

## 20. 国内外の子宮肥大試験に関するデータ整理とその問題点の把握及び解決策の検討

分担研究者 永井 賢司

株式会社 三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 部長

### 研究要旨

これまで、OECD Validation Study 後に実施された試験データを収集・整理し、negative control に関する情報、代謝活性化される化合物に関する情報、estrogen antagonist 評価への有用性、群構成、positive, negative の判断基準および試験の成立条件を問題点として抽出し、検討を加えてきた。本年度は、2007年1月に開催された OECD 6<sup>th</sup> Meeting of the Validation Management Group (VMG) の議論について、これまで検討してきた知見を基に考察し、得られた知見を OECD ガイドライン案の骨子に付加する形でガイドライン案として纏めた。

### A. 研究目的

子宮肥大試験については、すでに OECD Validation Study が終了し、用いられた4種類いずれの protocol も弱いエストロゲン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であり、さらに動物種、飼育条件、溶媒等の諸条件の幅を許容しうる robust な方法であることが確認されている。本試験法をガイドラインとして実用段階とする上で最終的に残されている問題点を抽出し、その解決策を検討する。

### B. 研究方法

OECD Validation Study で用いられた子宮肥大試験 protocol は、これまでに実施された膨大な報告を詳細に検討して作成されている。Validation Study 以降、この protocol に準じて実施された試験データを整理することにより、本試験法をガイドラインとして実用段階とする上での問題点を抽出し、その解決策を検討する。

### C-D. 研究結果・考察

OECD Validation Study では、4種類の

protocol (①幼若ラット, 3日間経口投与, ②幼若ラット, 3日間皮下投与, ③卵巣摘出成熟ラット, 3日間皮下投与, ④卵巣摘出成熟ラット, 7日間皮下投与) について、phase 1 では、強力なエストロゲン様作用を有する ethynyl estradiol (EE) および抗エストロゲン様物質である ZM189.154, phase 2 では、弱いエストロゲン様作用を有するとされる methoxychlor, bisphenol A, genistein, o,p'-DDT, nonylphenol および negative control として di-n-butyl phthalate, 陽性対照として EE を用いて実施された。いずれの protocol を用いても、弱いエストロゲン様作用を再現性良く検出することができ、実用上の幅を許容しうる robust な方法であることが確認されている (mini-monograph “The OECD Validation of the Uterotrophic Bioassay”<sup>1, 2,3,4,5</sup>)。

しかしながら、子宮肥大試験の OECD Validation Study を review することを目的として設置された peer review panel (PRP) の報告<sup>6</sup>では、各委員の意見に大きな相違があり、未だコンセンサスを得るに至っていない。本研究では、これまでに、PRP 報告での問題点を中心に、特

に重要と考えられる以下の 6 点について検討を加えてきた。

- 1) negative control に関する情報
- 2) 代謝活性化される化合物に関する情報
- 3) estrogen antagonist 評価への有用性
- 4) 群構成
- 5) positive, negative の判断基準
- 6) 試験の成立条件

本年度は、2007年1月に開催された OECD 6<sup>th</sup> Meeting of the Validation Management Group (VMG) の議論について、これまで検討してきた知見を基に考察し、得られた知見を OECD ガイドライン案の骨子に付加する形でガイドライン案として纏めた。

#### 1) 抗 estrogen 活性評価について

Yamasaki 等は、OECD Validation protocol のうち幼若ラット、3 日間皮下投与の protocol を用いて子宮肥大試験を実施している<sup>7,8,9</sup>。32 化合物について agonist 活性の他、同時に EE を投与する antagonist 活性についても評価した結果、20 化合物で EE による子宮重量の増加が抑制された。これらの化合物は、いずれも estrogen 活性が陽性であり、EE 活性を抑制する用量も両者で概ね一致しており、用量依存性も認められている。しかしながら、中には 4,4'-biphenol のように低および中用量で EE 活性を抑制するが、最高用量では影響しないという例も見られた。

In vitro 試験法との比較では、子宮肥大試験において EE の estrogen 活性を抑制した 10 化合物について reporter gene assay (ER- $\alpha$ ) を実施している<sup>9</sup>。すべての化合物で agonist 活性が認められたのに対し、antagonist 活性の認められたのは、僅か 1 化合物であった。この結果は、antagonist 評価には、化学物質の代謝等も含めた評価が可能な *in vivo* 試

験が必要であることを示している。

また、Ohta 等は、卵巣摘出マウス、7 日間の経口および皮下投与により 21 化合物について agonist および antagonist 活性の評価を行った<sup>10</sup>。その結果、5 化合物で agonist と antagonist の作用を示し、6 化合物では antagonist 活性のみが認められたが、agonist 活性のみが認められた例はなかった。

以上、agonist 活性を示す化合物には同時に antagonist 活性を示すものがあり、中には antagonist 活性のみが認められる化合物があること、また、antagonist 活性の評価は、*in vitro* スクリーニング試験である reporter gene assay では困難であり、子宮肥大試験の中で実施することが必要であると考えられた。しかしながら、2007 年 VMG において、子宮肥大試験の抗 estrogen 活性に関するプロトコルは、バリデートが不十分であるとして、Test Guideline には含めず Guidance Document としての扱いとすることとされた。子宮肥大試験の中で抗 estrogen 活性を評価することの重要性は上に述べた通りであり、今後、VMG での再考を期待する。

#### 2) 陽性対照の取り扱いについて

VMG において以下の通り陽性対照の取り扱いが採択された。

- ① 初めて試験を実施する機関は、試験系の反応性を保障するために EE を用いて用量反応性を確認する。
- ② その後は、定期的に適当な 1 用量の EE を用いて試験系の反応性を確認する。
- ③ あるいは、試験毎に陽性対照群において確認する。

しかしながら、定期的（例えば半年に 1 回）に適当な用量の EE を用いて試験系の反応性を確認することの問題点として、EE 投与群で適当な反応性が確認できなかった場合に過去半年間の試験成績の信頼

