

別添2

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究 (H10-生活-016)

平成12年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 井上 達

平成13(2001)年4月

目次

I.	総括研究報告書	
	内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究 井上達	1
II.	分担研究報告書	
1.	初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 鈴木勝士	18
2.	マウス生殖腺の分化および精子、卵形性への内分泌かく乱化学物質の 影響に関する研究 井口泰泉	33
3.	内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 広川勝いく	41
4.	神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究 菅野純	52
5.	ポリグルタミン神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物 質の解析 垣塚彰	60
6.	ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明に関する研究 加藤茂明	69
7.	ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 に関する研究 藤本 成明	75
8.	ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索 笹野公伸	86
9.	[内分泌かく乱研究整備] 神経に対する内分泌かく乱化学物質研究 -cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析- 井上達	113
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	119

別添 4

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の人の健康への影響のメカニズム等に関する調査研究

主任研究者 井上 達 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部部长

研究要旨

本研究では、内分泌かく乱化学物質における影響メカニズムの可能性として指摘されている諸点のうち解明の困難が集中している、いわゆる“高次生命系”の挙動に焦点をあて、①内分泌系・②免疫系・③神経系などの高次生命系ネットワーク個々に対する影響について、発生・生殖面をはじめとした時間軸やメモリー機構などを考慮しつつ、それらの作用機転の可能性を明らかにしようとしている。それぞれ各要素間相互の連携を司るシグナル伝達系を解析する立場からさらに、④核内レセプターとその共役転写因子、⑤エストロゲン受容体とセカンドメッセンジャーの相互作用、⑥ステロイド代謝活性機構についても併せて検討を進めた。尚、近年、技術的に長足の進展の見られる cDNA マイクロアレイに注目してこれを導入することによって、そうした“技術”の側からも関与する遺伝子群の探索を進め、それらの発現を照合することによって重要性をもつと思われる要素の選別を並行して試みることにした。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属における職名（50 音順）

井口泰泉	岡崎国立共同研究機構・統合バイオサイエンスセンター教授
垣塚 彰	大阪バイオサイエンス研究所 部長
加藤茂明	東京大学分子細胞生物学研究所・分子生物部門 教授
菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 室長
笹野公伸	東北大学大学院・医学系研究科 教授
鈴木勝士	日本獣医畜産大学 教授
広川勝いく	東京医科歯科大学大学院・医学系研究科 教授
藤本成明	広島大学原爆放射能医学研究所 助教授

A. 研究目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物

質における、それらの作用の可能性の問題として指摘されてきた種々の事象の内、その主な問題点の中で解明の困難が集中

しているいわゆる“高次生命系”での挙動に焦点をあてる。すなわち①内分泌系・②免疫系・③神経系などの高次生命系ネットワークの個々に対する影響について、存り得る作用機転の可能性を検討することによって問題の本質を明らかにする。その際、高次系における特徴として知られるところの、発生・生殖面をはじめとした時間軸やメモリー機構などへの影響の可能性についても考慮を払って検討をおこなう。以上によって近い将来のリスク評価にかかわる知的基盤を整備しようとするものである。

確かに、より直接的な研究の“ニーズ”として内分泌かく乱化学物質の生物影響として危惧されている焦点のひとつにそれら生物の発生や生殖への影響を問う直接的課題がある。しかし、発生や生殖に関わる受容体・リガンド系や、これに連続するシグナル伝達機構、そしてそれらの制御メカニズムなどの諸機構は、今日、この領域を解明してゆく見通しが緒についたばかりのホットな領域に属している。僅か4年前のエストロゲン $\beta$ 受容体のクローニングによって、化学物質の生体影響評価が全く新しい局面を迎えたように、この課題では、ホットな科学の領域にある事を以て看過できない基礎研究への“目配り”が迫られている。本研究課題に対する行政サイドからのこうした面でのニーズの高いことも念頭におくものとする。内分泌かく乱化学物質問題が緊急性を帯び、可能な限り近い将来のリスク評価への展望を期待されつつもこれを

困難にしている主たる要因は、そうした受容体・リガンド系に端を発してシグナル伝達系を介して生体に影響する核内受容体シグナル制御と化学物質の相互作用に注目したメカニズム解析の方策の基本が確立されていないことに起因している。

核内受容体、細胞内シグナル伝達ネットワークを中心とした研究からなる本研究での“高次生命系”に焦点を絞ったアプローチは、以上のような戦略に基づいており、事実、米国環境防護庁の研究法策なども、機構研究部門については、当研究と同様の戦略へと収斂しつつある。

こうした研究の成果は、将来的なリスク評価戦略の基盤を形成するものとなることが期待される。

尚、以上のような解析的アプローチに対して、近年、技術的に長足の進展の見られる cDNA マイクロアレイに注目して、このものの導入による技術の側から、関与する発現遺伝子群を照合して、重要性をもつと思われる要素の選別を試みる取り組みを開始することとした。この方策によって、大量の発現遺伝子の解析を迅速に進め、総合的な遺伝子発現カスケードを解析することを意図している。さしあたり、内分泌かく乱化学物質(EDCs)に応答する遺伝子を機能別に整理し、EDC-トキシコゲノミクスとも云うべきデータベースを構築する課題を新しく設定している。

#### A. 補) 個々の課題のねらい

まず本研究の柱となる高次生命系につ

いては、これを構成する発生・生殖、免疫、神経の3つの部門についてそれぞれ2課題の分担者を設定して研究を進めている。

#### 1. 発生・生殖系については、

- ①発生影響観察系の樹立と、この系におけるビスフェノールA(BPA)の影響、
- ②低用量ジェチルスチルベストロール(DES)、ビスフェノールA(BPA)の影響
- ③BPAなどの血中移行問題について、

