

えにくく、血清中 T_4 濃度の低下は、他のメカニズムにより引き起こされている可能性が示唆された。

これらの結果から、PCB による血清中 T_4 濃度の低下の作用機序について十分に説明することは困難であった。そこで、 T_4 の体内動態に注目してさらに検討を加えた。KC500 投与後、いずれの動物においても、 T_4 の血中からの消失クリアランスおよび分布容積は、用量依存的に増加した。この結果より、各動物において、KC500 投与後の血清中 T_4 濃度の低下は、血清中 T_4 の組織への急速な移行による可能性が示唆された。そこで、血清中から消失した $[^{125}I]T_4$ がどこの組織に移行したかを明らかにするために、 $[^{125}I]T_4$ の組織移行について検討した。その結果、KC500 投与により、用いた全ての動物において T_4 は血中から速やかに肝臓に移行していた。また、胆汁中 $[^{125}I]T_4$ -Glu の排泄量の結果から、KC500 投与後、ラットでは胆汁中への T_4 のグルクロン酸抱合体の排泄が促進することが示された。

以上の結果をまとめると、KC500 投与後、用いた全ての動物において、血清中 T_4 濃度の低下には、 T_4 の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。この T_4 の肝臓への移行には、何らかの輸送担体が関与している可能性が考えられる。さらに、ラットでは胆汁中への T_4 のグルクロン酸抱合体の排泄が行われるが、血中から肝臓への T_4 の移行量に対して、胆汁から T_4 の排泄が追いつかず、 T_4 は肝臓に滞ってしまうものと考えられる。今後、さらなる検討が必要である。

II. 基盤研究

【生殖・ステロイド代謝】

雌性生殖器官への作用メカニズムの
解明（井口泰泉）

マイクロアレイ法を用いたマウス子宮

での網羅的な遺伝子解析と、エンドポイントとした子宮肥大を重ねると、子宮肥大を引き起こすエストロゲンの用量依存的に、発現変動遺伝子数も増加することが明らかとなった。合成エストロゲンと天然のエストロゲンで発現変動が起こる遺伝子群の相違、エストロゲン類似作用を化学物質で変動する遺伝子のプロファイル等が今後の課題である。予備的な結果として、合成エストロゲンの DES とエストラジオールで発現変動する遺伝子群は必ずしも同じではないこと、化学物質に特異的な遺伝子発現の変動もありそうなことを見出しており、詳細を詰める予定である。またノニルフェノールにより発現が変動する遺伝子について解析したところ、高用量(50mg/kg)では、エストロゲンと非常に類似した遺伝子群の発現を誘導したのに対し、それ以下の用量では必ずしもエストロゲンによる影響とは一致しなかった。ラット胎児の輸卵管では胎生 15 日から、ステロイドホルモン受容体の発現が確認された。胎児期の合成エストロゲン投与により、輸卵管の形態異常が起こることも報告されており、エストロゲン受容体 α を介した反応と思われる。また、出生直後のエストロゲン処理により不可逆的に細胞増殖を継続する膈では、いくつかの遺伝子がエストロゲン非依存的に発現しており、その中には、多層化上皮の形成に必要な遺伝子に加えて、細胞増殖を継続的に引き起こす細胞増殖因子のポジティブフィードバックループの可能性が示唆された。今後、この点に関して探究する必要がある。

低用量影響を含む内分泌かく乱物質
暴露とヒト性ステロイド代謝との
関連性の解明（笹野公伸）

低用量の内分泌かく乱物質の作用を含
めて、ヒトの種々の組織、細胞における

エストロゲン作用動態を検討するにあたっては、エストロゲン及び種々のエストロゲン類似物質をヒト組織由来の培養細胞に添加後、遺伝子発現が増加あるいは低下した遺伝子群、すなはちエストロゲン誘導遺伝子をマイクロアレイ法を用いて広範に検討する事は極めて重要な検索方法である。しかしマイクロアレイ法で検討したエストロゲン誘導遺伝子がエストロゲン作用と関連しているのかどうか？ 更にはその誘導遺伝子が実際のヒトでのエストロゲン作用、代謝動態とどのように関係するのかといった事の解明、すなはち *in vitro* での結果の実際の人体に対しての影響への外挿が欠かせないアプローチとなる。

そこで今回我々は人体に対してのエストロゲン作用の一つの例として動脈の平滑筋細胞に対するエストロゲンの直接作用に注目した。そして ER 及び種々のエストロゲン代謝酵素を発現しているヒト動脈平滑筋由来の培養細胞にエストロゲンを添加して mRNA を抽出し、マイクロアレイ法を用いて誘導遺伝子群を広範に検出した。これらの誘導遺伝子群の中で細胞増殖抑制に関与する遺伝子として p120E4F が新たなエストロゲン誘導遺伝子として認められ、更にその発現が RT-PCR 法により確認された。次に p120E4F の作用を確認するためにこの遺伝子に対応する siRNA を細胞に導入し、エストロゲン添加により細胞増殖抑制作用が阻害されるのを確認した。このアプローチによりマイクロアレイ法で確認された遺伝子の作用を確実に把握する事が出来た。すなはち平滑筋細胞増殖抑制を生じるエストロゲン応答遺伝子の関与が *in vitro* の実験で証明された。又エストロゲンと SERMs (selective estrogen receptor modulators) とではこの siRNA 導入による抑制動態も異なり、今後の低

用量の内分泌かく乱物質の作用及びその機序を考えるにあたり極めて重要な知見ではないかと考えられた。

次にマイクロアレイ法の結果見つけられた新たなエストロゲン誘導遺伝子 p120E4F が実際のヒトのエストロゲン標的組織、すなはちエストロゲン応答組織でどのような作用をしており、更にはエストロゲン作用とどのように関係しているのかといった事の解析も極めて重要となる。今回の研究で実際のヒト大動脈組織で p120E4F の発現動態を検出したところこの遺伝子の発現細胞は ER α 陽性細胞に一致してその発現が認められ、実際のエストロゲン作用と密接な関連性が示唆された。さらにこの遺伝子のヒト大動脈における発現動態は、性別や動脈硬化の程度を含めたエストロゲン作用とも密接に関連を示している事が示された。このように *in vitro* の結果を *in vivo* のヒト組織での所見と対応していくアプローチは今後低用量暴露も含めて内分泌かく乱物質の人体への作用を考えるにあたって極めて重要な知見を供するものと考えられた。

