

Fig. 4

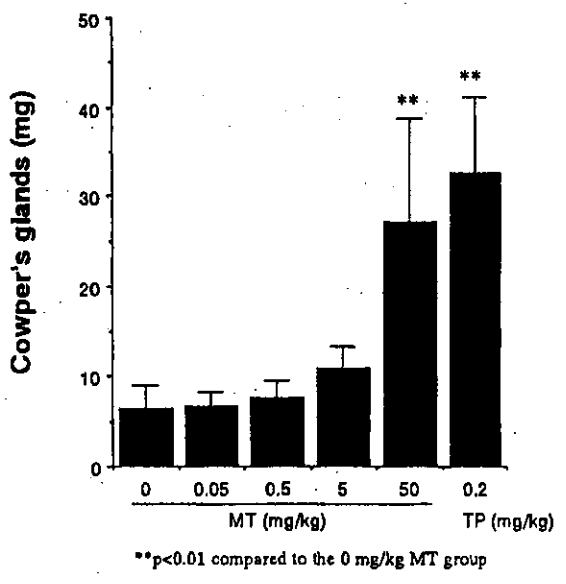
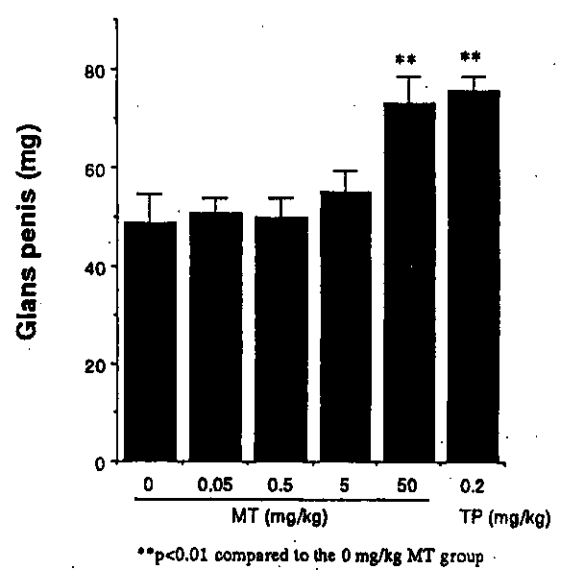
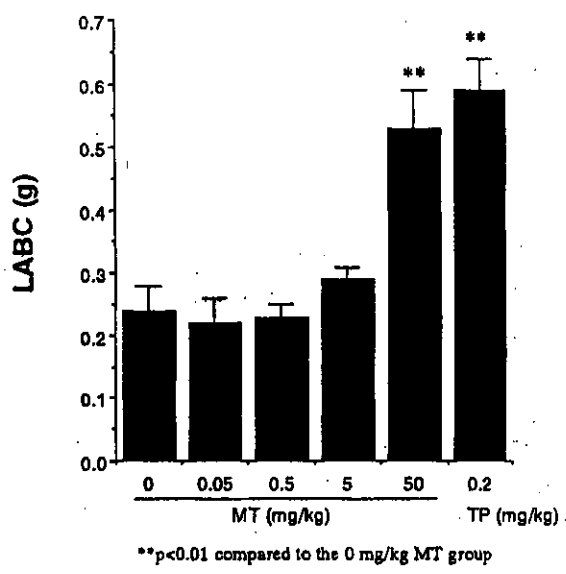
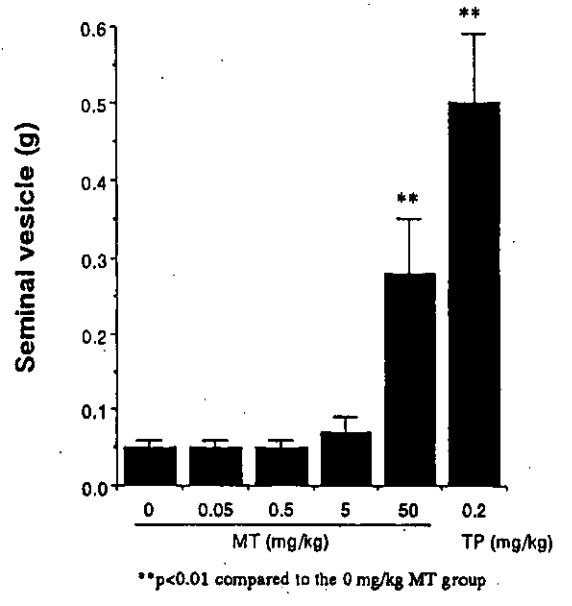
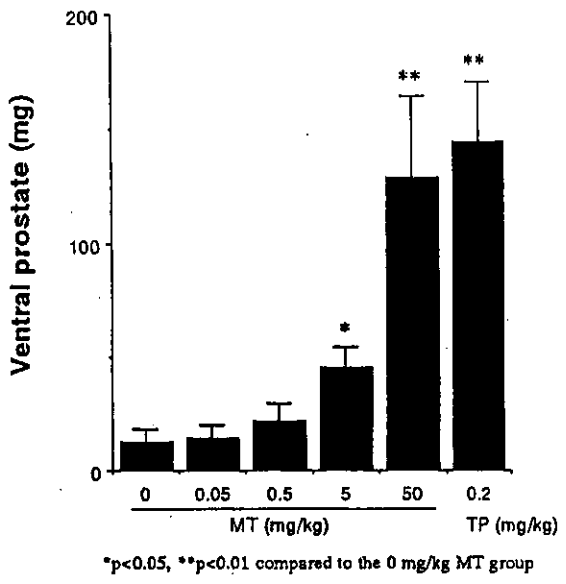


