

CD45RB、CD62L)の動態解析を実施した結果、CD4、CD8におけるCD44^{high}陽性T細胞の漸増が観察された。血清中の各イムノグロブリン分画をELISAにて検討すると、4週齢では雌雄ともにTCDD投与によりIgG2a及びIgG2bの産生が抑制され、8週齢になると雌雄でIgG1及びIgMの分泌量がTCDD投与により低下し、IgG2a及びIgG2bの産生量は雄においてTCDDによる抑制傾向が観察された

全身諸臓器について病理組織学的検討を実施した。その結果、唾液腺(顎下腺、耳下腺)、腎臓、肺、肝臓に病理組織学的な変化が認められた。

唾液腺:4週群で雌雄マウスともにTCDD投与により唾液腺(顎下腺、耳下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められた。炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤として観察された。TCDD 0.1 ng/head 群では雌雄マウスとも耳下腺炎が対照群に比較してやや強い変化が見られた。8週群では雌雄マウスともに4週群と比較し顎下腺、耳下腺により高度なリンパ球浸潤性病変(grade 3)が誘導された。

腎臓:腎臓の間質を中心に慢性のリンパ球浸潤が認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。雌マウスと比較して雄マウスにより高度な腎病変が見られた。特に、雄マウス1.0 ng/head、10.0 ng/head 投与群において顕著な間質性腎炎の出現が見られた。更に高度な腎病変ではthyroid-like appearanceに類似した尿細管病変が見られ、一部で嚢胞形成を伴っていた。

肺:肺の細気管支周囲、及び血管周囲にリンパ球浸潤性病変が見られ、雌マウスと比較して雄マウスにより顕著に認められた。特に8週群の雄マウス10.0 ng/head 投与群において高頻度であった。**肝:**肝内グリソン鞘細胆管周囲に軽度のリンパ球浸潤病変が観察され、やや雄マウスに高頻度に認められた。特に雄マウス10.0 ng/head 投与群において顕著であった。

3) 妊娠マウスへのTCDD投与による次世代マウスへの影響

妊娠NFS/sldマウス(15日)にTCDD(100、1000 ng/kg 体重)を腹腔内投与した後、出生後4週、及び8週の次世代マウスの変化を検討し、それぞれ対照群と比較した。体重の変動については、4週齢、8週齢とも雌雄マウスにおい約5%前後の体重

減少率が見られたが、特に性差は見られなかった。臓器湿重量については、100 ng/Kg 投与群での8週齢雄マウス胸腺において対照群と比較して約20%の重量減少が見られたが、雌マウスでは著変はなかった。脾臓重量への影響は雌雄マウスとも4週群で対照群と比較して約10%の減少が見られ、8週齢では雌マウス100 ng/kg 投与群で約25%の重量減少が見られた。

次世代マウス出生後の免疫担当細胞への影響について検討した。

胸腺:雌雄マウスとも胸腺内CD4SP/CD8SP(シングルポジティブ)細胞及びDP(ダブルポジティブ)細胞への分化に特に異常は観察されなかった。T細胞活性化マーカー(CD44、CD45RB、CD62L)の動態を観察した結果、雌雄マウスともに8週齢胸腺でCD4陽性T細胞のうちCD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。

脾臓:脾臓における妊娠マウスTCDD投与による次世代マウスへの影響は殆ど認められなかったが、雌マウスにおいてTCDD100 ng/kg 投与によるCD8陽性T細胞のT細胞活性化マーカー(CD44、CD45RB、CD62L)の動態解析から雌雄マウスともに8週齢脾臓でCD4陽性CD44^{high}陽性T細胞の軽度増加が見られた。次に、脾臓T細胞のサイトカイン産生能をELISAにて検討した結果、8週齢マウスでは雌雄ともに次世代マウスにおける末梢T細胞のIL-2の産生能が増強され、特に雄マウスで顕著であった。一方、IL-4、IFN- γ 産生能は雌マウスT細胞で著明な産生亢進が認められた。IL-10産生については雄雌マウスともに著変が見られなかった。

病理組織学的検討の結果、唾液腺(顎下腺)、腎臓、肺、肝臓に病理組織学的な変化が認められた。

唾液腺:4週群で雌雄ともに次世代マウス唾液腺(顎下腺、耳下腺)に軽度のリンパ球浸潤が認められた。炎症性病変は導管周囲の巣状単核細胞浸潤として観察された。一方、涙腺炎の出現はいずれの実験群でも見られなかった。妊娠マウスへのTCDD投与100 ng/kg、1000 ng/kg 群の次世代マウスに高度な変化が見られ、雌マウスにより強い変化が認められた。8週群では雌雄マウスともに4週群と比較し顎下腺に高度なリンパ球浸潤性病変(grade 3)が誘導された。

肺:TCDD投与100 ng/kg、1000 ng/kg 群ともに

肺の細気管支周囲、及び血管周囲にリンパ球浸潤性病変が見られ、雌雄マウスとも高頻度であった。肺の間質性病変は1000 ng/kg 投与群でやや高頻度に発生した。

肝：TCDD 投与群の次世代マウス肝内グリソン鞘細胆管周囲に軽度から中等度のリンパ球浸潤病変が観察された。

腎臓：TCDD 妊娠時期投与群マウス腎臓の間質を中心に慢性のリンパ球浸潤が軽度認められ、間質性腎炎類似の病理組織像を呈していた。しかし、新生児投与実験で見られた高度な間質性腎病変は確認されなかった。

内分泌かく乱化学物質の免疫異常に及ぼす影響に関する研究

武吉 正博

1. 母動物

媒体対照群、1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群及び媒体対照群、1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群、10 $\mu\text{g/kg/day}$ 群で分娩した動物はそれぞれ16/35匹、31/50匹、23/50匹であり、媒体対照群と比較していずれの群においても出産率、妊娠期間、産仔数は媒体対照群と比較していずれの群においても有意差は認められなかった。

2. 仔動物

いずれの群も出生時の出生仔外表に異常は見られなかった。

LLNA

媒体対照群における AOO、0.25、0.5、1% DNCB、2.5、5 及び 10% TMA 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.081 、 5.60 ± 0.586 、 6.83 ± 0.394 、 7.01 ± 0.618 、 2.74 ± 0.399 、 5.19 ± 0.653 及び 7.85 ± 0.570 であり、EC6 は DNCB が 0.33%、TMA が 6.52% であった。

1 $\mu\text{g/kg/day}$ 群における AOO、0.25、0.5、1% DNCB、2.5、5 及び 10% TMA 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.025 、 3.45 ± 0.386 、 5.24 ± 0.503 、 5.94 ± 0.377 、 2.78 ± 0.407 、 3.67 ± 0.164 及び 5.87 ± 0.757 であり、EC6 は DNCB が 1.04%、TMA が 10.30% であった。

10 $\mu\text{g/kg/day}$ 群における AOO、0.25、0.5、1% DNCB、2.5、5 及び 10% TMA 群の SI 値はそれぞれ 1.00 ± 0.079 、 8.71 ± 1.593 、 16.29 ± 0.590 、 16.51 ± 1.011 、 6.35 ± 0.966 、 11.82 ± 0.959 及び 18.65 ± 1.234 であり、EC6 は DNCB が 0.16%、TMA が 2.34%

であった。

胸腺細胞の分化能解析

雄仔動物離乳時の胸腺を用いた。離乳時における胸腺の各分化ステージの T 細胞存在比には、明白な変化は見られなかった。

In vitro での $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 細胞への分化操作後、10 $\mu\text{g/kg/day}$ 群において $\text{CD4}^+\text{CD8}^+$ 細胞が減少、 $\text{CD4}^+\text{CD8}^-$ 細胞及び $\text{CD4}^-\text{CD8}^-$ 細胞の増加が認められた。

更に Th1 及び Th2 細胞への分化操作後、細胞内サイトカインを染色することにより、Th1・Th2 バランスへの影響を検討した結果、IL-4 及び IL-10 産生 T 細胞増加傾向を認め、Th2 優位の変動が示唆された。

サイトカイン産生

IFN- γ ; EE を経胎盤・経乳汁暴露した母獣から得られた仔動物を Th1 誘導抗原 (Dinitrochlorobenzene、DNCB) 及び Th2 誘導抗原 (Trimelliticanhydride、TMA) を用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体のみを投与した場合には IFN- γ の産生は見られなかったが、DNCB 或いは TMA を用いて感作・惹起を行った場合、120 時間後において共に誘導が見られたが、特に EE の低用量暴露群において対照群及び高用量群と比較して著しい分泌亢進 ($P < 0.05$ 、Bonferroni test) が確認された。

IL-4：同様に仔動物を Th1 誘導抗原 DNCB 及び TMA を用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体及び Th1 誘導抗原である DNCB を投与した場合には誘導は見られなかったが、Th2 誘導抗原の TMA を用いて感作・惹起を行った場合、24 時間後において全ての群において誘導が見られたが、EE 暴露による影響は見られなかった。