【免疫】

低用量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
(廣川勝昱)

胎仔胸腺器官培養システム (HOS-FTOC) を用いることにより、極めて低用量の EDCs が胸腺細胞の増殖分化を抑制することが明らかになった。この EDCs の抑制効果は、培養システムにエストロゲン受容体拮抗剤を添加することにより見られなくなるので、エストロゲン受容体を介したものであることが分かった。成熟 T 細胞についても、マイトゲンなどの刺激で増殖期にあるものについては、EDC

s が細胞内情報伝達系に影響を及ぼすことが分かった。この事から EDC s が T 細胞の分化段階だけでなく、末梢における免疫反応系にも影響を示すことが分かった。今後は EDC s による胸腺リンパ球の増殖・分化に対する抑制効果を妊娠マウスや胎仔マウスを用いて、*in vivo* で調べる必要のあることがわかった。

内分泌かく乱物質の免疫機能に及ぼす影響及び低用量影響に関する研究 (山崎聖美)

マクロファージは自然免疫を担う細胞の1つであり、多数の表面レセプターによって異物を認識し、迅速に貪食、排除を行うとともに、炎症性サイトカインを産生する。この機構は、免疫系の中でも最も原始的なものであり、高等生物のみならず生物が広く持っているシステムである。

LPS や IFN- γ で活性化されたマクロファージには一酸化窒素合成酵素 (NOS) が発現し、L-アルギニンのグアニジド基に酸素を添加して、NO と L-シトリルリンを生成する。NO は細菌や腫瘍細胞に対して高レベルの毒性がある。NO は毒性と関係しないシグナル伝達の機能も持っており、その毒性機能は、ほとんどが過酸化亜硝酸塩の形成につながる酸素還元系の産物との相互作用の後に起こる。この機能は、貪食作用や炎症の部位で起こる。感染防御機構において、自然免疫は感染早期の防御機構のみならず、適応免疫の Th1/Th2 細胞への分化を決定する大きな要因となる。

本研究では、内分泌かく乱物質のマクロファージの活性化に対する影響を調べることを目的とし、マクロファージの活性化の指標として、NO 産生量と貪食作用を選んだ。

in vitro では、アルキルフェノール化

合物類、フタル酸化合物類、BPA、2,4'-DDE、4,4'-DDE とともに低濃度で NO 産生を上昇させ、LPS で刺激したときは逆に 10^{-3} ~ 10^{-4} M で NO 産生を減少させた。これらの化合物は、 10^{-3} ~ 10^{-4} M と 10^{-10} ~ 10^{-11} M の濃度で特に細胞に作用すると思われる。貪食作用については、NO 産生で見られた 10^{-3} ~ 10^{-4} M と 10^{-10} ~ 10^{-11} M の濃度での高い反応性は見られなかったが、 10^{-3} ~ 10^{-4} M では貪食作用が減少し、 10^{-10} ~ 10^{-11} M では上昇する傾向が見られた。 10^{-3} ~ 10^{-4} M という濃度は、化合物によっては細胞毒性を示す濃度であるため、NO 産生の上昇と貪食作用の減少は、細胞毒性によるものかもしれない。今回の実験では、NO 産生については 16 時間処理で、貪食作用については 3 時間処理である。貪食作用についても、長時間の処理を行った場合の実験をする必要があると思われる。

in vivo での結果は、*in vitro* とは異なり、コントロールと有意差はみられなかったが、個体間のばらつきが大きかったことが差のみられなかった一因と考えられる。

本研究では、貪食作用という指標では化学物質の影響ははっきりと確認できなかったが、NO 産生については影響があることが分かった。NO 産生量の低下は、直接的に抗病原微生物作用の低下に結びつき、感染防御の低下につながる点で重要な知見であると思われる。また、NO 産生の増加、貪食能の増加は、常にマクロファージが活性化され続けることによって異物が進入した際に本来の機能が働かなくなる可能性も示している。マクロファージ活性化の別の指標、たとえば TNF- α の産生量などでこれらの化合物の影響をさらに調べる必要があると思われる。

内分泌かく乱物質が免疫系に影響を及

ぼしている例として、海棲哺乳類が大量に死亡した事件があげられる。死亡したイルカの多くは、体内に種々の化学物質が蓄積されており、皮膚及び器官にウイルスやバクテリアの著しい日和見感染があったことが報告されている。これは化学物質が免疫機能を低下させウイルス感染に抵抗できなかったためと考えられる。また、PCBに汚染したバルト海の魚を餌として与えたアザラシに先天性及び後天性の免疫応答抑制が見られたという報告がある。汚染された海域に住むアザラシにおける免疫抑制は、細菌性及びウイルス性感染症の発症率増加の理由であると考えられている。本研究から得られた結果がこういった現象を一部裏付けているのではないかと思われる。

マクロファージはホルモン受容体を介していない経路で影響を受けていると思われる。今回の研究から、内分泌攪乱作用を疑われている化学物質が、内分泌系だけでなく免疫機能に影響を及ぼしていることが示唆された。免疫機能がどのような経路で化学物質の影響を受けるのか、その詳細なメカニズムの解明に関する研究もこれから行う必要がある。フタル酸エステル類はPPARを活性化する。マクロファージにおけるPPAR活性化とマクロファージ機能との関係についてはまだ明らかになっていないが、このような経路により影響を及ぼしている可能性もある。

今回の研究において、アルキルフェノール類、フタル酸エステル類、BPAでは、NO産生において低用量での反応が見られた。フタル酸エステル化合物はプラスチック類の可塑剤として使用されており、BPAは樹脂の原料として使用されている。ヒトは食器や食品の包装材などを通してこれらの化合物を低用量で日常的に摂取している可能性があり、さらなる研究が

必要であると思われる。

【神経】

核内受容体・コファクター複合体の新規作用機構及び複合体形成における内分泌かく乱物質の低用量影響に関する解析（垣塚 彰）

当初フェノバルビタールによって誘導される内在性のmPXR活性化因子を同定することが出来たと考えていたが、実際に同定されたDEHPは天然物ではなく、実験操作上プラスチック製品を用いたときに誤って溶出混入した物質であると推察される。このDEHPはフタル酸エステル類の1つであり、塩化ビニル樹脂の可塑剤として、子供用玩具、医療器具、建築材料、自動車用内装材など、幅広く利用されており、日常生活においては、常にある程度の濃度のDEHPに曝露される可能性がある。たとえば、医療用に使用されている軟質塩ビ器具としては、点滴用バッグ、点滴用チューブ、透析用チューブ、輸血用バッグ、輸血用チューブ、心臓バイパス機器用チューブ、鼻腔栄養チューブ、呼吸用チューブ等があり、これらに含まれるDEHPに関して、人への毒性影響に関しては激しい議論が行われている。

