血漿中 TCDD 濃度は, それぞれ 0.441±0.065, 0.406±0.062 および 0.402±0.064 pg/g (wet), 300 ng/kg 群ではそれぞれ 4.294±0.556, 2.883±0.841 および 1.906±0.529 pg/g (wet)であった. 特に, 妊娠 80 日の 300 ng/kg 群では, 測定した 16 母動物中の 4 母動物において 6.3~8.7 pg/g (wet) と, 同群の他個体よりも高い TCDD 曝露レベルを示した [No. 34 : 6.3 pg/g (wet), No. 37 : 8.6 pg/g (wet), No. 40 : 7.1 pg/g (wet), No. 57 : 8.7 pg/g (wet)] . 最終投与後 12 カ月目の TCDD 濃度は, 30 ng/kg 群では 0.022 pg/g (wet), 300 ng/kg 群では 0.050 pg/g (wet) であり, 両群とも検出限界に近い値まで減少した. なお, 対照群については, いずれの測定時点でも検出限界以下の濃度であった.

分娩後 30 日~35 日および分娩後 85 日~90 日の乳汁中薬物濃度は, 30 ng/kg 群ではそれぞれ 6.240±1.141 および 3.120±0.278 pg/g (wet), 300 ng/kg 群ではそれぞれ 84.600±46.904 および 18.180±3.487 pg/g (wet)であった. これらのことから, 本実験においても TCDD は乳汁移行することが示された. なお, 対照群については, いずれの測定時点でも検出限界以下, あるいはその近傍の濃度であった.

### 3.3. F0 母動物の剖検所見および器官重量

F0 母動物の器官重量測定結果を Table 5-1~5-3 に示した.

30 および 300 ng/kg 群では、肺、肝臓および腎臓を中心に以下のような所見がみられた。30 ng/kg 群では、肺の結節 (Nos. 25, 59) , 肝臓の嚢胞形成, 粗造化, 褐色巣, 赤色巣, 白色巣あるいは白色結節 (Nos. 24, 25, 26, 29, 30, 47, 53, 65) などが, 300 ng/kg 群では肺の結節 (Nos. 33, 42, 60, 66) , 肝臓の嚢胞形成, 腫瘤, 赤色巣, 白色巣, 黄色巣, 黄白色巣あるいは白色結節 (Nos. 34, 35, 39, 40, 44, 60, 66) , 腎臓の白色巣 (No. 40) などがみられた。なお, Rier ら[39]の報告によって危惧された子宮内膜症の発現は 1 例もみられなかった。

母動物の器官重量については、30 および 300 ng/kg 群において TCDD 曝露の影響と考えられる変化はみられなかった。なお, 30 ng/kg 群の脳重量は対照群と比較して低値を示したが、用量に依存しない偶発的変化であると判断した。

### 3.4. 出生児の生存状況

流産、死産および児の生後死亡の発生頻度については、その詳細を Table 1 に、その概要を Table 6 に示した。妊娠期間中の児の死亡（流産あるいは胚・胎児死亡）は対照群, 30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 2, 0 および 1 例で、TCDD 曝露に伴う増加はみられなかった。死産については比較的高頻度での発現となり、対照群, 30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 3, 5 および 3 例の発現がみられたが、群間での差はみられなかった。結果的に、出生時点（生後 0 日）の生存児数は、対照群, 30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 18/23, 15/20 および 16/20 例であり、生後 0 日までの児の生存率に TCDD 曝露に伴う影響はみられなかった。

出生後、離乳までの間に、対照群, 30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 1, 1 および 2 例の死亡がみられたが、これらの頻度に群間で差はみられなかった。一方、離乳直後から 1 ヶ月の間に非常に高頻度の出生児の死亡がみられ、対照群で 3 例, 300 ng/kg

群では6例の児の死亡を認めた。これらは、対照群でも3例と比較的に高頻度の死亡が発現したこと、300 ng/kg 群での死亡はこの時期に特異的に偏ったことから、TCDD曝露に伴う変化ではなく、後述するように児のストレスに起因した変化と考えられた。離乳跡1ヶ月から剖検時（7歳）までには、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ4, 5 および 2 例の死亡がみられた。対照群と 30 ng/kg 群との間には差はみられず、逆に 300 ng/kg 群ではこの時期の死亡は両群よりも少なかった。

剖検時（生後7歳）における生存率は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ55.5, 60.0 および 37.5%と、300 ng/kg 群でみかけの生存率は低くなった。しかし、離乳直後から1ヶ月の間に発現したストレスに起因すると考えられるこの時期特異的死亡を除外した剖検時（生後7歳）における生存率は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ66.7, 60.0 および 60.0%であり、児の生存率については群間における差はなかったものと結論した。

### 3.5. 出生時の観察、出生児の体重推移および食欲状態

出生時の性比（雄／雌）は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ5／13, 8／7 および 9／7であった。TCDD曝露により危惧された性比の雌への偏りは、本試験ではみられなかった。出生時点における児の外形観察では、目立った外形異常はみられなかったが、出生後、歯牙の萌出が顕著になるに連れて、300 ng/kg 群だけで歯の形成異常（早期萌出、歯胚欠如など）が明らかとなった[68]。それ以外には出生児に外形異常はみられなかった。

出生児の体重を Table 7-1～7-6 に、また雄出生児の体重推移を Fig 3 に示した。いずれの時点においても、雌雄共に対照群と 30 および 300 ng/kg 群との間に統計学的有意差はみられなかったが、300 ng/kg 群の雄では生後3歳以降に、対照群と比較して約

10%の体重増加の抑制がみられた。出生児の食欲状態については、TCDD曝露に起因すると考えられる異常はいずれの群においてもみられなかった。

### 3.6. 出生児の血液学的検査

出生時の生後180日（Table 8-1～8-4）、生後36ヶ月（Table 8-5～8-8）および剖検時（生後7歳、Table 8-9～8-12）における血液学的検査結果をTable 8に示した。

リンパ球数およびその比率の減少が300 ng/kg群の雌ではみられたが、これが児の免疫機能に対する影響を示唆する変化であるかは不明であった。300 ng/kg群の雄および30 ng/kg群ではTCDD曝露に起因すると考えられる変化はみられなかった。なお、生後180日の検査では、赤血球数、ヘマトクリット値あるいはヘモグロビン濃度の低値などの児の貧血傾向を示唆する変化がみられたが、これらはその後回復する一過性の変化であった。他にも30および300 ng/kg群では他にも統計学的有意差が散見されたが、用量依存の無い変化であるか、対照群の変動範囲内の変化であると判断した。

### 3.7. 出生児の血液生化学検査

出生時の生後180日（Table 9-1～9-4）、生後36ヶ月（Table 9-5～9-8）および剖検時（生後7歳、Table 9-9～9-12）における血液生化学検査結果をTable 9に示した。

ASAT, ALAT, ALP（アルカリフォスファターゼ）および総ビリルビンの高値傾向並びに総コレステロールの低値傾向などの、肝機能障害を疑わせるパラメータの変動が300 ng/kg群の雌雄でみられた。300 ng/kg群のそれ以外のパラメータおよび30 ng/kg群では、TCDD曝露に起因すると考えられる変化はみられなかった。

### 3.8. 出生児が性成熟した段階での剖検所見および器官重量

出生児の生後7歳時点での器官重量測定結果をTable 10-1～10-8に示した。

300 ng/kg 群の雄 1 例 (No. 39) および雌 2 例 (Nos. 35, 42) では腎臓の白色巣 (表面および断面, 左右) がみられたが, 30 ng/kg 群および対照群ではいずれの出生児にも異常はみられなかった. 300 ng/kg 群では, その他に腎臓の白色巣がみられた動物 (No. 42) において, 肺の暗赤色巣および黄白色結節がみられたが, 雌雄生殖器に関してはいずれの出生児にも異常はみられなかった.

出生児の器官重量については, 30 および 300 ng/kg 群の雌において, 卵巣および顎下腺重量の高値がみられたが, その毒性学的意義は不明であった. 雄では TCDD 曝露の影響と考えられる変化はみられなかった. なお, 30 および 300 ng/kg 群では他にも統計学的有意差が散見されたが, 用量依存の無い変化であるか, 対照群の変動範囲内の変化であると判断した.

#### 4. 考察

現行 TDI 算定の基礎となった 86 ng/kg の約 1/3 量および 3 倍量に相当する 30 並びに 300 ng/kg の濃度の TCDD を, アカゲザルの妊娠 20 日から分娩後 90 日に体内負荷量がほぼ一定となるように算出された条件で曝露させ, その次世代の出生前および出生後の発生に対する影響並びにその時の母動物の生殖機能に対する影響について検討した. TCDD 曝露を受けた母動物によって自然分娩および哺育された出生児は, 性成熟に達するまで飼育し, 7 歳の冬に剖検した.

30 あるいは 300 ng/kg の TCDD を母動物の妊娠期間および哺育期間 (妊娠 20 日～分娩後 90 日) に曝露させても, 母動物の一般状態, 哺育および授乳行動, 体重推移, 摂餌量並びに妊娠期間の長さには明らかな変化はみられなかった. しかし, 流産, 死産および児の生後死亡が高頻度に起こり, 最終的な 7 歳時点での評価例数は, 対照群が雄 4 例, 雌 6 例, 30 ng/kg 群が雄 6 例, 雌 3 例, 300 ng/kg 群が雄 3 例, 雌 3 例となっ

た。特に、離乳直後から1ヶ月の間に非常に高頻度の児の死亡がみられ、対照群で3例、300 ng/kg 群では6例の児の死亡を認めた。アカゲザルは他のマカカ属のサル（カニクイザルなど）と比べても知能が高く、より外界の環境変化に対して感受性が高いと一般的に言われている。したがって、この時期特異的な児の死亡については、アカゲザルの特性、出生児の飼育の複雑さおよび難しさに起因するものと考えられた。一方、この時期の死亡を除いたアカゲザルの生後7歳の生存率としては妥当であり、実験・飼育に関する不備はなかったものと判断した。さらに、今回の一連の実験において、後述するような重要な雄性生殖能に対する毒性知見を検出できたことから、評価児数としても十分な数は維持できたものと考えた。

30 ng/kg 群の妊娠80日、140日および分娩後90日の血漿中 TCDD 濃度は、それぞれ 0.441, 0.406 および 0.402 pg/g (wet), 300 ng/kg 群ではそれぞれ 4.294, 2.883 および 1.906 pg/g (wet)であった。特に 300 ng/kg 群の妊娠80日では、測定した16母動物中の4母動物 (Nos. 34, 37, 40, 57) において、6.3~8.7 pg/g (wet)と同群の他個体よりも高い TCDD 曝露レベルを示し、これらの動物では妊娠後期の流産 (No. 34), 死産 (No. 37) あるいは出生後間もない死亡 (1ヶ月以内, Nos. 40, 57) が起こった。30年以上前にいくつかの研究グループによって実施された TCDD 曝露によるアカゲザルの発毒性試験においても、流産の増加が報告されている[69-71]。今回の実験では、300 ng/kg 群での生存率については対照群との間に差はなかったものの、TCDD 曝露と流産、死産あるいは出生後間もない死亡については、何らかの因果関係が存在する可能性が考えられた。TCDD 曝露レベルとその毒性変化の関連性については、出生児の歯の形成異常においてもみられた[68]。歯の形成異常は 300 ng/kg 群だけでみられ、妊娠80日における母体血漿中 TCDD 濃度が 2.0 pg/g (wet)以下であった出生児では1例も歯の異常がみられなかったのに対し、2.1~4.0 pg/g (wet)であった出生児では 20%, 4.1

pg/g (wet)以上であった出生児では全例で歯の異常が認められた。なお、歯の形成異常以外には催奇形性作用はみられず、歯の異常も児の摂食行動などその後の児の発育に影響を与えるものではなかった。最終投与後 12 ヶ月目の TCDD 濃度は、30 ng/kg 群では平均で 0.038 pg/g (wet), 300 ng/kg 群では 0.056 pg/g (wet)であり、両群とも検出限界[0.04 pg/g (wet)]に近い値まで減少した。Bowman らによると、アカゲザルにおける TCDD の半減期は約 1 年であると報告されている[67]。今回の実験では、当初の想定よりも早く血漿中 TCDD 濃度が減少した可能性は否めないが、出生児の歯の形成異常、また後述する様々な雄性生殖器官への影響が確認されており、母動物の TCDD 曝露レベルとしては十分かつ妥当な量を担保できたものと考えた。また、乳汁中 TCDD 濃度に関しては血漿中濃度よりも高いレベルであったことが確認された。

出生児では、前述の歯の形成異常はみられたものの、性比、一般状態および食欲状態については、TCDD 曝露に起因すると考えられる異常はみられなかった。体重に関しては、雄の生後 3 歳以降に対照群と比較して約 10%の体重増加抑制がみられたが、この原因については不明であった。出生児の血液学的検査では、リンパ球数およびその比率の減少が 300 ng/kg 群の雌で、血液生化学検査では、ASAT, ALAT, ALP および総ビリルビンの高値傾向並びに総コレステロールの低値傾向などの、肝機能障害を疑わせるパラメータの変動が 300 ng/kg 群の雌雄でみられたが、出生児の生殖能および生殖器官への影響を評価する上で問題となるような変化ではなかった。出生児の生後 7 歳時点での剖検では、腎臓の白色巣（表面および剖面、左右）が 300 ng/kg 群の雄 1 例および雌 2 例で、肺の暗赤色巣および黄白色結節が雌 1 例でみられた。腎臓および肺の変化は母動物の剖検においてもみられており、血液学的検査におけるリンパ球数およびその比率の減少、血液生化学検査における肝機能パラメータの変動と合わせて、アカゲザルにおける TCDD 曝露に起因した特徴的变化と考えられた。



以上のように、アカゲザルの妊娠 20 日から分娩後 90 日に 30 あるいは 300 ng/kg の濃度の TCDD を曝露させた結果、出生児に歯の形成異常、血液学的検査におけるリンパ球数の減少、肝機能障害を疑わせる血液生化学パラメータの変動、肺並びに腎臓の肉眼的異常所見などがみられたが、出生児の生殖能および生殖器官への影響を評価する上で障害となるような毒性変化は見出されなかった。

## 5. Tables and Figures

Table 1-1 Pregnancy outcome including gestational length, and pre- and postnatal mortality

Dose level: 0 ng/kg

Animal No.	Date on Day 0 of gestation	Date on delivery (abortion/fetal death)	Gestational length	Gender of neonate	Note	Date of offspring death	Postnatal day at offspring death	Postnatal day at necropsy (age of 7) Female: 2007/12/3 Male: 2007/12/10
1	1999/11/30	2000/5/9	161	Female				2764
2	1999/12/3	2000/5/18	167	Female				2755
3	1999/12/11	2000/5/30	171	Female	Postnatal death	2001/8/26	453	
4	1999/12/11	2000/5/23	164	Male				2757
5	1999/12/14	2000/2/12	60		Fetal death			
6	1999/12/15	2000/6/3	171	Female				2739
7	1999/12/15	2000/5/7	144	Female				2766
8	1999/12/16	2000/1/25	40		Fetal death			
9	1999/12/17	2000/6/3	169	Female	Postnatal death	2001/8/12	435	
10	1999/12/18	2000/5/12	146	Male				
11	1999/12/19	2000/5/21	154	Female				2752
12	1999/12/19	2000/5/31	164	Female				2742
13	1999/12/23	2000/5/21	150	Male				2759
14	1999/12/23	2000/5/27	156	Female	Stillbirth			
15	1999/12/28	2000/6/10	165	Female	Postnatal death	2002/6/3	723	
46	1999/12/31	2000/6/10	162	Female	Postnatal death	2005/8/20	1897	
49	2000/1/1	2000/5/27	147	Male	Stillbirth			
58	2000/1/11	2000/6/26	167	Female	Postnatal death	2000/9/28	94	
61	2000/1/16	2000/6/17	153	Male	Postnatal death	2004/1/5	1297	
62	2000/1/17	2000/7/6	171	Male				2713
63	2000/1/24	2000/7/6	164	Female	Postnatal death	2006/11/2	2310	
64	2000/1/29	2000/7/2	155	Male				2717
69	2000/1/29	2000/7/8	161	Female	Postnatal death	2001/8/7	395	

Mean 160.1

S.E. 1.9

**Table 1-2 Pregnancy outcome including gestational length, and pre- and postnatal mortality**

**Dose level: 30 ng/kg**

Animal No.	Date on Day 0 of gestation	Date on delivery (abortion/fetal death)	Gestational length	Gender of neonate	Note	Date of offspring death	Postnatal day at offspring death	Postnatal day at necropsy (age of 7) Female: 2007/12/3 Male: 2007/12/10
16	1999/11/28	2000/5/15	169	Male	Postnatal death	2003/3/25	1044	
17	1999/12/6	2000/5/4	150	Male	Stillbirth			
18	1999/12/8	2000/5/26	170	Female	Postnatal death	2007/3/8	2477	
19	1999/12/9	2000/5/13	156	Male				2767
20	1999/12/11	2000/5/22	163	Female	Stillbirth			
21	1999/12/15	2000/5/22	159	Female				2751
22	1999/12/18	2000/5/30	164	Male				2750
23	1999/12/19	2000/6/3	167	Female	Postnatal death	2004/8/4	1523	
24	1999/12/20	2000/5/26	158	Male	Postnatal death	2000/11/1	159	
25	1999/12/22	2000/5/25	155	Male				2755
26	1999/12/22	2000/6/10	171	Female	Postnatal death	2002/8/25	806	
27	1999/12/25	2000/6/17	175	Male				2732
28	1999/12/26	2000/6/1	158	Female	Stillbirth			
29	1999/12/26	2000/5/31	157	Female	Stillbirth			
30	1999/12/28	2000/6/7	162	Female				2735
47	1999/12/31	2000/6/10	162	Male				2739
50	2000/1/2	2000/6/22	172	Female	Stillbirth			
53	2000/1/4	2000/6/18	166	Male				2731
59	2000/1/11	2000/6/18	159	Female	Postnatal death	2007/3/16	2462	
65	2000/3/3	2000/8/14	164	Female				2667

Mean 162.9

S.E. 1.5

**Table 1-3 Pregnancy outcome including gestational length, and pre- and postnatal mortality**

**Dose level: 300 ng/kg**

Animal No.	Date on Day 0 of gestation	Date on delivery (abortion/fetal death)	Gestational length	Gender of neonate	Note	Date of offspring death	Postnatal day at offspring death	Postnatal day at necropsy (age of 7) Female: 2007/12/3 Male: 2007/12/10
31	1999/11/28	2000/5/17	171	Female				2756
32	1999/11/30	2000/5/16	168	Male	Postnatal death	2001/8/26	467	
33	1999/12/1	2000/4/29	150	Male				2781
34	1999/12/6	2000/4/12	128	Male	Abortion			
35	1999/12/12	2000/5/22	162	Female				2751
37	1999/12/14	2000/5/26	164	Male	Stillbirth			
38	1999/12/15	2000/5/27	164	Female	Postnatal death	2001/7/26	425	
39	1999/12/18	2000/6/6	171	Male				2736
40	1999/12/19	2000/5/24	157	Female	Postnatal death	2000/6/19	26	
41	1999/12/19	2000/5/10	143	Female	Postnatal death	2001/7/6	422	
42	1999/12/20	2000/6/1	164	Female				2741
43	1999/12/23	2000/6/16	176	Male	Stillbirth			
44	1999/12/25	2000/6/1	159	Male	Postnatal death	2007/6/4	2559	
45	1999/12/27	2000/6/11	167	Female	Postnatal death	2001/8/7	422	
51	2000/1/2	2000/6/22	172	Male	Postnatal death	2001/8/2	406	
57	2000/1/9	2000/7/12	185	Male	Postnatal death	2000/7/13	1	
60	2000/1/14	2000/6/26	164	Male				2723
66	2000/2/25	2000/8/15	172	Male	Moribundity	2007/5/10	2459	
67	2000/2/28	2000/4/8	40		Abortion			
68	2000/3/1	2000/8/17	169	Male	Postnatal death	2001/8/13	361	

Mean 165.4

S.E. 2.2

Table 2-1 Body weight of F0 dams (kg) - Gestation period

Group (ng/kg)	Animal No.	GD20	GD40	GD60	GD80	GD100	GD120	GD140
	1	4.24	3.88	3.95	4.24	4.51	4.55	4.86
	2	5.58	5.75	5.84	6.03	6.15	6.40	6.59
	3	4.04	4.01	3.84	4.00	4.40	4.18	4.53
	4	5.51	5.41	5.39	5.57	5.88	6.06	6.25
	5	4.10	4.33	4.52	- a	-	-	-
	6	4.68	4.56	4.47	4.65	4.46	4.73	5.02
	7	4.56	4.37	4.34	4.69	4.91	5.21	5.58
	8	4.66	4.66	-	-	-	-	-
	9	4.48	4.49	4.28	4.44	4.74	4.73	4.96
	10	4.08	3.88	4.31	4.29	4.10	4.40	4.63
	11	4.46	4.43	4.56	4.68	4.58	4.47	4.60
0	12	5.52	5.44	5.86	6.40	6.50	6.62	6.66
	13	4.97	5.07	5.14	5.28	5.45	5.75	6.00
	14	4.02	3.94	4.02	4.01	3.96	4.01	4.11
	15	4.18	4.30	4.25	4.24	4.24	4.51	4.55
	46	4.75	4.41	4.31	4.48	4.57	4.95	5.40
	49	4.75	4.62	4.86	5.24	5.55	5.82	6.13
	58	4.51	4.23	3.99	4.21	4.23	4.60	3.92
	61	5.02	5.02	5.02	4.88	5.56	6.00	6.04
	62	4.73	4.63	4.73	4.90	5.25	5.34	5.84
	63	4.45	4.24	4.04	4.27	4.67	4.74	4.82
	64	4.45	5.00	5.47	5.27	5.43	5.35	5.45
	69	6.52	6.61	6.80	6.92	7.04	7.42	7.68
	Mean	4.707	4.664	4.727	4.890	5.056	5.230	5.410
	S.E.	0.126	0.138	0.162	0.174	0.183	0.196	0.207

GD : Day of gestation

Embryo/fetal death GD60 (a), GD40 (b)

Table 2-2 Body weight of F0 dams (kg) - Lactation period

Group (ng/kg)	Animal No.	LD1	LD10	LD20	LD30	LD40	LD50	LD60	LD70	LD80	LD90
	1	4.22	4.10	4.33	3.95	3.93	4.32	3.89	4.30	4.30	4.19
	2	5.72	5.47	5.65	5.38	5.65	5.19	5.60	5.51	5.54	5.48
	3	4.24	4.23	4.26	3.88	4.16	4.13	4.10	4.68	4.35	4.30
	4	5.63	5.38	5.14	5.03	4.84	5.11	5.07	4.91	4.89	5.03
	5	- a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	4.68	4.86	4.86	4.88	5.03	5.03	4.82	4.88	5.17	4.42
	7	4.80	4.67	4.53	4.55	4.55	4.52	4.51	4.90	4.61	4.20
	8	- b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	4.37	4.40	4.24	4.04	4.22	4.36	4.05	4.17	4.46	4.30
	10	- c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	11	4.10	4.21	4.26	4.29	4.31	4.31	4.38	4.46	4.36	5.86
0	12	6.04	5.81	6.14	5.69	5.93	5.73	5.20	5.63	5.66	5.48
	13	5.48	5.52	5.70	5.76	5.66	5.64	5.72	5.86	5.77	5.86
	14	- d	-	-	-	-	-	-	-	4.17	4.04
	15	3.93	4.22	4.42	3.89	4.35	3.65	4.18	4.22	4.75	4.76
	46	3.92	4.51	4.58	4.33	4.65	4.49	4.67	4.60	-	-
	49	- e	-	-	-	-	-	-	-	3.91	4.00
	58	4.22	4.25	4.44	3.75	3.80	4.08	4.29	4.06	5.43	5.21
	61	5.54	5.56	5.08	5.32	5.21	5.36	5.43	5.38	4.33	4.41
	62	4.68	5.02	4.94	4.37	4.56	4.60	4.19	4.46	4.08	4.13
	63	4.09	4.09	3.75	3.73	4.07	4.04	4.12	4.02	4.84	4.32
	64	4.68	5.11	4.97	4.46	4.93	4.83	4.82	4.86	5.77	5.86
	69	7.11	7.20	7.33	7.27	7.14	7.26	7.34	7.22	7.39	7.22
	Mean	4.858	4.923	4.923	4.698	4.833	4.814	4.799	4.896	4.936	4.898
	S.E.	0.207	0.191	0.201	0.217	0.198	0.198	0.200	0.188	0.193	0.200

LD : Day of lactation

GD : Day of gestation

Embryo/fetal death GD60 (a), GD40 (b)

Still birth GD146 (c), GD156 (d), GD147 (e)

Table 2-3 Body weight of F0 dams (kg) - Gestation period

Group (ng/kg)	Animal No.	GD20	GD40	GD60	GD80	GD100	GD120	GD140
30	16	5.41	5.34	5.05	5.08	5.02	5.44	5.42
	17	4.95	4.60	4.50	4.61	4.98	5.39	5.71
	18	4.28	3.96	3.97	4.20	4.46	4.62	4.72
	19	4.29	3.95	3.97	4.11	4.51	4.56	4.48
	20	5.68	5.73	5.87	6.15	6.60	6.96	7.08
	21	5.55	5.86	6.06	6.48	6.74	6.87	7.16
	22	4.07	3.88	4.11	4.40	4.48	4.76	5.00
	23	4.50	4.73	4.63	4.93	5.11	5.34	5.60
	24	4.41	4.27	4.28	4.54	4.56	4.70	5.00
	25	5.80	5.10	5.03	5.45	5.60	5.80	6.00
	26	4.80	4.49	4.44	4.47	4.47	4.55	4.62
	27	5.50	4.80	4.87	5.06	5.22	5.39	5.88
	28	4.02	3.92	4.19	4.27	4.38	4.38	4.48
	29	5.57	5.87	5.95	6.18	6.34	6.44	6.72
	30	4.57	4.88	4.84	5.20	5.26	5.61	5.80
	47	4.29	4.15	4.31	4.41	4.44	4.64	5.00
	50	5.25	5.48	5.81	6.23	6.45	6.73	7.10
	53	5.20	5.29	5.22	5.64	5.52	5.94	6.06
	59	5.26	5.14	5.07	5.39	5.80	6.04	6.36
	65	5.17	4.80	4.84	5.09	5.25	5.55	6.26
	Mean	4.929	4.812	4.851	5.095	5.260	5.486	5.723
	S.E.	0.130	0.147	0.149	0.165	0.175	0.183	0.197

GD : Day of gestation

Not significantly different from control

Table 2-4 Body weight of F0 dams (kg) - Lactation period

Group (ng/kg)	Animal No.	LD1	LD10	LD20	LD30	LD40	LD50	LD60	LD70	LD80	LD90
30	16	4.76	5.10	5.07	4.87	4.83	5.28	5.38	5.44	5.35	5.04
	17	- a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	3.96	4.10	4.12	3.82	4.23	3.91	4.50	4.35	4.38	4.10
	19	4.16	4.09	3.93	3.60	3.83	3.62	4.03	4.10	3.80	3.90
	20	- b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	21	6.55	6.36	5.93	6.09	6.08	6.25	6.17	6.23	5.93	5.91
	22	4.58	4.32	4.28	3.85	4.32	4.37	4.48	4.52	4.39	4.31
	23	5.15	5.48	5.35	5.16	5.30	5.36	5.24	5.18	5.08	4.13
	24	4.24	4.38	4.29	3.90	4.26	3.76	4.28	4.16	4.21	4.40
	25	5.37	4.93	5.18	4.78	5.08	5.32	5.20	5.31	5.29	5.05
	26	4.34	4.65	4.94	4.14	4.85	4.88	4.87	5.10	5.19	5.30
	27	5.18	5.37	4.74	4.77	5.07	5.22	5.30	5.15	5.01	4.98
	28	- c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	- d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	30	5.03	4.71	4.99	5.28	5.02	4.92	4.92	4.85	4.72	4.89
	47	4.44	4.55	4.39	4.15	4.24	4.06	4.06	4.16	4.62	3.93
	50	- e	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	53	5.52	5.58	5.14	5.14	5.31	5.33	5.42	5.42	5.47	5.48
	59	5.51	5.62	5.40	5.36	5.43	5.43	5.54	5.44	5.38	5.42
	65	5.75	5.64	5.32	5.45	5.68	5.38	5.39	5.44	5.49	5.50
	Mean	4.969	4.992	4.871	4.691	4.902	4.873	4.985	4.990	4.954	4.823
	S.E.	0.183	0.173	0.145	0.191	0.161	0.196	0.157	0.159	0.150	0.167

LD : Day of lactation

GD : Day of gestation

Still birth GD150(a), GD163(b), GD158(c), GD172(e)

Prolapse of the uterus, Still birth GD157(d)

Not significantly different from control

Table 2-5 Body weight of F0 dams (kg) - Gestation period

Group (ng/kg)	Animal No.	GD20	GD40	GD60	GD80	GD100	GD120	GD140
300	31	4.32	4.59	4.75	5.15	5.41	5.51	5.62
	32	4.32	4.67	4.67	4.93	5.41	5.62	5.68
	33	4.79	4.91	4.86	4.81	5.00	5.23	5.44
	34	4.40	4.25	4.41	4.66	4.93	5.12	- a
	35	4.38	4.43	4.41	4.43	4.50	4.54	4.66
	37	4.21	4.21	4.24	4.29	4.62	4.21	4.32
	38	4.12	4.09	4.13	4.44	4.79	5.09	5.51
	39	5.66	5.73	5.78	6.16	6.42	6.48	6.82
	40	4.86	4.85	4.55	4.77	4.91	5.01	5.22
	41	4.92	4.75	4.63	4.90	5.10	5.20	5.75
	42	5.33	5.27	5.26	5.61	5.63	5.93	6.36
	43	6.52	6.50	6.75	6.99	7.26	7.32	7.50
	44	4.77	4.49	4.52	4.68	4.81	5.13	5.50
	45	4.86	4.52	4.37	4.50	4.63	4.88	5.32
	51	4.98	5.22	5.39	5.51	5.62	5.81	5.95
	57	5.06	5.26	5.03	5.37	5.52	6.11	6.00
	60	4.80	4.87	5.00	5.31	5.42	5.82	6.06
	66	5.46	5.52	5.63	5.76	5.76	5.97	6.79
	67	4.76	4.52	- d	-	-	-	-
	68	4.84	4.63	4.73	4.85	4.51	4.56	5.10
Mean		4.868	4.864	4.901	5.112	5.276	5.449	5.756
S.E.		0.126	0.130	0.147	0.156	0.159	0.170	0.183

GD : Day of gestation

Abortion GD128(a), GD40(d)

Not significantly different from control

Table 2-6 Body weight of F0 dams (kg) - Lactation period

Group (ng/kg)	Animal No.	LD1	LD10	LD20	LD30	LD40	LD50	LD60	LD70	LD80	LD90
300	31	4.46	4.52	4.55	4.39	4.39	4.32	4.42	4.44	4.30	4.50
	32	5.35	5.35	5.35	4.94	4.65	5.39	4.66	5.46	5.46	5.36
	33	4.82	4.74	4.64	4.63	4.90	4.48	4.89	4.44	4.88	4.79
	34	- a	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	35	4.36	4.43	4.00	4.24	4.07	4.50	4.39	4.31	4.47	4.28
	37	- b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	4.83	4.69	4.38	4.07	4.25	4.33	4.46	4.20	4.40	4.39
	39	6.11	6.02	6.08	5.39	6.12	6.05	5.40	5.68	5.68	5.44
	40	5.05	4.44	4.78	- e	-	-	-	-	-	-
	41	4.97	4.64	4.58	4.43	4.35	4.53	4.74	4.75	4.71	4.82
	42	5.96	5.44	5.57	5.32	5.50	5.58	5.57	5.56	5.52	5.55
	43	- c	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	44	4.98	4.49	4.61	4.45	4.61	4.55	4.50	4.46	4.52	4.51
	45	5.25	4.99	4.65	4.63	4.43	4.70	4.66	4.69	4.71	4.74
	51	5.69	5.14	5.47	5.46	5.46	5.72	5.66	5.86	6.03	5.49
	57	5.35	- f	-	-	-	-	-	-	-	-
	60	5.46	5.30	5.35	4.96	4.80	4.99	5.12	5.07	4.85	4.80
	66	5.97	5.81	5.84	5.49	5.90	5.64	5.74	5.84	5.53	5.24
	67	- d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	68	4.56	4.41	4.37	4.53	4.54	4.63	4.61	4.86	4.79	4.84
Mean		5.198	4.961	4.948	4.781	4.855	4.958	4.916	4.973	4.989	4.911
S.E.		0.136	0.136	0.158	0.128	0.171	0.159	0.130	0.160	0.146	0.115

LD : Day of lactation

GD : Day of gestation

Abortion GD128(a), GD40(d)

Still birth GD164(b), GD176(c)

F1 death LD26(e), LD1(f)

Not significantly different from control

Table 3 Plasma TCDD concentrations in F0 dams

Group (ng/kg)	Animal No.	Concentration (pg/g(wet))			
		GD 80	GD 140	AD 90days	AFA 12months
0	1	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
	2	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
	3	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
	4	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
	6	-	-	<0.04	<0.04
	11	<0.04	<0.04	-	-
	Mean	<0.04	<0.04	<0.04	<0.04
S.E.	-	-	-	-	
30	16	0.72	0.63	0.59	0.11
	17	0.41	0.30	-	-
	18	0.63	0.65	0.51	<0.04
	19	0.52	0.50	0.34	<0.04
	20	0.29	0.25	-	-
	21	0.15	0.19	0.24	<0.04
	22	0.47	0.43	0.33	<0.04
	29	0.34	0.30	-	-
	Mean	0.441	0.406	0.402	0.022
S.E.	0.065	0.062	0.064	-	
300	31	1.90	1.80	1.00	0.05
	32	4.50	2.80	3.40	0.14
	33	3.30	1.90	1.50	<0.04
	34	6.30	-	-	-
	35	2.60	2.20	0.73	<0.04
	37	8.60	7.00	-	-
	38	2.90	1.60	2.90	0.06
	39	2.40	-	-	-
	40	7.10	-	-	-
	41	3.40	-	-	-
	42	3.20	-	-	-
	43	2.10	-	-	-
	44	2.80	-	-	-
	57	8.70	-	-	-
	60	4.60	-	-	-
66	4.30	-	-	-	
Mean	4.294	2.883	1.906	0.05	
S.E.	0.556	0.841	0.529	0.026	

<0.04 was regarded as "0" when Mean and S.E. values were calculated.

- : Not measured

GD : Day of gestation

AD : After Delivery

AFA : After Final Administration



Table 4 Milk TCDD concentrations in F0 dams

Group (ng/kg)	Animal No.	Concentration (pg/g(wet))	
		AD 30~35	AD 85~90
0	1	0.059	<0.04
	2	<0.04	0.040
	3	<0.04	0.067
	4	<0.04	<0.04
	6	0.064	<0.04
	Mean	0.025	0.021
	S.E.	0.015	0.014
30	16	5.800	2.600
	18	8.400	2.900
	19	6.700	2.900
	21	2.100	4.200
	22	8.200	3.000
	Mean	6.240	3.120
	S.E.	1.141	0.278
300	31	54.000	18.000
	32	270.000	27.000
	33	39.000	22.000
	35	12.000	5.900
	38	48.000	18.000
	Mean	84.600	18.180
	S.E.	46.904	3.487

<0.04 was regarded as "0" when Mean and S.E. values were calculated.

