

に関して、血清中の抗 α -fodrin抗体(anti-JS-1)、抗SSA抗体、及び抗SSB抗体をELISAにて定量化したところ、Ovx群、Sham群ともにTCDD投与により抗体価に変化は無く、両者にも差が認められなかった(図-7)。さらに、Th1型抗体産生あるいはTh2型抗体産生を示すことが知られているIgG2aあるいはIgG1の相対比に関してもOvx群、Sham群にて変化は認められなかった(図-7)。

4) TCDD投与による胸腺への影響

T細胞分化を司る胸腺組織へのTCDD暴露による影響をOvx群とSham群で比較した。TCDD非投与において、OvxによってCD4陰性CD8陰性(Double negative: DN)分画細胞数が有意に減少していることが判り、Sham群ではTCDD投与によりDN分画は減少傾向にあるのに対し、Ovx群ではDN分画の増加が見られ、TCDD 1000 ng/kg投与ではOvx群のDN分画はSham群に比較して有意に上昇していることが確認された(図-8)。Double positive (DP)分画、CD4陽性(CD4SP)分画及びCD8陽性(CD8SP)分画に関してはTCDDによる変化、Ovx、Sham群での差は目立たなかった。さらに、DN分画での詳細な分化過程を検討するために、DN分画におけるCD44⁺CD25⁻の発現を解析した(CD44⁺CD25⁻:DN1; CD44⁺CD25⁺: DN2; CD44⁻CD25⁺:DN3; CD44⁻CD25⁻:DN4)。OvxによりDN2への集積がSham群に比較して増加しており、TCDDの投与によりSham群ではDN2への集積は上昇しているのに対し、Ovx群では逆に低下することが明らかとなった(図-9)。また、OvxによりDN4への集積が低下しており、TCDDの投与により1000ng/kgではSham群と差が無くなっていた。また、DN3でのOvx群でSham群に比較して高濃度のTCDD投与により、集積が低下することが判った。

5) 胸腺および脾臓におけるAhR関連遺伝子、免疫関連遺伝子のTCDD投与による変動

胸腺において、TCDDの細胞内受容体の一つであるAhRのmRNA発現を検討すると、OvxによってSham群よりも低下することが判り、Sham群ではTCDD投与によりその発現は低下するものの、Ovx群では増加傾向にあった(図-10)。また、AhRを介

して転写が調節されていることが知られているNF- κ Bに関してもAhRの動態と類似していた。さらに、CYP1A1のmRNAは高濃度のTCDD投与によりOvx群で発現の増加傾向が認められた。一方で、T細胞の分化に関連した転写因子として、T-bet(Th1細胞分化に重要な因子)、GATA-3(Th2細胞分化に重要な因子)、あるいはRoRgt(Th17細胞分化に重要な因子)の発現を胸腺で確認すると、T-betとRoRgtの発現はOvx群とSham群とでの変化は認められなかったものの、GATA-3のmRNA発現はOvxによって著しく低下し、高濃度のTCDDによりOvxで低下したGATA-3mRNA発現はSham群と同程度に回復した(図-10)

一方、脾臓でのAhR関連遺伝子の発現にTCDD投与により著変は認められなかった。また、GATA-3の発現に関しては、胸腺での動態と類似して、Ovxでその発現が低下し、高濃度のTCDD投与によりSham群のレベルと同程度に回復した。T-betあるいはRoRgtのmRNA発現に関して変化は認められなかった(図-10)。

6) 胸腺における自己抗原遺伝子発現

胸腺分化異常に基づいた自己免疫疾患の発症機序の一つとして、胸腺上皮細胞における自己抗原遺伝子の発現調節が重要であるということが知られている。そこで、唾液腺組織特異的自己抗原の一つとして知られているSalivary gland protein-1(SP-1)のmRNA発現を検討したところ、Ovxにより発現の増加傾向が見られ、TCDD投与により、Sham群、Ovx群ともに著しくSP-1の発現が低下することが明らかになった(図-11)。また、脾臓の臓器特異的自己抗原の一つとして知られているGAD67に関してはTCDD投与により両群ともに増加傾向にあるが、両者で発現に差は認められなかった(図-11)。さらに、胸腺における臓器特異的自己抗原の発現制御に重要とされている転写因子Autoimmune regulator(AIRE)のmRNA発現を観察してみたところ、AIREの発現はOvxによって有意に減少することが判り、TCDDの投与によりSham群では濃度依存的にAIREの発現が低下するのに対し、Ovx群では逆に上昇することが明らかとなった。

D. 考察

今回の研究では卵巣を摘出することによって、生体内のエストロジェンを欠乏した状態におけるダイオキシン暴露が免疫システムにどのような影響を明らかにすることが目的である。本研究で用いられたNFS/sldマウスは生後3日目に胸腺を提出することで涙腺、唾液腺に限局する自己免疫性病変を誘導さら、ヒトシェーグレン症候群の疾患モデルとして知られている(*J Immunol* 153:2769-2777, 1994, *Science* 276:604-607, 1997)。今回の研究では、胸腺摘出を行うことなく、卵巣摘出とTCDDの暴露により唾液腺に激しい炎症性病変が誘導された。本来の疾患モデルの病理組織像と類似した病変であったが、モデルマウスで高率に観察される自己抗体の産生上昇は今回の実験群では観察されなかった。また、末梢の活性化状態に関しても疾患モデルで確認されている各種マーカーのメモリー型へのシフトは観察されなかったが、T細胞のIFN- γ 産生は卵巣摘出マウスにTCDDを投与して群では対照群よりも有意に上昇していたことから、病態の発症にTh1型のT細胞の関与が示唆される。Sham群でもTCDD投与により中等度の炎症性病変が観察された個体があったが、解析時に8ヶ月齢に達しており、加齢的变化にTCDDの影響が加わった可能性がある。これまでの検討でもTCDD暴露後、長期の観察で変化が現れること、内分泌かく乱物質の“Low dose-late effect”という性質は従来より報告されている。今後、免疫系の加齢的变化とTCDDの関係も検討する必要がある。

性ホルモンは免疫系に様々な影響を及ぼすことが知られているが、これまでに、今回用いたNFS/sldマウスに生後3日目に胸腺摘出を施した後、4週齢にて卵巣摘出を行い、経時的に観察すると、涙腺、唾液腺における自己免疫病変の増悪が認められた(*Am. J. Pathol.* 155:173-181, 1996)。また、関節リウマチの疾患モデルとして知られるMRL/lprマウスに卵巣摘出を施すことにより関節病変が増悪することを報告している(*Endocrinology* 145:2384-2391, 2004)。さらに、エストロジェン欠乏によりシェーグレン症候群の標的臓器である唾液腺細胞において細胞周期関連因子であるRetinoblastoma-associated protein-48(RbAp48)を介して、アポトーシスが誘導さ

