

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究
—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—
(H17-化学-一般-001)

総合研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 20(2008)年 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

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究
—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—
(H17-化学-一般-001)

平成 19 年度 総合研究報告書

主任研究者 江馬 眞

平成 20(2008)年 3 月

目 次

I. 総合研究報告書	
研究の総括	
江馬 眞 1
II. 分担研究報告書	
1. 児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析	
江馬 眞 19
2. 神経幹細胞系譜制御における化学物質の影響に関する研究	
中島 欽一 29
3. 脳形成・発達過程における神経伝達物質シグナルの外因性かく乱による脳障害 に関する研究ーモデル系開発とメカニズム解明	
種村 健太郎 35
4. 自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤に関する研究	
竹田 潔 39
5. 子どもに対する化学物質暴露影響の内分泌的観点からの解明	
渡邊 肇 53
6. 成人・子ども間リスク評価結果の外挿に関する研究	
菅野 純 61
7. 細胞を用いた <i>in vitro</i> における化学物質・薬物の影響解析	
田上 昭人 71
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 79
IV. 研究成果の刊行物・別刷 85

別添 3

I . 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

化学物質による子どもへの健康影響に関する研究

—恒常性維持機構発達の過渡特性に立脚したリスク評価研究—

主任研究者 江馬 眞

国立医薬品食品衛生研究所・安全性生物試験研究センター・総合評価研究室・室長

研究要旨

本研究は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で子どもが経験する高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえて、化学物質の有害作用発現の子どもとしての特異性を解明することにより、従来から盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とすることを目的とした。そのために、研究班を「恒常性維持機構発達解析」と「外挿問題解析」に分けて組織し、「恒常性維持機構発達解析」を更に、発生成長段階検討、神経系、免疫系、及び内分泌系に、「外挿問題解析」を、化学物質の大人への影響評価結果を子どもへの評価に外挿する研究と、実験動物とヒトとの間を結びつける研究とに分けて研究を進めた。

発生成長段階検討においては、紫外線吸収剤DBHCB, HDBBが幼若期投与では性差無く毒性が生じるが、成体では性差が生じ、雄の方が感受性が高いことを見出した。その背景として、女性ホルモンによる毒性軽減が示唆される結果が得られ、これがホルモン産生が始まっていない幼若期には雌雄に毒性が強くなる理由であることが解明された。神経系について、レチノイン酸が神経幹細胞の成熟を早め、バルプロ酸(Valproic acid: VPA) が分化に影響を与えることを見出し、さらに、バルプロ酸の抗てんかん作用はてんかんによる異所的神経新生の抑制によることを明らかにした。また、胎児期のグルタミン酸受容体過剰刺激により、成熟時の脳構造、行動に顕著な障害が生じることが分かり、サリドマイドによる広汎性発達障害のメカニズムもグルタミン酸シグナルのかく乱による可能性が示唆される結果を得た。免疫系について、自然免疫系の細胞も、獲

得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性がある結果が得られ、これは化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見として特に有用であると考えられた。内分泌について、新生児期エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発メカニズムに関わりうる遺伝子を同定した。

「外挿問題解析」に於いては、大人-子ども外挿問題について、網羅的遺伝子発現解析を駆使し、ヒドロキシクエン酸 (HCA) 精巣毒性、ドーモイ酸 (DA) 脳影響が、幼若期の方が成体より強い背景を説明する遺伝子変化を検討した。その結果、HCAは脂肪酸代謝を始めとする複数の遺伝子群の関与が、DAは幼若期投与により、脳発達に関連する遺伝子発現変化を起点に、グルタミン酸受容体シグナル系以外のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な影響が起きている可能性が示唆された。実験動物-ヒト外挿問題について、マウス細胞を用い、VPAが神経細胞分化を促進する分子メカニズムの一端が明らかになり、個体レベルでのVPAの催奇形性発症メカニズムの解明にとって有用な知見であると考えられた。

以上の成果の中で免疫系において明らかになった、幼若期マウスの自然免疫系細胞は、受容体 (Toll-like receptor) 刺激による炎症性サイトカインの一部 (IL-12など) の産生、食食能、大腸菌の殺菌能力が成体マウスの細胞に比べ低いという知見は特筆すべきものと考えられる。これは、自然免疫系の細胞は子どもの成長に応じて発達することはないという従来の常識を覆す知見であり、化学物質の子どもへの健康影響を考察する際の重要な基盤となると考えられる。

分担研究者

中島 欽一

奈良先端科学技術大学院大学・
バイオサイエンス研究科・動物
代謝調節学講座・分子神経分化
制御学分野

竹田 潔

研究所・試験部・安全性試験室・研
究員 (H17年度のみ)

大阪大学・医学系研究科・感染
免疫学講座・教授

渡邊 肇

自然科学研究機構・基礎生物学研
究所・岡崎統合バイオサイエンス

種村 健太郎

国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部主任研究官 (H18-19年度)

菅野 純

センター・生命環境・助教授

国立医薬品食品衛生研究所

桑形 麻樹子

(財)食品薬品安全センター・秦野

安全性生物試験研究センター

毒性部部長

田上昭人 国立生育医療研究センター
薬剤治療研究部部長

A. 研究目的

本研究の目的は、「子どもは小さな大人ではない」、即ち、離乳や性成熟などの外的・内的な大変動を経て成人に至る過程で、子どもが経験する高次恒常性維持機構の過渡的アンバランスの特性を踏まえた、化学物質の有害作用の発現の、子どもとしての特異性を解明することである。これにより、従来より盲点であると指摘されてきた「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎とする。

B. 方法

研究班を【恒常性維持機構発達解析】と【外挿問題解析】に分けて組織した。

【恒常性維持機構発達解析】

<発生発育>

児の発生成長段階における化学物質の毒性発現様式と感受性の変化の解析を目的として、紫外線吸収 2-(3',5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole (DBHCB) 及び、化学構造が類似している 2-(2'-hydroxy-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole (HDBB) について、5 週齢ラットにおける反復投与試験の結果と、離乳前ラットを用いた反復投与試験の結果を比較検討した。さらに、14 日間反復投与毒性試験、反復投与毒性生殖発生毒性併合試験を実施し、性ホルモンの関与を検討するために去勢ラットを用いた反復投与毒性試験を実施した。同時に、血中濃度測定及び肝薬物代謝酵素活性測定試験、代謝安定性試験、CYP 分子種特定試験を実施した (江馬)。

<神経>

マウス ES 細胞を用い、血清非存在下に浮游培養することで神経幹細胞のアストロサイト分化能獲得現象を再現できる *in vitro* の系を確立し用いた。ES 細胞を血清非存在下に 4 日間浮游培養した場合、胎生初期～中期の神経幹細胞に相当する神経幹細胞様細胞が誘導される。この細胞は、アストロサイト誘導性サイトカイン LIF で刺激してもアストロサイトへの分化は観察されない。そこでこの 4 日間の浮游培養中に Retinoic acid (RA) を添加し、その影響を調べた。また、アストロサイト早期分化能獲得に DNA メチル化というエピジェネティックなゲノム修飾が関与することから、DNA のメチル化状態を bisulfite シークエンスなどによって検討した。VPA に関しては成体神経幹細胞のニューロン分化を促進することが分かっていたが、胎仔神経幹細胞に対する影響については不明であったので、胎仔神経幹細胞に対する影響を成体神経幹細胞に対するそれと比較するとともに、マイクロアレイによる遺伝子発現解析などを足掛りとしてその作用機序解明も試みた。また VPA の脊髄損傷治療応用への可能性、抗てんかん作用の解明も検討した (中島)。

妊娠マウスにドーモイ酸を投与し、得られた新生子 (雄マウス) について生後 10 週齢時に解析を開始した。なお、成体時におけるドーモイ酸投与の影響と比較検討するため、生後 10 週齢の雄マウスについても解析を行った。神経行動毒性については、主に情動-認知系行動について、オープンフィールド試験、明暗往來試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、驚愕反応プレパルス抑制試験、ケージ内活動量測定試験を組み合わせた解析を行い、胎生期におけるドーモイ酸投与の結果に生じる行動の変化およびその障害性の有無について検討した。脳構造への障害性の有無に関しては、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせて、共

焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。またグルタミン酸が興奮性神経伝達物質であることから、得られた新生児における脳内の興奮-抑制バランス制御に障害が生じている可能性が高い。よって各種受容体および調節因子タンパクの発現パターンについても解析した。次に、胎生 14.5 日齢のマウスに対して妊娠マウス母獣への強制経口投与 (100mg/kg) により胎盤経由で、サリドマイド、フタルルグルタミン (サリドマイドのヒト型代謝産物)、フタルルグルタミン酸 (フタルルグルタミン類似構造化学物質) を暴露し、産出した雄マウスについて生後 10-12 週齢時に、形態機能解析及び行動解析を行った。形態機能解析には、特に終脳における神経細胞突起の発達に焦点を合わせた免疫組織化学を用いた。同時に、脳内の興奮-抑制バランスへの影響評価を目的として各種受容体および調節因子タンパクの発現を検討した。行動解析は、情動-認知系行動に焦点を合わせ、オープンフィールド試験、明暗往来試験、高架式十字迷路試験、恐怖条件付け試験、及びプレパルス驚愕抑制試験を組み合わせたバッテリー試験として実施した (種村)。

胎生期 BrdU 暴露誘発性の多動性障害モデルを用いて、生後に発現する多動性障害発現の臨界期を検討した (桑形)。

<免疫>

自然免疫系の活性制御機構の破綻により慢性大腸炎を発症する自然免疫系特異的 Stat3 欠損マウス、IL-10 ノックアウトマウスを用いて活性を制御する分子機構を解析した。次に、TLR 刺激による NF- κ B 依存性の遺伝子発現に早期誘導型と遅期誘導型に分かれる分子機構を解析した。MyD88 欠損マクロファージを TLR4 リガンドで刺激し、TRIF 依存性のシグナルが入る状況で早期誘導型と遅期誘導型の遺伝子発現を解析した。さらに、早期誘導型遺伝子として

MIP2 遺伝子、遅期誘導型遺伝子として Lcn2 遺伝子を代表とし、各遺伝子プロモーターへの転写制御因子群のリクルートをクロマチン免疫沈降法で解析した。また、各遺伝子プロモーターのクロマチン構造をヒストン H3 のメチル化を指標に解析した。同じ核に発現する I κ B 分子 I κ B ζ の遅期誘導型遺伝子の発現誘導における役割を解析した。

子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、2 週齢と 8 週齢のマウスの腹腔に存在するマクロファージを用いて解析した。まず、両週齢のマウスの腹腔を Hanks 液で洗浄し、細胞を回収し、CD11b 陽性細胞を単離し実験に用いた。TLR4 リガンドである LPS で刺激し、TNF- α , IL-6 および IL-12p40 の産生を ELISA 法で解析した。次に、これらマクロファージの食食能を蛍光ラベルした非病原性大腸菌を用いて flow cytometry で比較解析した。また、食食後の食食胞の成熟について、食食胞の pH 測定、Lamp1 の発現集積を指標に、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、各マクロファージにおける殺菌能を、非病原性大腸菌の CFU を測定し、解析した。食食胞の成熟に関わる細胞内シグナルを伝達する MAP キナーゼ p38 の活性化を western blot 法で、また p38 の標的遺伝子の発現誘導を real time PCR 法で解析した (竹田)。

<内分泌>

周生期の化学物質曝露により通常ホルモン制御から逸脱する際の作用メカニズムについて、膈上皮への影響を中心に遺伝子レベルからの解析を行った。マウス (C57BL/6J) を動物実験に関する指針に従い飼育し交配したのち、新生児マウスを得た。これらを用いて新生児期 (出生直後から 5 日間)、または成体期 (生後 10 週間) に化学物質としてジエチルスチルベストール (DES) 曝露を行った。DES は 1g 体