IL-10：同様に仔動物を Th1 誘導抗原 DNCB 及び TMA を用いて感作し、同一抗原を用いて惹起した後の所属リンパ節細胞からサイトカイン産生を比較検討した結果、媒体のみを投与した場合には IL-10 の産生は見られなかったが、DNCB 及び

TMA を投与した場合には共に IL-10 の誘導が見られたが、Th2 誘導抗原の TMA を用いて感作・惹起を行った場合、誘導の亢進が見られた。EE 暴露による明らかな影響は見られなかった。

3) 生殖器

内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

長尾 哲二

1) マウス系統の DEC_s に対する感受性の差異の検討では、E₂ の胎生期暴露により C57BL/6N の精巣重量は ICR に比較して低用量域 (0.1 μg/kg 体重) から有意に低値を示した (ICR では 1 μg/kg 体重から有意に低値)。しかし GEN あるいは低用量 BPA の暴露では、生後の精巣、精巣上体及び精囊のそれぞれの重量はいずれのマウス系統も対照レベルであった。E₂ あるいは GEN 暴露では、成熟後の精巣に組織学的変化 (精細管萎縮、生殖細胞減少など) がいずれのマウス系統にも観察された。しかし低用量 BPA は、いずれの系統の精巣組織にも効果を示さなかった。

2) マウス生殖巣発生期における EDC_s の暴露では、最終投与 24 時間後の観察により、合成ホルモン投与群において間質細胞の細胞質に多数の脂肪滴が観察され、さらにグリコーゲン顆粒の集簇も確認された。しかし生殖索には胎生期暴露による傷害を示唆する毒性学的変化は、セルトリ細胞及び生殖細胞のいずれにも観察されなかった。CLOM 暴露群、低用量 BPA 暴露群の生殖巣には、毒性学的変化は観察されなかった。

3) 生殖巣及び胎児精巣、新生児精巣の生殖細胞のアポトーシスによる過剰細胞死の観察では、いずれの EDC_s の胎生期暴露においても生殖巣及び胎児精巣の細胞に Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかった。しかし、DES、E₂、EE、EB、TAM、CLOM 暴露群の生後 9、14 及び 28 日の新生児の精巣には顕著な Tunel 陽性細胞の増加が観察された。ATZ 暴露群、低用量 BPA 暴露群の新生児精巣では、いずれの時期にも Tunel 陽性細胞の増加は観察されなかった。

4) EDC_s の外生殖器の形成過程に及ぼす影響については、DES、E₂、EE、EB あるいは Flu の胎生期

暴露により雄の末期胎児の AGD (AGD・体重³) が対照群と比較して有意に短縮した。暴露群の雄胎児の肛門-生殖突起間周辺の組織において、細胞間質の減少がみられ、同時に細胞外マトリックスの減少が認められた。Flu 及び Vcz の 100 mg/kg 体重/日について実施した雌雄胎児の肛門-生殖突起間周辺の組織観察においては、対照群の雄及び Vcz 投与群の雄では、表皮組織直下真皮層に毛嚢様あるいは腺様構造を呈する上皮様細胞の集塊が認められたが、Flu 投与群ではこれらの組織構造は認められなかった。

上記腺様構造の電子顕微鏡観察では、上皮細胞に特異的なデスモソーム結合が認められ、これら細胞集塊は基底膜様構造により取り囲まれていた。当該部位の単位重量あたりの HP 量の定量については Flu あるいは Vcz 暴露群の雄胎児における HP 量が対照群と比較して抑制される傾向がみられた。また、当該部位における Type IV Collagen の免疫染色では、肛門-生殖突起間の表皮細胞層直下の染色性及び分布について比較したが、群間及び雌雄間に差は認められなかった。

5) 胎齢 17 日、18 日及び生後 1 日のいずれの精巣においても、DES 投与群における *Ins13* mRNA 発現は対照群と比較して有意に減少した。日齢間に発現の差はみられなかった。*SF-1* については、投与群の胎齢 18 日の発現が有意に減少したが、胎齢 17 日及び生後 1 日には、対照群との間に差は認められなかった。*P450* については、*Ins13* と同様、いずれの日齢においても投与群の発現は減少した。

胎齢 18 日胎児の精巣について、用量・反応関係の有無を調べた結果、*Ins13* mRNA 発現は DES の用量に依存して減少する傾向がみられた。生後 7 週において観察した精巣下降不全についても、用量に依存して増加したが、対照群及び 6.25 μg/kg 群では観察されなかった。なお、胎齢 17 日、18 日あるいは生後 1 日の精巣摘出時の肉眼観察では、50 μg/kg 群のいずれの日齢においても、精下降不全を示す個体が観察されたが、25 μg/kg 以下の投与群では観察されなかった。

内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

吉田 緑

種々の用量の DES を生後 24 時間以内の Donryu

ラット、マウスに単回皮下投与後、12ヶ月齢まで観察し、遅発性影響の高感受性で且つ利便性の高い検出指標を生殖器の形態観察、臓器重量、性周期観察、子宮発がん性などを項目とし検討した。

1) ラットを用いた遅延型影響検索モデルの作製と検出指標の確立—Donryu ラットを用いた DES 新生児期暴露による遅発型影響予測指標の検出—

性成熟までの観察において、体重及び膺開口時期に投与による影響は認められなかった。胸腺、子宮の重量はいずれの検査時期においても差が認められなかったが、卵巣重量は5、7週齢で DES 1500 及び150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群において有意に低下した。

病理組織学的検索では、DES 1500 及び150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群に影響が観察された。DES 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では PND21 より低形成を示したが、DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では異常は認められなかった。初回排卵後の5週齢の検査では両群の卵巣ともこのう胞状の変性卵胞より構成され卵巣の小型化が認められた。子宮は PND21 までは投与による変化は認められなかったが、5週齢では DES 1500 及び150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群で上皮の上皮内過形成 (intraluminal hyperplasia) が認められた。膺では PND14 の DES 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群において扁平上皮の肥厚が観察され、5週齢以降は DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重以上の群で扁平上皮の肥厚が認められた。胸腺及び乳腺には HE 染色では異常は認められなかった。

5週齢の卵巣、子宮及び胸腺の ER α 、 β 、プロゲステロンレセプター (ProgR) あるいは卵胞・黄体に発現している rat inhibitor of apoptosis protein (rIAP3) の mRNA の発現を RT-PCR 法により比較したが、DES 10 μg 群で ProgR の発現の増加が観察された以外、とくに変化は認められなかった。

DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では膺開口後ただちに持続発情を示した。DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群においても膺開口後持続発情を示す動物は少数例ながら認められ、経時的に増加して11週齢で半数、15週齢で大部分の動物が持続発情となった。DES 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では11週齢までは正常な性周期を示したが、13週齢より持続発情が出現し15週齢で半数、19週齢で大部分が持続発情となった。DES 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では15週齢より持続発情が出現し19週齢で半数、28週齢で大部分が持続発情を示した。DES 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群及び対照群は同じ推移

を示し、23週齢で持続発情が出現、31週齢で半数が持続発情となった。

DES 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では対照群に比較し増殖性病変の頻度・病変数ともに有意差は認められなかったが、DES 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群では子宮内腺癌の発生頻度は、有意差はないが増加傾向を示し、異型性過形成と腺癌を併せた増殖性病変数は対照群と比較し有意に増加した。DES 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重以下の群では増殖性病変数は対照群と比較し有意差は認められなかった。DES 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群の子宮の萎縮が顕著で、子宮腺の形成が殆ど観察されず、内膜は扁平上皮化生を示す個体が多く認められた。12ヶ月齢の卵巣は大部分の動物において、対照群を含むいずれの群においても黄体がなく閉鎖卵胞が存在する萎縮性的変化が認められ、対照群を含む DES 各群の卵巣萎縮の形態像に質的な差は認められなかった。

2) C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

離乳までの児数、死亡数及び哺育を中断した母動物数については、いずれの群においても死亡児数、哺育中断母動物数は少なく、ほとんどの児動物が離乳まで成育することが明らかとなった。また、対照群と投与群で有意な差はいずれのこの項目にも認められなかった。溶媒対照群と無処置対照群の間にも有意な差は認められなかった。また、児動物の体重についても投与による変化は観察されなかった。

性周期については、DES 2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ 群で持続発情を示す動物が多い傾向が9週齢より観察された。経時的な変動について、本実験は16週齢までの観察であるものの、持続発情動物の増加傾向はいずれの群にも認められなかった。

3) DES の投与量の *in vivo* におけるエストロゲン活性の有無を確認

子宮重量は DES 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群体重以上で有意に増加した。DES 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重群は対照群と同様の値を示した。

