

- Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. In: Toxicogenomics, Inoue, T., and Pennie W.D. eds., Springer (Berlin). pp. 100-106, 2002
- Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 50:1237-1245, 2002
- Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ Mol Mutagen* 39: 271-278, 2002
- Niho, N., Shibutani, M., Toyoda, K., Sato, H., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Hirose, M: Dose- and time- response studies of sodium o-phenylphenate urinary bladder carcinogenicity in rats. *Food Chem Toxicol* 40: 715-722, 2002
- Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, C., Masutomi, N., Nishikawa, A., Hirose, M.: Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital-treatment in a medium-term rat liver bioassay. *Carcinogenesis* 23: 1047-1055, 2002
- Arai, K., Shibutani, M., Matsuda, H.: Distribution of the class II beta-tubulin in developmental and adult rat tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 52:174-182, 2002
- Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press (in press)
- Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* (in press)
- Yonehara, K., Suzuki, M., Nishihara, M.: Sex-related differences in gene expression in neonatal rat hypothalamus assessed by cDNA microarray analysis. *Endocrine J* 49, 131-137, 2002
- Yonehara, K., Suzuki, M., Yamanouchi, K., Nishihara, M.: Androgen induces p130 mRNA expression in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 334, 107-110, 2002
- Futakuchi, M., Hirose, M., Imaida, K., Takahashi, S., Ogawa, K., Asamoto, M., Miki, T., Shirai, T.: Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced colon carcinogenesis by 1-O-hexyl-2,3,5-trimethylhydroquinone after initiation with 1,2-dimethylhydrazine in F344 rats. *Carcinogenesis* 23: 283-287, 2002
- Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Shirai, T.: Effects of genetic background on prostate and taste bud carcinogenesis due to SV40 T antigen expression under probasin gene promoter control. *Carcinogenesis* 23: 463-467, 2002
- Futakuchi, M., Cheng, J. L., Hirose, M., Kimoto, N., Cho, Y.-M., Iwata, T., Kasai, M., Tokudome, S., Shirai, T.: Inhibition of conjugated fatty acids derived from safflower or perilla oil of induction and development of mammary tumors in rats induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Cancer Lett.* 178: 131-139, 2002
- Takahashi, S., Inaguma, S., Cho, Y.-M., Imaida, K., Wang, J., Fujiwara, O., Shirai, T.: Lack of mutation induction with exposure to 1.5 GHz electromagnetic near fields used for cellular phones in brains of big blue mice. *Cancer Res.* 62: 1956-1960, 2002
- Takahashi, S., Inaguma, S., Sakakibara, M., Cho, Y.-M., Suzuki, S., Ikeda, Y., Cui, L., Shirai, T.: DNA methylation in the androgen receptor gene promoter region in rat prostate cancer. *The Prostates* 52: 82-88, 2002
- Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Shirai, T.: A transgenic rat model of prostate carcinogenesis. *J. Toxicol. Pathol.* 15: 191-196, 2002
- Fukushima, S., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Konishi, Y., Tsuda, H., Uehara, N., Imaida, K., Shirai, T., Tatematsu, M., Tsukamoto, T., Hirose, M., Furukawa, F., Wakabayashi, K., Totsuka, Y.: Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or *N*-Nitrosodiethylamine. *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 1076-1082, 2002
- Futakuchi, M., Ogawa, K., Sano, M., Tamano, S., Takeshita, F., Shirai, T.: Suppression of lung metastasis by aspirin but not indomethacin in an *in vivo* model of chemically induced hepatocellular carcinoma. *Jpn. J. Cancer Res.* 93: 1175-1181, 2002
- Shirai, T., Kato, K., Futakuchi, M., Takahashi, S., Suzuki, S., Imaida, K., Asamoto, M.: Organ differences in the enhancing potential of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine on carcinogenicity in the prostate, colon and pancreas. *Mutation Res.* 506-507: 129-136, 2002
- Suzuki, S., Takahashi, S., Asamoto, M., Inaguma, S., Ogiso, T., Hirose, M., Shirai, T.: Lack of modification of

- 2-amino-3, 8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx)-induced hepatocarcinogenesis in rats by fenbendazole - a CYP1A2 inducer. *Cancer Lett.* 185: 39-45, 2002
- Cho, Y.-M., Takahashi, S., Asamoto, M., Suzuki, S., Inaguma, S., Hokaiwado, N., Shirai, T.: Age dependent histopathological findings in the prostate of probasin/SV40 T antigen transgenic rats: Lack of influence of carcinogen or testosterone treatment. *Cancer Sci.* 94:153-157, 2003
- Ito, A., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Shirai, T.: Regulation of cell proliferation by induction of p21/WAF1 in rat bladder carcinoma cells using the Cre-loxP system. *Cancer Sci.* (in press)
- Takeshita, F., Ogawa, K., Asamoto, M., Shirai, T.: Mechanistic approach of contrasting modifying effects of caffeine on carcinogenesis in the rat colon and mammary gland induced with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine., *Cancer Lett.* (in press)
- Kano, K., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Taniguchi, K.: Smad2 and Smad3 accumulate in the nucleus of spermatocytes in the regressed testis of the Syrian hamster. *J Reprod. Dev.* 48: 97-101, 2002
- Sakaue, M., Ishimura, R., Kurosawa, S., Fukuzawa, N., Kurohmaru, M., Hayashi, Y., Tohyama, C., Ohsako, S.: Administration of estradiol-3 benzoate down-regulates the expression of testicular steroidogenic enzyme genes for testosterone production in the adult rat. *J. Vet. Med. Sci.* 64:107-113, 2002
- Awal, M.A., Kurohmaru, M., Mizukami, T., Andriana, B.B., Kanai, Y., Hayashi, Y.: Effect of Bisphenol-A on the Sertoli cell culture from prepubertal male Wistar rats. *The Sciences* 2: 19-23, 2002
- Nakatani, T., Kim, H.-J., Kaburagi, Y., Yasuda, K., Ezaki, O.: A low fish oil feeding inhibits SREBP-1 proteolytic cascade, while a high fish oil feeding decreases SREBP-1 mRNA in mice liver: its relationship to anti-obesity effect. *J. Lipid Res.* (in press)
- Ikeda, S., Miyazaki, H., Nakatani, T., Kai, Y., Kamei, Y., Miura, S., Tsuboyama-Kasaoka, N., Ezaki, O.: Up-regulation of SREBP-1c and lipogenic genes in skeletal muscles after exercise training. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296: 395-400. 2002
- Terada, S., Takizawa, M., Yamamoto, S., Ezaki, O.: Itakura H, Akagawa KS.: Eicosapentaenoic acid inhibits CSF-induced human monocyte survival and maturation into macrophage through the stimulation of H₂O₂ production. *J. Leukoc. Biol.* 71: 981-986, 2002
- Takahashi, M., Tsuboyama-Kasaoka, N., Nakatani, T., Ishii, M., Tsutsumi, S., Aburatani, H., Ezaki, O.: Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPAR α activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 282: G338-G348, 2002
- Nakatani, T., Tsuboyama-Kasaoka, N., Takahashi, M., Miura, S., Ezaki, O.: Mechanism for peroxisome proliferator-activated receptor- α activator-induced up-regulation of UCP2 mRNA in rodent hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 277: 9562-9569, 2002
- 小泉睦子, 江馬 眞, 広瀬雅雄, 大野泰男, 井上 達, 長谷川隆一: DINP の無毒性量と耐容 1 日摂取量の算定. *日本食品化学学会誌*, 9, 39-45, 2002
2. 学会発表
- 榊富直哉, 渋谷 淳, 高木広憲, 畝山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: 内分泌かく乱化学物質の周産期暴露による児動物下垂体前葉のゴナドトロピン陽性細胞数の変動について, 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 第 29 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: p243(P-54), 6 月, 2002
- 畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 有村卓朗, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの多目的な遺伝子解析 (第四報), 第 61 回日本癌学会総会, 東京, 第 61 回日本癌学会総会記事: p411(2863), 10 月, 2002
- 渋谷 淳: マイクロダイセクション法の基礎と毒性病理学への応用, メタカーン固定材料を用いた解析方法について, 日本毒性病理学会主催 平成 14 年度毒性病理教育セミナー, 名古屋, 11 月 28 日, 2002
- 加藤奈津美, 渋谷 淳, 高木広憲, 眞島恵介, 畝山智香子, 井上弘子, 藤田春香, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol 28 日間反復投与時のラット肝臓における遺伝子の網羅的発現解析, 第 19 回日本毒性病理学会, 東京, 第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集: p80(P-59), 1 月, 2003
- 畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 加藤奈津美, 藤田春香, 井上弘子, 広瀬雅雄: メタカーン固定・免疫染色後 microdissection により採取した微小組織領域での突然変異解析, 第 19 回日本毒性病理学会, 東京, 第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集: p45(O-17), 1 月, 2003
- 藤田春香, 高木広憲, 渋谷 淳, 畝山智香子, 井上弘子, 加藤奈津美, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラ

フィン包埋切片における laser microdissection, real-time RT-PCR を用いた微小細胞領域における mRNA 発現解析法の開発, 第 19 回日本毒性病理学会, 東京, 第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集: p79(P-58), 1 月, 2003

高木広憲, 渋谷 淳, 畝山智香子, 李 輝哲, 西原真杉, 三森国敏, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol の周産期曝露により誘発されるラット内分泌・生殖器系の変化に及ぼす genistein の修飾作用の検討, 第 19 回日本毒性病理学会, 東京, 第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集: p74(P-48), 1 月, 2003

Takagi, H., Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K., Hirose, M.: Effects of perinatal exposure of five putative endocrine disrupting chemicals (EDCs), methoxychlor, genistein, diisononylphthalate, 4-nonylphenol and bisphenol A, on endocrine/reproductive systems in rats. 42th Annual Meeting of Society of Toxicology (2003. 3. 9-13), Salt Lake City, Utah, U.S.A., Toxicol. Sci. 72 (No. S-1): 77 (No. 373)

Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Effect of perinatal exposure to environmental endocrine disrupting chemicals on sexual behaviors and serum hormone levels in rats. 5th International Congress of Neuroendocrinology. Bristol, UK, August, 2002.

