

厚生労働科学研究費補助金研究報告書
厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・
新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究

H16-化学-003
2006（平成18年度）

総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞
国立医薬品食品衛生研究所

平成19年（2007）3月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

研究課題名（課題番号）＝ 内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）
の胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する総合研究（H16-化学-003）

平成 18 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 19 (2007) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告書			
内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露による			
リスク予測に関する総合研究（H16-化学-003）			
	江馬 眞	-----	1
II. 分担研究報告書			
1. 奇形の受容体シグナルを介した発生メカニズムの解析	江馬 眞/高木 篤也	-----	15
2. ダイオキシン胎生期・授乳期暴露のアカゲザル児の生後発育に及ぼす影響	隅田 寛	-----	21
3. 胚幹細胞（ES細胞）に対する受容体シグナルを介する化学物質の胎児毒性			
モデルとしての有用性の検討	高木 篤也	-----	27
4. 受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機能解析	菅野 純	-----	31
5. 細胞アレイを指標とした内分泌かく乱化学物質の影響	矢守 隆夫	-----	37
6. ヒト型モデル動物によるAhRの分子基盤解析とAhRの生理的プロセスへの関与	藤井 義明	-----	41
7. ヒト型モデル試験系による内分泌かく乱化学物質の影響解析	鎌滝 哲也	-----	45
8. 齧歯類前立腺を用いた内分泌かく乱化学物質の新生仔暴露の作用	藤本 成明	-----	49
9. 甲状腺ホルモンかく乱物質の作用機構の解明：ラットからヒトへ	加藤 善久	-----	53
10. 受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーション	井上 達	-----	59
11. 受容体シグナルを介する毒性物質の有害性評価法及び一般化スクリーニング			
試験スキームの国際動向に関する研究	広瀬 明彦	-----	63
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	-----	75
IV. 研究成果の刊行物・別冊	-----	-----	79

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

I. 総括研究報告書

内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露による
リスク予測に関する総合研究

主任研究者 江馬 眞 国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

内分泌かく乱化学物質（EDCs）（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露影響を明らかにし、その作用機序の解析を推進することによりリスクアセスメントの確度の向上に資することを目的として、本研究班を4部構成（【奇形発生】、【発がん】、【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数（TEF）及び耐容一日摂取量（ADI）の妥当性の検討】及び【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】）として研究を推進した。その結果、マウスによる胎児影響解析の技術基盤の確立、AhRの生体に於ける機能に関する新たな知見の取得、TCDD口蓋裂部位に於ける既知の標的遺伝子（CYP1A1、Ahrr等）の発現増加の確認、及び、口蓋裂関与遺伝子群の抽出、アカゲザル児でのTCDD胎内暴露影響による臼歯と精巣の異常の確認、マウスES細胞分化過程でのAhR発現パターン情報の取得、TCDD投与マウス肝に於ける発がん関連遺伝子群の抽出、ヒト培養細胞パネルでのEDCsのクラスター形成確認、AhRの盲腸癌、炎症に於ける働き等を明らかにした。また、多環芳香族炭化水素（PAH）によるLXR α 標的遺伝子発現抑制にp53によるRXR発現抑制の関与、前立腺に於けるテストステロン応答遺伝子へのTCDDの影響、PCB投与による血中T₄減少の機序としての血中から肝臓への移行を明らかにした。さらに、リスクの質と先進科学の普及に関する考察を行うと共にTCDD類のTEFの再評価、非ダイオキシン様PCBの健康影響評価等に関する最新情報を収集した。

分担研究者

江馬眞（国立医薬品食品衛生研究所）
隅田寛（広島国際大学保健医療部）
高木篤也（国立医薬品食品衛生研究所）

菅野純（国立医薬品食品衛生研究所）
矢守隆夫（癌研究会癌化学療法センター）
藤井義明
（筑波大学先端学際領域研究センター）

鎌滝哲也（高崎健康福祉大学薬学部）

藤本成明

（広島大学原爆放射線医科学研究所）

加藤善久（徳島文理大学香川薬学部）

井上達（国立医薬品食品衛生研究所）

広瀬明彦（国立医薬品食品衛生研究所）

A. 研究目的

本研究の目的は、内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）の胎児・新生児暴露影響を明らかにすると共に、毒性影響の作用機序に関する基礎的解析を推進することにより、ヒトへのリスクアセスメント向上に資することにある。具体的には、核内受容体を介したマウス口蓋裂発生に関与する様々な標的分子種の同定並びにシグナル伝達への影響を明らかにすることにより、その分子毒性学的作用機序を明らかにし、もって受容体原性物質のリスクアセスメントの信頼性を高める（江馬、高木）。霊長類を対象とする研究として、胎生期・授乳期を通じて TCDD に暴露されたアカゲザル児の乳歯期からほぼ成獣期に至るまでの児の発育に与える影響を調べ、耐容一日摂取量の妥当性を検討する（隅田）。胎生期暴露影響の基礎研究として ES 細胞分化に対する TCDD 等の影響について遺伝子発現、シグナル伝達への影響を明らかにする（高木）。受容体原性シグナルを介したエピジェネティック発がんの分子機構解析を行う。すなわち、p53 ヘテロ欠失マウスを用いたこれまでの研究で示唆されたダイオキシンによる発がんの非単調用量反応性（逆 U 字型反応）の機序解明のため、短期発がんモデルである Tg.AC マウスを用いて