重あたり 3 μ g、5日間投与した。曝露による組織学的な変化について解析を進めると同時に、エストロゲンの主要な標的器官である子宮と膣からRNAを調製し遺伝子発現プロファイルの解析を進めた。これにより新生児期の曝露により恒久的に発現が変化する遺伝子の探索を行った。またDES投与後、通常1-6時間で子宮および膣を摘出しRNAを調製し、その遺伝子発現状態を解析した。対照群にはごま油を用いた。生後70日のマウスの解析にあたっては、その2週間前に卵巣摘出を行った。遺伝子発現プロファイルの解析結果をもとに、遺伝子の発現レベルが新生児期のエストロゲン処理により異なっていた遺伝子について、ゲノムの状態を解析した。遺伝子発現プロファイルをもとに選択した遺伝子の近傍について、Bisulfite法によりDNAのメチル化状態を明らかにし、エピジェネティックな変化が恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす変化が生じている可能性について検討を加えた（渡邊）。

【外挿問題解析】

化学物質の毒性評価を進める過程で、成体(成人)と幼若個体(子ども)で毒性の強さが異なる化学物質が見出されてきている。本研究ではそのような化学物質の具体例として、幼若投与の方が成体期投与より強い影響が生じることが明らかになったヒドロキシクエン酸(HCA)とドーモイ酸(DA)を例として取り上げ、その背景となる分子メカニズムを、網羅的遺伝子発現解析手法を用いて検討し、成人でのリスク評価結果を子どものリスク評価予測に外挿する際の有効性と限界について検討した。遺伝子発現は、当方が開発した Percellome 手法(遺伝子発現値の絶対化手法: Kanno et al. BMC Genomics 29;7:64.)を適用して解析し、コピー数算出、統計解析を行った。得られた遺伝子リストの既知情報との照合には Ingenuity pathway analysis (Ingenuity Systems)を用いた(菅野)。

ES細胞を用いた各臓器への化学物質影響のモデル解析として、マウスES細胞を用いたEST法に加えて、ヒト組織細胞を用いた毒性試験方法の開発を目指し、カルバマゼピン及びバルプロ酸の細胞に与える毒性のメカニズムの解析を行った。バルプロ酸については、マウス神経芽腫由来 NIE-115細胞を用いて細胞分化増殖に及ぼす影響メカニズムの解析を行った(田上)。

C. 結果

【恒常性維持機構発達解析】

発生成長段階検討に加え、脳神経系、免疫系、内分泌系の3つの高次生体機能について化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見を集積した。

<発生発育>

紫外線吸収剤 DBHCB を6週齢のラットに反復経口投与したところ、雄では肝臓重量増加等が認められたが、雌では全く影響がみられなかった。新生児期雌雄ラットへの経口投与では、雌雄ともに肝臓への影響が認められた。次に、HDBBについて、5週齢の雌雄のラットにHDBBを反復強制経口投与したときには毒性に性差がみられ、雄の0.5 mg/kg以上、雌の12.5 mg/kg以上で主に肝障害及び血液生化学的検査値の変化が、雌雄の12.5 mg/kg以上で心筋の異常が観察された。生後4-21日の雌雄の新生児ラットに直接HDBBを強制経口投与したところ、毒性の性差が消失し、2.5 mg/kg以上の雌雄で肝重量の増加、12.5 mg/kgの雌雄で肝障害及び血液生化学的検査値の変化が認められた。さらに、去勢により性差が著しく軽減することも判明した。5週齢でHDBB代謝を検討すると、血漿中HDBB濃度は投与5-8時間後に最高値に達し、投与24時間後には著しく低下した。雄では総P450量を含む代

謝系変化が認められたが、雌では認められなかった。HDBBを代謝するCYP群については、ミクロソームとのインキュベーションによる検討により、CYP1A1、CYP1A2、CYP2C6、CYP2C11及びCYP2D2が候補であることが分かった(江馬)。

<神経>

神経幹細胞系譜制御に対する化学物質影響の分子基盤解明のために、レチノイン酸(RA)とバルプロ酸(VPA)の神経幹細胞に対する作用を検討した。その結果、まず、RAのES細胞早期アストロサイト分化誘導時に、アストロサイト特異的遺伝子であるGFAPのプロモーターのSTAT3結合配列のDNA脱メチル化が生じること、またそのメカニズムはDNAメチル基転移酵素Dnmt1の遊離であることが明らかになった。次に、RAがLIFと協調して胎生期神経幹細胞のアストロサイト分化を誘導することを見出し、その分子メカニズムとして、RA刺激によりアストロサイト特異的遺伝子プロモーター中のヒストンのアセチル化が亢進し、結果として転写因子STAT3の結合が促進されるためであることを明らかにした。更に、VPAがオリゴデンドロサイト分化を顕著に抑制し、ニューロン分化を促進することを見出し、マイクロアレイ解析によりニューロン軸索伸長阻害タンパク質遺伝子の発現抑制を認めた。これを受け、VPAのニューロン分化促進作用を*in vivo*で検討するため、VPA処理した神経幹細胞を脊髄損傷モデルマウスの脊髄に移植したところ、未処理細胞移植群と比較して、顕著な機能回復が見られた。さらに、齧歯類やヒトにおいて、てんかんにより海馬歯状回の異所的ニューロン新生が促進されること及び長期認識障害が引き起こされることが知られていることを踏まえ、VPAの抗てんかん薬の作用について、VPAがこの異所的ニューロン新生を阻害し、認識