AD : After delivery

Table 5-1 Organ weights in F0 dams

Group	Animal	Pituit.	Thyr.R	Thyr.L	Thyr.LR	Adre.R	Adre.L	Adre.LR	Ovary.R	Ovary.L	Ovary.LR	Thymus
(ng/kg)	No.	mg	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
	2	109	0.71	0.67	1.38	0.36	0.40	0.76	0.32	0.28	0.60	6.0
	3	112	0.32	0.30	0.63	0.22	0.30	0.52	0.22	0.19	0.42	1.1
	4	103	0.58	0.62	1.19	0.42	0.61	1.04	0.28	0.95	1.23	3.5
	5	103	0.30	0.31	0.60	0.25	0.29	0.54	0.24	0.29	0.53	1.8
	6	98	0.60	0.58	1.18	0.27	0.36	0.64	0.42	0.23	0.65	1.0
	7	107	0.58	0.50	1.08	0.29	0.43	0.72	0.17	0.15	0.33	1.6
	9	137	0.39	0.50	0.89	0.39	0.49	0.88	0.34	0.36	0.70	2.8
0	12	152	0.34	0.39	0.73	0.28	0.41	0.69	0.09	0.11	0.19	6.7
	15	92	0.21	0.22	0.42	0.26	0.32	0.58	0.18	0.55	0.73	2.1
	46	100	0.28	0.26	0.54	0.25	0.29	0.54	0.32	0.22	0.53	3.6
	61	144	0.30	0.29	0.60	0.22	0.30	0.52	0.22	0.17	0.39	2.3
	62	131	0.39	0.28	0.67	0.47	0.55	1.03	0.13	0.14	0.27	2.4
	63	146	0.38	0.39	0.77	0.35	0.47	0.82	0.27	0.26	0.53	5.3
	64	111	0.29	0.37	0.66	0.27	0.39	0.66	0.25	0.15	0.40	0.8
	69	96	0.29	0.24	0.53	0.33	0.46	0.79	0.14	0.10	0.24	5.8
	Mean	116.1	0.397	0.395	0.791	0.309	0.405	0.715	0.239	0.277	0.516	3.12
	S.E.	5.2	0.038	0.038	0.074	0.019	0.025	0.044	0.023	0.056	0.067	0.51

Group	Animal	Subm.R	Subm.L	Subm.LR	Spleen	Brain	Heart	Lung	Liver	Kid.R	Kid.L	Kid.LR	Uterus
(ng/kg)	No.	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g	g
	2	1.3	1.4	2.65	5.6	96.7	19.8	45.0	105.1	11.6	11.0	22.6	9.2
	3	1.4	1.4	2.82	2.8	91.4	18.2	24.7	92.9	9.1	9.4	18.4	12.3
	4	1.3	1.2	2.46	4.8	82.6	28.2	37.1	121.8	10.7	11.3	22.0	21.0
	5	0.8	0.8	1.52	4.2	94.9	21.7	34.8	81.3	9.2	9.2	18.4	10.7
	6	1.6	2.0	3.62	3.4	87.9	23.8	31.8	104.3	10.0	9.5	19.5	15.3
	7	0.6	0.6	1.26	3.4	84.8	20.3	42.9	88.0	9.3	9.6	18.9	9.1
	9	1.4	1.4	2.75	5.7	96.4	29.0	32.4	138.9	10.8	10.9	21.8	16.3
0	12	1.0	1.0	2.05	6.2	95.1	30.0	42.6	115.5	10.5	10.7	21.2	6.2
	15	1.5	1.4	2.84	6.5	81.4	16.5	30.7	96.7	7.6	7.9	15.5	20.7
	46	1.2	1.1	2.37	5.0	89.3	23.6	36.8	119.6	9.8	9.7	19.5	16.6
	61	1.0	1.0	1.96	13.9	93.8	25.1	81.9	126.0	13.1	12.6	25.7	11.8
	62	0.8	0.7	1.53	5.5	82.3	30.6	83.4	105.9	11.5	11.7	23.1	12.4
	63	1.0	1.0	2.03	4.0	107.3	20.2	36.1	102.4	8.2	8.6	16.8	19.4
	64	1.4	1.3	2.75	6.2	85.8	20.7	34.2	95.4	12.3	13.5	25.8	14.6
	69	0.8	0.9	1.67	3.6	98.5	20.8	35.4	87.7	10.1	10.2	20.3	11.1
	Mean	1.14	1.15	2.29	5.39	91.21	23.23	41.99	105.43	10.25	10.39	20.63	13.78
	S.E.	0.08	0.09	0.17	0.68	1.88	1.15	4.46	4.17	0.38	0.39	0.76	1.14

Pituit. : Pituitary  
 Thyr.L : Thyroid (Left)  
 Adre.R : Adrenal (Right)  
 Adre.LR : Adrenal (Left & Right)  
 Ovary L : Ovary (Left)  
 Kidn.R : Kidney (Right)  
 Kid.LR : Kidney (Left & Right)  
 Subm.L : Submandibular gland (Left)

Thyr.R : Thyroid (Right)  
 Thyr.LR : Thyroid (Left & Right)  
 Adre.L : Adrenal (Left)  
 Ovary R : Ovary (Right)  
 Ovary.LR : Ovary (Left & Right)  
 Kidn.L : Kidney (Left)  
 Subm.R : Submandibular gland (Right)  
 Subm.LR : Submandibular gland (Left & Right)

Table 5-2 Organ weights in F0 dams

Group (ng/kg)	Animal No.	Pituit. mg	Thyr.R g	Thyr.L g	Thyr.LR g	Adre.R g	Adre.L g	Adre.LR g	Ovary.R g	Ovary.L g	Ovary.LR g	Thymus g
	16	102	0.36	0.38	0.74	0.28	0.38	0.66	0.23	0.22	0.45	2.2
	19	131	0.26	0.38	0.64	0.34	0.43	0.77	0.23	0.14	0.37	0.9
	20	130	0.42	0.30	0.72	0.26	0.31	0.57	0.18	0.27	0.45	1.8
	21	123	0.57	0.57	1.14	0.52	0.72	1.24	0.29	0.16	0.45	3.7
	22	76	0.42	0.33	0.75	0.27	0.35	0.62	0.35	0.36	0.71	1.2
	23	128	0.44	0.39	0.83	0.41	0.49	0.90	0.36	0.17	0.53	2.8
	24	102	0.39	0.41	0.80	0.27	0.37	0.64	0.26	0.31	0.57	2.7
	25	131	0.34	0.38	0.72	0.33	0.43	0.76	0.31	0.20	0.51	7.8
30	26	118	0.27	0.28	0.55	0.34	0.33	0.67	0.49	0.43	0.92	3.8
	27	122	0.35	0.34	0.69	0.46	0.60	1.06	0.29	0.26	0.55	3.7
	28	82	0.26	0.26	0.52	0.29	0.35	0.64	0.32	0.26	0.58	1.5
	29	133	0.42	0.37	0.79	0.39	0.46	0.85	0.33	0.18	0.51	3.8
	30	72	0.27	0.25	0.52	0.36	0.45	0.81	0.21	0.31	0.52	1.7
	47	132	0.43	0.40	0.83	0.25	0.33	0.58	0.21	0.25	0.46	5.3
	50	111	0.20	0.27	0.47	0.29	0.42	0.71	0.25	0.15	0.40	2.2
	53	97	0.38	0.35	0.73	0.39	0.46	0.85	0.28	0.36	0.64	1.2
	65	115	0.66	0.68	1.34	0.35	0.45	0.80	0.25	0.25	0.50	1.8
	Mean	112.1	0.379	0.373	0.752	0.341	0.431	0.772	0.285	0.252	0.536	2.83
	S.E.	4.9	0.028	0.027	0.053	0.018	0.025	0.043	0.018	0.020	0.031	0.43

Group (ng/kg)	Animal No.	Subm.R g	Subm.L g	Subm.LR g	Spleen g	Brain g	Heart g	Lung g	Liver g	Kid.R g	Kid.L g	Kid.LR g	Uterus g
	16	0.7	0.8	1.5	6.7	85.8	24.8	32.7	91.7	10.6	10.3	20.9	13.1
	19	0.8	0.8	1.6	4.5	92.2	20.8	29.0	71.0	9.0	8.8	17.8	7.5
	20	1.0	1.4	2.4	3.7	85.1	23.8	37.1	99.6	8.9	8.7	17.6	20.6
	21	1.3	1.2	2.5	3.9	88.8	23.6	44.1	124.3	11.3	12.2	23.5	15.8
	22	1.9	2.1	4.0	2.3	83.3	17.9	31.0	79.5	8.4	7.8	16.2	10.7
	23	2.1	2.0	4.1	5.2	78.7	23.9	29.7	124.6	10.8	11.1	21.9	10.3
	24	1.7	1.7	3.4	4.6	98.2	19.1	32.4	92.0	10.0	9.4	19.4	9.4
	25	1.4	1.4	2.8	7.5	84.5	24.9	56.8	105.9	11.3	10.3	21.6	21.7
30	26	0.9	0.9	1.8	7.3	87.0	21.9	40.4	99.9	8.7	7.9	16.6	9.2
	27	1.3	1.1	2.4	3.6	96.4	26.8	46.0	81.8	10.3	10.3	20.6	11.2
	28	1.8	1.8	3.6	3.1	83.4	21.4	34.3	108.2	7.5	7.9	15.4	17.5
	29	1.4	1.4	2.8	5.2	88.7	23.6	82.1	105.5	13.0	12.8	25.8	23.3
	30	0.9	0.9	1.8	3.8	83.4	20.5	28.2	86.7	9.4	9.2	18.6	14.0
	47	1.1	0.9	2.0	7.7	82.2	21.2	35.3	88.1	7.9	8.5	16.4	15.3
	50	1.1	1.1	2.2	5.2	85.5	32.2	52.4	111.4	14.8	14.3	29.1	14.5
	53	1.4	1.4	2.8	4.1	87.5	22.0	46.9	85.5	9.3	9.2	18.5	11.0
	65	1.0	1.1	2.1	4.0	93.6	23.3	45.6	113.5	11.6	11.4	23.0	13.3
	Mean	1.28	1.29	2.58	4.85	87.31*	23.04	41.41	98.19	10.16	10.01	20.17	14.02
	S.E.	0.10	0.10	0.19	0.39	1.26	0.79	3.28	3.76	0.46	0.45	0.90	1.11

Pituit. : Pituitary

Thyr.R : Thyroid (Right)

Thyr.L : Thyroid (Left)

Thyr.LR : Thyroid (Left &amp; Right)

Adre.R : Adrenal (Right)

Adre.L : Adrenal (Left)

Adre.LR : Adrenal (Left &amp; Right)

Ovary R : Ovary (Right)

Ovary L : Ovary (Left)

Ovary.LR : Ovary (Left &amp; Right)

Kidn.R : Kidney (Right)

Kidn.L : Kidney (Left)

Kid.LR : Kidney (Left &amp; Right)

Subm.R : Submandibular gland (Right)

Subm.L : Submandibular gland (Left)

Subm.LR : Submandibular gland (Left &amp; Right)

\*P&lt;0.05:Significantly different from control

Table 5-3 Organ weights in F0 dams

Group (ng/kg)	Animal No.	Pituit. mg	Thyr.R g	Thyr.L g	Thyr.LR g	Adre.R g	Adre.L g	Adre.LR g	Ovary.R g	Ovary.L g	Ovary.LR g	Thymus g
	31	121	0.26	0.31	0.57	0.29	0.44	0.73	0.15	0.21	0.36	2.8
	33	108	0.34	0.33	0.67	0.35	0.52	0.87	0.33	0.21	0.54	3.0
	34	114	0.25	0.27	0.52	0.25	0.38	0.63	0.19	0.31	0.50	0.9
	35	75	0.37	0.27	0.64	0.36	0.46	0.82	0.12	0.26	0.38	1.3
	37	76	0.63	0.59	1.22	0.29	0.38	0.67	0.19	0.20	0.39	0.8
	39	103	0.33	0.29	0.62	0.30	0.33	0.63	0.32	0.96	1.28	2.2
	40	76	0.43	0.41	0.84	0.30	0.47	0.77	0.26	0.43	0.69	1.5
300	41	111	0.35	0.34	0.69	0.33	0.39	0.72	0.29	0.21	0.50	2.3
	42	99	0.28	0.29	0.57	0.31	0.41	0.72	0.16	0.26	0.42	5.0
	44	121	0.38	0.36	0.74	0.35	0.44	0.79	0.26	0.39	0.65	1.5
	45	111	0.50	0.54	1.04	0.33	0.39	0.72	0.28	0.19	0.47	2.6
	51	140	0.34	0.39	0.73	0.33	0.40	0.73	0.20	1.29	1.49	1.2
	57	132	0.43	0.44	0.87	0.35	0.48	0.83	0.21	0.23	0.44	1.4
	60	76	0.46	0.44	0.90	0.28	0.39	0.67	0.19	1.15	1.34	3.5
	66	129	0.29	0.27	0.56	0.31	0.34	0.65	0.14	0.19	0.33	3.0
	68	91	0.37	0.32	0.69	0.32	0.44	0.76	0.30	0.18	0.48	1.2
	Mean	105.2	0.376	0.366	0.742	0.316	0.416	0.732	0.224	0.417	0.641	2.14
	S.E.	5.3	0.025	0.024	0.048	0.008	0.013	0.018	0.017	0.092	0.094	0.28

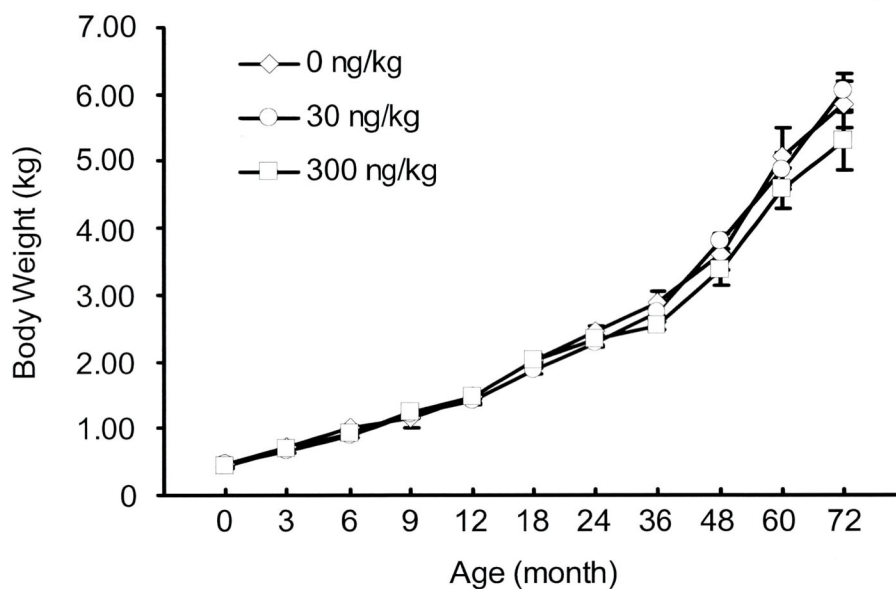
Group (ng/kg)	Animal No.	Subm.R g	Subm.L g	Subm.LR g	Spleen g	Brain g	Heart g	Lung g	Liver g	Kid.R g	Kid.L g	Kid.LR g	Uterus g
	31	1.5	1.4	2.9	4.7	91.6	25.5	35.7	108.3	10.2	11.4	21.6	9.9
	33	1.0	0.9	1.9	4.3	75.2	23.7	38.5	120.4	10.5	10.5	21.0	7.9
	34	1.1	1.1	2.2	4.2	92.2	20.5	32.5	85.4	10.0	10.4	20.4	19.6
	35	0.6	0.9	1.5	2.8	76.6	18.1	36.1	82.0	7.9	8.4	16.3	12.8
	37	0.9	0.9	1.8	5.0	98.7	21.1	39.7	89.6	10.7	10.5	21.2	16.0
	39	1.1	1.1	2.2	8.4	90.7	26.6	40.7	116.7	13.5	12.0	25.5	14.3
	40	1.8	1.8	3.6	5.0	99.0	22.5	37.5	101.2	9.2	9.6	18.8	18.8
300	41	1.0	1.2	2.2	6.0	93.8	22.9	39.6	87.4	9.9	9.6	19.5	16.5
	42	1.3	1.3	2.6	4.8	87.9	23.8	48.9	100.2	10.7	11.4	22.1	12.7
	44	0.7	0.6	1.3	5.0	83.6	19.4	33.0	86.0	10.3	10.5	20.8	12.0
	45	1.4	1.3	2.7	4.8	85.3	21.9	39.0	94.8	10.4	10.2	20.6	11.6
	51	1.3	1.4	2.7	3.7	91.6	24.6	40.3	127.4	11.9	12.7	24.6	12.1
	57	1.0	1.0	2.0	3.5	100.1	24.4	42.0	102.6	11.7	11.5	23.2	16.1
	60	1.3	1.1	2.4	3.8	94.2	18.2	50.6	82.6	9.0	8.8	17.8	12.4
	66	1.2	1.2	2.4	2.9	98.5	24.6	82.0	98.0	10.7	10.3	21.0	16.0
	68	1.0	1.1	2.1	4.8	99.9	20.2	34.7	92.2	10.3	11.5	21.8	17.5
	Mean	1.14	1.14	2.28	4.61	91.18	22.38	41.93	98.43	10.43	10.58	21.01	14.14
	S.E.	0.07	0.07	0.14	0.33	1.95	0.65	2.94	3.46	0.32	0.29	0.58	0.81

Pituit. : Pituitary  
 Thyr.L : Thyroid (Left)  
 Adre.R : Adrenal (Right)  
 Adre.LR : Adrenal (Left & Right)  
 Ovary.L : Ovary (Left)  
 Kidn.R : Kidney (Right)  
 Kid.LR : Kidney (Left & Right)  
 Subm.L : Submandibular gland (Left)  
 Not significantly different from control

Thyr.R : Thyroid (Right)  
 Thyr.LR : Thyroid (Left & Right)  
 Adre.L : Adrenal (Left)  
 Ovary.R : Ovary (Right)  
 Ovary.LR : Ovary (Left & Right)  
 Kidn.L : Kidney (Left)  
 Subm.R : Submandibular gland (Right)  
 Subm.LR : Submandibular gland (Left & Right)

**Table 6****Pregnancy outcome, postnatal mortality, and survival rate of offspring**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
Number of dams	23	20	20
Number of abortions	2	0	1
Number of stillbirths	3	5	3
Number of live births	18	15	16
Number of early postnatal deaths (until weaning)	1	1	2
Number of offspring that died within about 1 month after weaning	3	0	6
Number of offspring that died after about 1 month after weaning	4	5	2
Number that survived until necropsy (7 years old)	10	9	6
Survival rate (7 years old), %	55.6	60.0	37.5
Survival rate (7 years old), % ,except offspring death within about 1 month after weaning	66.7	60.0	60.0

**Fig. 3.**

Body weight of male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. Numbers of male offspring were 4, 6 and 5 in the control, 30 and 300 ng/kg groups, respectively. The values expressed are mean  $\pm$  SE.

Table 7-1 Body weight of male offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
0	4	0.42	0.57	0.71	0.91	0.90	1.55	1.86	2.28	2.53	3.04	4.09	4.98	6.18
	13	0.54	0.55	0.79	1.15	1.42	NE	2.26	2.68	3.44	4.09	5.67	6.71	6.93
	61	0.40	0.53	0.77	0.96	1.28	1.54	2.09	2.51	2.77	- a	-	-	-
	62	0.44	0.61	0.71	1.00	1.10	1.31	1.78	2.22	2.67	3.28	4.45	5.45	7.14
	64	0.48	0.42	0.64	0.93	NE	1.53	2.12	2.56	2.84	3.99	6.11	6.21	8.17
	Mean	0.455	0.536	0.724	0.989	1.175	1.483	2.022	2.450	2.850	3.600	5.080	5.838	7.105
S.D.	0.054	0.071	0.059	0.098	0.225	0.115	0.197	0.194	0.350	0.519	0.964	0.771	0.821	

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 1297(a)

Table 7-2 Body weight of male offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
30	16	0.45	0.39	0.45	0.67	0.96	1.24	1.72	1.99	- a	-	-	-	-
	19	0.41	0.43	0.55	0.93	1.29	1.56	1.83	2.31	2.84	4.29	4.79	5.56	6.97
	22	0.46	0.57	0.69	0.81	1.13	1.28	1.84	2.13	2.37	3.68	5.30	5.69	6.56
	24	0.35	0.40	0.50	- b	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	0.45	0.51	0.68	0.91	1.20	1.33	1.97	2.45	3.31	3.84	5.84	6.87	8.30
	27	0.48	0.53	0.62	0.80	1.11	1.36	1.73	2.14	2.50	3.64	4.97	6.61	8.01
	47	0.38	0.54	0.72	0.90	1.15	1.33	1.93	2.12	2.41	3.50	4.03	5.16	6.61
	53	0.57	0.61	0.73	0.99	1.34	1.60	1.86	2.55	3.03	3.83	4.21	6.37	7.50
	Mean	0.443	0.498	0.617	0.860	1.169	1.386	1.840	2.241	2.743	3.797	4.857	6.043	7.325
	S.D.	0.068	0.082	0.106	0.108	0.125	0.139	0.093	0.202	0.380	0.273	0.676	0.671	0.731

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 1044(a), 159(b)

Not significantly different from control

Table 7-3 Body weight of male offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
300	32	0.44	0.54	0.55	0.61	0.80	0.84	- a	-	-	-	-	-	-
	33	0.35	0.42	0.64	0.88	1.22	1.50	NE	2.20	2.57	3.60	4.75	6.03	7.48
	39	0.43	0.56	0.75	0.88	1.27	1.59	2.07	2.43	2.60	3.80	5.19	6.33	7.88
	44	0.48	0.44	0.55	0.75	1.09	1.39	1.95	2.47	2.65	3.78	5.09	5.18	- b
	51	0.47	0.48	0.55	0.68	0.90	0.94	- c	-	-	-	-	-	-
	60	0.42	0.57	0.76	1.03	1.32	1.52	2.01	2.39	2.29	2.48	3.44	3.84	- d
	66	0.41	0.56	0.70	1.03	1.27	1.38	NE	2.14	2.52	3.23	4.50	5.08	6.82
	68	0.47	0.46	0.56	0.91	1.15	- e	-	-	-	-	-	-	-
	Mean	0.434	0.504	0.633	0.845	1.128	1.309	2.010	2.326	2.526	3.378	4.594	5.292	7.393
S.D.	0.041	0.060	0.093	0.153	0.188	0.297	0.060	0.147	0.140	0.552	0.701	0.973	0.535	

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 467(a), 2559(b), 406(c), 2459(d), 361(e)

Not significantly different from control

Table 7-4 Body weight of female offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
	1	0.41	0.48	0.48	0.72	0.97	1.15	1.52	1.93	2.68	3.47	4.03	4.28	5.37
	2	0.44	0.78	0.78	0.95	1.23	1.43	1.80	2.20	2.56	3.09	3.49	3.55	4.09
	3	0.45	0.48	0.61	0.70	1.09	1.32	- a	-	-	-	-	-	-
	6	0.42	0.56	0.56	0.59	0.84	0.86	1.65	2.08	2.36	3.73	4.12	4.41	4.65
	7	0.33	0.59	0.59	0.88	1.38	1.62	2.00	2.38	2.58	3.02	3.82	4.56	4.95
	9	0.34	0.43	0.55	0.68	0.87	0.94	- b	-	-	-	-	-	-
0	11	0.34	0.59	0.59	0.72	0.73	0.94	1.57	2.04	2.61	3.08	4.00	4.44	4.75
	12	0.47	0.72	0.72	0.86	1.32	1.67	1.86	2.20	2.22	3.43	3.67	4.04	5.00
	15	0.45	0.57	0.75	1.01	1.42	1.66	2.26	- c	-	-	-	-	-
	46	0.44	0.48	0.75	1.00	1.27	1.35	1.66	1.71	1.85	2.53	3.00	- d	-
	58	0.35	0.34	0.39	- e	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	63	0.46	0.70	0.70	0.95	1.37	1.67	1.91	2.35	2.79	3.34	4.69	4.43	- f
	69	0.51	0.55	0.61	1.06	1.42	NE	- g	-	-	-	-	-	-
	Mean	0.415	0.558	0.620	0.842	1.159	1.328	1.803	2.111	2.456	3.211	3.853	4.244	4.802
	S.D.	0.058	0.122	0.115	0.156	0.249	0.315	0.235	0.222	0.303	0.365	0.496	0.348	0.428

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 453(a), 435(b), 723(c), 1897(d), 94(e), 2310(f), 395(g)

Table 7-5 Body weight of female offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
	18	0.40	0.44	0.64	0.79	1.07	1.21	1.68	2.06	2.48	3.05	3.63	3.79	- a
	21	0.45	0.55	0.83	1.09	1.34	1.60	2.28	2.69	3.15	3.73	4.67	5.08	5.99
	23	0.39	0.50	0.77	0.95	1.27	1.48	2.01	2.48	2.59	3.50	- b	-	-
30	26	0.34	0.43	0.63	0.86	1.02	1.15	1.70	2.07	- c	-	-	-	-
	30	0.40	0.51	0.79	1.02	1.36	1.67	2.00	2.38	2.60	3.32	4.27	4.82	5.85
	59	0.43	0.41	0.53	0.72	0.90	1.11	1.80	2.31	2.63	3.56	4.59	4.81	- d
	65	0.45	0.55	0.77	1.10	1.39	1.81	NE	2.48	2.82	3.80	4.48	4.41	4.41
	Mean	0.408	0.484	0.708	0.933	1.193	1.433	1.912	2.353	2.712	3.493	4.328	4.582	5.417
	S.D.	0.038	0.058	0.109	0.147	0.194	0.278	0.230	0.229	0.241	0.276	0.418	0.503	0.875

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 2477(a), 1523(b), 806(c), 2462(d)

Not significantly different from control

Table 7-6 Body weight of female offspring

Group (ng/kg)	Animal No.	0M	1M	3M	6M	9M	12M	18M	24M	36M	48M	60M	72M	FBW
	31	0.40	0.50	0.64	0.87	1.17	1.44	1.91	2.17	2.68	3.26	4.27	4.29	3.63
	35	0.37	0.43	0.67	0.87	1.11	1.29	1.88	2.22	2.77	3.52	4.27	4.41	4.35
	38	0.37	0.46	0.62	0.83	0.99	1.05	- a	-	-	-	-	-	-
300	40	0.28	- b	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	41	0.29	0.37	0.56	0.84	1.16	1.44	- c	-	-	-	-	-	-
	42	0.46	0.56	0.80	0.91	1.19	1.48	2.06	2.34	2.43	3.35	5.10	4.82	5.67
	45	0.41	0.54	0.81	0.99	1.36	1.58	- d	-	-	-	-	-	-
	Mean	0.368	0.477	0.682	0.885	1.163	1.380	1.950	2.243	2.627	3.377	4.547	4.507	4.550
	S.D.	0.064	0.071	0.101	0.059	0.120	0.187	0.096	0.087	0.176	0.132	0.479	0.278	1.035

M : Days after birth (Month)

FBW : Final body weight

NE : Not examined

Death day 425(a), 26(b), 422(c), 422(d)

Not significantly different from control

Table 8-1 Hematology in male offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Eosino. (%)
0	4	5.56	11.3	37.9	13.3	542	68.2	23.9	35.1	1.0	0.00	0
	13	4.92	15.0	34.6	11.5	551	70.3	23.4	33.2	1.4	0.30	2
	61	6.17	18.7	38.7	13.4	435	62.7	21.7	34.6	0.7	0.19	1
	62	5.51	13.5	38.1	12.2	589	69.1	22.1	32.0	1.0	0.27	2
	64	5.24	13.1	37.6	12.6	395	71.8	24.0	33.5	1.3	0.00	0
	Mean	5.480	14.32	37.38	12.60	502.4	68.42	23.02	33.68	1.08	0.152	1.0
S.E.	0.207	1.24	0.72	0.35	37.1	1.55	0.47	0.55	0.12	0.065	0.4	
30	16	4.69	9.0	34.1	11.5	706	72.7	24.5	33.7	0.9	0.09	1
	19	5.89	12.5	40.3	13.3	596	68.4	22.6	33.0	1.3	0.13	1
	22	4.95	12.2	34.3	11.5	564	69.3	23.2	33.5	0.7	0.12	1
	25	4.48	12.2	30.0	10.5	362	67.0	23.4	35.0	1.0	0.00	0
	27	4.34	17.5	29.0	10.0	283	66.8	23.0	34.5	1.6	0.00	0
	47	5.10	8.5	36.0	12.9	543	70.6	25.3	35.8	1.3	0.17	2
	53	4.61	11.1	32.6	11.0	660	70.7	23.9	33.7	3.2	0.11	1
Mean	4.866*	11.86	33.76*	11.53	530.6	69.36	23.70	34.17	1.43	0.089	0.9	
S.E.	0.197	1.12	1.43	0.45	58.3	0.81	0.35	0.37	0.32	0.025	0.3	
300	32	4.48	19.1	31.6	10.5	951	70.5	23.4	33.2	1.3	0.38	2
	33	4.73	18.0	32.2	10.7	596	68.1	22.6	33.2	2.2	0.00	0
	39	5.51	14.7	39.0	13.1	573	70.8	23.8	33.6	1.1	0.00	0
	44	3.78	10.0	27.8	9.1	438	73.5	24.1	32.7	3.5	0.00	0
	51	4.42	9.9	31.8	11.2	439	71.9	25.3	35.2	1.5	0.00	0
	60	4.53	19.1	32.1	11.1	623	70.9	24.5	34.6	1.8	0.76	4
	66	4.50	15.6	33.1	11.3	592	73.6	25.1	34.1	1.3	0.62	4
	68	6.01	18.7	39.9	13.4	411	66.4	22.3	33.6	1.4	1.50	8
Mean	4.745*	15.64	33.44*	11.30*	577.9	70.71	23.89	33.78	1.76*	0.408	2.3	
S.E.	0.246	1.37	1.43	0.49	61.0	0.88	0.39	0.29	0.28	0.190	1.0	

RBC: Number of red blood cells  
WBC: Number of white blood cells  
Ht: Hematocrit value  
Hb: Hemoglobin concentration  
Plat.: Number of blood platelets  
MCV: Mean corpuscular volume  
MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio

\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-2 Hematology in male offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Baso. (%)	Mono. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Mono. (%)	Lymph. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Neutro. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Neutro. (%)
0	4	0.00	0	0.00	0	10.51	93	0.79	7
	13	0.00	0	0.30	2	12.75	85	1.65	11
	61	0.00	0	0.00	0	16.46	88	2.06	11
	62	0.14	1	0.00	0	12.42	92	0.68	5
	64	0.13	1	0.26	2	10.87	83	1.83	14
	Mean	0.054	0.4	0.112	0.8	12.602	88.2	1.402	9.6
S.E.	0.033	0.2	0.069	0.5	1.056	1.9	0.280	1.6	
30	16	0.18	2	0.18	2	7.47	83	1.08	12
	19	0.00	0	0.38	3	10.63	85	1.38	11
	22	0.00	0	0.37	3	10.37	85	1.34	11
	25	0.49	4	0.24	2	9.88	81	1.59	13
	27	0.00	0	0.53	3	15.40	88	1.58	9
	47	0.00	0	0.17	2	7.14	84	1.02	12
	53	0.00	0	0.44	4	7.77	70	2.78	25
Mean	0.096	0.9	0.330*	2.7**	9.809	82.3*	1.539	13.3	
S.E.	0.070	0.6	0.052	0.3	1.080	2.2	0.223	2.0	
300	32	0.00	0	0.57	3	13.94	73	4.20	22
	33	0.00	0	0.18	1	16.74	93	1.08	6
	39	0.15	1	0.00	0	12.05	82	2.50	17
	44	0.00	0	0.20	2	8.80	88	1.00	10
	51	0.00	0	0.20	2	8.02	81	1.68	17
	60	0.00	0	0.57	3	16.62	87	1.15	6
	66	0.00	0	0.16	1	12.48	80	2.34	15
	68	0.00	0	0.19	1	16.27	87	0.75	4
Mean	0.019	0.1	0.259	1.6	13.115	83.9	1.838	12.1	
S.E.	0.019	0.1	0.072	0.4	1.211	2.2	0.406	2.3	

Baso.: Number of basophilic leukocytes  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio  
Mono.: Number of monocytes  
Mono. (%): Monocyte ratio  
Lymph.: Number of lymphocytes  
Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio

\*P<0.05, \*\*P<0.01 :Significantly different from control



Table 8-3 Hematology in female offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Eosino. (%)
0	1	5.37	11.70	38.9	12.9	486	72.4	24.0	33.2	1.2	0.00	0
	2	5.29	15.80	37.2	12.6	348	70.3	23.8	33.9	1.0	0.16	1
	3	5.62	15.50	40.1	13.9	383	71.4	24.7	34.7	0.7	0.00	0
	6	4.76	9.80	31.5	10.0	304	66.2	21.0	31.7	0.7	0.20	2
	7	5.29	13.80	36.2	11.9	436	68.4	22.5	32.9	1.0	0.00	0
	9	5.69	16.70	40.0	12.8	438	70.3	22.5	32.0	1.3	0.00	0
	11	5.02	4.00	35.4	12.4	331	70.5	24.7	35.0	2.8	0.00	0
	12	4.60	12.80	33.3	11.0	695	72.4	23.9	33.0	1.9	0.13	1
	15	5.51	10.80	38.5	13.0	455	69.9	23.6	33.8	1.4	0.11	1
	46	5.50	10.30	34.6	11.0	731	62.9	20.0	31.8	2.7	0.21	2
	63	4.96	11.00	35.5	12.0	415	71.6	24.2	33.8	2.0	0.00	0
	69	5.94	14.40	39.2	12.7	450	66.0	21.4	32.4	0.8	0.00	0
	Mean		5.296	12.217	36.70	12.18	456.0	69.36	23.03	33.18	1.46	0.068
S.E.		0.114	1.000	0.79	0.31	38.1	0.85	0.44	0.32	0.21	0.025	0.2
30	18	5.61	12.30	38.4	12.6	687	68.4	22.5	32.8	0.9	0.00	0
	21	5.47	17.30	36.8	12.3	244	67.3	22.5	33.4	0.8	0.35	2
	23	5.61	8.80	38.2	12.7	426	68.1	22.6	33.2	0.9	0.00	0
	26	4.91	10.50	33.5	11.2	634	68.2	22.8	33.4	1.9	0.53	5
	30	5.08	16.30	35.8	12.0	490	70.5	23.6	33.5	0.3	0.00	0
	59	4.90	9.60	34.3	12.0	440	70.0	24.5	35.0	1.2	0.19	2
	65	5.68	8.80	37.1	12.6	468	65.3	22.2	34.0	0.7	0.09	1
Mean		5.323	11.943	36.30	12.20	484.1	68.26	22.96	33.61	0.96	0.17	1.4
S.E.		0.131	1.338	0.71	0.20	55.0	0.65	0.31	0.27	0.19	0.08	0.7
300	31	4.60	13.90	34.6	11.6	283	75.2	25.2	33.5	1.1	0.00	0
	35	4.73	11.10	34.8	12.0	438	73.6	25.4	34.5	0.8	0.11	1
	38	5.04	17.40	33.7	10.5	478	66.9	20.8	31.2	2.4	0.17	1
	41	4.96	23.60	31.5	9.5	628	63.5	19.2	30.2	1.4	0.00	0
	42	5.81	14.90	37.5	12.4	574	64.5	21.3	33.1	0.9	0.15	1
	45	5.00	17.80	31.9	10.4	462	63.8	20.8	32.6	1.4	0.00	0
Mean		5.023	16.450*	34.00*	11.07*	477.2	67.92	22.12	32.52	1.33	0.072	0.5
S.E.		0.172	1.745	0.89	0.45	48.9	2.12	1.05	0.64	0.24	0.033	0.2

RBC: Number of red blood cells  
WBC: Number of white blood cells  
Ht: Hematocrit value  
Hb: Hemoglobin concentration  
Plat.: Number of blood platelets  
MCV: Mean corpuscular volume  
MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-4 Hematology in female offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. (10 <sup>2</sup> /mm <sup>3</sup> )	Baso. (%)	Mono. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Mono. (%)	Lymph. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Neutro. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Neutro. (%)
0	1	0.00	0	0.47	4	10.06	86	1.17	10
	2	0.00	0	0.32	2	13.75	87	1.58	10
	3	0.00	0	0.00	0	12.56	81	2.95	19
	6	0.00	0	0.00	0	7.35	75	2.25	23
	7	0.14	1	0.41	3	11.18	81	2.07	15
	9	0.00	0	0.17	1	15.36	92	1.17	7
	11	0.00	0	0.04	1	2.68	67	1.28	32
	12	0.00	0	0.26	2	10.75	84	1.66	13
	15	0.11	1	0.43	4	8.64	80	1.51	14
	46	0.00	0	0.10	1	8.14	79	1.85	18
	63	0.11	1	0.00	0	10.56	96	0.33	3
	69	0.00	0	0.14	1	12.82	89	1.44	10
	Mean		0.030	0.3	0.195	1.6	10.321	83.1	1.605
S.E.		0.016	0.1	0.051	0.4	0.970	2.2	0.188	2.2
30	18	0.00	0	0.49	4	10.82	88	0.98	8
	21	0.00	0	0.52	3	13.32	77	3.11	18
	23	0.00	0	0.26	3	7.22	82	1.32	15
	26	0.00	0	0.21	2	8.19	78	1.58	15
	30	0.00	0	0.33	2	13.53	83	2.45	15
	59	0.00	0	0.19	2	7.87	82	1.34	14
	65	0.00	0	0.09	1	7.39	84	1.23	14
Mean		0.000	0.0*	0.299	2.4	9.763	82.0	1.716	14.1
S.E.		0.000	0.0	0.060	0.4	1.048	1.4	0.292	1.1
300	31	0.14	1	0.14	1	12.37	89	1.25	9
	35	0.00	0	0.22	2	9.44	85	1.33	12
	38	0.00	0	0.35	2	12.88	74	4.00	23
	41	0.00	0	0.94	4	17.70	75	4.96	21
	42	0.00	0	0.00	0	12.67	85	2.09	14
	45	0.18	1	0.53	3	15.49	87	1.60	9
Mean		0.053	0.3	0.363	2.0	13.425*	82.5	2.538	14.7
S.E.		0.034	0.2	0.137	0.6	1.160	2.6	0.638	2.5

Baso.: Number of basophilic leukocytes  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio  
Mono.: Number of monocytes  
Mono. (%): Monocyte ratio  
Lymph.: Number of lymphocytes  
Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-5 Hematology in male offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC ( $10^6/\text{mm}^3$ )	WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Eosino. (%)
0	4	5.66	4.30	43.2	13.7	339	76.3	24.2	31.7	1.2	0.02	0.5
	13	5.32	7.21	40.3	13.3	359	75.6	24.9	33.0	1.9	0.05	0.7
	61	5.85	11.96	43.9	14.4	325	75.0	24.6	32.8	1.1	0.82	6.9
	62	5.48	5.06	44.3	14.5	384	80.9	26.5	32.7	1.5	0.07	1.3
	64	5.07	5.53	40.3	13.2	273	79.6	26.1	32.8	0.8	0.02	0.4
	Mean	5.476	6.812	42.40	13.82	336.0	77.48	25.26	32.60	1.30	0.196	1.96
	S.E.	0.135	1.373	0.88	0.27	18.6	1.17	0.44	0.23	0.19	0.156	1.24
30	19	6.16	7.50	44.4	14.4	400	72.1	23.4	32.5	0.8	0.05	0.6
	22	5.43	6.28	41.4	13.4	386	76.3	24.7	32.3	1.2	0.08	1.2
	25	4.52	4.47	34.0	11.3	456	75.2	25.1	33.3	1.3	0.01	0.3
	27	5.12	5.57	36.9	12.0	377	72.1	23.4	32.5	0.9	0.27	4.8
	47	5.50	4.41	44.0	14.4	364	79.9	26.1	32.7	1.3	0.03	0.8
	53	5.60	8.97	43.8	14.1	416	78.3	25.2	32.3	1.1	0.03	0.4
	Mean	5.388	6.200	40.75	13.27	399.8**	75.65	24.65	32.60	1.10	0.078	1.35
	S.E.	0.222	0.729	1.77	0.54	13.4	1.30	0.44	0.15	0.09	0.040	0.70
300	33	5.42	7.24	39.5	12.9	460	72.9	23.8	32.6	0.8	0.06	0.9
	39	5.92	6.03	43.5	14.4	341	73.5	24.3	33.0	1.2	0.05	0.9
	44	5.86	8.67	45.1	14.8	314	77.0	25.2	32.7	1.4	0.51	5.8
	60	5.35	8.25	43.2	13.7	424	80.7	25.6	31.7	0.9	0.35	4.2
	66	5.40	9.66	42.4	13.8	425	78.5	25.5	32.5	1.4	0.55	5.7
	Mean	5.590	7.970	42.74	13.92	392.8	76.52	24.88	32.50	1.14	0.304	3.50
	S.E.	0.123	0.621	0.92	0.32	27.8	1.48	0.35	0.22	0.12	0.107	1.10

RBC: Number of red blood cells      MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
WBC: Number of white blood cells    MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ht: Hematocrit value                    Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Hb: Hemoglobin concentration        Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Plat.: Number of blood platelets    Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio  
MCV: Mean corpuscular volume  
\*\*P<0.01: Significantly different from control

Table 8-6 Hematology in male offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Baso. (%)	Mono. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Mono. (%)	Lymph. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Lymph. (%)	Neutro. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Neutro. (%)	LUC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	LUC (%)
0	4	0.03	0.6	0.12	2.9	3.07	71.4	0.98	22.9	0.08	1.8
	13	0.02	0.3	0.16	2.3	5.61	77.9	1.27	17.6	0.09	1.3
	61	0.06	0.5	0.54	4.6	4.99	41.7	5.32	44.5	0.22	1.8
	62	0.02	0.4	0.16	3.2	3.42	67.7	1.32	26.1	0.07	1.3
	64	0.01	0.1	0.15	2.7	4.64	83.7	0.70	12.6	0.03	0.5
	Mean	0.028	0.38	0.226	3.14	4.346	68.48	1.918	24.74	0.098	1.34
	S.E.	0.009	0.09	0.079	0.39	0.479	7.23	0.858	5.45	0.032	0.24
30	19	0.02	0.3	0.20	2.6	3.47	46.2	3.67	48.9	0.10	1.2
	22	0.04	0.6	0.40	6.4	3.82	60.9	1.85	29.4	0.09	1.3
	25	0.00	0.1	0.08	1.8	1.47	32.8	2.84	63.6	0.07	2.8
	27	0.02	0.3	0.16	2.9	3.65	65.5	1.36	24.4	0.12	1.8
	47	0.01	0.3	0.18	4.0	2.76	62.7	1.39	31.5	0.04	0.6
	53	0.05	0.6	0.46	5.1	4.88	54.4	3.44	38.4	0.10	0.4
	Mean	0.023	0.37	0.247	3.80	3.342	53.75	2.425	39.37	0.087	1.35
	S.E.	0.008	0.08	0.061	0.70	0.467	5.05	0.420	5.96	0.011	0.36
300	33	0.02	0.3	0.12	1.6	4.43	61.2	2.50	34.5	0.11	1.2
	39	0.03	0.5	0.18	3.0	3.49	57.9	2.12	35.1	0.15	2.0
	44	0.05	0.5	0.34	3.9	6.15	70.9	1.45	16.7	0.18	1.0
	60	0.07	0.8	0.32	3.9	6.11	74.1	1.25	15.1	0.16	1.2
	66	0.08	0.8	0.20	2.1	7.20	74.6	1.47	15.2	0.16	1.7
	Mean	0.050	0.58	0.232	2.90	5.476	67.74	1.758	23.32	0.152	1.42
	S.E.	0.011	0.10	0.042	0.47	0.666	3.44	0.236	4.70	0.012	0.19