Fig. 5

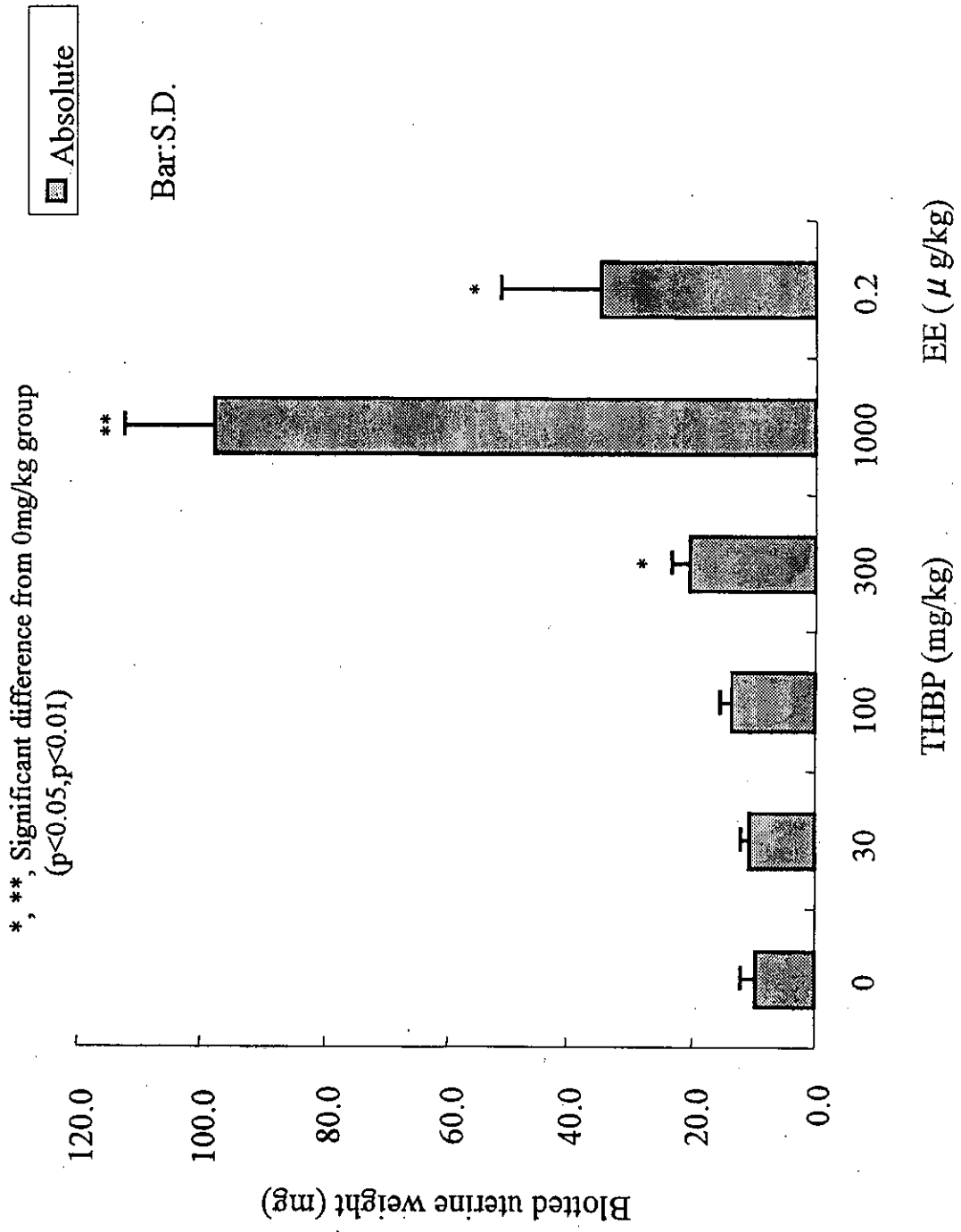


Fig. 6

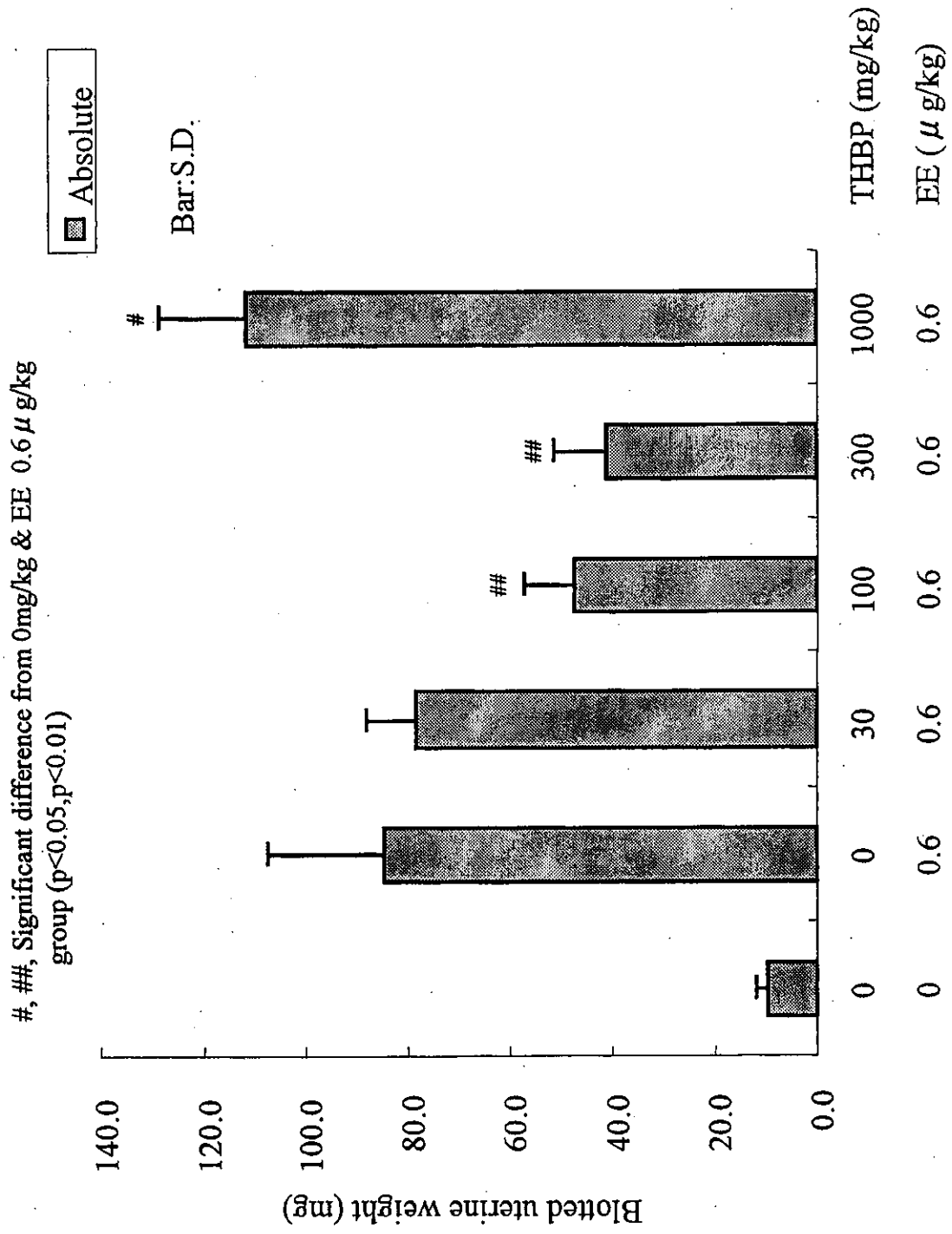


Fig. 7

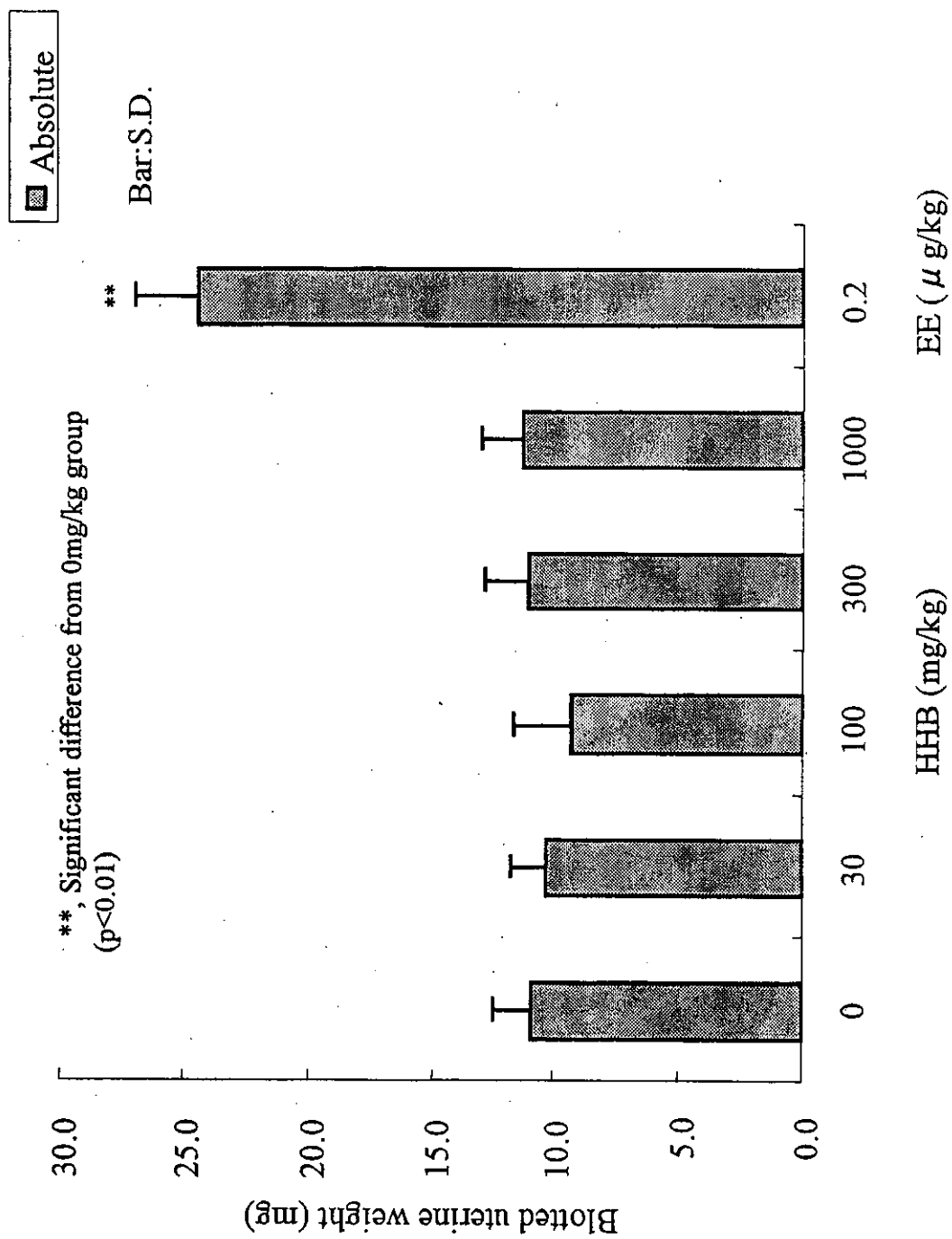


Fig. 8

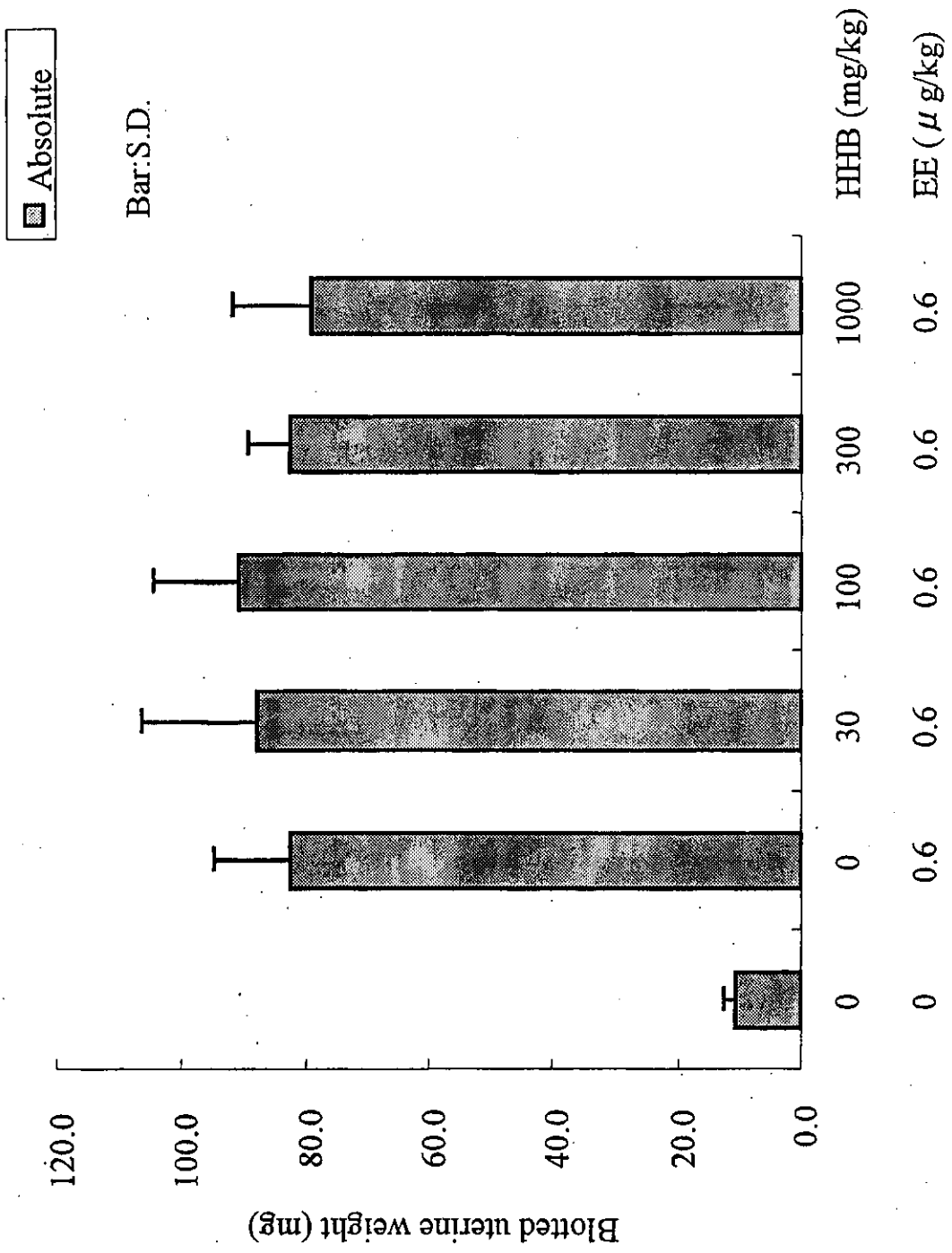


Fig. 9

## 12. OECD ガイドライン 407:28 日間反復投与毒性試験法の適用に関する研究

研究者 広瀬 雅雄 国立医薬品食品衛生研究所病理部 部長

### 研究要旨

“OECD テストガイドライン 407, enhanced”において、内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を目的として、内分泌かく乱化学物質を成熟動物に一定期間投与した時の投与動物の肝臓で発現の変動する遺伝子の網羅的解析を行っている。今年度は、エストロゲン作用検出パラメータの探索を目的として、EE を 0.01, 0.1, 1.0 ppm の割合で 28 日間混餌投与した雌雄の SD:IGS ラットで、CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 1 Microarray による 3774 遺伝子の網羅的発現解析を行った。その結果、5 倍以上もしくは 0.2 倍以下の変動を示した遺伝子のうち、用量依存的に発現の上昇する遺伝子を雄では 3 個、雌では 24 個見出した。逆に用量依存的に発現低下する遺伝子は雄では見られず、雌で 3 個見出した。その用量依存性は 0.01 ppm から変動するものが多く、病理組織所見や性周期回帰では 1.0 ppm のみで変動を認めたことと比較すると、これらの遺伝子発現変化はエストロゲン作用の高感度検出指標になりうるものと考えられた。また、用量依存性が明らかではない反応性を示す遺伝子も多数認められたが、個体間での発現量比較で低用量での反応性に個体間のバラツキが反映されている可能性が示唆された。この問題については、他の化合物投与例での発現解析結果を併せて、総合的に解釈したい。