#### 2. 免疫系については、

- ①免疫系におけるエストロゲン受容体の発現、
- ②低用量DES混餌(0.1~1.0 $\mu$ g/3ヶ月)での免疫系への影響の検索、

#### 3. 神経系については、

- ①エストロゲン受容体の検出法の検討と胎生期暴露の胎児脳でのエストロゲン受容体発現の変化、
- ②ポリグルタミン神経毒性への修飾効果、及び
- ③神経系核内受容体PPAR $\gamma$ の新規コファクターの同定(PGC-2)と、このコファクターを介した新たな反応系としてのリガンド依存性の転写因子の活性化機構に関する研究

などのサブテーマを設定している。

次に以上と並行して、

#### 4. 核内リセプター系についての研究では、

- ①性ステロイドホルモン受容体の転写制御機構に関する共役因子の検索と同定、

- ②ショウジョウバエを用いた男性ホルモンレセプターの機能解析、並びに

- ③ステロイドホルモン受容体AP-1部位を介する転写活性化のエストロゲン受容体 $\alpha$ および $\beta$ の比較、

#### 5. ステロイド代謝活性化機構についての研究では、17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydro-genase (17 $\beta$ -HSD)のヒト消化管の吸収上皮での発現と、DES、genisteinによる17 $\beta$ -HSD酵素阻害作用について検討している。

以上の他、6. 文献収集評価、および班全体に関わる7. 研究整備などの対応を研究項目として設定している。

各課題についての研究方法は以下の通りである。

## B. 方法

### 1. 高次系ネットワーク：発生・生殖

#### 1. 1. 初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木勝士)

発生影響観察系の樹立とこの系におけるエストロゲン受容体の検出を目的として、50、500pg または 5ng/embryo のE1を鶏受精卵に投与し、48時間孵卵して鶏胚の発生状況につき対照と比較、胚盤葉下層の消失、胚の管様構造への変形、重複胚奇形、神経管形成の異常などの有無および胚発生の遅延(体節数低

下)を指標とした形態学的な検討を行った。また、2.5、5.0、および10.0  $\mu$ g/embryo のBPA(和光純薬、分析用標準品)をDMSOの助けで水溶液とし、E1の場合と同様に鶏胚に処置し、同様の形態学的観察を行った。

### 1.2. マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究(井口泰泉)

妊娠マウスとニホンザルを用いて、ビスフェノールA(BPA)の胎盤透過性を検討した。また、マウスの胎仔期に、合成エストロゲン(DES)及びBPAを投与し、低用量影響を検討した。

### 2. 内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究(広川勝いく)

C57BL/6マウス(♂/♀)3ヶ月齢、18ヶ月齢にDESを1.急性投与実験;高用量(15mg/kg)、低用量(3mg/kg)を腹腔内投与で1回x5日、2.慢性投与実験;比較的low用量を2用量(0.44  $\mu$ g/kg、4  $\mu$ g/kg)添加粉末飼料として3ヶ月間給餌、で投与した。これらについて、A)体重と臓器重量(胸腺、脾臓、肝、腎、精巣、卵巣、副腎)、B)フローサイトメトリー 胸腺(CD4/CD8)、脾臓(Thy-1/B220, CD4/CD8, ナイブ/メリー, NK/CD3)、C)リンパ球の増殖能 T細胞増殖能(anti-CD3MoAb, Con A), B細胞増殖能(LPS)、D)抗SRBC抗体産生能(PFC法)、E)NK細胞活性を検討した。また、胸腺・脾臓等の組織からone-step法にて、total RNAを調整し、RT-PCR法により各種ホ

ルモン受容体の発現の有無を検索した。

## 3. 高次系ネットワーク：神経

### 3.1. 神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響(菅野純)

C57BL/6妊娠マウスにDESを低用量連続皮下投与し、胎生18日に全脳を摘出した。total RNAを抽出し、同腹の胎児を雄雌別にプールし、RT反応により得られたcDNAをPCR反応に用いた。エストロゲンレセプター検出系としては、1)全スプラッシングバリエーション検出法と2)個別に各エクソン欠損したものを検出する個別プライマー法を用い、RT-PCRを行った。さらに、検出感度を上昇させるため、得られたPCR産物のサザンブロットングを行った。

### 3.2. 神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析(垣塚彰)

神経機能におよぼす内分泌ホルモン様物質及び内分泌攪乱化学物質の作用をポリグルタミンが引き起こす神経細胞死を指標に解析した。

また、PPAR $\gamma$ のコファクターとして同定されたPGC-1、PGC-2の転写活性化能と脂肪細胞の分化における役割に関して機能解析を行った。

## 4. 核内レセプター

### 4.1. 性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明(加藤茂明)

ショウジョウバエを用いた男性ホルモ

ンレセプターの機能解析のため、ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的に発現する系の構築を試みた。また、ホルモン活性を規定するレセプター共役因子を同定するため、酵母 two-hybrid 法を用いた cDNA スクリーニング、及び生化学的手法や、新たな転写共役因子結合体同定の試みして、HeLa 細胞核抽出液から複合体の精製を行なった。

#### 4. 2. ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本成明)

ヒト ER の発現ベクターを用いて、エストロゲン依存性 AP-1 応答系をモデル化し、エストロゲン及び内分泌かく乱物質の作用を検討した。また、ラット ER を介した応答をヒト ER の結果と比較するため、ラットの ER $\alpha$  及び  $\beta$  を発現ベクターに組み込み ERE 応答系、AP-1 応答系を再構成した。

### 5. ステロイド代謝活性機構

#### 5. 1. ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究

(笹野公伸)