Baso.: Number of basophilic leukocytes      Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio        Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Mono.: Number of monocytes                    Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio  
Mono. (%): Monocyte ratio                      LUC: Number of large unstained cells  
Lymph.: Number of lymphocytes                LUC (%): Large unstained cell ratio  
Not significantly different from control

Table 8-7 Hematology in female offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Eosino. (%)
0	1	5.32	6.66	41.9	13.4	318	78.8	25.2	31.9	1.0	0.02	0.4
	2	5.43	7.96	45.1	13.5	274	83.1	24.8	29.9	1.0	0.03	0.3
	6	4.77	4.81	35.9	11.1	388	75.3	23.4	31.0	1.3	0.04	0.9
	7	4.98	2.63	36.1	12.0	348	72.6	24.2	33.3	0.8	0.01	0.5
	11	5.39	9.52	41.9	13.5	536	77.8	25.1	32.3	1.0	0.12	1.3
	12	4.65	3.63	35.8	11.8	372	77.1	25.5	33.1	1.3	0.06	1.6
	46	5.52	4.21	42.1	13.8	340	76.3	24.9	32.7	1.2	0.04	1.0
	63	5.74	7.06	42.7	13.5	492	76.3	24.1	31.6	0.6	0.04	0.6
	Mean	5.225	5.810	40.19	12.83	383.5	77.16	24.65	31.98	1.03	0.045	0.83
	S.E.	0.136	0.836	1.30	0.36	31.2	1.07	0.25	0.40	0.09	0.012	0.16
30	18	5.65	3.95	43.0	13.2	523	76.2	23.3	30.6	1.2	0.03	0.9
	21	5.75	5.08	42.4	13.6	261	73.8	23.6	32.0	1.1	0.03	0.6
	23	5.53	10.39	43.5	13.2	332	78.5	23.9	30.4	1.3	0.03	0.3
	30	4.68	10.88	38.1	12.3	338	81.3	26.3	32.3	1.1	0.35	3.2
	59	4.95	8.03	41.1	12.6	368	83.1	25.5	30.7	1.3	0.06	0.8
	65	5.66	8.08	42.6	13.4	396	75.2	23.7	31.5	1.5	0.03	0.4
	Mean	5.370	7.735	41.78	13.05	369.7	78.02	24.38	31.25	1.25*	0.088	1.03
S.E.	0.181	1.133	0.81	0.20	35.8	1.48	0.50	0.33	0.06	0.053	0.44	
300	31	5.33	2.62	42.7	13.7	363	80.1	25.8	32.2	0.8	0.01	0.3
	35	5.36	2.88	43.4	14.1	289	81.0	26.3	32.5	0.9	0.01	0.4
	42	5.89	8.84	42.6	13.9	444	72.3	23.6	32.7	1.3	1.23	14.0
	Mean	5.527	4.780	42.90*	13.90*	365.3	77.80	25.23	32.47	1.00	0.417	4.90
S.E.	0.182	2.031	0.25	0.12	44.8	2.76	0.83	0.15	0.15	0.407	4.55	

RBC: Number of red blood cells  
WBC: Number of white blood cells  
Ht: Hematocrit value  
Hb: Hemoglobin concentration  
Plat.: Number of blood platelets  
MCV: Mean corpuscular volume  
MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-8 Hematology in female offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Baso. (%)	Mono. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Mono. (%)	Lymph. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Neutro. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Neutro. (%)	LUC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	LUC (%)
0	1	0.03	0.5	0.18	2.7	4.54	68.2	1.83	27.5	0.05	0.7
	2	0.05	0.6	0.42	5.2	5.51	69.2	1.81	22.7	0.15	1.8
	6	0.01	0.3	0.25	5.2	3.10	64.5	1.34	27.9	0.06	1.2
	7	0.01	0.3	0.07	2.7	2.00	75.9	0.51	19.5	0.03	1.0
	11	0.07	0.8	0.25	2.7	4.57	48.0	4.43	46.5	0.07	0.8
	12	0.01	0.3	0.19	5.3	2.19	60.4	1.09	30.1	0.08	2.3
	46	0.01	0.2	0.15	3.6	3.07	72.9	0.86	20.4	0.08	1.9
	63	0.02	0.3	0.28	3.9	4.69	66.4	1.99	28.2	0.04	0.6
	Mean	0.026	0.41	0.224	3.91	3.709	65.69	1.733	27.85	0.070	1.29
	S.E.	0.008	0.07	0.037	0.42	0.456	3.04	0.43	3.00	0.013	0.22
30	18	0.01	0.4	0.21	5.4	2.51	63.6	1.12	28.2	0.06	1.6
	21	0.01	0.2	0.17	3.4	3.42	67.2	1.41	27.7	0.05	0.9
	23	0.03	0.3	0.65	6.3	3.42	32.9	6.11	58.8	0.13	1.3
	30	0.03	0.3	0.46	4.2	6.98	64.2	2.95	27.1	0.11	1.0
	59	0.03	0.3	0.35	4.4	5.79	72.2	1.69	21.1	0.10	1.3
	65	0.03	0.3	0.22	2.7	4.98	61.6	2.74	33.9	0.09	1.1
	Mean	0.023	0.30	0.343	4.40	4.517	60.28	2.670	32.80	0.090	1.20
S.E.	0.004	0.03	0.075	0.53	0.691	5.68	0.75	5.46	0.012	0.10	
300	31	0.02	0.7	0.12	4.4	1.66	63.4	0.77	29.5	0.04	1.6
	35	0.00	0.1	0.10	3.6	1.53	53.1	1.18	40.9	0.05	1.8
	42	0.06	0.7	0.32	3.6	5.67	64.2	1.42	16.1	0.14	1.5
	Mean	0.027	0.50	0.180	3.87	2.953	60.23	1.123	28.83	0.077	1.63
S.E.	0.018	0.20	0.070	0.27	1.359	3.57	0.19	7.17	0.032	0.09	

Baso.: Number of basophilic leukocytes  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio  
Mono.: Number of monocytes  
Mono. (%): Monocyte ratio  
Lymph.: Number of lymphocytes  
Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio  
LUC: Number of large unstained cells  
LUC (%): Large unstained cell ratio  
Not significantly different from control

Table 8-9 Hematology in male offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	WBC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Eosino. (%)
0	4	5.25	7.96	41.1	13.0	446	78.2	24.8	31.7	1.2	0.24	3.1
	13	5.22	6.83	42.9	13.2	323	82.2	25.4	30.9	1.4	0.04	0.7
	62	5.08	4.22	40.7	13.8	318	80.2	27.1	33.8	1.6	0.09	2.1
	64	5.16	3.66	42.0	13.4	269	81.4	26.0	31.9	1.3	0.02	0.6
	Mean	5.178	5.668	41.68	13.35	339.0	80.50	25.83	32.08	1.38	0.098	1.63
	S.E.	0.037	1.030	0.49	0.17	37.7	0.87	0.49	0.61	0.09	0.050	0.60
30	19	5.98	20.16	42.9	14.1	392	71.7	23.6	32.9	1.1	0.14	0.7
	22	5.29	9.73	42.6	13.1	402	80.5	24.7	30.7	1.2	0.05	0.5
	25	5.33	3.93	41.0	13.7	440	76.9	25.7	33.4	1.0	0.08	2.0
	27	4.79	5.35	35.8	11.2	392	74.6	23.3	31.2	0.9	0.07	1.3
	47	5.16	14.22	41.4	13.3	494	80.2	25.9	32.2	2.5	0.11	0.8
	53	5.15	15.65	40.9	13.5	419	79.4	26.2	33.0	1.2	0.03	0.2
	Mean	5.283	11.507*	40.77	13.15	423.2*	77.22	24.90	32.23	1.32	0.080	0.92
	S.E.	0.160	2.568	1.05	0.41	16.0	1.44	0.50	0.44	0.24	0.016	0.26
300	33	5.19	9.82	38.6	12.6	420	74.4	24.2	32.5	1.3	0.36	3.7
	39	5.79	5.72	43.9	14.4	276	75.8	24.8	32.7	0.8	0.08	1.5
	66	5.33	10.73	43.4	13.6	406	81.5	25.6	31.4	1.2	0.76	7.1
	Mean	5.437	8.757	41.97	13.53	367.3	77.23	24.87	32.20	1.10	0.400	4.10
	S.E.	0.181	1.541	1.69	0.52	45.8	2.17	0.41	0.40	0.15	0.197	1.63

RBC: Number of red blood cells  
WBC: Number of white blood cells  
Ht: Hematocrit value  
Hb: Hemoglobin concentration  
Plat.: Number of blood platelets  
MCV: Mean corpuscular volume  
MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio

\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-10 Hematology in male offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Baso. (%)	Mono. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Mono. (%)	Lymph. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Lymph. (%)	Neutro. (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	Neutro. (%)	LUC (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	LUC (%)
0	4	0.03	0.3	0.09	1.1	4.69	58.9	2.83	35.6	0.07	0.9
	13	0.02	0.3	0.18	2.7	2.71	39.7	3.79	55.5	0.08	1.2
	62	0.01	0.3	0.06	1.4	2.26	53.6	1.77	41.9	0.03	0.6
	64	0.02	0.6	0.12	3.4	2.32	63.5	1.15	31.3	0.02	0.6
	Mean	0.020	0.38	0.113	2.15	2.995	53.93	2.385	41.08	0.050	0.83
	S.E.	0.004	0.08	0.026	0.54	0.574	5.15	0.583	5.28	0.015	0.14
30	19	0.07	0.3	0.72	3.6	3.41	16.9	15.71	78.0	0.10	0.5
	22	0.03	0.3	0.40	4.1	2.43	25.0	6.77	69.6	0.05	0.6
	25	0.01	0.2	0.11	2.7	1.32	33.6	2.37	60.3	0.05	1.3
	27	0.02	0.3	0.19	3.5	3.03	56.6	1.97	36.9	0.08	1.4
	47	0.08	0.6	0.31	2.2	6.12	43.0	7.50	52.7	0.10	0.7
	53	0.02	0.1	0.32	2.1	1.72	11.0	13.52	86.4	0.04	0.2
	Mean	0.038	0.30	0.342*	3.03	3.005	31.02*	7.973*	63.98*	0.070	0.78
	S.E.	0.012	0.07	0.087	0.33	0.700	6.93	2.307	7.31	0.011	0.19
300	33	0.02	0.2	0.33	3.3	5.22	53.1	3.79	38.6	0.10	1.0
	39	0.01	0.2	0.12	2.2	2.17	38.0	3.20	56.1	0.12	2.1
	66	0.07	0.6	0.20	1.9	7.47	69.6	1.98	18.5	0.25	2.4
	Mean	0.033	0.33	0.217	2.47	4.953	53.57	2.990	37.73	0.157*	1.83*
	S.E.	0.019	0.13	0.061	0.43	1.536	9.13	0.533	10.86	0.047	0.43

Baso.: Number of basophilic leukocytes  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio  
Mono.: Number of monocytes  
Mono. (%): Monocyte ratio  
Lymph.: Number of lymphocytes  
Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio  
LUC: Number of large unstained cells  
LUC (%): Large unstained cell ratio

\*P<0.05:Significantly different from control

Table 8-11 Hematology in female offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal number	RBC ( $10^6/\text{mm}^3$ )	WBC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Ht (%)	Hb (g/dL)	Plat. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Ret. (%)	Eosino. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Eosino. (%)
0	1	4.65	8.17	37.0	12.2	455	79.6	26.3	33.0	1.1	0.09	1.1
	2	4.76	13.01	37.3	11.9	455	78.5	25.0	31.9	1.2	0.11	0.8
	6	4.64	9.40	34.8	10.8	666	74.9	23.2	31.0	1.3	0.07	0.8
	7	4.99	3.91	36.1	12.0	319	72.3	24.0	33.2	0.1	0.01	0.1
	11	4.91	15.99	37.8	12.5	456	76.9	25.4	33.0	1.2	0.98	6.2
	12	4.36	7.53	34.2	11.3	469	78.4	25.9	33.0	1.4	0.20	2.6
	Mean	4.718	9.668	36.20	11.78	470.0	76.77	24.97	32.52	1.05	0.243	1.93
S.E.	0.092	1.743	0.59	0.25	45.4	1.11	0.48	0.36	0.19	0.149	0.92	
30	21	5.26	15.83	39.9	12.8	340	76.0	24.4	32.1	1.4	0.46	2.9
	30	4.66	11.54	38.5	12.2	323	82.7	26.1	31.6	0.9	0.19	1.6
	65	5.39	11.35	38.5	12.4	473	71.4	23.0	32.2	0.8	0.15	1.3
	Mean	5.103*	12.907	38.97**	12.47	378.7	76.70	24.50	31.97	1.03	0.267	1.93
S.E.	0.225	1.463	0.47	0.18	47.4	3.28	0.90	0.19	0.19	0.097	0.49	
300	31	4.64	23.60	32.5	11.2	729	69.9	24.1	34.4	1.1	0.07	0.3
	35	4.78	5.05	37.1	12.5	307	77.7	26.1	33.6	0.9	0.13	2.6
	42	5.15	4.88	37.0	12.1	350	72.0	23.5	32.6	0.8	0.96	19.7
	Mean	4.857	11.177	35.53	11.93	462.0	73.20	24.57	33.53	0.93	0.387	7.53
S.E.	0.152	6.212	1.52	0.38	134.1	2.33	0.79	0.52	0.09	0.287	6.12	

RBC: Number of red blood cells      MCH: Mean corpuscular hemoglobin  
WBC: Number of white blood cells      MCHC: Mean corpuscular hemoglobin concentration  
Ht: Hematocrit value      Ret. (%): Reticulocyte ratio  
Hb: Hemoglobin concentration      Eosino.: Number of eosinophilic leukocytes  
Plat.: Number of blood platelets      Eosino. (%): Eosinophilic leukocyte ratio  
MCV: Mean corpuscular volume  
\*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control

Table 8-12 Hematology in female offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal number	Baso. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Baso. (%)	Mono. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Mono. (%)	Lymph. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Lymph. (%)	Neutro. ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Neutro. (%)	LUC ( $10^3/\text{mm}^3$ )	LUC (%)
0	1	0.02	0.2	0.22	2.7	3.98	48.7	3.76	46.0	0.10	1.2
	2	0.07	0.5	0.41	3.2	7.16	55.1	5.11	39.3	0.15	1.1
	6	0.04	0.4	0.19	2.0	4.94	52.5	4.08	43.4	0.08	0.9
	7	0.06	1.5	0.13	3.3	2.77	70.8	0.86	21.9	0.10	2.4
	11	0.08	0.5	0.37	2.3	6.86	42.9	7.51	47.0	0.19	1.2
	12	0.02	0.3	0.23	3.0	4.69	62.2	2.26	30.0	0.14	1.8
	Mean	0.048	0.57	0.258	2.75	5.067	55.37	3.930	37.93	0.127	1.43
S.E.	0.010	0.19	0.044	0.21	0.688	4.05	0.939	4.08	0.017	0.23	
30	21	0.06	0.4	0.38	2.4	6.77	42.8	8.05	50.9	0.11	0.7
	30	0.05	0.5	0.35	3.1	6.73	58.3	4.11	35.6	0.10	0.9
	65	0.02	0.2	0.20	1.8	4.46	39.3	6.41	56.5	0.10	0.9
	Mean	0.043	0.37	0.310	2.43	5.987	46.80	6.190	47.67	0.103	0.83*
S.E.	0.012	0.09	0.056	0.38	0.763	5.84	1.143	6.25	0.003	0.07	
300	31	0.07	0.3	0.81	3.4	3.71	15.7	18.87	79.9	0.08	0.3
	35	0.02	0.3	0.11	2.1	1.89	37.4	2.85	56.4	0.06	1.2
	42	0.02	0.4	0.28	5.8	1.89	38.8	1.60	32.7	0.13	2.7
	Mean	0.037	0.33	0.400	3.77	2.497**	30.63**	7.773	56.33	0.090	1.40
S.E.	0.017	0.03	0.211	1.08	0.607	7.48	5.560	13.63	0.021	0.70	

Baso.: Number of basophilic leukocytes      Lymph. (%): Lymphocyte ratio  
Baso. (%): Basophilic leukocyte ratio      Neutro.: Number of neutrophilic leukocytes  
Mono.: Number of monocytes      Neutro. (%): Neutrophilic leukocyte ratio  
Mono. (%): Monocyte ratio      LUC: Number of large unstained cells  
Lymph.: Number of lymphocytes      LUC (%): Large unstained cell ratio  
\*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control

Table 9-1 Serum biochemistry in male offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	4	32	14	2074	168	0.240	6.6	234	24
	13	42	14	1048	1486	0.230	7.8	239	37
	61	37	23	961	236	0.200	7.1	219	20
	62	32	21	1659	181	0.240	7.2	198	28
	64	43	34	1404	207	0.230	7.5	235	42
	Mean	37.2	21.2	1429.2	455.6	0.228	7.24	225.0	30.2
	S.E.	2.4	3.7	204.2	257.9	0.007	0.20	7.6	4.1
30	16	25	40	1322	228	0.30	6.1	331	65
	19	25	29	1906	330	0.30	6.7	164	28
	22	41	21	1501	473	0.19	7.1	163	20
	25	29	32	1589	705	0.26	6.9	266	32
	27	30	27	1028	2523	0.30	6.4	162	16
	47	47	27	1089	295	0.27	6.7	218	25
	53	61	19	941	242	0.22	6.1	176	31
	Mean	36.9	27.9	1339.4	685.1	0.263*	6.57**	211.4	31.0
	S.E.	5.1	2.6	131.7	312.7	0.016	0.15	24.7	6.1
300	32	46	14	1071	548	0.28	7.6	154	94
	33	77	37	2742	168	0.49	6.4	141	127
	39	40	29	1008	693	0.30	6.9	209	88
	44	48	45	1279	144	0.26	5.9	136	60
	51	58	15	840	568	0.51	6.1	224	211
	60	46	22	1282	111	0.36	6.8	181	122
	66	41	17	1261	169	0.20	6.3	182	39
	68	38	15	2491	354	0.41	5.7	218	87
		Mean	49.3*	24.3	1496.8	344.4	0.351**	6.46*	180.6*
	S.E.	4.5	4.1	251.4	81.2	0.039	0.22	12.2	18.5

Notes) ASAT :Aspartate aminotransferase T.Bil. :Total protein  
 ALAT :Alanine aminotransferase T.Prot. :Albumin  
 ALP :Alkaline phosphatase T.Chol. :Total cholesterol  
 CPK :Creatine phosphokinase TGL :Triglyceride  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01 :Significantly different from control

Table 9-2 Serum biochemistry in male offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	4	103	20.8	0.79	5.36	11.3	146	4.4	105
	13	106	17.5	0.76	6.35	10.7	149	4.1	108
	61	110	14.5	0.66	7.13	9.7	151	4.1	116
	62	101	15.1	0.83	3.99	9.0	153	5.1	111
	64	114	16.7	0.94	6.01	10.8	148	5.6	109
	Mean	106.8	16.92	0.796	5.768	10.30	149.4	4.66	109.8
	S.E.	2.4	1.11	0.046	0.528	0.42	1.2	0.30	1.8
30	16	121	23.9	0.84	5.37	10.1	145	5.3	110
	19	28	21.1	0.64	7.07	10.4	150	5.1	112
	22	100	45.0	0.88	7.26	11.1	146	4.8	109
	25	127	19.4	0.73	6.14	10.4	144	4.6	109
	27	227	17.1	0.83	8.01	11.1	147	4.4	110
	47	91	19.4	0.70	6.29	10.6	148	4.1	109
	53	108	13.2	0.75	6.47	12.2	148	4.2	113
	Mean	114.6	22.73	0.767	6.659	10.84	146.9*	4.64	110.3
	S.E.	22.4	3.92	0.032	0.326	0.27	0.8	0.17	0.6
300	32	109	16.3	0.82	5.16	10.6	146	3.9	110
	33	125	13.8	0.67	6.04	9.2	146	4.7	108
	39	86	13.4	0.64	5.33	11.5	148	5.0	108
	44	67	16.3	0.63	5.31	9.5	147	5.1	110
	51	72	23.6	0.64	3.58	11.9	146	3.3	106
	60	129	15.0	0.63	7.85	11.1	147	4.7	114
	66	179	13.4	0.77	4.96	10.9	144	3.7	107
	68	114	11.1	0.43	5.97	11.6	145	4.7	112
		Mean	110.1	15.36	0.654*	5.525	10.79	146.1*	4.39
	S.E.	12.8	1.32	0.041	0.427	0.35	0.4	0.23	0.9

Notes) Glucose :Glucose Ca :Calcium  
 BUN :Blood urea nitrogen Na :Sodium  
 Creat. :Creatinine K :Potassium  
 IP :Inorganic phosphorus Cl :Chloride  
 \*P<0.05:Significantly different from control

Table 9-3 Serum biochemistry in female offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	1	78	29	1304	413	0.38	6.6	268	36
	2	89	44	1430	4319	0.52	7.3	381	47
	3	55	26	1210	2184	0.37	6.9	251	38
	6	45	28	1424	258	0.19	7.0	221	34
	7	28	19	1561	105	0.32	7.1	225	30
	9	66	103	750	459	0.42	6.9	728	90
	11	59	39	875	358	0.22	6.4	129	49
	12	29	14	1198	201	0.23	7.2	176	18
	15	38	20	2322	189	0.29	6.9	287	12
	46	37	23	1545	203	0.21	7.1	202	13
	63	37	24	1503	742	0.35	6.9	213	80
	69	36	46	993	240	0.25	6.6	191	17
		Mean	49.8	34.6	1342.9	805.9	0.313	6.91	272.7
	S.E.	5.7	6.8	117.4	358.3	0.029	0.08	45.2	7.2
30	18	34	32	1023	334	0.31	6.9	324	105
	21	46	27	1425	341	0.26	7.6	238	30
	23	41	22	1570	266	0.43	7.0	345	108
	26	51	29	2450	316	0.25	6.9	158	39
	30	43	27	1348	1746	0.25	6.6	148	56
	59	62	89	1342	386	0.54	6.1	488	135
	65	29	14	1487	259	0.47	7.0	277	104
	Mean	43.7	34.3	1520.7	521.1	0.359	6.87	282.6	82.4**
	S.E.	4.1	9.4	168.0	204.8	0.045	0.17	44.6	15.2
300	31	41	20	1426	98	0.25	6.7	166	34
	35	48	27	1589	633	0.39	7.2	205	27
	38	29	16	1014	165	0.19	6.0	138	69
	41	28	16	1341	202	0.16	6.0	243	23
	42	74	49	894	221	0.38	7.1	237	99
45	43	24	1332	525	0.28	7.6	265	75	
	Mean	43.8	25.3	1266.0	307.3	0.275	6.77	209.0	54.5
	S.E.	6.8	5.1	106.7	88.7	0.039	0.27	20.0	12.6

Notes) ASAT :Aspartate aminotransferase  
ALAT :Alanine aminotransferase  
ALP :Alkaline phosphatase  
CPK :Creatine phosphokinase  
\*\*P<0.01:Significantly different from control

T.Bil. :Total protein  
T.Prot. :Albumin  
T.Chol. :Total cholesterol  
TGL :Triglyceride

Table 9-4 Serum biochemistry in female offspring (Day 180 after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	1	103	21.0	0.69	5.11	10.5	147	4.7	111
	2	168	16.3	0.84	5.21	8.0	147	5.1	112
	3	167	19.0	0.74	6.56	10.5	144	4.0	110
	6	81	17.4	0.75	5.78	10.9	149	5.2	110
	7	126	20.6	0.68	6.06	11.7	147	5.3	111
	9	102	19.6	0.69	5.08	10.9	147	5.7	112
	11	106	22.0	0.69	4.47	9.9	128	4.2	88
	12	72	10.9	0.71	6.78	9.5	149	5.1	113
	15	80	19.5	0.83	4.99	11.4	148	3.8	109
	46	105	15.8	0.75	7.74	11.0	150	5.5	109
	63	124	12.8	0.76	8.27	10.8	149	5.2	108
	69	92	23.8	0.47	6.96	9.7	148	4.6	111
		Mean	110.5	18.23	0.717	6.084	10.40	146.1	4.87
	S.E.	9.0	1.09	0.027	0.344	0.29	1.7	0.18	1.9
30	18	96	34.3	0.65	5.92	10.9	148	5.4	108
	21	91	16.3	0.8	5.87	10.4	147	4.3	109
	23	104	11.5	0.67	10.36	11.0	146	4.9	104
	26	125	14.8	0.79	5.30	11.7	151	4.5	109
	30	135	16.1	0.61	6.49	10.6	146	4.0	109
	59	103	15.9	0.52	6.98	10.7	146	5.2	108
	65	109	15.2	0.55	6.51	11.1	149	5.1	112
	Mean	109.0	17.73	0.656	6.776	10.91	147.6	4.77	108.4
	S.E.	5.9	2.83	0.041	0.632	0.16	0.7	0.19	0.9
300	31	64	17.9	0.70	5.46	10.8	148	5.2	111
	35	121	16.1	0.75	6.19	10.9	151	4.8	112
	38	92	24.9	0.97	4.21	8.8	144	3.6	109
	41	111	15.0	0.8	4.34	9.6	147	3.9	108
	42	64	13.7	0.61	4.64	7.3	147	3.7	108
	45	111	10.6	0.66	5.60	11.4	148	4.7	109
	Mean	93.8	16.37	0.748	5.073*	9.80	147.5	4.32*	109.5
	S.E.	10.2	1.98	0.052	0.324	0.63	0.9	0.27	0.7

Notes) Glucose :Glucose  
BUN :Blood urea nitrogen  
Creat. :Creatinine  
IP :Inorganic phosphorus  
Ca :Calcium  
Na :Sodium  
K :Potassium  
Cl :Chloride  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 9-5 Serum biochemistry in male offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	4	57	71	858	193	0.17	7.7	133	20
	13	45	37	1275	444	0.24	7.9	160	30
	61	52	56	784	1011	0.14	7.6	171	85
	62	50	77	1048	258	0.17	7.4	187	38
	64	96	212	1467	284	0.18	7.3	155	26
	Mean	60.0	90.6	1086.4	438.0	0.180	7.58	161.2	39.8
S.E.	9.2	31.1	127.6	149.1	0.016	0.11	8.9	11.7	
30	19	39	87	1279	279	0.27	7.8	120	33
	22	69	91	1509	695	0.22	7.3	123	26
	25	74	179	944	465	0.25	7.1	181	16
	27	49	47	898	130	0.17	7.7	173	31
	47	74	112	1349	218	0.15	7.5	160	69
	53	75	90	1102	308	0.09	6.8	122	71
Mean	63.3	101.0	1180.2	349.2	0.192	7.37	146.5	41.0	
S.E.	6.3	17.8	98.0	82.6	0.028	0.15	11.4	9.5	
300	33	77	133	1402	137	0.30	7.5	118	26
	39	42	54	1424	187	0.25	7.4	163	27
	44	55	81	1383	344	0.21	8.2	159	43
	60	119	239	828	223	0.15	7.5	95	44
	66	91	110	2082	122	0.22	7.4	130	52
	Mean	76.8	123.4	1423.8	202.6	0.226	7.60	133.0	38.4
S.E.	13.5	31.8	198.8	39.7	0.025	0.15	12.8	5.1	
Notes)	ASAT	:Aspartate aminotransferase			T.Bil.	:Total protein			
	ALAT	:Alanine aminotransferase			T.Prot.	:Albumin			
	ALP	:Alkaline phosphatase			T.Chol.	:Total cholesterol			
	CPK	:Creatine phosphokinase			TGL	:Triglyceride			
	Not significantly different from control								

Table 9-6 Serum biochemistry in male offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	4	69	34.3	0.64	5.44	11.0	153	4.4	106
	13	84	33.5	0.48	6.80	10.2	146	3.9	106
	61	75	25.1	0.42	5.24	9.8	148	4.3	105
	62	79	33.5	0.52	7.18	10.7	155	4.5	104
	64	71	29.8	0.53	6.41	10.0	151	4.6	110
	Mean	75.6	31.24	0.518	6.214	10.34	150.6	4.34	106.2
S.E.	2.7	1.72	0.036	0.378	0.22	1.6	0.12	1.0	
30	19	70	23.6	0.54	6.39	10.6	155	4.5	111
	22	67	35.8	0.43	6.15	9.9	150	4.5	108
	25	56	25.4	0.54	6.36	10.2	150	4.2	114
	27	76	40.4	0.49	5.31	10.5	150	4.8	107
	47	86	27.8	0.46	6.48	10.0	152	5.0	107
	53	70	33.4	0.60	4.86	10.0	150	5.5	106
Mean	70.8	31.07	0.510	5.925	10.20	151.2	4.75	108.8	
S.E.	4.1	2.67	0.025	0.275	0.12	0.8	0.19	1.2	
300	33	72	26.6	0.57	5.08	10.1	148	4.0	107
	39	90	22.8	0.51	6.24	10.2	153	4.7	109
	44	69	17.8	0.38	6.56	10.4	154	5.1	107
	60	86	36.9	0.55	5.40	10.1	151	4.9	103
	66	117	24.6	0.35	7.08	9.9	145	4.6	108
	Mean	86.8	25.74	0.472	6.072	10.14	150.2	4.66	106.8
S.E.	8.5	3.15	0.045	0.369	0.08	1.7	0.19	1.0	
Notes)	Glucose	:Glucose			Ca	:Calcium			
	BUN	:Blood urea nitrogen			Na	:Sodium			
	Creat.	:Creatinine			K	:Potassium			
	IP	:Inorganic phosphorus			Cl	:Chloride			
	Not significantly different from control								



Table 9-7 Serum biochemistry in female offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	1	77	69	891	512	0.20	7.9	202	37
	2	91	66	987	637	0.11	7.6	110	50
	6	53	58	1152	643	0.21	7.1	195	56
	7	33	44	1116	483	0.21	7.4	179	18
	11	48	55	1121	336	0.19	7.4	182	60
	12	48	37	367	425	0.22	7.2	165	62
	46	100	109	609	275	0.18	7.7	119	24
	63	81	201	1392	96	0.18	7.6	179	41
	Mean	66.4	79.9	954.4	425.9	0.188	7.49	166.4	43.5
S.E.	8.5	18.9	116.0	65.7	0.012	0.09	12.0	5.8	
30	18	83	208	1177	633	0.27	7.1	161	31
	21	60	75	916	1230	0.29	7.2	102	17
	23	59	102	1128	202	0.16	7.7	126	86
	30	29	37	1231	141	0.08	6.8	99	68
	59	36	65	963	347	0.18	7.4	224	123
	65	43	55	1827	287	0.13	7.4	137	75
	Mean	51.7	90.3	1207.0	473.3	0.185	7.27	141.5	66.7
S.E.	8.0	25.1	133.7	166.6	0.033	0.13	19.0	15.7	
300	31	107	228	1025	326	0.25	7.4	103	19
	35	66	116	1339	664	0.34	7.4	130	21
	42	121	176	1168	215	0.20	7.4	103	35
	Mean	98.0*	173.3*	1177.3	401.7	0.263*	7.40	112.0*	25.0
S.E.	16.5	32.4	90.8	135.0	0.041	0.00	9.0	5.0	
Notes)	ASAT	:Aspartate aminotransferase			T.Bil.	:Total protein			
	ALAT	:Alanine aminotransferase			T.Prot.	:Albumin			
	ALP	:Alkaline phosphatase			T.Chol.	:Total cholesterol			
	CPK	:Creatine phosphokinase			TGL	:Triglyceride			
	*P<0.05:Significantly different from control								

Table 9-8 Serum biochemistry in female offspring (36 month after birth)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	1	112	28.9	0.57	5.54	10.6	148	4.0	105
	2	117	40.8	0.56	5.54	10.1	152	4.0	109
	6	88	35.0	0.54	6.86	9.9	153	4.9	110
	7	86	21.7	0.49	5.98	10.4	153	4.4	110
	11	81	28.4	0.45	5.36	10.6	150	4.5	108
	12	72	39.5	0.51	3.77	9.9	147	4.6	107
	46	77	45.5	0.38	5.91	10.0	147	5.1	105
	63	100	24.0	0.57	7.74	10.8	156	5.2	109
	Mean	91.6	32.98	0.509	5.838	10.29	150.8	4.59	107.9
S.E.	5.8	3.02	0.024	0.409	0.13	1.2	0.16	0.7	
30	18	86	22.8	0.5	6.74	10.2	151	4.9	109
	21	71	17.9	0.51	6.57	10.0	151	4.1	109
	23	67	30.6	0.58	5.51	10.7	154	5.5	113
	30	103	24.5	0.46	6.49	9.5	149	4.4	110
	59	94	36.7	0.55	5.06	10.4	149	4.9	108
	65	76	23.3	0.4	8.03	10.4	148	4.3	108
	Mean	82.8	25.97	0.500	6.400	10.20	150.3	4.68	109.5
S.E.	5.7	2.71	0.026	0.424	0.17	0.9	0.21	0.8	
300	31	38	31.2	0.54	5.92	10.8	153	4.0	111
	35	68	21.1	0.52	5.81	9.9	156	3.8	112
	42	65	21.2	0.46	5.15	10.5	150	4.8	104
	Mean	57.0**	24.50	0.507	5.627	10.40	153.0	4.20	109.0
S.E.	9.5	3.35	0.024	0.240	0.26	1.7	0.31	2.5	
Notes)	Glucose	:Glucose			Ca	:Calcium			
	BUN	:Blood urea nitrogen			Na	:Sodium			
	Creat.	:Creatinine			K	:Potassium			
	IP	:Inorganic phosphorus			Cl	:Chloride			
	**P<0.01:Significantly different from control								

Table 9-9 Serum biochemistry in male offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	4	26	47	568	728	0.15	7.3	111	21
	13	61	66	356	63	0.17	7.9	117	25
	62	52	65	561	258	0.14	6.8	130	43
	64	40	82	419	119	0.14	7.3	154	33
	Mean	44.8	65.0	476.0	292.0	0.150	7.33	128.0	30.5
	S.E.	7.6	7.2	52.7	151.0	0.007	0.22	9.5	4.9
30	19	25	45	725	134	0.28	7.6	124	58
	22	41	63	748	91	0.20	7.7	136	24
	25	29	47	573	122	0.24	7.5	178	22
	27	30	40	371	111	0.17	7.6	166	29
	47	47	60	607	195	0.13	7.5	168	58
	53	61	66	727	120	0.18	6.5	99	26
	Mean	38.8	53.5	625.2	128.8	0.200*	7.40	145.2	36.2
	S.E.	5.6	4.4	58.6	14.5	0.022	0.18	12.5	7.0
300	33	36	51	667	119	0.17	7.2	98	37
	39	40	72	638	747	0.21	7.4	151	27
	66	97	219	897	77	0.15	8.0	142	36
	Mean	57.7	114.0	734.0*	314.3	0.177	7.53	130.3	33.3
	S.E.	19.7	52.8	81.9	216.7	0.018	0.24	16.4	3.2

Notes) ASAT :Aspartate aminotransferase T.Bil. :Total protein  
ALAT :Alanine aminotransferase T.Prot. :Albumin  
ALP :Alkaline phosphatase T.Chol. :Total cholesterol  
CPK :Creatine phosphokinase TGL :Triglyceride  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 9-10 Serum biochemistry in male offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	4	87	28.0	0.93	3.36	9.9	149	4.6	103
	13	94	54.6	0.95	3.90	10.3	148	4.5	109
	62	151	41.8	1.23	5.01	9.8	146	4.2	106
	64	79	28.3	0.98	4.17	9.8	153	4.0	110
	Mean	102.8	38.18	1.023	4.110	9.95	149.0	4.33	107.0
	S.E.	16.4	6.35	0.070	0.344	0.12	1.5	0.14	1.6
30	19	50	25.0	0.88	4.40	10.0	150	3.7	111
	22	90	31.3	1.04	4.26	10.5	154	4.2	108
	25	84	27.3	0.98	4.75	9.8	148	4.0	109
	27	76	31.2	1.14	3.68	10.5	152	4.1	112
	47	76	21.1	0.78	4.59	9.9	150	4.2	109
	53	53	24.6	1.09	3.97	9.9	153	3.8	111
	Mean	71.5*	26.75	0.985	4.275	10.10	151.2	4.00*	110.0*
	S.E.	6.7	1.64	0.055	0.162	0.13	0.9	0.09	0.6
300	33	93	25.6	0.97	3.62	9.8	146	3.8	107
	39	111	23.8	1.05	3.59	10.1	152	3.8	109
	66	136	22.6	0.99	5.45	10.6	156	4.8	114
	Mean	113.3	24.00	1.003	4.220	10.17	151.3	4.13	110.0
	S.E.	12.5	0.87	0.024	0.615	0.23	2.9	0.33	2.1

Notes) Glucose :Glucose Ca :Calcium  
BUN :Blood urea nitrogen Na :Sodium  
Creat. :Creatinine K :Potassium  
IP :Inorganic phosphorus Cl :Chloride  
\*P<0.05:Significantly different from control

Table 9-11 Serum biochemistry in female offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal No.	ASAT (IU/L)	ALAT (IU/L)	ALP (IU/L)	CPK (IU/L)	T.Bil. (mg/dL)	T.Prot. (g/dL)	T.Chol. (mg/dL)	TGL (mg/dL)
0	1	43	51	284	162	0.22	7.5	168	45
	2	71	93	395	850	0.19	6.8	115	44
	6	47	82	399	134	0.16	6.8	176	49
	7	53	42	878	190	0.18	7.4	234	16
	11	40	86	604	94	0.13	7.0	186	88
	12	36	71	200	247	0.16	7.5	187	41
	Mean	48.3	70.8	460.0	279.5	0.173	7.17	177.7	47.2
S.E.	5.1	8.3	100.3	116.0	0.013	0.14	15.7	9.5	
30	21	21	34	266	71	0.17	7.4	112	30
	30	24	50	356	88	0.07	7.1	99	55
	65	294	217	676	14848	0.14	7.4	144	117
	Mean	113.0	100.3	432.7	5002.3	0.127	7.30	118.3*	67.3
S.E.	90.5	58.5	124.4	4922.8	0.030	0.10	13.4	25.9	
300	31	13	13	2396	237	0.10	8.0	92	48
	35	323	872	785	204	0.18	7.4	90	23
	42	43	55	270	203	0.17	6.9	111	37
	Mean	126.3	313.3	1150.3	214.7	0.150	7.43	97.7**	36.0
S.E.	98.7	279.6	640.3	11.2	0.025	0.32	6.7	7.2	
Notes)	ASAT	:Aspartate aminotransferase			T.Bil.	:Total protein			
	ALAT	:Alanine aminotransferase			T.Prot.	:Albumin			
	ALP	:Alkaline phosphatase			T.Chol.	:Total cholesterol			
	CPK	:Creatine phosphokinase			TGL	:Triglyceride			
	*P<0.05, **P<0.01:Significantly different from control								