障害を回復させることを明らかにした。この作用は主にVPAのヒストン脱アセチル化酵素阻害作用によって発揮されることも明らかにした(中島)。

妊娠母マウスにドーモイ酸の腹腔投与を行い、出生後の雄マウスについて行動解析を行った結果、成体期マウスへのドーモイ酸投与時に確認された記憶障害のみならず、情動行動の変化および情報処理能力の低下が確認された。また脳構造を解析したところ、大脳皮質における神経細胞軸索の発達に障害が認められた。これらの結果から、胎生期におけるグルタミン酸受容体の過剰刺激は、脳構造形成異常を引き起こし、その結果として脳機能発達障害を生じる可能性が示された。この結果を受け、胎生期グルタミン酸シグナルの外因性かく乱による神経毒性発現の解明を目的として、マウスにサリドマイド、フタリルグルタミン、フタリルグルタミン酸の経胎盤暴露を行った結果、胎生期サリドマイド暴露雄マウスでは情動・認知行動に関する逸脱は認められなかったが、胎生期フタリルグルタミン暴露雄マウスでは、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間増加と、プレパルス驚愕反応抑制試験での驚愕反応抑制度の低下が明らかとなった。また胎生期フタリルグルタミン酸暴露雄マウスでは、オープンフィールド試験での総移動量減少と、高架式十字迷路試験での柵無しアームでの滞在時間及びアーム選択回数増加、また場所-連想記憶障害が確認された。一方、成体期(生後10週齢)雄マウスへの強制経口投与からはこうした行動異常は認められなかった。行動異常を呈した胎生期暴露マウスについて、大脳皮質及び海馬における神経細胞軸索構成タンパクを解析した結果、神経細胞軸索突起の発達不全が確認された。さらに、神経細胞軸索構成タンパクのリ

ン酸化修飾状態および界面活性剤に対する溶解性は、暴露群マウスでは対照群と大きく異なることが示された（種村）。

遺伝子毒性物質として知られている BrdU をラットの 9-15 日に投与したとき出生児に多動傾向が認められ、妊娠 9-10 日投与では多動傾向はみられず、投与が後期になるほど顕著になった（桑形）。

<免疫>

多細胞生物に共通に保存された免疫系である自然免疫系に関し、自然免疫系が Toll-like receptor (TLR) を介して病原体を認識し活性化されるメカニズムの一端を明らかにした。すなわち、DNA マイクロアレイを用いた解析をきっかけに、核に発現する I κ B 分子である I κ BNS が、炎症刺激によって発現変動する遺伝子の中で特定のサブセットの発現を選択的にブロックし、個体レベルでも炎症を抑制することを明らかにした。さらに、早期誘導型遺伝子と遅期誘導型遺伝子の発現誘導機構を解析した。早期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が常に開いており転写制御因子が刺激後迅速にアクセスしやすい構造となっている一方、遅期誘導型遺伝子のプロモーターは、クロマチン構造が閉じており、TLR 刺激により構造変換を受けて開き、転写制御因子がアクセスできるようになることが、遺伝子発現に時間を要する原因であることを明らかにした。さらに、遅期誘導型遺伝子のプロモーターのクロマチン構造変換に関わる分子として、I κ BNS と同じ I κ B 分子 I κ Bzeta を同定した。

また、子どもの自然免疫系の活性を解析するため、2 週齢と 8 週齢のマクロファージを LPS 刺激し、TNF- α , IL-6 産生を解析したところ、両週齢のマクロファージ間で差は認められなかった。しかし、IL-12p40 の産生は 2 週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。非病原性大腸菌の取り込み能をフローサイトメトリ

ーで解析したところ、2 週齢マウス由来のマクロファージで低下が認められた。貪食胞の成熟を、電子顕微鏡を用いた Lamp1 の免疫染色解析したところ、Lamp1 の貪食胞膜への集積が 2 週齢マウスのマクロファージでは不十分であった。また、貪食胞の pH 低下も 2 週齢マウス由来マクロファージでは障害されていた。このように、2 週齢マウス由来マクロファージでは、細菌の取り込み、およびその後の貪食胞の成熟に障害を認めた。これらの障害に伴い、2 週齢マウス由来のマクロファージでは、大腸菌の殺菌能も低下しており、大腸菌の感染後のマクロファージ内の大腸菌の生菌数は 2 週齢マウスのマクロファージで有意に増加していた。さらに、貪食胞の成熟に関与する細胞内シグナルを伝達する p38 の活性化を p38 のセリン残基のリン酸化を指標に解析したところ、2 週齢マウス由来マクロファージでは、5 分後のリン酸化誘導が 8 週齢マウス由来マクロファージに比較すると有意に低下していることが明らかになった。また、p38 の標的遺伝子でマクロファージの貪食に関わる SR-A や MARCO 遺伝子の大腸菌感染による発現誘導も、2 週齢マウス由来マクロファージでは低下していた（竹田）。

<内分泌>

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン (DES) を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生児期 (0 日、5 日) と成熟期 (70 日) ではエストロゲン曝露による初期応答遺伝子が子宮や膣において大きく異なることが明らかになった。一方で、新生児期のエストロゲン曝露を 5 日間行った場合、成熟期にエストロゲン非依存的な膣上皮の増殖を確

認した。この場合、5日間曝露後のエストロゲン応答遺伝子は、初期応答遺伝子に比べてその応答遺伝子数が増加していることが明らかになった。さらに、これら新生児期にエストロゲン応答した遺伝子の一部は、その活性化状態が成熟期まで続くことが明らかになった。こうした長期的な遺伝子発現変化に関する要因として、エピジェネティックな変化が考えられたため、発現変化が顕著な遺伝子の制御領域を中心として、ゲノムレベルでのメチル化、ヒストンの修飾状態の解析を進めた結果、臍で特異的にメチル化されている遺伝子を同定した（渡邊）。

【外挿問題解析】

＜大人-子ども外挿問題＞

化学物質の大人への影響評価結果を子どもへの影響評価に外挿するための研究、実験動物とヒトとを結びつける研究を進め、子どもの特性を踏まえた化学物質リスク評価に寄与する知見を集積した。