再現性を確認すると同時に、その発がん用量相関性の分子機構を解析する（菅野）。新規化学物質の細胞増殖阻害メカニズムを予測するシステム「Cancer Cell Informatics」を用い、細胞増殖への影響を切り口として、内分泌かく乱分子機構のフィンガープリントを解析し、生体作用様式の推測を行う（矢守）。外来異物に対する生体反応における AhR の役割を明らかにする。また、AhR 遺伝子ノックアウトマウスを用いて、AhR の生体機能を明らかにする（藤井）。AhR-CYP シグナル伝達経路を介した酸化ストレスが芳香族炭化水素（AH）による内分泌かく乱作用に関与している可能性がある。そこで、ヒト型モデル試験系を用いて AH による内分泌かく乱作用における CYP 誘導及びその機能の役割を明らかにし、リスクアセスメントに役立てる（鎌滝）。新生仔期の齧歯類前立腺でアンドロゲン応答遺伝子を検索し、それへのダイオキシンの作用を定量的に検証し、そのアンドロゲン阻害作用を指標としたリスク予測を行う（藤本）。いくつかの動物種を用いて、PCB による血清中 T_4 濃度の低下作用機序を解明し、さらに、その機序がヒトにおいて適用できるか否かを検討する（加藤）。海外における最新の内分泌かく乱化学物質（ダイオキシン類を含む）のヒトへの健康影響評価、特に胎児・新生児暴露によるリスク予測に関する研究の国際的な進展状況に関する情報を収集し、本基盤研究の実験部分や事実上情報が不足している低用量効果の毒性評価のための背景的な支援を行う（井上）。受容体シグナルを介するスクリーニング試験法の確立に関する

国際動向を調査・整理する。また、年次毎の国内外の、ダイオキシンを含む受容体を介した毒性研究の成果の一般への発信法について、必要な課題を整理し、個々の課題に対し年次毎に提言を作成する（広瀬）。

B. 研究方法

核内受容体を介した内分泌かく乱物質の口蓋裂誘導の分子機構を明らかにするため、12.5日齢のC57BL/6妊娠マウスに2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を20 μ g/kgの用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5日齢の胎児を摘出し、口蓋部位を小型のハサミで採取、RNAをRNAeasy（キアゲン社）で抽出、蛍光ラベル後、40000以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社のGeneChip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用い、定量的マイクロアレイ解析手法であるPercellome法を用いて遺伝子発現解析を行った（江馬、高木）。

妊娠20日のアカゲザルに2,3,7,8-TCDDを30または300ng/kg皮下投与し、その後30日毎に初回投与量の5%量を維持量として投与した。妊娠動物は自然分娩させ、児を哺育させた。母体へのTCDD投与は分娩後90日まで続けた。児は母体に哺育させ、約1年後に離乳した。生後約200日から5歳まで、軽麻酔下で児の歯を口腔内デジタルカメラ及びX線により観察した。また、初産児（F1a）の離乳後、期間をおいて母体を再度交配、妊娠させ、F1a実験で、妊娠20日にTCDD20ng/kg（低暴露量群）または200ng/kg（高暴露量群）を皮下投与した。その後はF

1a実験と同様にTCDDを投与して第二産児（F1b）を得た。F1bを生後約850日で剖検し、精巣と精巣上体の組織所見を中心にTCDDの影響を検討した。また、児から抽出したRNAを材料に、AhRの塩基配列の相同性を検討し、ヒトとの感受性の差について検討した。（隅田、安田）。

TCDDのES細胞及びその浮遊培養により形成される胚様体(EB)の分化への影響を遺伝子レベルで解析するため、ダイオキシンの受容体であるAryl-hydrocarbon receptor (AhR)、Arntを含むES細胞及びEBの分化過程で変動する各種遺伝子の正常な発現パターンについてマイクロアレイを用いて、経時的に解析を行った。実験は、フィーダー細胞上で培養したマウスES細胞(TT2)をLIFを除いたES培地で7日間浮遊培養した。その間に形成されるEBの培養開始1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、及び7日後に、0.5日間隔でEBを採取し、アフィメトリクス社のGene Chip Mouse Genome 430 2.0 Arrayを用いて遺伝子発現解析を行った。また、その解析には定量的比較を正確に行うために、我々の開発したPercellome手法（細胞1個当たりのmRNA絶対量を得る遺伝子発現解析手法）を用いた（高木）。

発がんプロモーター作用高感受性動物としてTg.ACマウス（癌遺伝子のv-Ha-ras導入トランスジェニックマウス）をC57BL/6マウスに10世代戻し交配した雌雄マウス（一群15匹）に、2,3,7,8-TCDDを0.1、1、10ng/kg体重の用量で週2回3ヶ月間経口投与した。対照群にはコーン油を投与し、生じてくる腫瘍の種類並び

に発生頻度を解析した。TCDD 投与マウス肝臓の遺伝子発現の解析では雄 C57BL/6 マウスに TCDD を 1-30 μ g/kg の用量で単回経口投与し、2, 4, 8, 及び 24 時間後の肝臓のマイクロアレイデータを解析に供した (菅野)。

ダイオキシン類を含む種々の内分泌かく乱化学物質、核内受容体アゴニストについてヒト培養細胞パネルに対する増殖阻害活性の強弱を調べることにより、その毒性 (増殖阻害) 評価を行った。また、ヒト癌細胞に対する化学物質暴露の影響を、遺伝子発現プロファイルの変化として解析した (矢守)。

