

- Mechanism analysis of hormetic effect using three dimension microarray system. 95th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, March 27-31, Orlando, Florida, U. S. A., 2004 (AACR proceedings, vol. 45, March 2004, 3226, p. 747)
- 14) 福島昭治：環境発がん物質の閾値。シンポジウム講演，第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会，7 月 6-8 日，大阪，2004（第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集 S1-4, p. 107)
- 15) Puatanachokchai R, Imaoka S, Osada M, Morimura K, Wanibuchi H, Wei M, Funae, Y, Fukushima S.: Unforeseen effect of phenobarbital in rat CYP2B1 transgenic mice model. 15th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations 2004: Chemical biology in the Postgenomic Era New Approaches and Applications. July 4-9, Mainz, Germany, 2004 (Book of Abstracts, P5-GS-7, p. 117)
- 16) Fukushima S, Morimura K, Wanibuchi H, Kinoshita A, Salim EI: Current and emerging challenges in toxicopathology: Application of rat medium-term bioassays for carcinogens and hormesis phenomenon of the carcinogens. Workshop, 10th International Congress of Toxicology:ICTX 2004, July 11-15, Tampere, Finland, 2004 (Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 197, No. 3, WS WI-43, p. 148)
- 17) 木下アンナ、森村圭一朗、プアタナ チョクチャイラウィワン、串田昌彦、鰐淵英機、北野光昭、福島昭治：非遺伝毒性発がん物質の低用量域肝発がん性：ホルミシスの存在。シンポジウム講演，第 63 回日本癌学会学術総会，9 月 29-10 月 1 日，福岡，2004（日本癌学会学術総会記事 S01-1, p. 30)
- 18) Fukushima S, Kitano M, Kinoshita A., Puatanachokchai R, Kushida M.: Hormesis on carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. The 2nd Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP) General Assembly Conference. November 1-3, Seoul, Korea, 2004 (Book of Abstracts, p. 59)
- <一般演題>
- 1) 宮地夏子、森村圭一朗、内藤沙紀、萩原淳司、鰐淵英機、福島昭治：低用量遺伝毒性発がん物質 diethylnitrosamine (DEN) の肝発がん性と *in vivo* へに原性における閾値の存在。第 93 回日本病理学会，6 月 9-11 日，札幌，2004（日本病理学会誌第 93 巻第 1 号 P2-K-43, p. 360)
- 2) 串田昌彦、森村圭一朗、木下アンナ、サリム エリサイド、鰐淵英機、福島昭治：低用量 DDT のラット肝発がんに対する影響。第 93 回日本病理学会，6 月 9-11 日，札幌，2004（日本病理学会誌第 93 巻第 1 号 P2-K-44, p. 360)
- 3) 木下アンナ、鰐淵英機、森村圭一朗、サリム エリサイド、萩原淳司、福島昭治：Mmh/OGG1 ミュータントマウスにおける Phenobarbital の発がん性試験。

- 第 93 回日本病理学会, 6 月 9-11 日, 札幌, 2004 (日本病理学会誌第 93 巻第 1 号 P2-K-45, p. 360)
- 4) ◎プアタナチョックチャイ ラウイワン、木下アンナ、森村圭一朗、鰐淵英機、カンジンソック、福島昭治: Hormetic phenomenon of alpha benzene hexachloride in diethylnitrosamine induced rats. 第 93 回日本病理学会, 6 月 9-11 日, 札幌, 2004 (日本病理学会誌第 93 巻第 1 号 P2-K-47, p. 360)
- 5) 森村圭一朗、星 学、鰐淵英機、木下アンナ、福島昭治: 遺伝毒性発がん物質のリスク評価. 第 11 回日本がん予防研究会, 7 月 15-16 日, 東京, 2004 (第 11 回日本がん予防研究会抄録集 P41, p. 79)
- 6) 宮地夏子、森村圭一朗、プアタナチョックチャイ ラウイワン、カンジンソック、萩原淳司、福島昭治: 食品由来の遺伝毒性発がん物質 Diethylnitrosamine(DEN)の肝発がん性と in vivo 変異原性における閾値. 第 11 回日本がん予防研究会, 7 月 15-16 日, 東京, 2004 (第 11 回日本がん予防研究会抄録集 P42, p. 80)
- 7) ◎Puatanachokchai R, Wanibuchi H, Morimura K, Kinoshita A, Osada M, Funae Y, Fukushima S.: Hormetic effect of alpha benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis and possible mechanisms in rats. 第 11 回日本がん予防研究会, 7 月 15-16 日, 東京, 2004 (第 11 回日本がん予防研究会抄録集 P43, p. 81)
- 8) 宮地夏子、鰐淵英機、山口貴嗣、柚木孝之、村井 隆、森 聖、福島昭治: 遺伝毒性発がん物質 Diethylnitrosamine(DEN)の低用量域における肝発がん性と in vivo 変異原性の閾値の存在. 第 63 回日本癌学会学術総会, 9 月 29-10 月 1 日, 福岡, 2004 (日本癌学会学術総会記事 P-0088, p. 100)
- 9) ◎プアタナチョックチャイラウイワン、鰐淵英機、森村圭一朗、木下アンナ、カンジンソック、船江良彦、福島昭治: Dimethylnitrosamine 誘発ラット肝発癌における α -BHC の“ホルミシス現象”の分子的メカニズム. 第 63 回日本癌学会学術総会, 9 月 29-10 月 1 日, 福岡, 2004 (日本癌学会学術総会記事 P-0089 p. 100)
- G. 知的所有権の所得状況
1. 特許取得
なし
 2. 実用新案登録
なし
 3. その他 (データベース等)