4) 性周期を修飾する卵巣の変化について

① busulfan 胎生期投与による卵細胞減少が性周期及び子宮発がんに与える影響について

Busulfan 5.0 mg/kg 群では、子宮内腺癌の発生

頻度と腫瘍性病変数ともに有意な増加を示したが、2.5 mg/kg 群は対照群と同様であった。Busulfan 群では対照群と比べ早くより持続発情を示し、5.0 mg/kg 群では対照群より約4ヶ月間早い6ヶ月齢で、2.5 mg/kg 群では8ヶ月齢で大部分が持続発情となった。Busulfan 投与の卵巣は萎縮し、形態学的に黄体及び卵胞ともに殆ど認められなかった。Busulfan 投与により血中のインヒビン、エストロゲン及びプロゲステロンともに減少したが、E/P比は5.0 mg/kg 群で増加傾向を示した。

②幼若期の放射線照射による卵巣への影響が性周期に与える影響について

γ線照射による卵巣への明らかな影響は、1.0Gyを性成熟前である14日齢で照射した動物に認められた。14日齢照射動物では照射6時間後においてすでに卵細胞及び大部分の顆粒膜細胞にアポトーシスが観察され、照射9週後の11週齢では卵巣の重量は対照群より有意に小さく、肉眼的にも明らかに小さかった。性成熟前の0.2Gy、成熟後の0.2、1.0Gy照射群では肉眼的及び組織学的に異常は認められなかった。形態計測解析において、性成熟前1.0Gy照射群では卵胞及び黄体数ともに対照と比較し明らかに減少し、原始卵胞から発育卵胞の枯渇が著しかった。性周期の観察ではいずれの群も臍開口後の7週齢では大部分の動物が規則正しい4日性周期を示したが9週齢より1.0Gy性成熟前照射群においては持続発情を示す個体が出現し、時間とともに急激に増加して17週齢ではほぼ全例が持続発情を呈した。

5) 子宮癌発生を修飾する因子について

子宮癌がん実験において、I3C 500 及び2000 群、4HE 群では、子宮内膜腺癌の発生頻度あるいは個体当りの子宮増殖性病変数が有意に増加した。E₂ 群においても同様の傾向が観察されたが有意な差はなかった。子宮癌がん実験においてもI3C 投与による性周期への影響は認められなかった。肝臓の検索では、I3C 投与にCYP1A1、1A2、1B1 mRNA の発現が増加し(15ヶ月齢)、小葉中心性肝細胞肥大及び肥大部の免疫組織化学染色によりCYP1A1、1A2の誘導が確認された。6から15ヶ月齢まで測定した肝臓中のエストロゲン代謝酵素はestradiol 2-及び4-hydroxylaseの活性値が高く、特に後者の有意な増加がいくつかの検査時期で認められた。

内分泌かく乱化学物質の生殖器系の老化に至る過程に対する影響

太田 亮

SD ラット PND1-5 に DES を強制経口投与し、101 週齢まで観察した。

体重推移：雌の高用量群において46週齢以降の体重が対照群より高値で推移する傾向が認められた。

交尾率及び受胎率：雌では交尾率や受胎率の低下が中及び低用量群で認められたが、雄では影響は認められなかった。

行動試験：24週齢時には、低用量群の雄の回避率がやや低値で推移したが、48週齢時には、回避率にDES投与の影響を示唆する変化はみられなかった。また、総反応数にも群間の差は認められなかった。

精子検査及び雄の生殖器重量：DESの影響は認められなかった。

雌の器官重量：54週齢の雌の剖検では、下垂体重量が全てのDES投与群で有意に増加し、副腎重量が高及び中用量群、甲状腺重量が高用量群のみで有意に増加した。また卵巣重量は、高及び中用量群で有意に低下した。

排卵検査：hCG誘発の排卵数には、DESの影響はみられなかった。

免疫検査：26週齢では血中の抗SRBC-IgMが全てのDES投与群で有意に低下したが、52週齢では認められなかった。

生存曲線：高用量群の雌においてのみ生存日数が短縮した。

〈内分泌かく乱性確定試験開発支援基礎研究〉

確定試験に関わる発がん性検討：乳腺上皮系の分化形質を指標とした内分泌かく乱化学物質の発がん影響の検討

長村 義之

1. EDCsの周産期投与によるラット乳腺発現系への影響

1) DMBA投与4週間後のF1の乳腺

病理組織学的にDES低用量及びBPAでは明らかな形態変化が見られなかった。但し、DMBA単独群と比較し、DES低用量群の乳腺ではTEB及び導管上皮の細胞増殖活性に軽度の増加が認められた。一方、DES高用量では、腺房形成、乳汁分泌

及び導管の拡張といった明らかな組織学的変化が認められ、腺房の上皮は高い細胞増殖活性を示した。同様に WM 標本の観察から溶媒対照群、DMBA 単独群、DES 低用量及びBPA 投与群では、形態学的にいずれも導管及び TEB が主体を成していたのに対し、DES 高用量群では腺房及び太い導管が観察され、TEB の構造は消失していた。また、乳腺腫瘍の初期病変と考えられる小結節は、DMBA 処置を施した全群で認められたが、発現状況は DMBA 単独群を含め群間に明らかな差は認められなかった。

2) DMBA 投与 13 週間後の F1 の乳腺

F1 の腫瘍発生率は、DMBA 処置を施したいずれの群でも 83~100%と高頻度で、DMBA 対照群に対する明らかな差は、認められなかった。病理組織学的には DES 低用量群、BPA 投与群では、主に papillary/ductal adenoma もしくは carcinoma であり、誘発された腫瘍の組織像も DMBA 対照群と差は認められなかった。一方、DES 高用量群では intraductal cribriform carcinoma が主体で ductal carcinoma が 混在、他群の腫瘍と比べ悪性度が高く組織形態に明らかな差が認められた。

2. EDCs による乳癌由来株化細胞への影響

文献情報をもとに化合物の濃度を設定し、各細胞の増殖を指標として評価した。しかし、当初 ER+、HER2- の MCF-7 では、DES 処理において、明らかな増加傾向は確認できなかった。一方、BPA 処理では 10^{-7} M 及び 10^{-5} M 添加によって、軽度の細胞増殖が認められた。ER+、HER2+ の BT474 では、DES 処理で低濃度の 10^{-11} M で細胞増加傾向が確認されたが、逆に高濃度の 10^{-7} M では細胞数が低値を示した。一方 BPA 処理ではいずれの添加濃度でも溶媒を添加したサンプルと差が認められなかった。ER-、HER2+ の SK-BR-3 では、DES 及び BPA 処理共に、明らかな傾向は確認できなかった。

3. RNAi による ER 発現抑制における EDCs の乳癌由来株化細胞への影響

1) 乳がん由来株化細胞の ER α 発現 (EDCs による MCF-7 及び BT474 細胞の影響)

MCF-7、BT474 細胞に各種条件で E₂、DES、BPA を添加し、4 日間培養した後、細胞数を測定したところ MCF-7 における E₂ 添加では 10^{-8} M、DES 添加では 10^{-10} M 及び 10^{-8} M、BPA 添加では 10^{-8} M

及び 10^{-6} M において Vehicle と比較し細胞数の有意な増加が認められた。一方 BT474 では、いずれの EDCs 投与群においても Vehicle と比較し有意な増殖は認められなかった。また、MCF-7 及び BT474 の ER α の発現量を Quantitative RT-PCR、免疫組織化学染色を用い解析したところ、ER α の mRNA 発現量は MCF-7 が有意に高値を示し、免疫染色性においても MCF-7 において明らかに強い染色性を示した。

2) shRNA 導入による ER α 発現抑制された MCF-7 細胞の EDCs の影響

BPA を含む化合物の細胞増殖応答と ER α の関与を検討するため、shRNA による RNAi 誘導により ER α 発現抑制した MCF-7 またはコントロールとして Empty ベクターをトランスフェクションした MCF-7 細胞を用いて E₂、DES 及び BPA を種々の濃度で 4 日間培養し、細胞増殖について確認した。その結果、MCF-7 に Empty ベクターをトランスフェクションした E₂ 添加群では、Vehicle と比べ 10^{-10} M、 10^{-8} M 及び 10^{-6} M のいずれの濃度においても有意な増加が認められ、特に 10^{-8} M において明らかな高値を示した。DES 添加群では 10^{-10} M、 10^{-8} M 及び 10^{-6} M のいずれの濃度においても増加傾向が見られ、特に、 10^{-8} M において顕著な増加を示した。BPA 添加群についても、 10^{-7} M、 10^{-6} M、 10^{-5} M で有意な増殖が認められ、特に 10^{-5} M において顕著な増殖が認められた。一方、shRNA により ER α 発現抑制した MCF-7 細胞では、いずれの化合物についても、すべての濃度で EDCs による細胞数の増加は、認められなかった。また、ER α 発現抑制を確認するため Quantitative RT-PCR 及び免疫組織化学染色では、Empty ベクターをトランスフェクションした細胞に対し、明らかな ER α 発現抑制が確認された。