Suzuki M, Lee H-C, Chiba S, Yonehara K, Yonezawa T, Nishihara M. Perinatal exposure of female rats to environmental endocrine disrupting chemicals interferes with lordosis behavior and LH surge on the proestrous day in adulthood. 32nd Annual Meeting of Society for Neuroscience. Orland, USA, November, 2002.

竹下文隆, 今井田克己, 二口充, 小川久美子, 鈴木周五, 白井智之: 4-Nonylphenol 投与によるラット再生尿細管の増加, 第 19 回日本毒性病理学会, 東京, 2003 年 1 月 23, 24 日. (第 19 回日本毒性病理学会講演要旨集, p.65)

稲熊真悟, 今井田克己, 鈴木周五, 二口充, 加藤浩司, 竹下文隆, 朝元誠人, 白井智之: 前立腺発がん に及ぼす 4-nonylphenol の影響, 第 61 回日本癌学会総会, 東京, 2002 年 10 月 1-3 日. (日本癌学会総会記事 P.359)

竹下文隆, 今井田克己, 小川久美子, 稲熊真悟, 曹永晩, 加藤浩司, 白井智之: DMAB ラット前立腺発がんに対する Nonylphenol と Genistein の影響, 第 61 回日本癌学会総会, 東京, 2002 年 10 月 1-3 日. (日本癌学会総会記事 P.359)

今井則夫, 玉野静光, 市原敏夫, 今井田克己, 白井智之: 内分泌攪乱作用の疑われている Nonylphenol によるラット肝発がん修飾作用および生殖器の形態学的変化, 第 18 回日本毒性病理学会, 東京, 2002 年 1 月 24, 25 日. (第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 44)

堤友子, 吉野裕子, 河部真弓, 今井則夫, 白井智之: 出生児の性成熟期での内分泌攪乱物質(Nonylphenol) の経胎盤あるいは授乳曝露による影響, 第 18 回日本毒性病理学会, 東京, 2002 年 1 月 24, 25 日. (第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 44)

竹下文隆, 小川久美子, 今井田克己, 二口 充, 白井智之: DMAB ラット前立腺発がんに対する Nonylphenol と Genistein の影響, 第 18 回日本毒性病理学会, 東京, 2002 年 1 月 24, 25 日. (第 18 回日本毒性病理学会講演要旨集, p. 93)

Higuchi M, Yamakawa J, Tanaka-Takeuji S, Sekine T, Oka J, Takimoto H, Ezaki O: Effect of swimming training on maximal aerobic capacity of middle-aged and elderly women. The Sixth IOC World Congress on Sport Sciences, 2002. 05. 28, St. Louis, MO. U.S.A.

Yamazaki T, Ezaki O: Effect of endocrine disruptors on lymphocyte responses. DIOXIN2002, 2002. 08. 11, Barcelona

Wu J, Mu G, Yamada K, Higuchi M, Ezaki O, Ishimi Y.: Combined intervention of soy isoflavone and a moderate exercise prevents bone loss and hypercholesterolemia in ovariectomized mice. 日中医学大会 2002, 2002. 11. 04, 北京

Tsuboyama-Kasaoka N, Kamei Y, Miura S, Takahashi M, Ezaki O: LOW LEVEL OVEREXPRESSION OF UCP2 IN ADIPOSE TISSUES UP-REGULATES PGC-1 AND AMELIORATES HIGH FAT DIET-INDUCED OBESITY AND METABOLIC ABNORMALITIES. National Institute of Health and Nutrition, Tokyo, Japan. 9th International congress on obesity, 2002. 08, SAO PAULO

江崎治: ヒトにおける脂質, 糖代謝の側面から. 第 37 回日本循環器管理研究協議会総会・日本循環器病予防学会, 2002.05.30, 東京

江崎治, 仲谷照代: 魚油摂取による中性脂肪, コレステロール低下機序. 第 75 回日本生化学会大会, 2002.10.16, 国立京都国際会館(京都)

呉堅, 王新祥, 山田和彦, 樋口満, 江崎治, 石見佳

子：大豆イソフラボンと運動の併用は骨代謝ばかりでなく脂質代謝も改善する。第 20 回日本骨代謝学会，2002.07.26，岡山

仲谷照代，金賢珠，江崎治：魚油摂取による SREBP-1 を介した脂肪合成抑制のメカニズム。第 34 回日本動脈硬化学会，2002.07.18，神戸

宮崎裕美，笠岡(坪山)宜代，江崎治：運動トレーニングによる骨格筋内の脂肪合成系遺伝子発現の増加機序。第 56 回日本栄養・食糧学会大会，2002.07.20，北海道

笠岡(坪山)宜代，宮崎裕美，江崎治：共役リノール酸 (CLA) の適正摂取条件に関する検討および SREBP1 を介した肝臓脂肪蓄積メカニズムの解析。第 56 回日本栄養・食糧学会大会，2002.07.21，北海道

高橋真由美，笠岡(坪山)宜代，油谷浩幸，江崎治：高脂肪食摂取マウスの白色脂肪細胞における遺伝子発現：ジーンチップを用いた解析。第 56 回日本栄養・食糧学会大会，2002.07.21，北海道

仲谷照代，笠岡(坪山)宜代，高橋真由美，三浦進司，江崎治：PPAR α 活性化を介したマウス及びラット肝実質細胞での UCP2mRNA 発現増加メカニズム。第 56 回日本栄養・食糧学会大会，2002.07.21，北海道

三浦進司，池田仁子，甲斐裕子，亀井康富，江崎治：糖輸送体 GLUT4 発現と転写共役因子 PGC-1 の関連性について。第 56 回日本栄養・食糧学会大会，2002.07.21，北海道

矢島宏昭，柳原恵美子，近藤恵二，笠岡(坪山)宜代，江崎治，及川眞一：ビール苦味成分の肥満抑制作用。第 23 回日本肥満学会，2002.10.04，京都

高橋真由美，笠岡(坪山)宜代，江崎治：高脂肪食による肥満発症機序・白色脂肪細胞における遺伝子発現の検討。第 23 回日本肥満学会，2002.10.04，京都

廣田晃一，杉山みち子，高田和子，平原文子，江崎治：IT を利用した生活習慣改善のための自己学習システムに関する研究--コンピュータシステムの設計と開発--。第 49 回日本栄養改善学会学術総会，2002.11.14，沖縄

杉山みち子，廣田晃一，高田和子，平原文子，江崎治：生活習慣改善のための自己学習システムへのイ

ンターネットの応用：第 22 回医療情報学連合大会，2002.11.15，福岡

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書（平成14年度）

周産期曝露による影響評価研究

分担研究者 渋谷 淳 国立医薬品食品衛生研究所 病理部第二室長

研究要旨：フタル酸／アジピン酸エステル類の周産期曝露による影響評価として、妊娠ラットを用い、妊娠及び哺乳期間中に母ラットへの混餌による経口投与を行い、離乳時及び性成熟後での内分泌・生殖器官の病理組織学的評価により、曝露期間中の標的臓器への直接影響と、性成熟後影響を判別する。また脳の性分化影響について、脳の性分化臨界時期での視床下部での遺伝子発現解析を行う。14年度はまず、di-n-butyl phthalate (DBP)と di-2-ethylhexyl adipate (DEHA) について予備的な用量設定試験を行い、各投与実験の最高用量を決定した。次いで、DBP について予備試験結果をもとに、20, 200, 2000, 10000 ppm の4用量を設定し、妊娠15日目から生後21日目までの間、混餌投与を行った。その結果、現在までのところ、雄性児動物においてDBPによる精巣障害を介したテストステロン・サージの阻害に起因すると考えられる性分化障害を検出すると共に、雌においては、春期発動の遅延、性成熟後での下垂体重量の低値、性周期異常を検出した。このことは、フタル酸エステル類の今まで知られていない雌での生殖機能に対する影響を示唆している。また、雌の児動物で低用量域での体重増加が認められたが、明らかな用量依存性はないものの Mylchreest らの報告結果 (Toxicol. Sci. 55, 143-151, 2000) と類似した現象と考えられ、病理組織学的検索結果等を待って総合的に評価する。