AhR 欠失マウス及び野性型マウスを用いて、マクロファージあるいは、腸組織について遺伝子発現変化、形態学的変化などを、DNA マイクロアレイ、RT-PCR、抗体染色法や分子生物学的手法を用いて解析した (藤井)。

PAHs が LXR 標的遺伝子 (ABCA1 及び SREBP1c) mRNA 発現に及ぼす影響をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討した。TK プロモータに LXR 応答配列を連結させたレポータープラスミドを HepG2 細胞及び Hep3B 細胞に導入し、MC の LXR 転写活性に及ぼす影響を検討した。RXR タンパク質の発現量は HepG2 細胞から調製した核抽出液を用い、ウエスタンブロット法により定量した (鎌滝)。

マウス前立腺に対する内分泌かく乱物質暴露の作用を検討するため、生後 6 日目の C57BL 雄マウスにテストステロンプロピオネイト (T) 4 mg/kg bw、3MC 0.2, 1 mg/kg bw 及び 2, 3, 7, 8- TCDD 101000 ng/kg bw を i. p. 投与した。前立腺組織

については、腹葉 (VP)、背側葉 (DLP)、前葉 (AP) を解剖学的に区別して保存した。in vitro プロモーター解析として同定された新生仔期アンドロゲン応答遺伝子である PSP94, probasin, SPI-KT3, EAPA2, SPI-KT3, Defensin b1 についてその遺伝子上流域を含む luc レポーターを作製した。これらを、CHO、HepG2、DT3 細胞株にトランジェントに導入して、デハイドロテストステロン (DHT)、3MC 及びエストラジオール (E2) を添加し、それらのアンドロゲン応答性に対する修飾作用を解析した (藤本)。

昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソームについて、T₄-UDP-GT 活性及び UGT 分子種の発現量を解析した。TTR 遺伝子欠損マウスに Kanechlor-500 (KC500、100 mg/kg) あるいは 2, 2', 4, 5, 5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB、112 mg/kg) を投与し、4 日後に、血清中甲状腺ホルモン濃度、肝ミクロソームにおける UGT 分子種の発現量及び血中 PCB 水酸化体濃度を測定した。また、TTR 遺伝子欠損マウスに KC500 あるいは PentaCB を投与し、最終投与後 4 日に [¹²⁵I]T₄ を静脈内投与し、[¹²⁵I]T₄ の血清クリアランス、血清タンパクとの結合率及び組織分布量を測定した (加藤)。

内分泌かく乱化学物質 (ダイオキシン類を含む) の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、化学物質危害情報に対する適切な一般社会の対応、すなわち適切な危機管理と同時に適切な安心感を醸成す

る方途を提供するため、AhRをめぐる最近の知見に即して、ダイオキシン研究関連の事象について考察した（井上）。

2006年8月にオスロで行われた第26回ハロゲン化有機環境汚染物質とPOPSに関する国際シンポジウム「DIOXIN'2006」に参加し、ダイオキシン及びダイオキシン様PCBのヒト及び哺乳動物におけるTEFのWHO 2005再評価ならびに欧州におけるPCDD/F、PCB、PBDE and HBCDDの現在の曝露量に対するリスク評価の試み等の最新の内分泌かく乱物質の健康影響に関する国際動向について情報収集した（広瀬）。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法を用いるといった、国立医薬品食品衛生研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。また、ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している

（江馬、高木、菅野）。動物を扱う委託実験においては、「イナリサーチ動物実験指針」に従って行い、ダイオキシン類の実験は専用特殊実験施設内で、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している（菅野）。動物は新日本科学(SNBL)のサル実験施設の「動物実験ガイドライン」に従い愛護的に扱い、また実験者がTCDDからの悪影響を受けないように配慮した（隅田）。動物を扱う実験においては、筑波大学「動物実験

規則」に従って行った（藤井）。動物を扱う実験においては、広島大学「動物取り扱い倫理規定」に従って行った（藤本）。動物を扱う実験においては、静岡大学の「動物実験ガイドライン」に従って行った。また、実験者及び飼育者はPCBによる汚染を受けないように十分に保護対策を施し、またPCB曝露動物、廃液等は保管し、曝露・漏洩を防止する対策についても万全を期して実施した（加藤）。

C. D. 研究結果と考察

【奇形発生】

核内受容体を介した内分泌かく乱化学物質の口蓋裂誘導の分子機構を明らかにするため、C57BL/6妊娠マウスにTCDDを20 µg/kgの用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5日齢の胎児口蓋部位を対象にマイクロアレイ解析を行った。変化した遺伝子中で、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等のTCDDによりAhRを介して誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加し、胎児口蓋がTCDDの直接的な標的部位であることが、遺伝子レベルで確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認された。その中には、CDKインヒビターや血管形成阻害因子の増加も確認され、口蓋裂形成との関連が強く示唆された。また、ケラチン遺伝子が増加し、分化の亢進が生じていることも示唆された（江馬、高木）。

TCDD投与アカゲザルF1b屠殺例の精巢上体を形態的に調べた結果、20 ng/kg投与群に変化が認められた。陰茎長 (mm)