れることを見いだした(*Mol. Cell Biol.* 26:2925-2935, 2006)。加えて、RbAp48遺伝子トランスジェニックマウスはシェーグレン症候群様の自己免疫疾患を発症することも報告した(*J. Exp. Med.* 2205:2915-2927, 2008)。このようにエストロジェンは生体内で免疫系あるいは標的臓器に大きく影響することにより自己免疫を含めた免疫不全疾患の発症に関与しているものと考えられる。特にエストロジェンの低下を伴う閉経期の女性に自己免疫疾患の発症ピークが存在することを説明する上で極めて重要な所見といえる。本研究において、卵巣を摘出することによりエストロジェンが欠乏した状態で、エストロジェン様作用あるいはその作用を阻害するとされるTCDDの暴露により、TCDDのかく乱作用が強調された影響として、唾液腺組織での炎症性病変の惹起につながった可能性が考えられる。

エストロジェン欠乏状態でのTCDD暴露により、末梢の免疫系には決定的な変化が認められなかったが、中枢免疫システムである胸腺においては、エストロジェン欠乏のみですでに、分化異常が確認され、その上にTCDD暴露が加わると、さらに分化異常を来すことが明らかとなった。平成16年度から18年度までの本事業における研究で、新生児期へのTCDD投与によりシェーグレン症候群様の炎症性病変が誘導されることを見だし、その分子機序として、生後3日目での胸腺組織におけるAhRの発現亢進がTCDDに対する反応性に大きな影響が及ぼされていたものと考えられた(*J. Immunol.* 182:6576-6586, 2009)。今回の卵巣摘出マウスへのTCDD投与ではAhRの発現に関しては胸腺組織あるいは脾臓組織においてそれぞれの実験群で著変は観察されなかった。AhRの発現は生後3日目の胸腺組織で亢進した後、急激にその発現は低下することが明らかになっていることから(*J. Immunol.* 182:6576-6586, 2009)、生体内の環境変化により大きくその発現が変化する可能性が考えられる。今後、卵巣摘出前後でのその発現に関して検討を加える必要がある。また、新生仔期でのTCDD投与ではAIREの発現あるいは臓器特異的自己抗原の変化が認められた(*J. Immunol.* 182:6576-6586, 2009)。今回の研究でもAIREの発現及びSP-1の発現がTCDD投与で大きく変化したが、卵巣摘出の影響は

明らかにならなかった。しかし、胸腺細胞の分化自体が卵巣摘出で影響を受けていることから、胸腺細胞の選択システムにエストロゲンそのものの影響及びTCDDの影響が複雑に関連しているものと想定される。

胸腺組織、脾臓組織ともにTh2型T細胞の分化に重要とされる転写因子であるGATA-3の発現が卵巣摘出で有意に低下していた。1000 ng/kgのTCDDの暴露によりGATA-3のmRNAレベルは対照群と同程度になっていたことから、Th2細胞への分化異常から相対的なT細胞分化の不均衡を生じ、IFN- γ 産生Th1型のT細胞が炎症性病変を発症させた可能性が考えられる。近年、AhRを介したシグナルがTh17あるいは調節性T細胞の分化に重要であるという報告が成された(Nature 2008)。本研究では卵巣摘出群でTCDD投与により病変が誘導されていたのに反し、脾臓細胞中のFoxp3陽性調節性T細胞の割合が有意に上昇していた。今後、調節性T細胞の機能におけるエストロゲンあるいはTCDDの関係を探索する必要がある。

TCDDは細胞内のレセプター(AhR)と結合し、核内に移行した後、AhR nuclear translocator (ARNT)と複合体を形成し、プロモーター領域にXenobiotic response elements(XRE)を有する標的遺伝子の転写調節をすることが知られている。また、その標的遺伝子にはNF- κ Bなどのサイトカインの調節に重要な遺伝子も含まれており、TCDDのサイトカイン産生制御機構が存在することが考えられる。エストロゲン欠乏とTCDD暴露が免疫系に大きく影響を及ぼすのかはまだ不明な点が多いが、女性の周産期及び閉経期に免疫システムに何らかの大きな変化が生じており、そこにTCDDのような内分泌かく乱物質の暴露がさらなる免疫異常を引き起こす可能性が想定される。

今後、さらに詳細な分子機序を明らかにすることにより、周産期における内分泌かく乱物質の影響に関して有益な情報を提供できるものと考えられる。

E. 結論

シェーグレン症候群疾患モデルNFS/*sld*雌マウスに卵巣摘出を施した上に、TCDDを投与すると、8ヶ月齢にて唾液腺に激しい炎症性病変が観察され、

その機序として、胸腺でのT細胞の分化異常、T細胞のサイトカイン分泌異常が認められた。

F. 健康危険情報

現在の時点で該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, and Hayashi Y : Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-*p*-dioxin (TCDD) causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. *J Immunol* 182:6576-6586, 2009
2. Arakaki R, Nagaoka A, Ishimaru N, Yamada A, Yoshida S, and Hayashi Y : Role of plasmacytoid dendritic cells (pDCs) for aberrant class II expression in the exocrine glands from estrogen-deficient mice of healthy background. *Am J Pathol* 174:1715-1724, 2009
3. Ishimaru N, Arakaki R, Yoshida S, Yamada A, Noji S, and Hayashi Y : Expression of the retinoblastoma protein RbAp48 in exocrine glands leads to Sjogren's syndrome-like autoimmune exocrinopathy. *J Exp Med* 205, 2915-2927, 2008
4. 石丸直澄、林 良夫:ダイオキシンによる免疫異常 臨床免疫・アレルギー科 51(1):60-65, 2009
5. 石丸直澄、小橋真之、山田安希子、新垣理恵子、林 良夫:新生児期におけるダイオキシンへの暴露と自己免疫疾患の発症 臨床免疫・アレルギー科 53(1)(印刷中), 2010

2. 学会発表

1. 低用量ダイオキシンの新生仔期投与による自己免疫病変の誘導 日本免疫学会総会学術集会記録、39巻 p161, 2009
2. Neonatal exposure to low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) causes autoimmunity in salivary glands due to the

- disruption of T cell tolerance. Th 11th International Symposium on Exocrine Secretion Program and Abstract p.8, 2009
3. 自己免疫病と性差 日本病理学会会誌、97巻第1号 p.170 2008
 4. エストロジェン欠乏による外分泌腺上皮クラスII発現の誘導メカニズム 日本病理学会会誌、97巻第1号 p.322, 2008
 5. 低用量TCDDの新生児期投与による自己免疫