性を保障できない、陽性対照を加えないで実施した際に被験物質投与群で微妙な結果が出た場合に評価が困難である等があり、結局、再試験の実施が必要になる。また、リスクアセスメントの観点からは、被験物質と EE との活性の相対比を把握することができないという欠点がある。以上の点から、試験毎に陽性対照群を設定し、試験系を保障することが推奨される。

### 3) 群構成について

群構成については、2007年VMGにおいて、被験物質を2群とするという意見がある。しかしながら、antagonist 活性を示す化合物の中には4,4'-biphenolのように低および中用量でEE活性を抑制するが、最高用量では影響しないという例も見られるため、2群では評価を誤る可能性がある。また、日本での子宮肥大試験の役割は、単にエストロゲン様作用の有無を確認するだけでなく、次に確定試験を実施すべき化合物の優先順位付けをするということにある。したがって、被験物質のエストロゲン様作用の強度についての知見を得るといった観点からも、3群以上の構成が必要と考えられる。

#### (参考文献)

1. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. 2001. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for *in Vivo* Estrogenic Responses: Phase 1. *Environ Health Perspect* 109:785-794
2. Owens W and Koeter BWM. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: An Overview. *Environ Health Perspect* 111:1527-1529
3. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dose-Response Studies. *Environ Health Perspect* 111:1530-1549
4. Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Coded Single-Dose Studies. *Environ Health Perspect* 111:1550-1558
5. Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. 2003. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: Phase 2: Dietary Phytoestrogen Analyses. *Environ Health Perspect* 111:1559-1567
6. Draft Peer-Review Report for the Uterotrophic Bioassay. Task force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) of the Test Guidelines Programme. OECD, ENV/JM/TG/EDTA (2004) 1, 05 January 2005.
7. Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, Yakabe Y. 2004. Comparative study of the uterotrophic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicol. Lett.* 146: 111-120
8. Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawasaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. 2003. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183: 93-115
9. Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawasaki M, Takatsuki M. 2003. Comparison of the reporter gene assay for ER-alpha antagonists with immature rat uterotrophic assay of 10 chemicals. *Toxicol. Lett.* 142: 119-131
10. Ohta R, Tazura Y, Miyahara T, Marumo H. 2005. The Mouse Uterotrophic Assay.

## E. 結論

子宮肥大試験については、すでに OECD Validation Study が終了し、用いられた 4 種類いずれの protocol も弱いエストロジェン様作用を検出することができ、その再現性、検出感度、試験機関間での再現性等、満足できる試験法であり、さらに動物種、飼育条件、溶媒等の諸条件の幅を許容しうる robust な方法である。本研究では、これまでに OECD Validation Study 後に実施された試験データを収集・整理し、negative control に関する情報、代謝活性化される化合物に関する情報、estrogen antagonist 評価への有用性、群構成、positive, negative の判断基準および試験の成立条件について検討を加えてきた。本年度は、2007 年 1 月に開催された OECD 6<sup>th</sup> Meeting of the Validation Management Group (VMG) の議論について、これまで検討してきた知見を基に考察し、得られた知見を OECD ガイドライン案の骨子に付加する形でガイドライン案として纏めた。

## F. 健康危惧情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K. 2006. Differential Expression Patterns of Wnt and  $\beta$ -Catenin/TCF-Target Genes in the Uterus of Immature Female Rats Exposed to 17  $\alpha$ -Ethinyl Estadiol. *Toxicol. Sci.* 91(2): 419-430

2) Katayama S, Ashizawa K, Gohma H, Fukuhara T, Narumi K, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K. 2006. The

expression of Hedgehog genes (*Ihh*, *Dhh*) and Hedgehog target genes (*Ptc1*, *Gli1*, *Coup-TfII*) is affected by estrogenic stimuli in the uterus of immature female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 217: 375-383

### 2. 学会発表

1) 幼若雌性ラットの子宮におけるエストロジェン応答遺伝子の発現に及ぼす ethynyl estradiol, genistein, methoxychlor および ICI182,780 の複合効果、片山誠一、芦沢幸二、永井賢司、山本由徳、大保真由美、秋山賢之助、山下保志、第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 (p303, 2004 年)

2) 幼若雌性ラットの子宮における Wnt 関連遺伝子の発現に及ぼす ethynyl estradiol の影響、片山誠一、芦沢幸二、福原理広、廣安誠、永井賢司、安東賢太郎、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会 (p209, 2005 年)

3) 幼若雌性ラットの子宮における Wnt および beta-catenin/TCF 標的遺伝子の発現に及ぼすエチニルエストラジオールの影響、福原理広、片山誠一、芦沢幸二、廣安誠、永井賢司、山下保志、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (p223, 2006 年)

4) 幼若雌性ラットの子宮におけるヘッジホッグ遺伝子およびヘッジホッグ標的遺伝子の発現に及ぼすエストロゲンレセプター選択的アゴニストの影響、片山誠一、芦沢幸二、福原理広、廣安誠、永井賢司、山下保志、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (p224, 2006 年)

## H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

## 別紙

### げっ歯類を用いた子宮肥大試験法 —エストロジェン様作用の短期スクリー ニング試験—

#### 1. 試験法の原理

子宮肥大試験は恒常性維持機構（視床下部-下垂体-卵巣フィードバック系）が無いか、あるいは欠如させた個体では、内因性のエストロジェンが低い状態にあるため子宮重量のベースラインが低く、外来性のエストロジェンに対する子宮肥大反応が高感度に検出されることを利用する。

#### 2. 使用動物

試験には、雌性幼若ラット（離乳後、思春期前）および雌性卵巣摘出ラット/マウス（young adult）が用いられる。

バリデーションでは Sprague-Dawley 系ラットおよび Wistar 系ラットが用いられた。反応性が低いことが知られている、あるいは疑われる系統の動物は使ってはならない。初めて試験を実施する機関は、試験系の反応性を保障するために 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE) を用いて用量反応性を確認する。