Ⅱ. 分担研究報告書

Ⅱ. 基盤研究

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明

分担研究者 井口泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

研究要旨

臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的として、それぞれの生育過程にあるマウスにエストロゲンを曝露し、雌性生殖器官における遺伝子応答を解析した。その結果、新生仔期から成長が進むにつれそのエストロゲン応答遺伝子の種類が変化するだけでなく、応答遺伝子数が増加していくことが明らかになった。臨界期に特異的に発現変動する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その解析を進めている。

A. 研究目的

臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにする。すなわち、エストロゲンにより誘起される組織異常の臨界期の概念を明確にするために、臨界期前後でのエストロゲン処理により発現変動する遺伝子をマイクロアレイ法を用いて探索するとともに、組織異常に関連する遺伝子を明らかにし、化学物質の低用量および複合影響の結果と照合させる。

B. 研究方法

それぞれの生育過程にあるマウスにエストロゲンを曝露し、雌性生殖器官における応答を解析した。すなわち、C57BL/6Jマウスを動物実験に関する指針に従い飼育し交配したのち、新生仔マウスを得た。出生直後、出生後 5 日、20 日、70 日に

それぞれジエチルスチルベストロール（DES）を 1g 体重あたり 2 μ g 投与した。対照群にはごま油を用いた。投与後、通常 6 時間で子宮および膣を摘出し RNA を調製した。生後 70 日のマウスの解析にあたっては、その 2 週間前に卵巣摘出を行った。

調製した RNA を精製した後、cDNA 合成、ラベル化 cRNA プロブの合成を行い、合成した 15 μ g の cRNA プロブを用いて、DNA マイクロアレイ（Mouse U74Av2 ; Affymetrix 社）にハイブリダイゼーションを行い、規定の方法に従い約 1 万 2 千遺伝子の発現について解析を行った。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた実験においては、自然科学研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指

針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

C. 研究結果

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン (DES を障害性陽性対象物質とする) を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期から成長が進むにつれその応答遺伝子の数が増加することが明らかになった。

すなわち新生仔にエストロゲンを曝露し、子宮における遺伝子発現変化を解析したところ、解析した 1 万 2 千の遺伝子のうちおよそ 30 遺伝子が発現上昇していた。これに対し、出生 70 日後のマウスにおいては 600 以上の遺伝子がエストロゲンにより発現が誘導されていた。また新生仔期に発現が誘導される遺伝子の多くは出生 70 日後のマウスにおいて誘導される遺伝子とは異なっており、新生仔期に特有のエストロゲン応答をすることが示唆された。興味深いことにこうした新生仔期特有のエストロゲン応答性は急速に消失し、マウスの成育過程においてエストロゲン応答性が異なっていくことが示された。

さらに、こうした成育過程によるエストロゲン応答性の差は、マウス膺においても確認され、マウスの成育が進むにつれてエストロゲン応答性の遺伝子が増加することが明らかになった。これは、新生仔期のエストロゲン曝露による雌性生殖器官への不可逆的な影響を解明する上

でも重要な知見である。

D. 考察

マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれそれぞれの影響によりその期間は異なる。例えば、膺上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後 5 日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。従来は、この曝露と最終的な発現系 (エンドポイント) との関連、エンドポイントの解析が主であったが、本研究によりエストロゲン曝露により引き起こされる初期の変化について明らかにすることができた。

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生する思春期以前から受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。本研究の結果、エストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていることが示された。こうした変化は比較的急速におきており、臨界期が終了する生後 5 日では、エストロゲンにより誘導される遺伝子数は出生直後のものに比べて増加しているだけでなく、遺伝子の種類も異なっていた。したがって新生仔期においてのみ反応するエストロゲン応答遺伝子について、発現パターンや機能解析を進めていくことにより、最終的に引き起こされる不可逆的な影響の発現メカニズムを解明できると思われる。

E. 結論

マウスの新生仔期から成獣にいたるまで雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子を解析したところ、応答遺伝子群はその成育段階で大きく変化することがわかった。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる出生直後の臨界期では、発現が変動する遺伝子は限られており、成獣で応答する遺伝子群とも異なっていた。こうした臨界期に特異的に発現変動する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その解析を進めている。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Adachi, T., K.-B. Koh, H. Tainaka, Y. Matsuno, Y. Ono, K. Sakurai, H. Fukata, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol. Reprod. Devel.*, 67: 19-25, 2004.
2. 井口泰泉：環境ホルモン研究と野生動物・生態系. *科学* 74: 53-58, 2004.
- ©3. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Estrogen-independent activation of ErbBs signaling and estrogen receptor α in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Oncogene*, 23: 340-349, 2004.
4. Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and T. Iguchi: An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*: 137: 11-20, 2004.
5. Katsu, Y., D.S. Bermudez, E.L. Braun, C. Helbing, S. Miyagawa, M.P. Gunderson, S. Kohno, T.A. Bryan, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen. Comp. Endocr.*, 136: 122-133, 2004.
6. Matsuno, Y., T. Adachi, K.B. Koh, H. Fukata, A. Sugimura, K. Sakurai, T. Shibayama, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol on testicular gene expression in adult mouse: comprehensive analysis with cDNA subtraction method. *Internat. J. Androl.*, 27: 115-122, 2004.
7. Adachi, T., Y. Ono, K.B. Koh, K. Takashima, H. Tainaka, Y. Matsuno, S. Nakagawa, E. Todaka, K. Sakurai, H. Fukata, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Long-term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to genistein in mice: Toxicogenomic analysis using cDNA