病変の誘導 日本免疫学会総会学術集会記録、38巻 p.97, 2008

6. エストロジェン欠乏によって唾液腺組織に発現増強されるCD11c+B220+樹状細胞の同定とその機能解析 日本免疫学会総会学術集会記録、38巻 p.97, 2008.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
本年度該当なし

図説明

図一1 卵巣摘出マウスへのTCDD投与実験プロトコール

6週齢雌マウスに卵巣摘出(Ovx)、TCDDの腹腔内投与後、2ヶ月及び4ヶ月にて末梢血を採取し、T細胞分画をフローサイトメーターにて確認した。Ovx後6ヶ月(8ヶ月齢)にて解析を行った。グラフはOvx後4ヶ月の末梢血単核球におけるCD4陽性、CD8陽性T細胞の割合を示す。

図一2 唾液腺組織における炎症性病変の病理組織学的評価

上段は各群の唾液腺(顎下腺)、涙腺組織に関して病理組織学的評価を示す。下段は唾液腺組織における代表的な病理組織写真を示す(ヘマトキシリンエオジン染色)。

図一3 TCDD投与による脾臓でのT細胞分画

上段は各群の脾臓におけるCD4/CD8のT細胞分画に関してフローサイトメーターによる解析プロファイルを示す。下段は各群の陽性細胞数(%)の平均±SDを示す。

図一4 TCDD投与による脾臓でのT細胞活性化マーカー

上段に各群の脾臓CD4陽性細胞におけるCD44及びCD62Lの発現をフローサイトメーターによる解析プロファイルで示す。下段にCD44^{high}CD62L⁻分画(メモリー型分画)の割合(%)を平均±SDで示す。

図一5 TCDD投与による脾臓T細胞におけるサイトカイン産生への影響

各群の脾細胞を固相化した抗CD3抗体にて24時間刺激後、培養上清における各サイトカイン濃度をELISAにて定量化した。数値は各群(3匹)の平均±SDを示す。

図一6 脾臓における調節性T細胞へのTCDD投与の影響

上段は各群における脾臓CD4陽性T細胞におけるFoxp3の発現をフローサイトメーターにて解析した。下段は各群のCD4陽性Foxp3陽性細胞数(%)を定量化した。数値は各群(4~6匹)の平均±SDを示す。

図一7 脾臓におけるB細胞および血清自己抗体の産生におけるTCDD投与の影響

上段は脾臓におけるB220陽性B細胞の割合を示す。数値は各群(4~6匹)の平均±

SDを示す。中、下段は血清中の自己抗体あるいはIgGサブクラスをELISAにて定量化し、各群の平均±SDをOD値にて示す。

図-8 胸腺におけるT細胞分化におけるTCDD投与の影響

上段は各群の胸腺細胞におけるCD4/CD8のフローサイトメーターによる解析プロファイルを示す。下段は各分化段階における陽性細胞数(%)を示す。数値は各群(4~6匹)の平均±SDを示す。

図-9 胸腺における初期T細胞分化へのTCDD投与の影響

上段は各群のCD4/CD8 double negative(DN)分画におけるCD25/CD44の発現をフローサイトメーターによる解析プロファイルを示す。下段は各分化段階における陽性細胞数(%)を示す。数値は各群(4~6匹)の平均±SDを示す。

図-10 胸腺組織および脾臓組織における各mRNA発現におけるTCDD投与の影響

胸腺および脾臓における各因子のmRNAの発現をreal-time RT-PCR法にて定量化した。各因子のb-actin mRNAに対する相対値を平均±SDで示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$

図-11 胸腺における臓器特異的自己抗原及びAIRE発現へのTCDD投与の影響

胸腺組織におけるSP-1、GAD67及びAIREのmRNA発現をreal-time RT-PCR法にて定量化した。各mRNAのb-actin mRNAに対する相対値を平均±SDで示す。

図-1

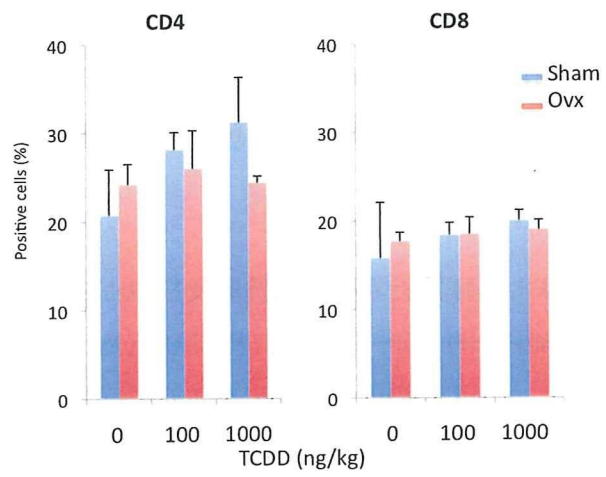
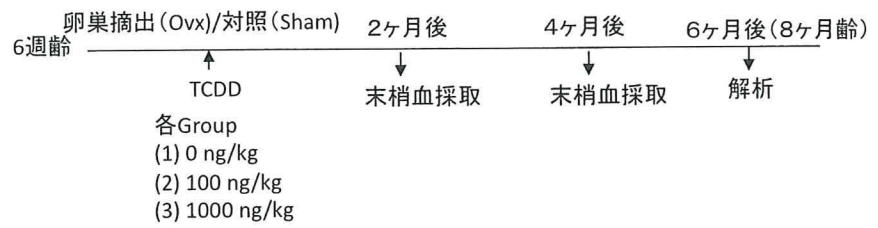