#### 3. 幼若動物

離乳までの馴化期間中は親あるいは里親と同一ケージで飼育する。

投与は生後 18 日（誕生日を生後 0 日とする）の離乳後できるだけ速やかに実施すべきである。好ましくは、投与は生後 21 日には終了していることが望ましく、遅くとも生後 24 日には終了してはならない。

#### 4. 卵巣摘出

卵巣摘出手術は 6~7 週齢で実施する。術後 14 日以上回復期間をおき、子宮

を萎縮させ、子宮重量のベースラインを低く、安定させる。投与開始日の 5 日前から前日までの計 5 日間は、毎日膣スミアを採取し、性周期を観察し、発情休止期であることを確認する。さらに、解剖時に卵巣が残存していないことを確認する。

#### 5. 体重

投与開始時の動物の体重範囲は、平均体重 $\pm$ 20%以内とする。特に、幼若動物では、体重は子宮重量と関連するので体重のばらつきは最小に抑えるべきである。

#### 6. 飼育環境

- 1) 温度 : 22  $\pm$  3°C
- 2) 相対湿度 : 目標値 50 ~ 60 % (許容範囲 30 ~ 70 %)
- 3) 照明時間 : 12 時間/日

#### 7. 収容動物数

幼若ラットについては複数飼いとす。young adult ラット/マウスの場合は個別飼いまたは 3 匹/ケージ以内とする。

#### 8. 飼料および飲用水

自由摂取とする。

なお、飼料中の植物性エストロジェン濃度は total genistein equivalent 値

(TGE) が 350  $\mu$ g/g diet 以下とするのが望ましい。特に、卵巣摘出マウスを用いる場合は体重あたりの摂餌量が幼若ラットの約 2 倍、卵巣摘出 young adult ラットの約 4 倍になるので、注意が必要である。なお、飼料中の植物性エストロジェンの試験系への影響は対照群の子宮重量によって判断することが可能である

(14 項参照)。

## 9. 群構成

予め *in vitro* 試験成績あるいは他の安全性試験成績が得られる場合には、用量設定はその成績を考慮すべきである。なお、最高用量は 1000 mg/kg とし、必要に応じて用量設定試験を実施する。用量設定試験は、少数の動物を用いて実施し、3 日間の投与によって動物の死亡および重篤な症状が認められない用量を選択する。

antagonist 評価についても agonist 評価と同様に複数群設定する。標準的には、被験物質については公比約 3 で、agonist、antagonist 評価用に各 3 用量設定し、これに溶媒対照群、陽性対照群 1 群および antagonist 評価用対照群を加えた 9 群構成、1 群あたりの動物数は 6 とする。

### 10. 陽性対照

試験毎に陽性対照群を設定し、試験系を保障する。陽性対照として 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE)を用いる。

ラットにおいて推奨される用量は、強制経口投与では 1~3  $\mu$ g/kg/日、皮下投与では 0.3~1  $\mu$ g/kg/日である。

### 11. 投与

投与経路は強制経口投与または皮下投与とする。

投与は、1 日 1 回、3 日間とする。卵巣摘出動物を使用する場合は、7 日間まで延長することも可能である。

投与液量は、強制経口投与では 10 mL/kg、皮下投与では 5 mL/kg とする。antagonist 活性評価に用いる EE については、2 mL/kg とする。

### 12. 観察・測定項目

#### (1) 一般状態

1 日 1 回 (投与期間中は投与前後の 2 回)、できるだけ同じ時刻に観察する。

#### (2) 体重および摂餌量

体重は、投与開始日から解剖日まで毎日 0.1 g 単位で測定する。

投与期間中の摂餌量の測定 (ケージ単位で測定) はオプションとする。結果は g/匹/日で表す。

#### (3) 子宮の取り出し

剖検は投与と同じ順序で行う。最終投与後約 24 時間に麻酔下で脱血して安楽死させる。

卵巣摘出動物を用いる場合は、卵巣が残存していないかを確認する。

恥骨結合を注意深く離開した後、ピンセットで脂肪をつかみ、子宮および膣を一括して摘出する。子宮および膣は、脂肪を丁寧に除去した後、膣を子宮頸部の外子宮口側で子宮から切り離す。摘出子宮は、乾燥を避けるため、適切な容器に入れる。

#### (4) 子宮重量測定

子宮重量は、まず子宮内液を含んだ状態で測定し (wet weight)、次に子宮壁の一部を切開して子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度、重量を測定する (blotted weight)。0.1 mg 単位で測定する。

#### (5) 子宮および膣の病理組織学的検査 (オプション)

子宮および膣を、10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、脱水、パラフィン包埋を行う。パラフィン包埋ブロックを薄切し、スライド貼付切片を作製する。常法にしたがいヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行い、病理組織学的変化を検索する。

### 13. 結果の解釈

少なくとも高用量で、溶媒対照群と比較して統計学的に有意な子宮重量増加 ( $p < 0.05$ ) が認められた場合は、エストロジェン様作用は陽性と考えられる。作用に用量依存性があれば、さらに陽性の結果はサポートされる。ただし、被験物質のエストロジェン様活性と抗エストロジェン

ン様活性が重なり合って用量反応曲線の形に影響を及ぼす可能性は配慮する必要がある。

antagonist 活性評価の場合には、antagonist 評価用対照群と比較して統計学的に有意な子宮重量減少が認められたときに、その被験物質には antagonist 活性があると判定される。

#### 1 4. 試験の成立条件

試験結果が陽性、陰性の判定をするには、信頼性の高い試験成績が得られていることが前提であり、そのためには、以下の2点を試験成績の採用する要件とすべきであると考えられる。

##### (1) 溶媒対照群の平均子宮重量

溶媒対照群の平均子宮重量 (blotted weight) が、卵巣摘出ラット (young adult)、幼若ラット、卵巣摘出マウス (young adult) で、それぞれ 120 mg, 50 mg, 20 mg 以上の場合は、試験系に何らかの問題があったものと判断する。