Table 9-12 Serum biochemistry in female offspring (at necropsy)

Group (ng/kg)	Animal No.	Glucose (mg/dL)	BUN (mg/dL)	Creat. (mg/dL)	IP (mg/dL)	Ca (mg/dL)	Na (mEq/L)	K (mEq/L)	Cl (mEq/L)
0	1	82	26.4	0.58	5.19	10.1	149	4.2	108
	2	122	20.7	0.41	4.08	8.2	145	4.4	111
	6	102	34.7	0.75	5.12	9.5	153	4.7	112
	7	104	21.0	0.56	4.40	9.6	150	4.7	110
	11	84	29.3	0.54	2.85	10.2	151	5.0	110
	12	86	30.4	0.64	3.97	9.5	146	3.8	108
	Mean	96.7	27.08	0.580	4.268	9.52	149.0	4.47	109.8
S.E.	6.4	2.25	0.046	0.353	0.29	1.2	0.17	0.7	
30	21	91	17.0	0.57	4.84	9.7	151	4.1	112
	30	113	24.0	0.54	4.56	9.7	152	3.8	111
	65	88	27.8	0.51	6.24	10.0	154	4.9	109
	Mean	97.3	22.93	0.540	5.213	9.80	152.3	4.27	110.7
S.E.	7.9	3.16	0.017	0.520	0.10	0.9	0.33	0.9	
300	31	83	19.1	0.39	3.94	9.7	148	5.1	109
	35	73	27.2	0.52	4.14	9.3	153	4.4	110
	42	66	23.3	0.74	3.90	9.4	151	4.0	110
	Mean	74.0*	23.20	0.550	3.993	9.47	150.7	4.50	109.7
S.E.	4.9	2.34	0.102	0.074	0.12	1.5	0.32	0.3	
Notes)	Glucose	:Glucose			Ca	:Calcium			
	BUN	:Blood urea nitrogen			Na	:Sodium			
	Creat.	:Creatinine			K	:Potassium			
	IP	:Inorganic phosphorus			Cl	:Chloride			
	*P<0.05:Significantly different from control								

Table 10-1 Absolute organ weight in male offspring

Group	Animal No.	Pituit. (mg)	Thyr.R (g)	Thyr.L (g)	Thyr.R&L (g)	Adre.R (g)	Adre.L (g)	Adre.R&L (g)	Test.R (g)	Test.L (g)	Test.R&L (g)	Pancr. (g)	Thymus (g)	Subm.R (g)	Subm.L (g)
0ng/kg	4	75	0.22	0.23	0.45	0.38	0.50	0.88	11.4	11.5	22.9	11.1	1.1	2.1	2.2
	13	98	0.31	0.33	0.64	0.40	0.50	0.90	20.8	19.8	40.6	12.8	0.5	2.2	1.7
	62	97	0.18	0.17	0.35	0.52	0.62	1.14	8.2	7.8	16.0	13.4	2.0	1.3	1.4
	64	102	0.35	0.31	0.66	0.36	0.41	0.77	34.1	34.8	68.9	13.6	3.5	2.5	2.7
	Mean	93.0	0.265	0.260	0.525	0.415	0.508	0.923	18.63	18.48	37.10	12.73	1.78	2.03	2.00
S.E.	6.1	0.039	0.037	0.075	0.036	0.043	0.078	5.81	5.99	11.80	0.57	0.65	0.26	0.29	
30ng/kg	19	96	0.45	0.47	0.92	0.54	0.57	1.11	20.3	19.6	39.9	8.9	2.9	1.1	1.1
	22	90	0.42	0.46	0.88	0.31	0.36	0.67	5.2	5.1	10.3	10.3	2.9	1.7	2.1
	25	90	0.18	0.19	0.37	0.33	0.42	0.75	19.3	19.4	38.7	10.0	1.6	1.7	1.7
	27	82	0.25	0.25	0.50	0.31	0.37	0.68	13.4	13.4	26.8	12.6	3.5	1.5	1.6
	47	96	0.17	0.17	0.34	0.33	0.42	0.75	9.8	9.4	19.2	14.7	2.5	1.3	1.3
53	60	0.25	0.26	0.51	0.30	0.43	0.73	10.0	10.1	20.1	10.9	2.9	1.9	2.1	
Mean	85.7	0.287	0.300	0.587	0.353	0.428	0.782	13.00	12.83	25.83	11.23	2.72	1.53*	1.65	
S.E.	5.5	0.049	0.054	0.103	0.038	0.031	0.067	2.40	2.37	4.77	0.85	0.26	0.12	0.17	
300ng/kg	33	102	0.18	0.21	0.39	0.25	0.32	0.57	13.0	11.3	24.3	11.1	2.0	2.0	1.6
	39	88	0.37	0.38	0.75	0.33	0.38	0.71	18.4	17.6	36.0	17.0	2.0	2.3	2.3
	66	86	0.29	0.30	0.59	0.45	0.48	0.93	16.2	17.0	33.2	14.1	2.0	2.4	2.3
	Mean	92.0	0.280	0.297	0.577	0.343	0.393	0.737	15.87	15.30	31.17	14.07	2.00	2.23	2.07
	S.E.	5.0	0.055	0.049	0.104	0.058	0.047	0.105	1.57	2.01	3.53	1.70	0.00	0.12	0.23

Notes) Pituit. : Pituitary      Thyr.R : Thyroid (Right)      Thyr.L : Thyroid (Left)      Thyr.R&L : Thyroid (Right&Left)  
 Adre.R : Adrenal (Right)      Adre.L : Adrenal (Left)      Adre.R&L : Adrenal (Right&Left)  
 Test.R : Testis (Right)      Test.L : Testis (Left)      TestR&L : Testis (Right&Left)      Pancr. : Pancreas  
 Subm.R : Submandibular.gland (Right)      Subm.L : Submandibular gland (Left)

\*P<0.05:Significantly different from control

Table 10-2 Absolute organ weight in male offspring

Group	Animal No.	Subm.R&L (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidn.R (g)	Kidn.L (g)	Kidn.R&L (g)	Epid.R (g)	Epid.L (g)	Epid.R&L (g)	Sem.V (g)	Prost. (g)
0ng/kg	4	4.3	1.7	85.2	28.1	65.0	124.6	9.8	10.0	19.8	1.9	2.2	2.2	5.7	2.3
	13	3.9	3.4	103.0	26.3	46.9	135.6	12.8	12.7	25.5	3.2	3.2	3.2	17.2	2.8
	62	2.7	2.3	90.3	30.1	46.7	106.7	9.7	9.7	19.4	2.6	2.4	2.4	9.3	1.7
	64	5.2	4.1	97.0	30.2	42.1	109.6	10.6	10.8	21.4	4.2	4.1	4.1	26.7	2.8
	Mean	4.03	2.88	93.88	28.68	50.18	119.13	10.73	10.80	21.53	2.98	2.98	2.98	14.73	2.40
	S.E.	0.52	0.54	3.88	0.93	5.06	6.75	0.72	0.67	1.39	0.49	0.43	0.43	4.66	0.26
30ng/kg	19	2.2	5.1	101.9	29.3	40.1	111.9	11.9	12.0	23.9	3.1	3.2	3.2	28.9	2.0
	22	3.8	2.9	100.3	27.4	43.4	108.3	11.3	11.1	22.4	1.7	1.9	1.9	14.1	1.8
	25	3.4	4.4	91.1	26.1	50.1	114.3	13.3	13.8	27.1	3.1	2.9	2.9	37.9	2.5
	27	3.1	3.7	105.7	32.3	45.7	108.2	10.5	10.4	20.9	3.4	3.0	3.0	13.4	2.0
	47	2.6	6.5	88.5	28.9	46.1	119.4	13.0	12.6	25.6	2.3	2.4	2.4	12.0	1.9
	53	4	3.4	99.3	29.7	43.1	112.4	10.4	10.5	20.9	2.0	2.1	2.1	7.5	2.3
300ng/kg	Mean	3.18	4.33	97.80	28.95	44.75	112.42	11.73	11.73	23.47	2.60	2.58	2.58	18.97	2.08
	S.E.	0.28	0.54	2.70	0.86	1.38	1.71	0.50	0.54	1.04	0.28	0.22	0.22	4.80	0.11
300ng/kg	33	3.6	2.8	84.3	31.9	47.0	118.3	11.1	10.9	22.0	2.7	2.6	2.6	9.7	2.1
	39	4.6	4.7	106.5	41.2	55.3	118.9	11.8	12.6	24.4	4.3	4.4	4.4	20.2	1.9
	66	4.7	5.7	95.3	29.6	51.7	116.0	10.2	11.9	22.1	2.5	2.4	2.4	33.3	2.3
	Mean	4.3	4.40	95.37	34.23	51.33	117.73	11.03	11.80	22.83	3.17	3.13	3.97	21.07	2.10
	S.E.	0.35	0.85	6.41	3.55	2.40	0.88	0.46	0.49	0.78	0.57	0.64	0.70	6.83	0.12

Notes) Subm.R&L : Submandibular gland (Right&Left)

Kidn.R : Kidney (Right)

Epid.R : Epididymis (Right)

Sem.V : Seminal vesicles

Prost. : Prostate

Not significantly different from control

Kidn.L : Kidney (Left)

Epid.L : Epididymis (Left)

Prost. : Prostate

Not significantly different from control

Kidn.R&L : Kidney (Right&Left)

Epid.R&L : Epididymis (Right&Left)

Prost. : Prostate

Not significantly different from control

Table 10-3 Relative organ weight in male offspring

Group	Animal No.	B.W. (kg)	Pituit. (mg)	Thyr.R (g)	Thyr.L (g)	Thyr.R&L (g)	Adre.R (g)	Adre.L (g)	Adre.R&L (g)	Test.R (g)	Test.L (g)	Test.R&L (g)	Pancr. (g)	Thymus (g)	Subm.R (g)	Subm.L (g)
0ng/kg	4	6.18	12.1	0.036	0.037	0.073	0.061	0.081	0.142	1.84	1.86	3.71	1.80	0.18	0.34	0.36
	13	6.93	14.1	0.045	0.048	0.092	0.058	0.072	0.130	3.00	2.86	5.86	1.85	0.07	0.32	0.25
	62	7.14	13.6	0.025	0.024	0.049	0.073	0.087	0.160	1.15	1.09	2.24	1.88	0.28	0.18	0.20
30ng/kg	64	8.17	12.5	0.043	0.038	0.081	0.044	0.050	0.094	4.17	4.26	8.43	1.66	0.43	0.31	0.33
	Mean	7.105	13.08	0.0373	0.0368	0.0738	0.0590	0.0725	0.1315	2.540	2.518	5.060	1.798	0.240	0.288	0.285
	S.E.	0.410	0.47	0.0045	0.0049	0.0091	0.0060	0.0081	0.0139	0.664	0.685	1.347	0.049	0.076	0.036	0.037
300ng/kg	19	6.97	13.8	0.065	0.067	0.132	0.077	0.082	0.159	2.91	2.81	5.72	1.28	0.42	0.16	0.16
	22	6.56	13.7	0.064	0.070	0.134	0.047	0.055	0.102	0.79	0.78	1.57	1.57	0.44	0.26	0.32
	25	8.30	10.8	0.022	0.023	0.045	0.040	0.051	0.090	2.33	2.34	4.66	1.20	0.19	0.20	0.20
300ng/kg	27	8.01	10.2	0.031	0.031	0.062	0.039	0.046	0.085	1.67	1.67	3.35	1.57	0.44	0.19	0.20
	47	6.61	14.5	0.026	0.026	0.051	0.050	0.064	0.113	1.48	1.42	2.90	2.22	0.38	0.20	0.20
	53	7.50	8.0	0.033	0.035	0.068	0.040	0.057	0.097	1.33	1.35	2.68	1.45	0.39	0.25	0.28
300ng/kg	Mean	7.325	11.83	0.0402	0.0420	0.0820	0.0488	0.0592	0.1077	1.752	1.728	3.480	1.548	0.377	0.210*	0.227
	S.E.	0.298	1.05	0.0079	0.0086	0.0165	0.0059	0.0052	0.0110	0.309	0.299	0.607	0.148	0.039	0.015	0.025
	33	7.48	13.6	0.024	0.028	0.052	0.033	0.043	0.076	1.74	1.51	3.25	1.48	0.27	0.27	0.21
300ng/kg	39	7.88	11.2	0.047	0.048	0.095	0.042	0.048	0.090	2.34	2.23	4.57	2.16	0.25	0.29	0.29
	66	6.82	12.6	0.043	0.044	0.087	0.066	0.070	0.136	2.38	2.49	4.87	2.07	0.29	0.35	0.34
	Mean	7.393	12.47	0.0380	0.0400	0.0780	0.0470	0.0537	0.1007	2.153	2.077	4.230	1.903	0.270	0.303	0.280
300ng/kg	S.E.	0.309	0.70	0.0071	0.0061	0.0132	0.0098	0.0083	0.0181	0.207	0.293	0.498	0.213	0.012	0.024	0.038

Notes) Pituit. : Pituitary      Thyr.R : Thyroid (Right)      Thyr.L : Thyroid (Left)      Thyr.R&L : Thyroid (Right&Left)  
 Adre.R : Adrenal (Right)      Adre.L : Adrenal (Left)      Adre.R&L : Adrenal (Right&Left)  
 Test.R : Testis (Right)      Test.L : Testis (Left)      TestR&L : Testis (Right&Left)      Pancr. : Pancreas  
 Subm.R : Submandibular gland (Right)      Subm.L : Submandibular gland (Left)

\*P<0.05: Significantly different from control

Table 10-4 Relative organ weight in male offspring

Group	Animal No.	Subm.R&L (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidn.R (g)	Kidn.L (g)	Kidn.R&L (g)	Epid.R (g)	Epid.L (g)	Epid.R&L (g)	Sem.V (g)	Prost. (g)
0ng/kg	4	0.70	0.28	13.79	4.55	10.52	20.16	1.59	1.62	3.20	0.31	0.36	0.66	0.92	0.37
	13	0.56	0.49	14.86	3.80	6.77	19.57	1.85	1.83	3.68	0.46	0.46	0.92	2.48	0.40
	62	0.38	0.32	12.65	4.22	6.54	14.94	1.36	1.36	2.72	0.36	0.34	0.70	1.30	0.24
	64	0.64	0.50	11.87	3.70	5.15	13.41	1.30	1.32	2.62	0.51	0.50	1.02	3.27	0.34
	Mean	0.57	0.398	13.293	4.068	7.245	17.020	1.525	1.533	3.055	0.410	0.415	0.825	1.993	0.338
S.E.	0.07	0.057	0.655	0.196	1.149	1.676	0.125	0.119	0.244	0.046	0.039	0.087	0.540	0.035	
30ng/kg	19	0.32	0.73	14.62	4.20	5.75	16.05	1.71	1.72	3.43	0.44	0.46	0.90	4.15	0.29
	22	0.58	0.44	15.29	4.18	6.62	16.51	1.72	1.69	3.41	0.26	0.29	0.55	2.15	0.27
	25	0.41	0.53	10.98	3.14	6.04	13.77	1.60	1.66	3.27	0.37	0.35	0.72	4.57	0.30
	27	0.39	0.46	13.20	4.03	5.71	13.51	1.31	1.30	2.61	0.42	0.37	0.80	1.67	0.25
	47	0.39	0.98	13.39	4.37	6.97	18.06	1.97	1.91	3.87	0.35	0.36	0.71	1.82	0.29
53	0.53	0.45	13.24	3.96	5.75	14.99	1.39	1.40	2.79	0.27	0.28	0.55	1.00	0.31	
Mean	0.437	0.598	13.453	3.980	6.140	15.482	1.617	1.613	3.230	0.352	0.352	0.705	2.560	0.285	
S.E.	0.04	0.088	0.605	0.178	0.217	0.709	0.098	0.091	0.188	0.030	0.027	0.056	0.592	0.009	
300ng/kg	33	0.48	0.37	11.27	4.26	6.28	15.82	1.48	1.46	2.94	0.36	0.35	0.71	1.30	0.28
	39	0.58	0.60	13.52	5.23	7.02	15.09	1.50	1.60	3.10	0.55	0.56	1.10	2.56	0.24
	66	0.69	0.84	13.97	4.34	7.58	17.01	1.50	1.74	3.24	0.37	0.35	0.72	4.88	0.34
	Mean	0.583	0.603	12.920	4.610	6.960	15.973	1.493	1.600	3.093	0.427	0.420	0.843	2.913	0.287
	S.E.	0.061	0.136	0.835	0.311	0.376	0.560	0.007	0.081	0.087	0.062	0.070	0.128	1.048	0.029

Notes) Subm.R&L : Submandibular gland (Right&Left)  
Kidn.R : Kidney (Right) Kidn.L : Kidney (Left) Kidn.R&L : Kidney (Right&Left)  
Epid.R : Epididymis (Right) Epid.L : Epididymis (Left) Epid.R&L : Epididymis (Right&Left)  
Sem.V : Seminal vesicles Prost. : Prostate  
Not significantly different from control

Table 10-5 Absolute organ weight in female offspring

Organ weight in female Rhesus Monkeys													
Group	Animal No.	Pituit. (mg)	Thyr.R (g)	Thyr.L (g)	Thyr.R&L (g)	Adre.R (g)	Adre.L (g)	Adre.R&L (g)	Ovary R (g)	Ovary L (g)	OvaryR&L (g)	Pancr. (g)	Thymus (g)
0ng/kg	1	94	0.23	0.24	0.47	0.26	0.34	0.60	0.17	0.18	0.35	10.4	3.3
	2	97	0.20	0.21	0.41	0.42	0.53	0.95	0.14	0.28	0.42	8.0	1.9
	6	89	0.24	0.21	0.45	0.28	0.38	0.66	0.13	0.10	0.23	9.8	1.4
	7	93	0.46	0.48	0.94	0.26	0.32	0.58	0.24	0.32	0.56	8.0	1.0
	11	78	0.20	0.20	0.40	0.25	0.32	0.57	0.17	0.18	0.35	7.2	1.5
	12	74	0.25	0.21	0.46	0.31	0.36	0.67	0.22	0.18	0.40	9.1	2.4
	Mean	87.5	0.263	0.258	0.522	0.297	0.375	0.672	0.178	0.207	0.385	8.75	1.92
	S.E.	3.8	0.040	0.045	0.084	0.026	0.032	0.058	0.018	0.033	0.044	0.50	0.34
30ng/kg	21	131	0.18	0.19	0.37	0.40	0.52	0.92	0.30	0.14	0.44	12.2	4.1
	30	74	0.24	0.18	0.42	0.31	0.44	0.75	0.36	0.22	0.58	11.6	5.9
	65	96	0.16	0.18	0.34	0.40	0.49	0.89	0.25	0.28	0.53	6.6	2.9
	Mean	100.3	0.193	0.183	0.377	0.370	0.483*	0.853	0.303**	0.213	0.517	10.13	4.30**
	S.E.	16.6	0.024	0.003	0.023	0.030	0.023	0.052	0.032	0.041	0.041	1.78	0.87
300ng/kg	31	93	0.21	0.21	0.42	0.50	0.59	1.09	0.23	0.10	0.33	9.9	1.2
	35	92	0.24	0.25	0.49	0.36	0.47	0.83	0.19	0.14	0.33	9.4	0.9
	42	71	0.14	0.16	0.30	0.32	0.32	0.64	0.36	0.20	0.56	12.9	1.7
	Mean	85.3	0.197	0.207	0.403	0.393	0.460	0.853*	0.260*	0.147	0.407	10.73*	1.27
	S.E.	7.2	0.030	0.026	0.055	0.055	0.078	0.130	0.051	0.029	0.077	1.09	0.23

Notes) Pituit. : Pituitary      Thyr.R : Thyroid (Right)      Thyr.L : Thyroid (Left)      Thyr.R&L : Thyroid (Rights&Left)  
 Adre.R : Adrenal (Right)      Adre.L : Adrenal (Left)      Adre.R&L : Adrenal (Rights&Left)  
 Ovary R : Ovary (Right)      Ovary L : Ovary (Left)      OvaryR&L : Ovary (Rights&Left)  
 Pancr. : Pancreas

\*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control



Table 10-6 Absolute organ weight in female offspring

Organ weight in female Rhesus Monkeys													
Group	Animal No.	Subm.R (g)	Subm.L (g)	Subm.R&L (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidn.R (g)	Kidn.L (g)	Kidn.R&L (g)	Uterus (g)
0ng/kg	1	1.6	1.3	2.9	3.4	86.6	22.6	31.3	92.8	9.2	9.5	18.7	12.3
	2	1.1	1.3	2.4	2.4	85.6	18.0	29.9	108.6	7.9	8.1	16.0	9.4
	6	1.4	1.3	2.7	3.9	84.7	18.9	33.9	100.7	8.2	8.1	16.3	6.0
	7	1.1	1.1	2.2	7.4	95.9	19.4	49.2	105.3	12.0	11.6	23.6	7.3
	11	1.0	1.1	2.1	6.3	100.7	20.6	35.3	121.2	9.8	10.5	20.3	4.9
	12	1.1	0.9	2.0	3.0	86.5	24.6	28.5	102.8	9.0	8.9	17.9	9.2
	Mean	1.22	1.17	2.38	4.40	90.00	20.68	34.68	105.23	9.35	9.45	18.80	8.18
	S.E.	0.09	0.07	0.14	0.81	2.71	1.02	3.08	3.86	0.60	0.57	1.16	1.09
30ng/kg	21	2.2	1.8	4.0	3.7	94.8	21.7	42.4	108.3	13.5	13.0	26.5	11.4
	30	1.7	1.6	3.3	4.7	89.3	27.3	40.0	120.4	11.7	11.7	23.4	12.5
	65	1.3	1.4	2.7	4.2	100.7	19.2	34.8	123.8	11.5	11.6	23.1	7.0
	Mean	1.73*	1.60**	3.33*	4.20	94.93	22.73	39.07	117.50*	12.23*	12.10**	24.33**	10.30
	S.E.	0.26	0.12	0.38	0.29	3.29	2.39	2.24	4.70	0.64	0.45	1.09	1.68
300ng/kg	31	1.8	1.3	3.1	3.1	91.4	25.2	34.4	119.2	11.0	11.6	22.6	6.5
	35	1.3	1.5	2.8	2.3	80.1	18.3	36.4	90.4	9.6	9.7	19.3	5.1
	42	2.2	2.2	4.4	5.9	90.9	25.4	52.4	131.3	11.9	9.9	21.8	9.5
	Mean	1.77*	1.67	3.43*	3.77	87.47	22.97	41.07	113.63	10.83	10.40	21.23	7.03
	S.E.	0.26	0.27	0.49	1.09	3.69	2.33	5.70	12.13	0.67	0.60	0.99	1.30

Notes) Subm.R : Submandibular gland (Right)      Subm.L : Submandibular gland (Left)  
 Subm.R&L : Submandibular gland (Right&Left)      Kidn.R : Kidney (Right)  
 Kidn.L : Kidney (Left)      Kidn.R&L : Kidney (Right&Left)  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control

Table 10-7 Relative organ weight in female offspring

Group	Animal No.	B.W. (kg)	Pituit. (mg)	Thyr.R (g)	Thyr.L (g)	Thyr.R&L (g)	Adre.R (g)	Adre.L (g)	Adre.R&L (g)	Ovary R (g)	Ovary L (g)	OvaryR&L (g)	Pancr. (g)	Thymus (g)
0ng/kg	1	5.37	17.5	0.043	0.045	0.088	0.048	0.063	0.112	0.032	0.034	0.065	1.94	0.61
	2	4.09	23.7	0.049	0.051	0.100	0.103	0.130	0.232	0.034	0.068	0.103	1.96	0.46
	6	4.65	19.1	0.052	0.045	0.097	0.060	0.082	0.142	0.028	0.022	0.049	2.11	0.30
	7	4.95	18.8	0.093	0.097	0.190	0.053	0.065	0.117	0.048	0.065	0.113	1.62	0.20
	11	4.75	16.4	0.042	0.042	0.084	0.053	0.067	0.120	0.036	0.038	0.074	1.52	0.32
	12	5.00	14.8	0.050	0.042	0.092	0.062	0.072	0.134	0.044	0.044	0.036	0.080	1.82
	Mean	4.802	18.38	0.0548	0.0537	0.1085	0.0632	0.0798	0.1428	0.0370	0.0438	0.0807	1.828	0.395
	S.E.	0.175	3.05	0.0200	0.0200	0.0400	0.0200	0.0300	0.0500	0.0100	0.0200	0.0200	0.220	0.150
30ng/kg	21	5.99	21.9	0.030	0.032	0.062	0.067	0.087	0.154	0.050	0.023	0.073	2.04	0.68
	30	5.85	12.6	0.041	0.031	0.072	0.053	0.075	0.128	0.062	0.038	0.099	1.98	1.01
	65	4.41	21.8	0.036	0.041	0.077	0.091	0.111	0.202	0.057	0.063	0.120	1.50	0.66
	Mean	5.417	18.77	0.0357	0.0347	0.0703*	0.0703	0.0910	0.1613	0.0563**	0.0413	0.0973	1.840	0.783**
	S.E.	0.505	3.08	0.0032	0.0032	0.0044	0.0111	0.0106	0.0217	0.0035	0.0117	0.0136	0.171	0.113
300ng/kg	31	3.63	25.6	0.058	0.058	0.116	0.138	0.163	0.300	0.063	0.028	0.091	2.73	0.33
	35	4.35	21.1	0.055	0.057	0.113	0.083	0.108	0.191	0.044	0.032	0.076	2.16	0.21
	42	5.67	12.5	0.025	0.028	0.053	0.056	0.056	0.113	0.063	0.035	0.099	2.28	0.30
	Mean	4.550	19.73	0.0460	0.0477	0.0940	0.0923	0.1090	0.2013	0.0567**	0.0317	0.0887	2.390**	0.280
	S.E.	0.597	3.84	0.0105	0.0098	0.0205	0.0241	0.0309	0.0542	0.0063	0.0020	0.0067	0.173	0.036

Notes) Pituit. : Pituitary Thyr.R : Thyroid (Right) Thyr.L : Thyroid (Left) Thyr.R&L : Thyroid (Right&Left)

Adre.R : Adrenal (Right) Adre.L : Adrenal (Left) Adre.R&L : Adrenal (Right&Left)

Ovary R : Ovary (Right) Ovary L : Ovary (Left) OvaryR&L : Ovary (Right&Left)

Pancr. : Pancreas

\*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control

Table 10-8 Relative organ weight in female offspring

Group	Animal No.	Subm.R (g)	Subm.L (g)	Subm.R&L (g)	Spleen (g)	Brain (g)	Heart (g)	Lung (g)	Liver (g)	Kidn.R (g)	Kidn.L (g)	Kidn.R&L (g)	Uterus (g)
0ng/kg	1	0.30	0.24	0.54	0.63	16.13	4.21	5.83	17.28	1.71	1.77	3.48	2.29
	2	0.27	0.32	0.59	0.59	20.93	4.40	7.31	26.55	1.93	1.98	3.91	2.30
	6	0.30	0.28	0.58	0.84	18.22	4.06	7.29	21.66	1.76	1.74	3.51	1.29
	7	0.22	0.22	0.44	1.49	19.37	3.92	9.94	21.27	2.42	2.34	4.77	1.47
	11	0.21	0.23	0.44	1.33	21.20	4.34	7.43	25.52	2.06	2.21	4.27	1.03
	12	0.22	0.18	0.40	0.60	17.30	4.92	5.70	20.56	1.80	1.78	3.58	1.84
	Mean	0.253	0.245	0.498	0.913	18.858	4.308	7.250	22.140	1.947	1.970	3.920	1.703
	S.E.	0.017	0.020	0.033	0.163	0.823	0.142	0.624	1.390	0.108	0.104	0.210	0.216
30ng/kg	21	0.37	0.30	0.67	0.62	15.83	3.62	7.08	18.08	2.25	2.17	4.42	1.90
	30	0.29	0.27	0.56	0.80	15.26	4.67	6.84	20.58	2.00	2.00	4.00	2.14
	65	0.29	0.32	0.61	0.95	22.83	4.35	7.89	28.07	2.61	2.63	5.24	1.59
	Mean	0.317*	0.297	0.613*	0.790	17.973	4.213	7.270	22.243	2.287	2.267	4.553	1.877
	S.E.	0.027	0.015	0.032	0.095	2.434	0.311	0.318	3.001	0.177	0.188	0.364	0.159
		31	0.50	0.36	0.85	0.85	25.18	6.94	9.48	32.84	3.03	3.20	6.23
300ng/kg	35	0.30	0.34	0.64	0.53	18.41	4.21	8.37	20.78	2.21	2.23	4.44	1.17
	42	0.39	0.39	0.78	1.04	16.03	4.48	9.24	23.16	2.10	1.75	3.84	1.68
	Mean	0.397**	0.363**	0.757**	0.807	19.873	5.210	9.030	25.593	2.447	2.393	4.837	1.547
	S.E.	0.058	0.015	0.062	0.149	2.741	0.869	0.337	3.688	0.293	0.426	0.718	0.191

Notes) Subm.R : Submandibular gland (Right)      Subm.L : Submandibular gland (Left)  
 Subm.R&L : Submandibular gland (Right&Left)      Kidn.R : Kidney (Right)  
 Kidn.L : Kidney (Left)      Kidn.R&L : Kidney (Right&Left)

\*P<0.05, \*\*P<0.01 : Significantly different from control

## 第3章

# 胎生期・授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザルの精液性状、 精巣および精巣上体に対する影響

### 1. 導入

ここ 50 年間に於いて、全世界的に毎年約 1% のヒト精子濃度の減少が起こっているとの報告が西欧諸国からなされており[72-76]、ヒト精子数の減少や他の男性生殖器障害にも環境ホルモン（外因性内分泌攪乱化学物質）が関与している可能性が指摘されている[72, 73]. ダイオキシン類は内分泌攪乱化学物質として知られている有機汚染物質であり、少ない曝露においても雄性生殖器官への影響を含む強い毒性を持つことが示唆されている。ラットにおける妊娠および授乳期の TCDD 曝露は、30~1000 ng/kg 以下の曝露においても精子数の減少[43-45, 77-79]、精巣および精巣上体重量の減少[43, 80]などの雄出生児の生殖器官に悪影響を引き起こすことが知られている。

Rier らは、成獣アカゲザルの実験において、5 あるいは 25 ppt の濃度のダイオキシンを混ぜた餌を長期間（4 年）与え続けると、10 年後の子宮内膜症の発生頻度とその重篤度が有意に増加したと報告している[39]. 成獣雄アカゲザルに TCDD 曝露させて雄性生殖器への影響を評価した実験は少ないが、精細管における精母細胞の著しい減少、精子細胞および精子の脱落が TCDD 混餌投与を行った Allen らの実験において報告されている[81]. アカゲザルを用いた TCDD 曝露による発生毒性試験（次世代に対する影響）は、30 年以上前にいくつかの研究グループによって報告されている[69-71]. しかし、それらの実験の主たる所見は流産であり、胎生期および授乳期の TCDD 曝露による雄アカゲザル出生児への生殖器官に対する影響を評価したものはない。

そこで、我々は胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザル出生児の雄性生殖器官および雄性生殖能に対する影響について着目し、アカゲザルを用いた長期間の発生毒性試験を開始した。TCDD 曝露を受けた母動物によって自然分娩および哺育された雄出生児は、性成熟に達するまで飼育し、6歳の段階で精液性状の検査および受胎能の確認を行った。その後、7歳の段階で剖検し、精巣および精巣上体を病理組織的に精査した。

## 2. 材料および方法

使用した動物、飼育条件、被験物質、投与方法およびその妥当性についての詳細は第2章にて記載した。胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザル出生児が、十分性成熟に達したと考えられる6歳の段階で、精液検査および受胎能の確認を行った。その後、7歳の冬の時点で剖検を行い、精巣および精巣上体の病理組織的検査を実施した。

### 2.1. 肛門－生殖器間距離および陰茎長の計測

出生児の肛門－生殖器間距離（anogenital distance, AGD, 陰茎基部と肛門前端的間の距離）および陰茎長を生後1日、90日、その後は半年おきに1回計測した。

### 2.2. 精液検査

出生児が性成熟に十分達していると考えられる6歳の冬の段階で実施した。精液は Valerio ら[82, 83]の方法を参考にして、陰茎への電気刺激によって採取した。動物を保定器に入れて座位に保定し、動物が落ちついた時点で陰茎を引き出し、アルコール綿花で軽く拭いた。自家製の幅約5mmのスリット状のアルミホイルを陰茎の基部お

よび亀頭の下部に装着し，日本光電九州株式会社（福岡）製の電気刺激装置（型式：SEN-3401）およびアイソレーター（型式：SS-203J）を用いて，20～30 V，10～20 mA の単相交流電流を数秒間隔で断続的に通電させた（毎秒 10～20 刺激，30～50 ミリ秒間隔）．射出された精液はガラス製の試験管に受け，約 37°C に調整された恒温槽に速やかに浸け，その後の検査のために必要に応じて生理食塩水で適宜希釈した．

採取した精液は，色調，精液量，凝固物重量，精子生存率（%，運動精子比率），精子活動性（運動性の段階化），総精子数，精子濃度（総精子数／精液量）および精子奇形率（%，奇形精子比率，ローズベンガルで染色した精子塗抹標本を使用）について評価した．精子活動性は精子の運動状況を以下の 5 段階に分類することにより評価した [+++ (100) : 極めて活発な前進運動を行う，++ (75) : 活発な前進運動を行う，+ (50) : 緩慢な前進運動を行う，± (25) : 旋回または振り子運動を行う，- (0) : 非運動精子] ．そして，以下の計算式により，個体ごとの精子活動性を算出した．

$$\text{精子活動性} = [ (+\text{比率} \times 100) + (++)\text{比率} \times 75) + (+\text{比率} \times 50) + (\pm\text{比率} \times 25) ] \div 100$$

これらの精液検査は，それぞれの出生児に対して 2 週間隔で 3 回試行した．採取当日に 1～2 分間の電気刺激によっても射出精子が得られなかった動物については，更なる電気刺激を最大 3 日連続で実施した．3 日間の電気刺激においても評価可能な精液が採取できなかった場合は，その動物の当該試行は「精液採取不能」と判断した．なお，個別値についてはそれぞれの動物の 3 試行間のばらつきの程度も考慮し，3 試行の平均値をその動物の個別値とはしなかった．そのかわり，その動物が示した最高値がその動物が持つ最大の能力であり，最も評価に適した値と考えて，最高値をそのままその動物の個別値として採用した．

### 2.3. 精巣および精巣上体の病理組織的検査

7歳の冬の段階で剖検を実施し、臓器の肉眼的異常の有無を確認した後、精巣および精巣上体を摘出し、重量を測定した。精巣はブアン液にて固定し、翌日10 v/v%中性緩衝ホルマリンに移し変え、保存した。精巣上体は10 v/v%中性緩衝ホルマリンにて、固定・保存を行った。なお、対照群の動物番号4および30 ng/kg群の動物番号22については、生後6歳の精液検査結果が比較的良好であったにも関わらず、精巣の病理組織的検査では精細管の精上皮が未熟であった（精祖細胞および精母細胞の数および配列は正常であるが、精子細胞だけが極端に少ない）。これらは、アカゲザルが季節繁殖性であることから、季節的に未熟な段階で剖検を実施してしまったものと判断し、生後7歳時点の評価（臓器重量および病理組織的検査）の対象からは除外した。精巣および精巣上体の重量も評価対象を対照群、30および300 ng/kg群のそれぞれ3、5および3例として再評価し、以降の精巣および精巣上体の病理組織的検査も同じ評価例数で行った。

10 v/v%中性緩衝ホルマリンで固定・保存された精巣および精巣上体は、常法に従ってパラフィンに包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色スライド標本を作製した。また、精巣については、精細管のステージ鑑別のためにPAS染色スライド標本も作製した。これらのスライド標本を光学顕微鏡下で観察した。

精巣に関しては、最初にClermontら[84, 85]およびDreefら[86]のカニクイザルあるいはアカゲザルにおける方法を参考に、精細管のステージ鑑別を行った。精子は精子形成サイクルと呼ばれる一連の過程（精祖細胞→精母細胞→精子細胞→精子）を経て形成されるが、アカゲザルおよびカニクイザルを始めとするマカカ属のサルでは、それらが12のステージに区分されている[84-86]。精上皮細胞（生殖細胞およびセルト

り細胞)は、核の色調、形状および大きさを観察することによって、容易にその種類と精細管ステージが判別できるため、これらの手法を用いて 12 ステージ分類を行った。その後、12 に分類された各精細管をさらに 5 つの区分(ステージ II~IV, V~VI, VII~VIII, IX~X および XI~I)に分け、動物ごとの 5 区分精細管ステージ比率を算出し、ステージ特異的に TCDD の影響が発現していないか確認した。これらの精細管ステージ比率算出には、その信頼性確保の観点から、少なくとも 300~400 の精細管を観察した。さらに、我々は TCDD 曝露によって精細管が軽度に萎縮している感触を得たため、5 区分された各ステージ精細管のそれぞれ 5 つの精細管短径を計測することによって、各動物の 5 ステージ区分精細管の平均短径を算出した(1 動物あたりトータル 25 の精細管を計測)。算出には、可能な限り円形に近い断面を持つ精細管を採用した。

次に、TCDD 曝露によってある特定の生殖細胞が特異的に影響を受けている可能性を探るべく、精細管中のセルトリ細胞および生殖細胞(精祖細胞:spermatogonia, 精母細胞:spermatocytes, 精子細胞:spermatids に分類)を計数した。これらの計数にはステージ VII~VIII にある 5 つの精細管を用いた。また、セルトリ細胞は化学物質の曝露など外界からの環境変化影響を受けても、その数は最も影響を受けないことが知られており、1 精細管あたりのセルトリ細胞数もその選択した精細管の大きさに比例してほぼ一定である[87]。したがって、常法に従い、各精細管のセルトリ細胞あたりの精祖細胞、精母細胞および精子細胞比率についても算出した。

精巣上体については、スライド断面あたりの精巣上体管、精巣上体管上皮細胞層、精巣上体管内腔、精巣上体管内腔内の貯留精子の各エリア面積を算出した。これらの算出には動物あたり 30 の精巣上体管を用い、選択した精巣上体管の大きさによる算出誤差を補正する目的で、精巣上体管面積あたりの各上皮細胞層、精巣上体管内腔、



精巣上体管内腔内の貯留精子比率についても算出した。

上述の精細管の平均短径計測，セルトリ細胞および生殖細胞の計数，精巣上体の各エリア面積の算出には，画像解析ソフトウェア「analySIS」（Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany）を用いて行った。

#### 2.4. 雄性ホルモンの測定

血清中のテストステロンおよびインヒビン B 濃度の測定を 6 歳の冬（精液検査と同時期）に行った。これらの測定は約 4 週間の間隔で 2 回実施した。また，7 歳の冬の剖検時に採取した凍結精巣組織を用いて，精巣中のテストステロンおよびその代謝活性体である  $5\alpha$ ジヒドロテストステロン（DHT）についても測定した。これらの雄性ホルモンの測定は，株式会社新日本科学 薬物代謝分析センター（和歌山県海南市）の協力を得て，テストステロンおよび DHT はラジオイムノアッセイ（RIA）法で，インヒビン B はエンザイムイムノアッセイ（EIA）法にて行った。それぞれの測定法（濃度算出法）の概要を以下に示した。

テストステロン（DiaSorin, Inc., Vercelli, Italy）および DHT（Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, USA）濃度は，標準的な RIA チューブ固相法にて測定した。標準曲線用試料の放射能カウント数から，ガンマーカウンター内蔵のコブラ 5005，5010 システムソフトの Auto spline により標準曲線を作成し，放射能カウント数を標準曲線に当てはめて求めた。データの計算処理に用いる放射能カウント数は，二重測定の平均値を用いた。血清中テストステロン濃度は ng/mL の単位で，組織内濃度は ng/g の単位で小数点以下 2 桁まで表示した。

インヒビン B 濃度は標準的な EIA 法にて測定し，Multiskan Ascent で吸光度を測定した（主波長：492 nm）。4-parameters logistic curve fit プログラム（Ascent Software, Lerwick,

UK) で得られた標準曲線を用いて、各 well の試料濃度を算出し、二重測定 averages を求めた。血清中インヒビン B 濃度は pg/mL の単位で小数点以下 2 桁まで表示した。

## 2.5. 統計解析

MUSCOT 統計解析ソフトウェア (ユックムス株式会社) を用いて検定を行った。F 検定により分散の一様性の検定を行い、その結果、分散が一様の場合には Student's t-test を用いて、分散が一様でない場合には順位変換を行った後 Aspin-Welch t-test を用いて、TCDD 曝露群と対照群との平均順位の対比較検定を行った。頻度データについては Fisher の直接確率法で検定した。検定の有意水準は 5% とし、5% ( $P < 0.05$ ) および 1% ( $P < 0.01$ ) の指標で表記した。全ての定量データは Mean  $\pm$  SE (standard error of mean) で表記した。

## 3. 結果

### 3.1. 肛門-生殖器間距離、陰茎長、精巣および精巣上体重量

出生時および生後 820 日時点まで生存していた雄出生児の肛門-生殖器間距離 (AGD) を Table 11 に示した。AGD については、対照群と 30 および 300 ng/kg 群との間に統計学的有意差はみられなかったが、300 ng/kg 群の出生時および生後 820 日時点の AGD は対照群の 83 および 94% であった。陰茎長については、TCDD 曝露に伴うと考えられる差は、いずれの測定時点においてもみられなかった。

剖検時 (生後 7 歳時点) における精巣および精巣上体の重量を Table 11 に示した。精巣 (両側) 重量は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 41.83, 28.94 および 31.17 g (相対重量: 5.51, 3.86 および 4.23 g/Final BW) であり、TCDD 曝露を受けた両群ともに対照群の約 70% に減少した。精巣上体重量については、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 6.57, 5.50 および 6.30 g (相対重量: 0.88, 0.74 および 0.84

g/Final BW) であり, 30 ng/kg 群では対照群の 84%に減少したが, 300 ng/kg 群では対照群とほぼ同程度の値であり, 本変化は用量に依存した変化ではなかった.