は、対照群と 300 ng/kg 群ではほぼ同じ数値であったが、30 ng/kg 群では対照群に比較して有意に大きい数値であった。精巣の大きさ (mm) は、各群に有意差は認めなかったが、対照群と 300 ng/kg 群がほぼ同じ値であったのに対して、30 ng/kg 群では数値が高い傾向にあった。精子数は TCDD 用量依存的に低下していた。アカゲザル AhR の塩基配列を決定するために、血液サンプルから RNA を調整して、cDNA を作成した。データベース上の塩基配列の比較の結果、アカゲザルの TCDD に対する感受性はヒトよりも高いと予想された (隅田、安田)。

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、多くの遺伝子発現に変動が見られた。ダイオキシンの受容体として知られている AhR を始め、関連する遺伝子として、AhRR、Arnt、Arnt2、ER (エストロゲン受容体) α 、 β 、Cyp1a1、Cyp1b1 遺伝子の発現パターンについて解析した。その結果、ES 細胞において AhR 遺伝子の発現が認められ、分化開始によりその発現は増加し、分化開始後、2 日目に発現はピークとなり、その後減少するパターンを示すことが明らかとなった。また、AhR とヘテロダイマーを構成し、ダイオキシンの毒性発現に関与することが知られている Arnt 遺伝子は AhR 遺伝子と同様に ES 細胞に発現し、分化開始後、1-2 日でピークに達した後、減少するという AhR 遺伝子によく似た発現パターンを示すことが明らかとなった。その他の AhRR、Arnt2、ER- α 、 β 、Cyp1a1、Cyp1b1 の AhR 関連遺伝子においても、AhR に似た

発現パターンが見られた。また、TCDD により肝臓、胎児口蓋で誘導されることが知られている遺伝子の発現パターンを解析したところ、Cyp1a1 と同様に Cbr3 (carbonyl reductase 3) と Pmm1 (phosphomannomutase1) が分化初期に増加することが明らかとなった (高木)。

【発がん】

Tg.AC マウスを C57BL/6 マウスに 10 世代戻し交配した雌雄マウス (一群 15 匹) に、2, 3, 7, 8-TCDD を 0.1、1、10ng/kg 体重の用量で週 2 回 3 ヶ月間経口投与した。対照群にはコーン油を投与し、生じてくる腫瘍の種類並びに発生頻度を解析した。TCDD 投与マウス肝臓の遺伝子発現の解析では雄 C57BL/6 マウスに TCDD を 1-30 μ g/kg の用量で単回経口投与し、2, 4, 8, 及び 24 時間後の肝臓のマイクロアレイデータを解析に供した。投与終了時まで死亡は見られなかった。体重及び摂餌量、臓器重量には差は認められなかった。外見として口唇周囲の乳頭腫がいずれの群とも散発性に認められたが、TCDD による影響は見られなかった。剖検による肉眼所見では、前胃の乳頭腫が対照群を含む各群でほとんどのマウスで見られたが、TCDD 投与による影響は明らかでなかった。一方、胸腺の肥大あるいは腫瘍が対照群を除く各投与群で低頻度ながら見られたが、雄では TCDD による増加は見られず、また雌では減少傾向が見られるなど TCDD による胸腺腫の増加は確認出来なかった。TCDD 投与マウス肝臓遺伝子発現のデータベースの癌関連遺伝子発現解析の結果、癌抑制作用が示唆されている Htatip2 (TIP30) 遺伝子が TCDD 及び、TCDF、メチ

ルコランスレン(MC)により顕著に増加することが新たに確認された。また、この遺伝子の *in silico* プロモーター解析の結果では、AhR 応答配列が認められた(菅野)。

【障害性発現メカニズム解析と毒性等価換算係数(TEF)及び耐容一日摂取量(ADI)の妥当性の検討】

ダイオキシン類を含む種々の内分泌かく乱化学物質、核内受容体アゴニストを「Cancer Cell Informatics」により、検討を行った。得られたフィンガープリントを解析した結果、レチノイン酸アゴニストの 9-*cis*, all-*trans* retinoic acid と TTNPB が一つのクラスターを形成した。エストロゲンアゴニスト estradiol と dieldrin がクラスターを形成し、このクラスターはエストロゲンアンタゴニストの tamoxifen、toremifene が形成するクラスターとは異なっていた。PPAR アゴニストである Bis (2-ethylhexy) phthalate と troglitazone はさらにまた別のクラスターを形成した。スズ化合物も興味あるクラスターを示した。ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることによりヒトがん細胞パネルは内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測に使えることが示唆された(矢守)。

AhR 欠失マウスの大腸癌の発症について検討した結果、生後 8 週で大腸癌、特に回盲部に癌の発生が認められ、生後 11 週で 100%に癌の発生が認められることが明らかになった。癌は殆どすべて回盲部に発生し、成長は比較的緩徐に 30~40 週でプラトーに達した。病変は腺腫が腺癌に