##### (2) 陽性対照の反応性

陽性対照群 (EE 投与群) で、溶媒投与群と比較して統計学的に有意な子宮重量増加が認められること。

試験が成立していることを判断する上で、試験実施機関において、溶媒対照群および陽性対照群の子宮重量の背景データを収集しておくことが推奨される。

## 21. 国内外の Hershberger 試験に関するデータ整理と その問題点の把握及び解決策の検討

分担研究者 山崎 寛治

財団法人 化学物質評価研究機構 日田事業所 所長

### 研究要旨

2006年の第5回、2007年の第6回 Validation Management Group of Mammalian Testing (VMG)で、Hershberger 試験ガイドライン化のための最終的な試験である Validation phase 3 試験の結果について公表された。結果としては、各試験機関間の相関性、検出感度は良好であった。すでに、日本3機関で行った phase 3 のデータは論文化されている。一方、OECD で実施した、phase 1 については2006年に論文化され、phase 2 については2007年に論文化が予定されている。また、Phase 1 から Phase 3 の成績をもとにしたピアレビューが進行中であり、次回の VMG 会議でその結果が公表される予定である。

### A. 研究目的

実施された試験をもとに、本試験法の問題点の抽出し、その解決法を考慮し、さらに本試験法に関連する情報を収集する。また、OECD ガイドライン化に寄与する。

### B. 研究方法

OECD の動向について調査した。また、本試験法に関する文献調査を実施し、本試験に関する情報を収集した。

### C-D. 研究結果及び考察

①Validation phase 3 試験：OECD で実施された Phase 3 の試験結果が公表された。試験物質はブラインドで各試験施設に送付され、OECD プロトコル案に従い実施された。試験終了後、OECD からコード物質に関する情報があった。androgen 作用検出プロトコルでは Testosterone propionate (0.4 または 0.2 mg/kg/day)、Trenbolone (1.5, 40 mg/kg/day)、4-Nonylphenol (160 mg/kg/day)、2,4-Dinitrophenol (10 mg/kg/day) が使用され、一方、anti-androgen 作用検出プロトコルでは、

Flutamide (3 mg/kg/day)、Linurone (10, 100 mg/kg/day)、*p,p'*-DDE (16, 160 mg/kg/day)、4-Nonylphenol (160 mg/kg/day)、2,4-Dinitrophenol (10 mg/kg/day) が使用された。なお、日本での試験は平成18年度に終了したが、試験物質の供給関係上 4-nonylphenol、Trenbolone、*p,p'*-DDE、Linurone を使用した試験を実施した。

OECD で実施された Phase 3 の試験結果についての要約は以下に記載する。

#### ◆ androgen 作用

—Testosterone propionate (0.4 または 0.2 mg/kg/day)：副生殖器官重量の増加

—Trenbolone (1.5 mg/kg/day)：副生殖器官重量に変化なし

—Trenbolone (40 mg/kg/day)：副生殖器官重量の増加

—4-Nonylphenol (160 mg/kg/day)：副生殖器官重量に変化なし

—2,4-Dinitrophenol (10 mg/kg/day)：副生殖器官重量に変化なし

なお、上記は媒体対照群に比較した結果である。



◆ anti-androgen 作用

—Flutamide (3 mg/kg/day) : 副生殖器官重量の減少

—Linurone (10 mg/kg/day) : 副生殖器官重量に変化なし

—Linurone (100 mg/kg/day) : 副生殖器官重量の減少

—*p, p'*-DDE (16 mg/kg/day) : 副生殖器官重量に変化なし

—*p, p'*-DDE (160 mg/kg/day) : 副生殖器官重量の減少

—4-Nonylphenol (160 mg/kg/day) : 副生殖器官重量に変化なし

—2,4-Dinitrophenol (10 mg/kg/day) : 副生殖器官重量に変化なし

なお、上記は Testosterone propionate (0.4 または 0.2 mg/kg/day) 投与対照群に比較した結果である。

この結果、本試験法のブラインド物質を使用した試験は有用と結論付けされた。なお、Phase 1 から Phase 3 の成績をもとにしたピアレビューについては進行中であり、次回の VMG 会議でその結果が公表される予定である。本試験法は子宮肥大試験に引き続き、ガイドライン化に進むものと考えられる。

なお、VMG で検討事項とされていた非去勢幼若ラットを使用した Hershberger 試験の結果が 2007 年の第 6 回 VMG で公表され、従来の去勢ラットを使用した本試験法とほぼ同等の結果が得られたとされた。しかし、詳細のデータは提示されず、今後はこの点も議論の一つと考えられる。

②文献調査：平成 18 年度に公表された論文について調査した。その結果、以下の論文が公表されていた。

Owens W, Zeiger E, Walker M, et al. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase

1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. Environ Health Perspect, 114: 1259-1265, 2006.

内容は OECD で実施した Phase 1 のまとめである。すなわち 7 カ国 17 試験機関がハーシュバナーValidation 試験の Phase 1 として、標準プロトコールのもと androgen 作用物質として Testosterone propionate を使用した結果、良好な成績を認め、さらに anti-androgen 作用検出系として Flutamide を Testosterone propionate を同時に投与した場合にも anti-androgen 作用がみられ、標準プロトコールの有用性が証明されたという内容である。また、Phase 2 については、以下の論文が掲載途中である。

Owens W, Gray LG Jr., Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E. 2007. The OECD Program to Validate the Rat Hershberger Bioassay to Screen Compounds for In Vivo Androgen and Antiandrogen Responses: Phase-2 Dose-Response Studies Environ Health Perspect 2007 (in press).

Validation Phase 2 の結果であり、良好な結果が得られたという内容である。この論文には共同研究者として参加した。

## E. 結論

OECD VMG 会議でバリデーションプログラムの最終であるブラインド物質を使用した Phase 3 が公表された。結果としては、ブラインド物質を使用した試験においても、各機関間での相関性は良好であり、さらには物質の検出系としても Hershberger 試験は有用であるとされた。また、文献調査では過去において実施した Phase 1 の結果が論文化され、Phase 2 試験の結果も論文化途中である。なお、現時点において、本試験の Phase 1 から Phase 3 の結果をもとにピアレビューが実施されており、次回の VMG までには終了すると思われる。

## F. 健康危惧情報

無し

## G. 研究発表

### 1. 発表論文

#### 1) 雑誌

① Owens W, Gray L. E, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E. The OECD Program to Validate the Rat Hershberger Bioassay to Screen Compounds for In Vivo Androgen and Antiandrogen Responses: Phase-2 Dose-Response Studies. Environ Health Perspect, 115, -, 2007.