### 3.2. 精液性状

出生児の生後 6 歳における精子検査 (精液性状) 結果を Fig. 4 および Table 12-1~12-7 に示した.

これらの精液検査は, それぞれの出生児に対して 2 週間隔で 3 回試行した. 1 試行につき最大 3 日連続 (1~2 分間/日) での電気刺激を施し, 3 日間の電気刺激においても評価可能な精液が採取できなかつた場合に, その動物の当該試行を「精液採取不能」と判断した. 300 ng/kg 群では, 3 動物の 7 試行において評価可能な精液の採取ができなかつた (3 試行×5 動物, 計 15 試行実施). 300 ng/kg 群における評価可能な精液が採取できた頻度 (8/15 試行, 53%) は, 対照群 (4 動物, 12/12 試行, 100%) と比較して統計学的に有意に減少した. 30 ng/kg 群 (6 動物, 16/18 試行, 89%) では対照群との間に統計学的有意差はみられなかつた.

300 ng/kg 群では, 総精子数 ( $47.93 \times 10^6$ ) が対照群 ( $140.75 \times 10^6$ ) と比較して約 1/3 に減少し, 精子濃度 ( $456.97 \times 10^6/\text{mL}$ ) は対照群 ( $3963.33 \times 10^6/\text{mL}$ ) と比較して著しい減少を示した ( $P < 0.01$ ). また, 統計学的な有意差はみられなかつたものの, 同群では精子生存率 (57.33%) および精子活動性 (61.25%) が, 対照群 (精子生存率: 86.35%, 精子活動性: 73.78%) と比較して減少し, 精液量 (0.185 mL) および凝固物重量 (559.38 mg) は対照群 (精液量: 0.098 mL, 凝固物重量: 158.25 mg) と比較して増加した.

30 ng/kg 群では, 総精子数および精子濃度について, 対照群との間に統計学的有意差はみられなかつたが, 精子生存率 (72.37%), 精子活動性 (65.63%), 精液量 (0.238 mL) および凝固物重量 (428.02 mg) については, 300 ng/kg 群と同様の傾向を示した. また, 精子生存率および精子活動性の減少, 並びに凝固物重量の増加については, 用

量依存的な変化であった。

精子奇形率および精液の色調については、群間で差はみられず、TCDD 曝露に伴う影響はみられなかった。

### 3.3. 精巣の病理組織的検査

精巣の病理組織的検査結果を Fig. 5, Table 13 および 14 に示した。

最初に光学顕微鏡下にて精巣を観察した結果、30 および 300 ng/kg 群の精細管は対照群と比較して軽度に小さく、精上皮の生殖細胞数も軽度に減少していることが示された (Fig. 5)。しかし、生殖細胞、セルトリ細胞およびライディッヒ細胞の形態については、いずれの群においても異常はみられなかった。

次のステップとして、TCDD の精子形成ステージ特異的な影響の有無を評価するために、精細管のステージ鑑別を行った (Table 13)。アカゲザルの精子形成サイクルは 12 のステージに区分されている [84-86]。12 に分類された各精細管をさらに 5 つの区分 (ステージ II~IV, V~VI, VII~VIII, IX~X および XI~I) に分け、動物ごとの 5 区分精細管比率を算出した。その結果、精細管比率はいずれの区分ステージにおいても TCDD 曝露群と対照群との間に差はみられず、TCDD 曝露に伴うステージ特異的な精細管比率の増減はみられなかった。精細管の平均短径については、30 および 300 ng/kg 群 (166.8 および 166.2  $\mu\text{m}$ ) において対照群 (185.4  $\mu\text{m}$ ) の約 89% まで減少した。これらの変化には用量依存性はなく、TCDD 曝露両群ともに同程度の減少であった。またステージ特異的な精細管短径の減少もみられなかった。

さらにその次のステップとして、TCDD の生殖細胞特異的な影響の有無を評価するために、精細管中のセルトリ細胞および生殖細胞 (精祖細胞: spermatogonia, 精母細胞: spermatocytes, 精子細胞: spermatids に分類) を計数した (Table 14)。これらの

計数にはステージ VII～VIII にある精細管を用い、生殖細胞数をセルトリ細胞数で補正した値も評価に供した。30 および 300 ng/kg 群では、精母細胞数 (56.8 および 66.3) および精子細胞数 (69.8 および 74.5) が対照群 (精母細胞数 : 71.2, 精子細胞数 : 96.7) と比較して低値を示し、その減少の程度は精母細胞よりも精子細胞が大きかった。セルトリ細胞あたりの精母細胞数および精子細胞数についても同様の傾向を示し、30 ng/kg 群のセルトリ細胞あたりの精母細胞 (4.3) および精子細胞 (5.4), 並びに 300 ng/kg 群のセルトリ細胞あたりの精子細胞 (6.9) については、対照群 (精母細胞 : 6.1, 精子細胞数 : 9.6) と比較して低値を示した。300 ng/kg 群のセルトリ細胞数 (11.2) および精祖細胞数 (8.5) についても、対照群 (セルトリ細胞数 : 13.7, 精祖細胞数 : 9.4) と比較して低値傾向を示したが、セルトリ細胞あたりの精祖細胞は対照群と差が無く、その毒性学的意義は無いものと考えられた。30 ng/kg 群では、セルトリ細胞数および精祖細胞数並びにセルトリ細胞あたりの精祖細胞において、対照群との間に差はみられなかった。

### 3.4. 精巣上体の病理組織的検査

精巣上体の病理組織的検査結果を Fig. 6 および Table 15 に示した。

最初に光学顕微鏡下にて精巣上体を観察した結果、30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管は対照群と比較して明らかに小さく、精巣上体管内の精子も明らかに減少していた (Fig. 6) 。精巣上体管上皮細胞の形態については、いずれの群においても異常はみられなかった。

次のステップとして、スライド断面あたりの精巣上体管、精巣上体管上皮細胞層、精巣上体管内腔および精巣上体管内腔内の貯留精子の各エリア面積を、画像解析装置を用いて算出した (Table 15) 。また、精巣上体管の大きさによる算出誤差を補正す

る目的で、精巣上体管面積あたりの各上皮細胞層、精巣上体管内腔、精巣上体管内腔内の貯留精子比率についても算出し、評価に供した。30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管 (153873 および 138778  $\mu\text{m}^2$ ) および精巣上体管内腔 (82421 および 70851  $\mu\text{m}^2$ ) の各エリア面積は、対照群 (精巣上体管 : 252589  $\mu\text{m}^2$ , 精巣上体管内腔 : 127190  $\mu\text{m}^2$ ) と比較して統計学的に有意に減少し、300 ng/kg 群の精巣上体管内腔内の貯留精子 (9979  $\mu\text{m}^2$ ) 面積も、対照群 (54126  $\mu\text{m}^2$ ) と比較して統計学的に有意に減少した。また、30 ng/kg 群の精巣上体管内腔内の貯留精子 (8764  $\mu\text{m}^2$ ) のエリア面積も、対照群と比較して統計学的な有意差はみられないものの、300 ng/kg 群と同程度に減少した。精巣上体管あたりの各エリア面積比率については、30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管上皮細胞層比率 (50.2 および 50.7%) は、対照群 (35.3%) と比較して統計学的に有意に増加したのに対し、300 ng/kg 群の精巣上体管内腔比率 (49.3%) および精巣上体管内腔内の貯留精子比率 (6.1%) は、対照群 (精巣上体管内腔比率 : 64.7%, 精巣上体管内腔内の貯留精子比率 : 17.3%) と比較して統計学的に有意に減少した。30 ng/kg 群の精巣上体管内腔比率 (49.8 %) および精巣上体管内腔内の貯留精子比率 (4.6%) は 300 ng/kg 群と同程度に減少した。

### 3.5. 雄性ホルモン濃度

生後6歳時点でのテストステロンおよびインヒビンB濃度並びに剖検時に採取した精巣中のテストステロンおよびその代謝活性体であるDHT濃度を以下に示した。

対照群、30 ng/kg 群および300 ng/kg 群の血清中テストステロン濃度は11.85, 11.95 および9.33 ng/mLであり、精巣中のテストステロン濃度は185.23, 296.78 および205.50 ng/gであり、精巣中のDHT濃度は2.01, 2.45 および1.66 ng/gであった。これらのホルモン濃度については、群間で明らかな差はみられず、雄性生殖能に影響を与える変

化ではないものと判断した。なお、30 および 300 ng/kg 群の血清中インヒビン B 濃度 (341.98 および 362.44 pg/mL) は対照群 (195.51 pg/mL) と比較して統計学的に有意に上昇した ( $P<0.05$ )。

#### 4. 考察

アカゲザルの胎生期および授乳期 (妊娠 20 日から分娩後 90 日) に TCDD を曝露させ、その出生児の精液性状、精巣および精巣上体に対する影響について評価した。

胎生期および授乳期 (妊娠 20 日から分娩後 90 日) に TCDD の 30 あるいは 300 ng/kg を曝露させたアカゲザルの出生児を生後 6 歳の性成熟に達する時期まで生育させ、その精液性状に対する影響を確認した結果、300 ng/kg 群では総精子数が対照群と比較して約 1/3 に減少し、精子濃度は対照群と比較して著しく減少した ( $P<0.01$ )。これらの射出精子数の雄出生児における減少は、TCDD を妊娠 15 日のラットに単回投与したいくつかの実験においても報告されている[44, 45, 77, 88, 89]。さらに、Mocarelli らによると、イタリアのセブソでの工場爆発事故によって幼少期に TCDD 被爆を受けた男性住民においても、同様の射出精子濃度の減少が 22 年後の疫学調査において報告されている[90]。したがって、経胎盤あるいは幼少期 TCDD 曝露により、射出精子数および射出精子濃度の減少が引き起こされるのは間違いのないようである。一方、30 ng/kg の TCDD を胎生期および授乳期に曝露させても、アカゲザル出生児の射出精子数および射出精子濃度の減少はみられなかった。これらのことから、TCDD 胎生期および授乳期曝露に伴うアカゲザル出生児の射出精子数および射出精子濃度に対する影響については、30 ng/kg と 300 ng/kg との間に閾値があり、それは現行の日本における TDI [63] 算出の基となった LOAEL 値、86 ng/kg に近似しているものと考えられた。

当初、我々は 300 ng/kg 群で生じた射出精子数の減少を説明できる所見が、精巣で

見出されることを期待した。しかし、我々の予想に反して、出生児の精巣における TCDD 曝露の影響は小さかった。300 ng/kg 群における射出総精子数は対照群の約 1/3 まで減少していたにもかかわらず、精巣重量、精細管短径および精細管中の精子細胞数の減少は、それぞれ対照群の 70, 89 および 77%であった。さらに、300 ng/kg 群ではごく軽度の精祖細胞および精母細胞数の減少がみられたものの、セルトリ細胞あたりのこれらの生殖細胞数比率については対照群との間に差はみられなかった。興味深いことに、母体へ TCDD を曝露させたラット出生児においても類似の変化がみられている。Gray らは、妊娠 15 日に Long Evans ラットへ TCDD を曝露させたところ、800 ng/kg 以上の群でラット出生児における射出精子数の減少がみられたが、いずれの群においても精巣重量あるいは一日精子生産量 (daily sperm production, DSP) の減少は検出できなかったと報告した[44, 45]。加えて、母体への TCDD 曝露によって、ラット出生児に精巣重量の減少を伴わない軽度な DSP の減少がみられた報告[43, 79]、あるいはラット出生児に精巣重量および DSP の減少を伴わなかった実験報告がある[78, 91]。これらのことから、たとえ影響を受けたとしても、TCDD 曝露によって引き起こされる精巣重量、精細管短径および精細管中の生殖細胞 (特に精子細胞数) の減少は、射出精子数に対する影響と比較すると、その毒性学的重要度は低いものと考えられた。

出生児の精巣上体重量については、対照群と TCDD 曝露群の間に統計学的有意差はみられなかったが、精巣上体の病理組織的検査では 30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管は対照群と比較して明らかに小さく、精巣上体管内腔内の貯留精子数も明らかに少なかった。病理形態計測では、30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管、精巣上体管内腔および精巣上体管内腔内の貯留精子の各エリア面積は、対照群と比較して明らかに減少した。一方、30 および 300 ng/kg 群の精巣上体管あたりの精巣上体管上皮細胞層比



率は対照群と比較して統計学的に有意に増加し、精巣上体管の萎縮は精巣上体管上皮細胞層の構造的変化に起因するものではなく、精巣上体管内腔内の貯留精子数減少を伴った精巣上体管内腔の狭窄に起因するものと考えられた。胎生期および授乳期 TCDD 曝露に伴うアカゲザル出生児の精巣上体管内貯留精子数の減少はラットでの報告と一致する[43-45, 77-79]。したがって、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた次世代にとって、精巣上体管内貯留精子数は、射出精子数と同様に DSP あるいは精細管内の生殖細胞数カウントよりも感受性の高い評価指標と考えられた。射出および精巣上体内貯留精子数の減少を説明するために、Sommer らは精巣上体および輸出管の上皮細胞の貪食活性が上昇し、それらが射出精子数の減少に関与したのではないかと推察した[77]。Faqi らは雌 Wistar ラットに初回投与として 25, 60 あるいは 300 ng/kg の TCDD を交配前 2 週間の時点で投与し、その後 1/5 量である 5, 12 あるいは 60 ng/kg の TCDD を週 1 回維持量として投与した実験において、全 TCDD 曝露群において精巣上体管内貯留精子数の減少と精子の精巣上体内通過時間の延長がみられたと報告している[79]。我々は、今回のアカゲザルにおける実験において、TCDD 曝露に起因した射出および精巣上体内貯留精子数の減少を説明するための十分な実験データを持ち合わせていないが、精子の精巣上体内通過時間の延長、精巣上体および輸出管における上皮細胞の貪食活性上昇などが関与した可能性があるかと推察した。

ラットでは、雄出生児の AGD 短縮が、母体への TCDD 曝露に起因する一つの感受性高い指標として挙げられている[43, 44, 78, 91]。今回の実験では、300 ng/kg 群の雄出生児の出生時点での AGD は、対照群の約 83%と軽度に低値を示したが、生後 820 日時点では対照群の約 94%まで回復した。また、陰茎長については TCDD 曝露群と対照群との間で統計学的な有意差はみられず、その形態についてもいずれの群においても異常はなかった。外生殖器の発達についてはアンドロゲン依存的と言われている

ため、Mably らは循環テストステロンおよびその活性代謝体である DHT の濃度を、TCDD を妊娠 15 日のラットに単回投与した実験における出生児で確認し、テストステロンおよび DHT 濃度の減少がみられたと報告している[43]。しかし、今回の我々の実験では、血清中テストステロン濃度、精巣中のテストステロンおよび DHT 濃度について、TCDD 曝露群と対照群との間に雄性生殖能に影響を与えるような差は認められなかった。これらのことを総合的に考えると、TCDD をアカゲザルの胎生期および授乳期に曝露させても、その出生児では AGD および外生殖器の発達については全く影響を及ぼさないか、毒性学的に意義の無いレベルの影響しか及ぼさないものと考えられた。

当初、我々は交配実験を実施し、受胎能を調べることが最も直接的な TCDD 曝露を受けた出生児の生殖能力を評価する手法だと考えていた。そこで、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた雄児と性成熟した無処置雌、あるいは TCDD 曝露を受けた雌児と性成熟した無処置雄との間で交配実験を試みた。交配は、出生児が十分に性成熟に達していると考えられる年齢である 6 歳の繁殖期（1 月～3 月）に行った。しかし、2 例の TCDD 曝露を受けた雌児（30 および 300 ng/kg 群の各 1 例）を除き、対照群の交配組み合わせにおいても妊娠動物を得ることはできなかった。これらの交配では、全ての組み合わせで交配期間中に交尾行動がみられ、対照群の精液性状は背景値と比較しても遜色ないレベル（例を挙げると、対照群の総精子数： $140.8 \pm 52.9 \times 10^6$ 、背景値の総精子数： $167.4 \pm 62.2 \times 10^6$ ）であったにもかかわらず、結果として受胎能を評価することは出来なかった。この原因について十分に説明することは難しいが、一つの可能性として、それぞれのホームケージでの個別飼育での影響が考えられた。これは、アカゲザルの社会性および習性を考慮して群飼育を試みた際に、群れ内での闘争がみられ、数例の動物の死亡が起こってしまった結果から、性成熟に達するまでの

動物の生存性向上を最優先に考えた処置であった。ところが、特に幼少期のサルにとって、互いに触れ合い、遊ぶ行動が、アカゲザルの精神行動発達にとって重要であった可能性は否定できない。そのことが児の受胎能評価の失敗に関連したものと推察した。胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の受胎能評価はできなかったものの、我々はそれらの出生児において射出精子数および精巣・上体内貯留精子数の減少を見出すことができたため、アカゲザル出生児の生殖能力をある程度評価できたものと考えた。

精液検査では、胎生期および授乳期 TCDD 曝露により、アカゲザル出生児の精子生存率および精子活動性が用量依存的に減少する傾向が示された。加えて、300 ng/kg 群ではいくつかの試行において評価可能な精液が採取できず、その頻度は対照群と比較して統計学的に有意に増加した。これらの所見は、TCDD 曝露に伴いアカゲザル出生児の副生殖器、前立腺および精囊に影響がもたらされている可能性を示唆すると考えられた。さらに、今回の試験では 30 および 300 ng/kg 群において、精液量および凝固物重量の増加もみられた。したがって、次のステップでは胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の前立腺および精囊に対する影響について検討した。

## 5. Tables and Figures

**Table 11**

**Anogenital distance, and testis and epididymis weights of male offspring**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
<b>Anogenital distance (mm)</b>			
PND 1 <sup>a)</sup>	37.6 ± 0.81	37.3 ± 2.86	31.3 ± 2.96
PND 820 <sup>b)</sup>	90.6 ± 1.69	87.0 ± 1.67	84.6 ± 3.33
<b>Organ weight (paired)<sup>c)</sup></b>			
Testes – Absolute (g)	41.83 ± 15.28	28.94 ± 4.43	31.17 ± 3.53
Testes – Relative (g/Final B.W.)	5.51 ± 1.80	3.86 ± 0.58	4.23 ± 0.50
Epididymides – Absolute (g)	6.57 ± 0.96	5.50 ± 0.46	6.30 ± 1.21
Epididymides – Relative (g/Final B.W.)	0.88 ± 0.09	0.74 ± 0.06	0.84 ± 0.13

PND: Postnatal days. B.W.: Body weight.

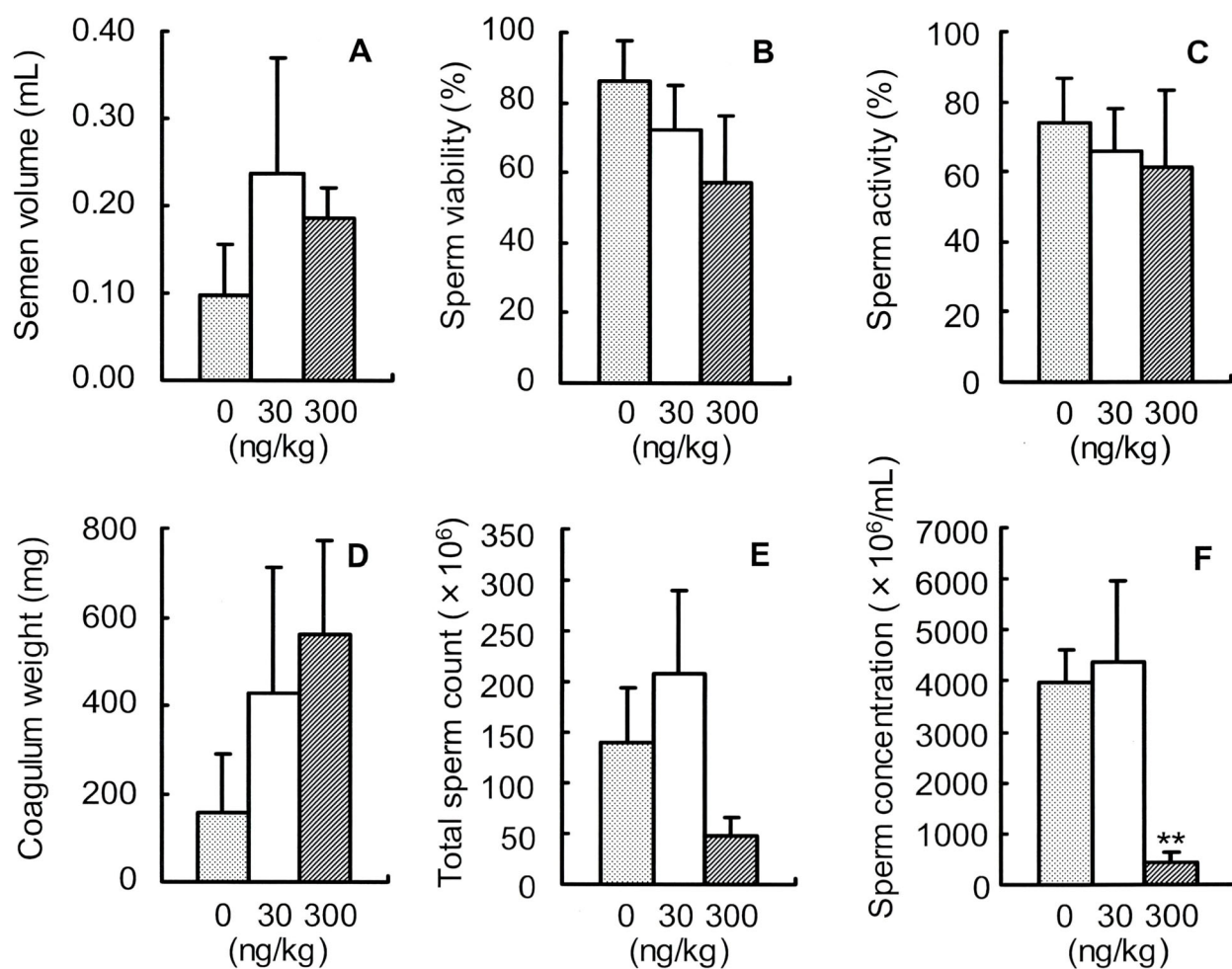
a Numbers of offspring were 5, 8 and 8 in the control, 30 and 300 ng/kg groups, respectively.

b Numbers of offspring were 5, 7 and 5 in the control, 30 and 300 ng/kg groups, respectively.

c Numbers of offspring were 3, 5 and 3 in the control, 30 and 300 ng/kg groups, respectively.

The values expressed are mean ± SE.

There were no significant differences in any landmark when compared with the control group.



**Fig. 4.**

Effects on semen quality in male offspring exposed to TCDD in utero and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. A: Semen volume, B: Sperm viability, C: Sperm activity, D: Coagulum weight, E: Total sperm count, F: Sperm concentration. Numbers of male offspring were 4, 6 and 5 in the control, 30 and 300 ng/kg groups, respectively. The values expressed are mean  $\pm$  SE. \*\*Significant difference from the control group ( $P < 0.01$ ).

Table 12-1 Individual semen analysis data in male offspring (Semen color)

Dose (ng/kg)	Animal number	Semen color		
		1st time	2nd time	3rd time
0	4	YW	YW	YW
	13	YW	YW	YW
	62	MW	MW	MW
	64	MW	MW	MW
30	19	MW	MW	MW
	22	MW	MW	MW
	25	-	MW	-
	27	MW	MW	MW
	47	MW	MW	MW
	53	MW	MW	MW
300	33	-	-	MW
	39	MW	MW	MW
	44	-	-	-
	60	MW	MW	MW
	66	-	-	MW

YW : Yellowish white

MW : Milky white

- : No available semen obtained

Table 12-2 Individual semen analysis data in male offspring (Semen volume)

Dose (ng/kg)	Animal number	Semen volume (mL)			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	0.04	0.02	0.02	0.04
	13	0.02	0.02	0.01	0.02
	62	0.06	0.05	0.02	0.06
	64	0.27	0.06	0.03	0.27
	Mean	0.098	0.038	0.020	0.098
	S.E.	0.058	0.010	0.004	0.058
30	19	0.83	0.33	0.21	0.83
	22	0.02	0.05	0.01	0.05
	25	-	0.03	-	0.03
	27	0.41	0.08	0.06	0.41
	47	0.03	0.03	0.06	0.06
	53	0.03	0.05	0.03	0.05
300	Mean	0.264	0.095	0.074	0.238
	S.E.	0.160	0.048	0.035	0.132
	33	-	-	0.17	0.17
	39	0.03	0.09	0.16	0.16
	44	-	-	-	-
	60	0.12	0.30	0.11	0.30
300	66	-	-	0.11	0.11
	Mean	0.075	0.195	0.138	0.185
	S.E.	0.045	0.105	0.016	0.041

- : No available semen obtained

Not significantly different from control

Table 12-3 Individual semen analysis data in male offspring (Coagulum weight)

Dose (ng/kg)	Animal number	Coagulum weight (mg)			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	NO	NO	NO	0.0
	13	NO	NO	NO	0.0
	62	78	NO	NO	78.0
	64	555	162.3	NO	555.0
	Mean	316.5	162.3	-	158.25
	S.E.	238.5	-	-	133.52
30	19	1826	765.6	655	1826.0
	22	67	NO	NO	67.0
	25	-	NO	137.1	137.1
	27	368	226.5	148.4	368.0
	47	166	170	104.6	170.0
	53	NO	NO	NO	0.0
	Mean	606.8	387.4	261.3	428.02
S.E.	411.2	189.8	131.6	284.18	
300	33	-	-	147	147.3
	39	152	273.9	NO	273.9
	44	-	-	-	-
	60	1069	944.0	527	1069.0
	66	-	-	747	747.3
	Mean	610.5	609.0	473.9	559.38
S.E.	458.5	335.1	175.2	213.37	

NO : No coagulum obtained

- : No available semen obtained

Not significantly different from control

Table 12-4 Individual semen analysis data in male offspring (Sperm viability)

Dose (ng/kg)	Animal number	Sperm viability (%)			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	79.8	0.0	98.7	98.7
	13	52.9	27.4	0.0	52.9
	62	91.7	95.9	87.4	95.9
	64	57.1	94.1	97.9	97.9
	Mean	70.38	54.35	71.00	86.35
	S.E.	9.24	24.13	23.81	11.17
30	19	65.2	0.0	50.7	65.2
	22	91.2	66.2	11.9	91.2
	25	-	12.5	-	12.5
	27	96.5	95.7	96.2	96.5
	47	79.0	57.9	23.3	79.0
	53	76.7	87.2	89.8	89.8
	Mean	81.72	53.25	54.38	72.37
S.E.	5.54	15.96	17.01	12.81	
300	33	-	-	0.0	0.0
	39	74.4	58.4	55.4	74.4
	44	-	-	-	-
	60	12.5	35.7	81.7	81.7
	66	-	-	73.2	73.2
	Mean	43.45	47.05	52.58	57.33
S.E.	30.95	11.35	18.36	19.20	

- : No available semen obtained

Not significantly different from control

Table 12-5 Individual semen analysis data in male offspring (Sperm activity)

Dose (ng/kg)	Animal number	Sperm activity (%)			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	80.0	0.0	88.8	88.8
	13	35.0	20.0	0.0	35.0
	62	57.5	82.5	72.5	82.5
	64	70.0	85.0	88.8	88.8
	Mean	60.63	46.88	62.53	73.78
	S.E.	9.70	21.68	21.19	13.01
30	19	62.5	0.0	20.0	62.5
	22	70.0	60.0	6.3	70.0
	25	-	8.8	-	8.8
	27	80.0	87.5	95.0	95.0
	47	82.5	35.0	1.3	82.5
	53	57.5	75.0	52.5	75.0
	Mean	70.50	44.38	35.02	65.63
S.E.	4.83	14.57	17.45	12.24	
300	33	-	-	0.0	0.0
	39	60.0	40.0	35.0	60.0
	44	-	-	-	-
	60	12.5	47.5	95.0	95.0
	66	-	-	90.0	90.0
	Mean	36.25	43.75	55.00	61.25
S.E.	23.75	3.75	22.82	21.83	

- : No available semen obtained

Not significantly different from control

Table 12-6 Individual semen analysis data in male offspring (Total sperm count)

Dose (ng/kg)	Animal number	Total sperm count ( $\times 10^6$ )			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	97.3	4.8	95.6	97.3
	13	8.4	14.0	32.6	32.6
	62	151.6	60.3	33.1	151.6
	64	98.0	281.5	158.6	281.5
	Mean	88.83	90.15	79.98	140.75
	S.E.	29.67	64.93	30.09	52.85
30	19	220.9	73.7	65.5	220.9
	22	76.0	43.8	92.4	92.4
	25	-	3.4	-	3.4
	27	565.5	340.9	83.2	565.5
	47	112.2	62.8	17.2	112.2
	53	25.2	57.7	258.1	258.1
	Mean	199.96	97.05	103.28	208.75
S.E.	96.87	49.78	40.82	80.60	
300	33	-	-	0.0	0.0
	39	18.7	41.6	59.2	59.2
	44	-	-	-	-
	60	3.3	33.5	88.3	88.3
	66	-	-	44.2	44.2
	Mean	11.00	37.55	47.93	47.93
S.E.	7.70	4.05	18.41	18.41	

- : No available semen obtained

Not significantly different from control



Table 12-7 Individual semen analysis data in male offspring (Sperm concentration)

Dose (ng/kg)	Animal number	Sperm concentration ( $\times 10^6$ /mL)			
		1st time	2nd time	3rd time	BEST
0	4	2432.50	240.00	4780.00	4780.0
	13	420.00	700.00	3260.00	3260.0
	62	2526.67	1206.00	1655.00	2526.7
	64	362.96	4691.67	5286.67	5286.7
	Mean	1435.53	1709.42	3745.42	3963.35
	S.E.	603.20	1013.47	819.11	644.00
30	19	266.14	223.33	311.90	311.9
	22	3800.00	876.00	9240.00	9240.0
	25	-	113.33	-	113.3
	27	1379.27	4261.25	1386.67	4261.3
	47	3740.00	2093.33	286.67	3740.0
	53	840.00	1154.00	8603.33	8603.3
	Mean	2005.08	1453.54	3965.71	4378.30
S.E.	741.78	633.13	2035.47	1598.27	
300	33	-	-	0.00	0.0
	39	623.33	462.22	370.00	623.3
	44	-	-	-	-
	60	27.50	111.67	802.73	802.7
	66	-	-	401.82	401.8
	Mean	325.42	286.95	393.64	456.95**
S.E.	297.92	175.28	164.05	172.98	

- : No available semen obtained

\*P<0.05:Significantly different from control

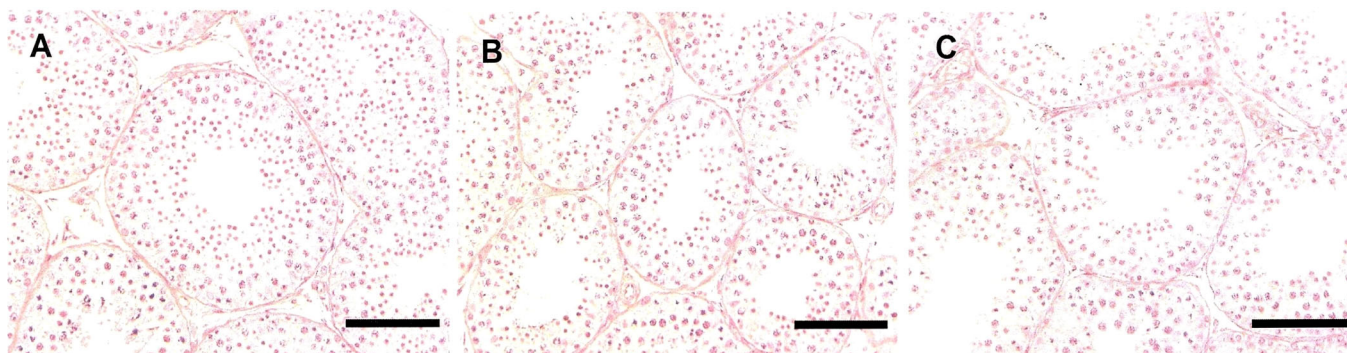


Fig. 5.

Photomicrographs of the seminiferous tubules of male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. A slight decrease in the diameter of the seminiferous tubules in the 30 (B) and 300 (C) ng/kg groups was noted when compared with the control group (A). There were no significant differences in the ratio of spermatogonia per Sertoli cell in the TCDD-exposure groups; however, the number and ratio per Sertoli cell in spermatids were reduced in the 30 and 300 ng/kg groups when compared with the control group. Scale bar = 100  $\mu$ m.

**Table 13****Ratio of 5 seminiferous tubule classifications and the diameters**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
<b>Number of male offspring</b>	3	5	3
<b>Ratio of 5 seminiferous tubule classifications (%)</b>			
Stage II to IV	17.1	10.9	10.4
Stage V to VI	14.3	17.7	16.2
Stage VII to VIII	18.1	17.6	15.0
Stage IX to X	21.6	21.9	22.7
Stage XI to I	30.5	31.3	35.7
<b>Diameters of the seminiferous tubules (µm)</b>			
Stage II to IV	185.4 ± 18.69	165.5 ± 10.14	164.8 ± 14.25
Stage V to VI	184.4 ± 15.56	170.2 ± 8.68	166.0 ± 11.26
Stage VII to VIII	182.1 ± 15.14	166.3 ± 10.65	166.1 ± 11.59
Stage IX to X	183.7 ± 15.14	167.6 ± 6.42	169.3 ± 8.72
Stage XI to I	184.4 ± 16.08	164.6 ± 8.04	164.9 ± 11.38
Total	184.0 ± 15.81	166.8 ± 8.57	166.2 ± 11.39

The values expressed are mean ± SE.

There were no significant differences in any landmark when compared with the control group.

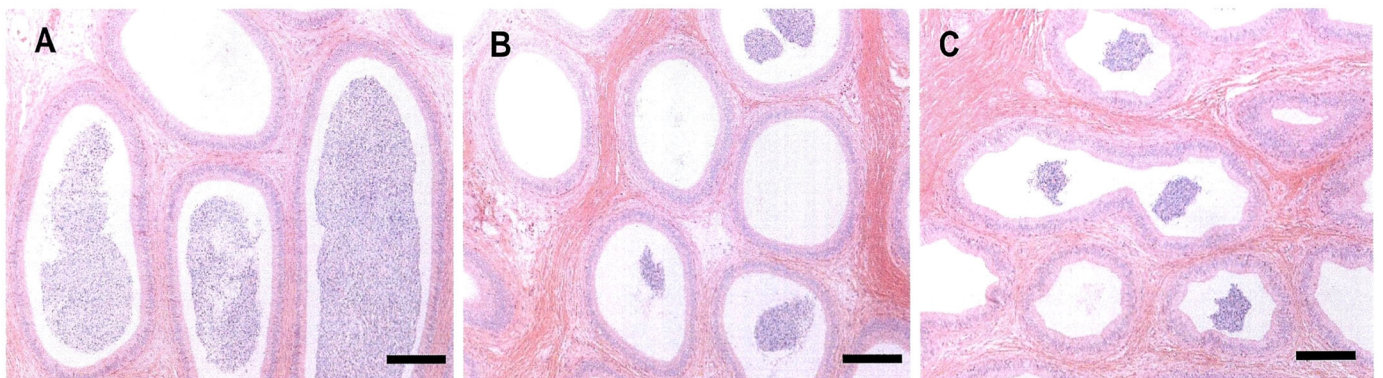
**Table 14**

**The numbers of Sertoli and germ cells (classified as spermatogonia, spermatocytes, and spermatids) per cross section and the ratio of germ cells per Sertoli cell from Stage VII or VIII seminiferous tubules**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
<b>Number of male offspring</b>	3	5	3
<b>Numbers of cells in the seminiferous tubules (ratio per Sertoli cell)</b>			
Sertoli cells	13.7 ± 1.61	13.2 ± 0.58	11.2 ± 0.90
Spermatogonia	9.4 ± 0.85 (0.8)	9.6 ± 0.54 (0.7)	8.5 ± 1.77 (0.8)
Spermatocytes	71.2 ± 7.23 (6.1)	56.8 ± 8.83 (4.3)	66.3 ± 13.67 (5.9)
Spermatids	96.7 ± 21.03 (9.6)	69.8 ± 9.76 (5.4)	74.5 ± 12.32 (6.9)

The values expressed are mean ± SE.