脳の性分化影響については、視床下部の性的二型核 (SDN-POA) を含む内側視索前野 (MPOA) 特異的な microarray 解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を目的に、メタカーン固定法を利用した、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手し、ラット肝臓をメタカーン固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した50 ngの total RNA について poly(A⁺)RNA の増幅効率を検討した。その結果、2回の増幅で poly(A⁺)RNA を50万倍に増幅することに成功した。次いで、この増幅した aRNA を用いて GeneChip[®] Rat Genome U34A Array による microarray 解析を行って、未固定肝組織での解析結果との比較を行った結果、メタカーン固定・パラフィン包埋材料から採取した微量の total RNA を2回増幅しても、比較的忠実性の高い発現データの得られることが判明した。

A. 研究目的

フタル酸／アジピン酸エステルは食料品の包装材料及び医療用具等の多くのプラスチック製品の可塑剤として広く利用され、特に di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) の使用量が多い。ヒトへの曝露として、特に、弁当類の製造過程での手袋からの溶出による DEHP の高濃度曝露が近年問題となり、diisononyl phthalate (DINP) に関しては、乳幼児の長時間に及ぶ mouthing 行動による玩具からの口腔内溶出による曝露が懸念されている。

フタル酸／アジピン酸エステルの毒性として現在問題になっているのは精巣毒性と生殖・発生毒性であり、その活性本体は加水分解代謝産物であるモノエステル体であると考えられている。その毒性発現の機序としては、アンドロジェン受容体との結合を介さない抗アンドロジェン作用による内分泌かく乱作用の存在や PPAR の subtype の関与が示唆されているものの、その分子的な証明は乏しい。また、精巣

障害に関しては幼弱な時期で感受性の高いことが知られており、ヒト新生児では大人に見られるようなグルクロン酸抱合による解毒が未発達であることから、これらの解毒・排泄機構が成人のそれと異なる可能性がある。よって、脳の性分化の臨界期に曝露された場合、化学物質の内分泌かく乱作用の可能性とは別に、未熟な精巣からのテストステロン・サージの阻害による脳の性分化障害が生じ、性成熟後での性行動に影響を与える可能性がある。一方、げっ歯類で見られる精巣毒性がマーモセットやカニクイザルでは見られないとの報告があり、その毒性の感受性に種差の存在する可能性がある。更に、肝臓や腎臓の基礎疾患がある場合、フタル酸エステル類の体内動態に影響を与える可能性が高く、モノエステル体による影響の増強される可能性がある。

以上より、フタル酸／アジピン酸エステルによる毒性発現に関して、感受性の高い胎生期ないし新生時期や基礎疾患等による高感受性状態での曝露影響、

及び霊長類で感受性が低い理由や受容体を介した分子メカニズム等については未解決な部分が多い。本分担研究では、それらのうち、胎生期ないし新生時期での曝露影響についてラットを用いた病理組織学的研究を実施した。初年度である今年度は、*di-n-butyl phthalate* (DBP)と *di-2-ethylhexyl adipate* (DEHA) について予備的な用量設定試験を行い、引き続いて DBP の本実験を実施した。また、脳の性分化影響評価として、視床下部の性的二型核 (SDN-POA) を含む内側視索前野 (MPOA) 特異的な *microarray* 解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を予定している。我々は最近、組織をパラフィン包埋しても RNA や蛋白質の発現解析や DNA の配列解析に未固定凍結組織に準ずるパフォーマンスを保証する組織固定法としてメタカーン固定法を見出し、マイクロダイセクション法により採取された微量組織での発現解析に有効な方法であることを示してきた。そこで今回はメタカーン固定法を利用してパラフィン包埋切片からの MPOA 特異的な *microarray* 解析を行うが、そのためには基礎条件の検討が必要であり、今年度は予備的にパラフィン包埋切片から得られた微量な RNA の増幅効率と、増幅して得られた aRNA を用いて *microarray* 解析を行った際の遺伝子発現情報の忠実性について検討を行った。

B. 研究方法

周産期曝露影響評価として、被検物質を妊娠・授乳期ラットに投与し、児動物への影響の評価を行った。被検物質は、想定されるヒトへの曝露形態を考慮して、飼料に混じて母動物に摂取させることにより経胎盤・経乳的に児動物に曝露した。まず最初に、妊娠 SD:IGS ラットを用いて、今後検索予定の DBP (5000, 10000, 15000 ppm)と DEHA (6000, 12000, 18000 ppm)について、妊娠 15 日目から出産 21 日目までの間の混餌投与による予備的な用量設定試験を行った。曝露期間での母動物体重・摂餌量、出生児数、出生時体重、出生児の体重増加率、離乳時体重・生存率を指標に検討した結果、DBP については 10000 ppm、DEHA は 12000 ppm を妊娠・保育を維持できる最大耐量と判断し、各々の投与実験の最高用量とした。引き続き、DBP について、20, 200, 2000, 10000 ppm の 4 用量を設定し、妊娠 15 日目から出産 21 日目までの間、混餌投与を行い、投与終了時と 11 週目及び 20 週目の解剖を終了した (Fig. 1)。被検物質投与のための基礎飼料は、大豆由来の phytoestrogen を除いた SF (NIH-07 変型) 飼料を用いた。離乳後は、通常的基础飼料に切り替えて児動

物を飼育した。In life parameter としては、母動物の体重、摂餌量の推移、出生児数及び雄性児率、生後 2 日目での体重と肛門・生殖突起間距離 (AGD)、雄性児での生後 14 日目での乳頭・乳輪の出現、春期発動、児動物体重の推移を経時的に検索した。生後 3 週の解剖時には、肝、腎、脳、副腎、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、乳腺を採材し、乳腺以外の臓器に関して臓器重量を測定した。精巣はブアン固定を行い、他の臓器はホルマリン固定を行った。11 及び 20 週目には更に、前立腺、精嚢 (+凝固腺)、下垂体の重量をホルマリン固定後に測定した。今後、各時期での解剖例の病理組織学的検討とともに、血清ホルモンの測定や下垂体ホルモンの免疫染色を予定している。

また、フタル酸エステル類による脳の性分化影響評価に関しては、MPOA での内分泌かく乱遺伝子指標を得る目的で、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析法の開発研究に着手した。予備的な検討として、発現誘導遺伝子の特性がよく検索されている phenobarbital (PB)を 80 mg/kg/日、3 回、連日投与したラットの肝臓を用い、メタカーン固定・パラフィン包埋後、10 μ m の薄切片を作製し、脱パラフィン後、total RNA を調製した。抽出した 50 ng の total RNA から poly(A)⁺ RNA の増幅を Message AmpTM aRNA キット (Ambion)を用いて 2 回行い、変性後 Affymetrix GeneChip[®] Rat Genome U34A Array とハイブリダイズし、発現遺伝子数などについて解析を行った (Fig. 2)。比較の対照として、同一動物の未固定凍結肝組織から直接調製した total RNA から、1 回増幅、2 回増幅して得られた aRNA を用いた。

(倫理面への配慮)

投与実験は混餌による経口投与が主体であり、動物の苦痛を最小限に留めた。また、動物はすべてエーテル深麻酔下で大動脈からの脱血により屠殺し、動物に与える苦痛は最小限に留めた。また、動物飼育、管理に当たっては、研究所の利用規程に従った。

C. 研究結果

DBP の投与期間中の母動物における体重と摂餌量は、対照群を含めて群間に明らかな差を認めなかった (Fig. 3, 4)。即ち、DBP は用量に依存して母動物に摂取されていた (Table 1)。また、妊娠期間、リッターサイズには群間に差は認めなかったものの、雄性出生児率は 2000 ppm より有意な低下を示した。更に、有意差はないものの、児動物の生後 2 日目における体重は 10000 ppm 群で低値傾向を示した。そ