男女双方の様々な年代を含む食道から直腸までの消化管においてこの 17 $\beta$ -HSD 2 の発現及び活性を総合的に検討し、ヒト成人におけるこの酵素の生物学的意義を検討した。また、ヒト胎児の消化管他の組織ならびに 17 $\beta$ -HSD 2 を transfection させた培養細胞で酵素活性に対して与える内分泌かく乱物質の影響

を検討した。

### 6. 文献収集評価

#### 6. 1. 内分泌かく乱化学物質に関する文献収集評価に関する研究 (総括班)

研究成果のデータベース化と、社会への還元を本学会議で得られた成果をモノグラフとして出版する事により具体化する。

### 7. 内分泌かく乱研究整備

#### 7. 1. 神経に対する内分泌かく乱化学物質研究-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析 (井上 達、他)

C57BL/6 妊娠マウスに DES を胎生 11 日目から 8 日間連続で 66  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を投与し、胎生 18 日目の胎児から脳全体を摘出し、total RNA を取得した。

得られた total RNA から mRNA を精製し、逆転写反応時に Cy3-dUTP または Cy5-dUTP を取り込ませ蛍光ラベルした cDNA を合成する。これを胎児で発現している遺伝子を載せた DNA チップに、処理、無処理由来サンプルを同時にハイブリダイゼーションし、結果を解析した。また、定量的 RT-PCR は ABI 社の PRISM7700 を用い、同社のプロトコールに従ってリアルタイムで PCR 増幅をモニターする方法にて行った。

## C. 研究結果

### 1. 発生・生殖系

#### 1. 1. 初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究 (鈴木勝士)

E1 投与による異常は(1) 胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成、(2) 体軸の分裂ないし重複奇形、(3) 神経管閉鎖不全および屈曲など、および(4) 体節形成遅延であった。(2)~(4)には用量相関が認められた。他の系で同様に ER を活性化する BPA について 2.5、5、および 10  $\mu\text{g}/5\mu\text{l}/\text{embryo}$  を E1 に準じて投与したところ、用量相関的に神経管尾部を主体とした E1 の(3)に類似する異常が認められた。

#### 1. 2. マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究 (井口泰泉)

ビスフェノール A (BPA) の胎盤透過性については、マウスでは投与 30 分、ニホンザルでは投与 1 時間で、胎仔の組織から BPA が検出された。マウスの胎仔期の DES 0.02、0.2、2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と BPA.20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の投与で膈開口が有意に早まった。胎仔マウスのミューラー管では部域特異的に Hoxa9、10、11、13 が発現するが、DES 投与により発現が変化した。

### 2. 免疫系

#### 2. 内分泌かく乱化学物質の免疫系に及ぼす影響に関する研究 (広川勝いく)

免疫系の各種の細胞に Estrogen 受容

体(ER $\alpha$ )が発現されていることが解った。DES を大量投与した急性実験、および長期間の微量投与のいずれにおいても胸腺を中心とした免疫系への影響が認められた。その影響は DES の用量、マウスの性と月齢により異なることが明らかになった。

### 3. 神経系

#### 3. 1. 神経幹細胞分化に及ぼす内分泌かく乱化学物質の影響 (菅野 純)

エクソン全長による全スプライシングバリエーション検出法では、アニーリング温度を最適化するため、グラジエント PCR 機を用いて、PCR southern blotting を行ったところ、各アニーリング温度でバンドのパターンがランダムになった。これらのバンドのシーケンスを検討した結果、すべて mER スプライシングバリエーションではなく、プライマー配列を含む PCR 副産物であった。以上の結果より、全スプライシングバリエーション検出法の構築は困難であると判断した。一方、機能ドメインとしてリガンド結合部位である mER  $\beta$  のエクソン 5 に着目し、検出感度を向上させるため PCR 産物のサザンブロットングを組み合わせ、PCR サイクル数 28 の mER  $\beta$ 2, del5 の半定量法を確立した。マウス胎生 11 日から 8 日間連続 DES 低用量 (0.02、0.2、2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) 投与した胎生 18 日のマウス雌全脳では、mER $\beta$  del5 のスプライシングバリエーションの発現は、無処理群に比べ、わずかに増加しているものが認めら



れた。また、mER  $\beta$ 2については、ばらつきがあるが、mER 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  で発現の上昇が認められた。

### 3. 2. 神経毒性のリスクファクターとしての内分泌かく乱物質の解析 (垣塚 彰)

植物等に含まれる内分泌様物質に神経変性を促進する可能性のあることが判明した。これらのものと構造的に類似する合成内分泌攪乱物質にも同様な増悪作用がある可能性が推測された。

ER と PPAR $\gamma$ 間で、共通するリガンドが存在し、クロストークが行われている可能性が推測された。

PPAR $\gamma$ のコファクターとして同定された PGC-1、PGC-2 は、単に PPAR $\gamma$ の活性を修飾するのではなく、それぞれが脂肪細胞の分化に特異的な作用をもち、褐色脂肪細胞、白色脂肪細胞の表現型の決定に重要な機能をもつことが判明した。

## 4. 核内レセプター

### 4. 1. 性ステロイドホルモンレセプターの転写制御機能の解明 (加藤茂明)

ショウジョウバエにヒト AR を組織特異的にリポーター遺伝子として GFP を発現する系の構築に成功した。また、160KDa の核内レセプター転写共役因子 (SRC-1/TIF2/AIB1) 群の C 末端に位置する転写促進活性化領域 (AD2) に相互作用する因子を MCF7 細胞 cDNA ライブラリーから検索し、p68 と極めて相同性の高い RNA ヘリケース p72 を単離