There were no significant differences in any landmark when compared with the control group.



**Fig. 6.**

Photomicrographs of the ductus epididymidis in male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. Areas of the ductus epididymidis and cavity in the ductus epididymidis, and reserved sperm in the cavity were significantly reduced in the 30 (B) and 300 (C) ng/kg groups when compared with the control group (A). Scale bar = 200  $\mu$ m.

**Table 15****Areas of the ductus epididymis, epithelial cell layer and cavity of the ductus epididymis, and reserved sperm in the cavity (per cross section)**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
<b>Number of male offspring</b>	3	5	3
Ductus epididymis ( $\mu\text{m}^2$ )	252589 $\pm$ 31701	153873 $\pm$ 16173*	138778 $\pm$ 11092*
Epithelial cell layer ( $\mu\text{m}^2$ )	80040 $\pm$ 7165	71451 $\pm$ 6080	67927 $\pm$ 10042
Cavity ( $\mu\text{m}^2$ )	127190 $\pm$ 18827	82421 $\pm$ 11660*	70851 $\pm$ 12196*
Reserved sperm ( $\mu\text{m}^2$ )	54126 $\pm$ 17119	8764 $\pm$ 2407	9979 $\pm$ 4534*
Epithelial cell layer / Ductus epididymis (%)	35.3 $\pm$ 3.37	50.2 $\pm$ 3.38*	50.7 $\pm$ 6.24*
Cavity / Ductus epididymis (%)	64.7 $\pm$ 3.37	49.8 $\pm$ 3.38*	49.3 $\pm$ 6.24*
Reserved sperm / Ductus epididymis (%)	17.3 $\pm$ 4.65	4.6 $\pm$ 0.95	6.1 $\pm$ 1.88*

The values expressed are mean  $\pm$  SE.

\*Significant difference from the control group ( $P < 0.05$ ).

## 第4章

### 胎生期・授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザルの

### 前立腺および精囊に対する影響

#### 1. 導入

TCDD は内分泌攪乱化学物質として知られている有機汚染物質であり、少ない曝露においても強い毒性を持つことが知られている。是永らによると、妊娠および授乳期間に TCDD を負荷させたアカゲザル母動物を最終投与から約4年後に剖検したところ、alpha-smooth muscle actin (alpha-SMA) 陽性肝細胞の増加, transforming growth factor beta (TGF $\beta$ ) タンパク発現レベルの上昇, vascular endothelial cadherin (VE カドヘリン) タンパク発現レベルの減少がみられ、それらが肝臓の血管内皮細胞損傷に寄与したと報告している[92]。今回、TCDD 曝露を受けた母動物から生まれた児において、精子および精液性状の悪化、すなわち射出精子数および精巣上体内貯留精子数の減少、精子生存率および精子活動性の低下がみられたことを第3章にて報告した。さらに、これらのアカゲザル出生児においては精液量および凝固物重量の増加もみられ、TCDD 曝露に伴いアカゲザル出生児の副生殖器、前立腺および精囊に影響がもたらされている可能性が示唆された。

ラットでは、出生児における前立腺重量の減少が、妊娠期間の TCDD 曝露によって引き起こされる最も感受性の高い毒性指標の一つとして認識されている[44, 80, 91, 93]。Fritz らによると、妊娠期間に TCDD を曝露させた C57BL/6J マウス母動物から生まれた児を老齢期に確認した実験において、背外側前立腺における篩状構造発生頻度上昇を伴う前立腺の発育障害がみられたと報告している[94]。マウス前立腺におけ

る篩状構造発現は、前立腺ガンと関連性がある変化と考えられており、発生初期での TCDD 曝露は前立腺ガン罹患率を高める可能性があるとする[94].

そこで、今回、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザル出生児の副生殖器に対する影響について着目し、病理組織的に精査した。また、そこで前立腺における顕著な病理組織的变化を認めため、オリゴ DNA マイクロアレイ解析および Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) の手法を用いて、TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の前立腺に対する影響を遺伝子発現レベルでも評価した。

## 2. 材料および方法

使用した動物、飼育条件、被験物質、投与方法およびその妥当性についての詳細は第2章にて記載した。胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた雄アカゲザル出生児が十分に性成熟に達したと考えられる7歳の冬の時点で剖検を行い、以下の検査を実施した。

### 2.1. 前立腺および精囊の病理組織的検査

剖検時に前立腺および精囊を摘出し、臓器の肉眼的異常の有無を確認した後、重量を測定した。摘出した臓器は2分して、その約半分を液体窒素で凍結し、その後の RNA 抽出作業まで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。残りの半分は10 v/v%中性緩衝ホルマリンにて、固定・保存し、常法に従ってパラフィンに包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色スライド標本作製した。これらのスライド標本を光学顕微鏡下で観察した。

前立腺については、画像解析ソフトウェア「analySIS」(Olympus Soft Imaging Solutions GmbH)を用いて、1動物あたり20の腺(スライドを4区画に分け、それぞ

れの区画から平均的で円形に近い断面を持つ 5 個の前立腺組織を採用) の上皮細胞丈を計測し、その平均値を算出した。精囊についても画像解析ソフトウェアを用いて 1 スライドあたりの管全体および内腔の面積を算出し、精囊の内腔面積比率を算出した。

## 2.2. RNA の抽出

凍結保存していた前立腺組織を Trizol 存在下で、Polytron Homogenizer (Kinematica, Littau-Lucerne, Switzerland) を用いて粉碎した。粉碎した懸濁液にクロロホルムを加えて、ボルテックスミキサーを用いて攪拌し、遠心分離させた。分離したクロロホルム層を分取して、イソプロパノールを加えて攪拌し、さらに遠心分離させて Total RNA を抽出した。抽出した Total RNA は、RNeasy columns (QIAGEN, Valencia, USA) を用いて精製した。精製した Total RNA は、NanoDrop 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) を用いて 260/280nm の吸光度を測定し、抽出した Total RNA の濃度確認を行った。また、Agilent Bioanalyzer 2100 および RNA Nano LabChip Kit (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) を用いて電気泳動を行い、RNA の Integrity Numbers (RIN) 測定を実施して、抽出した Total RNA の純度確認を行った。RIN 値が 7 以上のサンプルだけを用いて、その後の解析を行った。

## 2.3. オリゴ DNA マイクロアレイ解析

Total RNA を Low RNA Input Linear Amplification Kit (1-color, Agilent Technologies) を用いて、Cyanine 3 でラベルされた cRNA を作製した。この cRNA と Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies) を 65°C で 17 時間ハイブリダイゼーションさせた。ハイブリダイズさせたスライドガラスを洗浄し、Agilent scanner (Agilent Technologies) を用いてイメージスキャンした。スキャンしたイメー

ジは、Agilent's Feature Extraction software (バージョン 9.5, Agilent Technologies) を用いてスポットの数値化を行い、GeneSpring GX 7.3.1 software (Agilent Technologies) を用いて解析を行った。得られたアレイデータは、Agilent 社推奨の 1-color 実験の Normalization シナリオに従って正規化 (Normalization) させた。具体的には、アレイ間のシグナル強度の系統的な誤差を補正して、生物学的な変動を抽出する Per Chip Normalization を選択した。搭載されている約 22,000 遺伝子の中で、対照群と TCDD 曝露群の発現レベルを比較して 1.5 倍以上の差がみられ、かつ One-way parametric ANOVA tests を実施して、有意水準 5% ( $P < 0.05$ ) の差があった遺伝子に着目した。

#### 2.4. Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの定量

以下の 4 つの遺伝子について、その発現量を定量し、DNA マイクロアレイで得られた結果の信頼性を確認するために、Real-time PCR での解析を行った。DNA データベース (NCBI The Entrez Nucleotide database) の情報をもとに、*TGM4*, *TGFB1*, *COL1A1*, *MMP2* の 4 遺伝子について配列情報を入手した。

*TGM4* (NM\_003241)

*TGFB1* (NM\_000660)

*COL1A1* (NM\_000088)

*MMP2* (NM\_004530)

Primer3 program ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) を用いて、非特異的結合の可能性を可能な限り排除し、増幅に最適と思われるプライマーペアーを設計した。設計したプライマーペアーの塩基配列を Table 16 に示した。



Table 16

Gene transcript targets, primer sequence and GeneBank accession number of sequences used for assay design (Real-time quantitative PCR)

Gene	Primer Sequence (5'-3')	Gene Bank account
<i>TGM4</i>	F: 5'-ACACAGGCTGCCATTACG-3' R: 5'-AGGGAGCTCTCAGTCAGCA-3'	NM_003241
<i>COL1A1</i>	F: 5'-GACAGAGGCATAAAGGGTCAC-3' R: 5'-AGGACCAGAGGCTCCAGA-3'	NM_000088
<i>TGFB1</i>	F: 5'-GCCGACTACTACGCCAAGGA-3' R: 5'-TGCTGTGTGTGCTCTGCTTG-3'	NM_000660.3
<i>MMP2</i>	F: 5'-CCGGAAAAGATTGATGCAG-3' R: 5'-GGTCAGTGGCTTGGGGTA-3'	NM_004530

設計したプライマーペアでの増幅を確認し、ABI 7500 instrument (Applied Biosystems, Foster City, USA) と TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を用いて、対照群と TCDD 曝露群における Real-time PCR を行った。増幅反応は 50°C で 2 分間、95°C で 10 分間を 40 サイクル実施し、その後 95°C で 15 秒、60°C で 1 分間の条件で増幅させた。全ての遺伝子の発現量は、内因性標準として選択した 18S rRNA の発現量で補正した。なお、これらの測定は 3 重測定で行った。

## 2.5. 統計解析

オリゴ DNA マイクロアレイ解析に関しては、GeneSpring GX 7.3.1 software (Agilent Technologies) に内在の機能を用いて、One-way parametric ANOVA tests を実施した。それ以外の定量データ (Real-time PCR を除く) は、MUSCOT 統計解析ソフトウェア (ユックムス株式会社) を用いて検定を行った。F 検定により分散の一樣性の検定を行い、その結果、分散が一樣の場合には Student's t-test を用いて、分散が一樣でない

場合には順位変換を行った後 Aspin-Welch t-test を用いて、TCDD 曝露群と対照群との平均順位の対比較検定を行った。検定の有意水準は 5%とし、5% (P<0.05) および 1% (P<0.01) の指標で表記した。全ての定量データは Mean ± SE (standard error of mean) で表記した。なお、Real-time PCR については、統計処理を行わなかった。

### 3. 結果

#### 3.1. 前立腺の病理組織的検査

前立腺の重量を Table 10 に、前立腺の病理組織的検査結果を Fig. 7 に、前立腺の上皮細胞丈計測結果を Table 17 に示した。

剖検時（生後 7 歳時点）の前立腺重量は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 2.40, 2.10 および 2.10 g（相対重量：0.34, 0.28 および 0.29 g/Final BW）であった。絶対重量ベースで、30 および 300 ng/kg 群の前立腺重量は、対照群の約 86%に減少したが、統計学的な有意差はみられない軽微な変化であった（Table 10）。

しかし、光学顕微鏡下での前立腺の観察を実施したところ、30 および 300 ng/kg 群では、用量に依存した腺組織の減少および間質組織の増大が対照群と比較してみられた（Fig. 7A～7C）。さらに高倍で観察すると、対照群の前立腺（Fig. 7D）では内腔を裏打ちするように配列され、丈が高い円柱上皮を持つ、良く発達した多くの腺組織とその周囲に筋繊維性の間質組織がみられたが、TCDD 曝露群の上皮細胞丈は扁平化していた（Fig. 7E）。そこで、次にその上皮細胞丈を画像解析装置を用いて測定したところ、30 および 300 ng/kg 群ではそれぞれ 11.266 および 10.434  $\mu\text{m}$  であり、対照群の上皮細胞丈（15.464  $\mu\text{m}$ ）と比較して統計学的に有意に減少していた（Table 17）。さらには、炎症性細胞浸潤（マクロファージ、好中球およびリンパ球）（Fig. 7F）、腺上皮細胞の崩壊（脱落および空胞化）（Fig. 7G）、そして多くの繊維芽細胞（Fig. 7H）

の存在が300 ng/kg群では明らかとなった。これらの中で主たる変化は繊維化であり、炎症性細胞浸潤および腺上皮細胞の崩壊は限局的な変化であった。これは生後7歳の時点ではすでにかかなりの広範な領域が繊維芽細胞に置き換わっており、限局的な変化になったものと考えられた。30 ng/kg群においても300 ng/kg群と同様の傾向がみられたが、300 ng/kg群と比較するとその影響は明らかに小さかった。

### 3.2. 精囊の病理組織的検査

精囊の重量を Table 10 に、精囊の病理組織的検査結果を Fig. 8 に、精囊の内腔面積算出結果を Table 17 に示した。

剖検時（生後7歳時点）の精囊重量は、対照群、30 および 300 ng/kg 群でそれぞれ 14.73, 16.98 および 21.07 g（相対重量：1.99, 2.56 および 2.91 g/Final BW）であった。絶対重量ベースで、30 および 300 ng/kg 群の精囊重量は、それぞれ対照群の約 115 および 143%と用量依存的な増加を示したが、個体間のばらつきが大きく、統計学的な有意差はみられなかった（Table 10）。

光学顕微鏡下で精囊を観察した結果、TCDD 曝露群では対照群と比較して精囊の内腔が拡張していた（Fig. 8A~8E）。さらに高倍で観察すると、対照群では良く発達した上皮細胞を持つ多くの腺構造の集合体として精囊が形成され、その中心内腔には適度な分泌物様物が貯留している（Fig. 8C）。一方、TCDD 曝露群では一見して分泌物の貯留が多く、内腔の拡張がみられ、腺を構成する上皮細胞の丈も対照群と比較して低くなっていた（Fig. 8D, 8E）。そこで、次に画像解析装置を用いて、管全体および内腔の面積を算出し、精囊の内腔面積比率を算出したところ、30 および 300 ng/kg 群ではそれぞれ 18.15 および 18.91%であり、対照群の 10.20%と比較して統計学的に有意に増加していた（Table 17）。

### 3.3. 前立腺の DNA マイクロアレイ解析結果

前立腺における DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析結果を Table 18 および 19 に示した。なお、今回実施した全 DNA マイクロアレイ解析データは、National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (NCBI GEO, [www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/)) の遺伝子発現データベースに登録されている (Accession No. GSE20043)。

対照群と TCDD 曝露群の発現レベルを比較して、300 ng/kg 群で 1.5 倍以上の発現量の差がみられ、One-way parametric ANOVA tests を実施して有意水準 5% ( $P < 0.05$ ) の差があった遺伝子は、1502 遺伝子 (up-regulation : 654 遺伝子, down-regulation : 848 遺伝子) であった。その中でヒト由来の GeneBank accession number が付いており、さらに Pub Med において文献検索可能であった 280 遺伝子 (up-regulation : 105 遺伝子, down-regulation : 175 遺伝子) の詳細を、Table 18 (up-regulation) および Table 19 (down-regulation) に示した。

それらの 280 遺伝子の中で、さらに今回の前立腺の病理組織的变化に関連すると考えられる遺伝子を 5 つのカテゴリーに分類し、Table 20 に示した。

300 ng/kg 群では、7 つの繊維化に関連する遺伝子 (*TGM4*, *GREM1*, *COMP*, *COL1A1*, *LUM*, *WNT5A* および *TGFB1*) の up-regulation がみられ、特に 300 ng/kg 群の *TGM4* は 469 倍という驚くような fold change を示した。一方、30 ng/kg 群のこれらの遺伝子の変動は *TGM4* (fold change : 2.05) を除いて軽微であった。さらに、3 つの炎症反応に関連する遺伝子 (*LIPG*, *ANXA1* および *TNFSF15*) の up-regulation, 2 つの細胞構成要素の崩壊に関連する遺伝子 (*ALCAM* および *MMP2*) の up-regulation 並びに腺上皮細胞の正常配列、および apico-basal 極性維持に関連する *ARHGEF18* の down-regulation が 300 ng/kg 群ではみられた。30 ng/kg 群においても *LIPG*, *ANXA1*,

*TNFSF15*, *ALCAM*, *MMP2* および *ARHGEF18* の各遺伝子の変動は、300 ng/kg 群と同様の傾向を示したが、300 ng/kg 群よりも変動率は小さかった。加えて、4 つのガン化に関連する遺伝子（up-reguration : *MET*, down -reguration : *PENK*, *SRD5A1* および *PRDM5*）, および 5 つのガン抑制に関連する遺伝子（up-reguration : *APRG1* および *ECRG4*, down -reguration : *TFF3*, *FOXC1* および *RELB*）の変動が 300 ng/kg 群でみられた。

### 3.4. Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの確認

前立腺における DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析結果を踏まえて、その中でも代表的な 4 つの遺伝子（*TGM4*, *TGFBI*, *COL1A1* および *MMP2*）を選択し、それらの mRNA 発現レベルを Real-time PCR を用いて確認した。その結果を Fig. 9 に示した。

300 ng/kg 群では、繊維化および細胞構成要素の崩壊に関連する 4 つの選択した全ての遺伝子において、対照群と比較して発現レベルの上昇が確認された（*TGM4*: 約 7220 倍, *TGFBI* : 約 1.45 倍, *COL1A1* : 約 4.07 倍, *MMP2* : 3.08 倍）。30 ng/kg 群では、*TGM4* は用量に依存した増加を示したが、*TGFBI*, *COL1A1* および *MMP2* については、対照群よりもごく軽度に減少、あるいはほぼ同程度の発現レベルを示した。300 ng/kg 群における発現レベルは、DNA マイクロアレイ解析と Real-time PCR との間でほぼ同様の発現パターンを示したことから、本実験における DNA マイクロアレイ解析結果は信頼性が高いものと判断した。

## 4. 考察

アカゲザルの胎生期および授乳期（妊娠 20 日から分娩後 90 日）に 30 あるいは 300

ng/kg の濃度の TCDD を曝露させ、その出生児の前立腺および精嚢に対する影響について評価した。前立腺においては、DNA マイクロアレイ解析および Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの定量化により、その影響を詳細に検討した。

前立腺の病理組織的検査では、30 および 300 ng/kg 群において用量に依存した腺組織の減少、および間質組織の増大が対照群と比較してみられた。さらには、限局的な変化ではあったものの、炎症性細胞浸潤および腺上皮細胞の崩壊が、TCDD を胎生期および授乳期のみにも曝露された 7 歳のアカゲザル出生児においてみられた。これらの事実は、炎症反応および腺組織の崩壊を伴った繊維化が、TCDD の胎生期および授乳期曝露から 7 年経ったアカゲザル出生児において、現在進行形で起こっていたことを示唆するものと考えられた。共同研究者の一人である是永らは、TCDD の最終投与から 4 年経ったアカゲザル母動物の肝臓における内皮細胞損傷について報告している [92]。その報告では、今回のアカゲザル出生児における前立腺の繊維化と類似の変化として、アカゲザル母動物における肝臓の洞様毛細血管周囲の繊維化を示唆する alpha-SMA 陽性肝細胞の増加がみられたと述べている [92]。しかし、アカゲザルにおける TCDD 半減期は約 1 年と考えられており、アカゲザル出生児に残留した TCDD が進行中の前立腺の繊維化に寄与したとは考えにくい。したがって、胎生期および授乳期 TCDD 曝露によって被った影響が 7 年後まで残存し、それがエピジェネティックな影響として生後 7 歳のアカゲザル出生児に及んだものと推察した。

DNA マイクロアレイ解析では、繊維化に関連すると考えられる遺伝子 (*TGM4*, *GREM1*, *COMP*, *COL1A1*, *LUM*, *WNT5A* および *TGFBI*) [95-105] や、炎症反応に関連すると考えられる遺伝子 (*LIPG*, *ANXA1* および *TNFSF15*) [106-108]、並びに細胞構成要素の崩壊に関連すると考えられる遺伝子 (*ALCAM*, *MMP2* および *ARHGEF18*) [100, 109-112] の発現変動が 300 ng/kg 群において確認され、*TGM4*, *TGFBI*, *COL1A1*

並びに *MMP2* の発現上昇は、Real-time PCR においても確認された。これらの mRNA 発現レベルの変動は前立腺における病理組織的变化と合致し、7 歳においても進行中の変化であるとする今回の推察を補強した。繊維化は細胞あるいは組織損傷からの回復および治癒反応として知られている。サイトカインの誘導によって起こる繊維芽細胞の凝集と増殖は、損傷を受けた組織を修復するためにコラーゲン原繊維（膠原原繊維）を産生する[104, 105]。炎症性細胞浸潤および腺上皮の崩壊が今回の実験でもみられており、損傷を受けた組織への応答反応として広範に繊維化が及んだことが示唆される。トランスグルタミナーゼは、ペプチド結合グルタミン残基とリジン残基の不可逆性の架橋結合を触媒する能力を持ち[95]、細胞外基質（extracellular matrix, ECM）の安定化に寄与している[96]。また、トランスグルタミナーゼは、最も有力な繊維形成誘導性のサイトカインである *TGFBI* の活性化を通じて、直接的に繊維化進行の役割を担っているとの報告がある[104]。TCDD 曝露を受けた 300 ng/kg 群のアカゲザル出生児の前立腺においても *TGM4* および *TGFBI* の発現上昇がみられたため、これらの遺伝子変動が前立腺の繊維化に重要な役割を果たしたものと考えられた。正常な組織では、ECM 成分の産生と分解のバランスが維持されている。ECM 成分の主要な成分は、繊維芽細胞によって産生される I 型コラーゲン (*COL1A1*) であるが[104]、マトリックスメタロプロテアーゼ（matrix metalloproteinase, MMP）は ECM 成分の分解に関与している物質として知られており、繊維化の進行は *COL1A1* と *MMP2* の不均衡によって引き起こされると考えられている[99-101, 110, 111]。また繊維化では、特徴的な I 型コラーゲンの過剰な産生が起こり、それは *MMP2* の活性化を伴っていることが知られている[99-101, 110, 111]。これらを総合的に考えると、*COL1A1* と *MMP2* の不均衡および *MMP2* の活性化が TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の前立腺で起き、それらが繊維化の進行しやすい状況を作り出したと考えら

れた。さらには、是永らによると、*TGF $\beta$*  タンパクの発現上昇、コラーゲン繊維の増生に関連する  $\alpha$ -SMA 陽性肝細胞数の増加が TCDD 曝露を受けた母動物においてもみられたことから[92]、繊維化と TCDD 曝露の関連性は疑いようの無いものと考えられた。

著しい *TGM4* の発現上昇が、300 ng/kg 群の DNA マイクロアレイ解析および Real-time PCR においてみられた。この酵素は、交尾後に形成される膣栓においてタンパク質架橋形成を担っているとされており[113]、また、膣内での精子輸送にも関連している[95]。今回、第3章では、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の精液検査において、精液量および凝固物重量の増加がみられた。また、TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の精囊では、用量依存的な精囊重量の増加と分泌物の過剰貯留を示唆するような内腔の拡張がみられた。したがって、著しい *TGM4* の発現上昇および精囊における変化は、精液の凝固物質の過剰形成および精液成分の変性に関連し、前立腺の腺組織の崩壊および繊維化とも相乗して、アカゲザル出生児の精子生存率および精子活動性の用量依存的減少にも関与したものと推察した。

当初、胎生期および授乳期の TCDD 曝露によってアカゲザル出生児の前立腺に上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) [114, 115]のような状況が起こっている可能性が考えられた。そこで、上皮細胞の変化について、細胞間接着の減弱を疑い、カドヘリンやインテグリンの DNA マイクロアレイ結果に着目したが、それらの発現減少はみられなかった。さらに、epithelial cadherin (*CDH1*) および integrin alpha (*INTGA6*) について、Real-time PCR を用いて mRNA レベルを確認したが、DNA マイクロアレイと同様の傾向であった (*CDH1* : 1.68 倍, *INTGA6* : 1.35 倍, 300 ng/kg における対照群との発現比率)。したがって、細胞間接着および上皮細胞機能に関連する遺伝子の変動しなかった要因として、上皮細胞の劇的な変化は7歳のアカゲザル



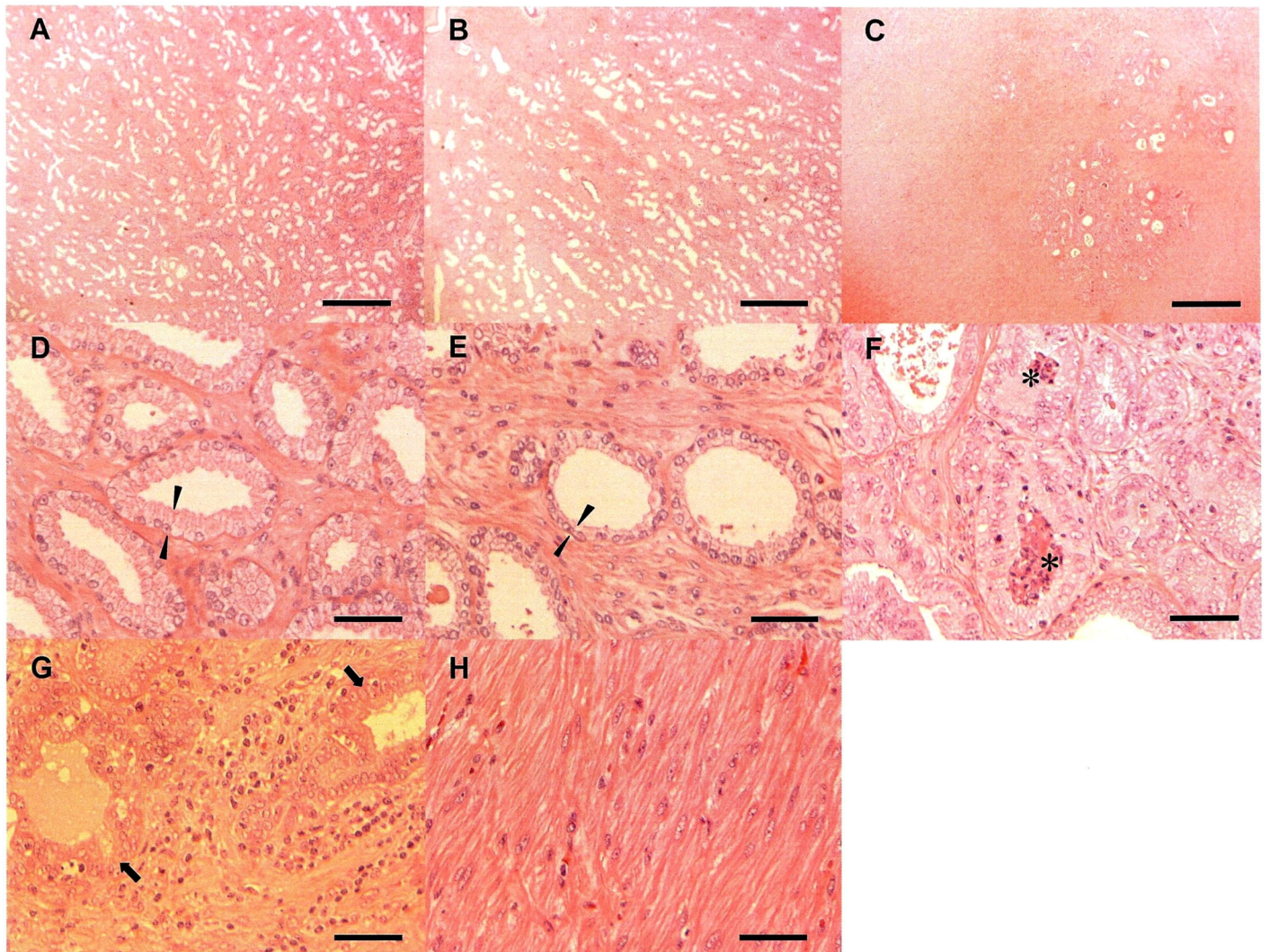
出生児では限局的な変化であり、すでに広範な領域が間質細胞に置き換わっていたからであると推察した。

DNA マイクロアレイ解析では、ガン化に関連する可能性がある 4 つの遺伝子の発現変動 (*MET* の up-reguration, *PENK*, *SRD5A1* および *PRDM5* の down -reguration) [116-119]がみられた。Fritz らは、妊娠期間に TCDD 曝露を受けた C57BL/6J マウス出生児を老齢期に剖検した実験において、前立腺ガンと関連性があると考えられる背外側前立腺の篩状構造の発生頻度上昇について報告している[94]。今回のアカゲザルを用いた実験では、前立腺ガンに関する病理組織的証拠はいずれの出生児にもみられず、また、前立腺ガンのマーカーである PSA (prostate-specific antigen) の本体であるカリクレイン 3 遺伝子[120, 121]の発現レベルの上昇が DNA マイクロアレイの結果ではみられなかったことから (-2.26 倍, 300 ng/kg における対照群との発現比率), 前立腺ガンである可能性は否定された。さらには、ガンの抑制と関連する 5 つの遺伝子の発現変動 (*APRG1* および *ECRG4* の up-reguration, *TFF3*, *FOXC1* および *RELB* の down -reguration) [122-126]もみられた。これらを総合的に考えると、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた 7 歳のアカゲザル出生児において、ガンが誘導されやすい環境が示唆されたが、生理学的小および分子生物学的な抵抗性および拮抗性が働き、繊維化を通じて安定性が保たれたものと推察した。

アカゲザルの胎生期および授乳期に TCDD を曝露させた結果、前立腺では用量に依存した腺組織の減少および間質組織の増大がみられ、その実態は炎症性細胞浸潤および腺組織の崩壊を含んだ前立腺の広範な繊維化であった。精囊では、用量依存的な精囊重量の増加、分泌物様物の過剰貯留を示唆するような内腔の拡張がみられた。前立腺の DNA マイクロアレイ解析では、繊維化、炎症反応および細胞構成要素の崩壊に関連する遺伝子の発現変動が確認され、300 ng/kg 群の Real-time PCR では、*TGM4*,

*TGFBI*, *COL1A1* 並びに *MMP2* の発現上昇が確認された。以上のことから、炎症反応および前立腺組織の崩壊を伴った前立腺の繊維化は、TCDD の最終曝露から7年経ったアカゲザル出生児においても現在進行形の変化であった可能性を示唆され、それらの出生児では前立腺の機能障害が生じていた可能性が強い。TCDD 曝露によってもたらされた前立腺の機能障害は、精囊における変化とも相乗して、次世代アカゲザルの精液性状悪化（射出精子数の減少，精子生存率および精子活動性の低下）に寄与した可能性が示唆された。

## 5. Tables and Figures



**Fig. 7.**

Photomicrographs of the prostates of male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. A dose-dependent decrease in the number of glands of the prostate, and a dose-dependent increase in interstitium tissue in the 30 (B) and 300 (C) ng/kg groups were shown when compared with the control group (A). At higher magnification, the normal appearance of glands of the prostate and surrounding fibromuscular stroma has well-differentiated glands with tall, columnar epithelial lining cells (D, arrowhead); however, epithelial heights in the TCDD-exposed groups tended to be flat (E, arrowhead). Inflammatory cell infiltration in the glandular lumens (F, asterisk), disruption of the glandular epithelium (G, arrow) and a large number of fibroblasts (H) were also observed in the 300 ng/kg group. Scale bar = 500  $\mu\text{m}$  for (A-C) and 50  $\mu\text{m}$  for (D-H).

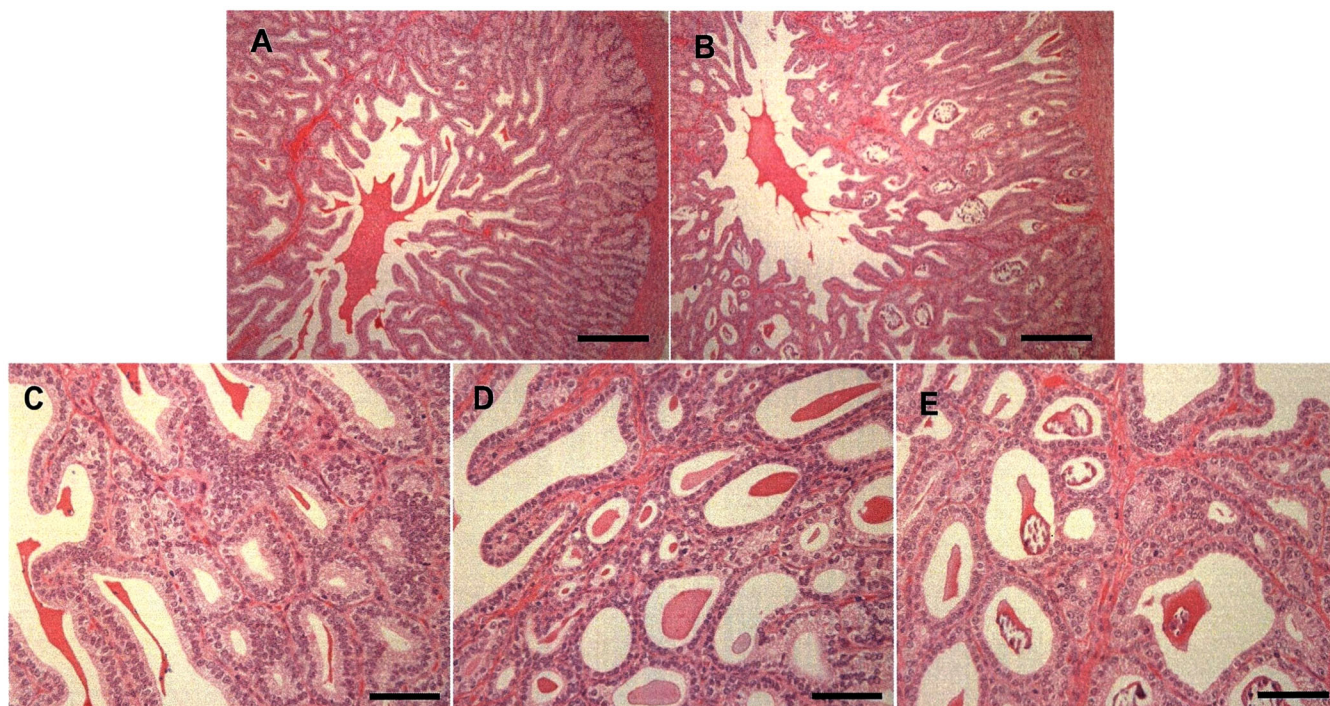
Table 17

**Histomorphometry in the prostate and seminal vesicle in male offspring**

	0 ng/kg	30 ng/kg	300 ng/kg
Epithelial height of glands of the prostate (µm)	15.4 ± 1.6	10.8 ± 0.5*	10.4 ± 1.1*
Rate of the lumen per total seminal vesicle (per cross section, %)	10.2 ± 2.7	18.2 ± 2.0*	18.9 ± 0.6*

The values expressed are mean ± SE.

\*Significant difference from the control group ( $P < 0.05$ ).



**Fig. 8.**

Photomicrographs of the seminal vesicle of male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. An increase in lumen of seminal vesicle (B) was shown in the TCDD-exposed groups when compared with the control group (A). At higher magnification, the normal appearance of seminal vesicle has well-differentiated epithelial cells and the lumen is tight (C); however, epithelial heights in the TCDD-exposed groups tended to be flat and the lumen of the seminal vesicle is expanded in the 30 (D) and 300 (E) ng/kg groups. Scale bar = 500 µm for (A, B) and 50 µm for (C-E).