- microarray. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 445-452, 2004.
8. 井口泰泉：野生動物の内分泌攪乱のメカニズムを探る．現代化学 No. 397: 34-39, 2004.
9. Kato, H., T. Iwata, Y. Katsu, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using *in vitro* assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1410-1414, 2004.
10. 井口泰泉：森田昌敏編、考えよう地球環境7 化学物質と健康の本．ポプラ社. 2004.
11. Adachi T, K.B. Koh, H.. Tanikawa, Y. Matsuno, Y. Ono, K. Sakurai, H. Fukata, T. Iguchi, M. Komiyama and C. Mori: Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17 β -estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol. Reprod. Devel.*, 67: 19-25, 2004.
12. Tatarazako, N., M. Koshio, H. Hori, M. Morita and T. Iguchi: Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka. *J. Health Sci.*, 50: 301-308, 2004.
13. 井口泰泉：環境ホルモンによる生態系の攪乱．環境研究, No. 132: 60-68, 2004.
- ©14. Miyagawa, S., A. Suzuki, Y. Katsu, M. Kobayashi, M. Goto, H. Handa, H. Watanabe and T. Iguchi: Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *J. Mol. Endocr.*, 32: 663-677, 2004.
- ©15. Okada, A., Y. Ohta, S.L. Brody, H. Watanabe, A. Krust, P. Chambon and T. Iguchi: Essential role of foxj1, but not of estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct. *J. Mol. Endocr.*, 32: 615-625, 2004.
16. 井口泰泉：化学物質管理の必要性．「化審法改正のポイント」．中園繁克、塚島順一編．化学工業日報社. pp. 458, 2004.
- ©17. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, D.B. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi: Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocr.*, 33: 243-252, 2004.
18. 井口泰泉：日本がリードする環境ホルモン問題．時報, 37 (10): 32-33, 2004.
19. 鎌迫典久, 小田重人, 阿部良子, 森田昌敏, 井口泰泉: ミジンコを用いた甲殻類に対する内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法開発. 環境科学会誌 (印刷中)
20. 井口泰泉: ゴードン会議に参加して. 環境ホルモン学会ニューズレター. 7(2): 4, 2004.
21. Okada, A., Y. Ohta, S.L. Brody and T. Iguchi: Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation. *J. Endocrinol.*, 182: 219-227, 2004.

22. Sato, T., Y. Fukazawa, Y. Ohta and T. Iguchi: Sustained mRNA expressions of growth factors participate in inducing estrogen-independent persistent proliferation of vaginal epithelium of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.*, 19: 43-51, 2004.
23. Kohno, S., M. Fujime, Y. Kamishima and T. Iguchi: Sexually dimorphic basal water absorption at the isolated pelvic patch of Japanese tree frog, *Hyla japonica*. *J. Exp. Zool.*, 301A: 428-438, 2004.
24. Seiwa, C., K. Tanaka, J. Nakahara, T. Komiyama, Y. Katsu, T. Iguchi and H. Asou: Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cell. *Neuroendocrinology*, 80: 21-30, 2004.
25. 井口泰泉: 環境ホルモンの最新動向. *生活と環境*, 49 (9): 9-13, 2004.
26. 井口泰泉: 内分泌攪乱物質の作用メカニズム: ステロイドホルモン受容体からオーファン受容体へ. *化学と生物*, (印刷中)
27. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Effect of 17 β -estradiol, nonylphenol and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen. Comp. Endocr.*, 138: 228-236, 2004.
28. Yoshinaga, N., E. Shiraishi, T. Yamamoto, T. Iguchi, S.-I. Abe and T. Kitano: Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibitory substance (MIS) during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *BBRC*, 322: 508-513, 2004.
29. Tominaga, N., S. Kohra, T. Iguchi and K. Arizono: Effects of perfluoro organic compound toxicity on nematode *Caenorhabditis elegans* fecundity. *J. Health Sci.*, 50: 545-550, 2004.
- © 30. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, S. Ohsako, C. Tohyama, H. Handa and T. Iguchi: Comparative uterine gene expression analysis after dioxin and estradiol administration. *J. Mol. Endocr.* (in press).
31. Nakada, N., H. Nyunoy, M. Nakamura, A. Hara, T. Iguchi and H. Takada: Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
32. Inudo, M., H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Matsuoka, T. Mori, S. Taniyama, K. Kadokami, M. Koga, R. Shinohara, T. Hutchinson, T. Iguchi and K. Arizono: Levels of estrogenicity, dietary phytoestrogen and organochlorine pesticide in an experimental fish diet and reproduction and hepatic vitellogenin expression in medaka (*Oryzias Latipes*). *Comp. Med.*, (in press).

2. 学会発表

1. A cDNA Microarray For Measuring

- Global Gene Expression Profiles In *Daphnia magna*: Giving Biomarkers Ecological Relevance (2004)
2. David J. Moore, Fei Ling Lim, Richard Connon, Helen L. Hooper, Steve Maund, Tom Hutchinson, Hajime Watanabe, Wim De Coen, Amanda Callaghan George Orphanides and Richard M. Sibly: British Toxicology Society Meeting 2004/4/7 Edinburgh
 3. 勝 義直、宮川信一、井口泰泉: タイトル: マウス膣に発現する deltaNp63 の転写調節機構解析. 日本発生生物学会 (名古屋) 2004 年 6 月 4 日-6 日
 4. 有菌幸司、古賀由香里、守田文代、中本貴士、木村宏和、浦 和寛、井口 泰泉: 金属類がセンチュウ (*C. elegans*) の発生や繁殖に与える影響. 第 14 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム (静岡) 2004 年 6 月 10-11 日.
 5. 小田重人、阿部良子、鑑迫典久、森田昌敏、井口泰泉: オオミジンコの系統による幼若ホルモン様物質に対する感受性の違い. 第 10 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2004 年 9 月 3-4 日.
 6. Sato, T. and T. Iguchi: Differential expression of BMP2, BMP4 and homeobox genes in mouse uterus and vagina. 日本動物学会 (名古屋) 2004 年 9 月.
 7. Kirigaya, A., T. Sato, T. Iguchi and S. Hayashi: Involvement of MIS and ER β in induction of polyovular follicles in mouse ovary treated with DES neonatally. 日本動物学会 (名古屋) 2004 年 9 月.
 8. Koga, Y., H. Kimura, N. Tominaga, T. Iguchi and K. Arizono.: Cytochrome P450 (CYP) genes in *C. elegans*: a potential bioindicator for evolution of toxicity of various environmental chemicals. Toxicology International Forum 2004 (Kyoto) 2004 年 10 月 12-13 日.