ヒドロキシクエン酸による精巣毒性について、ラットにおいて若齢ほど毒性が強く発現することを見出した。網羅的遺伝子発現解析を行った結果、脂肪酸合成・分解系遺伝子群、補体系遺伝子群、GST 遺伝子群の発現変動が認められ、成長段階の違いにより毒性影響に差が出るメカニズムが精巣恒常性維持機構発達と関連づけられると推察された。

ドーモイ酸 (DA) は幼若期投与の方が成体期投与より、認知障害の程度が激しく、かつ多動を伴う行動変化を引き起こすことが明らかになったので、網羅的遺伝子発現解析により、投与時期による違いを検討した。幼若個体として2週齢、成体として10週齢を選び、2週齢についてはドーモイ酸投与後24時間および9週間（11週齢）、10週齢については投与後24時間および11週齢時点で、大脳、海馬を各々採取して得た Percollome 適用

網羅的遺伝子発現データを用いた。まず、2週齢投与と10週齢投与の各々で発現差が生じた遺伝子群を抽出し比較したが、いずれも重なる遺伝子がほとんど無く、幼若個体と成体とでは遺伝子発現応答が異なっていることが確認された。また、各々の遺伝子リストを Ingenuity Pathway Analysis (IPA) に投入し、既知情報から抽出される network の主要な機能カテゴリーを比較したが、共通性は見出されなかった。そこで、各々の実験条件における遺伝子発現変化と既知情報を IPA により照合したところ、2週齢投与24時間後の変動遺伝子リストから、グルタミン酸受容体系が直接刺激された事に対応する pathway は報告されず、Axonal guidance や Wnt signal 系といった、脳発達関連の遺伝子カスケードが抽出された。2週齢投与11週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳での IL-4 シグナル活性化、海馬でのグルタミン酸受容体シグナル系低下に加え、グルココルチコイド受容体シグナルへの影響が示された。IL-4 は脳脊髄炎におけるミクログリア活性化に関わっていることが報告されており、幼若期投与により慢性的な炎症反応が惹起されていることが示唆され、表現型との関連が目された。海馬で認められたグルココルチコイド受容体シグナルに関しては、受容体発現低下がストレス過敏を引き起こすとの報告があり、幼若期投与に伴う行動変化との関連が示唆された。10週齢投与24時間後の変動遺伝子リストでは、大脳で脂質代謝影響に加え、Fas-mitochondria 系を介したアポトーシス活性化が認められた。海馬では脂肪酸代謝低下と共に、グルタミン酸受容体シグナル系の低下が認められ、DA が直接グルタミン酸受容体系を叩いていることが確認された。また、Ephrin 受容体や軸索ガイダンス系シグナルの低下も認められ

た。10週齢投与11週齢時の変動遺伝子リストでは、大脳でEphrin受容体シグナル影響が認められた。海馬では、p53系(DNA damage)への影響が認められたが、変化は小さいものであった(菅野)。

<実験動物ーヒト外挿問題>

マウス胚性幹細胞(ES細胞)を用いたEST法にて薬物の毒性評価を行った。抗ガン剤の5FU、AraCは強毒性と評価された。バルプロ酸、カルバマゼピンは弱毒性と判定され、これらの評価は動物を用いた評価と一致した。一方、抗うつ剤のパロキセチンはEST法では強毒性との評価が得られた。カルバマゼピンについて、内胚葉、中胚葉、外胚葉特異的マーカーを調べた結果、高濃度領域において内胚葉、中胚葉の初期の誘導に対しては、促進傾向がみられ、中後期発生に対しては抑制傾向がみられた。外胚葉系の神経細胞マーカーでは分化促進傾向がみられたが、その作用は軽度であった。抗けいれん剤の一つであるバルプロ酸の細胞毒性、神経組織形成に及ぼす影響をマウス胚性幹細胞(ES細胞)ならびにマウス神経芽腫由来N1E-115細胞を用いて解析した。その結果、バルプロ酸の添加により、マウスES細胞は内胚葉系及び中胚葉系への細胞分化は抑制され外胚葉系への分化は促進されることが明らかとなった。N1E-115細胞ではGadd45a遺伝子を介して神経細胞の分化を促進することが明らかとなった(田上)。

D. 考察

本研究によって期待される成果は、子どもに対する化学物質の影響を高次生体機能の恒常性維持機構発達メカニズムの成熟過程に基づいて考察し、リスク評価可能とすることにある。高次生体機能恒常性維持機構発達メカニズムは医学的、生理学的な観点から基礎研究が進められている分野であるが、そ

れらにより得られる知見は、化学物質の影響評価に直接役立てることは難しいものがほとんどである。それに対し本研究では、化学物質影響の発現が強く予想される高次生体機能恒常性維持機構の発達に焦点を絞って戦略的に基礎研究を進め、リスク評価に応用可能な基礎的知見の取得を目指した。

具体的成果として、まず【恒常性維持機構発達解析】に於いて、発生発育、神経系、免疫系、内分泌系のそれぞれについて次の知見を得た。

発生発育について、紫外線吸収剤DBHCB、HDBBに肝毒性があること、成体期には雌感受性が低いことを見出した。そこで、HDBBについて去勢ラットを用いて調べたところ、雌感受性が上昇したことから、女性ホルモンの関与が疑われる結果が得られた。一方、HDBB血中濃度に性差は認められず、ラット肝ミクロソーム及びS-9を用いた代謝物安定試験においても性差は認められなかった。HDBBの肝毒性作用については、ラウリル酸12-水酸化活性(CYP4A)の増加がみられたことから、ペルオキシソーム誘導剤応答性受容体(PPAR) α を介したメカニズムが関与している可能性が示唆された。また、幼若ラットでは発現が見られず、4~5週齢から雄ラットのみで急激に発現が増加することが報告されているCYP2C11の発現が雄で低下していたが、CYP2C11は、性ホルモンによって発現が変化することが知られていることから、その活性低下がHDBBの毒性に見られる性差の発現に寄与している可能性も考えられた(江馬)。