② Yamasaki K, Ohta R, Okuda H. OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 3-blind study using coded chemicals. Toxicol Lett, 163, 121-129, 2006.

③ Noda S, Muroi T, Takakura S, Sakamoto F, Takatsuki M, Yamasaki K, Tateyama S, Yamaguchi, R. Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid function modulators. Arch. Toxicol., 79, 267-235, 2005.

④ Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takakura S, Mitoma H, Sakamoto S, Nakai M, Yakabe Y. Comparison of the Hershberger Assay and Androgen Receptor Binding Assay of Twelve Chemicals. Toxicology, 195, 177-186,

2004.

⑤ Yamasaki K, Sawaki M, Ohta R, Okuda H, Katayama S, Yamada T, Ohta T, Kosaka T, Owens W. OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE. Environ Health Perspect, 111, 1912-1919, 2003.

⑥ Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka M, Shinoda K and Takatsuki M. Immature Rat Uterotrophic Assay of 18 Chemicals and Hershberger Assay of 30 Chemicals. Toxicology, 183: 95-115, 2003.

#### 2). 学会発表

① OECD validation of the Hershberger assay in Japan: blind study using coded chemicals, EUROTOX, 2005.

② OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 2-Dose response of methyltestosterone, vinclozolin and p,p'-DDE, EUROTOX, 2003.

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況

無し

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
五十嵐勝秀、萱野 純	内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響	井上達、井口泰泉	生体統御システムと内分泌攪乱	シュプリングァーフェアラク社	日本	2005	79-88
Midori Yoshida, Akihiko Maekawa	Uterine carcinogenesis based on estrogen or metabolite driven pathways in the Donryu rat	Takuji Tanaka, Hiroyuki Tsuda	Carcinogenesis Modification Carcinogenesis	Research Signpost	India	2005	135-151-

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Mariko Shirota, Yoshiaki Saito, Kiyoshi Imai, Shinji Horiuchi, Shinsuke Yoshimura, Masako Sato, Tesuji Nagao, Hiroshi Ono, Masanobu Katoh	Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration of pregnant rats	J Toxicol Sci	30	175-194	2005
Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M	Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rat testis	J Toxicol Sci	29	113-124	2004
Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, Nakamura Y, Uzuki M, Sawai T, Sasano H.	Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: A possible androgenic bone protective effects induced by exemestane.	Bone	40	876-887	2007
Grun F, Watanabe H, Zamanian Z, Maeda L, Arima K, Chubacha R, Gardiner DM, Kanno J, Iguchi T, Blumberg B.	Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates.	Mol Endocrinol.	20	2141-2155	2006
Nakamura Y, Suzuki T, Igarashi K, Kanno J, Furukawa T, Tazawa C, Fujishima F, Miura I, Ando T, Moriyama N, Moriya T, Saito H, Yamada S, Sasano H.	PTOVI: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta.	J Pathol.	209	522-531	2006
Hiroko Shiina, Takahiro Matsumoto, Takashi Sato,	Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice	PNAS	103	224-229	2006

Katsuhide Igarashi, Junko Miyamoto, Sayuri Takemasa, Matomo Sakari, Ichiro Takada, Takashi Nakamura, Daniel Metzger, Pierre Chambon, <u>Jun kanno</u> , Hiroyuki Yoshikawa, and Shigeaki kato					
Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T, <u>Kanno J</u> , Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furu- kawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Taka- hashi S, Yamada S, Sasano H.	E4F1, a novel estrogen-responsive gene in possible atheroprotection, revealed by microarray analysis.	Am. J. Pathol.	165	2019-2031	2004
Tetsuji Nagao, Kazuyoshi Wada, Makiko Kuwagata, Madoka Nakagomi, Chiaki Watanabe, Shinsuke Yoshimura, Yoshiaki Saito, Kenji Usumi, <u>Jun Kanno</u>	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice	Reprod Toxicol	18	109-120	2004
K. Miyagawa, M. Narita, M. Narita, H. Akama, <u>T. Suzuki</u>	Memory impairment associated with a dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol-A.	Neurosci. Lett.			in press
K. Miyagawa, M. Narita, M. Narita, K. Niikura, H. Akama, Y. Tsurukawa, <u>T. Suzuki</u>	Changes in central dopaminergic systems with the expression of Shh or GDNF in mice perinatally exposed to bisphenol-A.	Jpn. J. Neuropsychop- harmacol.			in press
M. Narita, K. Miyagawa, K. Mizuo, T. Yoshida, <u>T. Suzuki</u>	Changes in central dopaminergic systems and morphine reward by prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A in mice: Evidence for the importance of exposure period.	Addict. Biol			in press
M. Narita, K. Miyagawa, K. Mizuo, T. Yoshida, <u>T. Suzuki</u>	Prenatal and neonatal exposure to low-dose of bisphenol-A enhance the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect.	Neurosci. Lett.	402	249-252	2006
M. Miyatake, K. Miyagawa, K. Mizuo, M. Narita, <u>T. Suzuki</u>	Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes.	J. Neuroendocrinol.	18	434-444	2006
鈴木 勉、水尾圭祐、 宮川和也、成田 年	Bisphenol-A の胎児期および授乳期暴露 による脳内報酬系に及ぼす影響	日本神経精神薬 理学雑誌	25	125-128	2005
成田 年、宮川和也、 富田真理子、水尾圭 祐、鈴木 勉	Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性 暴露による dopamine 神経行動毒性発現	精神科	6	256-262	2005