### A. 研究目的

“OECD テストガイドライン 407, enhanced”において、内分泌かく乱作用を高感度に検出する新規パラメータの導入を目的として、一期目の本研究担当課題で、代表的化合物投与例でラット雄特異的に発現する  $\alpha_2\mu$ -globulin の肝・腎における発現量を検索し、いずれもホルモン作用に起因した用量依存性の変動を示さないが、いくつかの物質で低用量投与による肝 mRNA 発現の個体間のバラツキを見い出した。

Microarray 法の技術の確立に伴い、一度に多数の遺伝子の RNA 発現挙動を検出する網羅的解析手法の導入により、遺伝子指標の探索と同時にその用量依存性の検討が可能となってきた。内分泌かく乱化学物質(EDCs)の投与に起因した用量依存性の反応を高感度に検出する系として、この遺伝子発現の網羅的解析手法が注目を浴びてきており、この手法を利用して EDCs 特異的な発現クラスターを見出すことは、本研究課題の最終目標である。

一方、mRNA 発現の場合、用量に依存せずに、かつ蛋白質発現に反映されないような転写産物の発現変動を認める可能性がある。その生物学的な意義を検討することは重要な課題であるが、その前段階として EDCs の投与に起因して変動を示す遺伝子クラスターを解析・整理する必要がある。本研究では、成熟動物に対して EDCs を一定期間投与した時の生体影響を検出する目的で、肝臓を標的として投与動物で発現の変動する遺伝子を genome wide にスクリーニングする。

### B. 研究方法

今年度は、雌雄各群 5 匹の SD:IGS ラットに ethinylestradiol (EE)を 0.01, 0.1, 1.0 ppm の割合で 28 日間混餌投与し、雄は 28 日目に屠殺し、雌は投与 22 日目から性周期を観察して 28 日目から発情休止期を示す日に屠殺・剖検した (Fig. 1)。次いで、RNA later に保存した肝組織から total RNA を抽出し、各群 3 匹につき CLONTECH Atlas

Glass Rat 3.8 I Microarray による解析を行った。

(倫理面への配慮)

倫理面への配慮として、主な動物投与実験は経口投与により行い、動物の苦痛を最小限にとどめた。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たため、動物に与える苦痛は最小限にとどめた。

