

表4 精子の運動率および形態学的異常率

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	MOVEMENT ABILITY (%)		MORPHOLOGY ABNORMALITY (%)
	DEN	TEST CHEMICAL			5 MINUTES		
1	+	CONTROL	0	5	80.42 ± 4.66	1.70 ± 1.40	
2	+	BISPHENOL A	25	5	81.46 ± 15.85	1.20 ± 0.57	
3	+	BISPHENOL A	250	5	88.02 ± 9.28	1.40 ± 1.24	
4	+	BISPHENOL A	2000	5	81.08 ± 11.50	1.70 ± 1.04	
5	-	CONTROL	0	5	81.34 ± 9.35	2.00 ± 1.27	
6	-	BISPHENOL A	2000	5	88.22 ± 5.25	2.20 ± 1.44	

表5 精子生成過程のステイジング

TEST CHEMICAL	LEVEL (mg/kg)	NO. OF EXAMINED	Stage			
			Stage	Stage	Stage	Stage
CONTROL	0	5	39.6 ± 2.4	24.6 ± 4.3	6.4 ± 2.5	29.4 ± 1.1
BISPHENOLA	25	5	38.0 ± 1.2	24.8 ± 2.9	7.6 ± 1.8	29.6 ± 3.3
BISPHENOLA	250	5	37.6 ± 1.5	25.6 ± 4.2	8.2 ± 3.6	28.6 ± 3.9
BISPHENOLA	2000	5	39.4 ± 2.9	26.8 ± 1.8	7.4 ± 1.5	26.4 ± 3.9
CONTROL	0	5	43.0 ± 5.9	24.2 ± 4.6	6.2 ± 1.9	26.6 ± 6.2
BISPHENOLA	2000	5	43.0 ± 2.0	25.0 ± 4.1	8.2 ± 2.4	23.8 ± 2.7

(MEAN ± S.D.)

表6 GST-P陽性細胞巢の定量的結果

GROUP NO.	TREATMENT		LEVEL (ppm)	NO. OF EXAMINED	GST-P POSITIVE FOCI	
	DEN	TEST CHEMICAL			NO./cm ²	AREA(mm ² /cm ²)
1	+	CONTROL	0	14	4.614 ± 1.715	0.353 ± 0.164
2	+	BISPHENOL A	25	15	4.921 ± 1.836	0.388 ± 0.179
3	+	BISPHENOL A	250	15	3.634 ± 2.055	0.322 ± 0.185
4	+	BISPHENOL A	2000	15	4.376 ± 1.402	0.315 ± 0.142
5	-	CONTROL	0	8	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000
6	-	BISPHENOL A	2000	9	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000

(MEAN ± S.D.)

16. 内分泌攪乱物質の甲状腺発がん修飾作用を検出する
鋭敏なモデルの開発に関する研究

研究者 広瀬雅雄

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部 部長

研究要旨

β -estradiol 3-benzoate (EB) の甲状腺発がん促進効果をより鋭敏に検出可能な抗甲状腺剤の組み合わせについて検討を行うための予備実験として、卵摘ラットに *N*-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) でイニシエーションを行った後、EB の皮下埋植と同時に sulfadimethoxine (SDM), propylthiouracil (PTU), KClO_4 , イオパノ酸あるいは低ヨード食を7日間与え、濾胞上皮細胞の肥大の発現状況および濾胞上皮細胞における細胞増殖活性について検討した。その結果、SDM, PTU および KClO_4 で増殖活性の亢進が認められたため、これらについて長期実験を行うことにした。長期実験は予備実験と同じデザインで、SDM, PTU, あるいは KClO_4 の26週間ないし40週間投与を行っている。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質 (EDCs) の甲状腺発がん修飾作用を鋭敏に検出する試験系はまだ確立されておらず、早急にその試験系の確立が望まれている。前年度までに、DHPN でイニシエーションを行った後 EDCs と抗甲状腺剤である sulfadimethoxine (SDM) を組み合わせて投与するモデルについて検討してきたが、SDM 以外の抗甲状腺剤については検討を行っていない。今年度は最適な組み合わせを選び、モデルの確立を目指す。この試験系を開発することにより、EDCs の甲状腺発がんに対する修飾作用を検出することが可能となる。

B. 研究方法

[7日間予備実験]

卵巣を摘出した F344 雌ラットに *N*-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)

2000mg/kg bw でイニシエーションを行い、その後 EB の皮下埋植を行うと同時に抗甲状腺剤としてペルオキシダーゼ阻害作用のある SDM (30, 100ppm), propylthiouracil (PTU, 5, 30ppm), ヨード取込み阻害作用のある過塩素酸カリウム (KClO_4 , 30, 100ppm), ヨード剤であるイオパノ酸 (30, 100mg/kg) あるいは低ヨード食を投与し、投与7日で屠殺した。EB 埋植を行わない各群も併せて設けた。甲状腺を中心に病理組織学的に観察するとともに、免疫組織化学的に proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を検出し、濾胞上皮細胞における陽性率を計測した。

[長期実験]

卵巣を摘出した F344 雌ラットに DHPN 2000mg/kg bw でイニシエーションを行い、その後 EB の皮下埋植を行うと同時に抗甲状腺剤として SDM (30, 100ppm), PTU (2,

5ppm)あるいは KClO_4 (30, 100ppm)を投与し、投与 26 週ないし 40 週で屠殺する。EB 埋植を行わない各群も併せて設け、甲状腺を中心に病理組織学的に観察する。

(倫理面への配慮)

動物の取扱いは、国立医薬品食品衛生研究所の規定に基づいて行っている。なお、屠殺はエーテル深麻酔下、動脈からの脱血により行い、動物へ苦痛を与えないよう留意する。

C. 研究結果

[7日間予備実験]