確定試験に関わる各種核内受容体転写活性迅速確認系構築研究

西川 淳一

核内受容体のリガンド依存的な転写活性化の分子機構に基づき、簡便に化学物質の核内受容体への作用を検出できるシステムを構築した。開発したシステムを用い、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質について、多種類の核内受容体への影響を検討した。

核内受容体転写活性迅速確認系

核内受容体はリガンド依存性の転写調節因子であるが、その転写活性化にはリガンド結合による受容体の構造変化と構造変化を認識して結合するコアクチベーターと呼ばれる転写活性化共役因子が重要な役割を果たしていることが知られている。コアクチベーターは、不活性型（リガンドが結合していない状態）の受容体には結合せず、活性型（リガンドが結合した状態）の受容体のみ結合するという性質を持つタンパク質であり、リガンドシグナルを転写装置に伝達する仲介因子として働く。もし、化学物質が本来の生体内リガンドを真似て核内受容体に作用するならば、その化学物質も核内受容体の構造を活性型に変化させ、コアクチベーターと結合すると考え、核内受容体とコアクチベーターの相互作用を検出する方法を考案した。この方法の特徴として、コアクチベーターとバクテリア由来アルカリフォスファターゼ（BAP）を検出剤として使用することから、CoA-BAPシステムと名付けた。CoA-BAPシステムを用いて、現在までにER α 、ER β 、RAR α 、RAR γ 、TR α 、VDR、RXR α 、RXR γ 、PPAR α 、PPAR γ 、PPAR δ 、LXR α 、LXR β 、FXRの14種類の核内受容体についてアッセイ系を確立し、既知リガンドに対する応答を確認している。

核内受容体に結合する化学物質

確立したアッセイ系を用いて、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の14種類の核内受容体へのアゴニスト作用を評価した。その結果、以下の事が分かった。

1) アルキルフェノール類のERとRARへの影響

これまでの報告通り、パラ位に疎水性の側鎖を持つアルキルフェノール類は、CoA-BAPシステムにおいてもERに陽性反応を示した。しかし、本研究において、ノニルフェノールやオクチルフェノールは、ERだけではなく、RARに対しても比較的高い活性を示す事が分かった。RARは、ビタミンA代謝物の*all-trans* retinoic acid (ATRA)の受容体であり、胎仔期におけるATRA過剰暴露は種々の奇形を誘発することが多くの動物で報告されている。今回、内分泌かく乱作用が疑われているアルキルフェノール類がRARにアゴニスト活性を示したことは、これらの物質がERとの結合だけでなく、RARとの結合を介して、あるいは両者の複合作用として生体に悪影響を及ぼす可能性

を示唆している。

2) 有機スズ化合物のRXRとPPARへの影響

TBTやTPTは、RXRやPPARに用量依存的に強い活性を示した。これらの化合物以外にも、Tripropyltin (TPPrT) Tetrabutyltin (TetBT)はRXRに、Diphenyltin (DPT)やTricyclohexyltin (TCHT)はPPARに強い活性を示した。酵母two-hybrid法や哺乳動物細胞を用いたレポーター遺伝子試験では、有機スズ化合物のRXRとPPARへの結合性の差異は見いだせなかったが、CoA-BAPシステムで試験することにより、これらの結合様式に違いがあることを明らかになった。

また、PPARについてコアクチベーターを変えてTPTへの反応性を調べたところ、陽性コントロールとして用いたRosiglitazoneはp300、CBP、TIF2、SRC1、PGC1等のすべてのコアクチベーターに対しリガンド依存的な活性値の上昇が観察されたのに対し、TPTはp300やCBPを用いた時には効果を示さなかった。コアクチベーターは、PPARの構造を認識して結合する因子であることを考えると、これらの結果はRosiglitazoneが結合した状態とTPTが結合した状態でPPARの構造が異なる事を示唆している。

化学物質のSXRを介する免疫抑制作用

SXRは外来異物のセンサーとして働く核内受容体であり、多くの化学物質に反応してCYP3A4等の薬物代謝酵素の発現を誘導する。最近の研究から、SXRは免疫系のキー・レギュレーターであるNF κ Bとクロストークすることが分かってきた。そこで、培養細胞にSXRとNF κ Bを発現させ、SXRのリガンドであるRifampicinを添加したところ、濃度依存的にNF κ Bの活性が抑制された。また、逆にNF κ Bの発現量を増やしたところ、SXRの転写活性化能が抑制された。つまり、SXR（薬物代謝系）とNF κ B（免疫系）は相互に抑制的な作用を持つ事が示唆された。

確定試験に関わる多分化能修飾メカニズム確認の為のES細胞分化増殖影響解析研究 高木 篤也

1) ES細胞及びEBの分化過程で発現する遺伝子を経時的にマイクロアレイにより解析した。その結果、多くの遺伝子発現の変動が見られた。その

中で、核内受容体遺伝子 ER α 、 β 、ERR α 、 β 、 γ 、PR、AR、TR α 、 β 、VDR、PPAR α 、 δ 、 γ 、RAR α 、 β 、 γ 、RXR α 、 β 、 γ は、ES細胞及びEBにおいて、それぞれ特有の発現パターンを示した。

内胚葉のマーカーのAFP(alpha fetoprotein)、心臓のマーカーであるNKX2.5、Cardiac actin、中胚葉マーカーであるBrachyury、Cerberus、Goosecoid、Flt-1等について解析したところ、内胚葉のマーカーはEBの5日前後から、中胚葉マーカーについてはEBの2日後前後から、心筋のマーカーはEBの4.5日前後から、増加するなど、それぞれ個々の遺伝子に特異的な発現パターンが見られることを明らかにした。

2) BPAのEBに及ぼす影響の検討; ES細胞をゼラチンコートDish上で培養後、LIFを除いたES培地で浮遊培養した。その間にATRA、BPAを添加し、4日後に胚様体(EB)を採取し、細胞数を計測した。その結果、BPA群で軽度ではあるが有意な細胞数の増加が認められた。一方、ATRA群では細胞数の減少が確認された。

確定試験に関わる生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析
松島 裕子

1. 性周期に伴う遺伝子発現変化

11週齢のC57BL/6マウス雌を100匹用意し、解剖後に膣スミアにて性周期を判定し、発情前期、発情期、発情後期、発情間期の4周期毎に5匹以上ずつサンプルを取得した。得た臓器は、視床下部、下垂体、卵巣、子宮、膣に加え、血清である。血清以外の5臓器について、当部で開発したPercellome手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を実施した。1周期につき各臓器3サンプルずつデータを得た。得られたマイクロアレイデータをPercellome手法により、コピー数データに変換した。これにより、同じ遺伝子を臓器間で比較することが可能となった。まず、スキッタープロットを描き、性周期毎の遺伝子発現変化の全体像を検討したところ、視床下部領域は変化に乏しく、下垂体、卵巣は一部の遺伝子に変化が生じており、子宮、膣は多数の遺伝子に比較的大きな発現変化を生じていることが明らかとなった。エストロゲンによって発現が上昇することが報告されてい

るプロゲステロン受容体の発現変化を調べると、膣でその発現が発情前期に上昇していることが確認された。

2. 発達に伴う生殖器遺伝子発現変化

生後1日、3日、5日、7日、10日、16日、21日、28日の卵巣、子宮に加え、21日は視床下部、下垂体、膣を得た。これらの臓器について、当部で開発したPercellome手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を実施した。各臓器3サンプルずつのデータを得た。得られたマイクロアレイデータはPercellome手法により、コピー数データに変換した。そのデータをMF surfaceによりサーフェスデータとし、遺伝子毎に発現変化を検討した。検討した遺伝子カテゴリーは、1) ER alpha, beta, 2) Progesterone receptor, 3) ステロイド合成系, 4) LH/FSH5, 5) Androgen receptor target, 6) “Estrogen”をキーワードに含む遺伝子群, 7) DNA methyltransferase, 8) Oncogene, 9) Cyp, 10) Nuclear receptorの10カテゴリーである。以降でカテゴリー毎に解析した結果を記す。

1) ER alpha, beta

ER alphaは卵巣、子宮とも出生直後から成獣レベルの発現量を示し、変動は小さかった。生後21日では成獣に比べ下垂体での発現量は低いが、子宮、膣では成獣レベルに達していた。一方、ER betaは卵巣では発達に伴い経時的に発現量が上昇し、子宮では発現が認められなかった。生後21日での卵巣での発現量は成獣の数倍であることが判明した。

2) Progesterone receptor (PR)

ERによって発現が制御される代表的な遺伝子としてPRが知られている。そこで、PRの発現変化を検討した。その結果、PRの発現変化パターンはER alphaのパターンと類似しており、ER betaとは異なることが判明した。