今回の結果から、DEHPにヒトPXR受容体を活性化する潜在能力があることが判明したが、その活性化能は、マウスPXR受容体に対するものよりかなり弱く、齧歯類を用いた動物実験において示された精巣毒性等は、ヒトでは起こりにくいものと推測される。

一方、DEHPは血液中のリパーゼなどにより加水分解されてMEHPとなると、PPAR α を強く活性化することから、本来の作用とは異なった状況でPPAR α の標的遺伝子の活性化を促進する。その結果として内分泌の攪乱作用も無視できないか

もしれない。

神経系初期発生におけるエストロジェンレセプターの機能および内分泌かく乱化学物質の低用量影響に関する解析 (菅野 純)

今年度は、網羅的遺伝子発現解析により得られた発現変動遺伝子の定量的 RT-PCR による検証と、DES 暴露による神経幹細胞の分化能に及ぼす影響について焦点を絞って検討した。その結果、21 種類の遺伝子が実際に GeneChip 解析結果と同様の変化を示すことがわかり、GeneChip 解析結果がほぼ検証される結果が得られた。それら遺伝子の発現変動の特徴は、細胞分化に関わる遺伝子の発現 (PDGF receptor) が上昇し、cell cycle, cell signal, EGF receptor 等、自己複製に関わると考えられる遺伝子の発現が減少していることである。また、c-fos, VEGF, Egr1 等、子宮を始めとする他の臓器において estrogen によって発現が誘導されることが知られている遺伝子の発現が低下していること、estrogen と作用の一部を共有することが判明している insulin シグナルに関わる IGFBP-2 遺伝子の発現が低下していることは、*in utero* DES 暴露により、本来 estrogen によって誘導されるべき遺伝子群が誘導されない状態に固定されている可能性が示唆され、胎児期のエストロジェンシグナルのかく乱による影響を検討する上で今後重要な知見である。

今回得られた、DES 暴露を受けた胎児脳由来ニューロスフェアの分化能に影響が生じていることを示唆する結果は、GeneChip 解析および定量的 RT-PCR 解析から判明した発現変動遺伝子群の機能から予想される影響と矛盾しない。すなわち、マウス胎生 11 日から 14 日という、神経幹細胞が盛んに自己複製を行う時期

の DES 暴露は、神経幹細胞の自己複製能を低下させるのみならず、その分化能にも影響する可能性があることが、これらの結果から結論される。DES のエストロジェン受容体への結合活性がエストロジオールと遜色ないことを踏まえると、この影響はエストロジェン受容体を介していることが強く示唆される。BPA などの他の内分泌かく乱物質でも同様の影響が生じるかを含め、胎生期脳におけるエストロジェンシグナルのかく乱が神経幹細胞に及ぼす影響についてさらに踏み込んだ解析が必要である。

なお、胎児体内では実際には何らかのホメオスタシス維持機構あるいは発生プログラム監視機構が働き、それにより外来性刺激影響の緩和が起こっている可能性がある。ここで得られた低濃度 DES の神経幹細胞に対する影響は、そのような緩和機構が取り除かれた *in vitro* 実験環境で増幅された結果である可能性は考慮しておかなければならない (*In vivo* との比較を進めれば、ホメオスタシス維持機構の解析にも繋がると期待される)。

【核内レセプター】

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に関する研究
(加藤茂明)

性ホルモンレセプターには、数多くの転写共役因子及び複合体が結合することが分かった。しかしながら、これら因子複合体の中でいずれが最も重要であるかは判断できなかった。今後遺伝子ノックアウト等により、確認する必要があると思われた。また、ダイオキシンレセプターと性ホルモンレセプターが会合することから、性ホルモンかく乱作用の一つは、この分子機構を介するものと考えられた。

ステロイド受容体発現調節機構およ

びその内分泌かく乱物質低用量影響に関する研究（藤本成明）

エストロゲン作用を持つ内分泌かく乱化学物質の低用量作用メカニズムには、その受容体の発現変化が関与していると考えられる。従って、ER の発現変化とその調節機構を明らかにすることは、低用量作用を理解する基礎である。これまでの研究で、ラットおよびマウスの前立腺での ER 発現の *in vivo* での調節様式明らかにしてきた。すなわち、ER の mRNA 発現は、成長過程を通じて α 型から β 型へ動的に発現移行していること、および、 β 型発現はアンドロゲン依存的に調節されており、逆に α 型の発現は抑制的に調節されていることがマウス、ラット共通の現象として明らかになった。

今回、前立腺部位による発現とその調節様式の違いを検討した。その結果、ER α 、 β のアンドロゲン依存性発現調節そのものは部位によって差がなかった。しかし、mRNA の発現量およびその ER α ・ β 比率は部位により異なっており、これが組織における上皮細胞と間質細胞の構成比等による結果か、細胞での遺伝子発現調節の差によるのかは今後検討課題である。また、成熟期の 10 週齢の前立腺と 5 2 週齢の比較においては、後者で ER β の発現低下と ER α の発現上昇が観察された。これは、おそらく老化に伴い漸減するアンドロゲンレベルによる結果と考えられた。ER α の上昇と発癌リスクが相関することが、マウスモデルおよびヒト臨床例から報告されているが、ラットにおいては、老化とともに明確な ER α の上昇が観察されたことはこれに符合する。

前立腺細胞増殖において、エストロゲンはアンドロゲンと同時に投与したときには相乗的に前立腺肥大を誘導し

さらに前立腺癌化にも関係することが示されてきた。このとき、アンドロゲン応答性の遺伝子である probasin および kallikrein S3 の発現も増強されることが示された。probasin は、lipocalin superfamily に属する分泌タンパク質の一つであるが核内にも取り込まれる。また遺伝子上流に明確な AR 結合部位が同定されている。kallikrein S3 はアンドロゲン依存性に分泌される serine protease であり、おそらくヒトの PSA のホモログである。