#### C.D. 研究結果と考察

EE を 28 日間混餌投与した結果、1.0 ppm 群の雌雄で摂餌量の減少を認めたものの、体重増加の軽度抑制も認められ (Fig. 2)、結果として EE 摂取量は用量にほぼ相関して増加した (Table 1)。解剖時の臓器重量のうち、雄では 1.0 ppm 群の肝臓・腎臓(左)の絶対重量の減少と 1.0 ppm 群の下垂体相対重量の上昇、雌では 1.0 ppm 群の左右の副腎・卵巣 (右)で絶対重量の減少が認められた (Table 2)。性周期回帰検索では 1.0 ppm 群の雌で 5 例中 3 匹に発情期の延長が認められ (Fig. 3)、病理組織検索の結果、雄の 1.0 ppm 群で乳腺腺管の過形成、雌の 1.0 ppm 群で子宮内膜上皮の高円柱上皮化等が認められた (Table 3)。Microarray 解析の結果、EE 投与により、2 倍以上ないし 0.2 倍以下の発現の増減を示す遺伝子とも雌で多く認められた (Table 4)。これらの遺伝子につき、EE の用量に依存ないし非依存的に発現変動した遺伝子の分類をした結果、用量依存性の反応を示す遺伝子のうち発現上昇した遺伝子は雄で 3 個、雌で 24 個得られた。用量依存性の反応を示す遺伝子のうち発現低下した遺伝子は雄で 0 個、雌で 3 個得られた (Table 5)。しかし、雄での用量依存的に発現上昇を示した遺伝子は全て相対的発現量が非常に低く、発現レベルの観点からはエストロゲンに対する生物学的な反応性を示している可能性は低いと考えられた。用量依存的に発現変動し

た遺伝子の内訳を Table 6 に示した。雌で用量依存的に発現変動した遺伝子のうち、発現に明らかな雌雄差 (4 倍) の認められた遺伝子は B-myc transforming protein のみであったが、雄では構成的発現量が高く、EE の用量に関連した変動を認めなかった。また、Preoptic regulatory factor-2 (PORF-2) は、文献的に脳や精巣での発現が知られているが、卵巣摘出した雌ラットに estradiol を投与した際、視床下部の視索前野で mRNA が発現上昇することが報告されている。用量依存的な発現挙動を示す遺伝子に関しては、現在リアルタイム PCR にて発現の確認をしているところである。