H. 知的所有権の取得状況

なし

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

ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 笹野公伸 東北大学大学院 医学系研究科 医科学専攻
病理学講座 病理診断学分野 教授

研究要旨

本研究ではヒト骨芽細胞に対する estrogen 及び androgen の作用を確認後、骨芽細胞に対する種々の内分泌かく乱化学物質の細胞増殖に対する影響を検討する事を目的とした。ヒト骨芽細胞由来株の hFOB 1.19 を用いて、細胞増殖 (WST-8 assay) 及びアポトーシス (Hoechst, TUNEL assay) を指標とし、最初に Estradiol、 5α -dehydroxytestosterone の作用を検索した。さらに、genistein、bisphenol A、diethylstilbestrol の及ぼす影響を検討した。その結果、hFOB に対して estradiol 及び 5α -dehydroxytestosterone は細胞増殖を刺激した。さらに bisphenol A も同様に増殖を刺激したが、diethylstilbestrol では逆に有意にアポトーシスを生じさせた。一方 Genistein の添加では明らかな影響はみられなかった。本研究は内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであり、その影響は化合物によって質的な差を示した。

A. 研究目的

本研究では骨芽細胞（株化細胞）に対する estrogen 及び androgen の作用を確認した後、内分泌かく乱化学物質の骨細胞に対しての細胞増殖、細胞死に対する影響を検討した。

すなわち、ヒト骨組織は種々のステロイドホルモンの標的組織であり、これらのホルモンは骨の生理、病理に対して重要な作用を果たしている。そこでヒト骨組織では内分泌かく乱化学物質の影響も強く受けると考えられる。この内分泌かく乱物質の骨への影響は動物実験において骨格奇形という形で証明されてはいるが、ヒト骨組

織に対しての影響を詳細に検討した報告はまったくない。そこで本研究ではヒト骨芽細胞を用いて種々の内分泌かく乱化学物質の影響を確認して、内分泌かく乱物質の代表的な性ステロイド標的組織である骨組織に対しての影響を検討する第一歩とした。

B. 研究方法

本研究ではヒト骨芽細胞由来株の hFOB 1.19 を対象とした。細胞増殖 (WST-8 assay) 及びアポトーシス (Hoechst, TUNEL assay) を指標として、Estradiol、 5α -

dehydroxytestosterone のこの細胞に対する影響を確認する事で性ステロイドに対する応答性を検討し、同様に genistein、bisphenol A、diethylstilbestrol の影響を検索した。

すなわち、以下の方法で本研究では実験を進めた。

Chemicals

Estradiol 、 Progesterone 、 Diethylstilbestrol (以上、Sigma-Aldrich Co.)、 5α -dehydroxytestosterone、Genistein、Bisphenol A (以上、和光純薬工業株式会社)

Human osteoblast

hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372, transfected with T large antigen) を使用した。培地は DMEM/F12 medium に fetal bovine serum (10%) と G 418 sulfate (50mg/mL) を添加したものを使用し、 34°C 、5% CO_2 インキュベーター内で培養した。各薬剤を添加する際は、血清を含まない培地で 24 時間、前処置してから施行した。各薬剤を添加し、所定の時間経過後に細胞増殖/細胞死の判定を行った。

Cell proliferation assay

細胞増殖の判定には Cell Counting Kit-8 (株式会社同仁化学研究所) を使用し、発色強度を吸光度計 (450nm) で数値化した。

Apoptosis assays

アポトーシスの判定には Hoechst33258 染色を行い、陽性細胞数を数えた。また、TUNEL assay を行い、発色強度を吸光度計 (450nm) で数値化した (Apoptosis Screening Kit, 和光純薬工業株式会社)。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト骨芽細胞のモデルとして株化細胞を使用した。ヒト病理組織及び実験動物を使用していないため、学内の倫理委員会の承認を必要としなかった。

C. 研究結果

hFOB は estrogen receptor β 、androgen receptor を発現しており、estradiol 及び 5α -dehydroxytestosterone の添加によって、細胞増殖の刺激を受けた。さらに、これらのステロイド添加は血清枯渇によるアポトーシスを抑制した。さらに bisphenol A も同様に細胞増殖を刺激したが、diethylstilbestrol はアポトーシスを生じさせた。

すなわち、今回用いた hFOB は、estrogen receptor β 、androgen receptor、progesterone receptor が発現しており、組織内での性ステロイドホルモン作用に intracrine 機構として極めて重要な役割を果たしている事が明らかになってきている種々のエストロゲン合成・代謝酵素 (aromatase、 17β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1, 3, 5、 5α -reductase type 1, 2、steroid sulfatase、estrogen sulfotransferase) も同時に発現していた。また、又この細胞の性格を更に検討する目的で骨芽細胞マーカーである alkaline phosphatase の発現を確認している。以上より、hFOB はヒト骨芽細胞の性質、性ステロイドホルモン感受性を保っていると考えられ、ヒト骨芽細胞に対する内分泌かく乱物質の影響を検討するには適したモデル系で