K. Mizuo, M. Narita, T. Yoshida, M. Narita, <u>T. Suzuki</u>	Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor Bisphenol A in mice	Addiction Biol	9	19-25	2004
K. Mizuo, M. Narita, K. Miyagawa, M. Narita, E. Okuno, <u>T. Suzuki</u>	Prenatal and neonatal exposure to Bisphenol A affects the morphine-induced rewarding effect and hyper locomotion in mice	Neurosci. Lett	356	95-98	2004
Takeshi Honma, <u>Muneyuki Miyagawa</u> , Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi, Soichiro Sekiguchi.	Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring.	Indust Heal	44	510-524	2006
Kenichi Kobayashi, <u>Muneyuki Miyagawa</u> , Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma	Effects of in Utero and Lactational Exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate on Somatic and Physical Development in Rats Offspring.	Indust Heal	44	652-660	2006
Kenichi Kobayashi, <u>Muneyuki Miyagawa</u> , Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma	Effects of in utero and lactational exposure to Bisphenol A on thyroid status in F <sub>1</sub> rat offspring	Industrial Hhealth	43	685-690	2005
Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, <u>Muneyuki Miyagawa</u> and Junzo Saegusa	Comparative Investigation of Several Sperm analysis Methods for Evaluation of Spermatotoxicity of Industrial Chemical: 2-Bromopropane as an Example.	Industrial Health	42	219-225	2004
A. Maekawa, M. Yoshida, S. Katsuda and <u>K. Imai</u>	Toxicologic / Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents	J. Toxicol. Pathol	17	69-84	2004
Ishimaru N, Kishimoto, <u>Hayashi Y</u> , Sprent J.	Regulation of naive T cell function by the NF- $\kappa$ B2 pathway.	<i>Nature Immunol.</i>	7	763-772	2006
Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, <u>Hayashi Y</u>	Novel role for RbAp48 in tissue-specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands.	<i>Mol. Cell. Biol.</i>	26	2924-2935	2006
Kurobe H, Cunlan Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, arakaki R, <u>Hayashi Y</u> , Kitagawa T, Lipp M, Richard L, Boyd R, Takahama Y	CCR7-dependent cortex-to-medulla migration of positively selected thymocytes is essential for establishing central tolerance	Immunity	24	165-177	2006
Katunuma N, Le QT, Murata E, Matsui A, Majima E, Ishimaru N, <u>Hayashi Y</u> , Ohashi A	A novel apoptosis cascade mediated by lysosomal lactoferrin and its participation in hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine.	FEBS Lett	580	3699-3705	2006
Nobuhiko Katunuma,	Catechin derivatives: Specific inhibitor for	FEBS Lett	580	741-746	2006

Atsushi Ohashi, Etsuko Sano, Naozumi Ishimaru, <u>Yoshio Hayashi</u> , Etsuko Murata	caspsases-3,7 and 2, and the prevention of apoptosis at the cell and animal levels				
Katsushi Miyazaki, Noriaki Takeda, Naozumi Ishimaru, Fumie Omotehara, Rieko Arakaki, and <u>Yoshio Hayashi</u>	Analysis of in vivo role of $\alpha$ -fodrin autoantigen in primary Sjogren's syndrome	<i>Am. J. Pathol</i>	167	1051-1059	2005
Masami Takei, Hidetaka Shiraiwa, Takashi Azuma, <u>Yoshio Hayashi</u> , Naoyuki Seki, Shigemasa Sawada	The possible etiopathogenic genes of Sjogren's syndrome	<i>Autoimm Reviews</i>	4	479-484	2005
Entesarian M, Matsson H, Klar J, Bergendal B, Olson L, Arakaki R, <u>Hayashi Y</u> , Ohuchi H, Falhat B, Bolstad AI, Jonsson R, Wahren-Herlenius M, Dahl N	Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor 10 are associated with aplasia of lacrimal and salivary glands	<i>Nature Genet</i>	37	125-127	2005
Kuroda N, Mitani T, Takeda N, Ishimaru N, Arakaki R, <u>Hayashi Y</u> , Bando Y, Izumi K, Takahashi T, Nomura T, Sakaguchi S, Ueno T, Takahama Y, Uchida D, Sun S, Kajiura F, Mouri Y, Han H, Matsushima A, Yamada G, Matsumoto M	Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of aire-deficient mice	<i>J. Immunol</i>	174	1862-1870	2005
Ishimaru N, Arakaki R, Katunuma N, <u>Hayashi Y</u> ,	Critical role of cathepsin-inhibitors for autoantigen processing and autoimmunity.	<i>Adv. Enzyme. Regul</i>	44	309-320	2004
<u>Yoshio Hayashi</u> , Rieko Arakaki and Naozumi Ishimaru	Crucial role of tissue-specific apoptosis on the development of primary Sjogren's syndrome	<i>Oral Sci International</i>	1	55-64	2004
Hayashi Y, Ishimaru N, Arakaki R, Tsukumo S, Kishihara K, Shiota H, Yasutomo K, <u>Hayashi Y</u> ,	Effective treatment of a mouse model of Sjogren's syndrome with eyedrop administration of anti-CD4 monoclonal antibody.	<i>Arthritis Rheum</i>	50	2903-2910	2004
Kobayashi M, Yasui N, Ishimaru N, Arakaki R, <u>Hayashi Y</u>	Development of autoimmune arthritis with aging via bystander T cell activation in the mouse model of Sjogren's syndrome	<i>Arthritis Rheum</i>	50	3974-3984	2004
Maruyama T, Saito I, <u>Hayashi Y</u> , Kompfner	Molecular analysis of the human autoantibody response to $\alpha$ -fodrin in Sjogren's syndrome	<i>Am. J. Pathol</i>	165	53-61	2004