投与終了時の体重において、各抗甲状腺剤の影響は認められなかったが、EB 投与により各群とも 5-11%程度低値を示した(表1)。甲状腺重量は、対照群と比較してPTU (5, 30ppm)群において有意に ($p<0.01$) 増加した(表1)。病理組織学的にはSDM, PTU および KClO_4 の各群で濾胞上皮細胞の肥大と濾胞コロイドの減少が用量依存的にみられ、特にPTU (30ppm)において顕著であった。また、SDM および KClO_4 の各群では、EB 非投与群と比較しEB 投与群で濾胞上皮細胞肥大の程度が増強する傾向がみられた(表2)。また、濾胞上皮細胞のPCNA 陽性率は、対照群と比較してPTU (30ppm) 群で有意に ($p<0.01$)また、SDM (100ppm), PTU (5ppm)および KClO_4 (100ppm)の各群で明らかに高値を示し、さらにいずれの群でもEB 非投与群と比較して、EB 投与群で高値を示す傾向がみられた(表2)。

[長期実験]

現在投与 26 週まで経過した。26 週投与終了時の体重において、各抗甲状腺剤の影響は認められなかったが、EB 投与により各群とも 24-28%程度低値を示した。甲状腺比重量は、PTU (5ppm)のEB 非投与群と比較してEB 投与群で明らかに高値を示し、SDM (100ppm)でもEB 非投与群と比較して

EB 投与群で有意に ($p<0.01$) 高値を示したが、その差はPTU 投与群より少なかった。病理組織学的には、SDM (100ppm)のEB 非投与群では増殖性病変が認められなかったのに対しEB 投与群では2/4例に過形成が、1/4例には腺腫がみられた。また、PTU (5ppm)のEB 投与群においてもEB 非投与群と比較し、腺腫および腺癌の頻度が高くなる傾向がみられた。

D. 考察

EDCs の甲状腺発がん修飾作用を鋭敏に検索する試験系を確立する目的で、種々の抗甲状腺剤とEB を組み合わせて投与し、甲状腺発がんに対する修飾作用を比較検討している。7日間実験の結果では、病理組織学および細胞動態学的にSDM, PTU および KClO_4 の各群でEB 投与による抗甲状腺作用の促進傾向が認められ、EDCs と組み合わせて長期投与することにより、甲状腺発がん修飾作用が鋭敏に検出できる可能性が示唆された。26 週投与終了時においても、SDM およびPTU 群でEB 投与による甲状腺重量の増加および増殖性病変の発生頻度の増加がみられ、ペルオキシダーゼ阻害剤の併用が最も効果的であることが示唆された。文献的にはエストロゲン投与により、腫瘍を誘発したラット甲状腺のエストロゲン受容体レベルが上がることが報告されている(Fujimoto N. et al., Carcinogenesis, 1992)。一方、血清中エストロゲンが肝UDP-GT 活性に影響を与える(Watanabe M. et al., Pharmacol. Res., 1997) ことも知られている。従って今回、EB 併用投与により抗甲状腺作用が促進傾向を示したメカニズムとして、甲状腺に対する直接作用と、肝における甲状腺ホルモンの代謝促進を介する間接的な作用の可能性が考えられる。投与 40 週で屠殺する長期実験においては、甲状腺腫瘍の発生について

比較検討するとともに、血清甲状腺ホルモン値や肝 UDP-GT 活性の測定等も考慮する必要があると考えられた。

E. 結論

7日間実験の結果より、抗甲状腺剤とEB併用投与による抗甲状腺作用の促進傾向が認められた。現在、26週投与群の病理組織学的評価を進めるとともに、40週投与による甲状腺発がん修飾作用の検討を実施している。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nishikawa, A., Suzuki, T., Masumura, K., Furukawa, F., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y., Nohmi, T., Hayashi, M. and Hirose, M. Reporter gene transgenic mice as a tool for analyzing the molecular mechanisms underlying experimental carcinogenesis. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 20, 111-115, 2001.

Kimoto, N., Hirose, M., Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M. and Shirai, T. Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats. *Cancer Lett.*, 168, 15-21, 2001.

Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Nakamura, A. Akagi, K. and Shirai, T. Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 Rats. *Cancer Lett.*, 168, 23-29, 2001.

Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M. and Mitsumori, K. Environmental agents, endocrine disrupting chemicals and rat

thyroid carcinogenesis, *J. Toxicol. Pathol.*, 14, 71-77, 2001.

Hagiwara, A., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Hirose, M., Ito, N. and Shirai, T. Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically. *Toxicol. Pathol.*, 29, 180-186, 2001.

Yasuhara, K., Koujitani, T., Takegawa, K., Nasu, M., Onodera, H., Takagi, H., Hirose M., Mitsumori, K. Promoting effects of xylazine on development of thyroid tumors in rats initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and the mechanism of action. *Carcinogenesis*, 22, 613-618, 2001.

Ikeda, T., Nishikawa, A., Son H.-Y., Nakamura, H., Miyauchi, M., Imazawa, T., Kimura, S. and Hirose, M. Synergistic effects of high-dose soybean intake with iodine deficiency, but not sulfadimethoxine or phenobarbital, on rat thyroid proliferation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 390-395, 2001.

Furukawa, F., Nishikawa, A., Kasahara, K., Miyauchi, M., Nakamura, H., Son, H.-Y, Uchida K, Hirose, M. Involvement of lipid peroxidation in spontaneous pancreatitis in WBN/Kob rats. *Pancreas*, 22, 427-430, 2001.

Son, H.-Y., Nishikawa, A., Ikeda, T., Imazawa, T., Kimura, S., Hirose, M. Lack of effect of soy isoflavone on thyroid hyperplasia in rats receiving an iodine-deficient diet. *Jpn. J. Cancer Res.*, 92, 103-108, 2001.