**Table 18**

List of differentially expressed genes in the prostate (up-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
+ 468.86	+ 2.05	<i>TGM4</i>	Transglutaminase 4 (prostate)
+ 25.17	+ 1.54	<i>VNN2</i>	Vanin 2
+ 14.27	- 1.72	<i>KRT23</i>	Keratin 23 (histone deacetylase inducible)
+ 10.60	+ 2.05	<i>LIPG</i>	Lipase endothelial
+ 10.39	+ 4.18	<i>CRYAA</i>	Crystallin alpha A
+ 9.57	+ 1.20	<i>GREM1</i>	Gremlin 1 homolog cysteine knot superfamily ( <i>Xenopus laevis</i> )
+ 9.49	+ 1.76	<i>MAL2</i>	Mal T-cell differentiation protein 2
+ 6.61	+ 1.85	<i>PNOC</i>	Prepronociceptin
+ 6.33	- 2.76	<i>HLA-B</i>	Major histocompatibility complex class I B
+ 6.27	- 2.01	<i>ODD</i>	Odd-skipped homolog ( <i>Drosophila</i> )
+ 5.65	+ 1.93	<i>GPR74</i>	G protein-coupled receptor 74
+ 5.55	+ 4.21	<i>CNR1</i>	Cannabinoid receptor 1 (brain)
+ 5.36	+ 2.94	<i>UBD</i>	Ubiquitin D
+ 4.96	+ 1.57	<i>FCER1A</i>	Fc fragment of IgE high affinity I receptor for; alpha polypeptide
+ 4.95	- 1.69	<i>HSD11B2</i>	Hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2
+ 4.75	+ 1.76	<i>OSTalpha</i>	Organic solute transporter alpha
+ 4.64	- 2.22	<i>IRX4</i>	Iroquois homeobox protein 4
+ 4.45	+ 1.68	<i>PPP1R14C</i>	Protein phosphatase 1 regulatory (inhibitor) subunit 14C
+ 4.20	+ 1.65	<i>ANXA1</i>	Annexin A1
+ 4.03	+ 1.85	<i>MYB</i>	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)
+ 3.78	+ 3.68	<i>PDE1A</i>	Phosphodiesterase 1A calmodulin-dependent
+ 3.68	+ 1.05	<i>COMP</i>	Cartilage oligomeric matrix protein
+ 3.66	+ 2.40	<i>OSBPL3</i>	Oxysterol binding protein-like 3
+ 3.57	+ 4.86	<i>NDST4</i>	N-deacetylase/N-sulfotransferase (heparan glucosaminyl) 4
+ 3.19	+ 1.59	<i>B3GNT5</i>	UDP-GlcNAc:betaGal 3-N-acetylglucosaminyltransferase 5 beta-1

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 18 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (up-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
+ 2.93	- 1.65	<i>S100A2</i>	S100 calcium binding protein A2
+ 2.91	+ 1.27	<i>COL1A1</i>	Collagen type I alpha 1
+ 2.90	+ 2.47	<i>SEMA3E</i>	Sema domain immunoglobulin domain (Ig) short basic domain secreted (semaphorin) 3E
+ 2.90	+ 2.10	<i>WDR63</i>	WD repeat domain 63
+ 2.84	- 2.03	<i>ITGB1BP3</i>	Integrin beta 1 binding protein 3
+ 2.82	+ 1.54	<i>GAL3ST4</i>	Galactose-3-O-sulfotransferase 4
+ 2.80	+ 1.51	<i>SDF2L1</i>	Stromal cell-derived factor 2-like 1
+ 2.78	+ 1.58	<i>TNFSF15</i>	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily member 15
+ 2.75	+ 2.64	<i>ALCAM</i>	Activated leukocyte cell adhesion molecule
+ 2.73	+ 1.24	<i>MET</i>	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
+ 2.64	+ 1.14	<i>LUM</i>	Lumican
+ 2.62	+ 1.88	<i>NMBR</i>	Neuromedin B receptor
+ 2.61	+ 1.98	<i>CFH</i>	Complement factor H
+ 2.60	+ 2.26	<i>OSRF</i>	Osmosis responsive factor
+ 2.59	+ 1.69	<i>S100A4</i>	S100 calcium binding protein A4 (calcium protein calvasculin metastasin murine placental homolog)
+ 2.58	- 1.67	<i>IRX1</i>	Iroquois homeobox protein 1
+ 2.51	+ 2.36	<i>PYGL</i>	Phosphorylase glycogen; liver (Hers disease glycogen storage disease type VI)
+ 2.48	+ 1.60	<i>CFHL1</i>	Complement factor H-related 1
+ 2.43	+ 1.61	<i>ZNF597</i>	Zinc finger protein 597
+ 2.42	+ 1.85	<i>ZDHHC13</i>	Zinc finger DHHC domain containing 13
+ 2.39	+ 1.70	<i>TMEM4</i>	Transmembrane protein 4
+ 2.39	+ 3.39	<i>XKRX</i>	X Kell blood group precursor-related X-linked
+ 2.37	+ 1.35	<i>WNT5A</i>	Wingless-type MMTV integration site family member 5A
+ 2.36	+ 1.61	<i>MMP23B</i>	Matrix metalloproteinase 23B

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 18 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (up-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
+ 2.36	+ 2.87	<i>LPL</i>	Macaca mulatta lipoprotein lipase
+ 2.36	+ 4.85	<i>KLKB1</i>	Macaca mulatta plasma kallikrein B1
+ 2.35	+ 1.92	<i>NSUN6</i>	NOL1/NOP2/Sun domain family member 6
+ 2.35	+ 1.56	<i>COPI</i>	CARD only protein
+ 2.33	+ 2.76	<i>APRG1</i>	AP20 region protein
+ 2.26	+ 1.83	<i>ERO1LB</i>	ERO1-like beta ( <i>S. cerevisiae</i> )
+ 2.26	+ 2.16	<i>PRSS16</i>	Protease serine 16 (thymus)
+ 2.25	+ 1.55	<i>NFE2L3</i>	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3
+ 2.24	+ 2.04	<i>SHQ1</i>	SHQ1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )
+ 2.20	+ 1.71	<i>CPNE2</i>	Copine II
+ 2.19	+ 1.80	<i>TNFSF15</i>	Synovial sarcoma X breakpoint 4
+ 2.17	+ 1.61	<i>CLIC2</i>	Chloride intracellular channel 2
+ 2.16	+ 5.59	<i>KLKB1</i>	Kallikrein B plasma (Fletcher factor) 1
+ 2.12	+ 2.07	<i>NR4A2</i>	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 2
+ 2.11	+ 2.03	<i>PRLR</i>	Prolactin receptor
+ 2.11	+ 1.67	<i>TCTE1L</i>	T-complex-associated-testis-expressed 1-like
+ 2.10	+ 1.95	<i>NAP1L2</i>	Nucleosome assembly protein 1-like 2
+ 2.10	+ 2.98	<i>LILRP2</i>	Leukocyte immunoglobulin-like receptor pseudogene 2
+ 2.08	+ 3.13	<i>ST8SIA1</i>	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2 8-sialyltransferase 1
+ 2.07	- 1.53	<i>TGFBI</i>	Transforming growth factor beta-induced 68kDa
+ 2.06	+ 1.62	<i>PLK2</i>	Polo-like kinase 2 ( <i>Drosophila</i> )
+ 2.05	+ 2.01	<i>TFCP2L1</i>	Transcription factor CP2-like 1
+ 2.04	+ 2.28	<i>C4BPB</i>	Complement component 4 binding protein beta
+ 2.03	+ 2.14	<i>C10orf79</i>	Chromosome 10 open reading frame 79
+ 2.02	+ 1.54	<i>NFYA</i>	Nuclear transcription factor Y alpha
+ 2.02	+ 2.07	<i>FSHPRH1</i>	FSH primary response (LRPR1 homolog rat) 1
+ 2.02	+ 1.53	<i>GFPT1</i>	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 18 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (up-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
+ 2.00	+ 1.74	<i>LOC127540</i>	HMG2 like
+ 1.97	+ 1.68	<i>ECRG4</i>	Esophageal cancer related gene 4 protein
+ 1.97	+ 1.60	<i>RAD9B</i>	RAD9 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )
+ 1.97	+ 1.74	<i>GUCY1A3</i>	Guanylate cyclase 1 soluble alpha 3
+ 1.95	+ 1.94	<i>SLCO1A2</i>	Solute carrier organic anion transporter family member 1A2
+ 1.94	+ 1.79	<i>DDX53</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 53
+ 1.93	+ 2.18	<i>GPR126</i>	G protein-coupled receptor 126
+ 1.93	+ 1.80	<i>RNF125</i>	Ring finger protein 125
+ 1.89	+ 1.90	<i>STS</i>	Steroid sulfatase (microsomal) arylsulfatase C isozyme S
+ 1.87	+ 1.20	<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A 72kDa gelatinase 72kDa type IV collagenase)
+ 1.86	+ 1.61	<i>SLC24A1</i>	Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger) member 1
+ 1.85	+ 1.75	<i>TALDO1</i>	Transaldolase 1
+ 1.84	+ 2.19	<i>CDH2</i>	Cadherin 2 type 1 N-cadherin (neuronal)
+ 1.82	- 1.56	<i>KCNK1</i>	Potassium channel subfamily K member 1
+ 1.81	+ 1.53	<i>HIST2H2BE</i>	Histone 2 H2be
+ 1.75	+ 1.83	<i>IFI16</i>	Interferon gamma-inducible protein 16
+ 1.73	+ 1.58	<i>ADD3</i>	Adducin 3 (gamma)
+ 1.71	+ 1.56	<i>FLJ90650</i>	Laeverin
+ 1.71	+ 1.95	<i>WDR31</i>	WD repeat domain 31
+ 1.69	+ 1.62	<i>SMC5L1</i>	SMC5 structural maintenance of chromosomes 5-like 1 (yeast)
+ 1.66	+ 1.53	<i>EXT2</i>	Exostoses (multiple) 2
+ 1.64	+ 1.86	<i>CDW92</i>	CDW92 antigen
+ 1.64	+ 6.91	<i>TTBK1</i>	Tau tubulin kinase 1
+ 1.64	+ 1.54	<i>CGI-90</i>	CGI-90 protein

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)



**Table 18 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (up-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
+ 1.63	+ 1.70	<i>ANXA3</i>	Annexin A3
+ 1.62	+ 1.92	<i>STXBP5</i>	Syntaxin binding protein 5 (tomosyn)
+ 1.61	- 1.62	<i>CDC42EPI</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1
+ 1.60	+ 1.58	<i>C6orf146</i>	Chromosome 6 open reading frame 146
+ 1.58	+ 2.20	<i>HRH1</i>	Histamine receptor H1
+ 1.57	+ 1.55	<i>SH3BP5</i>	SH3-domain binding protein 5 (BTK-associated)
+ 1.55	- 1.60	<i>CGI-37</i>	Comparative gene identification transcript 37
+ 1.54	+ 2.00	<i>RDX</i>	Radixin
+ 1.53	+ 3.54	<i>LOC81691</i>	Exonuclease NEF-sp
+ 1.53	+ 1.65	<i>C21orf119</i>	Chromosome 21 open reading frame 119
+ 1.53	- 2.15	<i>ALDH1B1</i>	Aldehyde dehydrogenase 1 family member B1
+ 1.53	- 2.38	<i>ALDH3B2</i>	aldehyde dehydrogenase 3 family member B2
+ 1.51	- 1.89	<i>BAG2</i>	BCL2-associated athanogene 2

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19**

List of differentially expressed genes in the prostate (down-regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 25.67	+ 1.53	<i>GFER</i>	Growth factor augments of liver regeneration (ERV1 homolog <i>S. cerevisiae</i> )
- 10.62	- 1.79	<i>TFF3</i>	Trefoil factor 3 (intestinal)
- 9.01	+ 1.94	<i>NPTXR</i>	Neuronal pentraxin receptor
- 8.13	+ 2.89	<i>SPTBN1</i>	Spectrin beta non-erythrocytic 1
- 8.07	+ 3.34	<i>OR10A3</i>	Olfactory receptor family 10 subfamily A member 3
- 8.05	+ 2.20	<i>LOC51236</i>	Brain protein 16
- 8.04	- 2.05	<i>PENK</i>	Proenkephalin
- 7.58	+ 1.81	<i>DOC2A</i>	Double C2-like domains alpha
- 6.70	- 2.20	<i>POTE2</i>	Protein expressed in prostate ovary testis and placenta 2
- 6.15	- 2.89	<i>ATP2B3</i>	ATPase Ca <sup>++</sup> transporting plasma membrane 3
- 6.01	- 2.79	<i>NTS</i>	Neurotensin
- 5.22	+ 2.31	<i>CABP1</i>	Calcium binding protein 1 (calbrain)
- 4.67	+ 2.05	<i>B3GAT3</i>	Beta-1 3-glucuronyltransferase (glucuronosyltransferase I) 3
- 4.54	- 1.64	<i>MID1</i>	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)
- 4.51	+ 1.98	<i>TESSP2</i>	Testis serine protease 2
- 4.30	+ 1.61	<i>TSPAN102</i>	Tetraspanin 10
- 3.93	+ 1.56	<i>BMP1</i>	Bone morphogenetic protein 1
- 3.38	+ 1.70	<i>IRX4</i>	Yippee-like 3 ( <i>Drosophila</i> )
- 3.29	- 1.51	<i>FOXC1</i>	Forkhead box C1
- 3.28	+ 1.78	<i>CALML5</i>	Calmodulin-like 5
- 3.25	+ 1.58	<i>FLJ32416</i>	Homolog of mouse skeletal muscle sarcoplasmic reticulum protein JP-45
- 3.23	+ 2.80	<i>NNMT</i>	Nicotinamide N-methyltransferase
- 3.21	- 1.63	<i>GAL3ST3</i>	Galactose-3-O-sulfotransferase 3
- 3.20	+ 1.50	<i>SRD5A1</i>	Steroid-5-alpha-reductase alpha polypeptide 1 (3-oxo-5 alpha-steroid delta 4-dehydrogenase alpha 1)
- 3.17	- 1.78	<i>PAMCI</i>	Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase COOH-terminal interactor

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 3.16	+ 1.61	<i>SOX14</i>	SRY (sex determining region Y)-box 14
- 3.13	+ 2.57	<i>ZBTB16</i>	Zinc finger and BTB domain containing 16
- 3.13	+ 1.56	<i>IL13</i>	Interleukin 13
- 3.09	+ 2.01	<i>PCSK4</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 4
- 3.04	+ 2.07	<i>HCAP-G</i>	Chromosome condensation protein G
- 3.03	+ 1.70	<i>OPRL1</i>	Opiate receptor-like 1
- 3.02	- 1.73	<i>DRF1</i>	Dbf4-related factor 1
- 3.01	+ 1.66	<i>ITIH3</i>	Inter-alpha (globulin) inhibitor H3
- 2.97	+ 1.53	<i>FLJ14871</i>	Coronin actin binding protein 6
- 2.96	+ 3.32	<i>NPHP1</i>	Nephronophthisis 1 (juvenile)
- 2.93	+ 2.05	<i>FIGN</i>	Fidgetin
- 2.91	+ 1.53	<i>BARHL1</i>	BarH-like 1 (Drosophila)
- 2.85	+ 2.27	<i>PPP4C</i>	Protein phosphatase 4 (formerly X) catalytic subunit
- 2.82	+ 1.86	<i>CAMK2B</i>	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II beta
- 2.76	+ 1.96	<i>KLK3</i>	Kallikrein 3 (prostate specific antigen)
- 2.65	- 2.33	<i>SHANK2</i>	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2
- 2.63	+ 2.19	<i>CPT1A</i>	Carnitine palmitoyltransferase 1A (liver)
- 2.59	+ 1.51	<i>CTEN</i>	C-terminal tensin-like
- 2.58	+ 1.58	<i>ZNF195</i>	Zinc finger protein 195
- 2.57	+ 1.56	<i>MICAL-L2</i>	MICAL-like 2
- 2.55	+ 1.70	<i>C19orf33</i>	Chromosome 19 open reading frame 33
- 2.53	+ 1.90	<i>CLTCL1</i>	Clathrin heavy polypeptide-like 1
- 2.52	- 2.41	<i>KCNF1</i>	Potassium voltage-gated channel subfamily F member 1
- 2.47	- 2.85	<i>APLN</i>	Apelin AGTRL1 ligand
- 2.47	- 1.58	<i>SGTA</i>	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat (TPR)-containing alpha

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 2.47	- 2.96	<i>GDF5</i>	Growth differentiation factor 5 (cartilage-derived morphogenetic protein-1)
- 2.46	+ 1.57	<i>SEZ6L2</i>	Seizure related 6 homolog (mouse)-like 2
- 2.44	+ 1.84	<i>PRMT7</i>	Protein arginine N-methyltransferase 7
- 2.43	+ 1.60	<i>WIRE</i>	WIRE protein
- 2.43	- 1.88	<i>SUOX</i>	Sulfite oxidase
- 2.42	+ 1.70	<i>TRPV6</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 6
- 2.41	+ 3.16	<i>RIPK1</i>	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1
- 2.41	+ 1.57	<i>MMP28</i>	Matrix metalloproteinase 28
- 2.40	+ 2.06	<i>FAAH</i>	Fatty acid amide hydrolase
- 2.35	- 1.66	<i>LOC161931</i>	Testis nuclear RNA-binding protein-like
- 2.35	- 1.08	<i>PRDM5</i>	PR domain containing 5
- 2.32	+ 1.67	<i>GLRA2</i>	Glycine receptor alpha 2
- 2.32	+ 2.39	<i>ZNF192</i>	Zinc finger protein 192
- 2.30	- 1.57	<i>CBX6</i>	Chromobox homolog 6
- 2.29	+ 1.55	<i>GGT1</i>	Gamma-glutamyltransferase 1
- 2.24	+ 1.90	<i>SULT4A1</i>	Sulfotransferase family 4A member 1
- 2.23	+ 1.52	<i>CRYBB1</i>	Crystallin beta B1
- 2.23	+ 1.54	<i>GJA3</i>	Gap junction protein alpha 3 46kDa (connexin 46)
- 2.22	+ 1.60	<i>GGTL4</i>	Gamma-glutamyltransferase-like 4
- 2.22	- 1.88	<i>GRWD1</i>	Glutamate-rich WD repeat containing 1
- 2.18	- 1.51	<i>XAB2</i>	XPA binding protein 2
- 2.18	+ 1.66	<i>ZNF297</i>	Zinc finger protein 297
- 2.18	- 2.49	<i>GPR88</i>	G-protein coupled receptor 88
- 2.16	+ 2.10	<i>LIM2</i>	Lens intrinsic membrane protein 2 19kDa
- 2.16	+ 1.91	<i>C6orf32</i>	Chromosome 6 open reading frame 32
- 2.15	+ 2.82	<i>ZNF312</i>	Zinc finger protein 312
- 2.15	+ 2.01	<i>SYT13</i>	Synaptotagmin XIII

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 2.15	+ 1.71	<i>ACVR2B</i>	Activin A receptor type IIB
- 2.14	+ 2.60	<i>RGS13</i>	Regulator of G-protein signalling 13
- 2.14	+ 2.82	<i>ANGPTL3</i>	Angiopoietin-like 3
- 2.14	+ 2.78	<i>UNQ5830</i>	AILT5830
- 2.14	+ 2.66	<i>LOX</i>	Lysyl oxidase
- 2.14	+ 1.68	<i>PCDH11X</i>	Protocadherin 11 X-linked
- 2.11	- 1.62	<i>TTYH3</i>	Tweety homolog 3 (Drosophila)
- 2.09	+ 2.09	<i>ALPL</i>	Alkaline phosphatase liver/bone/kidney
- 2.07	- 1.61	<i>ARHGAP1</i>	Rho GTPase activating protein 1
- 2.06	+ 2.04	<i>ELMO3</i>	Engulfment and cell motility 3 (ced-12 homolog C. elegans)
- 2.06	+ 1.70	<i>GRM7</i>	Glutamate receptor metabotropic 7
- 2.05	+ 2.14	<i>GLIPR1</i>	GLI pathogenesis-related 1 (glioma)
- 2.01	- 1.91	<i>BFSP1</i>	Beaded filament structural protein 1 filensin
- 2.01	+ 1.59	<i>SPTBN2</i>	Spectrin beta non-erythrocytic 2
- 2.00	+ 1.82	<i>TRPM4</i>	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 4
- 1.99	+ 1.53	<i>NFX1</i>	Nuclear transcription factor X-box binding 1
- 1.99	+ 1.91	<i>AKAP8L</i>	A kinase (PRKA) anchor protein 8-like
- 1.97	- 1.53	<i>ARHGEF18</i>	Rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18
- 1.96	- 2.03	<i>RELB</i>	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)
- 1.96	- 1.59	<i>ESRRBL1</i>	Estrogen-related receptor beta like 1
- 1.95	- 2.50	<i>ADCYAPI</i>	Adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary)
- 1.95	- 1.72	<i>HIF3A</i>	Hypoxia inducible factor 3 alpha subunit
- 1.93	+ 2.85	<i>LOC51760</i>	B/K protein
- 1.93	+ 1.95	<i>GAS8</i>	Growth arrest-specific 8
- 1.93	- 1.52	<i>AK1</i>	Adenylate kinase 1

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 1.90	- 1.77	<i>EIF3S9</i>	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 9 eta 116kDa
- 1.90	+ 2.33	<i>C20orf151</i>	Chromosome 20 open reading frame 151
- 1.89	+ 1.56	<i>PIGQ</i>	Phosphatidylinositol glycan class Q
- 1.87	- 1.53	<i>UACA</i>	Uveal autoantigen with coiled-coil domains and ankyrin repeats
- 1.87	+ 1.54	<i>NOXA1</i>	NADPH oxidase activator 1
- 1.86	+ 1.94	<i>PRSS8</i>	Protease serine 8 (prostasin)
- 1.85	+ 1.77	<i>GGTLA4</i>	Gamma-glutamyltransferase-like activity 4
- 1.85	+ 1.59	<i>FDXR</i>	Ferredoxin reductase
- 1.85	- 1.68	<i>LETM1</i>	Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1
- 1.85	- 3.24	<i>MYOC</i>	Myocilin trabecular meshwork inducible glucocorticoid response
- 1.85	+ 2.59	<i>TTC21A</i>	Tetratricopeptide repeat domain 21A
- 1.85	+ 2.24	<i>C19orf18</i>	Chromosome 19 open reading frame 18
- 1.85	- 1.90	<i>ASCL1</i>	Achaete-scute complex-like 1 (Drosophila)
- 1.85	+ 1.69	<i>CAPN9</i>	Calpain 9
- 1.85	- 1.61	<i>MAP2K3</i>	Mitogen-activated protein kinase kinase 3
- 1.84	- 1.72	<i>KIAA0082</i>	KIAA0082
- 1.83	+ 2.08	<i>SIGIRR</i>	Single Ig IL-1R-related molecule
- 1.83	+ 1.53	<i>ABC1</i>	ATP-binding cassette sub-family A
- 1.83	- 1.87	<i>KLF16</i>	Kruppel-like factor 16
- 1.83	+ 1.51	<i>CARD14</i>	Caspase recruitment domain family member 14
- 1.81	+ 2.05	<i>NXF5</i>	Nuclear RNA export factor 5
- 1.81	+ 1.65	<i>TRMT1</i>	tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate) -methyltransferase 1
- 1.80	+ 1.88	<i>AGER</i>	Advanced glycosylation end product-specific receptor
- 1.79	- 2.71	<i>C21orf62</i>	Chromosome 21 open reading frame 62
- 1.77	+ 1.51	<i>FBXL4</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 4

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 1.76	+ 1.56	<i>ELK4</i>	ELK4 ETS-domain protein (SRF accessory protein 1)
- 1.75	+ 1.74	<i>KIAA1811</i>	KIAA1811 protein
- 1.75	+ 2.16	<i>AEGP</i>	Apical early endosomal glycoprotein precursor
- 1.75	+ 1.59	<i>PILRB</i>	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta
- 1.74	- 1.78	<i>LSAMP</i>	Limbic system-associated membrane protein
- 1.74	+ 2.19	<i>MYTIL</i>	Myelin transcription factor 1-like
- 1.72	+ 1.69	<i>C20orf81</i>	Chromosome 20 open reading frame 81
- 1.72	- 1.69	<i>TOMM34</i>	Translocase of outer mitochondrial membrane 34
- 1.71	+ 1.68	<i>MECT1</i>	Mucoepidermoid carcinoma translocated 1
- 1.70	+ 1.50	<i>LAMB2</i>	Laminin beta 2 (laminin S)
- 1.70	+ 1.56	<i>GABBR1</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor 1
- 1.70	+ 1.54	<i>HOXC9</i>	Homeo box C9
- 1.70	+ 2.23	<i>ABTB1</i>	Ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1
- 1.69	+ 1.63	<i>LOC553158</i>	PRR5-ARHGAP8 fusion
- 1.69	+ 1.91	<i>TGDS</i>	TDP-glucose 4 6-dehydratase
- 1.69	- 1.85	<i>RPS6KA2</i>	Ribosomal protein S6 kinase 90kDa polypeptide 2
- 1.67	+ 1.53	<i>GNS</i>	Glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase (Sanfilippo disease IIID)
- 1.67	+ 2.46	<i>TRIM9</i>	Tripartite motif-containing 9
- 1.66	- 1.56	<i>LLGL1</i>	Lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila)
- 1.66	+ 1.55	<i>AP1S1</i>	Adaptor-related protein complex 1 sigma 1 subunit
- 1.65	+ 1.72	<i>MSMB</i>	Microseminoprotein beta-
- 1.64	- 1.79	<i>KIAA0232</i>	KIAA0232 gene product
- 1.64	+ 1.50	<i>MIA</i>	Melanoma inhibitory activity
- 1.64	+ 3.36	<i>ILDRI</i>	Immunoglobulin-like domain containing receptor 1
- 1.62	+ 1.60	<i>SSB3</i>	SPRY domain-containing SOCS box protein SSB-3
- 1.62	- 1.85	<i>RAI17</i>	Retinoic acid induced 17
- 1.61	+ 1.51	<i>CPSF3L</i>	Cleavage and polyadenylation specific factor 3-like
- 1.60	+ 5.22	<i>NEGR1</i>	Neuronal growth regulator 1

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)

**Table 19 (continued)**

List of differentially expressed genes in the prostate (down -regulation), by microarray analysis

Fold change (300 ng/kg) <sup>a)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>b)</sup>	Symbol <sup>c)</sup>	Description <sup>d)</sup>
- 1.60	+ 1.88	<i>SNAPC4</i>	Small nuclear RNA activating complex polypeptide 4 190kDa
- 1.59	+ 1.54	<i>ILVBL</i>	IlvB (bacterial acetolactate synthase)-like
- 1.59	+ 2.11	<i>YPEL1</i>	Yippee-like 1 (Drosophila)
- 1.59	+ 1.69	<i>ACACB</i>	Acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
- 1.58	+ 1.78	<i>STAP2</i>	Signal-transducing adaptor protein-2
- 1.58	+ 1.85	<i>KCNMB3</i>	Potassium large conductance calcium-activated channel subfamily M beta member 3
- 1.57	+ 1.71	<i>SNIP</i>	SNAP25-interacting protein
- 1.57	+ 1.55	<i>NUDT18</i>	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 18
- 1.57	+ 1.74	<i>RTEL1</i>	Regulator of telomere elongation helicase 1
- 1.57	+ 1.75	<i>MGC52000</i>	CXYorf1-related protein
- 1.56	- 1.59	<i>WDR1</i>	WD repeat domain 1
- 1.55	+ 1.61	<i>HSCARG</i>	HSCARG protein
- 1.54	+ 1.79	<i>LIMR</i>	Lipocalin-interacting membrane receptor
- 1.54	- 2.01	<i>RHOQ</i>	Ras homolog gene family member Q
- 1.54	+ 1.73	<i>GABRG1</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor gamma 1
- 1.53	+ 1.58	<i>CDK10</i>	Cyclin-dependent kinase (CDC2-like) 10
- 1.53	+ 2.86	<i>CALML6</i>	Calmodulin-like 6
- 1.53	+ 2.71	<i>KIF12</i>	Kinesin family member 12
- 1.53	+ 1.59	<i>ZNF43</i>	Zinc finger protein 43 (HTF6)
- 1.52	- 1.87	<i>BHD</i>	Folliculin
- 1.52	+ 1.74	<i>GABRA2</i>	Gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor alpha 2
- 1.50	+ 1.50	<i>HS3ST3A1</i>	Heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

+: up-regulation, -: down-regulation

a) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

b) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

c) Symbol in LocusLink database

d) Description in Agilent Rhesus Macaque Gene Expression Microarrays (Agilent Technologies)



**Table 20**

**List of differentially expressed genes associated with histopathological changes in the prostate, by microarray analysis**

Category	Symbol <sup>a)</sup>	Accession <sup>b)</sup>	Fold change (30 ng/kg) <sup>c)</sup>	Fold change (300 ng/kg) <sup>d)</sup>	Reference
Fibrogenesis	<i>TGM4</i>	NM_003241	+ 2.05	+ 468.86	[95, 96]
	<i>GREM1</i>	NM_013372	+ 1.20	+ 9.57	[97]
	<i>COMP</i>	NM_000095	+ 1.05	+ 3.68	[98]
	<i>COL1A1</i>	NM_000088	+ 1.27	+ 2.91	[99-101]
	<i>LUM</i>	NM_002345	+ 1.14	+ 2.64	[102]
	<i>WNT5A</i>	NM_003392	+ 1.35	+ 2.37	[103]
	<i>TGFB1</i>	NM_000660	- 1.53	+ 2.07	[101, 104, 105]
Inflammatory response	<i>LIPG</i>	NM_006033	+ 2.05	+ 10.60	[106]
	<i>ANXA1</i>	NM_000700	+ 1.65	+ 4.20	[107]
	<i>TNFSF15</i>	NM_005118	+ 1.58	+ 2.78	[108]
Disruption of cell component	<i>ALCAM</i>	NM_001627	+ 2.64	+ 2.75	[109]
	<i>MMP2</i>	NM_004530	+ 1.20	+ 1.87	[100, 110, 111]
	<i>ARHGEF18</i>	NM_015318	- 1.53	- 1.97	[112]
Tumorigenesis	<i>MET</i>	NM_000245	+ 1.24	+ 2.73	[116]
	<i>PENK</i>	NM_006211	- 2.05	- 8.04	[117]
	<i>SRD5A1</i>	NM_001047	+ 1.50	- 3.20	[118]
	<i>PRDM5</i>	NM_018699	- 1.08	- 2.35	[119]
Antitumorigenesis	<i>APRG1</i>	NM_178342	+ 2.76	+ 2.33	[122]
	<i>ECRG4</i>	NM_032411	+ 1.68	+ 1.97	[123]
	<i>TFF3</i>	NM_003226	- 1.79	- 10.62	[124]
	<i>FOXC1</i>	NM_001453	- 1.51	- 3.29	[125]
	<i>RELB</i>	NM_006509	- 2.03	- 1.96	[126]

All selected genes showed statistically significant differences in the 300 ng/kg group ( $P < 0.05$ ).

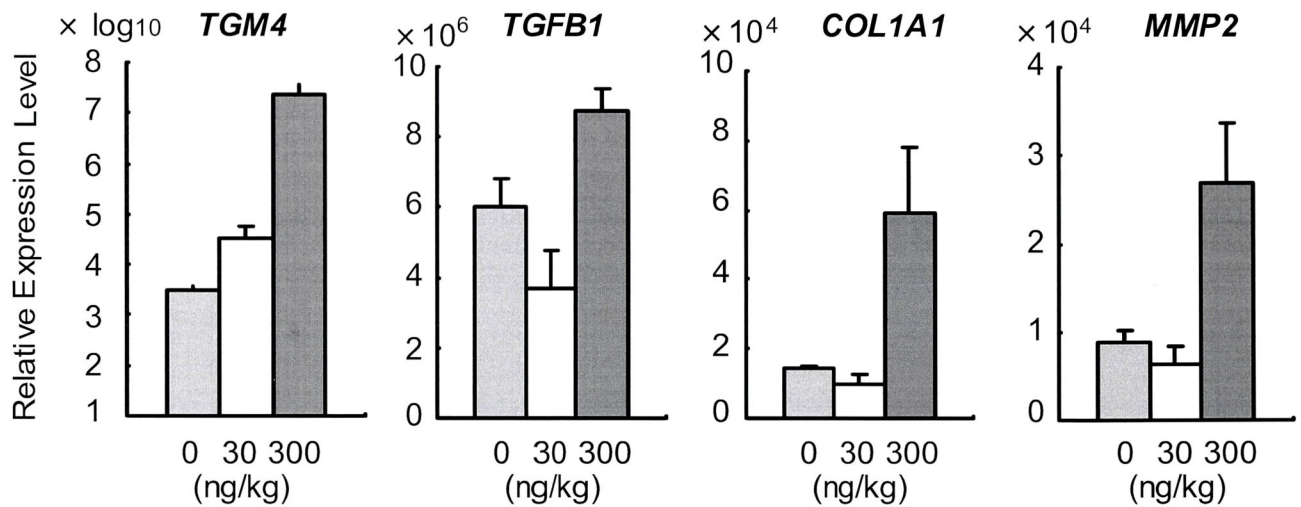
+: up-regulation, -: down-regulation

a) Symbol in LocusLink database

b) GeneBank accession number

c) Fold change, ratio of mean expression values (30 ng/kg group vs control group)

d) Fold change, ratio of mean expression values (300 ng/kg group vs control group)

**A****B**

<i>Symbol</i>	Fold change PCR	Fold change Microarray
<i>TGM4</i>	+ 7215.53	+ 468.86
<i>TGFB1</i>	+ 1.45	+ 2.07
<i>COL1A1</i>	+ 4.07	+ 2.91
<i>MMP2</i>	+ 3.08	+ 1.87

**Fig. 9.**

(A) Effects on relative mRNA expression levels in male offspring exposed to TCDD *in utero* and during lactation at dose levels of 0 (control), 30 and 300 ng/kg. Real-time quantitative PCR was conducted for 4 selected genes (*TGM4*, *TGFB1*, *COL1A1*, and *MMP2*) that showed differential expression in microarray analysis. Real-time quantitative PCR and data collection were performed using the ABI 7500 instrument and TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems, Foster City, USA). Quantitative values were normalized to 18S ribosomal RNA. Each bar represents the mean ± SE.

(B) The comparison of fold changes between Real-time quantitative PCR and microarray analysis in the selected genes. The fold changes in the 300 ng/kg group are described in each analysis. The expression patterns were similar between Real-time quantitative PCR and microarray analysis.

## 第5章

### 総合考察

本研究では、現行 TDI 算定の基礎となった 86 ng/kg の約 1/3 量および 3 倍量に相当する 30 並びに 300 ng/kg の濃度の TCDD を、アカゲザルの妊娠 20 日から分娩後 90 日に体内負荷量がほぼ一定となるように算出された条件で曝露させ、その次世代の出生前および出生後の発生に対する影響について検討した。TCDD 曝露を受けた母動物によって自然分娩および哺育された出生児は、性成熟に達した 7 歳の冬に剖検し、雄出生児の精液検査、ホルモン濃度の測定、精巣、精巣上体、前立腺、精囊の病理組織検査を行った。前立腺においては、DNA マイクロアレイ解析および Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの定量化により、その影響を詳細に検討した。

その結果、30 あるいは 300 ng/kg の TCDD を母動物の妊娠期間および哺育期間（妊娠 20 日～分娩後 90 日）に曝露させても、母動物の一般状態や哺育、授乳行動、体重推移、摂餌量並びに妊娠期間の長さに明らかな変化はみられなかった。流産、死産および児の生後死亡の頻度についても、対照群と TCDD 曝露群との間に明らかな差はみられなかったものの、妊娠 80 日の血漿中 TCDD 濃度が同群の他個体よりも高い曝露レベルを示した 300 ng/kg 群の 4 動物では、全例において妊娠後期の流産、死産あるいは出生後 1 ヶ月以内の死亡が引き起こされた。また、アカゲザルにおける TCDD 曝露と流産の増加については、いくつかの研究グループによって報告されている[69-71]。したがって、TCDD 曝露と流産、死産あるいは出生後間もない死亡については、何らかの因果関係の存在する可能性が示唆された。

出生児では、歯の形成異常[68]はみられたものの、性比、一般状態および食欲状態については、TCDD 曝露に起因すると考えられる異常はみられなかった。体重に関し

では、性成熟を迎える雄の生後3歳以降に、対照群と比較して約10%の体重増加抑制がみられたが、この原因については明らかにできなかった。出生児の生後7歳時点での剖検では、腎臓の白色巣が300 ng/kg 群の雄1例および雌2例で、肺の暗赤色巣および黄白色結節が雌1例でみられた。腎臓および肺の変化は母動物の剖検においてもみられており、血液学的検査におけるリンパ球数およびその比率の減少、血液生化学検査における肝機能パラメータの変動と合わせて、アカゲザルにおける TCDD 曝露に起因した特徴的变化と考えられた。一方、30 ng/kg 群では、特記すべき TCDD 曝露の影響は見出されなかった。以上のように、アカゲザルの胎生期および授乳期に30あるいは300 ng/kg の濃度の TCDD を曝露させた結果、出生児に体重増加抑制傾向(雄)、歯の形成異常、血液学的検査におけるリンパ球数の減少、肝機能障害を疑わせる血液生化学パラメータの変動、肺および腎臓の肉眼的異常所見などが300 ng/kg 群においてみられたが、出生児の生殖能および生殖器官への影響を評価する上で障害となるような毒性変化は見出されなかった。

アカゲザル出生児の精液検査では、300 ng/kg 群の総精子数が対照群と比較して約1/3に減少し、同群の精子濃度は対照群と比較して統計学的に有意に著しく減少した。これらの雄出生児における射出精子数の減少は、TCDD を妊娠15日のラットに単回投与したいくつかの実験においても報告されている[44, 45, 77]。さらに、イタリアのセベソでの工場爆発事故によって幼少期に TCDD 被爆を受けた男性住民においても、同様の射出精子濃度の減少が22年後の疫学調査において報告されている[90]。したがって、経胎盤あるいは幼少期 TCDD 曝露により、射出精子数および射出精子濃度の減少が引き起こされることは、間違いないと考えられた。さらに、アカゲザル出生児の精巣上体の病理組織的検査においても、精巣上体管内腔内の貯留精子数の有意な減少が30および300 ng/kg 群でみられ、これに伴い両群の精巣上体管は対照群と比較して

萎縮していた。一方、精巣に関しては、予想に反して TCDD 曝露の影響は小さかった。すなわち、300 ng/kg 群における射出総精子数は対照群の約 1/3 まで減少していたにもかかわらず、精巣重量、精細管短径および精細管中の精子細胞数の減少は、それぞれ対照群の 70, 89 および 77%であった。さらに、300 ng/kg 群ではごく軽度の精祖細胞および精母細胞数の減少がみられたものの、セルトリ細胞あたりのこれらの生殖細胞数比率については対照群との間に差はみられなかった。これらの変化は、興味深いことにラットにおける報告とも合致している[43-45, 78, 79, 91]。これらのことから、TCDD 曝露に伴う精巣あるいは精子形成に対する影響は、精巣上体精子数あるいは射出精子数に対する影響と比較すると弱く、その毒性学的重要度あるいは感受性は低いものと考えられた。

ラットでは、AGD 短縮が、母体への TCDD 曝露に起因する一つの感受性高い指標として挙げられており、その原因として母体あるいは出生児のアンドロゲン濃度の減少が考えられている[43, 44, 78, 91]。今回の実験では、300 ng/kg 群の雄出生児の出生時点での AGD は、対照群と比較して短縮傾向を示したものの、生後 3 歳時点では対照群と同程度まで回復した。また、陰茎長については差がみられず、その形態についても異常はなかった。さらに、今回の実験では血清中テストステロン濃度、精巣中のテストステロンおよび DHT 濃度について、TCDD 曝露群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。これらのことを総合的に考えると、TCDD をアカゲザルの胎生期および授乳期に曝露させても、その出生児では AGD および外生殖器の発達については全く影響を及ぼさないか、毒性学的に意義の無いレベルの影響しか及ぼさないものと考えられた。また、TCDD の精巣（精子形成）あるいは精液性状に対する影響も、アンドロゲン濃度の減少に起因するものとラットでは推察されているが[43-45, 78-79]、アカゲザルではその影響は顕著ではなく、他の可能性を示唆する結果と考え

られた。

精液検査では、他にも精子生存率および精子活動性が用量依存的に減少する傾向が示された。加えて、300 ng/kg 群ではいくつかの試行において評価可能な精液が採取できず、その頻度は対照群と比較して統計学的に有意に増加した。さらに、精液量および凝固物重量については、TCDD 曝露に伴って用量依存的に増加する傾向が示された。これらの所見は、TCDD 曝露に伴いアカゲザル出生児の副生殖器、前立腺および精嚢に何らかの影響がもたらされている可能性を示唆するものと考え、次に、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の前立腺および精嚢に対する影響について着目した。前立腺の病理組織的検査では、30 および 300 ng/kg 群において用量に依存した腺組織の減少および間質組織の増大が対照群と比較してみられた。さらには、限局的な変化ではあったものの、炎症性細胞浸潤および腺上皮細胞の崩壊が、7 歳のアカゲザル出生児においてみられた。これらの事実は、炎症反応および腺組織の崩壊を伴った繊維化が、TCDD 曝露から 7 年経ったアカゲザル出生児において現在進行形で起こっていたことを示唆するものと考えられた。しかし、アカゲザルにおける TCDD 半減期は約 1 年[67]であると考えられており、アカゲザル出生児に残留した TCDD が進行中の前立腺の繊維化に寄与したとは考えにくい。さらに、その残留した TCDD がアンドロゲン濃度の減少を引き起こして前立腺へ影響した可能性は極めて低い。したがって、胎生期および授乳期 TCDD 曝露によって被った影響が 7 年後まで残存し、それがエピジェネティックな影響として生後 7 歳のアカゲザル出生児に及んだものと推察した。

前立腺の DNA マイクロアレイ解析では、繊維化に関連する遺伝子 (*TGM4*, *GREM1*, *COMP*, *COL1A1*, *LUM*, *WNT5A* および *TGFBI*) [95-105], 炎症反応に関連する遺伝子 (*LIPG*, *ANXA1* および *TNFSF15*) [106-108], 並びに細胞構成要素の崩壊