の日における AGD は雌では変動を認めなかったものの、雄では 10000 ppm 群で有意に短縮した (Table 1). 生後 14 日目の雄性児動物における乳頭・乳輪の出現は、2000 ppm から用量依存的に増加し、10000 ppm で有意に増加した (Table 2). 春期発動の時期に関しては、雄では 200 ppm 群で早く認められた。また、発動を示した時期の体重は 10000 ppm 群で増加したものの、この群では発動時期に変動を認めなかった。雌では 10000 ppm 群で春期発動は遅延し、発動時期の体重は用量依存性はないものの、200 ppm 以上で増加を示した (Table 3). 離乳時 (3 週齢) の解剖では雌雄共に有意差はないものの 10000 ppm 群で体重の低値を認めた。また、雄では 10000 ppm 群で肝、脳、副腎の相対重量の増加、精巣の相対重量の低下を認めた。雌では、雄と同様に肝臓の相対重量の増加を認めた (Table 4). 生後の児動物体重の推移として、雄では生後 11 週目に 200 ppm 群での増加が認められたのみであった (Table 5). 雌では 200 ppm 群で生後 17 日目から 11 週にかけて体重増加を認め、20 ppm 群でも同様に生後 17 日目から 4 週にかけて高値を示した (Table 6). 11 週齢時の解剖では、雌雄とも明らかな体重の変動を検出しなかった。臓器重量に関しては、雄の 10000 ppm 群で腎相対重量の若干の低値を認め、明らかな用量依存性はないものの、20, 200, 2000 ppm 群で下垂体相対重量の増加を認めた。また、200 ppm 群で腹側前立腺相対重量が増加を示した (Table 7). 雌では 10000 ppm で明らかな下垂体重量の低下を認めた (Table 7). 雄の児動物のうち、10000 ppm 群で生後 11 週齢までの間、死亡例が増加し、生後 20 週目の解剖時に必要な匹数が得られなかった。20 週目の解剖時では、雌雄共に DBP 投与に起因した体重変動は認められなかった (Table 8). 臓器重量に関しては、雌の下垂体の相対重量が 200 ppm 以上の群でほぼ用量依存的に低下を示した。性周期の変動を生後 8-11 週の間と 17-20 週の間で検討した結果、8-11 週の間で有意差はないものの休止期の延長を示す例が 2000 ppm 群で 8 例中 2 例、10000 ppm で 8 例中 4 例と増加した。17-20 週の間では 2000 ppm 群で 10 例中 3 例が休止期の延長を示した (Table 9).

メタカーン固定法を利用した、パラフィン包埋切片中の微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手し、PB 投与したラット肝臓を用いて、メタカーン固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した 50 ng の total RNA から得られた aRNA の増幅効率の最適化を検討した (Fig. 2). その結果、2 回の増幅で poly(A⁺) RNA を 50 万倍に増幅することに

成功した。次いで、この増幅された aRNA を用いて GeneChip による解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った (Table 10-12, Fig. 5, 6). まず、搭載遺伝子のうち、発現が presence call あるいは absence call を示す遺伝子数と発現が marginal である遺伝子数について、未固定組織から調製した total RNA の 1 回増幅及び 2 回増幅サンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片から得られた total RNA の 2 回増幅サンプルを比較した結果、サンプル間でそれぞれに分類される遺伝子数に大きな違いは認められなかった (Table 10). また、5'末端から 3'末端にかけて広くプローブが設定されている GAPDH 遺伝子の 3'/5'のシグナル比を検討した結果、未固定組織の 1 回増幅サンプル (組織のマイクロアレイ解析に通常用いられる方法で調製されたサンプル) ではシグナル比がほぼ 1 であったのに対して、2 回増幅したサンプルでは、固定・包埋の有無を問わず、3'側のシグナルが強く現れていた (Table 10). 次に、未固定組織で 1 回ないし 2 回増幅したサンプルと、メタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅サンプルから得られた発現データについて相関を比較した結果、2 回増幅したサンプル同士の比較では、非補正データでの比較及び normalize したデータでの比較ともに高い相関係数が得られた (Fig. 5, Table 11). 一方、1 回増幅と 2 回増幅したものの非補正データでの比較では、メタカーン固定・パラフィン包埋の有無に関わらず、2 回増幅例同士の比較に比べて若干相関係数が低く現れたが、normalize したデータでの比較ではメタカーン固定・パラフィン包埋した切片から調製した aRNA と未固定組織での 1 回増幅 aRNA サンプルの間の相関は高い ($R_2=0.91$) という結果が得られた (Table 11). また、2 回増幅例同士 (未固定組織 vs. メタカーン固定・パラフィン包埋切片) での発現に差のある遺伝子はなかったものの、1 回増幅例と 2 回増幅例での発現データで発現に有意差を伴った違いを示した遺伝子数は、固定・包埋の有無を問わず、全体の 20-30% に及ぶことが明らかとなった (Table 11). 次に、未固定組織の 1 回ないし 2 回増幅サンプルとメタカーン固定・パラフィン包埋切片で 2 回増幅して得られた aRNA サンプルのそれぞれの間で、発現が共通している遺伝子と各々でのみ発現している遺伝子の数を求めた結果、2 回増幅例特異的に発現が変動する遺伝子が 330-370 程度であり、未固定組織で 1 回増幅したもので 800 前後の遺伝子であった (Fig. 6). これらの遺伝子のうち、3'末端の遺伝子情報が明らかなものにつき、プローブと poly(A⁺) tail 間の距離を求めた結果、未固定組織

の1回増幅例のみで発現していた遺伝子は、2回増幅サンプルのみで発現していた遺伝子に比べ、プローブ・poly(A⁺) tail 間距離の短いことが明らかとなった (Table 12).

フタル酸エステル類の混餌投与による脳の性分化影響を検索するために、抗アンドロジェン作用を示すフルタミドの単回投与 (250 μg/pup, 皮下投与, 生後1日目)を陽性対照として、フタル酸エステル類のうち最も毒性が強い DEHP について妊娠15日からの混餌投与 (6000 ppm)を行った (Fig. 7). これらの児動物につき、生後2日目での視床下部 MPOA 特異的な microarray 解析を行う予定であるが、一部の動物についてはメタカーン固定・パラフィン包埋切片からマイクロダイセクションによる MPOA 組織の回収を開始した。

D. 考察

周産期曝露影響評価として、今年度は DBP の評価を行い、その動物実験は終了した。現在まで得られた結果として、雄性出生児率は 2000 ppm より有意な低下を示した。しかし、群間で明らかなリッターサイズの変動を認めなかったことから、対照群で雄性出生児率が高いことに起因していると考えられた。また、雄性児動物の生後3週時における精巣重量の低値は、この化合物の精巣を標的とした毒性を反映した結果と考えられる。また、この時期における雌雄の肝重量の高値は、この化学物質のペルオキシゾーム増殖作用による肝肥大によるものと考えられた。更に、これら雄性児動物での AGD の短縮、乳頭・乳輪の出現等の変化は幼若期の精巣障害に起因したテストステロン・サージの阻害作用に因るものと考えられた。

雌で認められた春期発動の遅延、性成熟後での下垂体重量の低値、性周期異常は、フタル酸エステル類の今まで知られていない雌での生殖機能に対する影響を示唆している。また、雌の児動物で認められた低用量での体重増加は、明らかな用量依存性はないものの Mylchreest らの報告 (Toxicol. Sci. 55, 143-151, 2000) でも認められており、類似した現象と考えられるが、NOAEL の策定も含め評価については、病理組織学的検索結果等を待って総合的に行う。

脳の性分化影響については、視床下部 MPOA 特異的な microarray 解析による性分化障害の指標遺伝子群の探索を目的としているが、その予備的な検討として、メタカーン固定法を利用して、パラフィン包埋切片を用いた微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析の開発に着手し、ラット肝臓をメタカーン

固定・パラフィン包埋後、切片より採取・回収した 50 ng の total RNA から poly(A⁺) RNA の増幅効率を検討し、2回の増幅で poly(A⁺) RNA を 50 万倍に増幅することに成功した。次いで、この増幅された aRNA を用いて GeneChip による解析を行い、未固定肝組織での解析結果との比較を行った結果、メタカーン固定・パラフィン包埋しても、比較的忠実性の高い発現データが得られることが分かった。また、未固定肝組織を用いた場合と発現レベルの食い違う遺伝子は、設定されたプローブの3'末端からの距離が異なり、その食い違いはメタカーン固定・パラフィン包埋による影響ではなく、aRNA の2回増幅による影響であることが判明した。

E. 結論

周産期曝露影響評価として、今年度は DBP の評価を行った結果、雄性児動物において曝露による精巣障害に起因した抗アンドロジェン作用による変化を検出すると共に、雌においては、春期発動の遅延、性成熟後での下垂体重量の低値、性周期異常を検出した。このことは、フタル酸エステル類の今まで知られていない雌での生殖機能に対する影響を示唆している。また、雌の児動物で認められた低用量での体重増加は、明らかな用量依存性はないものの Mylchreest らの報告でも認められており、類似した現象と考えられるが、病理組織学的検索結果等を待って総合的に評価する。

また、パラフィン包埋切片での微小組織領域特異的な網羅的遺伝子発現解析に関する予備的検討の結果、パラフィン切片中の微量の RNA 分子を高い忠実性をもって増幅することに世界で初めて成功した。この技術を利用した網羅的遺伝子発現解析法が確立された場合、神経科学や発がんの分野のみならず、多くの分野での利用が期待できる。今後、フルタミドやフタル酸エステルにつき MPOA での遺伝子発現プロファイルを検索し、抗アンドロジェン作用による脳の性分化障害に関する発現クラスターの同定を予定している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn a fixation tool for multipurpose genetic analysis from paraffin-embedded tissues. In: Methods Enzymol, M. Conn (ed.) Academic Press (New York). Vol. 356, pp. 114-125, 2002