昨年度の研究で、ラット ER β の遺伝子上流域を約 0.7 kbp クローニングしそこにプロモーター活性があることを示した。またこの領域は既知のマウス ER β 上流域と非常に相同性が高かった。上流域の活性をより詳しく解明するため、マウスゲノムのさらに広範な領域について解析した。exon 1 上流約 2.1 kbp までのレポーターで解析したが、*in vitro* での転写活性化能は、-0.7 kbp 以下の領域でも必要十分であった。しかし、アンドロゲン依存性の発現調節は、-1.3 kbp 以下のプロモーターレポーターにおいてはみられず上流域の-1356/-1777 の構造が要求されることが示された。しかし、ここに ARE 類似の結合部位等はみられない。その応答機構の解明は今後の課題である。

【マイクロアレイ基盤整備】

遺伝子発現の網羅的検索と、インフォマティクスの確立（五十嵐勝秀）

本年度は、昨年度に引き続き、当班基盤研究へ導入した DNA マイクロアレイ技術を用いた各班員の研究サポートを行った。その結果、笹野班員、井口班員、加藤班員の 3 人の班員の方と共同研究を進めることができた。実際のデータは現在取得中のものも多いが、今年度中に取り

終え、各班員の研究サポートに役立てる。その中でも、加藤班員と実施している ARKO マウス卵巣における遺伝子発現変化において、ARKO により予想以上に広範な遺伝子発現が変化していることが判明した。この、「非常に多くの種類の遺伝子発現が変化している」という知見は、網羅的遺伝子発現解析を行って初めて得られるものであり、本技術の威力を示す結果である。

E. 結論

本研究課題では、平成 14 年度に引き続き、I. プロジェクト課題研究、および II. 基盤研究の 2 本立てで研究を推進した。

I. のプロジェクト研究では、引き続き文献情報調査とともに、必要な緊急の実験的検討を立ち上げ、これらに関澤が統括した。

II. の基盤研究では、従前通り、生殖・ステロイド代謝、免疫、神経、核内レセプター、などについて、引き続き基盤研究を、低用量問題に焦点を当てつつ推進し、井上がこれを統括した。また、それぞれの研究に対して、マイクロアレイ基盤整備の立場から、必要な研究課題をサポートした。

I. プロジェクト課題研究

低用量問題に関連する文献調査では、BPA のみに限っても続々と新しい論文が刊行されており、それらには低用量問題の今後のとるべき研究課題などを示唆するものが少なくなかった。

II. 基盤研究

基盤研究の中で特筆すべき点は、それぞれの部門における研究の進展が著しいことであり、生殖・ステロイド代謝部門では、エストラダイオールとエストロゲン様作用物質による卵巣摘出マウス

宮において応答遺伝子を探索し、データベース化し、マイクロアレイ解析によってヒト平滑筋細胞でエストロゲン誘導遺伝子を同定しうることが明らかになった。免疫部門では、種々の EDCs の胸腺分化、マクロファージ機能に対する影響が、低用量レベルで観察された。神経部門では、DEHP が mPXR の活性化能をもつことが明かとなり、DES によって胎児神経幹細胞の自己複製のみでなく分化も影響を受ける可能性があることを見出した。核内レセプター部門では、ダイオキシンの内分泌かく乱作用のメカニズムはエストロゲンレセプターへの作用による可能性があることが明かとなり、マイクロアレイ基盤整備では、井口班員、笹野班員、加藤班員らへの研究の支援を中心に進行した。

以上、今年度の成果によって、高次生命系に関連し低用量問題の背景となりうる重要な実験的事実が蓄積されたものと考ええる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

- Yoon, B. I., G. X. Li, K. Kitada, Y. Kawasaki, K. Igarashi, Y. Kodama, T. Inoue, K. Kobayashi, J. Kanno, D. Y. Kim, T. Inoue and Y. Hirabayashi (2003). Mechanisms of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: cDNA microarray analyses using mouse bone marrow tissue. *Environ Health Perspect* 111: 1411-20.
- Hirabayashi, Y., K. Yoshida, S.

Aizawa, Y. Kodama, J. Kanno, Y. Kurokawa, I. Yoshimura and T. Inoue (2003). Evaluation of nonthreshold leukemogenic response to methyl nitrosourea in p53-deficient C3H/He mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 190: 251-61.

- Tanaka, M., Y. Hirabayashi, T. Sekiguchi, T. Inoue, M. Katsuki and A. Miyajima (2003). Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood* 102: 3154-62.
- Takahashi, Y., T. Inoue, A. Gossler and Y. Saga (2003). Feedback loops comprising Dll1, Dll3 and Mesp2, and differential involvement of Psen1 are essential for rostrocaudal patterning of somites. *Development* 130: 4259-68.

著書・総説など

- Inoue, T. Introduction: Toxicogenomics - a New Paradigm of Toxicology. In: T. Inoue and W. D. Pennie (eds.), *Toxicogenomics*, pp. 3-11. Tokyo: Springer-Verlag Tokyo, 2003.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Kawasaki Y, Li GX, Kanno J, and Inoue T. On the Mechanistic Differences of Benzene-induced Leukemogenesis between Wild type and p53 Knockout Mice. In: K. Tanaka, T. Takabatake, K. Fujikawa, T. Matsumoto, and F. Sato (eds.), *Molecular Mechanisms for Radiation-induced Cellular Response and Cancer Development*, pp. 110-116. Aomori: Institute for Environmental Sciences, 2003.

2. 学会発表

- Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Yodoi J, Kanno J, Inoue T. Leukemia-Prevention *in vivo*-Model: Attenuation of Spontaneous and Benzene-Induced Thymic Lymphoma by Absorption of Reactive Oxygen Species (ROS) using Thioredoxin Over-Expression Mouse. *6th Joint conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association Advances in Cancer Research: Molecular and Cellular Biology, Genomics and Proteomics, Targeted Therapeutics, Novel Clinical Trials, Molecular and Genetic Epidemiology / Prevention* (2004.1.28) [Waikoloa, HI, (Conference proceedings, pp158, 2004)]
- Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI, Kawasaki Y, Kodama Y, Kaneko T, Yodoi J, Kanno J, Inoue T: Prevention of benzene-induced leukemogenesis by Trx/ADF requires of p53-expression. The 45th Annual Meeting of the American Society of Hematology (2003.12.8) [San Diego, CA, (*Blood* 102 (11): pp829a, 2003)]
- Inoue T: The Next Step of the TOXICIGENOMICS- From forward to reverse, a predicting genomics - Toxicogenomics International Forum (2003.10.13) [Seoul Korea, (Meeting abstract p6-7, 2003)]
- Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Inoue T, Kobayashi K, Kanno J, Kim DY, Inoue T, Hirabayashi Y: Exploration of the hematotoxic mechanism of benzene based on the cDNA microarray analyses

in the mouse bone marrow tissue.
Toxicogenomics International Forum
2003 (2003.10.9) [Tokyo, (Meeting
abstract, p89-90, 2003)]