3) ステロイド合成系

コレステロールからエストロゲン合成に至る系に関わる酵素群の遺伝子発現変化を解析した。その結果、Cyp17a1 (Pregnenolone \rightarrow 17-alpha-OH-Pregnenolone)、Hsd3b1 (Pregnenolone \rightarrow Progesterone)、Hsd17b1 (Estrone \rightarrow Estradiol)、Cyp19a1 (aromatase: Testosterone \rightarrow Estradiol)の4遺伝子の発現パターンがER betaのパターンに類似していることが判明した。

4) LH/FSH 系

生後 21 日では LHb、FSHa/LHa とともに下垂体での発現が、FSH receptor は卵巣での発現が成獣レベルに達していた。LH receptor、FSH receptor は発達に伴い卵巣での発現が経時的に上昇した。

5) Androgen receptor target

加藤茂明研究室（東京大学・分子生物学研究所）との Androgen receptor knockout (ARKO) mice に関する共同研究で、ARKO が早発卵巣不全を示すことが明らかとなり、その責任遺伝子の候補として KitL、Bmp15、Gdf9、HGF を抽出している。そこで、これらの遺伝子群の発現変化を調べたところ、Bmp15、Gdf9 の生後 21 日卵巣での発現が成獣より高く、卵巣発達に伴い発現が経時的に上昇する ER beta 型のパターンを示した。

6) “Estrogen” をキーワードに含む遺伝子群

27 ヶの遺伝子について発現変化を解析した。その結果、4 遺伝子が生後 21 日で成獣レベルの発現を示し、発達に伴い発現上昇する ER beta 型のパターンを示した。

7) DNA methyltransferase

この発達時期における DNA メチル化の重要性について示唆を得るために、DNA methyltransferase の発現変化パターンを調べた。その結果、メチル化パターンを維持する酵素である Dnmt1、酵素活性を持たないがメチル化パターン制御への関与が報告されている Dnmt3L の発現が生後 21 日で成獣レベルを示し、発達に伴い上昇する ER beta 型のパターンを示した。

8) Oncogene

このカテゴリーに属する遺伝子群は 116 ヶある。その中で 4 遺伝子が ER alpha もしくは ER beta と類似したパターンを示した。ER alpha 型は Rab25、Vav3、ER beta 型は Lmyc1、Mos であった。

9) Cyp

TCDD で発現が誘導される Cyp1b1、Cyp2s1 に加え、Cyp11a1 の発現が ER beta と類似したパターンを示した。一方、Cyp11a1 の発現は低いままどまった。

10) Nuclear receptor

このカテゴリーに属する 48 遺伝子群について発現変化を調べたところ、alpha fetoprotein の発現を制御することが報告されている Nr5a2 に加え、PPAR alpha、PPAR gamma の発現が ER beta と類似したパターンを示した。

3. エストロゲン受容体 α 遺伝子 cDNA ノックインマウス (ERaKI マウス) 妊娠維持不良について

ERaKI mouse の妊孕性検討過程で、本マウス雌が妊娠維持不良を示すことが判明した。明らかでない不良を示す時期及び胎児が死亡する時期を特定するため、妊娠 7.5 日目から 12.5 日目まで経時的に開腹し観察したところ、妊娠 9.5 日目から肉眼的にも胎児発育不良が認められ、妊娠 10.5 日目に大部分の胎児死亡が、妊娠 12.5 日目に全例死亡が確認された。発育不良の時期と胎盤発達の時期が重なることから、同時期の胎盤組織切片を検討したところ、妊娠 10.5 日目の胎盤において、ラビリンス構造発達不全が認められた。

4. ERaKI マウスの網羅的遺伝子発現解析

ERaKI mouse 雌の妊娠維持不良メカニズム検討のために、妊娠 10.5 日目の子宮及び胎盤について Percellome 手法を用い網羅的遺伝子発現解析を実施した。野生型と比較したところ、発現変化は胎盤よりも子宮に於いて大きかった。発現変化の生理的意義を考察するに当たり、性周期に伴う遺伝子発現変化データベースを随時参照した。

まず、組織切片解析により胎盤ラビリンス構造発達不全が疑われたため、その過程に関与しうる遺伝子群として血管新生制御遺伝子群に注目した。その結果、性周期に伴い発現変動する血管新生制御遺伝子として、Adrenomedullin (ADM)、Cyr61、VEGF-A が選択された。ERaKI マウスにおけるこれらの発現を調べたところ、ADM が子宮、胎盤共に低下傾向、Cyr61 は胎盤で低下傾向にあることが分かった。ADM、Cyr61 共に、ノックアウトマウスにおいて胎盤不全による妊娠維持不良が報告されていることから、これらの発現変化がエストロゲン受容体 α cDNA ノックインマウスにおける妊娠維持不良に関与していることが示唆された。

次に、ERaKI 子宮での発現変化に注目し解析したところ、発現上昇遺伝子群として Ovgp1 (Oviductal glycoprotein1)、Ptgs2 (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2)、Clca3 (Chloride channel calcium activated 3)、Itgp1 (Immunoresponsive gene 1) の 4 ヶに加え、Immunoglobulin 遺伝子群が選択された。

Ovgp1、Ptgs2、Clca3、Itgp1 はいずれも性周期において発現変動を示す遺伝子であり、発情期もし

くは発情後期に発現ピークを有していた。

発現低下遺伝子群としては、**prolactin like protein family** が選択された。そのゲノム上の位置を調べたところ、13番染色体にクラスター状に存在しており、これらの発現が共通のエンハンサーの支配下にあることが示唆された。

さらに、性周期データベースから子宮で発現変動を示す遺伝子の中に **Prominin1** があり、そのピークは発情期であった。ERαKI 子宮での **Prominin1** 発現は約半分に低下していた。

確定試験に関わる神経系形成・発達メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点の分子毒性学的解析

高木 篤也

1) 神経幹細胞影響試験系の開発

神経幹細胞の特性は、神経系細胞への多分化能と、それを保持したまま増殖する自己複製能の大きく2種類に分けられる。そこで、本研究ではこの2種類の特性に対する化学物質の影響を定量的に検討可能な試験系の開発を行った。

1) - 1: 自己複製能に対する影響を検討する系としては、神経幹細胞が、無血清培地中、bFGF、EGFを共存させつつ浮遊培養すると、単一細胞から分裂を繰り返すことにより、顕微鏡下容易に計数可能な細胞凝集塊(ニューロスフェア)を形成することを利用した、ニューロスフェア培養系を基本とした。化学物質の影響を、培養開始時に播種した生細胞数当たりのニューロスフェア数として定量化を試みた。そのために96well plateを利用することとし、マウス胎生14.5日の胎児終脳から得た細胞を用いて播種細胞数の検討を行い、1well当たり4000個の生細胞を播種することで50個程度のニューロスフェアが形成される系として安定した培養が行えるよう各種条件を設定した。

1) - 2: 分化能に対する影響を検討する系としては、神経幹細胞が未分化状態を維持して形成するニューロスフェアを、付着条件に移し血清で刺激すると神経系の各細胞系譜に分化することを利用して系の構築を行った。ニューロスフェアはおよそ1000個の細胞からなる凝集塊であるが、もともと単一細胞に由来するため、1個のニューロスフェアが付着後に分化しうる細胞系譜はもともと単一細胞が有していた分化能力を反映すると考

えられている。よって、化学物質をニューロスフェア形成時に添加することで、神経幹細胞がその分化能にどのような影響を受けたかを調べることができる。神経系細胞系譜マーカーとしては、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの各々に対し、MAP2、GFAP、O4を選び、各々に対する抗体を用いた免疫染色を行うことで陽性を判定した。各種条件検討を行い、結果的に血清1%、8wellスライドチャンバー1wellあたり投入するニューロスフェア数は20ヶとすることで、分化能に対する影響を定量的に検討することが可能な系として完成した。

2) DES、BPA、Thyroid hormone の胎児成熟神経幹細胞自己複製能への影響検討

BPAの胎児成熟神経幹細胞の自己複製能への影響を主に検討した。この試験系は、無血清培地中、bFGF、EGFを共存させつつ浮遊培養すると、神経幹細胞が単一細胞から分裂を繰り返すことにより、顕微鏡下容易に計数可能な細胞凝集塊(ニューロスフェア)を形成することを利用した、ニューロスフェア培養系を基本とするものである。