移行すると考えられ、さらに筋肉層への浸潤が認められた。Kaplan-Meyer 曲線でも明らかに AhR 欠失マウスは AhR ヘテロ欠失マウスや野性型マウスに比較して短命になっていることが判明した。組織標本を β -カテニン抗体で免疫染色すると、AhR 欠失マウスでは β -カテニンのタンパク質レベルでの発現が顕著に高くなっていた。さらに β -カテニンの mRNA の発現は野性型マウスと比較して殆ど変わらないことから、 β -カテニンのタンパク質の蓄積はタンパク質の安定化によることが示唆された。一方、東大分生研の加藤、大竹らとの共同研究によって、AhR がリガンド依存的に ER α , ER β と AR のユビキチン化とプロテアソームによる分解に関与していることを今年度明らかにした。これはダイオキシンやメチルコラントレンによる内分泌かく乱作用を説明する重要なメカニズムであるが、AhR 欠失マウスにおける β -カテニンの蓄積は、 β -カテニンの分解にも AhR が働いている可能性があることを示していると考えられた。その可能性を APC が変異を起こしている DLD-1 や SW480 細胞で調べると β -カテニンは AhR のリガンドである 3MC に依存してユビキチン化され、分解されることが示された。この分解が AhR の siRNA によって阻止されることから、AhR は β -カテニンの分解にも関与していることが確認された。AhR にはリガンド依存的に Arnt の他に Cul4B, DDB1, TBL3, Rbx1 などが結合してユビキチン化複合体を形成することが ER α , ER β などのユビキチン化では示されるが、 β -カテニンのユビキチン化も Cul4B の siRNA によって阻害されることから同じ複合体

が、 β -カテニンのユビキチン化にも関与していることが示唆された。AhR 欠失マウスは、DSS による大腸炎や LPS による敗血症ショックに対し、高感受性になっていることが発見され、AhR が抗炎症的に働くことが明らかになった。LPS を投与したマウスでは、TNF- α の血中濃度が野性型マウスに対し、AhR 欠失マウスでは、投与後 2 時間で顕著に上昇し、続いて向炎症性サイトカインである IL-6 や IFN- γ の血中濃度も急速に増加することが分った。さらに常在性の腹腔マクロファージでも AhR 欠失細胞では、LPS 刺激に対して向炎症性サイトカインの合成に関して過敏になっていることが明らかになった (藤井)。

PAHs の一つである MC で HepG2 細胞を処置した場合、ABCA1 及び SREBP1c mRNA 発現量は濃度依存的に抑制された。LXR α を介して誘導された転写活性は MC によって抑制された。AhR 及び CYP1A1 に対する siRNA を発現させた HepG2 細胞を用いた場合 MC によって LXR α を介した転写活性は抑制されなかった。p53 変異株である Hep3B 細胞では MC は LXR α を介した転写活性を抑制しなかった。MC による RXR α タンパク質の発現量の抑制はプロテアソーム阻害剤である MG132 共処置によって解除された。以上のことから LXR α シグナル伝達経路は PAHs によって活性化された p53 を介して RXR α (タンパク質のプロテアソームによる分解が促進されることで抑制される可能性が示唆された (鎌滝)。

新生仔期 TCDD 投与の影響を 6 週齢前立腺で検討した結果、PSP94、defensin β 、PCP4 の発現は、TCDD 投与量に依存して有

意に発現上昇していた。特に defensin β は、TCDD10 μ g/kg 群でも有意な発現上昇が見られた。PSP94 の転写開始点上流-562bp を含む luc レポーターを作製し、アンドロゲン受容体 (AR) とともに細胞株へ導入したところ、この領域がアンドロゲン応答性転写活性化を示した。そこで、このアンドロゲン応答に対する 3MC の作用を Ahr/Arnt (+) である HepG2 細胞により検討した結果、3MC 10^{-8} M \sim 10^{-6} M は、アンドロゲン応答性を増強することが示された。一方で、コンセンサスのアンドロゲン応答配列を有する (ARE)₂-luc による応答は、3MC により濃度依存性に抑制された。エストロゲン受容体 (ER) のアンドロゲン応答性転写に与える影響を検討するため、CHO 細胞株を用いて ER α \cdot β をコトランスフェクションした。PSP94 プロモーター活性は、ER α の存在下で 2-7 倍になった。一方で、ER β による転写活性化促進は弱いことが示された。mEAPA2 の転写開始点上流-1200bp を含む luc レポーターを作製した。このレポーターは単独では、アンドロゲン応答性を示さなかったが、ER α 存在下では、応答性を発揮した。ER β のコトランスフェクションではアンドロゲン応答を示さなかった。TCDD の新生仔期暴露実験により PSP94、defensin β 、PCP4 発現の異常亢進がみられた。これらの 3 つの前立腺タンパク質は、全てヒトホモログがありヒト前立腺での発現も知られていることから、ヒトリスク推定の指標として有用性であると考えられた (藤本)。

昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、ヒト肝ミクロソーム及びヒト小腸ミクロソーム

ムについて、 T_4 -UDP-GT 活性及び UGT 分子種の発現量を解析した。その結果、昆虫細胞発現系ヒト UGT 分子種、UGT1A1、UGT1A3、UGT1A8 の T_4 -UDP-GT 活性は、高値を示した。ヒト肝ミクロソームの T_4 -UDP-GT 活性における個人間変動の大きさは、UGT1A1、UGT1A3 の発現量と相関していた。また、ヒト肝ミクロソームの T_4 -UDP-GT 活性は、ST232 (UGT1A3 の特異的基質) 及び bilirubin (UGT1A1 の特異的基質) により阻害された。また、ヒト腸ミクロソームにおいて T_4 -UDP-GT 活性が認められ、ヒト腸 UGT1A の発現量はヒト肝よりも高かった。また、TTR 遺伝子欠損マウスに Kanechlor-500 (KC500、100 mg/kg) あるいは 2,2',4,5,5'-pentachlorobiphenyl (PentaCB、112 mg/kg) を投与し、4 日後に、血清中甲状腺ホルモン濃度、肝ミクロソームにおける UGT 分子種の発現量及び血中 PCB 水酸化体濃度を測定した。また、TTR 遺伝子欠損マウスに KC500 あるいは PentaCB を投与し、最終投与後 4 日に $[^{125}I]T_4$ を静脈内投与し、 $[^{125}I]T_4$ の血清クリアランス、血清タンパクとの結合率及び組織分布量を測定した。C57BL/6 系 (野生型) マウスに KC500 (100mg/kg) 及び PentaCB (112mg/kg) を投与した時、血清中総 T_4 濃度はいずれも著しく低下した。一方、TTR 遺伝子欠損マウスでは、KC500 を投与した時にのみわずかに低下した。この時、両マウスにおいて肝臓の Ugt1a1 の発現量は、両 PCB により同程度に増加した。両 PCB 投与による TTR 遺伝子欠損マウスの血中 PCB 水酸化体濃度は、野生型マウスの場合と比較して著しく低下した。また、KC500 及び PentaCB を処置した