E, Fox RI, Burton DR, Ditzel HI	reveals novel apoptosis-induced specificity				
Yoneda T, Ishimaru N, Arakaki R, Kobayashi M, Izawa T, Moriyama K, <u>Hayashi Y</u>	Estrogen deficiency accelerates murine autoimmune arthritis associated with receptor activator of nuclear factor-kB ligand-mediated osteoclastogenesis.	<i>Endocrino</i>	145	2384-2391	2004
<u>Hayashi Y</u> , Arakaki R, Ishimaru N	Apoptosis and estrogen deficiency in primary Sjogren's syndrome	<i>Curr. Opin. Rheumatol</i>	16	522-526	2004
<u>Takeyoshi M</u> , Noda S, Yamasaki K	Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay	<i>Exp Anim</i>	53	171-173	2004
<u>Takeyoshi M</u> , Noda S, Yamazaki S, Kakishima H, Yamasaki K, Kimber I	Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay	<i>J Appl Toxicol</i>	24	77-81	2004
Okuda H, <u>Nagao T</u>	Cardiovascular malformations induced by prenatal exposure to phenobarbital in rats	<i>Cong. Anom</i>	46	97-104	2006
Mariko Shirota, Yoshiaki Saito, Kiyoshi Imai, Shinji Horiuchi, Shinsuke Yoshimura, Masako Sato, <u>Tetsuji Nagao</u> , Hiroshi Ono and Masanobu Katoh	Influence of di-(2-ethylhexyl) phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats	<i>J Toxicol Sci</i>	30	175-194	2005
<u>Nagao T</u> , Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J	Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice	<i>Reprod Toxicol</i>	18	109-120	2004
<u>Yoshida M</u>	A new hypothesis for uterine carcinogenesis: A pathway driven by modulation of estrogen metabolism through cytochrome P450 induction in the rat liver.	<i>J Toxicol Path.</i>	19	57-67	2006
Yamada D, <u>Yoshida M</u> , Williams NY, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Murayama T, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y.	Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule.	<i>Mol Cell Biol</i>	26	3610-3624	2006
Kanoh A, Seko A, Ideo H, <u>Yoshida M</u> , Nomoto M, Yonezawa S, Sakamoto M, Kannagi R, and Yamashita K.	Ectopic expression of N-acetyl-glucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas	<i>Glycoconj J.</i>	23	453-460	2006

<u>Midori Yoshida</u> , Gen Watanabe, Mariko Shirota, Akihiko Maekawa, Kazuyoshi Taya	Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in Donryu rats	J. Reprod Devel	51	707-714	2005
Takasumi Shimomoto, <u>Midori yoshida</u> , Shin-ichi Katsuda, masakazu Takahashi, Fumiyuki Uematsu, Hiroki Kuniyasu, Akihiko Maekawa, Dai Nakae	$\alpha$ -Smooth muscle actin-positive stromal cells reactive to estrogens surround endometrial glands in rats but not mice	J Toxicol. Pathol.	18	47-52	2005
Fumiyuki Uematsu, Masakazu Takahashi, <u>Midori Yoshida</u> , Maki Igarashi, Naoto Watanabe, Noriko Suzuki, Masayoshi Abe, Ivan Rusyn, Robert A Floyd, Dai Nakae	Distinct patterns of gene expression in hepatocellular carcinomas and adjacent non-cancerous, cirrhotic liver tissues in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet	Cancer Sci	96	414-424	2005
<u>Yoshida, M.</u> , Katashima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D. and Maekawa, A.	Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism.	Carcinogen	25	2257-2264	2004
Katsuda, S., <u>Yoshida, M.</u> , Saarinen, N., Smeds, A., Nakae, D., Santti, R. and Maekawa, A.	Chemopreventive effects of hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis in Donryu rats.	Experimental Biology Medicine	229	417-424	2004
<u>Yoshida, M.</u> , Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A	Maternal exposure to low-doses of Bisphenol A has no effects on development of female reproductive tract and uterine carcinogenesis in Donryu rats	J. Reprod Develop	50	349-360	2004
Akihiko Maekawa, <u>Midori Yoshida</u> , Sin-ichi Katsuda, Kiyoshi Imai	Toxicologic / carcinogenic effects of endocrine disrupting chemicals on the female genital organs of rodents	J Toxicol Pathol	17	69-83	2004
Kanji Yamasaki, <u>Ryo Ohta</u> , Hirokazu Okuda	OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase3. blind study using coded chemicals	Toxicol Lett	163	121-129	2006
太田 亮、田面喜之、宮原 敬、丸茂秀樹	マウスを用いる子宮肥大試験	秦野研究所年報	27	28-35	2004
Horiguchi, K., Arai, S., Nishihara, T. and <u>Nishikawa, J.</u>	AIB1 promotes DNA replication by JNK repression and AKT activation during cellular stresses.	J. Biochem	140	409-419	2006
Hari, S., <u>Nishikawa, J.</u> , Horiguchi, K., Iida, M. and Nishihara, T.	Anti-androgenic activity of n-nitrosodibenzylamine, n-nitrosodiphenylamine and n-nitrosodicyclohexylamine.	J. Health Sci	52	522-531	2006