- Inoue T: Mechanisms of benzene-
induced hematotoxicity and
leukemogenicity: cDNA microarray
analyses using mouse bone marrow
tissue. A symposium in Honor of
Wagner BM, MD at New York Medical
College, "Chemical Safety
Assessment: Contributions of
Toxicological Pathology and
Mechanistic Investigations",
(2003.9.23) [Valhalla, NY]
- Hirabayashi Y, Li GX, Yoon BI,
Fujii-Kuriyama Y, Kaneko T, Kanno J,
Inoue T: AhR suppresses hemopoiesis
during steady state but accelerates
cell cycle as an early response: a
study of AhR-knockout mice. DIOXIN
2003 (2003.8.26) [Boston, MA,
(Organo-halogen Compounds 64:270-
273, 2003)]
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Kitada K,
Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, Li
GX, Kanno J, Kim DY, Inoue T: cDNA
microarray analysis addressing the
mechanisms of benzene-induced
epigenetic and genotoxic changes.
Gordon Research Conference on
Toxicogenomics (2003.6.25)
[Lewiston, ME]

H. 知的財産所有権の取得状況

1. 特許取得

該当しない

2. 実用新案登録

該当しない

3. その他 (データベース等)

該当しない

II. 分担研究報告書

I. プロジェクト課題研究

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質の生体影響に関する研究
—特に低用量効果・複合効果・作用機構について—

プロジェクト課題研究

プロジェクト課題研究総括研究者 関澤 純 徳島大学総合科学部

研究要旨

関澤は、低用量の免疫系、神経系への影響リスクの可能性について文献調査により検討し、結果を文献調査結果の整理、免疫系への影響の知見の整理、および影響リスク評価の観点として整理した。松井は、食品中には植物ホルモンなど様々なホルモン様物質に着目し内分泌攪乱と密接に関係するアリルヒドロカーボン受容体 (AhR) リガンドに焦点を当て、食品中や生体中に天然に存在している AhR リガンドについて調査した。様々な食品中に強い AhR リガンドとその阻害剤が存在しジェニステイン、ダイゼインなどのイソフラボン類にも AhR リガンド活性があることが明らかとなった。杉村は、生長初期の前立腺における低用量エストロゲン物質による前立腺重量、形態変化に対する影響について検討した。生直後の雄マウスに3日間 diethylstilbestrol (DES) を投与して、前立腺の腹葉と後側葉を微小解剖して形態測定と組織学的に検討し、前立腺重量および前立腺腺管分枝形態発生は $10\mu\text{g} \cdot 1\mu\text{g}$ 投与群において抑制されたが、 $1\text{ng} \cdot 1\text{pg}$ 投与群ではこの変化は認められず、前立腺発生初期におけるエストロゲン物質暴露は濃度依存的に長期間にわたる形態学的影響を及ぼすことが示唆された。福島は、 α -Benzene hexachloride (α -BHC) のラット肝発がん作用を diethylnitrosamine (DEN) をイニシエーターとする発がん二段階法を用い検討した。高用量投与では、glutathione S-transferase (GST) 酵素の活性は上昇し肝前がん病変である glutathione S-transferase placental form (GST-P) 陽性細胞巢の発生を促進、逆に低用量投与では抑制をもたらした。酸化ストレスのマーカー 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の形成レベルは α -BHC 高用量では増加し低用量では減少した。 α -BHC の発がん作用にはホルミシスの現象があることが判明した。加藤は、ポリ塩化ビフェニル (PCB) による甲状腺ホルモンかく乱作用機構と、マウス、ハムスター、ラット、モルモットにおける体内動態の種差について検討した。用いた全動物において、KC500 投与による血清中 T4 濃度の低下には、T4 の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。

分担研究者（順不同）

関澤 純 徳島大学 総合科学部 教授

松井三郎 京都大学大学院 地球環境
学堂 教授

杉村芳樹 三重大学 医学部 教授

福島昭治 大阪市立大学大学院
医学研究科 教授

加藤善久 静岡県立大学 薬学部 講師

A. 研究目的

関澤は、胎児期、周産期など特定時期の低用量の内分泌かく乱化学物質への曝露による免疫系、神経系への影響リスクについて、文献調査により現時点で入手可能な知見に基づき検討する。松井は、食品中や天然に存在する AhR リガンドの知見をまとめそれらの活性を比較することにより、AhR の役割について考察する。杉村は、前立腺におけるエストロゲン物質暴露による前立腺重量、形態変化に対する影響の検討する。福島は、 α -BHC の作用にホルミシス現象があるかどうかを検証する。加藤は、PCB 投与による血清中サイロキシン(T_4)濃度の低下作用メカニズムを明らかにするとともに、その低下作用メカニズムに動物種差があるか否かを検討する。

B. 方法

(1) TOXCENTER と MEDLINE を用い適切なキーワードを組み合わせて検索をし、必要な文献を抽出、内容を検討し、結果を文献調査結果の整理、影響リスク評価の観点、免疫系への影響の知見の整理としてまとめた。第6回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集から、神経・行動

毒性および免疫毒性関連の報告を表題、著者、標的器官、物質、対象生物、影響の内容、曝露時期に分け整理した。文献検索結果を影響リスク評価の観点、免疫系への影響と神経系への影響の概観した。

(2) 食品中や天然に存在する AhR に関する文献を収集し、情報をまとめて考察した。(3) 生直後の雄マウスに3日間 DES を投与し7、15、30、60 日後に解剖し重量・形態・組織学的変化を観察した。

(4) 雄性 F344 ラットに DEN を週1回、3 週間、腹腔内に投与した後、プロモーションの段階に α -BHC を 0、0.01、0.05、0.1、1、50、500ppm の用量で 10 週間、混餌投与した。実験開始 13 週にてラットを屠殺し、肝臓について種々の方法で検索した。