DESは 10^{-10} M、 10^{-11} M、BPAは 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、Thyroid hormoneはT3、T4を各々30ng/mL、40ng/mL用い、培養中に共存させた。細胞は神経幹細胞として成熟(刺激を受ければニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトの神経系3系統の細胞全てに分化し得る)しているマウス胎生14.5日の胎児終脳から得た。この培養系では、1well当たり8000個の生細胞を播種すると100個程度のニューロスフェアが形成される。このニューロスフェア数が安定して得られるよう各種条件を設定してある。今回の検討では、播種する細胞数を3段階振り、1well当たり4000個、6000個、8000個の生細胞を用いた。本試験系開発当初は7日間培養した後、顕微鏡下同定したニューロスフェアを直接計数していたが、各wellの写真を撮り記録に残すことで客観的な計数が出来るよう手順を変更した。BPAは 10^{-9} M、 10^{-10} Mではニューロスフェア数を増加させ、 10^{-11} Mでは減少させた。Thyroid hormoneも有意差はつかなかったが、ニューロスフェア数を増加させる傾向を示した。

盛んに自己複製を繰り返す神経幹細胞は同じ培養期間でも径の大きなニューロスフェアを形成す

ると考えられる。そこで、100 μ m 径を超えるニューロスフェア数を計数したところ、有意差はつかないものの、BPA⁹M で数が増加する傾向を示し、10¹¹M では減少する傾向となった。また、Thyroid hormone はかなり減少する傾向を示した。我々の検討で Thyroid hormone が神経幹細胞に対し、オリゴデンドロサイト分化誘導作用を示すことが判明している。よって、Thyroid hormone がニューロスフェアの数を増やす一方、径の大きなニューロスフェア形成を阻害したのは、Thyroid hormone が幹細胞の自己複製を阻害し分化を促進する過程で、結果的に前駆細胞の生存率を高め、同時にある程度の増殖を促進し、径の小さなニューロスフェア数を増加させたものと解釈出来る。

3) BPA の胎児成熟神経幹細胞アストロサイト分化に対する影響検討

2) の結果より、BPA が 10⁹M、10¹⁰M ではニューロスフェア数を増加させ、10¹¹M では減少させること、すなわち、神経幹細胞の自己複製に影響を与えることが明らかとなった。今年度はこれを受けて、BPA の神経幹細胞からのアストロサイト分化への影響を解析した。

神経幹細胞は胎児期に、神経細胞にしか分化しない段階から、グリア細胞にも分化しうる段階へと成熟する。胎生 11.5 日の神経幹細胞はアストロサイト分化誘導因子 LIF (Leukemia inhibitory factor) で刺激してもアストロサイト分化を示さないが、胎生 14.5 日の神経幹細胞は LIF 刺激によりアストロサイト分化を示す。この成熟過程には DNA メチル化を始めとするエピジェネティック制御が関わっていることが示されており、胎生 11.5 日にはアストロサイトマーカーとしても用いられる GFAP のプロモーターに存在する STAT3 結合部位がメチル化されているため、LIF で活性化され核に移行した STAT3 が DNA に結合できずアストロサイトに分化出来ないが、胎生 14.5 日には脱メチル化され分化できるようになることが分かっている。

分化影響を検討するために、マーカータンパク質の発現を定量化できる実験系として、赤外蛍光色素による In-cell western 系を導入した。この系では、96well plate にて培養した細胞をそのまま免疫染色し、タンパク質発現量を定量化することができる。そこで、胎生 11.5 日または 14.5 日の胎児終

脳から神経幹細胞を培養し、LIF 存在下、10¹³M~10⁷M までの BPA 影響を検討した。

胎生 11.5 日由来神経幹細胞は、アストロサイト分化能を持たないことを反映し、LIF による GFAP 発現上昇を示さなかった。一方で、胎生 14.5 日由来神経幹細胞は LIF 濃度依存的に GFAP 発現上昇を示した。

BPA は胎生 11.5 日由来神経幹細胞に対しては影響を示さなかったが、胎生 14.5 日由来神経幹細胞に対しては、濃度依存的に GFAP 発現抑制作用を示した。この結果を免疫蛍光染色顕微鏡観察により形態的に検討したところ、BPA⁹M で確かに GFAP 発現細胞数が減少していることが明らかとなった。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】

〈OECD Conceptual Frame Work Level 3~4 対応試験開発〉

Pubertal assay の改良としての外来性エストロゲン刺激による卵巣機能等の修飾の高感度検出試験系開発

松島 裕子

1) 追試データの解析 :

体重;解剖日 (PND21) の体重に対する DES 投与の影響は見られなかった。

子宮重量; PND1~5 (0~10 μ g/kg) +PND18~20 (0 及び 1 μ g/kg) の各群の子宮の相対重量は、対照群に対して有意な変化は示さなかった。これに対し、PND1~5 (0.1 μ g/kg 以上) +PND18~20 (10 μ g/kg) では、子宮の絶対及び相対重量に有意な低値がみられた。

病理組織学的検査;

① 多卵性卵胞の発生は、PND1~5 に DES 0.001 μ g/kg 以上の群で有意に増加した。

② 子宮内膜 reserve cell hyperplasia の発生は、PND1~5 (1, 10 μ g/kg) +PND18~20 (10 μ g/kg) でみられた。

③ 子宮腺の数は、PND1~5 に DES 1 μ g/kg 以上の群で減少した。

2) C57BL/6 マウスのエストロゲンに対する子宮肥大反応の予備検討 :

CD-1 マウスと同様に、PND1~5 に DES を投与した群では、離乳時の子宮肥大反応が減弱した。

3) 実験動物飼料中の植物性エストロゲンが動物実験に及ぼす影響の検討:

出生時の母親の体重(g、平均±SD)は、CRF1 群(n=10)が 27.5 ± 0.8 、PLD 群(n=12)が 27.0 ± 1.1 であり、ほぼ同じであった。

出産数/母、雄性仔、雌性仔の数は、CRF1 群が 8.7 ± 1.1 、 4.6 ± 1.0 、 4.0 ± 1.4 、PLD 群が 8.3 ± 1.4 、 4.3 ± 1.7 、 3.7 ± 1.5 であり、ほぼ同じであった。しかし、仔の平均体重(g)は、CRF1 群が雄性 1.36 ± 0.12 (n=46)、雌性 1.32 ± 0.12 (n=53)、PLD 群が雄性 $1.21 \pm 0.11^{**}$ (n=41) ($p < 0.01$)、雌性 $1.14 \pm 0.11^{**}$ (n=44) ($p < 0.01$)と、PLD 群の方が有意に低値であった。

多卵性卵胞の平均発生数±SD は、CRF1 群(n=11)が 10.09 ± 4.6 、PLD 群(n=15) $6.07 \pm 3.3^{*}$ ($p < 0.05$)と、PLD 群の方が有意に低値であった。

雄性PND 30のCRF1 群(n=7)、PLD 群(n=5)の体重(g)は 15.3 ± 1.28 、 15.5 ± 1.35 、精巣絶対重量(mg)は 79.3 ± 15.84 、 $93.6 \pm 10.21^{*}$ ($p < 0.05$)、精巣上体絶対重量(mg)は 18 ± 3.2 、 $22.6 \pm 1.14^{**}$ ($p < 0.01$)とPLD 群で雄性生殖器の重量が高値を示した。

4) C57BL/6 マウス新生時期DES 経母乳暴露による雌性生殖器への晩発影響の検討(H18)

子宮のreserve cell hyperplasiaの誘発は、DES、EE 投与群ともに認められなかった。

マウス個体当たりの多卵性卵胞の平均発生数±SD は、対照群 4 ± 1.4 (n=7)、周産期投与群 $6.8 \pm 3^{**}$ (n=14) ($p < 0.01$)と、投与群で有意に増加した。

前立腺等雄性生殖器系におけるアンドロゲン系影響のエストロゲン等複合シグナルによる修飾の研究

吉村 慎介

1) EE の抗アンドロゲン作用検出のためのHershberger 試験

EE 0、0.001、0.01、0.1、1 及び10 mg/kg の用量で実施した結果、体重増加抑制がみられ、1 及び10 mg/kg 投与群で解剖時体重が有意な低値を示した。前立腺腹葉及び陰茎亀頭の絶対重量には有意な低値が見られたが、前立腺腹葉の相対重量に有意差はなく、陰茎亀頭ではむしろ有意な高値がみられた。精囊+凝固腺では相対重量の有意な高値が1 mg/kg 投与群で見られた。EE 10 mg/kg 及び別

に追加したEE 30 mg/kg 投与群では精囊+凝固腺の相対重量に増加傾向が見られたものの、有意差はなかった。

このように、Hershberger 試験では、EE に抗アンドロゲン作用は認められず、精囊+凝固腺重量からはむしろアンドロゲン作用を疑わせる結果となった。

2) EE のアンドロゲン作用検出のためのHershberger 試験

EE 0、0.1、1、10 及び30 mg/kg の用量で実施した結果、体重増加抑制が見られ、1 mg/kg 以上の投与群で解剖時体重が有意な低値を示した。器官重量については、肛門挙筋+球海綿体筋の絶対重量が有意な低値を示したが相対重量に有意な差は見られなかった。30 mg/kg 投与群の前立腺腹葉相対重量、精囊+凝固腺の相対及び絶対重量が有意な高値を示し、10 mg/kg 投与群では精囊+凝固腺、陰茎亀頭の相対重量が有意な高値を示した。