图-2

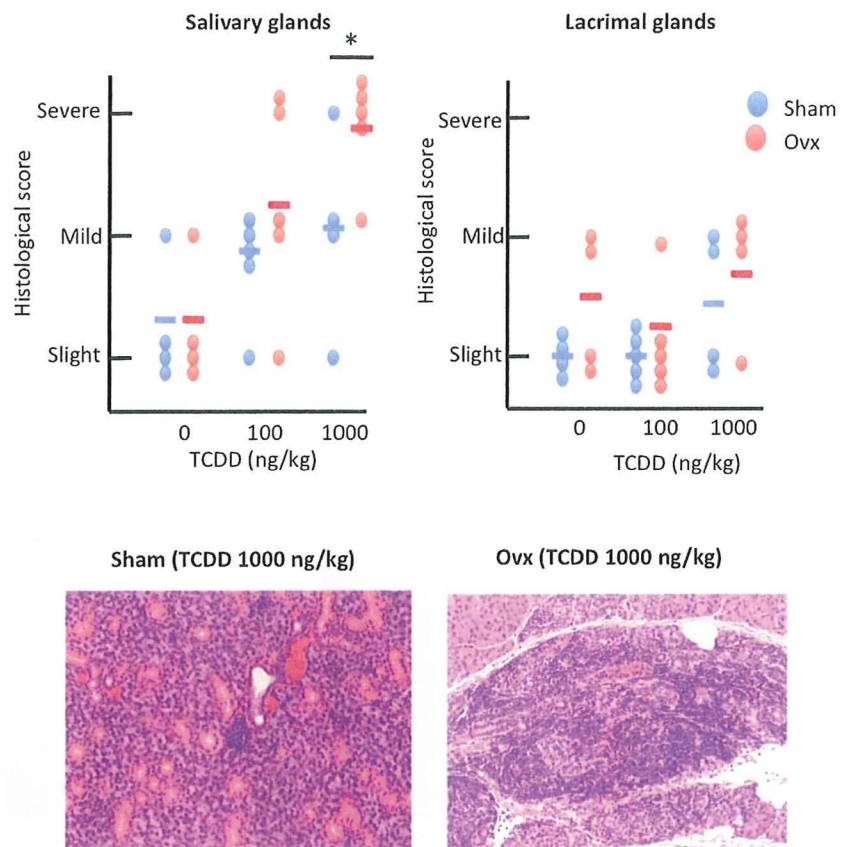


Figure 3

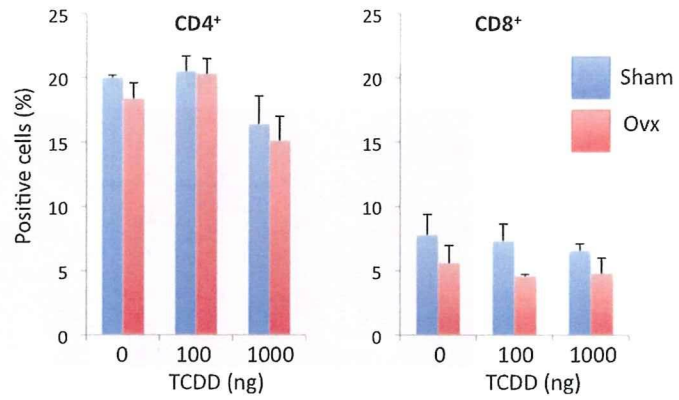
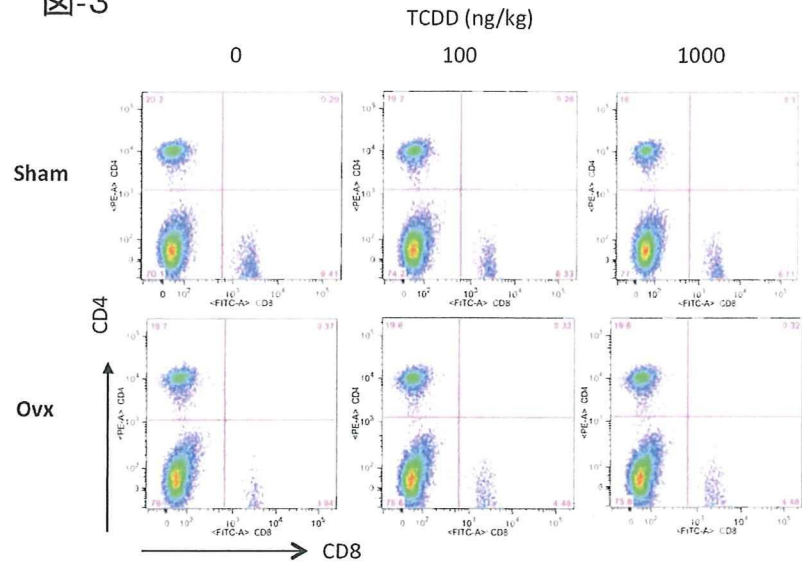