次に、EE 投与により発現量がいずれかの用量 (0.01, 0.1, 1.0 ppm) で 5 倍以上もしくは 0.2 倍以下に変動する用量非依存性の反応を示す遺伝子を検索した結果 (Table 5)、0.01 ppm のみで発現が 5 倍以上になる遺伝子は雄で 1 個、雌で 5 個、0.2 倍以下になる遺伝子は雄で 14 個、雌で 0 個得られた。0.1 ppm のみで発現が 5 倍以上になる遺伝子は雌雄ともに 0 個、0.2 倍以下になる遺伝子は雄で 1 個、雌で 8 個得られた。1.0 ppm のみで発現が 5 倍以上になる遺伝子は雄で 1 個、雌で 0 個、0.2 倍以下になる遺伝子は雄で 0 個、雌で 1 個得られた。0.1, 0.01 ppm とともに 5 倍以上になる遺伝子は雌雄ともに 0 個、0.2 倍以下になる遺伝子は雄で 4 個、雌で 0 個得られた (Table 5)。雌雄での用量非依存的な発現変動を示す遺伝子の多くは、相対発現量が低いものや、低用量 (0.01 ppm) での反応性が個体間でばらつくものが多い傾向にあった。

EE 投与例での用量依存的な発現クラスターの、エストロゲン作用の検出パラメータとしての可能性については、各種エストロゲン化合物投与例との発現プロファイルの比較が重要と考えられる。また、用量非依存的に発現変動した遺伝子で、



低用量での反応性に個体間のバラツキが反映されている可能性については、現在 CLONTECH の Atlas Glass Rat 3.8 I Microarray を用いて methoxychlor (20, 100, 500 mg/kg), nonylphenol (10, 50, 250 mg/kg), genistein (120, 400, 1000 mg/kg) の 28 日間反復経口投与したラット肝臓での RNA 発現解析を遂行しており、これらの化合物投与例での発現解析結果と併せて、総合的に解釈したい。

#### E. 結論

成熟動物に対して内分泌かく乱作用の疑われている化合物を一定期間投与した時の、肝臓を標的とした高感度な内分泌かく乱指標遺伝子の同定を目的として、網羅的遺伝子発現解析を行っている。

今年度は、EE を 28 日間曝露した時の雌雄での遺伝子発現プロファイルについて、検索遺伝子を 3774 に拡大し検討した結果、雌で用量依存的に発現上昇する遺伝子を多く見出した。その用量依存性は 0.01 ppm から変動するものが多く、病理組織や性周期回帰の検索では 1.0 ppm のみで変化を認めたことを考慮すると、これらの遺伝子発現変化はエストロゲン作用の高感度検出指標になりうる可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

特になし。

##### 2. 学会発表

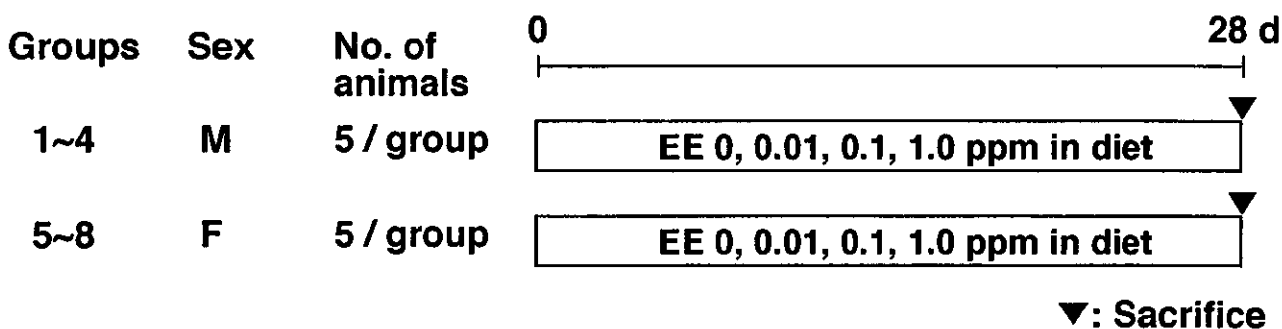
加藤奈津美, 渋谷淳, 高木広憲, 眞島恵介, 畝山智香子, 井上弘子, 藤田春香, 広瀬雅雄 :  
Ethinylestradiol 28 日間反復投与時のラット肝

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, 1 月, 2003

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

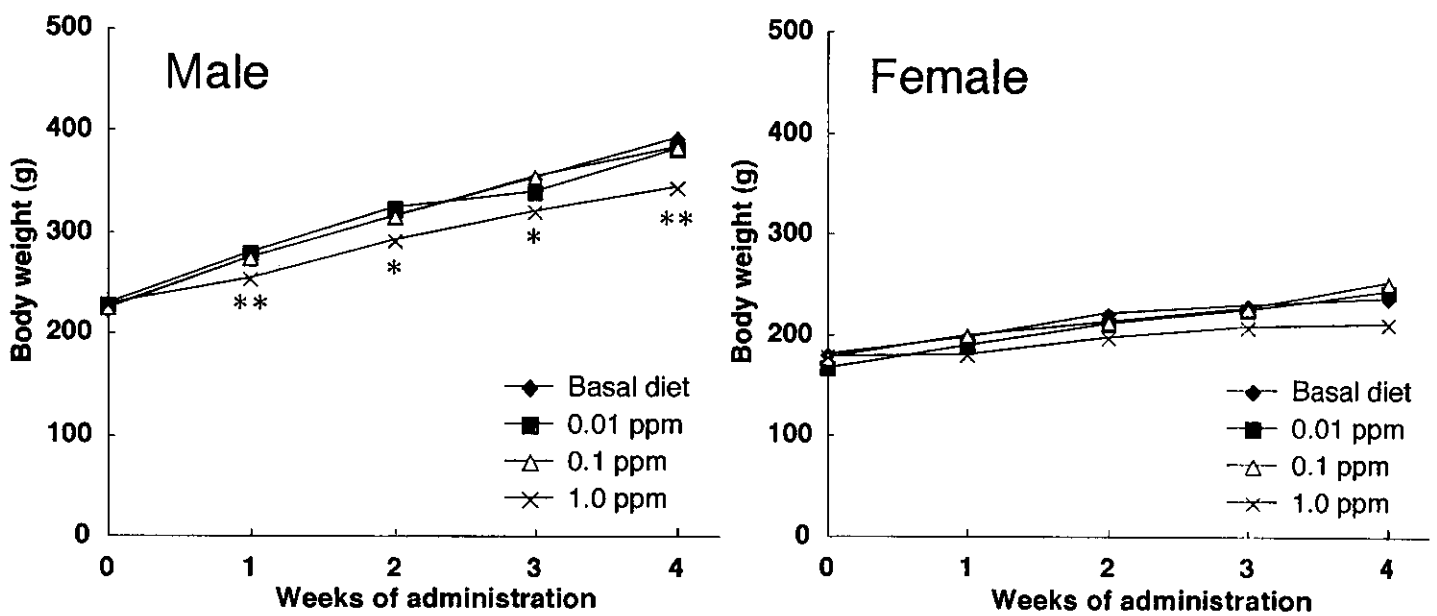
特になし。

**ANIMALS:** Rats, SD:IGS/Crj, both sexes  
**AGE OF START:** 6 weeks  
**CHEMICAL:** Ethinylestradiol (EE)  
**ADMI. ROUTE:** Oral by feeding  
**TARGET:** Liver