両マウスに $[^{125}I]T_4$ を静脈内投与した時、血中から $[^{125}I]T_4$ の消失は、両 PCB を投与した野生型マウスにおいて著しく促進したが、TTR 遺伝子欠損マウスではその促進はわずかであった。この時、野生型マウスでは、両 PCB の投与により $[^{125}I]T_4$ の分布容積 (Vd) は有意に増加した。TTR 遺伝子欠損マウスでは KC500 においてのみ Vd が増加した。PCB による血中 T_4 濃度低下は、肝臓の T_4 -UDP-GT の誘導、血中 TTR を介した T_4 の輸送の攪乱が主因とされてきたが、本研究結果は、それらは単に 1 つの要因であるにすぎないことを示唆し、その低下の主因は、 T_4 の血中から肝臓への移行によることが示された (加藤)。

【リスクコミュニケーション・国際動向等調査】

内分泌かく乱化学物質 (ダイオキシン類を含む) の生体作用及びその作用機構に関する新たな科学的知見を一般社会にリスク情報として還元してゆくための要件を整理し、化学物質危害情報に対する適切な一般社会の対応、すなわち適切な危機管理と同時に適切な安心感を醸成する方途を提供するため、AhR をめぐる最近の知見に即して、ダイオキシン研究関連の事象について考察した (井上)。

2006 年 8 月にオスロで行われた第 26 回ハロゲン化有機環境汚染物質と POPS に関する国際シンポジウム「DIOXIN' 2006」に参加し、ダイオキシン及びダイオキシン様 PCB のヒト及び哺乳動物における TEF の WHO 2005 再評価ならびに欧州における PCDD/F, PCB, PBDE and HBCDD の現在の曝露量に対するリスク評価の試み等の最新の内分泌かく乱物質の健康影響に関する

る国際動向について情報収集した（広瀬）。

E. 結論

1. TCDD 投与マウス胎児口蓋のマイクロアレイ解析を実施した結果、新たな TCDD の標的遺伝子及び口蓋裂誘導の候補遺伝子を得た。
1. 霊長類での TCDD の次世代に与える影響を視点として次世代に与えるリスクを評価した結果、TCDD の高暴露量により、児の生殖に影響が認められた。総合的に判断して、現在の耐容一日摂取量は一応妥当であると思われた。
1. ES 細胞および EB のマイクロアレイによる解析法を確立し、AhR、Arnt、Cyp1a1 を含む種々の発現遺伝子の変動パターンを明らかにした。
1. Tg. AC を C57B1/6 に 10 世代戻し交配して得られた雌雄マウスに、2, 3, 7, 8-TCDD を 0.1、1、10、30ng/kg 体重の用量で、週 2 回で 3 ヶ月間の経口投与実験を実施した結果、TCDD による腫瘍誘発作用は認められなかった。TCDD のマウス肝で変動する癌関連遺伝子として新たに TIP30 を見いだした。
1. Cancer Cell Informatics は、ターゲット既知の内分泌かく乱化学物質をレファレンスとすることによって、内分泌かく乱化学物質の分子メカニズム予測、あるいは生理作用未知の化合物のリスク評価に有用と考えられた。
1. AhR がリガンド依存的に ER α 、ER β 及び AR のユビキチン化に働き、続くプロテアソームによる分解に関与していることが明らかになった。さらに AhR 欠失マウスは、11 週令になると殆どすべて

のマウスで盲腸癌が発症することが明らかになり、AhR が大腸、特に盲腸において癌抑制因子として働いていることを明らかにした。

7. PAHs による LXR を介して誘導された転写活性は p53 依存的に抑制された。これは、LXR のヘテロ二量体のパートナーである RXR のタンパク質の分解は DNA 損傷によって活性化された p53 により促進されることを明らかにした。
8. TCDD の新生仔期暴露実験により PSP94、defensin β 、PCP4 発現の異常亢進が前立腺でみられた。これらの 3 つの前立腺タンパク質は、全てヒトホモログがありヒト前立腺での発現も知られていることから、ヒトリスク推定の指標として有用性であると考えられた。
9. PCB による血中 T₄ 濃度低下は、肝臓の T₄-UDP-GT の誘導、血中 TTR を介した T₄ の輸送の攪乱が主因とされてきたが、それらは単に 1 つの要因であるにすぎず、その低下の主因は、T₄ の血中から肝臓への移行によることが示された。また、この低下作用機序はヒトにおいても適用できる可能性が考えられた。
10. 受容体シグナルを介する毒性評価に関するリスクコミュニケーションについて、AhR をめぐる最近の知見に即して、ダイオキシン研究関連の事象について考察するとともに、ダイオキシン類の健康影響評価に関する最新の国際動向について情報収集した。

以上、平成 18 年度本研究班における研究の進展の結果、得られた新知見ならびに新技術により、現実的なリスクアセス

メントに今後よりいっそう貢献することが期待された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2007) Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. *Environ Toxicol*, 22, 44-52.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2007) Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. *Reprod Toxicol*, 23, 12-19.