(5) ddY 系マウス、Syrian 系ハムスター、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットに、KC500 (37.5 および 100 mg/kg) を投与し、血清中 total T_4 および free T_4 濃度を測定した。血中からの $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の消失クリアランス、胆汁中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ のグルクロン酸抱合体 ($[^{125}\text{I}]\text{T}_4\text{-Glu}$) の排泄量、トランスサイレチン (TTR) に対する血清中 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の結合率、 $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ の組織への移行量を測定した。

(倫理面への配慮)

屠殺にあたってはエーテル麻酔ないしは頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いた。また、医学研究科の実験動物取り扱い規定に対応してラットを飼育した。実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行った。

C. 結果と考察

(1) 文献検索結果を影響リスク評価の観点、免疫系への影響と神経系への影響の概観、および個別物質における知見として整理した。STN 提供の TOXCENTER と MEDLINE を用い、endocrine, immunotoxicity, neurotoxicity とを掛け合わせ年代制限を行った。第6回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集の報告を発表番号、タイトル、著者名、標的器官、対象物質、生物、影響の種類、曝露時期について整理した。免疫系、神経系は内分泌系と緊密な関係を持ち、生体の生理作用の制御やホメオスタシスに関与しており、化学物質による作用は単一の標的における一個の影響に留まらない。内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえる。影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。

(2) 天然の AhR リガンドとして活性の強いインディルビンの他の、インディゴ、ITE、ICZ、DIM、トリプトファンに紫外線を照射して生成する FICZ および dFICZ はすべてインドール環を持つ化合物であるが、多くの食品中に構造未同定の AhR リガンドが存在する。多くの AhR リガンドがリン酸化に影響を与える活性も併せ持っていた。

(3) 前立腺重量および腺管先端数は 10 μ g、1 μ g 群において減少を認めたが、1ng・1pg 群では変化は無かった。また 10 μ g、1 μ g 群の特に後側葉において結節状の異常腺管構造を認めた。ER- α および

ER- β ノックアウトマウスで DES 2 μ g の投与による前立腺への催奇形性は ER- α を介すると報告されているが詳細なシグナル伝達経路や分子機能は未解決であり、今後 ER- α および ER- β を介した前立腺に対する分子機能のさらなる検討が必要である。

(4) α -BHC の高用量投与では肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生を促進し、低用量投与では逆に抑制を示した。同様に高用量投与では、GST 酵素の活性は上昇し、低用量投与では減少傾向をもたらした。酸化ストレスのマーカーである 8-OHdG 形成レベルは 500 ppm では増加し、0.1, 1 ppm では減少した。GST-P 陽性細胞巢の結果から、 α -BHC の発がん作用にはホルミシス現象があることが判明した。8-OHdG の形成レベル、CYP450 蛋白量、cDNA マイクロアレイによる mRNA 発現量も結果を支持している。

(5) KC500 投与により、血中 125 I] T_4 のクリアランスおよび肝臓への移行量は、4 種の動物で著しく増加し、胆汁中 125 I] T_4 -Glu の排泄量は、ラットでのみ増加した。また、 125 I] T_4 と TTR の結合率は、ラットとモルモットで低下した。KC500 投与により、血清中 total T_4 および free T_4 濃度はいずれの動物でもほぼ用量依存的に低下した。各動物に KC500 を投与し、 125 I] T_4 の組織移行量を詳しく調べた結果、 125 I] T_4 の肝臓への移行量は、4 種の動物で顕著に増加した。用いた全ての動物において、KC500 投与後の血清中 T_4 濃度の低下には T_4 の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。

D. 結論

(1) 内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上でデータはまだ十分でない。リスク評価法については、適切なエンドポイントの選択と、それらに影響を及ぼす要因の整理、人と動物の間における反応の相同性に関する知見、性と生理周期、年齢や併用される化学物質や食生活など、生体側の反応を左右する要因など人の個体間における分布や変動の寄与、および定量的な評価における内分泌作用物質としての閾値あるいは変動許容幅などの検討が必要である。今後数年における調査研究の集積をベースに試験法、影響リスクの評価法を検討し、影響リスクの観点から重要な物質については人が曝露されるレベルで起こりうるリスクを可能な限り検討する必要がある。

(2) 食品中に様々な AhR リガンドが存在していることが文献調査で明らかとなった。これら AhR リガンドはリガンド活性以外にも様々な生理活性を持ち、特に細胞のリン酸化シグナルに影響を与える活性があり、なんらかの必然的な関係があるのかも知れない。

(3) 生長初期の前立腺の estrogenic chemicals 曝露により生長後の長期間にわたる影響が明らかとなった。

(4) α -BHC のラット肝発がん作用を DEN をイニシエーターとするラット肝二段階法で検討したところ、肝前がん病変である GST-P 陽性細胞巢の発生は高用量投与群では増加し、低用量群では抑制を示すというホルミシス現象が認められた。

(5) KC500 投与後、4 種の動物において、 T_4 の体内動態を詳しく調べた結果、血清中 T_4 濃度の低下には、 T_4 の肝臓への移行が大きく寄与していることが示唆された。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

神経・免疫毒性を中心とした内分泌かく乱化学物質による低用量影響の評価

分担研究者：関澤 純 徳島大学総合科学部

研究要旨

免疫系、神経系は内分泌系と緊密な関係を持ち、生体の生理作用の制御やホメオスタシスに関与しており、化学物質による作用は単一の標的における一個の影響に留まらない。人が暴露される低用量の内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響リスクの可能性について文献調査により検討した。TOXCENTER および MEDLINE 医学文献データベースでは、主題に沿った文献を的確に選別するキーワードは存在しないので、種々試行し得られた検索結果の中から 26 文献を選択し、それらについて内容を分類し、免疫系への影響の知見の整理、および影響リスク評価の観点として整理した。その結果から、内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつといえるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえ、影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。

A. 研究目的

化学物質による免疫系への影響や神経行動毒性の報告が見られるが、その作用機序や用量と影響の定量的な関係については未知の問題が多い。胎児期、周産期など特定時期の低用量の内分泌かく乱化学物質への曝露による免疫系、神経系への影響リスクについて、現時点で入手可能な知見に基づき検討する。

B. 研究方法

人が曝露される低用量の内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響リスクの可能性について文献調査を行った。