した。p72 は、ER $\alpha$ AF-1 に結合し、p68 を介して SRC-1/TIF-2 の AD2 に結合した。また p68/p72 は核内に局在しており、エストロゲン依存的に ER $\alpha$ 、TIF2 と核内に共存することがわかった。免疫沈降実験から、p68/p72 は、エストロゲン結合 ER $\alpha$ 、TIF2 ととも共沈した。更に、最近同定された RNA 転写共役因子 SRA と直接結合すること、SRA と p68/p72 は協調的に ER $\alpha$ の転写促進能を増強することを見出した。

### 4. 2. ステロイドホルモン受容体系における内分泌かく乱物質作用の検討 (藤本成明)

1) ヒト ER を介した AP-1 応答においては、ER $\alpha$ と $\beta$ は拮抗的に働いた。今まで報告のないラット ER を介したエストロゲン依存性 AP-1 応答系を再構築した結果、ラット ER $\beta$ ではヒト ER $\beta$ と異なりエストロゲンによる転写活性化がみられた。<sup>3</sup> また、この系で、エストロゲン様の内分泌かく乱物質の作用を検討したが、全て単純な弱いエストロゲン様物質として作用した。

## 5. ステロイド代謝活性機構

### 5. 1. ヒト組織における性ステロイド代謝酵素と受容体の検索に関する研究 (笹野公伸)

ヒト消化管では小腸を中心とする吸収上皮などの各組織で、エストラジオールをエストロンに転換する 17 $\beta$ -HSD2 の活性、発現が認められた。また、17 $\beta$ -HSD2

を transfection させた培養細胞ならびにこれらの酵素が存在している胎児の胎盤、小腸、肝臓組織を用いて 17 $\beta$ -HSD2 に対する阻害実験では、DES, genistein に阻害作用が認められた。

## 6. 文献収集・評価

### 6. 1. 内分泌かく乱化学物質に関する文献収集評価に関する研究（総括班）

本班研究によりもたらされた研究結果の集積を開始した。また、国際的データベースである、GEDRI (The Global Endocrine Disruptor Research Inventory) への登録を開始した。これと並行して、科学研究モノグラムの刊行の準備を開始し、その大綱を欧州の某出版社にて内部評価中である。

## 7. 内分泌かく乱研究整備

### 7. 1. 神経に対する内分泌かく乱化学物質研究-cDNA マイクロアレイによる発現遺伝子解析（井上 達、他）

DES 胎内暴露の胎児全脳において、1.5 倍以上発現が変動した遺伝子として、 $\alpha$ -globin,  $\beta$ -globin を始め、globin 様の未知遺伝子を含め多数の globin 類遺伝子が認められた。また、ハンチントン病の原因遺伝子である Huntingtin Disease 遺伝子産物にユビキチンを結合し、分解を促進する酵素である HIP2 (Huntingtin Interacting Protein 2) の発現も上昇した。

## D. 考 察

内分泌かく乱化学物質問題を内分泌ホルモン様化学物質の障害問題と呼ばず、かく乱問題と呼称している現在の認識の根底には、ホルモン様作用物質が直ちに障害につながるのかの如何を含む作用機構の本質への疑念がある。危惧の対象となっている事柄も、発育不全(遅滞・促進の双方への時間軸のズレが観察されている)、種々のアレルギー症候、知能発育の遅滞など、いずれも高次系機能の生理機能の解明とともに始めて明らかになる性質をもっている。これが定まった試験法の開発によって試験を行うのみでは本課題の解決が困難な一因である。本来ならばこうした学術に近接した部分は現段階で知り得ない認識として切り分けるのがこの種の研究課題を扱う上での常法であるが、この課題は、機構研究が行政研究施策上からも欠かすことの出来ない問題として取り上げられた。それは、遠くは DES や PCB で人類が得た経験、近くは、化学物質に対して反応性の異なる受容体サブタイプのシステムの発見など、科学の進展と求められる施策への導入とが、極めて近接している今日の科学に対する認識の点で、各国の行政と研究者の認識が共通した基盤に立っていることに基づいている。

以上の立場から各課題の結果を考察すると、

1. の発生・生殖系については、BPA について E1 に準じて投与したところ、神経管尾部を主体とした E1 の神経管閉

鎖不全および屈曲など、に類似する異常に用量相関が認められた。BPA についても E1 と同様な機序で異常が発生する可能性がある。さらに詳細な機序を解明するためには、初期胚のステージ、投与部位の特定に関してより厳密な規定を行って、異常のパターンについて再現性を高め、孵卵経過をたどって体軸決定、パターン形成に関わる遺伝子発現の攪乱を証拠づける必要がある。ヒトの曝露に相当する 2.4 µg/kg の約 10 倍の BPA で低用量影響を確認した。

2. の免疫系では、種々のパラメータが様々に変動して、評価が難しいこと、しかし比較的微量の DES でも慢性投与では、胸腺への影響が認められることが明らかにされている。

3. の神経系については、胎児期低用量 DES 暴露の胎児脳で、mERβ エクソン 5 のバリエント/ワイルド型比が変化することを示唆する結果を得た。今後、*in vitro* 神経細胞培養系を用い、神経幹細胞分化におけるスプライシングバリエントの機能を解析し、内分泌かく乱化学物質の神経系分化に及ぼす影響を検討することが必要である。他方、種々の化学物質がポリグルタミン(CAG)リピートの神経障害性を修飾する可能性に立脚したアイデアは注目されたが結果として、代表的な内分泌攪乱物質いずれの物質もポリグルタミンが引き起こす細胞死に対して、促進にも抑制にも効かなかった。一方、植物等に含まれる内分泌様物質や他の物質について同様のアッセイを行ったとこ