图-4

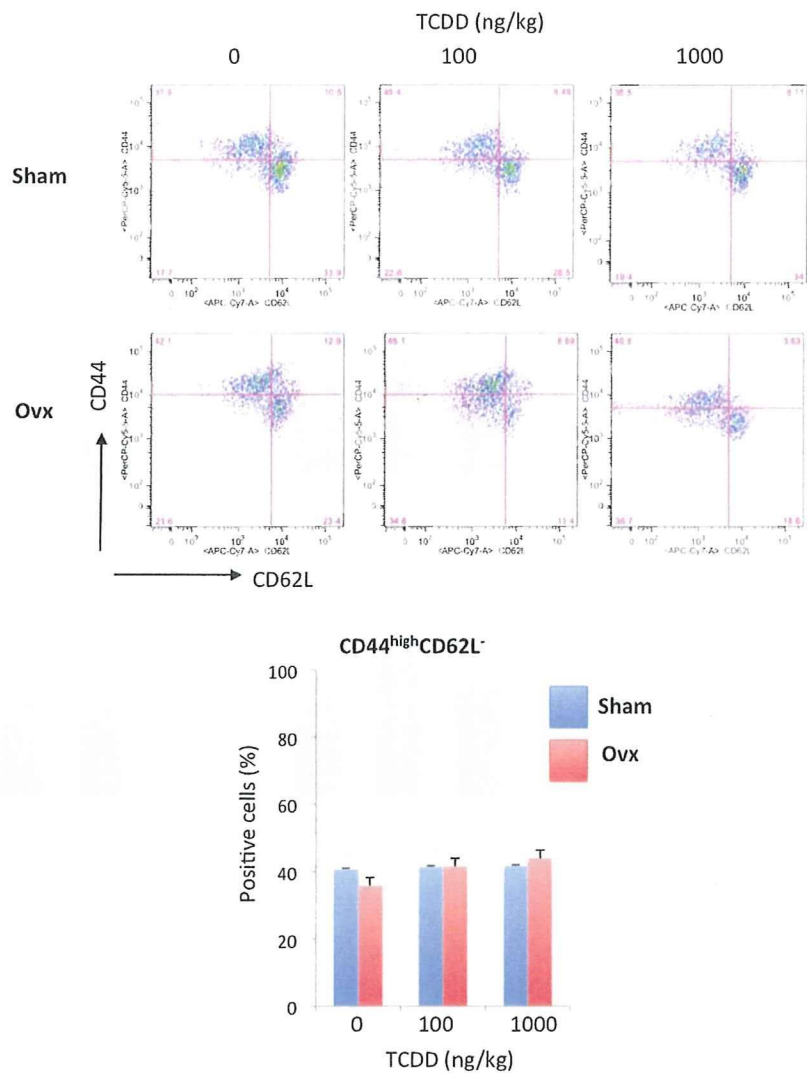


图-5

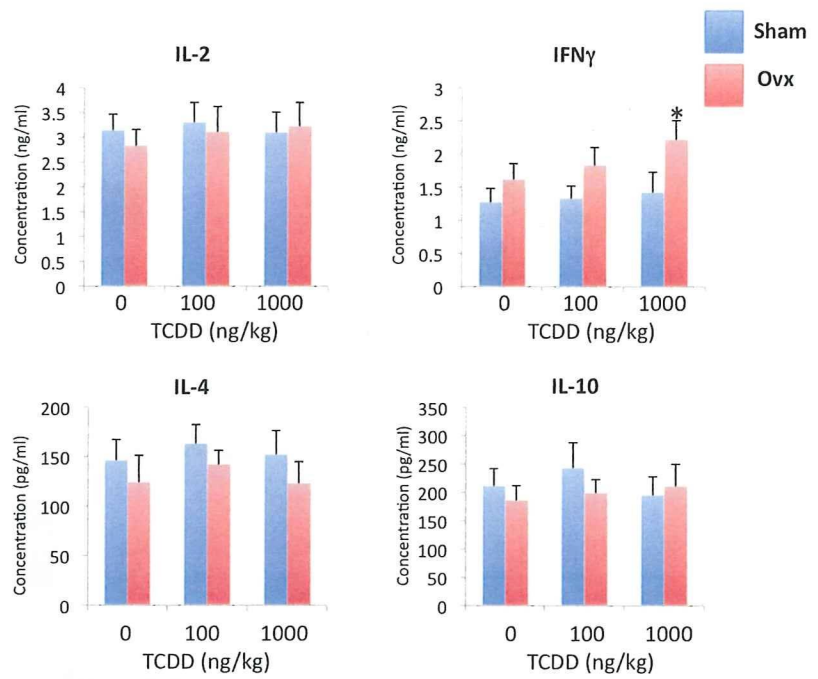


图-6

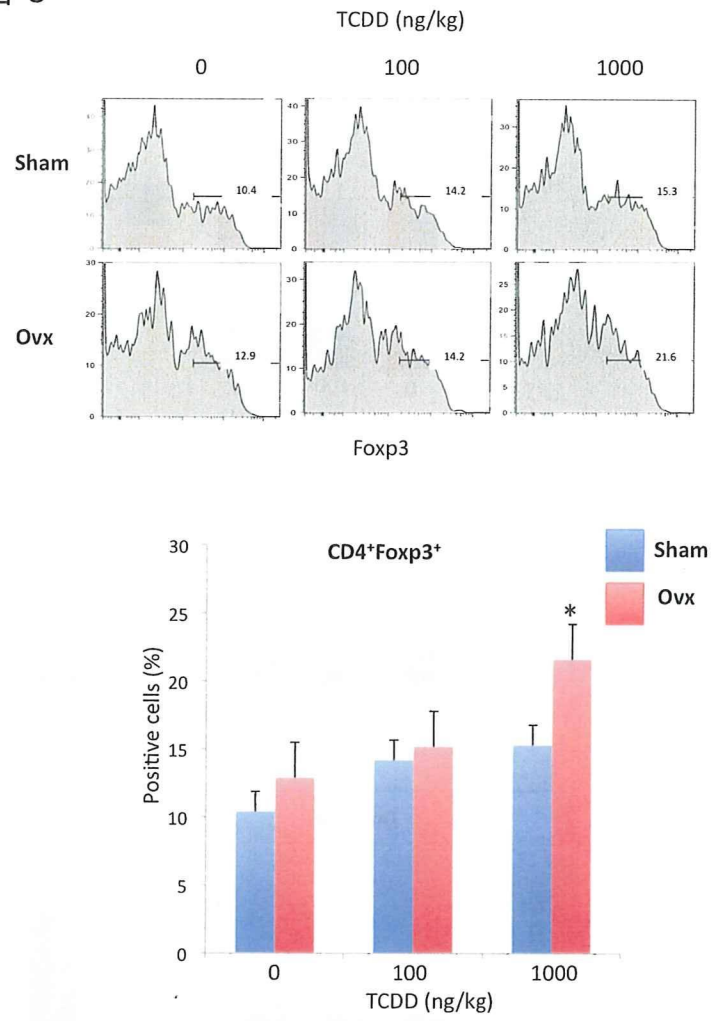
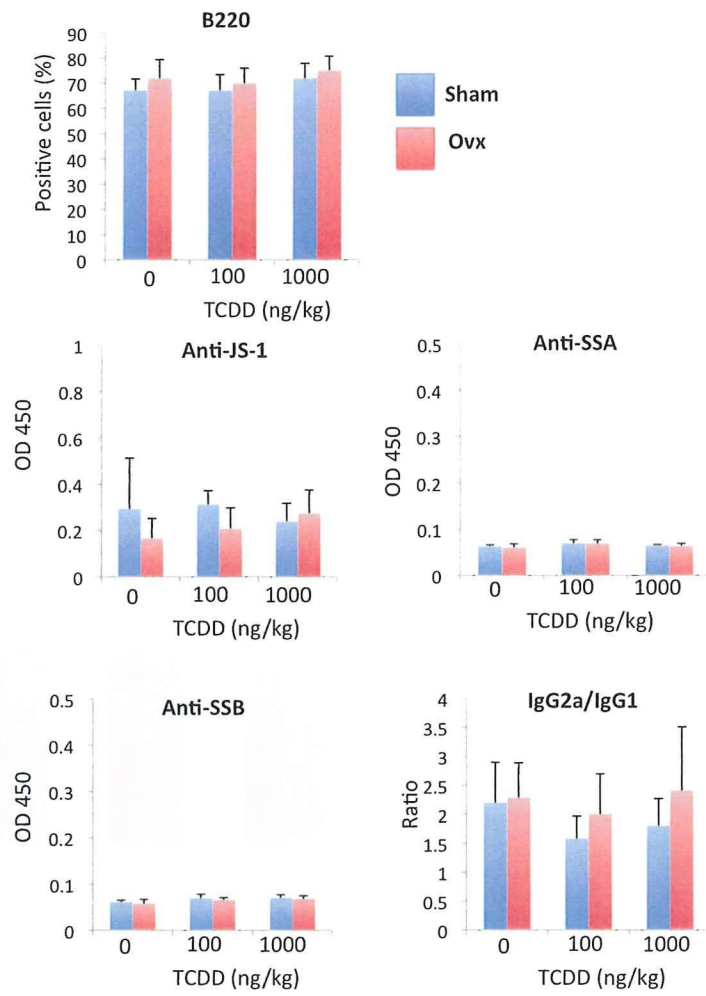