Shibutani, M., Uneyama, C., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Application of methacarn fixation for genetic analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. In: Toxicogenomics, Inoue, T., and Pennie W.D. eds., Springer (Berlin). pp. 100-106, 2002

Uneyama, C., Shibutani, M., Masutomi, N., Takagi, H., Hirose, M.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected paraffin-embedded tissue specimens. *J Histochem Cytochem* 50:1237-1245, 2002

Hirose, M., Nishikawa, A., Shibutani, M., Imai, T., Shirai, T.: Chemoprevention of heterocyclic amine-induced mammary carcinogenesis in rats. *Environ Mol Mutagen* 39: 271-278, 2002

Niho, N., Shibutani, M., Toyoda, K., Sato, H., Imaida, K., Takahashi, M., Hayashi, Y., Hirose, M.: Dose- and time- response studies of sodium *o*-phenylphenate urinary bladder carcinogenicity in rats. *Food Chem Toxicol* 40: 715-722, 2002

Shibutani, M., Takahashi, N., Kobayashi, T., Uneyama, C., Masutomi, N., Nishikawa, A., Hirose, M.: Molecular profiling of genes up-regulated during promotion by phenobarbital-treatment in a medium-term rat liver bioassay. *Carcinogenesis* 23: 1047-1055, 2002

Arai, K., Shibutani, M., Matsuda, H.: Distribution of the class II beta-tubulin in developmental and adult rat tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* 52:174-182, 2002

Shibutani, M., Uneyama, C.: Methacarn fixation for genomic DNA analysis in microdissected cells. In: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press (in press).

Masutomi, N., Shibutani, M., Takagi, H., Uneyama, C., Takahashi, N., Hirose, M.: Impact of dietary exposure to methoxychlor, genistein, or diisononyl phthalate during the perinatal period on the development of the rat endocrine/reproductive systems in later life. *Toxicology* (in press).

2. 学会発表

榎富直哉, 渋谷 淳, 高木広憲, 畝山智香子, 高橋則行, 有村卓朗, 広瀬雅雄: 内分泌かく乱化学物質の周産期暴露による児動物下垂体前葉のゴナドトロピン陽性細胞数の変動について, 第29回日本トキシコロジー学会学術年会, 名古屋, 第29回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集: P243 (P-54), 2002.6

畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 有村卓朗, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片からの多目的な遺伝子解析 (第四報), 第61回日本癌学会総会, 東京, 第61回日本癌学会総会記事: P411 (2863), 2002.10

渋谷 淳: マイクロダイセクション法の基礎と毒性病理学への応用, メタカーン固定材料を用いた解析方法について, 日本毒性病理学会主催平成14年度毒性病理教育セミナー, 名古屋, 2002.11.28

加藤奈津美, 渋谷 淳, 高木広憲, 眞島恵介, 畝山智香子, 井上弘子, 藤田春香, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol 28日間反復投与時のラット肝臓における遺伝子の網羅的発現解析, 第19回日本毒性病理学会, 東京, 第19回日本毒性病理学会講演要旨集: p80 (P-59), 2003.1

畝山智香子, 渋谷 淳, 高木広憲, 加藤奈津美, 藤田春香, 井上弘子, 広瀬雅雄: メタカーン固定・免疫染色後 microdissection により採取した微小組織領域での突然変異解析, 第19回日本毒性病理学会, 東京, 第19回日本毒性病理学会講演要旨集: p45 (O-17), 2003.1

藤田春香, 高木広憲, 渋谷 淳, 畝山智香子, 井上弘子, 加藤奈津美, 広瀬雅雄: メタカーン固定・パラフィン包埋切片における laser microdissection, real-time RT-PCR を用いた微小細胞領域における mRNA 発現解析法の開発, 第19回日本毒性病理学会, 東京, 第19回日本毒性病理学会講演要旨集: p79 (P-58), 2003.1

高木広憲, 渋谷 淳, 畝山智香子, 李 輝哲, 西原真杉, 三森国敏, 広瀬雅雄: Ethinylestradiol の周産期曝露により誘発されるラット内分泌・生殖器系の変化に及ぼす genistein の修飾作用の検討, 第19回日本毒性病理学会, 東京, 第19回日本毒性病理学会講演要旨集: p74 (P-48), 2003.1

Takagi, H., Shibutani, M., Masutomi, N., Uneyama, C., Takahashi, N., Mitsumori, K., Hirose, M.: Effects of perinatal exposure of five putative endocrine disrupting chemicals (EDCs), methoxychlor, genistein, diisononylphthalate, 4-nonylphenol and bisphenol A, on endocrine/reproductive systems in rats. 42th Annual Meeting of Society of Toxicology (2003. 3. 9-13), Salt Lake City, Utah, U.S.A., *Toxicol. Sci.* 72 (No. S-1): 77 (No. 373)

H. 知的所有権の取得状況
特になし。

Table 1. Maternal intake of DBP, duration of pregnancy, litter size, and anogenital distance at PND 2 of offspring

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Maternal intake of DBP (mg/kg/day)					
GD 15 – GD 20	0	1.6	14.9	260.0	878.6
PND 2 – PND 10	0	2.6	24.6	267.3	1298.6
Duration of pregnancy (days)	21.3 ± 0.5	21.5 ± 0.5	21.6 ± 0.5	21.3 ± 0.5	21.3 ± 0.5
No. of total litters	13.4 ± 2.1	11.3 ± 2.6	13.1 ± 2.0	12.4 ± 1.7	12.4 ± 1.9
Ratio. of male litter (%)	64.6 ± 13.5	51.3 ± 16.5	49.5 ± 12.5	43.9 ± 15.7*	33.7 ± 20.0**
B.W. of male at PND2 (g)	6.8 ± 0.6	7.5 ± 0.6	7.3 ± 0.8	7.0 ± 0.7	6.3 ± 0.6
B.W. of female at PND2 (g)	6.5 ± 0.6	7.2 ± 0.7	7.0 ± 0.8	6.5 ± 0.6	5.8 ± 0.5
AGD-male at PND2 (mm)	3.77 ± 0.21	3.93 ± 0.21	3.92 ± 0.29	3.77 ± 0.15	3.03 ± 0.11**
AGD-female at PND2 (mm)	2.13 ± 0.06	2.15 ± 0.12	2.10 ± 0.12	2.12 ± 0.14	2.12 ± 0.11

***: Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 2. Appearance of nipples/areolae in the male pups at PND 14 in the DBP study

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Incidence	0/21 (0%)	1/25 (4%)	2/16 (13%)	4/27 (15%)	15/15 (100%)**
No. of nipples and areolae/pup	0	1	1	1.8 ± 1.0	4.1 ± 2.5*
BW of identified animals (g)	-	32.3	32.8	32.0 ± 3.9	29.4 ± 6.0

***: Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 3. Onset of puberty in male and female offspring perinatally exposed to DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Males					
Age (day)	42.1 ± 1.3	41.3 ± 1.5	40.8 ± 1.2*	41.7 ± 1.6	42.6 ± 1.8
BW (g)	186.7 ± 14.2	187.5 ± 12.5	190.9 ± 14.8	191.7 ± 14.2	203.6 ± 18.0**
Females					
Age (day)	34.1 ± 1.8	33.6 ± 1.9	34.2 ± 2.1	34.8 ± 2.1	35.6 ± 2.0*
BW (g)	102.4 ± 10.8	108.3 ± 12.0	115.7 ± 12.8**	114.8 ± 14.5**	112.1 ± 17.3*

***: Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 5. Body weight changes in male pups during the feeding study of DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
PND 2	6.8 ± 0.6	7.5 ± 0.6	7.3 ± 0.8	7.0 ± 0.7	6.3 ± 0.6
PND 4	8.8 ± 1.0	9.6 ± 1.1	9.0 ± 0.6	9.0 ± 0.9	8.1 ± 1.0
PND 7	14.0 ± 1.6	14.9 ± 2.8	13.9 ± 1.3	14.3 ± 2.0	12.3 ± 2.1
PND 10	19.8 ± 3.0	19.8 ± 5.3	21.2 ± 1.6	21.0 ± 2.4	17.7 ± 4.6
PND 17	36.3 ± 4.4	38.7 ± 2.1	42.4 ± 3.3	36.7 ± 4.6	36.5 ± 7.3
PNW 3	45.6 ± 5.5	46.5 ± 3.5	48.7 ± 3.6	45.7 ± 6.8	45.0 ± 8.8
PNW 4	80.8 ± 7.5	83.3 ± 4.8	86.1 ± 7.4	82.6 ± 9.4	82.8 ± 9.9
PNW 5	128.0 ± 9.3	129.9 ± 67.2	137.7 ± 10.4	131.6 ± 11.0	133.7 ± 19.5
PNW 6	185.5 ± 10.8	188.8 ± 9.2	199.0 ± 13.5	192.2 ± 17.7	194.9 ± 27.2
PNW 7	248.9 ± 16.2	253.2 ± 13.0	262.8 ± 15.4	255.7 ± 23.5	263.0 ± 27.4
PNW 8	305.8 ± 20.5	308.5 ± 16.4	319.7 ± 20.2	312.8 ± 27.8	312.7 ± 29.4
PNW 9	340.1 ± 19.8	349.7 ± 19.1	357.6 ± 25.9	350.3 ± 32.0	363.9 ± 28.7
PNW 10	370.6 ± 28.6	377.2 ± 27.1	396.3 ± 30.8	380.2 ± 39.7	399.3 ± 26.1
PNW 11	391.3 ± 33.2	398.9 ± 30.8	424.9 ± 35.2*	399.3 ± 53.2	419.9 ± 27.8
PNW 20	541.1 ± 66.3	582.5 ± 55.0	612.3 ± 79.7	567.3 ± 61.7	Not available

*: Significantly different from the controls (p<0.05).