に関連する遺伝子 (*ALCAM*, *MMP2* および *ARHGEF18*) [100, 109-112]の発現変動が 300 ng/kg 群において確認され、*TGM4*, *TGFBI*, *COL1A1* および *MMP2* の発現上昇は、Real-time PCR においても確認された。これらの mRNA 発現レベルの変動は前立腺における病理組織変化と合致し、7 歳においても進行中の変化であるとする今回の推察を補強した。繊維化は細胞あるいは組織損傷からの回復および治癒反応として知られている。サイトカインの誘導によって起こる繊維芽細胞の凝集と増殖は、損傷を受けた組織を修復するためにコラーゲン原繊維を産生する[104, 105]。トランスグルタミナーゼは、ペプチド結合の不可逆的な架橋結合を触媒する能力を持ち[95]、ECM の安定化に寄与している[96]。また、トランスグルタミナーゼは、最も有力な繊維形成誘導性のサイトカインである *TGFBI* の活性化を通じて、直接的に繊維化進行の役割を担っている[104]。TCDD 曝露を受けた 300 ng/kg 群のアカゲザル出生児の前立腺においても *TGM4* および *TGFBI* の発現上昇がみられたため、これらの遺伝子変動が前立腺の繊維化に重要な役割を果たしたものと考えられた。また正常な組織では、ECM 成分の産生と分解のバランスが維持されている。ECM 成分の主要な成分は繊維芽細胞によって産生される I 型コラーゲン (*COL1A1*) であるが[104]、MMP は ECM 成分の分解に関与している物質として知られており、繊維化の進行は *COL1A1* と *MMP2* の不均衡によって引き起こされると考えられている[99-101, 110, 111]。さらに、繊維化では、特徴的な I 型コラーゲンの過剰な産生が起こり、それは *MMP2* の活性化を伴っていることが知られている[99-101, 110, 111]。これらを総合的に考えると、*COL1A1* と *MMP2* の不均衡および *MMP2* の活性化が TCDD 曝露を受けたアカゲザル出生児の前立腺で起き、それらが繊維化が進行しやすい状況を作り出したと考えられた。

著しい *TGM4* の発現上昇が、300 ng/kg 群の DNA マイクロアレイ解析および

Real-time PCR においてみられた。この酵素は、交尾後に形成される膣栓においてタンパク質架橋形成を担っているとされており[113]、膣内での精子輸送にも関連している[95]。生後 6 歳で実施した精液検査では、精液量および凝固物重量の用量依存的な増加がみられた。また、精囊では用量依存的な精囊重量の増加、分泌物の過剰貯留を示唆するような内腔の拡張がみられた。したがって、著しい *TGM4* の発現上昇および精囊における変化は、精液の凝固物質過剰形成および精液成分の変性に関連し、前立腺の腺組織崩壊および繊維化とも相乗して、アカゲザル出生児の精子生存率および精子活動性の用量依存的減少にも関与したものと推察した。

当初、TCDD の胎生期および授乳期曝露によってアカゲザル出生児の前立腺に上皮-間葉転換 (EMT) [114, 115]のような状況が起こっている可能性を考えた。そこで、上皮細胞の変化について、細胞間接着の減弱を疑い、カドヘリンやインテグリンの DNA マイクロアレイ結果に着目したが、それらの発現減少はみられなかった。さらに、*CDH1* および *INTG46* について、Real-time PCR を用いて mRNA レベルを確認したが、DNA マイクロアレイと同様に発現減少はみられなかった。これらは、上皮細胞の崩壊および炎症性細胞浸潤などの上皮における劇的な変化は、7 歳のアカゲザル出生児ではすでに限局的な変化であり、広範な領域が間質細胞に置き換わっていたためと推察した。また、DNA マイクロアレイ解析では、ガン化に関連する可能性がある 4 つの遺伝子の発現変動 (*MET* の up-reguration, *PENK*, *SRD5A1* および *PRDM5* の down-reguration) [116-119]がみられた。EMT はガン細胞の浸潤時に起こる現象である [114, 115]ことから、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた前立腺においてガンあるいはガン化が起こっている可能性を危惧したが、病理組織的にはガン細胞の存在は確認されず、前立腺ガンのマーカーである PSA の本体であるカリクレイン 3 遺伝子[120, 121]の発現レベルの上昇もみられなかったことから、前立腺ガンの可能性は



否定された。さらには、今回の DNA マイクロアレイの結果からは、ガンの抑制と関連する 5 つの遺伝子の発現変動 (*APRG1* および *ECRG4* の up-reguration, *TFF3*, *FOXC1* および *RELB* の down -reguration) [122-126] もみられた。これらを総合的に考えると、胎生期および授乳期に TCDD 曝露を受けた 7 歳のアカゲザル出生児において、ガンが誘導されやすい環境が示唆されたが、生理学的小および分子生物学的な拮抗作用が働き、繊維化を通じて前立腺の安定が保たれたものと推察した。しかし、前立腺の繊維化によって、前立腺の機能障害が生じていた可能性が高い。TCDD 曝露によってもたらされた前立腺の機能障害は、精囊における変化とも相乗して、次世代アカゲザルの精液性状悪化（射出精子数の減少、精子生存率および精子活動性の低下）に寄与した可能性が示唆された。

以上のように、300 ng/kg 群では TCDD 曝露の影響により、雄出生児の体重増加抑制傾向、歯の形成異常、血液学的検査におけるリンパ球数の減少、肝機能障害を疑わせる血液生化学パラメータの変動、肺および腎臓の肉眼的異常所見、射出および精巢上体管内貯留精子数の減少、精子生存率および精子活動性の減少傾向、前立腺における炎症反応並びに腺組織の崩壊を伴った繊維化などの数々の変化を引き起こした。一方、30 ng/kg 群ではそれらの変化はみられないか、みられたとしても 300 ng/kg 群と比較すると軽微な変化であった。これらのことから、TCDD 胎生期および授乳期曝露に伴うアカゲザル出生児の影響については、30 ng/kg と 300 ng/kg との間に閾値があり、それは現行の日本における TDI[63]算出の基となった LOAEL 値、86 ng/kg に近似しているものと考えられた。また、今回の実験の結果からは、現行の TDI は妥当な数値であると考えられた。

## 第 6 章

### 要約

現行 TDI 算定の基礎となった 86 ng/kg の約 1/3 量および 3 倍量に相当する 30 並びに 300 ng/kg の濃度の TCDD を、アカゲザルの妊娠 20 日から分娩後 90 日に体内負荷量がほぼ一定となるように算出された条件で曝露させ、その次世代の出生前および出生後の発生に対する影響を検討した。TCDD 曝露を受けた母動物によって自然分娩および哺育された出生児は、性成熟に達した 7 歳の冬に剖検し、雄出生児の精液検査、ホルモン濃度の測定、精巣、精巣上体、前立腺、精囊の病理組織検査を行った。前立腺においては、DNA マイクロアレイ解析および Real-time PCR を用いた mRNA 発現レベルの定量化により、その影響を詳細に検討した。

以下の知見が得られた。

1. 30 あるいは 300 ng/kg の TCDD を母動物の妊娠期間および哺育期間（妊娠 20 日～分娩後 90 日）に曝露させても、母動物の一般状態や哺育、授乳行動、体重推移、摂餌量並びに妊娠期間の長さに明らかな変化はみられなかった。
2. 流産、死産および児の生後死亡の頻度については、対照群と TCDD 曝露群との間に明らかな差はみられなかったが、妊娠中の血漿中 TCDD 濃度が高かった動物では、それらの間に因果関係の存在する可能性が示唆された。
3. 出生児の性比、一般状態および食欲状態については、TCDD 曝露に起因すると考えられる異常はみられなかった。しかし、300 ng/kg 群の雄出生児では、性成熟を迎える生後 3 歳以降に体重増加の抑制傾向がみられ、他にも歯の形成異常、リンパ球数の減少、血液生化学検査における肝機能パラメータの変動、腎臓並びに肺の肉眼的異常所見（腎臓の白色巣、肺の結節など）がみられた。

4. 精液検査では、300 ng/kg 群の総精子数が対照群と比較して約 1/3 に減少し、同群の精子濃度は対照群と比較して著しく減少した。これらの雄出生児における射出精子数の減少は、ラットの実験およびイタリアのセブソでの工場爆発事故後（22年）の疫学調査結果とも一致した。
5. 300 ng/kg 群では、精巣上体管腔内の貯留精子数の有意な減少およびこれに伴う精巣上体管の萎縮がみられたが、精巣重量、精細管短径、セルトリ細胞あたりの精祖細胞数、精母細胞数並びに精子細胞数比率についてはその影響は軽度であった。精巣あるいは精子形成に対する影響は、精巣上体精子あるいは射出精子数に対する影響と比較すると、毒性学的な重要度およびその感受性ともに低いものと判断された。
6. 雄出生児の肛門-生殖器間距離、外生殖器の発達に関しては、TCDD 曝露群と対照群との間に明らかな差は認められなかった。血清および精巣中アンドロゲン濃度についても同様であり、TCDD 曝露に伴う精子数の減少はアンドロゲン依存性ではないと考えられた。
7. 前立腺の病理組織学的検査では、30 および 300 ng/kg 群において用量に依存した腺組織の減少および間質組織の増大がみられた。これらの実体は炎症細胞浸潤および腺組織の崩壊を伴った繊維化であり、それらは TCDD 曝露から 7 年経ったアカゲザル出生児において現在進行形で起こっていたことが示唆された。
8. 前立腺の DNA マイクロアレイ解析では、繊維化に関連する遺伝子 (*TGM4*, *GREM1*, *COMP*, *COL1A1*, *LUM*, *WNT5A* および *TGFBI*) や、炎症反応に関連する遺伝子 (*LIPG*, *ANXA1* および *TNFSF15*) , 並びに細胞構成要素の崩壊に関連する遺伝子 (*ALCAM*, *MMP2* および *ARHGEF18*) の発現変動が 300 ng/kg 群において確認され、*TGM4*, *TGFBI*, *COL1A1* 並びに *MMP2* の発現上昇は Real-time

PCRにおいても確認された。

9. 精嚢では、用量依存的な精嚢重量の増加と分泌物の過剰貯留を示唆するような内腔の拡張がみられた。著しい *TGM4* の発現上昇および精嚢における変化は、精液の凝固物質の過剰形成および精液成分の変性に関連し、前立腺の腺組織の崩壊および繊維化に起因する前立腺の機能障害とも相乗し、アカゲザル出生児の射出精子数の減少、精子生存率並びに精子活動性の減少に関与したものと推察された。
10. 30 ng/kg 群では射出および精巣上体管内貯留精子数の減少、精子生存率および精子活動性の減少傾向、前立腺における炎症反応並びに腺組織の崩壊を伴った繊維化などの 300 ng/kg 群でみられた数々の雄性生殖器の毒性変化はみられないか、みられたとしても 300 ng/kg 群と比較すると軽度であった。これらのことから、TCDD の胎生期および授乳期曝露に伴うアカゲザル出生児の影響については、30 ng/kg と 300 ng/kg との間に閾値があり、それは現行の日本における TDI 算出の基となった LOAEL 値、86 ng/kg に近似していると考えられた。

## Summary

TCDD was injected to pregnant rhesus monkey females on Day 20 of gestation at an initial dose of 30 or 300 ng/kg, the low dose set at one-third of the LOAEL body burden of TCDD for rodents (86 ng/kg) and the high dose at about three times the LOAEL. Additional doses of TCDD at 1.5 ng/kg or 15 ng/kg (i.e. 5% of initial dose) were administered by injection every 30 days during the gestation and lactation periods until day 90 after delivery, to maintain the desired body burden. The effects of TCDD on second generation pre- and postnatal development were investigated. The offspring were delivered naturally and nursed by TCDD-exposed dams, raised until the age of sexual maturity, and were necropsied at the age of 7 years. The reproductive ability of the male offspring was evaluated by semen analysis, hormone level assay, and histopathology of the testes, epididymides, prostate, and seminal vesicles. A molecular biology approach (microarray analysis and real-time quantitative PCR) was adopted for characterization of the prostate gland.

The following data were obtained.

1. Gestational and lactational exposure of pregnant rhesus monkeys to TCDD (from Day 20 of gestation until Day 90 after delivery) at dose levels of 30 and 300 ng/kg had no clear effect on general maternal condition, nursing behavior, body weight, food consumption or gestational length.
2. There were no clear differences in the incidences of abortion, stillbirth or postnatal death of offspring between the control group and the TCDD exposure groups; however, a causal relationship between gestational TCDD exposure levels in dams and fetal/postnatal loss is a possibility.
3. There were no TCDD-related differences in sex ratio at birth, clinical signs, or appetite condition in the offspring. However, in the 300 ng/kg group, body weight from the age of 3 years (close to reaching sexual maturity) was suppressed by approximately 10%

when compared with the control group. Furthermore, dental abnormalities, a decrease in the number of lymphocytes, changes in serum biochemistry landmarks for hepatic function, and gross abnormalities in the kidneys (white focus) and lungs (nodes) were observed in the offspring in the 300 ng/kg group.

4. Semen analysis revealed that the total sperm count in the 300 ng/kg group was reduced by approximately one-third that in the control group, and sperm concentration in this group was significantly reduced when compared with the control group. Reductions in ejaculated sperm numbers in male offspring are consistent with results from rats and the results of an epidemiological survey of adult male residents of Seveso, Italy, following accidental exposure to TCDD in infancy (22 years previously).
5. In the 300 ng/kg group, the ductus epididymis in the male offspring was clearly smaller than in the control group, in conjunction with a decrease in reserved sperm number in the cavity of the ductus epididymis; however effects on paired testis weight, diameter of the seminiferous tubules, and spermatogonia, spermatocyte and spermatid per Sertoli cell ratios were slight. Accordingly, TCDD-induced effects on the testes and spermatogenesis are judged to be of lesser magnitude and sensitivity than the changes in epididymal and ejaculated sperm numbers.
6. There were no differences in AGD or external genital development in the male offspring between the control group and TCDD exposure groups. Circulatory and intra-testicular androgen levels in the TCDD exposure groups were also comparable to those in the control group. Taken together, it was considered that the reduction in sperm count following *in utero* and lactational TCDD exposure were not caused by decreasing androgen levels in the male offspring.
7. Histopathological examination of the prostate revealed a dose-dependent decrease in the number of glands, and a dose-dependent increase in interstitial tissue in the 30 and 300 ng/kg groups. Notably, inflammatory cell infiltration and disruption of the glandular

epithelium were also observed in offspring, 7 years after final transplacental and lactational TCDD exposure. These results indicated fibrosis in the prostate accompanied by inflammatory responses and disruption of the glands, which were considered to be ongoing changes.

8. Differential mRNA expressions associated with fibrosis (*TGM4*, *GREM1*, *COMP*, *COL1A1*, *LUM*, *WNT5A* and *TGFBI*), inflammatory response (*LIPG*, *ANXA1* and *TNFSF15*) and disruption of cell component (*ALCAM*, *MMP2* and *ARHGEF18*) were demonstrated by microarray analysis, and up-regulation of *TGM4*, *TGFBI*, *COL1A1* and *MMP2* was confirmed with real-time PCR.
9. In the seminal vesicle, a dose-dependent increase in weight and dilatation of the lumen indicating secretion retention were noted. It was inferred that marked expression of *TGM4* in the prostate and changes in the seminal vesicle correlated to excess production of coagulum substance and alteration of semen composition. In addition to alteration of semen composition, prostatic dysfunction by TCDD exposure induced by disruption of the prostatic glands and fibrosis may have been involved in decreases in sperm count, sperm viability and sperm activity in the TCDD-exposed rhesus monkey offspring.
10. At 30 ng/kg, decreases in ejaculated and epidermal sperm number, sperm viability, sperm activity, and fibrosis in the prostate, accompanied by inflammatory responses and disruption of glands of the prostate noted in the male rhesus monkey offspring in the 300 ng/kg group were either not induced or were of lesser magnitude. Therefore, it is considered that the effect of *in utero* and lactational TCDD exposure on male reproductive ability has a threshold somewhere between 30 and 300 ng/kg and is probably in the order of 86 ng/kg, the value set as the current TDI in Japan:

## 謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜りました宮崎大学農学部獣医臨床繁殖学講座の上村俊一教授に深甚の謝意を表します。

1999年からの長期にわたる研究に際して、ご指導、ご鞭撻を頂きました共同研究者である広島大学名誉教授の安田峯生博士、東京大学大学院総合文化研究科生命環境科学系の久保田俊一郎教授、広島国際大学保健医療学部診療放射線学科の隅田 寛教授、帝京大学医学部病理学教室の福里利夫教授、株式会社新日本科学の伊原敏夫博士および大島洋次郎博士に謝意を表します。

最後に、本研究の動物の飼育管理、投与、採血、測定をはじめとする実験全般において、多大なるご協力、ご支援を頂戴しました株式会社新日本科学の各位に心から御礼申し上げます。特に、統計解析および帳票作成において協力を頂いた株式会社新日本科学の井上歩美さん、病理形態計測、DNA マイクロアレイ解析、Real-time PCR および文献検索において多大な協力をいただいた加藤寛人君には、あらためて感謝いたします。



## 引用文献

- [1] Geyer H, Scheunert I, Korte F. Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. Regul Toxicol Pharmacol 1986;6:313-47.
- [2] Birnbaum LS, Couture LA. Disposition of octachlorodibenzo-*p*-dioxin (OCDD) in male rats. Toxicol Appl Pharmacol 1988;93:22-30.
- [3] Vinopal JH, Casida JE. Metabolic stability of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*P*-dioxin in mammalian liver microsomal systems and in living mice. Arch Environ Contam Toxicol 1973;1:122-32.
- [4] Nelson JO, Menzer RE, Kearney PC, Pimmer JR. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: in vitro binding to rat liver microsomes. Bull Environ Contam Toxicol 1977;18:9-13.
- [5] Olson JR, Gasiewicz TA, Neal RA. Tissue distribution, excretion, and metabolism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the Golden Syrian hamster. Toxicol Appl Pharmacol 1980;56:78-85.
- [6] Poiger H, Buser HR, Weber H, Zweifel U, Schlatter C. Structure elucidation of mammalian TCDD-metabolites. Experientia 1982;38:484-6.
- [7] Olson JR. Metabolism and disposition of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in guinea pigs. Toxicol Appl Pharmacol 1986;85:263-73.
- [8] Piper WN, Rose JQ, Gehring PJ. Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat. Environ Health Perspect 1973;5:241-4.
- [9] Michalek JE, Pirkle JL, Caudill SP, Tripathi RC, Patterson DG Jr, Needham LL. Pharmacokinetics of TCDD in veterans of Operation Ranch Hand: 10-year follow-up. J Toxicol Environ Health 1996;47:209-20. Erratum in: J Toxicol Environ Health 1997;52:557-8.
- [10] Piper WN, Rose JQ, Gehring PJ. Excretion and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorobenzo-*p*-dioxin in the rat. Environ Health Perspect 1973;5:241-4.
- [11] Fries GF, Marrow GS. Retention and excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

- by rats. J Agric Food Chem 1975;23:265-9.
- [12]Schechter A, Startin J, Wright C, Papke O, Ball M, Lis A. Concentrations of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in human placental and fetal tissues from the U.S. and in placentas from Yu-Cheng exposed mothers. Chemosphere 1996;32:551-7.
- [13]Furst P, Kruger C, Meemken HA, Groebel W. PCDD and PCDF levels in human milk-dependence on the period of lactation. Chemosphere 1989;18:439-44.
- [14]McGregor DB, Partensky C, Wilbourn J, Rice JM. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis. Environ Health Perspect 1998;106 Suppl 2:755-60.
- [15]May G. Chloracne from the accidental production of tetrachlorodibenzodioxin. Br J Ind Med 1973;30:276-83.
- [16]May G. Tetrachlorodibenzodioxin: a survey of subjects ten years after exposure. Br J Ind Med 1973;39:128-35.
- [17]Moses M, Lilis R, Crow KD, Thornton J, Fischbein A, Anderson HA, *et al.* Health status of workers with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the manufacture of 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid: comparison of findings with and without chloracne. Am J Ind Med 1984;5:161-82.
- [18]Moses M, Prioleau PG. Cutaneous histologic findings in chemical workers with and without chloracne with past exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. J Am Acad Dermatol 1985;12:497-506.
- [19]Bond GG, McLaren EA, Brenner FE, Cook RR. Incidence of chloracne among chemical workers potentially exposed to chlorinated dioxins. J Occup Med 1989;31:771-4.
- [20]Ott MG, Messerer P, Zober A. Assessment of past occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin using blood lipid analyses. Int Arch Occup Environ

- Health 1993;65:1-8.
- [21]Manz A, Berger J, Dwyer JH, Flesch-Janys D, Nagel S, Waltsgott H. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 1991;338:959-64.
- [22]Kogevinas M, Kauppinen T, Winkelmann R, Becher H, Bertazzi PA, Bueno-de-Mesquita HB, *et al.* Soft tissue sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins: two nested case-control studies. *Epidemiology* 1995;6:396-402.
- [23]Kogevinas M, Becher H, Benn T, Bertazzi PA, Boffetta P, Bueno-de-Mesquita HB, *et al.* Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol* 1997;145:1061-75.
- [24]Becher H, Flesch-Janys D, Kauppinen T, Kogevinas M, Steindorf K, Manz A, *et al.* Cancer mortality in German male workers exposed to phenoxy herbicides and dioxins. *Cancer Causes Control* 1996;7:312-21.
- [25]Hooiveld M, Heederik DJ, Kogevinas M, Boffetta P, Needham LL, Patterson DG Jr, *et al.* Second follow-up of a Dutch cohort occupationally exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and contaminants. *Am J Epidemiol* 1998;147:891-901.
- [26]Reggiani G. Acute human exposure to TCDD in Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health* 1980;6:27-43.
- [27]Caramaschi F, del Corno G, Favaretti C, Giambelluca SE, Montesarchio E, Fara GM. Chloracne following environmental contamination by TCDD in Seveso, Italy. *Int J Epidemiol* 1981;10:135-43.
- [28]Mocarelli P, Needham LL, Marocchi A, Patterson DG Jr, Brambilla P, Gerthoux PM, Meazza L, Carreri V. Serum concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health* 1991;32:357-66.

- [29] Bertazzi PA, Zocchetti C, Pesatori AC, Guercilena S, Sanarico M, Radice L. Ten-year mortality study of the population involved in the Seveso incident in 1976. *Am J Epidemiol* 1989;129:1187-200.
- [30] Bertazzi PA, Bernucci I, Brambilla G, Consonni D, Pesatori AC. The Seveso studies on early and long-term effects of dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect* 1998;106 Suppl 2:625-33.
- [31] Mocarelli P, Brambilla P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Needham LL. Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* 1996;348:409.
- [32] Nagayama J, Kuratsune M, Masuda Y. Determination of chlorinated dibenzofurans in kanechlors and "yusho oil". *Bull Environ Contam Toxicol* 1976;15:9-13.
- [33] Ryan JJ, Hsu CC, Boyle MJ, Guo YL. Blood serum levels of PCDFs and PCBs in Yu-Cheng children peri-natally exposed to a toxic rice oil. *Chemosphere* 1994;29:1263-78.
- [34] Lan SJ, Yen YY, Ko YC, Chen ER. Growth and development of permanent teeth germ of transplacental Yu-Cheng babies in Taiwan. *Bull Environ Contam Toxicol* 1989;42:931-4.
- [35] Kociba RJ, Keyes DG, Beyer JE, Carreon RM, Wade CE, Dittenber DA, *et al.* Results of a two-year chronic toxicity and oncogenicity study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;46:279-303.
- [36] National Toxicology Program. Carcinogenesis Bioassay of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (CAS No. 1746-01-6) in Osborne-Mendel Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Study). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* 1982;209:1-195.
- [37] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polychlorinated Dibenzo-Para-Dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans. Lyon, France, 4-11 February 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1997;69:1-631.
- [38] Murray FJ, Smith FA, Nitschke KD, Humiston CG, Kociba RJ, Schwetz BA.

- Three-generation reproduction study of rats given 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in the diet. *Toxicol Appl Pharmacol* 1979;50:241-52.
- [39] Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL. Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1993;21:433-441.
- [40] 厚生省：平成9年度厚生科学研究事業 子宮内膜症等に及ぼすダイオキシンの評価に関する研究
- [41] Mably TA, Moore RW, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects on androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;114:97-107.
- [42] Mably TA, Moore RW, Goy RW, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 2. Effects on sexual behavior and the regulation of luteinizing hormone secretion in adulthood.
- [43] Mably TA, Bjerke DL, Moore RW, Gendron-Fitzpatrick A, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of male rats to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 3. Effects on spermatogenesis and reproductive capability. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;114:118-126.
- [44] Gray LE Jr, Kelce WR, Monosson E, Ostby JS, Birnbaum LS. Exposure to TCDD during development permanently alters reproductive function in male Long Evans rats and hamsters: reduced ejaculated and epididymal sperm numbers and sex accessory gland weights in offspring with normal androgenic status. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;131:108-18.
- [45] Gray LE, Ostby JS, Kelce WR. A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;146:11-20.
- [46] Bjerke DL, Sommer RJ, Moore RW, Peterson RE. Effects of *in utero* and lactational

- 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on responsiveness of the male rat reproductive system to testosterone stimulation in adulthood. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;127:250-7.
- [47] Gray LE, Wolf C, Mann P, Ostby JS. *In utero* exposure to low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters reproductive development of female Long Evans hooded rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997;146:237-44.
- [48] Courtney KD, Moore JA. Teratology studies with 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1971;20:396-403.
- [49] Couture LA, Harris MW, Birnbaum LS. Characterization of the peak period of sensitivity for the induction of hydronephrosis in C57BL/6N mice following exposure to 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 1990;15:142-50.
- [50] Okey AB, Riddick DS, Harper PA. Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:226-32.
- [51] Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140:173-9.
- [52] Mimura J, Yamashita K, Nakamura K, Morita M, Takagi TN, Nakao K, *et al.* Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* 1997;2:645-54.
- [53] Lin TM, Rasmussen NT, Peterson RE. Effects of aryl hydrocarbon receptor null mutation and in utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on prostate and seminal vesicle development in C57BL/6 mice. *Toxicol Sci* 2002;68:479-87.
- [54] Hoffman EC, Reyes H, Chu FF, Sander F, Conley LH, Brooks BA, *et al.* Cloning of a factor required for activity of the Ah (dioxin) receptor. *Science* 1991;252:954-8.

- [55] Burbach KM, Poland A, Bradfield CA. Cloning of the Ah-receptor cDNA reveals a distinctive ligand-activated transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:8185-9.
- [56] Fujisawa-Sehara A, Yamane M, Fujii-Kuriyama Y. A DNA-binding factor specific for xenobiotic responsive elements of P-450c gene exists as a cryptic form in cytoplasm: its possible translocation to nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85:5859-63.
- [57] White TE, Gasiewicz TA. The human estrogen receptor structural gene contains a DNA sequence that binds activated mouse and human Ah receptors: a possible mechanism of estrogen receptor regulation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;193:956-62.
- [58] Krishnan V, Porter W, Santostefano M, Wang X, Safe S. Molecular mechanism of inhibition of estrogen-induced cathepsin D gene expression by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in MCF-7 cells. *Mol Cell Biol* 1995;15:6710-9.
- [59] Safe S, Astroff B, Harris M, Zacharewski T, Dickerson R, Romkes M, *et al.* 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds as antioestrogens: characterization and mechanism of action. *Pharmacol Toxicol* 1991;69:400-9.
- [60] Matsumura F. How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals? *Biochem Pharmacol* 1994;48:215-24.
- [61] Peattie DA, Harding MW, Fleming MA, DeCenzo MT, Lippke JA, Livingston DJ, *et al.* Expression and characterization of human FKBP52, an immunophilin that associates with the 90-kDa heat shock protein and is a component of steroid receptor complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:10974-8.
- [62] Alnemri ES, Fernandes-Alnemri T, Nelki DS, Dudley K, DuBois GC, Litwack G. Overexpression, characterization, and purification of a recombinant mouse immunophilin FKBP-52 and identification of an associated phosphoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*

1993;90:6839-43.

- [63]Environmental Health Committee of the Central Environment Council, Living Environment Council and Food Sanitation Investigation Council. Memorandum on tolerable daily intake (TDI) of dioxin and related compounds (Japan). Tokyo: Environmental Agency and Ministry of Health and Welfare, Japan;1999.
- [64]McConnell EE, Moore JA, Dalgard DW. Toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following a single oral dose. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978;43:175-87.
- [65]Tofilon PJ, Piper WN. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated depression of rat testicular heme synthesis and microsomal cytochrome P-450. *Biochem Pharmacol* 1982; 31:3663-6.
- [66]Chahoud I, Krowke R, Schimmel A, Merker HJ, Neubert D. Reproductive toxicity and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. 1. Effects of high doses on the fertility of male rats. *Arch Toxicol* 1989; 63:432-9.
- [67]Bowman RE, Schantz SL, Weerasinghe NCA, Gross ML, Barsotti DA. Chronic dietary intake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) at 5 or 25 parts per trillion in the monkey: TCDD kinetics and dose-effect estimate of reproductive toxicity. *Chemosphere* 1989;18:243-52.
- [68]Yasuda I, Yasuda M, Sumida H, Tsusaki H, Arima A, Ihara T, *et al.* *In utero* and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) affects tooth development in rhesus monkeys. *Reprod Toxicol* 2005;20:21-30.
- [69]Allen JR, Barsotti DA, Van Miller JP, Abrahamson LJ, Lalich JJ. Morphological changes in monkeys consuming a diet containing low levels of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Food Cosmet Toxicol* 1977;15:401-10.
- [70]Allen JR, Barsotti DA, Lambrecht LK, Van Miller JP. Reproductive effects of halogenated aromatic hydrocarbons on nonhuman primates. *Ann N Y Acad Sci*



- 1979;320:419-25.
- [71] Barsotti DA, Abrahamson LJ, Allen JR. Hormonal alterations in female rhesus monkeys fed a diet containing 2, 3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Bull Environ Contam Toxicol 1979;21:463-9.
- [72] Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ 1992;305:609-13.
- [73] Sharpe RM, Skakkebaek NE. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 1993;341:1392-5.
- [74] Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. N Engl J Med 1995;332:281-5.
- [75] MENCHINI-FABRIS F, ROSSI P, PALEGO P, SIMI S, TURCHI P. Declining sperm counts in Italy during the past 20 years. Andrologia 1996;28:304.
- [76] Swan SH, Brazil C, Drobnis EZ, Liu F, Kruse RL, Hatch M, *et al.* Geographic differences in semen quality of fertile U.S. males. Environ Health Perspect 2003;111:414-20.
- [77] Sommer RJ, Ippolito DL, Peterson RE. *In utero* and lactational exposure of the male Holtzman rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: decreased epididymal and ejaculated sperm numbers without alterations in sperm transit rate. Toxicol Appl Pharmacol 1996;140:146-53.
- [78] Wilker C, Johnson L, Safe S. Effects of developmental exposure to indole-3-carbinol or 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on reproductive potential of male rat offspring. Toxicol Appl Pharmacol 1996;141:68-75.
- [79] Faqi AS, Dalsenter PR, Merker HJ, Chahoud I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. Toxicol Appl Pharmacol 1998;150:383-92.

- [80]Ohsako S, Miyabara Y, Sakaue M, Ishimura R, Kakeyama M, Izumi H, *et al.* Developmental stage-specific effects of perinatal 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure on reproductive organs of male rat offspring. *Toxicol Sci* 2002;66:283-92.
- [81]Allen JR, Carstens LA. Light and electron microscopic observations in *Macaca mulatta* monkeys fed toxic fat. *Am J Vet Res* 1967;28:1513-26.
- [82]Valerio DA, Ellis EB, Clark ML, Thompson GE. Collection of semen from Macaques by electroejaculation. *Lab Anim Care* 1969;19:250-2.
- [83]Valerio DA, Leverage WE, Munster JH. Semen evaluation in Macaques. *Lab Anim Care* 1970;20:726-33.
- [84]Clermont Y, Leblond CP. Differentiation and renewal of spermatogonia in the monkey, *Macacus rhesus*. *Am J Anat* 1959;104:237-73.
- [85]Clermont Y. Two classes of spermatogonial stem cells in the monkey (*Cercopithecus aethiops*). *Am J Anat* 1969;126:57-71.
- [86]Dreef HC, Van Esch E, De Rijk EP. Spermatogenesis in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*): a practical guide for routine morphological staging. *Toxicol Pathol* 2007; 35:395-404.
- [87]O'Donnell L, Narula A, Balourdos G, Gu YQ, Wreford NG, Robertson DM, *et al.* Impairment of spermatogonial development and spermiation after testosterone-induced gonadotropin suppression in adult monkeys (*Macaca fascicularis*). *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:1814-22.
- [88]Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:283-335.
- [89]Birnbaum LS. Endocrine effects of prenatal exposure to PCBs, dioxins, and other xenobiotics: implications for policy and future research. *Environ Health Perspect* 1994;102:676-9.

- [90]Mocarelli P, Gerthoux PM, Patterson DG Jr, Milani S, Limonta G, Bertona M, *et al.* Dioxin exposure, from infancy through puberty, produces endocrine disruption and affects human semen quality. *Environ Health Perspect* 2008;116:70-7.
- [91]Ohsako S, Miyabara Y, Nishimura N, Kurosawa S, Sakaue M, Ishimura R, *et al.* Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5alpha-reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci* 2001;60:132-43.
- [92]Korenaga T, Fukusato T, Ohta M, Asaoka K, Murata N, Arima A, *et al.* Long-term effects of subcutaneously injected 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the liver of rhesus monkeys. *Chemosphere* 2007;67:S399-404.
- [93]Roman BL, Sommer RJ, Shinomiya K, Peterson RE. In utero and lactational exposure of the male rat to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: impaired prostate growth and development without inhibited androgen production. *Toxicol Appl Pharmacol* 1995;134:241-50.
- [94]Fritz WA, Lin TM, Moore RW, Cooke PS, Peterson RE. In utero and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure: effects on the prostate and its response to castration in senescent C57BL/6J mice. *Toxicol Sci* 2005;86:387-95.
- [95]Dubbink HJ, de Waal L, van Haperen R, Verkaik NS, Trapman J, Romijn JC. The human prostate-specific transglutaminase gene (TGM4): genomic organization, tissue-specific expression, and promoter characterization. *Genomics* 1998;51:434-44.
- [96]Strnad P, Omary MB. Transglutaminase cross-links Sp1-mediated transcription to ethanol-induced liver injury. *Gastroenterology* 2009;136:1502-5.
- [97]Carvajal G, Droguett A, Burgos ME, Aros C, Ardiles L, Flores C, *et al.* Gremlin: a novel mediator of epithelial mesenchymal transition and fibrosis in chronic allograft nephropathy. *Transplant Proc* 2008;40:734-9.

- [98] Halász K, Kassner A, Mörgelin M, Heinegård D. COMP acts as a catalyst in collagen fibrillogenesis. *J Biol Chem* 2007;282:31166-73.
- [99] Karsenty G, Park RW. Regulation of type I collagen genes expression. *Int Rev Immunol* 1995;12:177-85.
- [100] Théret N, Lehti K, Musso O, Clément B. MMP2 activation by collagen I and concanavalin A in cultured human hepatic stellate cells. *Hepatology* 1999;30:462-8.
- [101] Cutroneo KR, White SL, Phan SH, Ehrlich HP. Therapies for bleomycin induced lung fibrosis through regulation of TGF-beta1 induced collagen gene expression. *J Cell Physiol* 2007;211:585-9.
- [102] Charlton M, Viker K, Krishnan A, Sanderson S, Veldt B, Kaalsbeek AJ, *et al.* Differential expression of lumican and fatty acid binding protein-1: new insights into the histologic spectrum of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2009;49:1375-84.
- [103] Vuga LJ, Ben-Yehudah A, Kovkarova-Naumovski E, Oriss T, Gibson KF, Feghali-Bostwick C, *et al.* WNT5A is a Regulator of Fibroblast Proliferation and Resistance to Apoptosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2009;41:583-9.
- [104] Leask A. TGF $\beta$ , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovasc Res* 2007;74:207-12.
- [105] Mehta JL, Attramadal H. The TGFbeta superfamily in cardiovascular biology. *Cardiovasc Res* 2007;74:181-3.
- [106] Broedl UC, Jin W, Rader DJ. Endothelial lipase: a modulator of lipoprotein metabolism upregulated by inflammation. *Trends Cardiovasc Med* 2004;14:202-6.
- [107] Babbin BA, Laukoetter MG, Nava P, Koch S, Lee WY, Capaldo CT, *et al.* Annexin A1 regulates intestinal mucosal injury, inflammation, and repair. *J Immunol* 2008;181:5035-44.
- [108] Michelsen KS, Thomas LS, Taylor KD, Yu QT, Mei L, Landers CJ, *et al.* IBD-associated TL1A gene (TNFSF15) haplotypes determine increased expression of

- TL1A protein. PLoS One 2009;4:e4719.
- [109] Lunter PC, van Kilsdonk JW, van Beek H, Cornelissen IM, Bergers M, Willems PH, *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM/CD166/MEMD), a novel actor in invasive growth, controls matrix metalloproteinase activity. *Cancer Res* 2005;65:8801-8.
- [110] Bornstein P, Kyriakides TR, Yang Z, Armstrong LC, Birk DE. Thrombospondin 2 modulates collagen fibrillogenesis and angiogenesis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2000;5:61-6.
- [111] Gasanov AG, Bershova TV. [The role of changes of matrix metalloproteinase in cardiovascular diseases] *Biomed Khim* 2009;55:155-68.
- [112] Otani T, Ichii T, Aono S, Takeichi M. Cdc42 GEF Tuba regulates the junctional configuration of simple epithelial cells. *J. Cell Biol* 2006;175:135-46.
- [113] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1-12.
- [114] Bates RC, Mercurio AM. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and colorectal cancer progression. *Cancer Biol Ther* 2005;4:365-70.
- [115] Williams-Ashman HG. Transglutaminases and the clotting of mammalian seminal fluids. *Mol Cell Biochem* 1984;58:51-61.
- [116] Gmyrek GA, Walburg M, Webb CP, Yu HM, You X, Vaughan ED, *et al.* Normal and malignant prostate epithelial cells differ in their response to hepatocyte growth factor/scatter factor. *Am J Pathol* 2001;159:579-90.
- [117] Goo YA, Goodlett DR, Pascal LE, Worthington KD, Vessella RL, True LD, *et al.* Stromal mesenchyme cell genes of the human prostate and bladder. *BMC Urol* 2005;5:17.
- [118] Luo J, Dunn TA, Ewing CM, Walsh PC, Isaacs WB. Decreased gene expression of

steroid 5 alpha-reductase 2 in human prostate cancer: implications for finasteride therapy of prostate carcinoma. *Prostate* 2003;57:134-9.

- [119] Meani N, Pezzimenti F, Deflorian G, Mione M, Alcalay M. The tumor suppressor PRDM5 regulates Wnt signaling at early stages of zebrafish development. *PLoS One* 2009;4:e4273.
- [120] Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17:159-63.
- [121] Mattsson JM, Laakkonen P, Stenman UH, Koistinen H. Antiangiogenic properties of prostate-specific antigen (PSA). *Scand J Clin Lab Invest* 2009;69:447-51.
- [122] Leris AC, Roberts TR, Jiang WG, Newbold RF, Mokbel K. Evidence for a tumour suppressive function of APRG1 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2005;93:97-100.
- [123] Li LW, Yu XY, Yang Y, Zhang CP, Guo LP, Lu SH. Expression of esophageal cancer related gene 4 (ECRG4), a novel tumor suppressor gene, in esophageal cancer and its inhibitory effect on the tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer* 2009;125:1505-13.
- [124] Garraway IP, Seligson D, Said J, Horvath S, Reiter RE. Trefoil factor 3 is overexpressed in human prostate cancer. *Prostate* 2004;61:209-14.
- [125] Van der Heul-Nieuwenhuijsen L, Dits NF, Jenster G. Gene expression of forkhead transcription factors in the normal and diseased human prostate. *BJU Int* 2009;103:1574-80.
- [126] Xu Y, Josson S, Fang F, Oberley TD, St Clair DK, Wan XS, *et al.* RelB enhances prostate cancer growth: implications for the role of the nuclear factor-kappaB alternative pathway in tumorigenicity. *Cancer Res* 2009;69:3267-71.