Takizawa, T., Mitsumori, K., Takagi, H., Onodera, H., Yasuhara, K., Tamura, T., Hirose, M. Modifying effects of flumequine on dimethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in heterozygous *p53* deficient CBA mice. *J. Toxic. Pathol.*, 14, 135-143, 2001.

Ueda, M., Mithumori, K., Onodera, H.,

Takagi, H., Yasuhara, K., Takizawa, T., Hirose, M. Lack of modifying effects of bisphenol A and roasted soybean (Kinako) on N-ethyl-N-nitrosourea-induced uterine carcinogenesis in heterozygous p53 deficient CBA mice. *J. Toxicol. Pathol.*, 14, 129-134, 2001.

Takagi, H., Mitsumori, K., Onodera, H., Nasu, M., Tamura, T., Yasuhara, K., Takegawa, K., Hirose, M. Modifying effects of endocrine disrupting chemicals on N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine and sulfadimethoxine-induced thyroid carcinogenesis in rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 14, 121-128, 2001.

Masutomi, N., Toyoda, K., Shibutani, M., Niho, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M. Toxic effects of benzyl and allyl isothiocyanates and benzyl-isoform specific metabolites in the urinary bladder after a single intravesical application to rats. *Toxicol. Pathol.*, 29: 617-622, 2001.

Nakamura, H., Furukawa, F., Nishikawa, A., Miyauchi, M., Son, H.-Y., Imazawa, T., Hirose, M. Oral toxicity of a tocotrienol preparation in rats. *Fd. Chem. Toxicol.*, 39: 799-805, 2001

Imazawa T, Nishikawa A, Shibutani M, Ogasawara H, Furukawa F, Ikeda T, Suda K, Hirose M. Induction of pancreatic islet cell tumors in rats by repeated intravenous administration of 4-hydroxyaminoquinoline 1-oxide. *Toxicol Pathol.* 29:320-327, 2001.

Koujitani T, Yasuhara K, Toyosawa K, Shimada A, Onodera H, Takagi H, Tamura T, Hirose M, Mitsumori K. Immunohistochemical and ultrastructural studies of 2,6-dimethylaniline-induced nasal proliferative lesions in a rat two-stage nasal carcinogenesis model initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine. *Toxicol Pathol.* 29: 300-307, 2001.

Tamura T, Mitsumori K, Onodera H, Fujimoto N, Yasuhara K, Takegawa K, Takagi H, Hirose M. Dose-threshold for

thyroid tumor-promoting effects of orally administered kojic acid in rats after initiation with N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine. *J Toxicol Sci.* 2001 26: 85-94, 2001.

Koujitani T, Yasuhara K, Tamura T, Onodera H, Takagi H, Takizawa T, Hirose M, Hayashi Y, Mitsumori K. Lack of modifying effects of eugenol on development of lung proliferative lesions induced by urethane in transgenic mice carrying the human prototype c-Ha-ras gene. *J Toxicol Sci* 26: 129-139, 2001.

Niho N, Shibutani M, Tamura T, Toyoda K, Uneyama C, Takahashi N, Hirose M. Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats. *Food Chem Toxicol.* 39: 1063-1070, 2001.

Shoda T, Yasuhara K, Moriyasu M, Takahashi T, Uneyama C, Hirose M, Mitsumori K. Testicular toxicity of nitrofurazone causing germ cell apoptosis in rats. *Arch Toxicol.* 75: 297-305, 2001.

Okazaki K, Okazaki S, Nishimura S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Nakamura A, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M. A Repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol.* 75: 513-521, 2001.

Onodera H, Mitsumori K, Takagi H, Yasuhara K, Koujitani T, Tamura T, Imai T, Hirose M. Susceptibility of heterozygous p53 deficient CBA mice to induction of liver proliferative lesions by phenobarbital after dimethylnitrosamine initiation. *J. Toxicol. Pathol.* 14: 273-278, 2001.