**MICROARRAY:** CLONTECH Atlas Glass Rat 3.8 I Array  
 3774 registered genes are included.

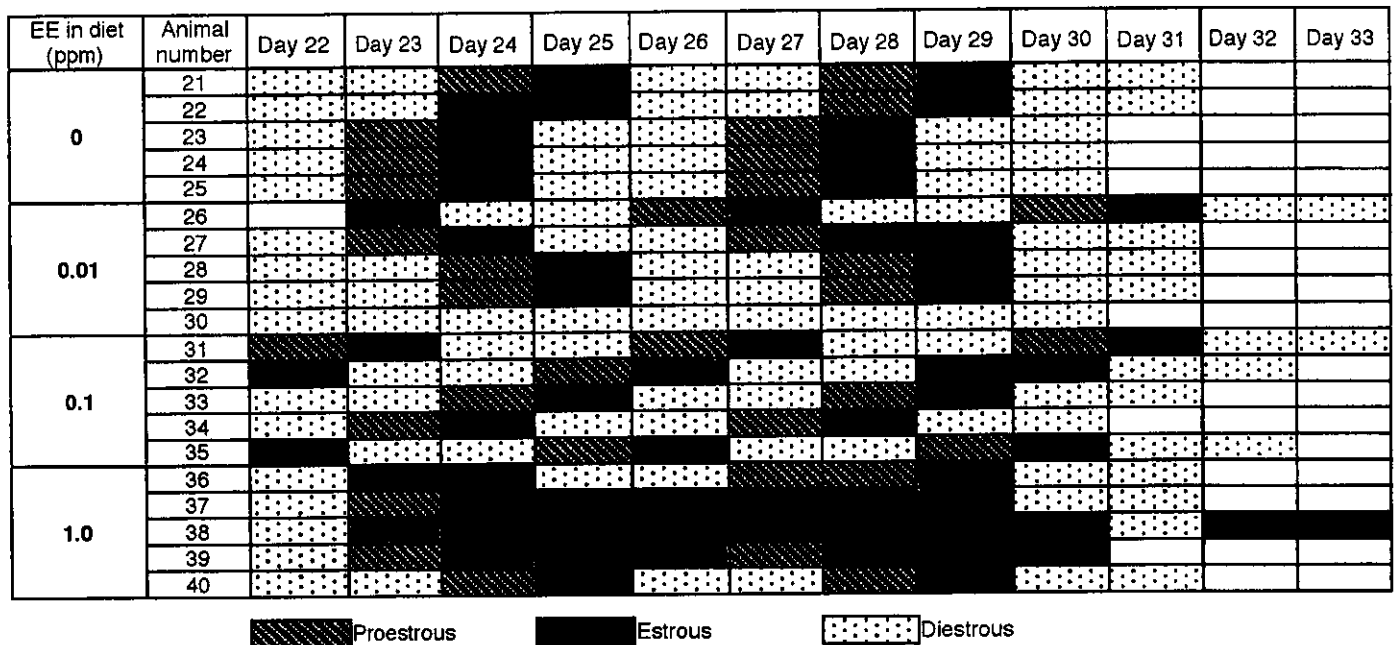
Fig. 1 **Experimental Design**



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

Fig. 2

**Body weight curves in SD:IGS rats fed diet containing EE for 28 days**



	control	0.01ppm	0.1ppm	1ppm
<b>Normal</b>	5	4	5	2
<b>Persistent diestrus</b>	0	1	0	0
<b>Prolonged estrus</b>	0	0	0	3

Fig. 3

**Estrous cycles of female rats treated with EE for 28 days.**

Table 1

**Body weights and intakes of food and chemical in SD:IGS rats fed diets containing EE for 28 days.**

Sex	EE in diet (ppm)	Final body weight (g)	Food intake (g/rat/day)	Daily EE intake ( $\mu$ g/kg/day)
Males	0	390.0 $\pm$ 13.3 <sup>a)</sup>	21.9	0
	0.01	375.7 $\pm$ 22.5	23.0	0.61
	0.1	381.3 $\pm$ 17.6	21.3	5.59
	1.0	341.3 $\pm$ 18.6 **	18.8	55.20
Females	0	245.1 $\pm$ 16.6	17.0	0
	0.01	247.3 $\pm$ 18.7	16.2	0.66
	0.1	251.6 $\pm$ 20.9	16.1	6.40
	1.0	216.4 $\pm$ 20.7	12.3	56.68

<sup>a)</sup> Mean $\pm$ S.D.

\*\* : Significantly different from the control at  $p < 0.01$

Table 2

## Relative organ weights in SD:IGS rats treated with EE for 28 days.

	Groups			
	Basal diet	0.01 ppm	0.1 ppm	1.0 ppm
<b>Males</b>				
Body weight (g)	390.0 ± 13.3 <sup>a)</sup>	375.7 ± 22.5	381.3 ± 17.6	341.3 ± 18.6**
Pituitary	0.036 ± 0.002	0.038 ± 0.002	0.039 ± 0.001	0.041 ± 0.003*
Liver	36.3 ± 1.5	35.1 ± 1.7	36.2 ± 3.7	34.9 ± 3.0
Adrenal(R)	0.056 ± 0.005	0.059 ± 0.010	0.063 ± 0.008	0.074 ± 0.017
Adrenal(L)	0.062 ± 0.011	0.071 ± 0.014	0.065 ± 0.005	0.072 ± 0.011
Kidney(R)	3.41 ± 0.27	3.39 ± 0.25	3.58 ± 0.19	3.56 ± 0.12
Kidney(L)	3.49 ± 0.32	3.33 ± 0.20	3.55 ± 0.12	3.50 ± 0.23
Testis(R)	4.14 ± 0.19	4.47 ± 0.34	4.26 ± 0.35	4.60 ± 0.51
Testis(L)	4.11 ± 0.16	4.49 ± 0.36	4.25 ± 0.31	4.61 ± 0.54
Epididymis(R)	1.19 ± 0.10	1.23 ± 0.07	1.22 ± 0.12	1.33 ± 0.11
Epididymis(L)	1.21 ± 0.05	1.24 ± 0.12	1.18 ± 0.09	1.31 ± 0.13
Ventral prostate)	1.74 ± 0.28	1.52 ± 0.25	1.64 ± 0.18	1.65 ± 0.06
Male accessory glands	4.70 ± 0.56	4.66 ± 0.43	5.03 ± 0.55	4.48 ± 0.29
<b>Females</b>				
Body weight (g)	245.1 ± 16.6	247.3 ± 18.7	251.6 ± 20.9	216.4 ± 20.7
Pituitary	0.068 ± 0.006	0.063 ± 0.004	0.063 ± 0.002	0.067 ± 0.007
Liver	34.0 ± 1.1	36.6 ± 2.4	35.0 ± 3.0	33.1 ± 1.0
Adrenal(R)	0.121 ± 0.035	0.116 ± 0.013	0.126 ± 0.019	0.095 ± 0.023
Adrenal(L)	0.116 ± 0.016	0.116 ± 0.010	0.127 ± 0.028	0.094 ± 0.015
Kidney(R)	3.46 ± 0.20	3.58 ± 0.41	3.76 ± 0.21	3.87 ± 0.26
Kidney(L)	3.53 ± 0.17	3.48 ± 0.34	3.53 ± 0.21	3.73 ± 0.32
Ovary(R)	0.181 ± 0.042	0.172 ± 0.019	0.179 ± 0.016	0.135 ± 0.027
Ovary(L)	0.184 ± 0.041	0.184 ± 0.022	0.147 ± 0.023	0.154 ± 0.048
Uterus	2.19 ± 0.34	2.32 ± 0.39	2.25 ± 0.22	1.98 ± 0.43

<sup>a)</sup> Mean ± S.D.