Table 6. Body weight changes in female pups during the feeding study of DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
PND 2	6.5 ± 0.6	7.2 ± 0.7	7.0 ± 0.8	6.5 ± 0.6	5.8 ± 0.5
PND 4	8.3 ± 1.0	9.3 ± 1.3	8.7 ± 0.6	8.6 ± 0.7	7.5 ± 0.9
PND 7	13.3 ± 1.8	14.2 ± 3.2	14.2 ± 1.4	13.7 ± 2.0	11.8 ± 2.0
PND 10	18.9 ± 3.3	20.3 ± 5.3	20.0 ± 2.8	19.9 ± 3.0	17.7 ± 3.5
PND 17	31.5 ± 5.2	38.8 ± 3.6**	39.1 ± 2.1**	35.6 ± 4.7	33.5 ± 4.0
PNW 3	40.3 ± 7.8	47.4 ± 3.9**	47.2 ± 3.5*	43.1 ± 6.6	42.2 ± 8.0
PNW 4	70.7 ± 8.1	75.5 ± 15.8*	80.6 ± 5.5**	75.5 ± 8.9	69.8 ± 12.6
PNW 5	107.1 ± 8.2	112.5 ± 10.1	117.0 ± 8.8**	113.2 ± 10.9	108.0 ± 16.2
PNW 6	150.0 ± 10.2	156.2 ± 11.2	162.2 ± 12.3*	156.0 ± 12.6	148.6 ± 18.0
PNW 7	180.5 ± 11.0	186.2 ± 13.6	195.7 ± 16.9**	189.5 ± 16.3	181.3 ± 18.0
PNW 8	204.2 ± 12.0	208.6 ± 19.1	218.7 ± 18.8*	208.8 ± 15.8	192.7 ± 23.8
PNW 9	222.6 ± 14.5	234.9 ± 18.2	248.0 ± 22.7**	234.0 ± 25.6	229.3 ± 20.6
PNW 10	245.7 ± 15.8	253.4 ± 19.8	272.2 ± 28.1**	257.3 ± 28.7	250.5 ± 21.8
PNW 11	262.0 ± 17.5	265.2 ± 17.7	288.3 ± 32.0*	273.3 ± 31.5	260.4 ± 23.9
PNW 20	339.5 ± 34.5	346.5 ± 24.0	372.5 ± 48.6	378.7 ± 50.3	339.2 ± 49.1

*, **: Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 4. Relative organ weights at PND 21 of offspring exposed perinatally to DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Males					
No. of animals examined	8	8	8	8	8
Body weight (g)	52.9 ± 7.0	49.8 ± 3.9	52.8 ± 3.3	55.5 ± 4.8	46.7 ± 3.0
Liver (g/100 g b.w.)	3.66 ± 0.20	3.47 ± 0.29	3.67 ± 0.08	3.81 ± 0.17	4.72 ± 0.25**
Kidneys (g/100 g b.w.)	1.07 ± 0.06	1.04 ± 0.06	1.09 ± 0.07	1.11 ± 0.07	1.10 ± 0.04
Brain (g/100 g b.w.)	2.80 ± 0.35	3.00 ± 0.11	2.80 ± 0.24	2.72 ± 0.22	3.13 ± 0.22*
Adrenals (mg/100 g b.w.)	28.87 ± 5.38	25.23 ± 3.80	23.57 ± 7.84	24.11 ± 7.35	30.88 ± 4.54
Testes (g/100 g b.w.)	0.43 ± 0.03	0.41 ± 0.04	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.35 ± 0.03*
Epididymides (g/100 g b.w.)	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01
Females					
No. of animals examined	8	8	8	8	8
Body weight (g)	50.2 ± 7.2	50.3 ± 6.4	50.9 ± 4.8	49.2 ± 10.0	44.0 ± 6.1
Liver (g/100 g b.w.)	3.81 ± 0.23	3.56 ± 0.20	3.86 ± 0.15	3.73 ± 0.15	4.82 ± 0.26**
Kidneys (g/100 g b.w.)	1.11 ± 0.09	1.08 ± 0.05	1.17 ± 0.05	1.23 ± 0.16	1.13 ± 0.05
Brain (g/100 g b.w.)	2.88 ± 0.33	2.87 ± 0.28	2.87 ± 0.26	3.03 ± 0.76	3.26 ± 0.55
Adrenals (mg/100 g b.w.)	29.39 ± 5.76	27.44 ± 6.79	29.04 ± 6.02	23.95 ± 4.54	28.80 ± 6.02
Ovaries (g/100 g b.w.)	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.04	0.03 ± 0.01
Uterus (g/100 g b.w.)	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01

***: Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 7. Relative organ weights at PNW 11 of offspring exposed perinatally to DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Males					
No. of animals examined	8	8	8	8	10
Body weight (g)	398.0 ± 15.8	398.1 ± 24.7	429.8 ± 29.8	410.3 ± 51.9	424.8 ± 32.4
Liver (g/100 g b.w.)	3.41 ± 0.20	3.36 ± 0.21	3.38 ± 0.27	3.40 ± 0.30	3.38 ± 0.21
Kidneys (g/100 g b.w.)	0.69 ± 0.04	0.66 ± 0.03	0.68 ± 0.05	0.67 ± 0.04	0.61 ± 0.04**
Brain (g/100 g b.w.)	0.50 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.47 ± 0.04	0.50 ± 0.06	0.49 ± 0.03
Pituitary (mg/100 g b.w.)	2.50 ± 0.29	2.90 ± 0.20*	2.98 ± 0.25*	3.04 ± 0.29**	2.77 ± 0.41
Adrenals (mg/100 g b.w.)	13.60 ± 1.71	12.30 ± 1.19	13.58 ± 1.40	12.15 ± 1.64	11.88 ± 2.34
Testes (g/100 g b.w.)	0.79 ± 0.03	0.80 ± 0.06	0.77 ± 0.09	0.84 ± 0.12	0.73 ± 0.14
Epididymides (g/100 g b.w.)	0.24 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.19 ± 0.06
Prostate, ventral (g/100 g b.w.)	0.12 ± 0.03	0.16 ± 0.02	0.17 ± 0.03**	0.15 ± 0.05	0.13 ± 0.03
Prostate, dorso-lateral (g/100 g b.w.)	0.42 ± 0.06	0.44 ± 0.03	0.47 ± 0.05	0.42 ± 0.07	0.38 ± 0.08
Seminal vesicle (g/100 g b.w.)	0.30 ± 0.05	0.29 ± 0.02	0.32 ± 0.04	0.25 ± 0.11	0.26 ± 0.05
Females					
No. of animals examined	8	8	8	8	8
Body weight (g)	267.6 ± 16.7	267.2 ± 21.5	286.6 ± 33.7	270.5 ± 39.9	270.9 ± 18.2
Liver (g/100 g b.w.)	3.41 ± 0.17	3.39 ± 0.23	3.72 ± 0.20	3.52 ± 0.51	3.28 ± 0.24
Kidneys (g/100 g b.w.)	0.64 ± 0.08	0.67 ± 0.06	0.66 ± 0.04	0.67 ± 0.06	0.62 ± 0.05
Brain (g/100 g b.w.)	0.69 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.67 ± 0.09	0.71 ± 0.08	0.69 ± 0.03
Pituitary (mg/100 g b.w.)	5.42 ± 0.68	5.24 ± 0.59	5.04 ± 0.54	4.94 ± 0.52	3.48 ± 0.54**
Adrenals (mg/100 g b.w.)	23.14 ± 2.78	21.57 ± 2.53	23.26 ± 2.75	21.39 ± 2.55	21.55 ± 2.12
Ovaries (g/100 g b.w.)	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.01	0.04 ± 0.01
Uterus (g/100 g b.w.)	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.03	0.16 ± 0.03	0.18 ± 0.03	0.18 ± 0.03