H. 知的所有権の取得状況
なし。

表 1 各種抗甲状腺剤およびβ-エストラジオール-3-ベンゾエート (EB) を 1 週間投与したラットの甲状腺および下垂体重量

処置	N	最終体重 (g)		甲状腺 (mg/100g bw)		下垂体 (mg/100g bw)	
		EB	(g)	(mg)	(mg)	(mg)	(mg)
Control	5	-	124.6 ± 2.4	8.2 ± 0.8	6.6 ± 0.6	6.6 ± 0.5	5.3 ± 0.5
		+	113.9 ± 6.6 [#]	9.8 ± 1.3 [#]	8.7 ± 1.5 [#]	10.8 ± 1.0 ^{##}	9.3 ± 0.4 ^{##}
SDM 30ppm	5	-	122.3 ± 11.7	9.4 ± 1.1	7.7 ± 0.8	6.6 ± 1.1	5.4 ± 0.7
		+	115.2 ± 2.0	9.8 ± 0.8	8.5 ± 0.7	11.4 ± 0.5 ^{##}	9.9 ± 0.5 ^{##}
SDM 100 ppm	5	-	123.3 ± 4.1	9.6 ± 1.8	7.8 ± 1.7	7.0 ± 1.2	5.7 ± 0.9
		+	112.6 ± 3.7 ^{##}	11.6 ± 3.0	10.3 ± 2.9	11.6 ± 0.5 ^{##}	10.3 ± 0.7 ^{##}
PTU 5ppm	5	-	123.4 ± 4.1	15.4 ± 1.5 ^{**}	12.5 ± 1.5 ^{**}	7.0 ± 0.0	5.7 ± 0.2
		+	113.2 ± 4.1 ^{##}	16.7 ± 2.5 ^{**}	15.2 ± 2.1 ^{**#}	11.2 ± 0.8 ^{##}	9.9 ± 0.7 ^{##}
PTU 30ppm	5	-	124.0 ± 4.4	23.6 ± 2.6 ^{**}	19.1 ± 2.4 ^{**}	6.6 ± 0.5	5.3 ± 0.3
		+	115.4 ± 5.4 [#]	27.2 ± 3.1 ^{**}	23.6 ± 3.1 ^{**#}	12.0 ± 0.7 ^{##}	10.4 ± 0.5 ^{##}
KClO ₄ 30ppm	5	-	122.0 ± 5.5	10.4 ± 2.3	8.5 ± 1.5	6.6 ± 0.5	5.4 ± 0.5
		+	113.9 ± 3.5 [#]	12.0 ± 2.9	10.5 ± 2.4	11.4 ± 0.5 ^{##}	10.0 ± 0.5 ^{##}
KClO ₄ 100ppm	5	-	123.3 ± 4.0	11.0 ± 1.4	8.9 ± 0.9	6.2 ± 0.4	5.0 ± 0.2
		+	113.2 ± 4.1 ^{##}	11.6 ± 1.7	10.3 ± 1.6	11.6 ± 0.5 ^{##}	10.3 ± 0.6 ^{##}
IOP 30 mg/kg	5	-	124.2 ± 7.2	10.6 ± 0.9	8.6 ± 0.9	6.4 ± 0.5	5.2 ± 0.4
		+	111.3 ± 4.4 ^{##}	9.6 ± 2.3	8.6 ± 2.1	11.4 ± 1.1 ^{##}	10.2 ± 1.0 ^{##}
IOP 100mg/kg	5	-	119.3 ± 5.2	9.4 ± 1.1	7.9 ± 1.2	6.0 ± 0.0	5.0 ± 0.2
		+	113.6 ± 3.4	10.6 ± 2.1	9.4 ± 2.1	10.8 ± 0.4 ^{##}	9.5 ± 0.5 ^{##}
Iodine free diet	4	-	126.2 ± 4.6	10.5 ± 1.7	8.4 ± 1.7	7.0 ± 0.0	5.6 ± 0.2
		+	112.0 ± 3.5 ^{##}	10.3 ± 1.0	9.1 ± 0.7	11.3 ± 1.3 ^{##}	10.0 ± 1.1 ^{##}

** : p<0.01 vs control群

#, ## : p<0.05, p<0.01 vs EB非投与群

表 2 各種抗甲状腺剤およびβ-エストラジオール-3-ベンゾエート (EB)を1週間投与したラットにおける甲状腺の病理組織学的変化および濾胞上皮細胞のPCNA陽性率

処置	N		濾胞上皮細胞肥大				細胞減少				PCNA陽性率 (%)
	EB	N	-	+	2+	3+	-	+	2+	3+	
Control	-	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0.10 ± 0.07
	+	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0.30 ± 0.20
SDM 30ppm	-	5	5	0	0	0	4	1	0	0	0.20 ± 0.07
	+	5	3	2	0	0	3	2	0	0	0.32 ± 0.23
SDM 100 ppm	-	5	0	3	2	0	0	5	0	0	1.10 ± 0.28
	+	5	0	0	5	0	0	5	0	0	1.42 ± 0.88
PTU 5ppm	-	5	0	0	0	5	0	0	5	0	0.96 ± 0.65
	+	5	0	0	0	5	0	0	5	0	1.52 ± 0.35
PTU 30ppm	-	5	0	0	0	5	0	0	0	5	10.16 ± 1.77**
	+	5	0	0	0	5	0	0	0	5	12.08 ± 1.81**
KClO ₄ 30ppm	-	5	0	5	0	0	3	2	0	0	0.24 ± 0.15
	+	5	0	5	0	0	3	2	0	0	0.32 ± 0.18
KClO ₄ 100ppm	-	5	1	4	0	0	2	3	0	0	0.58 ± 0.15
	+	5	0	2	3	0	0	5	0	0	0.76 ± 0.25
IOP 30 mg/kg	-	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0.12 ± 0.08
	+	5	3	0	0	0	4	1	0	0	0.12 ± 0.13
IOP 100mg/kg	-	5	5	0	0	0	5	0	0	0	0.12 ± 0.13
	+	5	4	1	0	0	5	0	0	0	0.24 ± 0.31
Iodine free diet	-	4	3	1	0	0	2	2	0	0	0.55 ± 0.25
	+	4	4	0	0	0	0	4	0	0	0.63 ± 0.26

** : p<0.01 vs control群

表 3 各種抗甲状腺剤およびβ-エストラジオール-3-ベンゾエート (EB) を 2 6 週間投与したラットの甲状腺重量

処置	N	最終体重		甲状腺	
		EB	(g)	(mg)	(mg/100g bw)
Control	5	-	217.3 ± 11.8	11.6 ± 4.1	5.4 ± 2.0
	5	+	165.7 ± 7.4 ^{##}	10.8 ± 2.1	6.5 ± 1.2
SDM 100 ppm	5	-	225.5 ± 8.8	9.3 ± 3.7	4.1 ± 1.6
	4	+	163.9 ± 3.5 ^{##}	15.3 ± 4.1	9.3 ± 2.4 ^{##}
PTU 5ppm	5	-	223.1 ± 9.3	28.3 ± 5.1 ^{**}	12.6 ± 1.9 ^{**}
	4	+	167.3 ± 16.1 ^{##}	82.4 ± 36.2 ^{**}	48.8 ± 19.5 ^{**#}
KClO ₄ 100ppm	5	-	229.2 ± 3.0	12.2 ± 2.5	5.3 ± 1.1
	4	+	164.7 ± 22.7 [#]	11.3 ± 3.3	7.2 ± 3.1