神経系について、神経幹細胞分化制御にレチノイン酸とバルプロ酸が影響を与えることが分かった。レチノイン酸はES細胞からの神経幹細胞への分化を経た早期アストロサイト分化誘導を引き起こすが、その過程において、「Dnmt1のアストロサイト特異的遺伝子プロモーターへの結合減弱による脱メチル化促進」という分子メカニズム

が生じていることが明らかになった。また、バルプロ酸は損傷脊髄において移植幹細胞のニューロン分化を誘導できると共に、軸索伸長も促進できることがわかった。さらにバルプロ酸の抗てんかん作用が、てんかんにより促進される海馬歯状回の異所的ニューロン新生を抑制することによって明らかになった。この作用はバルプロ酸のヒストン脱アセチル化阻害作用によることも明らかになった（中島）。

ヒトにおいて特に海馬を選択的に破壊する記憶毒性を示すことが報告されているドーモイ酸について、生後 10 週齢雄マウスへの投与結果から海馬依存的な場所-連想記憶障害が生じていたことから、グルタミン酸受容体過剰刺激による神経行動毒性標的部位はヒトと同様に海馬であると判断された。他方、妊娠マウスへのドーモイ酸投与の結果得られた胎生期暴露マウスでは、(1) さらに重度の学習-記憶障害が認められるとともに、(2) 情動系行動に大きな変化が認められること、(3) 海馬だけでなく大脳皮質において神経細胞突起形成不全が生じること、(4) 軸索構成タンパクに変化が生じていること、(5) 複数種のグルタミン酸受容体発現量に変化が生じていることが確認された。従ってこの系は、胎生期におけるグルタミン酸受容体の一過性過剰刺激を起点とした脳形成不全をとまなう脳機能発達障害モデルとして位置づけることが出来ると判断される。今後、脳形成過程における詳細な解析を行うとともに、他のグルタミン酸様構造化学物質についても各種受容体サブタイプへの親和性に応じて検討する必要があると考えられた。

ヒトの広汎性発達障害の一因とされている胎生期サリドマイド暴露影響のメカニズムが不明であること、従来の妊娠ラットへのサリドマイド投与による産子解析が大量投与 (800-1200mg/kg)

であり、ストレス影響が混交要因として指摘されていることを受け、マウスを用い 100mg/kg 投与量にて検討したところ、サリドマイドの胎生期暴露から得られた産子解析からは行動異常が検出されず、この条件で混交要因影響が排除できたと判断された。これを踏まえると、サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルイルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルイルグルタミン酸のマウスへの経胎盤暴露が、成熟期における情動・認知行動の逸脱を誘発したことは、外因性のグルタミン酸シグナルかく乱が、行動異常を伴う発達障害の起点となり得ることを示すものと考えられた（種村）。

免疫系について、2 週齢、8 週齢マウスの腹腔マクロファージを用いた解析から、子どものマクロファージでは、貪食能、貪食胞の成熟、殺菌能が有意に低下していることが明らかになった。これまで、自然免疫系の細胞は、獲得免疫系を担当するリンパ球とは異なり、子どもの成長に応じて発達することは無いと考えられてきたが、この結果はこの常識を覆すものであり、化学物質の子どもへの健康影響を考察するための基盤となる知見として特に有用であると考えられた（竹田）。

内分泌系について、エストロゲン産生開始時期が思春期以降であることから思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかは不明であったが、本研究の結果、新生児期にエストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていること、さらに新生児期の遺伝子発現状態の変化が成熟期まで続くことが示された。すなわち、臨界期（出生 5 日以内）においてエストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現制御において長期的な影響をうけ、これにより、最終的に不可逆的な影響を引き起こされる可能

性が考えられた (渡邊)。

【外挿問題解析】に於いて、大人-子ども外挿問題について、ヒドロキシクエン酸暴露に伴い、精巢の遺伝子発現が脂肪酸合成を促進する方向に変化していることが明らかとなった。また、その傾向は幼若個体の方でより顕著であった。これは、幼若個体が成体に比べ、脂肪酸の要求が高い可能性を示唆するものである。DAの幼若、成体感受性差については、次のように説明することが可能であると考えられた。すなわち、幼若期投与ではWnt signalingを始めとする脳発達に関連する遺伝子発現に変化が生じ、それを起点に、グルタミン酸受容体シグナル系に加え、GRシグナル系等のシグナルへの影響が固定化し、成体期投与よりも重篤な不可逆的影響が誘発される。一方、成体期投与では、直接的にグルタミン酸受容体シグナル系が刺激され、脂肪代謝影響やアポトーシス影響が生じ、一過性の障害が現れるが、その後、収斂する傾向にある。これらの結果は、DAを用いたモデル解析をPercellome手法を適用した網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、成人、子どもの感受性差について、その分子背景を解明することが可能であることを示すものであると考えられた (菅野)。

カルバマゼピンおよびバルプロ酸について、神経管欠損などの生殖発生毒性が知られている。本研究に於けるマウスES細胞を用いた試験では、ともに弱毒性の評価であったが、マウスES細胞でのバルプロ酸のIC50が治療濃度域内(0.3-0.7mM)の0.56mMであり、また神経系の発生により強く影響を及ぼしていることから、カルバマゼピンよりもバルプロ酸の方が高い奇形発症作用を有するものと推定された。また、培養神経系細胞を用いた解析により、バルプロ酸は、神経突起促進作用を有すること、それがGadd45a遺伝子等を介していることが明らかとなった。これは、バルプロ酸が神経細胞の分化に影響を及ぼすことが個体レベルで報告されていることに対応するものと考えられた。すなわちこれらの結果は、培養細胞系は、適切に用いることで化学物質作用を分子レベルで解明する良いツールとなることを裏付けるものと考えられた (田上)。

響を及ぼすことが個体レベルで報告されていることに対応するものと考えられた。すなわちこれらの結果は、培養細胞系は、適切に用いることで化学物質作用を分子レベルで解明する良いツールとなることを裏付けるものと考えられた (田上)。