*. **. Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 8. Relative organ weights at PNW 20 of offspring exposed perinatally to DBP

	Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
Males					
No. of animals examined	10	10	8	10	-
Body weight (g)	541.1 ± 66.3	582.5 ± 55.0	612.3 ± 72.7	567.3 ± 61.7	Not available
Liver (g/100 g b.w.)	2.82 ± 0.15	2.92 ± 0.29	3.12 ± 0.23	2.94 ± 0.37	Not available
Kidneys (g/100 g b.w.)	0.59 ± 0.03	0.59 ± 0.05	0.60 ± 0.05	0.57 ± 0.05	Not available
Brain (g/100 g b.w.)	0.39 ± 0.05	0.37 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.38 ± 0.04	Not available
Pituitary (mg/100 g b.w.)	2.69 ± 0.32	2.70 ± 0.45	2.73 ± 0.42	2.76 ± 0.24	Not available
Adrenals (mg/100 g b.w.)	10.59 ± 1.69	9.17 ± 1.62	9.85 ± 1.51	10.35 ± 2.91	Not available
Testes (g/100 g b.w.)	0.67 ± 0.08	0.62 ± 0.09	0.58 ± 0.07	0.67 ± 0.09	Not available
Epididymides (g/100 g b.w.)	0.26 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.03	Not available
Prostate, ventral (g/100 g b.w.)	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.12 ± 0.02	Not available
Prostate, dorso-lateral (g/100 g b.w.)	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.02	Not available
Seminal vesicle (g/100 g b.w.)	0.30 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.05	Not available
Females					
No. of animals examined	10	10	10	10	10
Body weight (g)	339.5 ± 34.5	346.5 ± 24.0	372.5 ± 48.6	378.7 ± 50.3	339.2 ± 49.1
Liver (g/100 g b.w.)	2.76 ± 0.11	2.87 ± 0.13	2.71 ± 0.28	2.79 ± 0.17	2.79 ± 0.34
Kidneys (g/100 g b.w.)	0.52 ± 0.05	0.56 ± 0.05	0.54 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.51 ± 0.05
Brain (g/100 g b.w.)	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.05	0.55 ± 0.07	0.53 ± 0.07	0.59 ± 0.07
Pituitary (mg/100 g b.w.)	6.03 ± 0.87	5.71 ± 0.83	5.04 ± 0.77*	5.04 ± 0.68*	4.64 ± 0.80**
Adrenals (mg/100 g b.w.)	18.52 ± 4.16	19.63 ± 2.27	20.05 ± 3.57	17.54 ± 4.33	17.09 ± 3.01
Ovaries (mg/100 g b.w.)	28.01 ± 4.77	28.05 ± 3.82	23.16 ± 4.00	26.54 ± 4.62	24.53 ± 4.84
Uterus (g/100 g b.w.)	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.02	0.15 ± 0.03	0.13 ± 0.03	0.16 ± 0.03

* ** : Significantly different from the controls (*, p<0.05; **, p<0.01).

Table 9. Estrous cyclicity during PNW 8-11 and PNW 17-20 of female offspring perinatally exposed to DBP

PNW 8-11		Control	20 ppm	200 ppm	2000 ppm	10000 ppm
No. of animals examined		8	8	8	8	8
Normal		7	7	7	6	4
Irregular (Extended diestrus)		1	1	1	2	4
PNW 17-20						
No. of animals examined		10	10	10	10	10
Normal		9	9	9	7	9
Irregular	Extended diestrus	1	1	0	3	1
	Extended estrus	0	0	1	0	0