** : p<0.01 vs control群

#, ## : p<0.05, p<0.01 vs EB非投与群

表 4 各種抗甲状腺剤およびβ-エストラジオール-3-ベンゾエート (EB) を 26 週間投与したラットの甲状腺の増殖性病変

処置 抗甲状腺剤	EB	N	増殖性病変		
			過形成	腺腫	腺癌
Control	-	5	0	0	0
	+	5	0	0	0
SDM 100 ppm	-	5	0	0	0
	+	4	2	1	0
PTU 5ppm	-	5	5	1	0
	+	4	4	2	1
KClO ₄ 100ppm	-	5	0	0	0
	+	4	0	1	0

17. 内分泌かく乱化学物質の乳腺発がんにおよぼす影響の検討

研究者 長村義之
東海大学医学部内分泌病理乳腺細胞診
副医学部長・教授

本研究班での、テーマは(1) エストロジェンが単独で乳癌誘発作用があるか、(2) またエストロジェン が DMBA による乳癌発癌の促進作用を有するか否かなどであるが、その際に問題となるのが乳腺におけるエストロジェン レセプター (ER) の動態である。このような、エストロジェンによる乳腺の動態の解析は、内分泌攪乱物質の影響を知る上で、極めて重要と考えられる。

A. 研究目的

内分泌攪乱物質は、多くの物質がエストロジェン作用を有することが広く知られてきている。本研究班での、テーマは1) エストロジェンが単独で乳癌誘発作用があるか、2) またエストロジェンが DMBA による乳癌発癌の促進作用を有するか否かなどであるが、その際に問題となるのが乳腺におけるエストロジェンレセプター (ER) の動態である。このような、エストロジェンによる乳腺の動態の解析は、内分泌攪乱物質の影響を知る上で極めて重要と考えられる。今回は、第1段階として、雌ラットにおいて、去勢後のエストロジェン投与による乳腺における ER α 、ER β の動向を免疫組織化学、RT-PCRにより検討した。

B. 研究方法

- ①E2 の 0 溶媒、10 および 3000 g/kg/week で i.m.投与 4 週後に解剖
- ②以下の処置を行い、13 週後に解剖
 - (1) Sham 群:溶媒を 1 週間に 1 回 i.m.投与
 - (2) OVX 群:溶媒を 1 週間に 1 回 i.m.投与
 - (3) E2 群: E2 (3000 g/kg)を 1 週間に 1 回 i.m.投与
 - (4) BC 群: BC (3 mg/kg)を解剖前の 4 日間に 1 日 1 回 s.c 投与
- ③乳腺組織の処理
 - ・組織標本作製用
 - ・RT-PCR 用

④免疫組織化学(IHC)

- ・抗 ER α 抗体, 1:80, Novocastra, 6F11
 - ・抗 ER β 抗体, 1:100, Santa Cruz, Y-19
 - ・抗 Ki-67 抗体, 1:80, Novocastra, MMI
- _S-AB 法(ニチレイ、ヒストファイブ)を行い、DAB にて発色

⑤RT-PCR

C. 研究結果および考察

実験 1 および実験 2 において、ER α は、エストラジオール 3000 μ g/kg 投与により IHC による上皮内の蛋白、および組織内の mRNA とも down-regulate された。一方、ER β は、対照群 E210 μ g/kg では IHC、RT-PCR により陰性であったが、E2 を 3000 μ g/kg 投与により蛋白、mRNA とも発現が見られた。また、E2 を 3000 μ g/kg 投与により、乳腺では、乳管は増殖、各腸し、上皮細胞では MIB-1 (増殖細胞抗原)の陽性核が増加し、E2 による細胞増殖が示された。下垂体では、プロラクチンの分泌を抑制するプロモクリプチン投与の乳腺での ER α 、ER β への影響は明らかでなかった。

E. 結論

今回投与した E2 量は、過剰なものであったが、E2により ER α は down-regulate され、ER β は up-regulate されることが示された。このように、E2 投与により乳腺上皮における ER の環境変化が示唆

された。内分泌攪乱物質の発癌への影響を
1097-1108, 2000
を考える上で、E2 による変化の把握は
極めて重要と考える。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

Jin L, Osamura RY, Kulig E, Lloyd RV et al
Leptin and Leptin Receptor Expression in
Rat and Mouse Pituitary Cells,
Endocrinology 141, 1, 333-339, 2000

Murakoshi M, Osamura RY et al
Immunoreactive Pit-1 protein in hyperplastic
pars intermedia induced by calcitonin of the
rat pituitary gland, Endocrine Journal 47, 1,
13-20, 2000

Osamura RY et al, Contributions of
immunohistochemistry and in situ
hybridization to the functional analysis of
pituitary adenomas, J Histochemistry &
Cytochemistry 48, 4, 445-458, 2000

Matsuno A, Osamura RY et al, Growth
hormone-releasing hormone expression in
pituitary somatotroph adenomas, studied by
immunohistochemistry and in situ
hybridization using catalyzed signal
amplification system, Human pathology 31,
7, 789-794, 2000

Osamura RY et al. Applications of Plastic
Embedding to Electron Microscopic
Immunocytochemistry and In Situ
Hybridization in Observations of Production
and Secretion of Peptide Hormones, J
Histochem Cytochem 48, 7, 885-891,
2000

Tahara S, Osamura RY et al, Expression
of pituitary Homeo Box 1(Ptx1) in human
non-neoplastic pituitaries and pituitary
adenomas, Modern Pathology 13, 10,

18. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期曝露が 雌性生殖器に与える影響に関する研究

研究者 吉田 緑

財団法人 佐々木研究所病理部 研究員

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生仔期曝露が雌性生殖器に与える影響のうち、大量曝露による典型例を確認した。エストロゲン作用を有する p-tert octylphenol(OP)のラット新生仔期大量曝露は、視床下部を障害した結果、視床下部・下垂体・性腺系を介して生殖器系臓器への間接的な影響を与えるだけでなく、子宮および膣へも直接的な影響を及ぼすことが確認され、子宮癌を誘発する可能性も示唆された。観察された変化は OP がエストロゲン様作用として働いた結果であると考えられた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質問題の中で胎児期および新生児期曝露による影響は、男性あるいは女性ホルモンの胎児期および新生児期曝露が生殖器系の発育・分化へ不可逆的かつ重篤な変化をもたらすことから、最も懸念されているものの一つである。中でも胎児期・新生児期曝露と生殖器系障害との関連が明らかな diethylstilbestrol (DES) 曝露ではヒトおよび実験動物に子宮あるいは膣癌を誘発させることが知られている。数年来、内分泌かく乱化学物質の胎児期および新生児期曝露に関する多くの報告がなされたが、生体への影響を判断する指標およびその発現機序については不明な部分が多く残されている。今回の研究は、生殖器系への影響が懸念されている内分泌かく乱化学物質を高用量から環境中に存在する低用量まで胎仔期あるいは新生仔期ラットに曝露することによって、雌性生殖器への影響を検出する有効な指標を検討するとともに子宮発癌への修飾作用について検討することを目的とする。

本年度はエストロゲン作用を有する代表的な内分泌かく乱化学物質の一つである p-tert octylphenol(OP)を新生仔期に大量曝露することにより典型的な変化を確認することを目的とし、特に視床下部・下垂体・性腺系を介する間接的影響および子宮および膣への直接的な影響を掌握することを目的として実験を行った。

B. 研究方法

子宮癌好発系の Crj:Donryu ラットを用いて生後 24 時間以内の雌新生仔の背部に OP100mg/kg を隔日に 15 日齢まで計 8 回皮下投与を実施した。本投与量は成熟および新生仔ラットに明らかなエストロゲン様作用を示す用量である。成熟前の雌性生殖器系の発育に対する OP の影響をみるために経時的に動物を剖検し、内分泌学および形態学的検索を行った。10 週齢に排卵数を確認し、性腺刺激ホルモン放出ホルモン (LHRH) 投与し排卵の有無を検討した。OP 新生仔期曝露した子宮および膣の変化と内因性エストロゲンとの関連性を卵巣摘出後の子宮重量および膣スメア像より検索した。また、性周期の異常を全実験期間にわたって観察した。

子宮発癌への修飾作用を検討するために、新生仔期大量曝露を行ったこれらのラットに 11 週齢にて N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(ENNG)を子宮腔内に投与して 15 ヶ月齢まで観察し、子宮の増殖性病変について形態学的に検索した。

倫理面への配慮

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」の主旨およびおよび WHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づき CIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に

沿って実施した。

C. 研究成果

新生仔期曝露群の体重は無処置対照群と同様で、一般状態にも異常は認められなかった。性成熟前の観察では、性腺刺激ホルモン(卵胞刺激および黄体形成ホルモン)が投与群で明らかな低値を示した。また子宮の重量には変化が認められなかったものの、曝露群では生後14日齢から発育する子宮腺の形成が明らかに抑制された。免疫組織化学染色の結果より10日齢から子宮被覆、腺上皮および間質のエストゲンレセプター発現および細胞増殖活性の異常が認められた。成熟後の子宮では8週齢から被覆上皮が過形成を示し、卵巣は明らかに小さく黄体がなく小卵胞のみからなる **polycystic ovary** を呈した。曝露群の膣開口は対照群より約1週間早い時期に認められ、性周期は正常なサイクルを示さずに持続発情を示した。成熟後の曝露群の卵管内に卵は観察されなかったが、LHRH 投与により排卵が誘発された。また卵巣摘出により子宮は萎縮し、膣スメアは速やかに去勢スメア像を示したが、その程度に群間の差はなかった。

大量の OP 新生仔期曝露によるラット子宮発癌修飾作用については、15ヶ月齢の検査において曝露群の子宮内膜腺癌の頻度は対照群と同様であったが、対照群では高分化型で子宮内の癌であったのに対し、曝露群では中・低分化型で、腹腔内に浸潤性増殖あるいは遠隔転移を示す癌が有意に増加した。また、上皮過形成の頻度が有意に減少した。

D. 考察

体重および一般状態などの外表検査では変化が認められなかったが、OP の新生仔期大量曝露は雌性生殖器系へ重篤な影響をもたらすことが明らかになった。性腺刺激ホルモンの性成熟前の低値が LHRH 投与により改善することから、OP 曝露は視床下部を障害し、それに伴って視床下部・下垂体・性腺コントロール系を破壊することが確認された。**polycystic ovary** による相対的エストロゲン高値に伴う持続発情、子宮内膜過形成などの変化が観察されたが、卵巣摘出により消失したことからこれらの変化は内因性エストロゲン依存性の変化であり、間接的な影響であると考えられた。一方、子宮腺の形成抑制、エストゲンレセプター発現

および細胞増殖活性の異常および膣開口の早期化は、内因性エストロゲンの低い時期から観察された変化であり、したがってこれらは OP 曝露の子宮、膣への直接的な発育分化に対する影響であると考えられた。

子宮の上皮過形成は前腫瘍性変化であり内膜腺癌が腺上皮から発生すると考えられていることから、曝露群での過形成の頻度低下は子宮腺の形成抑制に関連した変化であると思われる。しかし、発生した腺癌の悪性度が明らかに増加していたことから、OP の新生仔期曝露はラットの子宮癌を誘発する可能性が示唆された。発癌の機序については今後検討する予定である。

上記のいずれの変化もエストロゲン様物質胎仔・新生仔曝露で報告されていることから、今回も OP がエストロゲン様作用物質として働いた結果であると考えられた。

E. 結論

OP100mg/kg を生後1～15日齢の雌 Crj:Donryu ラットに隔日皮下投与し、雌性生殖器に対する影響を確認した。

曝露群では性腺刺激ホルモンの低下、無排卵、**polycystic ovary**、子宮内膜過形成等重篤な変化が観察されたが、LHRH 投与により排卵し、卵巣摘出により消失したことから、これらの変化は視床下部が障害され、視床下部・下垂体・性腺コントロール系が破壊されたことによる間接的な影響であると考えられた。また子宮腺の形成抑制、膣開口早期化など子宮および膣の発育分化に直接的な影響も及ぼすことが確認された。観察された変化はいずれも OP がエストロゲン様作用として働いた結果であると考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 書籍

なし

2. 雑誌

Shimomoto, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Mackawa, A.: Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 15, 2002. in press.

Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.: Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine -treated rats with high-dose exposure to p-tert octylphenol during adulthood. Japanese Journal of Cancer Research. 93, 2002, in press.

Yoshida, M., Katsuda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A. Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats. Toxicology Letters, 121:21-33, 2001.

Yoshida, M., Katsuda, S. and Maekawa, A.. Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats. Journal of Toxicologic Pathology, 14: 83-86. 2001

3. 学会などへの参加

吉田 緑、竹中亜希子、勝田真一、下元貴澄、安藤 進、高橋正一、前川昭彦：ラットの発育期子宮内膜におけるエストロゲンレセプターの発現および細胞増殖活性に与える新生仔期オクチルフェノール大量曝露の影響について。第 17 回日本毒性病理学会要旨集(淡路、2001)

吉田 緑、勝田真一、渡辺 元、田谷一善、前川昭彦：胎仔期および授乳期の低用量 bisphenolA 曝露がラット雌性生殖器に及ぼす影響。第 28 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集(東京,2001)

Yoshida, M., Katsuda, S., Takahashi, M., Shimomoto, T., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.: Effect of in utero and lactational exposure to low-dose bisphenol A on rat uterine carcinogenesis. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会要旨集(つくば、2001)

吉田 緑、勝田真一、谷本 倫、高橋正一、下元貴澄、田谷一善、中江 大、黒川雄二、前川昭彦：新生仔期オクチルフェノール曝露時間の長さがラット子宮発がんに与える影響。第 18 回日本毒性病理学会要旨集(東京,2001)

H. 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

別添 6.

Ⅲ 研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
菅野 純	子宮肥大試験およびハーシュバーガー試験：原理	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアー・フェアラーク東京	日本	2000	49-54
西川淳一、西原 力	酵母を用いたツーハイブリッド試験	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアー・フェアラーク東京	日本	2000/9/19	p.20-27
高木篤也	幹細胞を用いた検討	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	143-149
永井賢司	子宮肥大試験-幼若ラット法	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	65-69
松島裕子	子宮肥大試験-卵巣摘出法	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	54-64
豊田和弘、広瀬雅雄	28日間連続投与試験	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	76-84
金子豊蔵	ハーシュバーガー試験	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	69-75
長尾哲二	胎児期および新生児期暴露-視床下部神経核の構造変化-	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	163-170
長尾哲二	胎児期および新生児期暴露-生殖行動への影響-	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	179-185
今井田克己、白井智之	発がんプロモーション作用の検討	井上 達 (監修)	内分泌攪乱化学物質の生物学的試験法	シュプリングアーフェアラーク東京	日本	2000	199-204

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Jun Kanno, Lesley Onyon, Joseph Haseman, Penelope Fenner-Crisp, John Ashby, and William Owens	The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase I	Environmental Health Perspectives	109	785-794	2001
B.-I. Yoon, Y. Hirabayashi, T. Kaneko, Y. Kodama, J. Kanno, J. Yodoi, D.Y.Kim, T. Inoue	Transgene Expression of Thioredoxin (TRX/ADF) Protects Against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin(TCDD)-Induced Hematotoxicity	Arch. Environ. Contam. Toxicol	41	232-236	2001
Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Tohru Inoue	Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single injection of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in mice	Chemosphere	43	819-822	2001
菅野 純	ホルモン様化学物質と内分泌攪乱	治療学	34	468-472	2000
Kimie Sai, Jun Kanno, Ryuichi Hasegawa, James E Trosko and Tohru Inoue	Prevention of the down-regulation of gap junctional intercellular communication by green tea in the liver of mice fed pentachlorophenol	Carcinogenesis	21	1671-1676	2000
菅野 純	内分泌攪乱化学物質の生物影響	ファルマシア (日本薬学会)	35	219-223	1999
Mutsunori Fujiwara, Isao Okayasu, Masae Oritsu, Junko Komatsu, Michiyasu Yoshitsugu, Yoshihasa Katoh, Takafumi Bandoh, Hiroshi Toyoshima, Yoshio Kasae, Kunio Sugihara, Jun Kanno, Yuzo Hayashi	Significant Increase in prostaglandin E-Main Urinary Metabolite by Laxative Administration: Comparison with Ulcerative Colitis	Digestion	61	201-206	2000
J. Nishikawa, K. Saito, M. Sasaki, Y. Tomigahara, T. Nishihara	Molecular Cloning and Functional Characterization of a Novel Nuclear Receptor, Similar to an Embryonic Benzoate Receptor BXR.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	277	209-215	2000
T. Nishihara, J. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S.Hori, H. Utsumi	Estrogenic Activities of 517 Chemicals by Yeast Two-Hybrid Assay.	J. Health Sci.	46(4)	282-298	2000
Jun-ichi Nishikawa, Koichi Saito, Jun Goto, Fumi Dakeyama, Masatoshi Matuo, and Tsutomu Nishihara	New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator	Toxicology and Applied Pharmacology	154	76-83	1999
Byung-II Yoon, Yoko Hirabayashi, Yasushi Kawasaki.	Mechanism of action of benzene toxicity: Cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells(CFU-	Experimental Hematology	29	278-285	2001