ろ、いくつかの物質で非常に高い濃度ではあるが細胞死を修飾する効果、特に細胞死促進作用が認められた。

4. 核内レセプターについては、同定した転写共役因子群などの転写制御機構を解析することで、ホルモン活性を規定する共役因子の性状を明らかにできると期待している。他方、トラディショナルな ERE を介した転写活性系、AP1 部位を介する転写活性化系におけるホルモン様化学物質による反応性を比較し、両者が異なる場合があることを見いだした。しかし、ER を介した AP-1 応答について、広範な物質について検討してきたが、AP-1 応答に特異的な作用を及ぼす物質は現在までのところ見いだされなかった。このことは、AP-1 を介するエストロゲン応答におけるその転写活性化機構は、その応答様式の違いにもかかわらず、ERE と共通性があることを示唆している。

5. ステロイド代謝活性機構では、DES、genistein はこれらの物質そのものが性ステロイド作用を示すことに加えて、経口的に摂取された外因性の性ステロイドの消化管での分解、代謝を阻害する事によっても人体の性ステロイド代謝、作用に対して影響を与えている可能性を示した。内分泌かく乱物質の幾つかのもものではその化合物そのものが性ステロイドとしてエストロゲンなどの性ステロイド受容体と結合して作用する事以外に、生体内の性ステロイドホルモンの代謝動態を変えて作用させる可能性もあるという点

で今回の検討から極めて興味深く重要な知見を得たと考えられる

他方、以上のような研究とともに、近年、進歩の著しい cDNA マイクロアレイの内分泌かく乱化学物質研究への導入と実際の運用を行った。cDNA マイクロアレイシステムによる解析は、上記の1.~4. とは、方法的に研究の進め方が異なっているが、機構研究の本質が時間を要することを考慮して取り入れたモノで、本質を明らかにしつつ同時に内分泌かく乱物質問題へと接近する手段として有効な情報を与えるものと期待される。

## E. 結 論

本研究では、内分泌かく乱化学物質における影響メカニズムの可能性として指摘されている諸点のうち解明の困難が集中している、いわゆる“高次生命系”の挙動に焦点をあて、①内分泌系・②免疫系・③神経系などの高次生命系ネットワーク個々に対する影響について、発生・生殖面をはじめとした時間軸やメモリー機構などを考慮しつつ、それらの作用機転の可能性について明らかにすべく研究を行った。また、胎生期暴露サンプルの胎児全脳での発現遺伝子変動解析をモデルに、cDNA マイクロアレイの内分泌かく乱化学物質研究への導入を行った。

## F. 研究発表

### 論文発表

1. Inoue T.: Possible endocrine disruption and hormone-like chemicals. United Nation's University International Symposium on Endocrine-Disrupting Chemicals. United Nation's Univ. Publication, 2000. p.p.23-24.
2. Takahashi Y, Koizumi K, Takagi A, Kitajima S, Inoue T., Koseki H, Saga Y: Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signaling pathway. Nat Genet 25: 390-6, 2000.
3. Kitajima S, Takagi A, Inoue T., Saga Y: MesP1 and MesP2 are essential for the development of cardiac mesoderm. Development 127: 3215-26, 2000
4. Suzuki, H., M. Kokado, K. Saito, T. Kunieda and K. Suzuki, A locus responsible for hypo-gonadism (hgn) is located on rat Chromosome 10. Mammalian Genome 10(11): 1106-1107, 1999
5. Akimoto, T., Suzuki H., Y. Arai, K. Nakama and K. Suzuki, Locus of dominant hairless gene (Ht) causing abnormal hair and keratinization maps to rat chromosome 10. Experimental Animal 49(2): 137-140, 2000
6. Suzuki H., S. Fukaya, K. Saito and K. Suzuki, A locus responsible for osteochondro-dysplasia (ocd) is located on rat Chromosome 11. Mamm. Genome. 11 (6): 464-465, 2000

7. Uchibori, M., K. Saito, S. Yokoyama, T. Tsuji, H. Suzuki and K. Suzuki Monitoring and analysis of the EEG spikes frequency in E1 mice during sleep: A new application of wavelet transform. *Physiol. Behav.* (in submission), 2000
8. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K.: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, 49: 37-53, 2000
9. Iguchi, T.: Book review: Hormonal Chaos. *Nature Med.*, 6: 246-247, 2000
10. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Further study of methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumors. *Anticancer Res.*, 20: 379-384, 2000
11. Iguchi, T. and T. Sato: Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zool.*, 40: 402-411, 2000
12. Iguchi, T.: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs. *Trabajos del Instituto Cajal. Tomo LXXVII*: 52-53, 2000
13. Iguchi, T.: In: Environmental Endocrine Disruptors. Eds. L. Guillette, Jr. and D.A. Crain, Taylor & Francis, New York, pp. 234-268, 2000
14. Maeda, H., Segawa, T., Kamoto, T., Yoshida, H., Kakizuka, A., Ogawa, O., & Kakehi, Y. Rapid detection of candidate metastatic foci in the orthotopic inoculation model of androgen-sensitive prostate cancer cells introduced with green fluorescent protein. *Prostate* (in press), 2000
15. Yasuda, S., Hori, S., Maeda, H., Maeda, R., Gotoh, Y., Nishitoh, H., Ichijo, H., & Kakizuka, A. As2O3 treatment recruits Daxx and ASK1 to re-organized PML bodies and activates the SEK1-JNK cell death kinase cascade in APL cells. (in revision)
16. Hirabayashi, M., Inoue, K., Nakadate, K., Higashiyama, H., Kamei, Y., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Sobue, G., Kimura, Y., Hori, S., & Kakizuka, A. Identification of PIP1 as an effector of neurodegenerative phenotypes in polyglutamine-expressing neuronal cells. (in revision)
17. Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K., & Kakizuka, A. Genetical isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. (in revision)
18. Kanno J. :In vivo test for endocrine disruptors , *Nippon Rinsho. Review* Dec;58(12):2495-2501, 2000
19. Sai K, Kanno J., Hasegawa R, Trosko JE, Inoue T.: Prevention of the down-regulation of gap junction intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol. *Carcinogenesis.* 21(9):1671-1676, 2000
20. Tamura T, Kunimatsu T, Yee, S-T, Igarashi O, Utsuyama M, Tanaka S, Miyazaki S,