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 672-678.

Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 30-36.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet

Absorber2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5- chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol*, 29, 215-225.

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ema M (2006) Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and 4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto*, 46, 26-33.

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R. (2006) Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific $\alpha 2$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35-47.

Ema M, Hirose A. (2006) Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. In *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity* (Golub MS, Ed.), pp. 23-64, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton

2. 学会発表

Nishimura T, Tahara M, Kubota R, Shimizu M, Ema M, Tokunaga H. (2006) Behavior of fenthion after chlorination treatment and effect of its products on cholinesterase activity. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Arima A, Ihara T. (2006) Teratology study of dibutyltin in cynomolgus monkeys given during organogenesis. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、伊原敏夫 (2006) カニクイザルにおけるジブチルスズの発生毒性試験、第 46 回日本先天異常学会学術集会 (山形、6/29-30)

江馬 眞、松山隆史、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 紫外線吸収剤 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole のラット新生児における毒性、第 46 回日本先天異常学会学術集会 (山形、6/29-30)

江馬 眞 (2006) 生殖毒性、第 7 回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会 (名古屋、7/3)

江馬 眞、藤井咲子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2006) 加硫促進剤 1,3-di-o-tolylguanidine のラットにおける出生前発生毒性、第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 (名古屋、7/5)

Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Ema M. Gene Expression s analysis in uterus and ovary of mice treated dibutyltin dichloride during implantation. The 26th

International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/24).

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose, Kamata E. Pre- and post implantation embryonic loss induced by dibutyltin given to mice during early pregnancy. The 26th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs (DIOXIN 2006, Oslo, 8/21-25, 8/24).

Ema M, Arima A, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2006) Prenatal developmental toxicity of dibutyltin in cynomolgus monkeys given on consecutive three days during organogenesis. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/22

Hasegawa R, Hirata-Koizumu M, Dourson M, Hirose A, Nakai S, Kamata E, Ema M. (2006) Comprehensive evaluation on pediatric susceptibility to 18 chemical. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/23

Hirose A, Kamata E, Akiyama H, Takahashi M, Ema M, Hayashi M. (2006) Development in silico genotoxicity predictory system on chromosomal aberration for existing chemicals. EUROTOX 2006 (9/20-24, Dubrovnik/Cavtat) 9/21

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A,

Kamata E. (2006) Teratogenic effects of rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine (DTG), in rats. 27th Annual meeting of American College of Toxicology (10/5-8, Palm Springs)

Ema M. (2006) Introduction of Division of Risk Assessment. NIHS/NCBSR-KFDA/NITR Workshop on Regulatory Science and Information in Toxicological Evaluation of Potential High Risk Materials. November 29, 2006, Mita Conference Center.

Ema M. (2006) OECD high production volume chemicals programme NIHS/NCBSR-KFDA/NITR Workshop on Regulatory Science and Information in Toxicological Evaluation of Potential High Risk Materials. November 29, 2006, Mita Conference Center.

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. International Conference on Food Contamination and Neurodevelopmental Disorders (12/3-5, 2006, Valencia)

Ema M, Matsumoto M, Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E, Hasegawa R, Yamamoto N.
The Contribution of the Japanese Government to the OECD High Production Volume Chemicals Programme: Summary of 1st to 21st SIDS Initial Assessment

Meetings. First U.S. Conference on Characterizing Chemicals in Commerce: Using Data on High Production Volume (HPV) Chemicals. (12/12-14, 2006. Radisson Inn, Austin, Texas)

Ema M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Kamata, E. (2007) Toxicity study of ultraviolet light absorber 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) in rats during the pre-weaning period. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology

Fukunishi K, Hirose A, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Kamata E, Ema M. (2007) Combined repeated dose toxicity with the reproductive/developmental toxicity screening test of ultraviolet absorber 2-(3,5-di-*tert*-butyl-2-hydroxyphenyl)-5-chloro-2H-benzotriazole (DBHCB) in rats. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

Hirose A, Yamazoe Y, Ema M, Kawamura Y. (2007) Toxicity testing schema for the initial risk assessment of food contact plastics based on the concept of ttc and usage probabilistic factors. The 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし
2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
国内特許申請中（特願 2003-317031、特願
2004-219285）

別添 4

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

II. 分担研究報告書

1. 奇形の受容体シグナルを介した発生メカニズムの解析

国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 室長 江馬眞

国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長 高木篤也

研究要旨

核内受容体を介した口蓋裂発生に関する標的分子種の同定ならびにシグナル伝達への影響を明らかにすることを目的に、本年度は TCDD を投与した 13.5、14.5、15.5 日齢のマウス胎児の口蓋を対象にしたマイクロアレイ解析の精度を上げるために、これを昨年度と同様に実施し、再現性を確認した。その結果、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp) 等の TCDD により誘導されることが知られている遺伝子が再現性をもって対照群に比較して顕著に増加した。その他、増殖、シグナル伝達、分化、代謝等の遺伝子発現の変化が再現性をもって認められ、胎児口蓋において TCDD により影響される遺伝子群を多数同定することが出来た。