E. 結論

本研究の成果は、子どもに対する化学物質の影響を、高次生体機能の恒常性維持機構発達メカニズムの成熟過程に基づいて考察し、正確なリスク評価を実施することを可能とすることにある。

本研究に於いて、化学物質による子どもへの健康影響リスク評価に役立てる基礎的知見を得るため、発生成長段階検討、脳神経系、免疫系、内分泌系、外挿問題解析の各テーマについて基礎研究を推進した結果、各々のテーマについて「子どものリスク評価」を科学的に検討する基礎となる知見が得られた。特に自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達するという、従来の常識を覆す知見は特筆すべき結果であった。「子どものリスク評価」を科学的に検討するためには、更に基礎研究を続け、本研究で得られたような科学的根拠となる知見を集積する必要がある。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

Ema M, Fukunishi K, Hirose A, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Kamata E. (in press)
Repeated dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber
2-(3', 5'-di-*tert*-butyl-2'-hydroxyphenyl)

- 5-chlorobenzotriazole in rats. Drug Chem Toxicol.
- Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E (2008) Two-generation reproductive toxicity study of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide in rats. *Reprod Toxicol*, 25, 21-38.
- Ema M, Fujii S, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M (in press) Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod Toxicol*, 25 (3)
- Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (in press) Lack of Gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem Toxicol*.
- Hirata-Koizumi M, Noda A, Hirose A, Kamata E, Ema M. (in press) Reproductive and developmental toxicity screening test of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. *Reprod Toxicol*.
- Matsumoto M, Furuhashi T, Poncipe C, Ema M. (in press) Combined repeated dose and reproductive/developmental toxicity screening test of the nitrophenolic herbicide dinoseb, 2-*sec*-butyl-4,6-dinitrophenol, in rats. *Environ Toxicol*.
- Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A, Kamata E. (2008) Evaluation of developmental neurotoxicity of polysorbate 80 in rats. *Reprod Toxicol* 25, 89-99.
- Hirata-Koizumi M, Ogata H, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (2008) A 52-week repeated dose toxicity study of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 81-96.
- Hirata-Koizumi M, Matsuyama T, Imai T, Hirose A, Kamata E, Ema M. (2008) Gonadal influence of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl) benzotriazole in rats. *Drug Chem Toxicol*, 31, 115-126.
- Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. (2008) Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regulat Toxicol Pharmacol*, 50, 37-49.
- Ema M, Fujii S, Yabe K, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M. (2007) Evaluation of reproductive and developmental toxicity of the rubber accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazole sulfenamide in rats. *Congenit Anom Kyoto*, 49, 149-155.
- 江馬 眞 (2007) 有機スズ化合物の生殖発生毒性、国立医薬品食品衛生研究所報告. 125, 35-50.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) OECD 化学物質対策の動向 (第 12 報) - 第 20 回、第 21 回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2005 年パリ、ワシントン DC)、*化学生物総合管理学会雑誌*, 3, 43-55.
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、

- 菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞
(2007) OECD 化学物質対策の動向(第13報)
—第22回 OECD 高生産量化学物質初期評価会
議(2006年パリ)、国立医薬品食品衛生研究
所報告, 125, 101-106.
- 松本真理子、大井恒宏、宮地繁樹、菅谷芳雄、江
馬 眞 (2007) OECD 高生産量化学物質点検プ
ログラム—第23回初期評価会議概要, 化学
生物総合管理学会誌, 3, 56-65.
- 松本真理子、山本展裕、宮地繁樹、菅谷芳雄、江
馬 眞 (2007) OECD 高生産量化学物質点検プ
ログラム—第24回初期評価会議概要, 化学
生物総合管理学会誌, 3, 180-189.
- 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
- 松本真理子、日下部哲也、川原和三、菅谷芳雄、
江馬 眞 (2006) OECD 高生産量化学物質点検
プログラム: 第22回初期評価会議概要, 化
学生物総合管理学会誌, 2, 302-312
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、
菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞
(2006)、OECD 化学物質対策の動向(第10報)
—第18回 OECD 高生産量化学物質初期評価会
議(2004年パリ)、化学生物総合管理学会雜
誌, 2, 286-301
- 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
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、
菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞
(2006) OECD 化学物質対策の動向(第9報)
—第17回 OECD 高生産量化学物質初期評価会
議(2003年アローナ), 化学生物総合管理学
会誌, 2, 163-175
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、
菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞
(2006) OECD 化学物質対策の動向(第8報)
—第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会
議(2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌,
2, 147-162
- 松本真理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞
(2006) OECD 高生産量化学物質点検プログラ
ム: 第21回初期評価会議概要, 化学生物総
合管理学会誌, 2, 135-146
- 松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌
田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2006) OECD
高生産量化学物質点検プログラム: 第18回初
期評価会議までの概要 化学生物総合管理学
会誌, 2, 104-13
- 江馬 眞 (2006) OECD の高生産量化学物質安
全性点検プログラムとその手順、化学生物総
合管理学会, 2, 83-103
- 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-*o*-
hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in
Rat. *Drug Chem Toxicol*, 29, 215-225
- 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
- 高橋美加、松本真理子、川原和三、菅野誠一郎、菅谷芳雄、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、OECD 化学物質対策の動向 (第8報) -第16回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2003年パリ)、化学生物総合管理学会誌
- 松本真理子、高橋美加、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞、OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第18回初期評価会議までの概要、化学生物総合管理学会誌
- Hamamura M, Hirose A, Kamata E, Katoku K, Kuwasaki E, Oshikata T, Nakahara Y, Ema M, Hasegawa R. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific $\alpha 2u$ -glubulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *J Toxicol Sci*, 31, 35-47, 2006.
- Ema M, Hirose A. (2006) Reproductive and developmental toxicity of organotin compounds. Golub MS, Ed. *Metals, Fertility, and Reproductive Toxicity*, CRC Press, Boca Raton, pp. 23-64
- Hayashi M, Kamata E, Hirose A, Takahashi M, Morita T, Ema M. (2005) In silico assessment of chemical mutagenesis in comparison with results of Salmonella microsome assay on 909 chemicals. *Mutat Res*, 588, 129-135
- Hirata-Koizumi, M., Hamamura M, Furukawa H, Fukuda N, Ito Y, Wako Y, Yamashita K, Takahashi M, Kamata E, Ema M, (2005) Hasegawa R. Elevated susceptibility of newborn as compared with young rats to 2-*tert*-butylphenol and 2,4-di-*tert*-butylphenol toxicity. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 146-153
- Hasegawa R, Hirata-Koizumi, M., Takahashi M, Kamata E, Ema M. (2005) Comparative susceptibility of newborn and young rats to six industrial chemicals. *Congenit Anom Kyoto*, 45, 137-145
- 松本真理子、鈴木理子、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2005) OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第20回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 445-453
- 高橋美加、平田睦子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2005) OECD 化学物質対策の動向 (第7報) -第15回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002年ボストン)、衛研報告、123, 46-52
- 松本真理子、田中里依、川原和三、菅谷芳雄、江馬 眞 (2005) OECD 高生産量化学物質点検プログラム:第19回初期評価会議概要、化学生物総合管理学会誌 1, 280-288
- Hirata-Koizumi M, Nishimura N, Enami T, Wada H, Ogata H, Yamamoto Y, Ito Y, Kamata E, Ema