ある事が考えられた。

Estradiol (E2) 及び 5α -dehydroxytestosterone (DHT) (それぞれ 100p, 1n, 10, 100n, $1\mu\text{M}$) を hFOB に添加 (72 時間) し、細胞増殖を指標として評価した。結果、骨芽細胞に対して E2 及び DHT は直接的に作用し、細胞増殖を刺激した (いずれも最大 130%)。E2 は濃度依存性に細胞数を増加させた。DHT も濃度依存性に細胞数を増加させたが、 $1\mu\text{M}$ では逆に細胞数が減少した。E2 及び DHT の経時的影響では E2 及び DHT (いずれも 10nM 添加) とともに経時的 (12, 24, 48, 72 時間) に細胞数の増加が認められた。さらに長期間 (6 日間) の血清の枯渇条件下では、hFOB はアポトーシスを生じたが、E2 及び DHT (いずれも 10nM) はこのアポトーシスを抑制 (コントロールのアポトーシス 100% に対し約 40%) した。一方 Progesterone 添加 (100p, 1n, 10, 100n, $1\mu\text{M}$) では細胞増殖、アポトーシスともに大きな変化は示さなかった。

内分泌かく乱化学物質の影響を 72 時間の細胞増殖で検討した結果、bisphenol A の添加では 100pM 及び 1nM でおよそ 130-145% の増加を認めたが、さらに高濃度の 10nM 及び 100nM では 110-120% 程度だった。Genistein の添加 (100pM-100nM, 公比 10) では、110% 前後の増殖にすぎなかった。さらに diethylstilbestrol の添加は、100pM から細胞傷害 (アポトーシス) を生じた。

D. 考 察

ヒトにおいては閉経後女性に骨粗鬆症が多い等、骨組織に対するステロイドホルモン特に性ステロイドホルモンの影響が高齢化社会の拾来とあわせて重要視されてき

ている。閉経期女性に認められるようにエストロゲン欠乏は種々の骨吸収性サイトカインの発現を亢進し、破骨細胞の分化を促す。一方、エストロゲン及びアンドロゲンは骨芽細胞に直接作用し、その細胞増加を促すことが最近明らかにされてきている。このように骨組織はステロイドホルモンの影響を強く受けることから、内分泌かく乱化学物質の影響をかなり強く受けることは予想されてきたが生殖器、中枢神経系などと比べるとその検索は必ずしもあまり行われてはきていなかった。内分泌かく乱化学物質の骨組織への影響は水棲生物にみられる骨格奇形という形で現れ、近年これらの動物で Bone Mineral density (骨密度) を評価した報告もされている (Lind PM. et al., 2004, *Environ Health Perspect*)。ヒトにおいては 1970 年代に diethylstilbestrol に暴露された子供の骨格成長が、暴露を受けない子供と比して促進しているということが知られていた (Wettenhall HN. et al., 1975, *J Pediatry*)。しかし、これらが骨細胞、骨芽細胞といった細胞単位で直接的に影響するか否かについてはまったくわかっていない。さらに上記の影響は感受性の高い胎児に特有の現象とも考えられ、成人骨組織への影響には直接あてはまらないと想定されてきたが、具体的な科学的検証はまったく行われてこなかった。

近年になって内分泌かく乱化学物質の影響として、骨芽細胞における作用がようやく注目されるようになり、Suzuki N. & Hattori A. (2003, *Life Sci*) は goldfish の骨芽細胞における bisphenol

A (BPA) の影響を検討し、ALP が BPA によって減少することを明らかにした。さらに Kanno S ら (2004, *Toxicology*) はマウス間葉系細胞 MC3T3-E1 を用いて BPA、nonylphenol (NP)、bisphthalate (DEHP) の影響を確認し、NP は濃度依存性 (10^{-9} - 10^{-4} M) に、BPA と DEHP は高濃度 (10^{-4} M) でその細胞増殖を抑制することを報告した。このようによく内分泌かく乱物質の性ステロイド標的組織である骨に対する影響の検索は細胞単位で科学的に行われるようになり、特に近年内分泌かく乱物質が骨芽細胞の分化過程に影響を及ぼしているのではないのかという事が考えられてきている。

一方、ヒト成人においては植物エストロゲンが閉経後女性の骨粗鬆症予防につながると考えられており (Morabito N. et al., 2002, *J Bone Miner Res*; Satchell KD and Lydeking-Olsen E., 2003, *Am J Clin Nutr*; Branca F., 2003, *Proc Nutr Soc*)、その臨床応用が高齢化社会の到来と共に大きな注目を集めてきている。すなわちこれらの植物エストロゲンの検索結果はなんらかの形で内分泌かく乱化学物質が胎児のみならず成人骨組織へも作用することを示唆しているものである。

そこで本研究では、骨芽細胞である hFOB を用いて、この株化細胞における種々の性ステロイドホルモン環境を明らかにし、ステロイド反応性の骨芽細胞、つまり成人の生体細胞を反映したモデルであることを評価した。すなわちステロイドホルモンのヒト骨に対する影響は主には骨芽細胞の細胞数の保持、あるいは減少といった形で示されてくる為、この性ステロイドに対して

感受性のある hFOB 1.19 (ATCC, CRL-11372, transfected with T large antigen) を用いて内分泌かく乱物質の細胞増殖、細胞死に対する影響を検討する事は極めて重要な *in vitro* の実験系であると考えられる。すなわちこのモデルを使用し、3 種類の内分泌かく乱化学物質の影響を検討したところ、その作用に質的つまり、生理的ステロイドの作用を示したり、細胞傷害を示したりといった差異が認められた。この内分泌かく乱物質による骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対する影響の違いが何に起因しているのかを追求するためには、今後更なる詳細な検討が必要となる。そこで現在マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を施行中である。