(1) STN 提供の TOXCENTER (TOXLIN が改名) と MEDLINE を用い適切と思われるキーワードの組み合わせによる検索を行っ

た。得られた検索結果から必要な文献を選択、内容を検討し、結果を文献調査結果の整理、影響リスク評価の観点、免疫系への影響の知見の整理としてまとめた。

(2) 第 6 回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集(2003 年 12 月)から、神経・行動毒性および免疫毒性に関連する報告を選択し、これらをタイトル、著者、標的器官、物質、対象生物、影響の内容、曝露時期について整理した。

(3) 当初ビスフェノール A のリスク評価を目標に焦点をあてたデータベースを企図したが、このものについて新しいデータが続々と出つつあることから、現時点で適切な評価を下しがたい状況と判断して第 6 回日本内分泌攪乱化学物質学会の発表から関連情報のデータベースを作成した。

C. 研究結果

(1) TOXCENTER と MEDLINE による文献調査

endocrine, immunotoxicity, neurotoxicity とを掛け合わせ、件数は百件程度を目途に年代制限を行うこととした。MESH 統制語の使用を検討したが、以下の理由で断念した。endocrine: endocrine system は MESH にあるが、内分泌かく乱という概念の言葉は MESH にはなく、また immunotoxicity、neurotoxicity という概念に相当する言葉は MESH にはなかったが、それぞれ Anatomy 用語の immune system, nervous system は MESH にはあった。もしこれらの MESH を使用すると、endocrine system, immune system, nervous system に関するすべての文献がヒットし、数万件の膨大な検索結果から個々に必要な文献を検討することになり、非効率的であり適切といえない。また内分泌かく乱を意識的に研究しているといえる報告はほぼ 1988 年以降になってであり、またデータベースからは同じ文献が重複してヒットしてくるので、これら重複を確認して除去し 29 文献を抽出した(表 1、および付録 I を参照)。実際には内容的に神経・免疫毒性に関する文献はこのうち 26 件であった(表 2)。

表 1 検索結果

(A) Endocrine ? and (immunotox? or neurotox?): の組み合わせによる検索結果	7,700 件
(B) 上記のうち検索語が abstracts 収載	487 件
(C) 1988 年以降に限定	258 件
(D) 重複を除去	123 件
(E) 最終結果をプリントアウトし、この中から目的とする文献を選択	29 件

表 2 影響の標的器官による内訳

・神経系	18 件
・免疫系	8 件
・ほか	3 件

表 3 化学物質の種別

Estrogen 4 件, organotin, toxaphen, dioxin 3 件, PCB 2 件, chlordecone, PBDE, lead 1 件

表 4 試験系の開発についての文献

神経行動毒性	2 件
発生毒性	3 件

(2) 第 6 回日本内分泌攪乱化学物質学会要旨集 (2003 年 12 月)による文献調査

神経/行動毒性および免疫毒性関連の 36 件中、低用量影響評価に関連あると思われる発表は 24 件であった(付録 II 参照)。

表 5 影響の標的器官による内訳

・神経/行動毒性関連	17 件
・免疫関連	5 件
・甲状腺関連	3 件

表 6 化学物質の種別

・Bisphenol A	6 件
・PCB	6 件
・Phthalates	3 件
・PCDD/PCDF	3 件

表 7 対象生物の内訳

・ラット	10 件
・マウス	6 件
・ヒト	4 件
・細胞	4 件

表 8 影響の種類の内訳

・行動レベル	6 件
--------	-----

・分子生物学あるいは分析	17 件
・両方	3 件

表9 曝露時期

・周産期	10 件
・出生後	3 件
・成熟動物	3 件
・細胞	5 件

(3) 文献調査結果の整理 以上のようにして、文献について調査した結果、次のようにまとめられた。

(A) 免疫系への影響や神経行動毒性の報告が見られるが、その作用機序や用量と影響の低用量域での影響についての定量的な関係については未解決の問題が多い。それらは内分泌、免疫、神経系の高次生命系における生体のホメオスタシス、その背景にある細胞、分子レベルでの複雑な相関関係の問題、および曝露におけるいわゆる臨界期と影響の発生段階後期における発現の関連の問題として整理される。

(B) 化学物質による免疫系への有害影響は医薬品による直接的な影響の場合を除きあまり多くの注意が払われてこなかった。内分泌系や神経系との相互作用についてよく知られているもののすべての作用が有害ではないのはいままでの副腎皮質から分泌される糖質コルチコステロイド、副腎髄質や交感神経末端から分泌されるカテコールアミン、脳下垂体から分泌されるプロラクチン、成長ホルモンや、エンドルフィンのような副腎髄質や自律神経末端から分泌される神経ペプチドなど、神経系は多様な様式で免疫系と作用しあっている。反対にサイトカインのような免疫系の産物は神経系への重要なシグナルを発している。このように免疫系と神経系は複雑な化学メッセンジャーのネットワークを形成し、生理的

また病理的な結果につながる。行動学的条件付けによる免疫反応への影響など、ストレスによる免疫系への影響という例もある。糖質コルチコイドが免疫抑制効果を持つことは良く知られているが、糖質コルチコイド投与による胸腺退縮（ストレスの兆候）によりリンパ球の分布が変化する。リンパ節のアドレナリン作動受容体 α と β は脾臓、胸腺、リンパ節などリンパ組織の交感神経支配により高濃度のカテコールアミンに曝される。カテコールアミンはナチュラルキラー細胞活性の重要な調節因子である。

(4) 影響のリスク評価上の問題点の整理 (A) 生体の生理作用の制御やホメオスタシスにおける内分泌系、免疫系、神経系の共同作用に対する化学物質によるかく乱作用の可能性と有害リスクの評価はきわめて重要である。今後数年における調査研究の集積をベースに試験法、影響リスクの評価法を検討し、影響リスクの観点から重要な物質については人が曝露されるレベルで起こりうるリスクを可能な限り検討する必要がある。(B) 内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえる。

(C) 影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。(D) 試験系については、曝露時期と影響の観察時期およびエンドポイントの選択、適切な試験動物種、系統の選択の組み合わせを背景機作を考慮して実施することが必要である。

(E) リスク評価は、適切なエンドポイントの選択と、影響を及ぼす要因の整理、人と動物の間における反応の相同性に関する知見、人の個体間における分布（ポ

リモーフィズムなど遺伝的な背景を含む) や変動 (性と生理周期、年齢や併用される化学物質や食生活など、生体側の反応を左右する要因) の寄与、定量的評価における内分泌作用物質としての閾値についての新しい考え方と変動の許容幅の検討が必要である。