このように、Hershberger 試験では、EE がアンドロゲン作用を示す結果となった。

3) TAM のHershberger 試験

TAM 0、1、3、10、30 及び100 mg/kg の用量で抗アンドロゲン作用を調べた結果、全ての TAM 投与群で有意な体重増加抑制が見られた。肛門挙筋+球海綿体筋、尿道球腺の絶対重量が100 mg/kg 投与群で有意な低値を示したが相対重量に有意差は見られなかった。一方、精囊+凝固腺の絶対及び相対重量に有意な高値が見られたが用量依存性はなかった。陰茎亀頭では30 及び100 mg/kg 投与群の相対重量が有意な高値を示した。

TAM の0、3 及び30 mg/kg の用量でアンドロゲン作用を調べたところ、両群に有意な体重増加抑制が見られ、陰茎亀頭の相対重量が30 mg/kg 投与群で有意な高値を示した。

このように、TAM のHershberger 試験で器官重量に有意差が見られたが、用量依存性が明らかでない、或いは体重増加の抑制に伴う変化である可能性があることから、TAM は明らかな抗アンドロゲン作用或いはアンドロゲン作用を示さないと判断された。

4) ICI のHershberger 試験

ICI の0 及び3 mg/kg の用量で抗アンドロゲン作

用を調べた結果、解剖時体重に差はなく、副生殖器重量にも差はなかった。同用量でアンドロゲン作用を調べても、前立腺腹葉の絶対重量が有意な高値を示したが、相対重量に有意差は見られなかった。

このように、前立腺腹葉が増加する傾向を示したものの、3 mg/kg の ICI は明らかな抗アンドロゲン作用あるいはアンドロゲン作用を示さないと判断された。

5) EE の抗アンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する抗エストロゲン剤の併用効果

毎日の EE の投与に先立ち、1 あるいは 3 mg/kg の TAM を強制経口投与したところ、EE 100 mg/kg 投与群で前立腺腹葉、精囊+凝固腺、肛門挙筋+球海綿体筋の絶対重量及び相対重量、陰茎亀頭の絶対重量が有意な低値を示した。しかし、この群の体重増加抑制は著しく、解剖時には投与開始時よりもむしろ低下した。

EE 100 mg/kg では用量が高いと判断し、30 mg/kg を最高投与量として、3 mg/kg の TAM を皮下投与で併用したが、TAM 併用による器官重量の低下は見られなかった。

TAM の併用投与量を 30 mg/kg と増量して強制経口投与し、併用投与しない群と比較した。その結果、併用投与しない群では精囊+凝固腺、陰茎亀頭、尿道球腺の相対重量が EE 投与により有意な高値を示したが、併用により EE による増加は抑制された。しかし、併用群に有意差は見られなかった。

このように、TAM の併用投与では 30 mg/kg の強制経口投与で、EE による副生殖器重量増加傾向を抑制できたが、抗アンドロゲン作用を示す程度にまでは至らなかった。また、TAM 投与では体重増加抑制があり、EE への影響を比較するためには障害となった。

より選択的な抗エストロゲン剤である ICI を 3 mg/kg の用量で併用投与した結果、EE 0.1 及び 1 mg/kg 投与による体重増加抑制は軽減した。また、EE 1 mg/kg 投与により精囊+凝固腺、陰茎亀頭の相対重量は有意に増加したが、ICI を併用投与した結果、これらの増加は認められなくなった。しかし、より高用量の EE の投与では、10 及び 30 mg/kg 投与群とも体重増加抑制は 3 mg/kg の ICI を併用投

与した群でも見られ、器官重量についても、抗アンドロゲン作用を示す相対重量の低下は見られなかった。

このように、TAM に比較すると 3 mg/kg の ICI ではそれ自身が体重増加に及ぼす影響は少なく、また EE による副生殖器重量の増加作用を抑制する効果が見られたが、EE が抗アンドロゲン作用を示すほどの影響は見られなかった。

6) Methyltestosterone (MT) のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する TAM の併用効果

毎日の MT の投与に先立ち、30 mg/kg の TAM を強制経口投与し、併用投与しない群と比較したが、MT による副生殖器重量の増加に対する TAM の明らかな影響はなかった。

7) NG のアンドロゲン作用検出のための Hershberger 試験に対する抗エストロゲン剤の併用効果

毎日の NG の投与に先立ち、30 mg/kg の TAM を強制経口投与したが、NG による副生殖器重量の増加に明らかな影響はなかった。

より選択的な抗エストロゲン剤である ICI を併用投与した結果、いずれの副生殖器においても NG の重量増加作用は同様の有意差を示したが、増加の程度はやや軽減した。

このように、NG が示すアンドロゲン作用は、抗エストロゲン剤の ICI により、軽度に抑制された。

【OECD 対応試験実施・調査研究】

子宮肥大及び Hershberger 試験に関する研究

小野 宏

1) 子宮肥大試験；

① 2,2'-ジヒドロベンゾフェノンのマウス子宮肥大試験を実施した結果、単独投与では子宮重量が増加し、EE との併用投与では子宮重量は低下した。オクチルフェノールのマウス子宮肥大試験を実施した結果、単独投与では子宮重量が有意に増加したが、EE との併用投与では子宮重量の変化は検出されなかった。ベンツピレンのマウス子宮肥大試験では、単独投与による子宮重量の変化は観察されなかったが、EE を併用投与した群においては、被験物質の用量に依存して EE の子宮肥大反

応が抑制された。

② CE-2 群の子宮重量は、いずれの用量においても PLD 群に比べて高値を示し、標準偏差が大きくなる傾向にあった。しかしながら、EE のエストロゲン作用及びタモキシフェンの抗エストロゲン作用の検出感度に対しては、CE-2 群と PLD 群の間で明らかな差は認められなかった。

2) Hershberger 試験；

① Hershberger 試験の OECD バリデーション作業（フェーズ3）には、各国から計9施設が参加した。アンドロゲン作用の試験系では、肛門挙筋・球海綿体筋が最も感度の高い傾向にあり、前立腺、精囊、亀頭及び尿道球腺の感度は、ほぼ同程度であった。一方、抗アンドロゲン作用の試験系では、精囊が最も感度が高く、前立腺及び肛門挙筋・球海綿体筋がそれに次ぎ、亀頭及び尿道球腺の感度は低い傾向にあった。

② フルタミドの皮下投与による Hershberger 試験では、いずれの器官ともフルタミドの用量に依存して低下し、フルタミドの皮下投与での抗アンドロゲン作用が確認された。各器官におけるフルタミドのアンタゴニストとしての最小有効量は、前立腺、精囊並びに肛門挙筋・球海綿体筋では 1 mg/kg、亀頭及び尿道球腺では 3 mg/kg であった。

③ ICR マウスを用いた Hershberger 試験では、アンドロゲン作用の試験系において全ての器官が TP に反応したが、前立腺の反応がやや弱かった。一方、抗アンドロゲン作用の試験系においてフルタミドに反応した器官は、精囊と陰茎亀頭のみであった。C57BL/6J マウスを用いた Hershberger 試験では、アンドロゲン作用の試験系において全ての器官が TP に反応したが、前立腺の反応は他の器官に比べると弱かった。一方、抗アンドロゲン作用の試験系においても全ての器官がフルタミドに反応し、その中では尿道球腺が最も鋭敏に反応した。

OECD/WHO 関連等研究ハーモナイゼーション 総括

井上 達

EDCs 問題は、1) 化学物質がヒトを含む哺乳綱動物の内分泌系に影響を与える可能性への疑問（メカニズム）、2) 動物実験で影響の見られない低用量での影響への疑問（低用量特異性）、3) 実

環境中での暴露実態への疑問（暴露評価）が当初から投げかけられていた疑問であった。グローバル・アセスメントの編纂過程で 1500 件を超える報告を検討する中で明らかになったことは、世界の事例の中では、これらのいずれかの条件が崩れた時に、ヒトを含む様々な生物に内分泌かく乱現象が現実に行っているという事実であった。他方、野生生物における暴露状況とヒトにおける暴露経路は異なりヒトにおける内分泌かく乱化学の蓋然性は限定的であることも明らかになってきた。

ウェイブリッジ会議以降 10 年を迎えた本研究の最終段階にあたり必要なことからはフィンランドにおける欧州委員会の「ワークショップや NIEHS における BPA に関するワークショップで明らかになった認識の到達点に即してヒト影響メカニズム研究、適切な試験法の開発、などの諸点から OECD や WHO における連携のもとで引続き国際協力を進めてゆくことである。