E. 結 論

ヒト骨芽細胞の細胞増殖、細胞死に対して種々の内分泌かく乱物質の与える影響を検討する本研究では内分泌かく乱化学物質がヒト成人骨組織に影響を及ぼすことを示唆するものであった。又その影響は化合物によって質的な差を示した。

内分泌かく乱化学物質は胎児組織、生殖器 (生殖能) に対しては重要な影響をおこす事が報告されてはいるが、同じく重要な性ステロイド標的組織である成人骨組織においてその影響は推察はされてきたものの科学的な検証は殆ど行われてはきていない。そこで今回内分泌かく乱物質のヒト骨芽細胞に対する影響の一部を明らかにすることができたが、今後、種々の内分泌かく乱化学物質の標的組織としてさらなる詳細な検討が必要である

と考えられた。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Oki Y, Sasano H. Localization and physiological roles of urocortin. Peptides. 25:1745-1749.
2. Saner KJ, Suzuki T, Sasano H, Pizzey J, Ho C, Strauss JF 3rd, Carr BR, Rainey WE. Steroid sulfotransferase (SULT2A1) gene transcription is regulated by steroidogenic factor 1 (SF1) and GATA-6 in the human adrenal. Molecular Endocrinology. 2004
3. Utsunomiya H, Ito K, Suzuki T, Kitamura T, Kaneko C, Nakata T, Niikura H, Okamura K, Yaegashi N, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human endometrial carcinoma. Clinical Cancer Research. 10:5850-5856. 2004
4. Lu L, Suzuki T, Yoshikawa Y, Murakami O, Miki Y, Moriya T, Bassett MH, Rainey WE, Hayashi Y, Sasano H. Nur-related factor 1 and nerve growth factor-induced clone B in human adrenal cortex and its disorders. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 89:4113-4118. 2004
5. Deb S, Amin S, Imir AG, Yilmaz MB, Suzuki T, Sasano H, Bulun SE. Estrogen regulates expression of tumor necrosis factor receptors in breast adipose fibroblasts. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 89:4018-4024. 2004
6. Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N, Sasano H. Estrogen-Related Receptor {alpha} in Human Breast Carcinoma as a Potent Prognostic Factor. Cancer Research. 64:4670-4676. 2004
7. Tokunagaa H, Miyamura N, Sasaki K, Yoshizato K, Itasaka M, Nakamaru K, Suefuji M, Kawashima J, Matsumoto K, Sasano H, Araki E. Preclinical Cushing's Syndrome Resulting from Black Adrenal Adenoma. A Case Report. Hormone Research. 62:60-66. 2004
8. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, De Vries CJ, Jimenez PT, Carr BR, Rainey WE. The orphan nuclear receptor NGFIB regulates transcription of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase: Implications for the control of adrenal functional zonation. The Journal of Biological Chemistry. 279:37622-37630. 2004
9. Urano T, Takahashi S, Suzuki T, Fujimura T, Fujita M, Kumagai J, Horie-Inoue K, Sasano H, Kitamura T, Ouchi Y, Inoue S. 14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer. Biochemical and Biophysical Research Commun. 319:795-800. 2004
10. Akahira JI, Aoki M, Suzuki T,

- Moriya T, Niikura H, Ito K, Inoue S, Okamura K, Sasano H, Yaegashi N. Expression of EBAG9/RCAS1 is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 90:2197-2202. 2004.
11. Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 219:17-26. 2004
 12. Shimada N, Suzuki T, Inoue S, Kato K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Shimosegawa T, Sasano H. Systemic distribution of estrogen-responsive finger protein (Efp) in human tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 218:147-153. 2004.
 13. Akahira J, Sugihashi Y, Suzuki T, Ito K, Niikura H, Moriya T, Nitta M, Okamura H, Inoue S, Sasano H, Okamura K, Yaegashi N. Decreased expression of 14-3-3 sigma is associated with advanced disease in human epithelial ovarian cancer: its correlation with aberrant DNA methylation. *Clinical Cancer Research*. 10:2687-2693. 2004
 14. Bulun SE, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Yilmaz B, Sebastian S. Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene. *Seminars in Reproductive Medicine*. 22:5-9. 2004
 15. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Saruta M, Nakabayashi M, Suzuki T, Sasano H, Shibahara S. Expression of urocortin III/stresscopin in human heart and kidney. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89:1897-1903. 2004
 16. Inoue T, Sasano H. Possible effects of progesterone on human central nervous system and neurogenic tumors. *Journal of Endocrinological Investigation*. 27:76-79. 2004
 17. Armand R, Cappola AR, Horenstein RB, Drachenberg CB, Sasano H, Papadimitriou JC. Adrenal cortical adenoma with excess black pigment deposition, combined with myelolipoma and clinical Cushing's syndrome. *International journal of surgical pathology*. 12:57-61. 2004
 18. Tatsuno I, Uchida D, Tanaka T, Koide H, Shigeta A, Ichikawa T, Sasano H, Saito Y. Vasopressin responsiveness of subclinical Cushing's syndrome due to ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 60:192-200. 2004
 19. De La Cruz C, Moriya T, Endoh M, Watanabe M, Takeyama J, Yang M, Oguma M, Sakamoto K, Suzuki T, Hirakawa H, Orita Y, Ohuchi N, Sasano H. Invasive micropapillary carcinoma of the