- Hirokawa K and Nariuchi H. Molecular mechanism of the impairment in activation signal transduction in CD4+ T cells from old mice. *Int. Immunol.* **12**:1205-1215, 2000
21. Utsuyama M and Hirokawa K. Differential effect of diethyl stilbestrol on the immune system of young and old mice. In preparation
22. Li, M., Indra, A. K., Warot, X., Brocard, J., Messaddeq, N., Kato, S., Metzger, D., Chambon, P.: Skin abnormalities generated by temporally-controlled RXR mutations in adult mouse epidermis. *Nature*, **407**, 633-636, 2000
23. Adachi, M., Takayanagi, R., Tomura, A., Imasaki, K., Kato, S., Goto, K., Yanase, T., Ikuyama, S., Nawata, H.: Androgen-insensitivity syndrome as a possible coactivator disease. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 856-862, 2000
24. Kodera, Y., Takeyama, K., Murayama, A., Suzawa, M., Masuhiro, Y., Kato, S.: Ligand-type specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J. Biol. Chem.*, **275**, 33201-33204, 2000
25. Suzuki, K., Yamanishi, K., Mori, O., Kamikawa, M., Andersen, B., Kato, S., Toyoda, T., Yamada, G.: Defective terminal differentiation and hypoplasia of the epidermis in mice lacking the Fgf 10 gene. *FEBS Lett.*, 2000 (in press).
26. Ohuchi, H., Hori, Y., Yamasaki, M., Harada, H., Sekine, K., Kato, S., Itoh, N.: FGF10 acts as a major ligand for FGF receptor 2 IIIb in mouse multi-organ development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000 (in press).
27. Yamamoto, A., Hashimoto, Y., Kohri, K., Ogata, E., Kato, S., Ikeda, K., Nakanishi, M.: Cyclin E as a coactivator of the androgen receptor. *J. Cell Biol.*, **150**, 873-879, 2000
28. Arao, Y., Kuriyama, R., Kayama, F., Kato, S.: A nuclear matrix-associated factor, SAF-B, interacts with specific isoforms of AUF1/hnRNP D. *Arch. Biochem. Biophys.*, **380**, 228-236, 2000
29. Kato, S., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kobayashi, Y., Takeyama, K., Endoh, H., Yanagisawa, J.: Molecular mechanism of a cross-talk between oestrogen and growth factor signalling pathways. *Genes to Cells*, **5**, 593-601, 2000
30. Kato, S.: The function of vitamin D receptor in vitamin D action. *J. Biochem.*, **127**, 717-722, 2000
31. Haraguchi, R., Suzuki, K., Murakami, R., Sakai, M., Kamikawa, M., Kengaku, M., Sekine, K., Kawano, H., Kato, S., Ueno, N.: Yamada, G. Formation. *Development*, **127**, 2471-2479, 2000
32. Kobayashi, Y., Kitamoto, T., Masuhiro, Y., Watanabe, M., Kase, T., Metzger, D., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300 Mediates functional synergism between AF-1 and AF-2 of estrogen receptor a and b by interacting directly with the N-terminal A/B

- domains. *J. Biol. Chem.*, **275**, 15645-15651, 2000
33. Fuse, H., Kitagawa, H., Kato, S.: Characterization of transactivational property and coactivator mediation of rat mineralocorticoid receptor AF-1. *Mol. Endocrinol.*, **14**, 889-899, 2000
  34. Kinuta, K., Tanaka, H., Moriwake, T., Aya, K., Kato, S., Seino, Y.: Vitamin D is an important factor in estrogen biosynthesis of both female and male gonads. *Endocrinology*, **141**, 1317-1324, 2000
  35. Endre, B., Kato, S., DeLuca, H. F.: Metabolism of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in vitamin D receptor-ablated mice in vivo. *Biochemistry*, **39**, 2123-2129, 2000
  36. Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Mori, M., Yanagisawa, J., Kato, S.: p300/CBP Acts as a coactivator of the cone-rod homeobox transcription factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **269**, 410-414, 2000
  37. Tai, H., Kubota, N., Kato, S.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 311-316, 2000
  38. Hasegawa, Y., Fujii, K., Yamada, M., Igarashi, U., Tachibana, K., Tanaka, T., Onigata, K., Nishi, Y., Kato, S., Hasegawa, T.: Identification of novel human *GH-1* gene polymorphisms that are associated with growth hormone secretion and height. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **85**, 1290-1295, 2000
  39. Sugihara, K., Kitamura, S., Sanoh, S., Ohta, S., Fujimoto, N., Maruyama, S., Ito, A.: Metabolic activation of the proestrogens trans-stilbene and trans-stilbene oxide by rat liver microsomes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **167**, 46-54 2000
  40. Maruyama, S., Fujimoto, N., Asano, K., Ito A., Usui, T.: Expression of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  mRNAs in prostate cancers treated with leuporelin acetate. *Euro Urol.* In press 2000
  41. Takeyama J, Suzuki T, Hirasawa G, Muramatsu Y, Nagura H, Inuma K, Nakamura J, Kimura KI, Yoshihama M, Harada N, Andersson S, Sasano H: 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 expression in the human fetus., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**:410-416 2000
  42. Moriya T, Sakamoto K, Sasano H, Kawanaka M, Sonoo H, Manabe T, Ito J: Immunohistochemical analysis of Ki-67, p53, p21, and p27 in benign and malignant apocrine lesions of the breast: its correlation to histologic findings in 43 cases. *Modern Pathology* **13**:13-18 2000
  43. Kimura K, Sasano H, Shimosegawa T, Mochizuki S, Nagura H, Toyota T: Ultrastructure of cells undergoing apoptosis. *Vitamin and Hormone* **58**:257-266 2000
  44. Suzuki T, Moriya T, Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H: 17 $\beta$ -hydroxysteroid

- dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters., *British Journal of Cancer* 82:518-523 2000
45. Speiser PW, Susin M, Sasano H, Bohrer S, Markowitz J: Ovarian hyperthecosis in the setting of portal hypertension., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:873-877 2000
46. Hirasawa G, Takeyama J, Sasano H, Fukushima K, Suzuki T, Muramatsu Y, Darnel AD, Kaneko C, Hiwatashi N, Toyota T, Nagura H, Krozowski ZS: 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II and mineralocorticoid receptor in human placenta., *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:1306-1309 2000
47. Sone M, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Arihara Z, Satoh F, Sasano H, Ito H, Mouri T: Binding sites for melanin-concentrating hormone in the human brain., *Peptides* 21:245-50 2000
48. Suzuki S, Suzuki T, Tsubochi H, Koike K, Tateno H, Krozowski ZS, Sasano H: Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor in primary lung carcinomas. *Anticancer Research* 20:323-328 2000
49. Kaaijk EM, Sasano H, Suzuki T, Beek JF, van Der Veen F: Distribution of steroidogenic enzymes involved in androgen synthesis in polycystic ovaries: an immunohistochemical study., *Molecular Human Reproduction* 6:443-447 2000
50. Tashiro A, Sasano H, Nishikawa T, Yabuki N, Muramatsu Y, Coughtrie MW, Nagura H, Hongo M: Expression and activity of dehydroepiandrosterone sulfotransferase in human gastric mucosa., *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* 72:149-154 2000
51. Arai K, Muro H, Suzuki M, Oba N, Ito K, Sasano H: Adrenal rest tumor of the liver: A case report with immunohistochemical investigation of steroidogenesis., *Pathology International* 50:244-248 2000
52. Yoshimoto T, Naruse M, Ito Y, Naruse K, Ueda T, Tanabe A, Harada S, Nishikawa T, Sasano H, Obara T, Demura H: Adrenocortical carcinoma manifesting pure primary aldosteronism: a case report and analysis of steroidogenic enzymes., *Journal of Endocrinological Investigation* 23:112-117 2000
53. Ariga N, Moriya T, Suzuki T, Kimura M, Ohuchi N, Satomi S, Sasano H: 17beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in ductal carcinoma in situ and intraductal proliferative lesions of the human breast. *Anticancer Research* 20:1101-1108 2000
54. Iwabuchi M, Sasano H, Hiwatashi N, Masuda T, Shimosegawa T, Toyota T, Nagura H: Serrated adenoma: a clinicopathological, DNA ploidy, and immunohistochemical study.,



- Anticancer Research 20:1141-1147 2000
55. Tsubochi H, Suzuki T, Suzuki S, Ohashi Y, Ishibashi S, Moriya T, Fujimura S, Sasano H: Immunohistochemical study of basaloid squamous cell carcinoma, adenoid cystic and mucoepidermoid carcinoma in the upper aerodigestive tract., Anticancer Research 20:1205-1212 2000
56. Arihara Z, Takahashi K, Murakami O, Totsune K, Sone M, Satoh F, Ito S, Hayashi Y, Sasano H, Mouri T: Orexin-A in the human brain and tumor tissues of ganglioneuroblastoma and neuroblastoma., Peptides 21:565-570 2000
57. Murakami M, Nakagawasai O, Fujii S, Hosono M, Hozumi S, Esashi A, Taniguchi R, Okamura T, Suzuki T, Sasano H, Yanagisawa T, Tan-no K, Tadano T, Kitamura K, Kisara K: Antinociceptive effect of cilnidipine, a novel N-type calcium channel antagonist., Brain Research 868:123-127 2000
58. Matsuzaki S, Fukaya T, Uehara S, Murakami T, Sasano H, Yajima A: Characterization of messenger RNA expression of estrogen receptor- $\alpha$  and - $\beta$  in patients with ovarian endometriosis., Fertility and Sterility 73:1219-1225 2000
59. Matsuzaki S, Murakami T, Sato S, Moriya T, Sasano H, Yajima A: Endomyometriosis arising in the uterosacral ligament: A case report including a literature review and immunohistochemical analysis., Pathology International 50:493-496 2000
60. Semba S, Moriya T, Youssef EM, Sasano H: An autopsy case of ovarian hyperstimulation syndrome with massive pulmonary edema and pleural effusion., Pathology International 50:549-552 2000
61. Sasano H, Suzuki T, Moriya T: Recent advances in surgical pathology of adrenal incidentaloma., Biomed & Pharmacother 54 Suppl 1:169s-174s 2000
62. Bulun SE, Zeitoun KM, Takayama K, Sasano H: Estrogen biosynthesis in endometriosis: molecular basis and clinical relevance., Journal of Molecular Endocrinology 25:35-42 2000
63. Iino K, Oki Y, Sasano H: A case of adrenocortical carcinoma associated with recurrence after laparoscopic surgery., Clinical Endocrinol (Oxf) 53:243-248 2000
64. Yamanaka K, Iitaka M, Inaba M, Morita T, Sasano H, Katayama S: A case of renin-producing adrenocortical cancer., Endocrine Journal 47:119-125 2000
65. Suzuki T, Takahashi K, Darnel AD, Moriya T, Murakami O, Narasaka T, Takeyama J, Sasano H: Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in the human adrenal cortex and its disorders., Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 85:2752-2757 2000
66. Hasegawa T, Zhao L, Caron KM, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker KL: Developmental roles of

the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) as revealed by StAR knockout mice. *Molecular and cellular Endocrinology* 14:1462-1471 2000