\*,\*\* : Significantly different from the controls by a parametric statistic method at  $p < 0.05$ , and  $0.01$ , respectively. Relative organ weight was calculated as mg/g(b.w.).

Table 3

## Histopathological findings and their incidences in rats administered orally EE for 28 days.

Organ/finding	Dose of EE (ppm) No. of animals examined	Males				Females			
		0 5	0.01 5	0.1 5	1.0 5	0 5	0.01 5	0.1 5	1.0 5
<b>Pituitary</b>									
Cyst, anterior lobe	(present)	1	0	1	0	0	1	0	0
<b>Liver</b>									
Microgranuloma	(total)	1	4	2	2	4	3	4	2
	(±)	1	3	2	1	1	2	4	1
	(+)	0	1	0	1	3	1	0	1
Depletion of vacuoles, hepatocytes, centrilobular	(+, total)	2	2	2	4	2	1	1	1
<b>Kidney</b>									
Regenerating tubules	(total)	4	3	3	3	0	0	2	0
	(±)	3	2	3	3	0	0	2	0
	(+)	1	1	0	0	0	0	0	0
Cyst, cortex	(present)	2	0	0	0	0	0	0	0
Scar, cortex	(present)	0	0	0	1	0	0	0	0
Scar, cortico-medullary junction	(present)	0	1	0	0	0	0	0	0
Mononuclear cell infiltration, interstitium	(±, total)	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>Thyroid</b>									
Hypertrophy, follicular cells	(+)	0	0	1	1	0	0	0	0
<b>Mammary gland</b>									
Ductular atrophy		0	0	0	3	0	0	0	0
Lobular hyperplasia		0	0	0	0	0	1	0	1
<b>Ventral prostate</b>									
Hyperplasia	(total)	4	5	5	5	-	-	-	-
	(±)	0	0	0	0	-	-	-	-
	(+)	4	4	4	4	-	-	-	-
	(++)	0	1	1	1	-	-	-	-
Mononuclear cell infiltration, interstitium	(total)	1	2	3	3	-	-	-	-
	(±)	1	1	0	2	-	-	-	-
	(+)	0	1	2	1	-	-	-	-
	(++)	0	0	1	0	-	-	-	-
<b>Uterus</b>									
Tall columnar epithelium, endometrium	(+, total)	-	-	-	-	0	1	1	4*
<b>Vagina</b>									
Mucinar degeneration, mucosa	(+, total)	-	-	-	-	0	1	0	1
<b>Ovary</b>									
Increase of secondary follicles	(+, total)	-	-	-	-	1	1	0	0

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

Table 4

**Number of genes up- or down-regulated in the livers of rats treated orally with EE for 28 days.**

Dose of EE (ppm)	Fold increase vs. Cont	Number of genes up-regulated		Fold decrease vs. Cont	Number of genes down-regulated	
		Male	Female		Male	Female
0.01	> 2	38	117	< 0.5	69	29
	> 5	1	5	< 0.2	7	0
	> 10	0	0	< 0.1	7	0
-----						
0.1	> 2	85	443	< 0.5	31	186
	> 5	2	5	< 0.2	3	4
	> 10	0	0	< 0.1	0	3
-----						
1.0	> 2	89	592	< 0.5	36	187
	> 5	8	29	< 0.2	0	1
	> 10	0	1	< 0.1	0	2



Table 5

**Number of genes showing changes in the expression levels in the livers of rats treated with EE for 28 days.**

Dose-dependently expressed genes

ppm	fold vs. cont.	Male	Female
1.0	$\times 5 \leq$	3	24
	$\times 1/5 \geq$	0	3

Genes expressed dose-independently

ppm	fold vs. cont.	Male	Female
0.01	$\times 5 \leq$	1	5
	$\times 1/5 \geq$	14	0
0.1	$\times 5 \leq$	0	0
	$\times 1/5 \geq$	1	8
1.0	$\times 5 \leq$	1	0
	$\times 1/5 \geq$	0	1
0.1 , 0.01	$\times 5 \leq$	0	0
	$\times 1/5 \geq$	4	0

Table 6

List of genes showing dose-dependent up-regulation (5.0 <) or down-regulation (0.2 >).

Gene name	Gene Bank accession	Sex	Expression	M/F ratio	Gene Function	Subclassification
Solute carrier family 11 member 1 (natural resistance-associated macrophage protein 1)	AF041083	M	Up	0.1	Molecular Function	Transport
odorant-metabolizing protein (RY2D1)	M76733	M	Up	0.2	Biological Process	Cell Communication
Adrenergic receptor, $\beta$ 3	M74716	M	Up	0.3	Unclassified	
B-myc transforming protein	X17455	F	Up	4.0	Unclassified	
ventral anterior homeobox 2	AF113516	F	Up	0.8	Unclassified	
gap junction membrane channel protein $\beta$ 5	M76533	F	Up	2.3	Unclassified	
Opioid receptor $\delta$ 1	U00475	F	Up	2.6	Unclassified	
transforming growth factor $\beta$ -1 gene	X52498	F	Up	2.8	Biological Process Molecular Function	Cell Communication Signal Transducer
Transition protein 2	X14776	F	Up	1.7	Unclassified	
Hypocretin (orexin) neuropeptide precursor	AF041241	F	Up	1.7	Biological Process Molecular Function	Signal Transduction Signal Transducer
preoptic regulatory factor-2 (PORF-2)	X53232	F	Up	1.5	Unclassified	
p53-activated gene 608	Y13148	F	Up	2.4	Unclassified	
malate dehydrogenase mitochondrial	X04240	F	Up	1.2	Molecular Function Cellular Component	Enzyme Intracellular
secretory carrier membrane protein 1	L22079	F	Up	1.1	Molecular Function	Transport
Peripherin (retinal degradation slow)	NM_013021	F	Up	1.6	Unclassified	
CXC chemokine LIX	U90448	F	Up	1.4	Molecular Function	Signal Transducer
4-hydroxyphenylpyruvic acid dioxygenase	AF082834	F	Up	0.6	Unclassified	
potassium channel, subfamily K, member 3	AF031384	F	Up	1.9	Unclassified	
ras guanine nucleotide-releasing factor 1 (Rasgrf1)	AF044908	F	Up	1.4	Unclassified	
Muscle and microspikes RAS	D89863	F	Up	1.0	Unclassified	
regeneration associated protein 3 (Rap3)	AF202887	F	Up	1.5	Unclassified	
Heat shock 27 kDa protein	M86389	F	Up	1.4	Biological Process	Cell Communication
GTP-binding protein	M17526	F	Up	1.3	Unclassified	
CaM-KII inhibitory protein	AF041854	F	Up	1.5	Unclassified	
adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains	AF095576	F	Up	1.8	Unclassified	
actinin $\alpha$ 2 associated LIM protein	AF002281	F	Up	1.1	Cellular Component	Intracellular
neurogenic differentiation 1	D82945	F	Up	1.7	Unclassified	
proline-rich inositol polyphosphate 5-phosphatase (PIPP)	AB032551	F	Down	0.6	Molecular Function	Enzyme
peptidyl arginine deiminase, type III	D88034	F	Down	1.1	Unclassified	
NADH ubiquinone oxidoreductase subunit B13	D86215	F	Down	1.1	Molecular Function	Enzyme