Nakanishi, T., Hiromori, Y., Yokoyama, H., Koyanagi, M., Itoh, N., <u>Nishikawa, J.</u> and Tanaka, K.	Organotin compounds enhance 17 $\beta$ - hydroxysteroid dehydrogenase type 1 activity in human choriocarcinoma JAr cells: potential promotion of 17 $\beta$ -estradiol biosynthesis in human placenta.	<i>Biochem. Pharmacol</i>	71	1349-1357	2006
<u>Nishikawa, J.</u>	Imposex in marine gastropods may be caused by binding of organotins to retinoid X receptor.	<i>Marine Biology</i>	149	117-124	2006
Kanayama, T., Kobayashi, N., Mamiya, S., Nakanishi, T., <u>Nishikawa J</u>	Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferators-activated receptor $\gamma$ /retinoid X receptor pathway	<i>Mol. Pharm</i>	67	766-774	2005
Osada, S., Nishikawa, <u>J.</u> , Nakanishi, T., Tanaka, K., Nishihara, T	Some organotin compounds enhance histone acetyltransferase activity	<i>Toxicol. Lett</i>	155	329-335	2005
Ohta, K., Osada, S., <u>Nishikawa, J.</u> , Nishihara, T	Cloning and characterization of a cDNA encoding the histone acetyltransferase monocyclic leukemia zinc finger protein (MOZ) in the rat.	<i>J. Health Sci</i>	51	253-256	2005
Tsuyoshi Nakanishi, <i>Jun-ichi Nishikawa,</i> Youhei Hiromori, Hideaki Yokoyama, Mihoko Koyanagi, Shirri Takasuga, Jun- ichi Ishizaki, Mai Watanabe, Shun-ichi Isa, Naoki Utoguchi, Norio Itoh, Yutaka Kohnno, Tsutomu Nishihara, and Keiichi Tanaka	Trialkyltin compounds bind retinoid X receptor to alter human placental endocrine functions	<i>Mol Endocrinol</i>	19	2502-2516	2005
Takashi Hirooka, Hiroyasu Nagase, Kotaro Uchida, Yuji Hiroshige, Yoshie Ehara, <u>Jun-ichi</u> <u>Nishikawa,</u> Tsutomu Nishihara, Kazuhisa Miyamoto, Zazumasa Hirata	Biodegradation of Bisphenol A and disappearance of its estrogenic activity by the green alga <i>Chlorella fusca</i> var. <i>vacuolata</i>	<i>Enviro. Toxicol. Chemi</i>	24	1896-1901	2005
Shigehiro Osada, Mitsumasa Kurita, <u>Jun- ichi Nishikawa,</u> Tsutomu Nishihara	Chromatin assembly factor Asf1p-dependent occupancy of the SAS histone acetyltransferase complex at the silent mating-type locus HML $\alpha$	<i>Nucleic Acids Research</i>	33	2742-2750	2005
<u>Nishikawa, J.</u> , Mamiya, S., Kanayama, T., Nishikawa, T., Shiraishi, F., Horiguchi, T	Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods	<i>Environ. Sci. Technol.</i>	38	6271-6276	2004
菅野 純、北嶋 聡、	Percellome Project による毒性トランスクリ	細胞工学	26	71-77	2007

相崎健一、五十嵐勝秀、中津則之、高木篤也、小川幸男、児玉幸夫、	プトミクスの新しい試み、				
Yoshimura S., Yamaguchi H., Konno K., Ohsawa N, Noguchi S., Chisaka A	Observation of preputial separation is a useful tool for evaluating endocrine active chemicals	J. Toxicol. Pathol	18	141-157	2005
Yoshimura S., Yamaguchi H., Konno K., Ohsawa N, Noguchi S., Chisaka A	Hypospadias and incomplete preputial separation in male rats induced by prenatal exposure to an anti-androgen, flutamide.	J. Toxicol. Pathol.	17	113-118	2004
Corvi R, Ahr HJ, Albertini S, Blakey DH, Clerici L, Coecke S, Douglas GR, Gribaldo L, Groten J P, Haase B, Hamermik K, Hartung T, Inoue T, Indans I, Maurici D, Orphanides G, Rembges D, Sansone SA, Snape JR, Toda E, Tong W, van Delft JH, Weis B, Schechtman LM.	Meeting report: Validation of toxicogenomics-based test systems: ECVAM-ICCVAM/NICEATM considerations for regulatory use.	<i>Environ Health Perspect</i>	114	420-429.	2006
Katayama S, Ashizawa K, Gohma H, Fukuhara T, Narumi K, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K.	The expression of Hedgehog genes ( <i>Ihh, Dhh</i> ) and Hedgehog target genes ( <i>Ptc1, Gli1, Coup-Tf II</i> ) is affected by estrogenic stimuli in the uterus of immature female rats.	Toxicol. Appl. Pharmacol.	217	375-383	2006
Katayama S, Ashizawa K, Fukuhara T, Hiroyasu M, Tsuzuki Y, Tatemoto H, Nakada T, Nagai K.	Differential Expression Patterns of Wnt and $\beta$ -Catenin/TCF-Target Genes in the Uterus of Immature Female Rats Exposed to 17 $\alpha$ -Ethinyl Estadiol.	Toxicol. Sci.	91	419-430	2006
Owens W, Gray L. E, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E.	The OECD Program to Validate the Rat Hershberger Bioassay to Screen Compounds for In Vivo Androgen and Antiandrogen Responses: Phase-2 Dose-Response Studies.	Envir. Health Perspect,	115	In press	2007
Keiji Shiraishi, Katusi Miyata, Satsuki Houshuyama, Nobuya Imatanaka, Takaaki Umamo Yasuhi Minobe, Kanji Yamasaki	Subacute oral toxicity study of diethylphthalate based on the draft protocol for “enhanced OECD test guideline no. 407”	Arch Toxicol	80	10-16	2006
Katsumi Miyata, Keiji Shiraishi, Satsuki Houshuyama, Nobuya Imatanaka, Takaaki Umamo, Yasushi	Subacute oral toxicity study of di(2-ethylhexyl) adipate based on the draft protocol for “enhanced OECD test guideline no. 407”	Arch Toxicol	80	181-186	2006

<u>Minobe, Kanji</u> <u>Yamasaki</u>					
<u>Kanji Yamasaki</u> , Ryo Ohta, Hirokazu Okuda	OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 3. Blind study using coded chemicals	Toxicol Lett	163	121-129	2006
Shuji Noda, Takako Muroi, Saori Takakura, Satoko Sakamoto, Mineo Takatsuki, <u>Kanji Yamasaki</u> , Susumu Tateyama, Ryoji Yamaguchi	Ability of the Hershberger assay protocol to detect thyroid function modulators	Arch Toxicol	79	627-635	2005
<u>Yamasaki K</u> , Sawaki M, Noda S, Muroi T, Takakura S, Mitoma H, Sakamoto S, Nakai M, Yakabe Y	Comparison of the Hershberger Assay and Androgen Receptor Binding Assay of Twelve Chemicals.	Toxicol	195	177-186	2004

IV. 研究成果の刊行物・別冊り・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・435

# 書 籍