A. 研究目的

核内受容体を介した口蓋裂発生に関する様々な標的分子種の同定ならびにシグナル伝達への影響を明らかにすることにより、作用機序を明らかにし、受容体原性物質のリスクアセスメントの信頼性を高める。

B. 方法

実験：12.5 日齢の C57BL/6 妊娠マウスに 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を 20 μ g/kg の用量で単回強制経口投与後、13.5、14.5、15.5 日齢の胎児を摘出し、口蓋部位を小型のハサミで採取、RNA を RNAeasy（キアゲン社）で抽出、蛍

光ラベル後、40000 以上の遺伝子解析が可能なアフィメトリクス社の GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。

なお、各日齢毎に使用した chip 数は 3 で、chip 一枚当たり 13.5 日齢では各 6 匹、14.5 日齢では各 5 匹、15.5 日齢では各 4 匹のプールサンプルを使用した。データ取り扱いは細胞 1 個当たりの mRNA のコピー数で表すことが出来る“Percellome”法を用いた。

（倫理面への配慮）

使用する動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸椎脱臼法など苦痛の少ない方法

を用いるといった、本研究所の「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い実施した。ダイオキシン類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

12.5日の妊娠マウスに TCDD を単回経口投与し、13.5、14.5、15.5日齢の胎児口蓋のマイクロアレイ解析を行った。今回得られたデータを昨年度得られたマイクロアレイデータと比較して再現性を検討した結果、Cyp1a1、Ahrr、Cyp1b1、TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase (Tiparp)等の TCDD により誘導されることが知られている遺伝子が対照群に比較して顕著に増加していることが確認された。その他、数多くの遺伝子の発現量の変化が確認された。その中には、CDK inhibitor が胎齢 14.5日に増加していることが確認された。その他の細胞増殖に関連する遺伝子として Rerg (ras related, estrogen regulated growth inhibitor) 遺伝子の増加が見られた。血管形成を阻害する PF4 遺伝子の増加が見られた。また、転写因子 Glis1 や糖鎖の代謝に関与する Hs3st6、シグナル伝達に関与する Dab1 遺伝子等発現の増加が再現性をもって認められた。胎齢 15.5日にはケラチン遺伝子が増加した。減少した遺伝子としては AhR の他に、細胞接着に関与することが知られている Pcdh8 (protocadherin8) 遺伝子が認められた。

D. 考察

本研究では、TCDD による口蓋裂の機序解明のため、12.5日の妊娠マウスに TCDD を投与し、13.5、14.5、15.5日齢の胎児口蓋のマイクロアレイ解析を行った。その結果、TCDD の標的分子として知られている遺伝子を含む多くの遺伝子の変化を検出することが出来た。これらの遺伝子の中で、口蓋裂に関連する変化として細胞増殖の抑制に関与する遺伝子 p21 と Rerg の増加が見られた。また、血管形成阻害因子の PF4 や糖鎖の代謝酵素の増加が見られたことから、細胞外基質や血管も影響を受けていることが示唆された。その他、15.5日にケラチンの増加が見られたことから細胞分化が促進されていることが示唆された。以上、今回の実験で、マウス口蓋で TCDD により変化する多くの遺伝子が同定され、口蓋裂との機序解明に極めて有用な情報が得られた。

E. 結論

TCDD 投与マウス胎児のマイクロアレイ解析を実施した結果、新たな TCDD の標的遺伝子及び口蓋裂誘導の候補遺伝子を得た。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文

Ema M, Fujii S, Ikka T, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2007) Early pregnancy failure induced by dibutyltin dichloride in mice. *Environ Toxicol*, 22, 44-52.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Ihara T. (2007) Developmental toxicity of dibutyltin dichloride in cynomolgus monkeys. *Reprod Toxicol*, 23, 12-19.

Percellome Project による毒性トランスクリプトミクスの新しい試み、菅野純、北嶋聡、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、細胞工学、26、71-77、2007

Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Prenatal developmental toxicity study of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 672-678.

Ema M, Kimura E, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Reproductive and developmental toxicity screening test of basic rubber accelerator, 1,3-di-*o*-tolylguanidine, in rats. *Reprod Toxicol*, 22, 30-36.

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2006) Evaluation of Developmental Toxicity of Ultraviolet Absorber 2-(3',5'-Di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5- chlorobenzotriazole in Rat. *Drug Chem Toxicol*, 29, 215-225.

Takahashi M, Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Ito Y, Sunaga M, Fujii S, Kamata E, Hasegawa R, Ema M (2006) Susceptibility of newborn rats to 3-ethylphenol and

4-ethylphenol compared with that in young rats. *Congenit Anom Kyoto*, 46, 26-33.

Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R. (2006) Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific $\alpha 2u$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35-47.

Ema M, Hirose A. (2006) Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. In *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity* (Golub MS, Ed.), pp. 23-64, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton

2. 学会発表

Nishimura T, Tahara M, Kubota R, Shimizu M, Ema M, Tokunaga H. (2006) Behavior of fenthion after chlorination treatment and effect of its products on cholinesterase activity. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego

Ema M, Fukunishi K, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E, Arima A, Ihara T. (2006) Teratology study of dibutyltin in cynomolgus monkeys given during organogenesis. The 45th Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Diego

江馬 眞、福西克弘、松本真理子、広瀬明