### 13. 内分泌かく乱化学物質検出試験の技術移転普及に関する研究

研究者 菅野純 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毒性部長

研究要旨：ラットやマウスを用いた動物実験において、化学物質の内分泌かく乱作用を調べる際に、現在、指標となり得ると考えられている肛門生殖突起間距離（AGD）、陰茎包皮分離、膣開口、精子検査等の検査方法について、ビデオ撮影を実施した。

#### A. 目的

内分泌かく乱化学物質の検索に用いる検査方法をビデオ撮影し、その映像を国内のみならず海外にも配信することにより、検査法の普及に努めるとともに、これまで各施設で独自に実施してきた測定法の統一化を図る。

#### B. 方法

ラットおよびマウスを実際に飼育し、以下に示す検査項目についてビデオ撮りを実施した。

検査項目：肛門生殖突起間距離（AGD）、陰茎包皮分離、膣開口、精子検査

#### C、D 結果および考察

AGDの測定は、出生日から離乳日に至るまで様々な日齢で実施されているが、今回は生後4日齢のラット産児を用いた。AGDの値は産児の大きさに相関するため、測定の時期は重要であり、得られた値は、体重で補正する必要がある。AGDの値は、動物の保定方法やノギスの使用法等で、誤差を生じ易いため、同一測定者による全動物の計測が望ましい。また、体温低下など産児への影響を極力少なくするため、作業時間の短縮化を目指すべきである。

陰茎包皮分離および膣開口の日齢は、ラット-マウス間、さらには系統間で違いがあることから、実施に先立って、使用する系統の背景値を十分に把握しておくことが重要である。また、陰茎包皮分離については、包皮分離の基準が曖昧であることから、各施設間で統一した見解が必要と考えられる。一方、膣開口については、その判断基準は明確であるが、初回排卵日を特定するためには、膣スミアの採取や排卵検査が必要である。

精子検査は、精巣状態からの精子液を用いた精子運動能の検査方法について撮影を実施したが、最近では精子濃度、特に精巣での精子生産量（能）がエンドポイントとしてよく用いられているようである。また、精子検査は、使用機器が高価であることから、ビデオ撮影の映像は、検査方法の紹介に終わってしまう可能性が高いと考えられる。

今回撮影した検査方法のほかに、性周期の観察方法、乳頭などの身体発達検査法、さらには性行動の観察などが内分泌かく乱のエンドポイントとして該当する様に思われた。

#### F 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1 論文発表

- 1) 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.*, 2000, 21(9), 1671-6
- 2) Fujiwara M., Okayasu I., Oritsu M., Komatsu J., Yoshitsugu M., Katoh Y, Bandoh T., Toyoshima h., Kase Y, Sugihara K., Kanno J., Hayashi Y., Significant increase in prostaglandin E-main urinary metabolite by laxative administration, comparison with ulcerative colitis, *Digestion*, 2000, 61(3),201-6.
- 3) Iwama T., Kamikawa J., Higuchi T., Yagi K., Matuzaki T., Kanno J., Maekawa A., Development of invasive adenocarcinoma in a long-standing diverted ileal J-pouch for ulcerative colitis ; Report of a case, *Dis Colon Rectum*, 2000, 43(1),101-4
- 4) Kanno J., Onyon L., Haseman J., Fenner-Crisp P., Ashby J., and Owens W., The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses phase1, *Environmental Health Perspectives*, 2001, 109(8),785-794.
- 5) Yoon B-I., Hirabayashi Y., Kaneko T., Kodama Y., Kanno J., Yodoi J., Kim D.Y., Inoue T., Transgene expression of thioredoxin(TRX/ADF) protects against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)-induced hematotoxicity, *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 2001, 41, 232-236,
- 6) Yoo B-I., Hirabayashi Y., Ogawa Y., Kanno J., Inoue T., Kaneko T., Hemopoietic cell kinetics after intraperitoneal single infection of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD) in mice, *Chemosphere*, 2001, 43, 819-822,
- 7) Hirabayashi Y, Matsuda M, Aizawa S, Kodama Y, Kanno J., Inoue T., Serial transplantation of p53-deficient hemopoietic progenitor cells to assess their infinite growth potential, *Experimental Biology and Medicine*, 2002, 227, 474-479.,
- 8) Kanno J., Kato H., Iwata T., Inoue T., Phytoestrogen-low diet for endocrine disruptor studies, *J Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 50(13), 3883-3885,
- 9) Utsuyama M., Kanno J., Inoue T., Hirokawa K., Age/sex dependent and non-monotonous dose-response effect of diethylstilbestrol on the immune functions in mice., *Toxicol Lett.*, 2002, 135, 145-53,
- 10) Chiaki Kato, Satoshi Kitajima, Yumiko Saga, Jun Kanno, Ikuo Horii and Tohru Inoue, Assessment of quantitative dual-parameter flow cytometric analysis for the evaluation of testicular toxicity using cyclophosphamide and ethinylestradiol-treated rats. *J. Toxicological Sciences*, 27,(2), 87-96,2002,
- 11) Yoon BI, Hirabayashi Y., Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T., kanno J., Kim DY, Fujii-Kuriyama Y., Inoue T., Aryl hydrocarbon receptor mediates benzene-induced hematotoxicity, *Toxicol Sci.*, 2002, Nov., 70(1), 150-6
- 12) 菅野 純, 内分泌かく乱化学物質試験法-スクリーニング試験法、測定法、毒性試験 ; In vivo系を用いた暴露試験による評価、*日本臨床*、58巻、12号、2000、121-127