67. Suzuki T, Moriya T, Darnel AD, Takeyama J, Sasano H: Immunohistochemical distribution of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in human tissues. *Molecular and cellular Endocrinology* 164:69-75 2000

#### 主な学会発表

1. Ono A., Kanno J., and Inoue T.: Molecular aspects of functional differences among estrogen receptor ligands, 11th International Congress of Endocrinology, 2000
2. Kanno J., Igarashi K., Ono A., Takeyoshi M., Takatsuki M., Kubo A., Itai A., and Inoue T.: Estrogen receptor alpha point mutation altered responses to flavones in the reporter assay, 11th International Congress of Endocrinology, 2000
3. Kohno, S., Kamishima, Y., Watanabe, H. and Iguchi, T.: Effects of estrogenic chemicals on water absorption in skin of Japanese Tree Frog, *Hyla arborea japonica*. Gordon Research Conference, Environmental Endocrine Disruptors, Plymouth State College, New Hampshire, June 18-23, 2000
4. Watanabe, H., Shimizu, N., Sugimoto, K., Hatori, H., Kawauchi, H., Iguchi, T. and Handa, H.: High performance affinity beads designed for target identification of chemicals including endocrine disruptors. Gordon

Research Conference, Environmental Endocrine Disruptors, Plymouth State College, New Hampshire, June 18-23, 2000

5. Iguchi, T.: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs. Joint Meeting of the Vth International Conference on Hormones, Brain and Behavior and The Society for Behavioral Neuroendocrinology, Madrid, Spain, August 5-9, 2000
6. Fujimoto N., Yin H., Maruyama S., Asano K., Ito A. Strain difference in estrogen regulation of pttg (pituitary tumor transforming gene) in the rat pituitary gland International congress of endocrinology, Sydney, Australia, 2000
7. Takeyama J, Suzuki T, Harada N, Andersson S, Sasano H.: Expression of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$ ,  $17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Types 1 and 2 in Human Fetus, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000
8. Darnel A, Suzuki S, Suzuki T, Tsubochi H, Hirasawa G, Takeyama J, Kaneko C., Krozowski Z, Sasano H.:  $11\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 ( $11\beta$ -HSD2) in the Human Lung: Gene Expression and Regulation by Glucocorticoids in the Human Bronchial Epithelial Cell Line, BEAS-2B, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000
9. Sasano H., Murakami H, Narasaka T, Suzuki T, Harada N: Analysis of Estrogen

Receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in Human Aorta, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

10. Hasegawa T, Zhao L, Majdic G, Suzuki T, Shizawa S, Sasano H, Parker L.K.:  
Developmental Roles of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein(StAR) Revealed by StAR Knockout Mice, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

11. Suzuki T, Sasano H, Takeyama J, Freije A.W, Carr R. B, Rainey E W.:  
Developmental Changes of Steroidogenic Enzymes in Human Adrenal Cortex:Immunohistochemical Studies, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting,

Tronto; Canada; June 21-24;2000

12. Ito K, Suzuki T, Sasano H:  
Retinoid Receptors in the Human Endometrium and Its Disorders: Possible Modulator of Local Estrogenic Action, The Endocrine Society's 82st Annual Meeting, Tronto; Canada; June 21-24;2000

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 初期発育鶏卵に及ぼすエストロジェンの発生障害作用に関する研究

分担研究者 鈴木 勝士 日本獣医畜産大学 教授

研究要旨

エストロンの初期発育鶏胚の発生攪乱を調べるために、ステージ 10 の胚盤下卵黄内に 50、500pg/5 $\mu$ l/embryo、および 5ng/5 $\mu$ l/embryo の E1 を投与し、48 時間孵卵して、対照群と比較した。異常は(1) 胚盤葉下層の脱落とチューブ様構造の形成、(2) 体軸の分裂ないし重複奇形、(3) 神経管閉鎖不全および屈曲など、および(4) 体節形成遅延であった。(2)~(4)には用量相関が認められた。(1)の影響が発生学的には最も早期で(4)に向かって影響される時期が遅いと考えられた。これらの異常が E1 による作用であり、ER の活性化を介する可能性が高いと考えられた。この生理学的な意義が未解明な ER が外来性のエストロゲンにより活性化されると胚発生が攪乱され、最終的には生存不可な方向に発生運命が変更されると考えられた。

他の系で同様に ER を活性化する BPA について 2.5、5、および 10 $\mu$ g/5 $\mu$ l/embryo を E1 に準じて投与したところ、用量相関的に神経管尾部を主体とした E1 の(3)に類似する異常が認められた。BPA も E1 と同様な機序で異常が発生する可能性があると考えられた。

さらに詳細な機序を解明するためには、初期胚のステージ、投与部位の特定に関しより厳密な規定を行って、異常のパターンについて再現性を高め、孵卵経過をたどって体軸決定、パターン形成に関わる遺伝子発現の攪乱を証拠づける必要がある。

A. 研究目的

初期発育鶏卵に極微量のエストロン (E1)を投与し、胚盤葉下層の受容体の活性化と細胞死の誘導、発生かく乱の機序を解明するとともに、用量相関が見られるか否か調べる。また、同じ機序で作用

する可能性があると考えられるビスフェノール A(BPA)を投与してその影響を確認する必要がある。異常発生の再現性を高めるため、最適な投与部位と発生ステージの再検討を行う必要がある。