反復投与毒性試験系（TG107 を含む）への適用 に関する調査研究

広瀬 明彦・山崎 寛治

OECD でレベル3として検討されている改良 TG407 の適用について検討した。現在まで OECD ガイドライン化を目的とした試験については Phase 1、2 が実施され、終了している。最終段階である Phase 2 の結果が 2006 年の第 5 回 Validation Management Group of Mammalian Testing (VMG-mammalian) で公表された。

内分泌かく乱作用を検出できる有効なエンドポイントとして、以下の項目が改良 TG 407 のガイドラインに取り入れられることとなった。

- 1) 雄生殖器（精巣、精巣上体、前立腺腹葉、背腹葉、精囊腺（凝固線を含む））の臓器重量絶対重量及び相対重量
- 2) 雌生殖器（卵巣、子宮）の絶対重量及び相対重量
- 3) 下垂体の病理組織学検査
- 4) 甲状腺の重量及び病理組織学検査（重量測定は採取時のアーティファクトによる影響が大きいので付加的な推奨）
- 5) 雌雄生殖器の病理組織学検査（子宮頸部、膈、性周期における評価）
- 6) 雌雄の乳腺組織の病理組織学検査
- 7) もし被験物質が甲状腺毒性をもつ、あるいは

病理組織所見において甲状腺への影響が観察された場合は、解剖時血液を採取し、T4 濃度及び TSH 活性の検査を実施することが適切であろう。

各群の動物数を片性5匹から10匹に増やすかどうかは、さらなる検討が必要となる。特に感受性や検出力の強化は、試験全体の優先度といった背景の中で評価されなければならない。評価する化学物質の生産量の違いやヒトへの暴露レベルの違いも考慮されるべきである。最終的な決断には、技術の向上や上述したような雌生殖器官の性周期によるステージ分けといった可能性や訓練、技術の改良によって、現在のエンドポイントの検出力をあげるための代替法もまた考慮されるであろう。

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

永井 賢司

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。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 の判断基準及び試験の成立条件について検討を加えてきた。最終年度は、2007年1月に開催された OECD 6th Meeting of the Validation Management Group (VMG-mammalian) 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。

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

山崎 寛治

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 を国内で実施し、その結果を論文化した。また、OECD の VMG において日本の結果を含む Validation phase 3 の結果が公表された。その結果、Validation の最終段階であるブラインド物質で実施した Hershberger 試験

においても、試験機関間の相関性、さらに物質自体の検出も良好であった。現在、Phase 1 から Phase 3 までの結果をもとにピアレビューが実施中であり、次回の VMG 会議で公表される予定である。また、2006年に Phase 1 の結果が論文として出され、Phase 2 の結果が2007年に論文化予定である。以上のことから、本試験のガイドライン化についての試験は終了し、本試験が androgen、anti-androgen 作用を検出するスクリーニング法として有用であり、今後はガイドライン化に向け進むものと思われる。

D. 考察

本研究は、【内分泌かく乱性確定試験開発研究、一生涯試験等】では、実用的な「確定試験」を構築することを目指した研究を推し進めてきた。「試験スキーム」のスクリーニングに於いて生成された化学物質優先順位リストの上位化合物について実施される「確定試験」には、従来型の多世代試験が必ずしも最適でないことが内外の研究により示されてきた。このため、本研究では、既存の多世代試験法の改良のみに止まらず、一個体の受精、発生、発達、成熟、及び老化に亘る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指した（これは、経済協力開発機構 (OECD) の Conceptual Frame Work Level 5 に対応）。

神経・行動試験系については、神経障害性に関して必ずしも明確な器質的障害は誘導されないことが想定されたため、本研究班では、高次行動異常を当面の焦点として、胎生期・新生児期暴露が認知機能、場面適応性や報酬効果に及ぼす影響を検査する行動試験の導入を進めた。免疫系に関しては、有害性指標として自己免疫疾患モデル（人に於いて性差が著しいことで知られるシェーグレン病のモデル）の改良、あるいはIV型免疫応答のモデルである Local Lymph Node Assay の改良形を用いて、化学物質による自己免疫及び獲得免疫機能の修飾を解析した。内分泌系に関しては、生殖機能に関わる従来の指標に加えて、早発閉経等の成熟後の機能異常を中心に解析を行った。

本研究により遅発性の性周期異常等の低用量域における誘導が示されたことから一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於ける内分泌かく乱作用を考慮する必要が示されたと同時に、

この方向性に沿って引き続き網羅的な確認を加えつつ研究を進めることで、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な確定試験を確立することが出来る見通しが立ったと考える。

これを支える支援基盤研究としては、エストロゲン発がんの標的としての乳腺上皮を対象とした発がん性検討に関わる研究、問題となる化合物が標的とし得る核内受容体 AR、ER α/β 、GR、MR、RAR $\alpha/\beta/\gamma$ 、PR、PXR、RXR、TR α/β 、及び VDR 系との相互作用に対する迅速な判断材料を提供する研究、及び胎生初期影響のメカニズム情報提供支援体制としての胚性幹細胞 (ES 細胞) の *in vitro* での多分化能に対する影響解析研究、高精度遺伝子発現解析技術による生殖器の発達影響の複雑な作用点を明確にする研究、神経行動学的結果の分子生物学的裏付けを進めた。これらにより確定試験の評価の精度と客観性の向上が図られた。

【内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究】 (これは、OECD の Conceptual Frame Work Level 3~4 に対応する試験開発から成る) では、*in vivo* スクリーニング試験を着実に推し進め、より精度の高い化学物質優先順位リストの作成に貢献した。

【OECD 対応試験実施・調査研究】では、国際的協調の継続として、OECD に代表される国際的な場において、内分泌かく乱性の試験評価に関する上で最終的に残されている問題点の解決を図り包括的なガイドラインの開発に貢献した

E. 結論

本研究において、包括的対応体系の確立、胎児期、新生児期の周産期暴露が、成熟後に不可逆的に影響することや、従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識しつつ、その改良を含む確定試験法の開発の方向性を種々の新しい毒性指標とともに明らかにした。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

1) 論文発表

Shirota, M., Saito, Y., Imai, K., Horiuchi, S., Yoshimura, S., Sato, M., Nagao, T., Ono, H., Katoh,

M.: Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. *Journal of Toxicological Sciences*, (2005) 30, pp.175-194.

Ono, H., Saito, Y., Imai, K., Kato, M. : Subcellular distribution of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rat testis. *Journal of Toxicological Sciences*, (2004) 29: 113-124

Watanabe, C., Kuwagata, M., Yoshimura, S., Azegami, J., Kojima, K., Ono, H., Nagao, T. : An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Congenital Anomalies*, (2003) 43: 177-179

2) 学会発表

太田 亮、宮原 敬、又吉 健、大向英夫、小野 宏：新生児期の低用量 DES 暴露が及ぼす加齢雌ラットの生殖系への長期的影響、日本内分泌攪乱化学物質学会第 9 回研究発表会。2006 年 11 月 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1 特許取得

1.Non-RILLNA 法の感度上昇法

発明者：武吉 正博

出願日：2004年8月6日

出願番号：特願2004-230151

出願人：財団法人化学物質評価研究機構

公開番号：特許公開2006-42702

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

II. 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、菅野 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	シュプリンガーフェアラーク社	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.	PTOV1: a novel testosterone-induced atherogenic gene in human aorta.	J Pathol.	209	522-531	2006
Hiroko Shiina, Takahiro Matsumoto, Takashi Sato, Katsuhide Igarashi,	Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice	PNAS	103	224-229	2006

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 armacol.			in press
M. Narita, K. Miyagawa, K. Mizuo, T. Yoshida, T. Suzuki	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. Neuroendocrin ol.	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, T. Suzuki	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, T. Suzuki	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, Muneyuki Miyagawa, 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, Muneyuki Miyagawa, 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, Muneyuki Miyagawa, 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 ₁ rat offspring	Industrial Hhealth	43	685-690	2005
Katsumi Ohtani, Shigeru Yamazaki, Hisayo Kubota, Muneyuki Miyagawa 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 K. Imai	Toxicologic / Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents	J. Toxicol. Pathol	17	69-84	2004
Ishimaru N, Kishimoto, Hayashi Y, Sprent J.	Regulation of naive T cell function by the NF-kB2 pathway.	Nature Immunol.	7	763-772	2006
Ishimaru N, Arakaki R, Omotehara F, Yamada K, Mishima K, Saito I, Hayashi Y	Novel role for RbAp48 in tissue- specific estrogen deficiency-dependent apoptosis in the exocrine glands.	Mol. Cell. Biol.	26	2924-2935	2006
Kurobe H, Cunlan Liu C, Ueno T, Saito F, Ohigashi I, Seach N, arakaki R, Hayashi Y, Kitagwa 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, Hayashi Y, 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	caspases-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 Hayasi</u>	Analysis of in vivo role of α -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	Nature Genet	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	J. Immunol	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 α -fodrin in Sjogren's syndrome	<i>Am. J. Pathol</i>	165	53-61	2004