M, Hasegawa R. (2005) Susceptibility of new born rats to the hepatotoxicity of 1,3-dibromopropane and 1,1,2,2-tetrabromoethane, compared with young rats. J. Toxicol. Sci., 30, 29-42

Ema M, Hara H, Matsumoto M, Hirose A, Kamata E. (2005) Evaluation of developmental toxicity of 1-butanol given to rats in drinking water throughout pregnancy. Food Chem Toxicol, 43, 325-331

高橋美加、平田陸子、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、長谷川隆一、江馬 眞 (2005) OECD 化学物質対策の動向 (第6報) - 第14回 OECD 高生産量化学物質初期評価会議 (2002年パリ)、化学生物総合管理学会誌、1, 46-55

学会発表

Ema M, Matsuyama T, Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Hirose A. and Kamata E. (2007). Toxicity of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB) in pre-weaning rats. International Congress of Toxicology XI

Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M, Hirose A. and Kamata E. (2007). Evaluation of two-generation reproductive toxicity of a vulcanization accelerator N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamide (DCBS) in rats. 2007 EUROTOX

Ema M, Matsumoto M, Furuhashi T. and Poncipe C. (2007). Screening study for repeated dose and reproductive and developmental toxicity of the nitrophenolic herbicide dinoseb in rats. SETAC North America 28th Annual Meeting (11/11-15, Milwaukee)

Ema M, Fujii S, Hirata-Koizumi M, Matsumoto M. (2008) Evaluation of two-generation reproductive toxicity of flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) in rats. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

Harada T, Kimura E, Hirose A, Kamata E. and Ema M. (2007). Reproductive/developmental screening toxicity of 4-aminophenol in rats. 2007 EUROTOX

Hirata-Koizumi M, Hasegawa R, Hirose A, Ema M (2008) Proposal for safety exposure level of nitrobenzene through foods and drinking water. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

Hirose A, Kato H, Ise R, Oneda S, Hirata-Koizumi M, Ihara T, Ema M. (2008) Early response in gene expression profiles in monkey embryos following maternal exposure to thalidomide during the susceptible period for malformations. The 47th Annual Meeting of the Society of Toxicology.

Matsuyama T, Hirata-Koizumi M, Imai T, Hirose A, Kamata E. and Ema M. (2007). Toxicity of ultraviolet absorber 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB) in castrated rats. International Congress of Toxicology XI

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-chlorobenzo triazole (DBHCB) in rats during the pre-weaning period. The 46th Annual Meeting of the Society of

- Toxicology (Charlotte, 3/25-29, 2007)
- Fukunishi K, Matsumoto M, Hirata-Koizumu M, Hirose A, Kamata E, Emma 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 (Charlotte, 3/25-29, 2007)
- Hirose A, Yamazoe Y, Emma 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 (Charlotte, 3/25-29, 2007)
- 江馬 眞 (2007) 神経発生毒性試験、平成19年度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学 10月28日
- 江馬 眞 (2007) 生殖発生毒性試験、平成19年度後期「化学・生物総合管理の再教育講座」化学物質リスク評価の基礎2、お茶の水女子大学 10月28日
- 江馬 眞、原 洋明、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2007) ポリソルベート80のラットにおける発生神経毒性、第34回日本トキシコロジー学会学術集会 (6月27日、東京)
- 江馬 眞 (2007) OECD Developmental Neurotoxicity Studyガイドライン・ドラフトのその後、第47回日本先天異常学会学術集会 (7月7日、名古屋)
- 江馬 眞、伊藤義彦、松本真理子、平田睦子、広瀬明彦、鎌田栄一 (2007) 加硫促進剤 N,N-dicyclohexyl-2-benzothiazolesulfenamideのラットにおける反復/生殖発生毒性併合試験、第47回日本先天異常学会学術集会 (7月8日、名古屋)
- 平田睦子、渡 修明、向井大輔、今井俊夫、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)の28日間反復投与毒性試験、第34回日本トキシコロジー学会学術集会 (6月28日、東京)
- 平田睦子、松山隆史、今井俊夫、松本真理子、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞 (2007) 紫外線吸収剤2-(2'-hydroxy-3',5'-di-*tert*-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)を離乳前ラットに投与したときの影響、第47回日本先天異常学会学術集会 (7月8日、名古屋)
- 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、7/4-6)
- Hirose A, Aisaki H, Oh K, Matsumoto M, Kamata E, Igarashi K, Kanno J, Emma M. Gene Expression