- breast: Clinicopathological and immunohistochemical study. *Pathology International* 54:90-96. 2004
20. Amari M, Moriya T, Ishida T, Harada Y, Ohnuki K, Takeda M, Sasano H, Horii A, Ohuchi N. Loss of Heterozygosity Analyses of Asynchronous Lesions of Ductal Carcinoma in situ and Invasive Ductal Carcinoma of the Human Breast. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 33:556-62. 2003
 21. Murakami M, Aoyama M, Suzuki T, Sasano H, Nakayama S, Iijima T. Genetic characterization of a new splice variant of the beta2 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 254:217-225. 2003
 22. Bassett MH, Suzuki T, Sasano H, White PC, Rainey WE. The Orphan Nuclear Receptors NURR1 and NGFIB Regulate Adrenal Aldosterone Production. *Molecular Endocrinology*. 18:279-290. 2004
 23. Suzuki T, Moriya T, Ishida T, Ohuchi N, Sasano H. Intracrine mechanism of estrogen synthesis in breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57:460-462. 2003
 24. Suzuki S, Tsubochi H, Ishibashi H, Suzuki T, Kondo T, Sasano H. Increased expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Pathology International*. 53:751-756. 2003
 25. Nakata T, Takashima S, Shiotsu Y, Murakata C, Ishida H, Akinaga S, Li PK, Sasano H, Suzuki T, Saeki T. Role of steroid sulfatase in local formation of estrogen in postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86:455-460. 2003
 26. Suzuki T, Miki Y, Nakata T, Shiotsu Y, Akinaga S, Inoue K, Ishida T, Kimura M, Moriya T, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in normal human tissue and breast carcinoma. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86:449-454. 2003
 27. Sasano H, Edwards DP, Anderson TJ, Silverberg SG, Evans DB, Santen RJ, Ramage P, Simpson ER, Bhatnagar AS, Miller WR. Validation of new aromatase monoclonal antibodies for immunohistochemistry: progress report. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86:239-244. 2003
 28. Bulun SE, Sebastian S, Takayama K, Suzuki T, Sasano H, Shozu M. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 86:219-224. 2003
 29. Abd-Elaziz M, Akahira J, Moriya T, Suzuki T, Yaegashi N, Sasano H. Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian

- carcinoma: An independent prognostic factor of clinical outcome. *Cancer Science*. 94:980-985.2003
30. Suzuki S, Tsubochi H, Darnel A, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS, Kondo T. Expression of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in alveolar epithelial cells in rats. *Endocrine Journal*. 50:445-451.2003
31. Ito A, Yamaguchi K, Tomita H, Suzuki T, Onogawa T, Sato T, Mizutamari H, Mikkaichi T, Nishio T, Suzuki T, Unno M, Sasano H, Abe T, Tamai M. Distribution of rat organic anion transporting polypeptide-E (oatp-E) in the rat eye. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 44:4877-4884.2003
32. Ishizuka M, Hatori M, Suzuki T, Miki Y, Darnel AD, Tazawa C, Sawai T, Uzuki M, Tanaka Y, Kokubun S, Sasano H. Sex steroid receptors in rheumatoid arthritis. *Clinical science(London, England)*. 106:293-300.2004
33. Sugawara A, Takeuchi K, Suzuki T, Itoi K, Sasano H, Ito S. A case of aldosterone-producing adrenocortical adenoma associated with a probable post-operative adrenal crisis: histopathological analyses of the adrenal gland. *Hypertension Research*. 26:663-668.2003
34. Yang J, Kato K, Noguchi K, Dairaku N, Koike T, Iijima K, Imatani A, Sekine H, Ohara S, Sasano H, Shimosegawa T. Tochu (*Eucommia ulmoides*) leaf extract prevents ammonia and vitamin C deficiency induced gastric mucosal injury. *Life Science*. 73:3245-3256.2003
35. Koshiyama H, Fujisawa T, Kuwamura N, Nakamura Y, Kanamori H, Oida E, Hara A, Suzuki T, Sasano H. A case of normoreninemic aldosterone-producing adenoma associated with chronic renal failure: case report and literature review. *Endocrine*. 21:221-226.2003
- ©36. Nakamura Y, Miki Y, Suzuki T, Nakata T, Darnel AD, Moriya T, Tazawa C, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta. *American Journal of Pathology*. 163:1329-1339.2003
37. Murakami M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Iijima T. Structures of the Murine Genes for the beta1- and beta4-Subunits of the Voltage-Dependent Calcium Channel. *Journal of molecular neuroscience*. 21:13-22.2003
38. Mori T, Murakami Y, Nishiki M, Koshimura K, Sasano H, Kato Y. Expression of hypothalamic corticotropin-releasing hormone-like immunoreactivity in isolated ACTH deficiency: a report of an autopsied case. *Journal of Endocrinological Investigation*.