D. 考察

免疫系、神経系は内分泌系と緊密な関係を持ち、生体の生理作用の制御やホメオスタシスに関与しており、化学物質による作用は単一の標的における一個の影響に留まらない。内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえる。影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。

E. 結論

(1) 生体の生理作用の制御やホメオスタシスにおける内分泌系、免疫系、神経系の共同作用に対する化学物質によるかく乱作用の可能性と有害リスクの評価はきわめて重要である。今後数年における調査研究の集積をベースに試験法、影響リスクの評価法を検討し、影響リスクの観点から重要な物質については人が曝露されるレベルで起こりうるリスクを可能な限り検討する必要がある。

(2) 内分泌かく乱化学物質による免疫系、神経系への影響の報告は、個別物質については最近になり集積しつつあるが、低用量影響を評価する上で十分なデータはまだないといえる。

(3) 影響リスクを検討するうえで基本となる試験系とリスクの評価法の確立が、求められる。

(4) 試験系については、曝露時期と影響

の観察時期およびエンドポイントの選択、適切な試験動物種、系統の選択の組み合わせは複雑であり、再現性ある試験結果が得られる条件の標準化が必要である。

(5) リスク評価法については、適切なエンドポイントの選択と、それらに影響を及ぼす要因の整理、人と動物の間における反応の相同性に関する知見、人の個体間における分布 (ポリモーフィズムなど遺伝的な背景を含む) や変動 (性と生理周期、年齢や併用される化学物質や食生活など、生体側の反応を左右する要因) の寄与、および定量的な評価における内分泌作用物質としての閾値あるいは変動許容幅などの検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

© Sekizawa J., Suter G, Birnbaum L., Integrated Human and Ecological Risk Assessment : A Case Study of Tributyltin and Triphenyltin Compounds, J. Human and Ecological Risk Assessment. 2003; 9(1) 325-342

© Suter G, Vermeire T, Munns WR, Sekizawa J., Framework for the Integration of Health and Ecological Risk Assessment, J. Human and Ecological Risk Assessment. 2003; 9(1) 281-301

© Suter G, Munns WR, Sekizawa J., J. Types of Integration in Risk Assessment and Management, and Why They Are Needed, Human and Ecological Risk Assessment. 2003; 9(1) 273-279

2. 学会発表

© Sekizawa J., Miyairi S, Ema M.:
Possible modification of dioxin risk in
the presence of endogenous ligands for
arylhydrocarbon receptor, 23rd
International Symposium on Halogenated
Environmental Organic Pollutants and
POPs, 2003, 65 325-328 (Boston,
September, 2003)

© Sekizawa J.: Examination of health
risks from exposure to low doses o
f endocrine disruptors, Society for
Environmental Toxicology and Chemistry,
Asia/Pacific 2003 meeting (Christ
Church, September, 2003)

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
3. その他 なし

付録I TOXCENTER/MEDLINEによる文献検索結果

No.	著者名	文献名	出典	毒性
1	Barlow SM, Kozianowski G, Wurtzen G, Schlatter J.	Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet. Report of a workshop, 5-6 October 1999, Paris, France.	Food Chem Toxicol. 2001. Sep;19(9): 893-905. No abstract available. PMID: 11498266 [PubMed - indexed for MEDLINE]	-
2	Bearer CF	Biomarkers in pediatric environmental health: a cross-cutting issue.	Environ Health Perspect. 1998 Jun; 106 Suppl 3:813-6. PMID: 9646042 [PubMed - indexed for MEDLINE]	-
3	Birnbaum LS, Tuomisto J.	Non-carcinogenic effects of TODD in animals.	Food Addit Contam. 2000 Apr;17(4):275-88. Review. [PubMed]	免疫
4	Branchi I, Capone F, Alleva E, Costa LG.	Polybrominated diphenyl ethers: neurobehavioral effects following developmental exposure.	Neurotoxicology. 2003 Jun;24(3):449-62. Review. [PubMed]	神経
5	Chen CW	Assessment of endocrine disruptors: approaches, issues	Folia Histochem Cytobiol. 2001;39 Suppl 2:20-3 Review	神経
6	Colborn T, Smolen MJ, Rolland R.	Environmental neurotoxic effects: the search for new protocols in functional teratology.	Toxicol Ind Health. 1998 Jan-Apr;14(1-2):9-23. Review. [PubMed]	神経
7	DeLong GT, Rice CD.	Tributyltin potentiates 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl-induced cytochrome P-4501A-related activity.	J Toxicol Environ Health. 1997 Jun 6;51(2):131-48. [PubMed]	免疫
8	Descotes J.	Integrating immunotoxicity with effects on other biological systems in preclinical safety evaluation: a perspective.	Toxicology. 2000 Jan 17;142(3):157-60. Review. No abstract available. [PubMed]	神経
9	Drela N, Zesko I.	Gender-related early immune changes in mice exposed to airborne suspended matter.	Immunopharmacol Immunotoxicol. 2003 Feb;25(1):101-21. [PubMed]	免疫
10	Falnoga I, Tusek-Znidaric M, Horvat M, Stegnar P.	Mercury, selenium, and cadmium in human autopsy samples from Idrija residents and mercury mine	Environ Res. 2000 Nov;84(3):211-8. [PubMed]	神経
11	Ferguson SA, Scallet AC, Flynn KM, Meredith JM, Schwetz BA.	Developmental neurotoxicity of endocrine disruptors: focus on estrogens.	Neurotoxicology. 2000 Dec;21(6):947-56. Review. [PubMed]	神経
12	Garthoff LH, Sobotka TJ.	From farm to table to brain: foodborne pathogen infection and the potential role of the neuro-immune-endocrine system in neurotoxic sequelae.	Nutr Neurosci. 2001;4(5):333-74. Review. [PubMed]	神経
13	Goldman LR, Koduru S	Chemicals in the environment and developmental toxicity to children: a public health and policy	Environ Health Perspect. 2000 Jun; 108 Suppl 3:443-8. PMID: 10852843 [PubMed - indexed for MEDLINE]	神経
14	Gore AC, Wu TJ, Oung T, Lee JB, Woller MJ.	A novel mechanism for endocrine-disrupting effects of polychlorinated biphenyls: direct effects on gonadotropin-releasing hormone neurones.	J Neuroendocrinol. 2002 Oct;14(10):814-23. [PubMed]	神経