ANIMAL SPECIES: RAT STRAIN: Crj:CD(SD)IGS

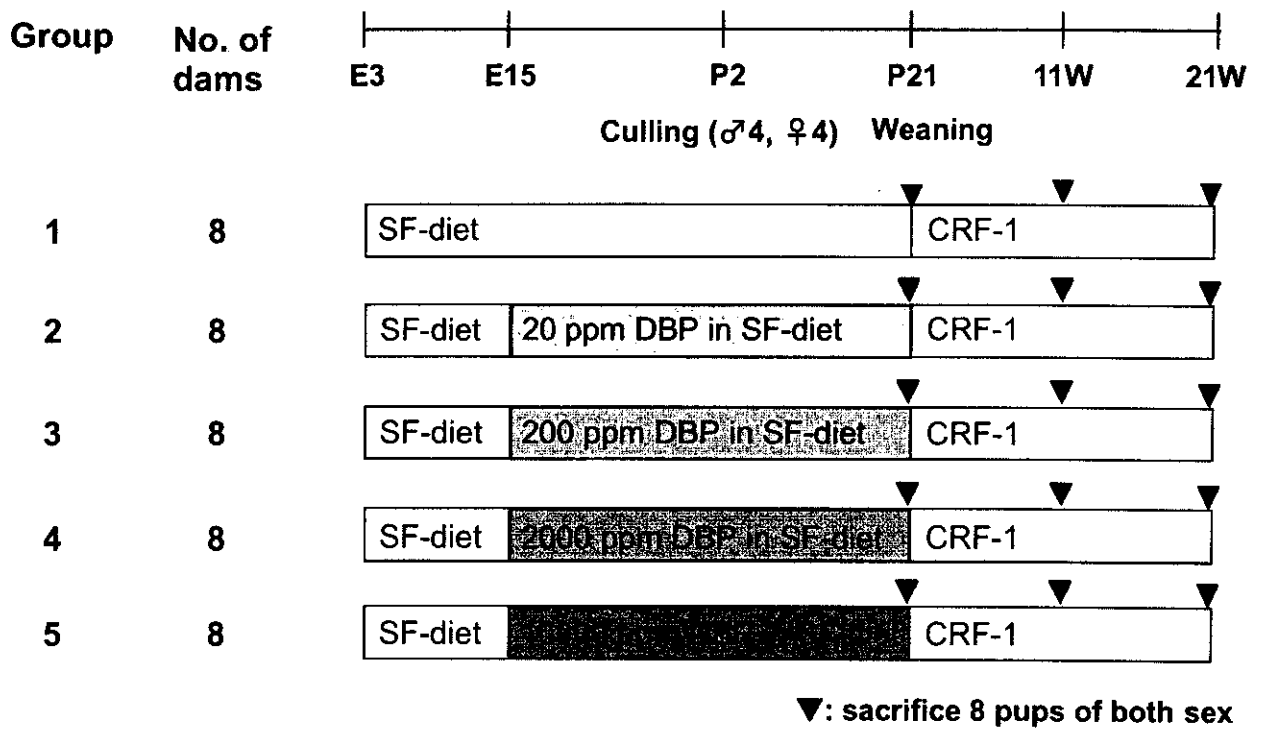


Fig. 1. Perinatal exposure study of DBP using rats

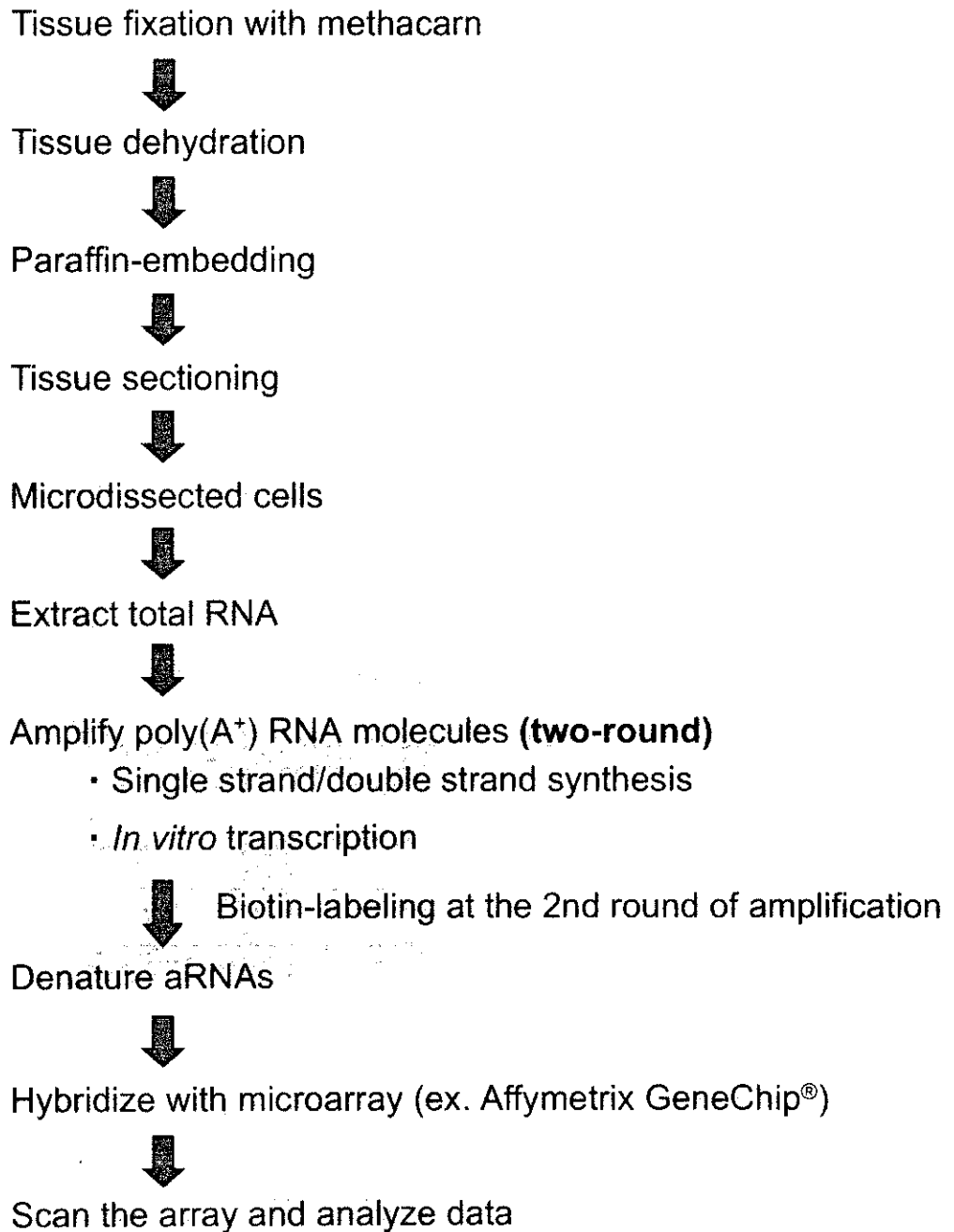


Fig. 2. Scheme for microarray analysis utilizing methacarn-fixed PETs

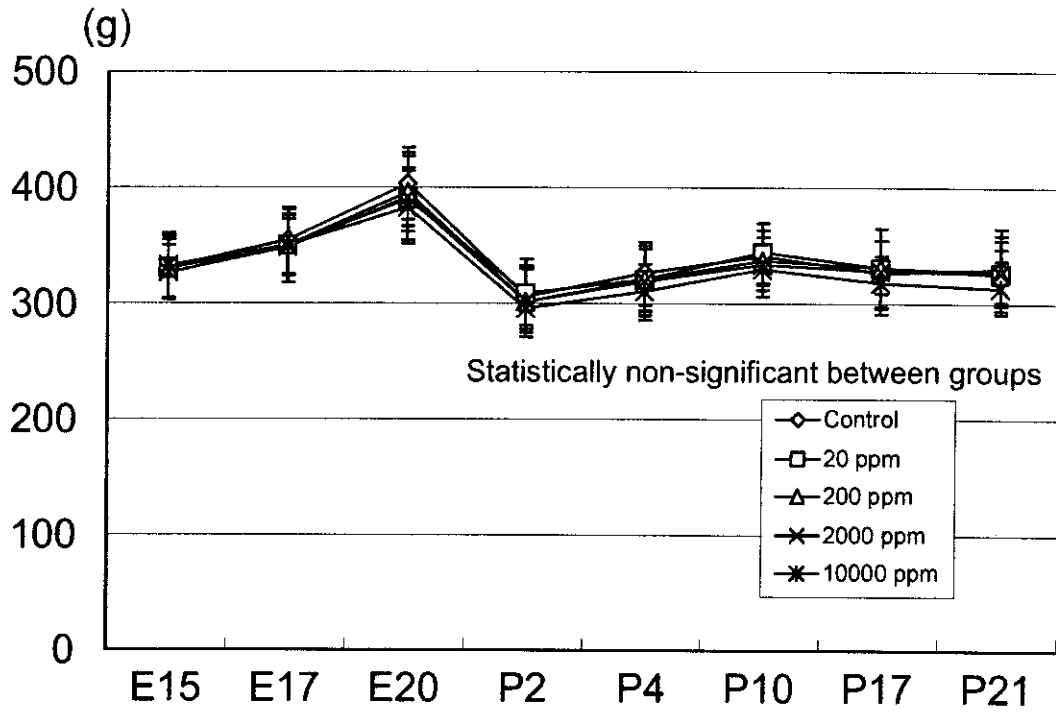


Fig. 3. Body weight changes of dams during exposure period

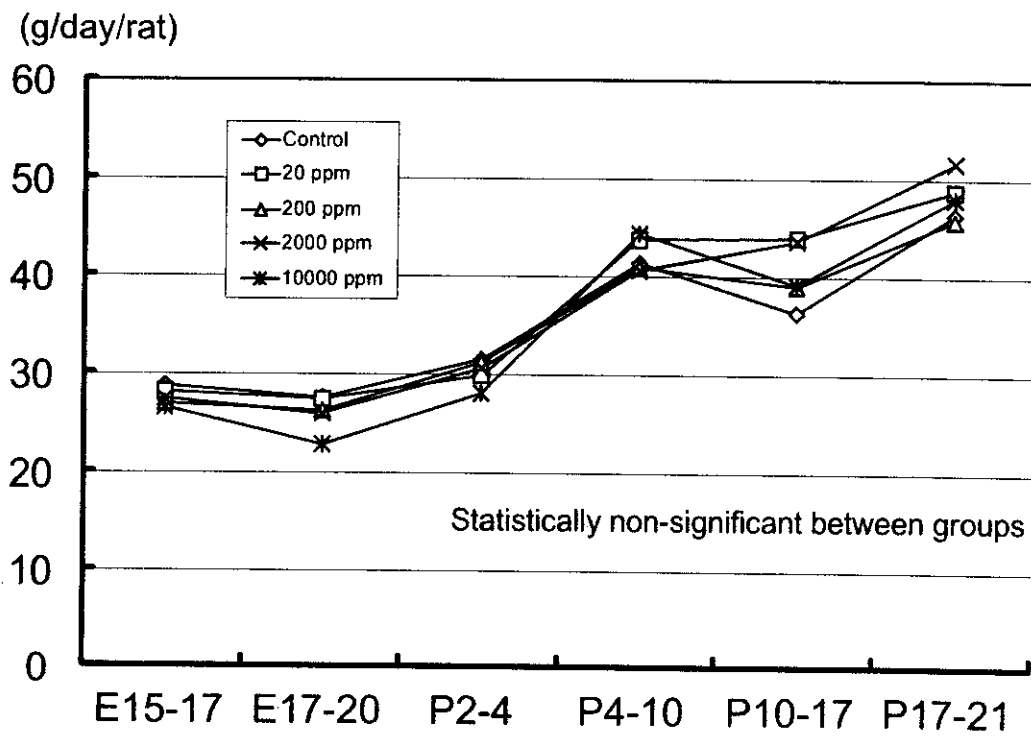


Fig. 4. Food intakes of dams during exposure period

Table 10. Comparison of gene ratios showing presence or absence call and signal ratios in the GAPDH gene between unfixed frozen tissue and methacarn-fixed PETs

Probes	Unfixed frozen, 1x amplified	Unfixed frozen, 2x amplified	MF-PET, 2x amplified
Present	40.3 %	36.9 %	36.4 %
Absent	57.5 %	60.9 %	61.5 %
Marginal	2.2 %	2.2 %	2.1 %
Signal ratio (3'/5') of GAPDH	1.1	12.3	11.3

1x amplified: once amplified by in vitro transcription
 2x amplified: twice amplified by in vitro transcription
 MF-PET: methacarn-fixed paraffin-embedded tissue

Table 11. Correlation analysis of gene expression data between unfixed-frozen tissue and methacarn-fixed PET

	MF-PET, 2x amplified vs. Unfixed, 1x amplified	Unfixed, 2x amplified vs. Unfixed, 1x amplified	MF-PET, 2x amplified vs. Unfixed, 2x amplified
R ₁	0.77	0.80	0.98
R ₂	0.91	0.63	0.98
p < 0.05	22.3 %	27.5 %	0 %

1 x amplified: once amplified by in vitro transcription
 2 x amplified: twice amplified by in vitro transcription
 MF-PET: methacarn-fixed paraffin-embedded tissue
 R1: Pearson's correlation coefficient with raw data
 R2: Pearson's correlation coefficient with normalized data

Table 12. Mean distance from the poly(A⁺) tail to the probe sites of the genes showing presence call only in each preparation

Preparation	No. of genes available ^a	Distance A ^b	Distance B ^c
MF-PET, 2x amplified	6	318	97
Unfixed, 1x amplified	5	847	569

^a No of genes whose 3' terminal sequence information is available among genes showing presence call only in each preparation.

^b Distance from the beginning of the poly(A⁺) tail to the probe located at 5'-most position.

^c Distance B: distance from the beginning of the poly(A⁺) tail to the probe located at the 3'-most position.