- 26:556-559. 2003
39. Konishi A, Tazawa C, Miki Y, Darnel AD, Suzuki T, Ohta Y, Suzuki T, Tabayashi K, Sasano H. The possible roles of mineralocorticoid receptor and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in cardiac fibrosis in the spontaneously hypertensive rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 85:439-442. 2003
40. Adachi J, Hirai Y, Terui K, Nakano T, Fukuda Y, Suda T, Sasano H. A report of 7 cases of adrenal tumors secreting both cortisol and aldosterone. *Internal medicine*. 42:714-718. 2003
41. Murakami M, Yamamura H, Suzuki T, Kang MG, Ohya S, Murakami A, Miyoshi I, Sasano H, Muraki K, Hano T, Kasai N, Nakayama S, Campbell KP, Flockerzi V, Imaizumi Y, Yanagisawa T, Iijima T. Modified cardiovascular L-type channels in mice lacking the voltage-dependent Ca²⁺ channel β 3 subunit. *The Journal of Biological Chemistry*. 278:43261-43267. 2003
42. Kimura Y, Suzuki T, Kaneko C, Darnel A, Akahira J, Ebina M, Nukiwa T, Sasano H. Expression of androgen receptor, and 5 α -reductase types 1 and 2 in early gestation fetal lung: A possible correlation with branching morphogenesis. *Clinical Science (London, England)*. 105:709-713. 2003
43. Nakabayashi M, Suzuki T, Takahashi K, Totsune K, Muramatsu Y, Kaneko C, Date F, Takeyama J, Darnel AD, Moriya T, Sasano H. Orexin-A expression in human peripheral tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 205:43-50. 2003
44. Kawamura M, Owada M, Ino J, Sugawara T, Nakano T, Mochizuki I, Sakuma T, Segawa T, Motegi I, Sasano H. Effect of uni-adrenalectomy on blood pressure in a patient with excessive adrenal 18-hydroxy-11-deoxycortico-sterone production bilaterally. *Internal Medicine*. 42:507-512. 2003
45. Sato Y, Suzuki T, Hidaka K, Sato H, Ito K, Ito S, Sasano H. Immunolocalization of nuclear transcription factors, DAX-1 and COUP-TF II, in the normal human ovary: correlation with adrenal 4 binding protein/steroidogenic factor-1 immunolocalization during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:3415-3420. 2003
46. Yang M, Moriya T, Oguma M, De La Cruz C, Endoh M, Ishida T, Hirakawa H, Orita Y, Ohuchi N, Sasano H. Microinvasive ductal carcinoma (T1mic) of the breast. The clinicopathological profile and immunohistochemical features of 28 cases. *Pathology International*. 53:422-428. 2003
47. Ishiguro H, Kato K, Kishimoto T, Nagai Y, Takahashi T, Sasano H, Ishikura H. Expression of

- steroidogenic enzymes by luteinizing cells in the ovarian-type stroma of a mucin-producing cystic tumour of the pancreas. *Histopathology*. 43:97-98. 2003
48. Fukushima A, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Misawa H, Kanda K, Morita E, Sasano H, Tanaka Y. Virilizing adrenocortical adenoma with Cushing's syndrome, thyroid papillary carcinoma and hypergastrinemia in a middle-aged woman. *Endocrine Journal*. 50:179-187. 2003
- ©49. Suzuki T, Nakata T, Miki Y, Kaneko C, Moriya T, Ishida T, Akinaga S, Hirakawa H, Kimura M, Sasano H. Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma. *Cancer Research*. 63:2762-2770. 2003
50. Utsunomiya H, Suzuki T, Ito K, Moriya T, Konno R, Sato S, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H. The correlation between the response to progestogen treatment and the expression of progesterone receptor B and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human endometrial carcinoma. *Clinical Endocrinology*. 58:696-703. 2003
51. Kawabata W, Suzuki T, Moriya T, Fujimori K, Naganuma H, Inoue S, Kinouchi Y, Kameyama K, Takami H, Shimosegawa T, Sasano H. Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase Type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions. *Modern Pathology*. 16:437-444. 2003.
52. Kai K, Satoh N, Watanabe A, Shiraiwa K, Sasano H, Furuhashi K. Case report of rat true hermaphroditism: colocalization of oocytes and granulosa and sertoli cells in the germinal cord. *Toxicologic Pathology*. 31:290-294. 2003.
53. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:2309-2317. 2003
54. Chai Z, Brereton P, Suzuki T, Sasano H, Obeyesekere V, Escher G, Saffery R, Fuller P, Enriquez C, Krozowski Z. 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type XI localizes to human steroidogenic cells. *Endocrinology*. 144:2084-2091. 2003
55. Sato Y, Terada Y, Utsunomiya H, Koyanagi Y, Ito M, Miyoshi I, Suzuki T, Sasano H, Murakami T, Yaegashi N, Okamura K. Immunohistochemical localization of steroidogenic enzymes in human follicle following xenotransplantation of the human ovarian cortex into NOD-SCID mice. *Molecular Reproduction and Development*. 65:67-72. 2003
56. Mune T, Morita H, Suzuki T, Takahashi Y, Isomura Y, Tanahashi T,

- Daido H, Yamakita N, Deguchi T, Sasano H, White PC, Yasuda K. Role of local 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression in determining the phenotype of adrenal adenomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 88:864-870. 2003
57. Suzuki S, Koyama K, Darnel A, Ishibashi H, Kobayashi S, Kubo H, Suzuki T, Sasano H, Krozowski ZS. Dexamethasone upregulates 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in BEAS-2B cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 167:1244-1249. 2003
58. Izumi M, Serizawa H, Iwaya K, Takeda K, Sasano H, Mukai K. A case of myxoid adrenocortical carcinoma with extensive lipomatous metaplasia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 127:227-230. 2003
59. Mune T, Morita H, Suzuki T, Takahashi Y, Isomura Y, Tanahashi T, Daido H, Yamakita N, Deguchi T, Sasano H, Yasuda K, White PC. Role of local 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (HSD11B2) expression in determining the phenotype of adrenal adenomas. *Endocrine Research*. 28:751-752 2002
60. Tsubochi H, Suzuki S, Kubo H, Ueno T, Yoshimura T, Suzuki T, Sasano H, Kondo T. Early Changes in Alveolar Fluid Clearance by Nitric Oxide after Endotoxin Instillation in Rats. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 167:205-210 2003
61. Suzuki T, Murry BA, Darnel AD, Sasano H. Progesterone metabolism in human leukemic monoblast U937 cells. *Endocrine Journal*. 49:539-546 2002
62. Suzuki T, Nakamura Y, Moriya T, Sasano H. Effects of steroid hormones on vascular functions. *Microscopy research and technique*. 60:76-84 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 (データベース等)
なし