图-7



8

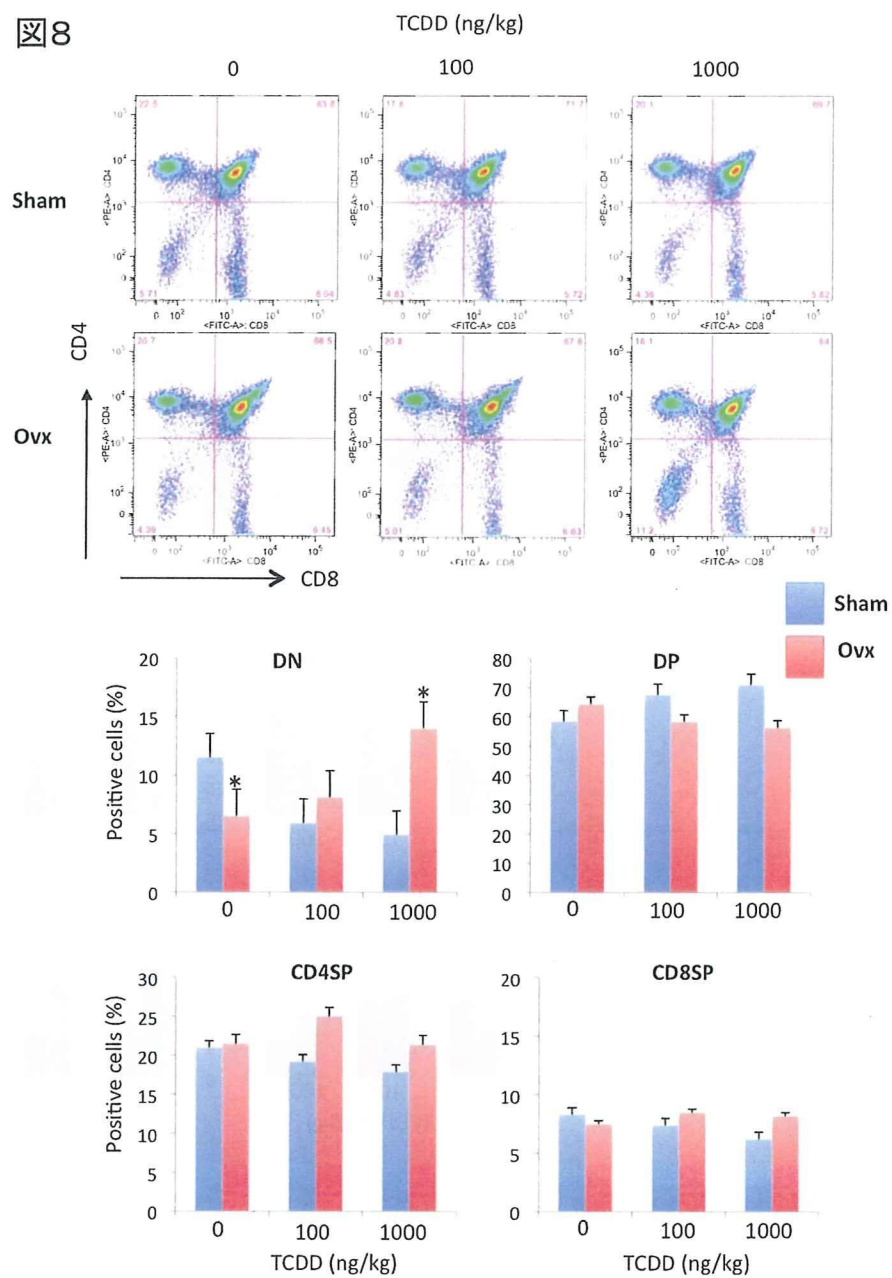


图-9

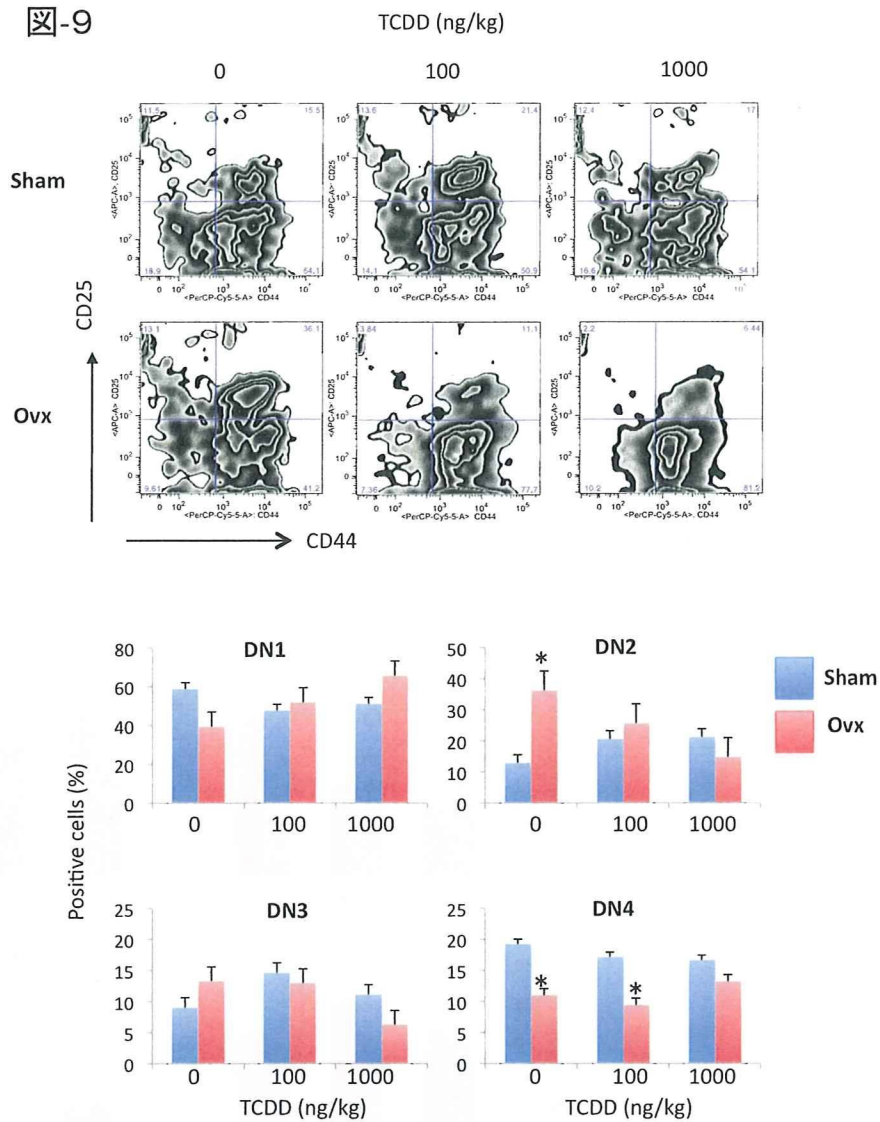


Figure 10

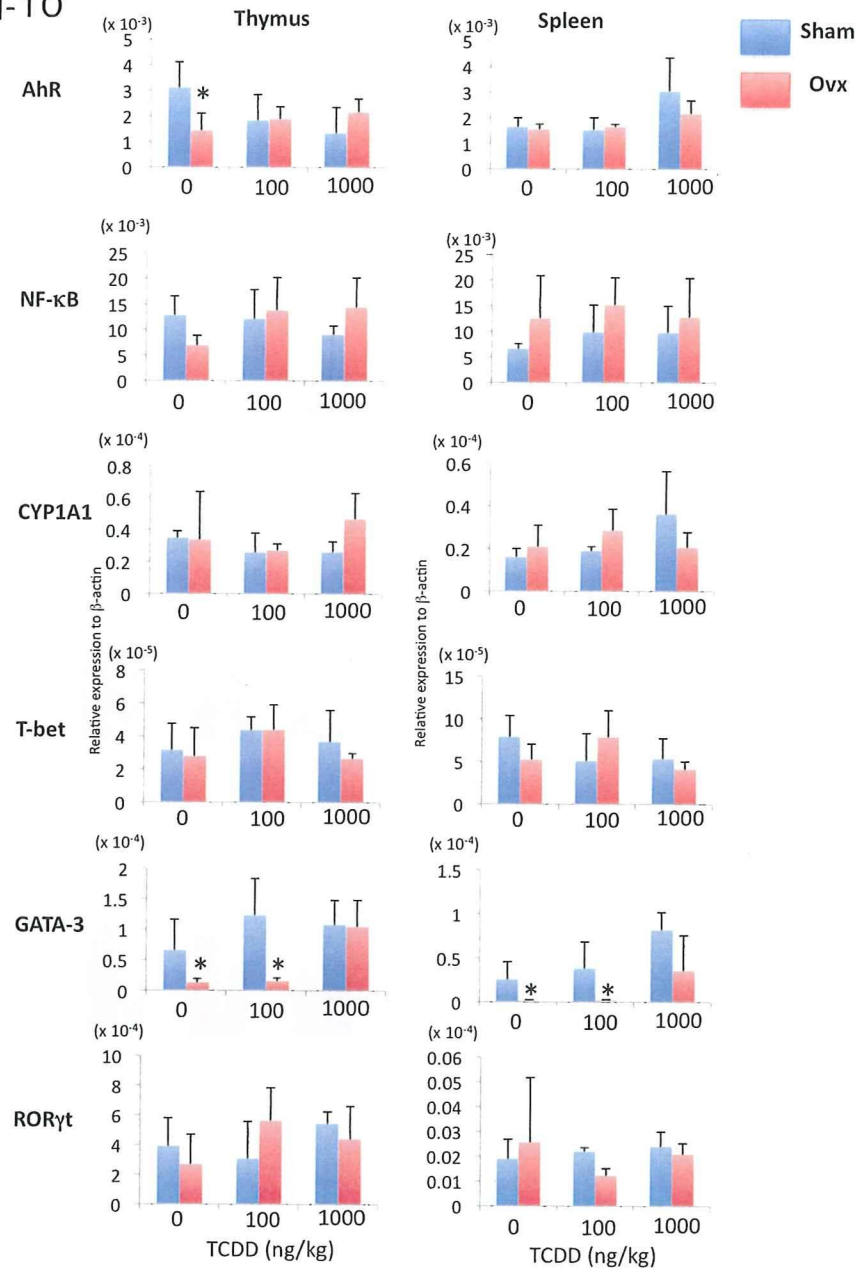
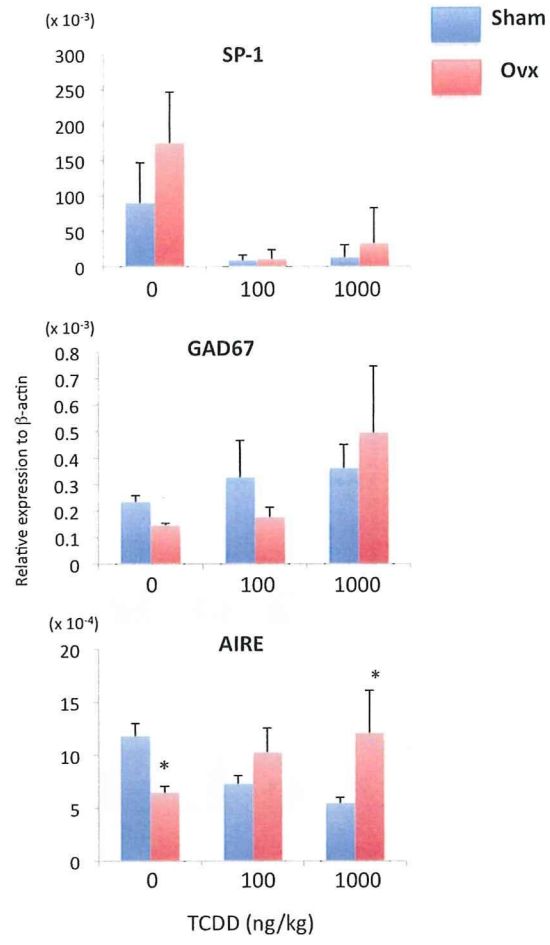


图 11



6. 化学物質の周産期暴露及び*in vitro*暴露の初期免疫応答に対する影響評価

研究分担者 武吉正博 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 課長
研究協力者 宮浦英樹 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所
研究協力者 堀内雅史 財団法人 化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所

研究要旨

CBA/JN マウスに 50 μ g/kg/day 及び 50 mg/kg/day の用量で BisphenolA (BisA)を経胎盤・経乳汁曝露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には影響はみられなかったが、出生仔を対象としたマウス局所リンパ節増殖試験(Local Lymph Node Assay, LLNA)を実施した結果、BisA の経胎盤・経乳汁曝露の雄仔獣について、0.5% 2,4-dinitrochlorobenzene に対する感作性応答の促進が認められる結果となった。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質の影響は動物の生殖能に対するものではなく神経系、免疫系に対する影響も示唆されている。そこで、化学物質の動物の免疫系に対する影響評価法としてのマウス局所リンパ節増殖試験(Local Lymph Node Assay, LLNA)を用いた検証実験を実施する。