Yukio Kodama, Toyozo Kaneko, Dae-Yong Kim, and Tohru Inoue	GM)				
Kazuko Yoshida, Tohru Inoue, Yoko Hirabayashi, Kumie Nojima, Toshihiko Sado	Calorie restriction and spontaneous hepatic tumors in C3H/HE mice	The Journal of Nutrition, Health & Aging	3	121-126	1999
Hirokazu Kurata, Chang-Bai Liu, Joulieta Valkova, Alisa E. Koch, Hans Yssel, Yoko Hirabayashi, Tohru Inoue, Takashi Yokota, Ken-ichi Arai	Recombinant Adenovirus Vectors for Cytokine Gene Therapy in Mice	J Allergy Clin Immunol	103	S471-484	1999
Haraguchi S., Kitajima S., Takagi A., Takeda H., Inoue T. and Saga Y	Transcriptional regulation of Mesp1 and Mesp2 genes: Differential usage of enhancers during development.	Mechanisms of Development	108	59-69	2001
Takahashi, Y., Koizumi Ken-ichi, Takagi A., Kitajima S., Inoue T., Koseki H. and Saga Y	Mesp2 initiates somite segmentation through the Notch signalling pathway	Nature genetics,	25	390-396	2000
Kitajima S., Takagi A., Inoue T., and Saga Y.,	Mesp1 and Mesp2 are essential for the development of cardiac mesoderm	Development	127	3215- 3226	2000
Saga, Y., Miyagawa- Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyasaki, J and Inoue, T.	MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube	Development	126	3437- 3447	1999
M.Saitoh, T. Umemura, Y. Kwasaki, J. Momma, Y. Matsushima, et al	Toxicity Study of fa Rubber Antioxidant, Mixture of 2-Mercaptomethyl- benzimidazoles, by Repeated Oral Administration to Rats	Food and Chemical Toxicology	37	777-787	1999
Nagao, T., Wada, K., Marumo, H., Yoshimura, S., Ono,	Reproductive effect of nonylphenol in rats after gavage administration: a two- generation study	Reproductive Toxicology	15	293-315	2001
Nagao, T., Saitoh, Y, Yoshimura, S.,	Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C	Teratology	61	248-261	2000
Nagao, T., Ohta, R., Marumo, H., Shindo, T., Yoshimura, S. and Ono H.	Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague- Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study.	Reproductive Toxicology	14	513-532	2000
Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K. and Ono H	Reproductive effects in male and female rats from neonatal exposure to <i>p</i> - octylphenol	Reproductive Toxicology	15	683-692	2001
Nagao, T., Yoshimura, S., Saito, Y., Nakagomi, M., Usumi, K., Ono, H	Reproductive effects in male and female rats of neonatal exposure to genistein.	Reproductive Toxicology	15	399-411	2001
Nagao, T., Saito, Y.,	Disruption of the reproductive system	Human &	19	284-296	2000

Usumi, K., Nakagomi, M., Yoshimura, S. and Ono, H	and reproductive performance by administration of nonylphenol to newborn rats.	Experimental Toxicology			
Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K.	Hepatic α_{2u} -globulin mRNA levels and diethylstilbestrol-associated testicular atrophy in rats.	Reprod Toxicol.	14(4)	355-357	2000
Takeyoshi M, Anai S, Shinoda K	Changes in serum α_{2u} -globulin levels in male rats given diethylstilbestrol (DES) and their applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals	Arch. Toxicol.	74	48-53	2000
太田 亮、今井 清	動物実験モデルによる新しい評価 法：ラットを用いる子宮重量試験と ハーシュバークー試験	アニテック ス	13	304-312	2001
Okazaki K, Imazawa T, Nakamura H, Furukawa F, Nishikawa A, Hirose M.	A repeated 28-day toxicity study of methyltestosterone in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals.	Arch Toxicol.	75	513-521	2001
Okazaki K, Okazaki S, Nishimura S, Nakamura H, Kitamura Y, Hatayama K, Nakamura A, Tsuda T, Katsumata T, Nishikawa A, Hirose M	A Repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening the endocrine-disrupting chemicals.	Arch Toxicol.	75	513-521	2001
Nagao T, Ohta R, Marumo H, Shindo T, Yoshimura S, Ono H.	Effect of butyl benzyl phthalate in Sprague-Dawley rats after gavage administration: a two-generation reproductive study.	<i>Reprod. Toxicol.</i>	14	513-532	2000
Nagao T, Wada K, Ku wagata M, Ono H.	Effects of prenatal and postnatal exposure to styrene dimmers and trimers on reproductive function in rats.	<i>Reprod. Toxicol.</i>	14	403-415	2000
Nagao, T, Fujikawa K, Ono H.	Two-generation approach to evaluate the reproductive effects of the environmental estrogens, butyl benzyl phthalate and nonylphenol.	<i>Cong. Anom.</i>	40	S121-127	2000
長尾哲二	内分泌かく乱物質の次世代の発生・生 殖への影響	治療学	34	29-33	2000
Nagao T, Saito Y, Usumi K, Nakagomi M, Yoshimura S, Ono H.	Disruption of the reproductive system and reproductive function by administration of nonylphenol to newborn rats.	<i>Human Exp. Toxicol.</i>	19	284-296	2000
Masako Sato, Kazuyoshi Wada, Hideki Marumo, Tetsuji Nagao, Kiyoshi Imai, and Hiroshi Ono	Influence of corn oil and diet on reproduction and the kidney in female Sprague-Dawley rats	Toxicological Sciences	56	156-164	2000
Nagao T, Yoshiaki Saitoh, Shinsuke Yoshimura	Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C	<i>Teratology</i>	61	248-261	2000
Tetsuji Nagao, Sinsuke yoshimura	Oral administration of clomiphene to neonatal rats causes reproductive tract abnormalities	Teratogenesis ,Carcinogene sis. and Mutagenesis			In press