B. 研究方法

1. 交配

CBA/JN Crj (日本チャールスリバー株式会社)を雌雄7週齢で購入し、5日以上検疫を行った後、雄1匹、雌2匹を一晩同居させ交配させた。交尾確認はプラグが確認できた雌について交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠0日(P0)とした。

2. 被験物質、投与期間および投与経路

BisphenolA (BisA, Lot No. ALP4850、和光純薬工業株式会社)を用い、媒体としてコーン油(Lot No. PEG0519、株式会社フヂミ製作所)を用いた。

投与は妊娠5日からBisAを高用量群50 mg/kg/day、低用量群50 μ g/kg/dayにて母動物に経口投与し、媒体対照群(VC)としてオリーブ油を投与する群を設けた。各群の母動物数

は12匹とし、投与は毎日午前中に、離乳日(分娩21日)まで行った。

3. 離乳

仔動物は分娩後21日に離乳を行った。

4. 検査

1) 母動物

一般状態および哺育状態は投与開始日から解剖日まで毎日1回以上観察した。体重はP0、5、12、19日、分娩後0、4、7、14、21日に測定した。妊娠動物は全例を自然分娩させ出産率、妊娠期間を求めた。

2) 仔動物

出生日に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、性別の検査を行った。一般状態については離乳日まで毎日1回以上観察した。体重は出生日から1週間に1回測定した。

5. LLNA

仔動物8-10週齢時に雌雄それぞれ同一投与群の仔動物を乱数による無作為抽出から群分けを行い、LLNAにおける媒体としてアセトン/オリーブ油混液(AOO)及び感作性陽性対照物質として0.5% 2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB)

を動物の両耳介に25 μ Lずつ3日間連続塗布を行った。最終感作の約48時間後に10 mg/mLの5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を腹腔内投与した後、その約24時間後に解剖し、耳介リンパ節を採取した。ELISA法により採取したリンパ節におけるBrdU取り込み量の測定を行った。

各個体のBrdU測定値を算出した後、媒体対照群、BisA低用量群及びBisA高用量群の各AOO群の平均値を算出した。各個体のBrdU測定値を同一母動物投与群のAOO群の平均値で除した数値(Stimulation Index, SI)を算出した後、0.5%DNCB群の平均SI値及び標準誤差を算出し、母動物に対するBisA投与量を要因とした一元配置分散分析(One-way ANOVA)を実施し有意差の有無を検討した。

C. 研究結果

1. 母動物

媒体対照群、BisA低用量群及びBisA高用量群で分娩した動物はそれぞれ6/12匹、5/12匹、6/12匹であった。媒体対照群と比較していずれの群においても出産率、妊娠期間及び産仔数は媒体対照群と比較していずれの群においても影響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みられなかった。

1) LLNA雄仔動物について

媒体対照群におけるAOO群、0.5%DNCB群のSI値はそれぞれ1.00 \pm 0.15、7.15 \pm 0.24であった。

BisA低用量群におけるAOO群、0.5%DNCB群のSI値はそれぞれ1.00 \pm 0.22、12.45 \pm 0.66であった。

BisA高用量群におけるAOO群、0.5%DNCB群のSI値はそれぞれ1.00 \pm 0.10、11.86 \pm 0.87で

あった。

0.5%DNCB群について、媒体対照群に対してBisA低用量群及び高用量群で有意な上昇が認められた。

2) LLNA雌仔動物について

媒体対照群におけるAOO群、0.5%DNCB群のSI値はそれぞれ1.00 \pm 0.15、7.15 \pm 0.24であった。

BisA低用量群における0.5%DNCB群のSI値は16.51 \pm 0.55であった。

BisA高用量群におけるAOO群、0.5%DNCB群のSI値はそれぞれ1.00 \pm 0.19、14.35 \pm 0.23であった。

0.5%DNCB群について、媒体対照群に対してBisA高用量群で有意な高値が認められなかった。なお、BisA低用量群はAOO群の動物が確保できなかったため、媒体対照群におけるAOO群との比から、0.5%DNCB群のSI値を算出した。

D. 考察

CBA/JN マウスに50 μ g/kg/day 及び50 mg/kg/dayの用量でBisphenol A (BisA)を経胎盤・経乳汁曝露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖毒性学的指標には媒体対照群との間で統計的な有意差は認められず、BisAの経胎盤・経乳汁曝露による影響はないものと推察された。各群の母動物から生まれた出生仔の免疫機能への影響を検討するため、Th1誘導抗原(Dinitrochlorobenzene)を用いてNon-RI LLNA試験を実施したところ、50 μ g/kg/day 及び50 mg/kg/day投与群の出生雄仔獣において、抗原に対する統計的に有意なStimulation indexの上昇が確認され、初期免疫応答能が亢進している可能性が示唆された。

E. 結論

Bisphenol Aの経胎盤・経乳汁曝露により、出

生雄仔獣の初期免疫応答能が亢進される可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Tarama R, Kato H, Ishikawa Y, Miyaura H, Takeyoshi M, Iwata H. Gene expression changes induced by type IV allergy-inducible chemicals in dendritic cells. *J Vet Med Sci.*, 70(7):673-80, 2008.

Basketter D, Cockshott A, Corsini E, Gerberick GF, Idehara K, Kimber I, Van Loveren H, Matheson J, Mehling A, Omori T, Rovida C, Sozu T, Takeyoshi M, Casati S. An evaluation of performance standards and non-radioactive endpoints for the local lymph node assay. The report and recommendations of ECVAM Workshop 65. *Altern Lab Anim.*, 36(2):243-57, 2008.

Takeyoshi M, Iida K, Suzuki K, Yamazaki S. Skin sensitization potency of isoeugenol and its dimers evaluated by a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay and guinea pig maximization test. *J Appl Toxicol.*, 28(4):530-4, 2008.

2. 学会発表

Takeyoshi, M. Overview - Non-radioisotopic Local Lymph Node Assay Based on BrdU Incorporation. Independent Scientific Peer Review Panel Meeting on the Murine Local Lymph Node Assay, March 3, 2008.

Takeyoshi M., Miyaura H., Minobe Y., Takatsuki M. EFFECTS OF *IN UTERO* THROUGH LACTATIONAL EXPOSURE OF ETHYNYLESTRADIOL ON IMMUNE SYSTEM IN F1 MICE. 11th International Congress of Toxicology 2007 (ICT XI), July 15 - 19, 2007.

宮浦英樹、武吉正博:エチニルエストラジオールを用いたマウスにおける経胎盤・経乳汁暴露による出生仔の免疫系への影響、第14回日本免疫毒性学会各術大会(JSIT2007)、2007年9月20日～9月21日

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

なし