

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

内分泌かく乱性確定試験法及び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

(H16-化学-001)

平成17年度 (2005)

総括・分担研究報告書

主任研究者 小野 宏

(財) 食品薬品安全センター秦野研究所

平成18 (2006) 年3月

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. 総括補佐及び一生涯試験、OECD バリデーション関連総括
(Bisphenol A のラットを用いた子宮内・経胎盤暴露試験による低用量影響の検討；委託研究)

分担研究者 菅野 純

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 部長

研究要旨

従来の多世代繁殖毒性試験の限界を認識し、その改良を含む試験法開発を進めている。具体的には一生涯（発生、発達、成熟、老化）の全ての段階に於いて内分泌かく乱作用により懸念される毒性指標（神経・行動、免疫毒性等、高次生命系及びその成熟に対する障害に焦点を当てた、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標）を網羅的に確認する「齧歯類一生涯試験法」の開発を行う。この一環として Bisphenol A (BPA) の低用量試験を実施した。この詳細試験は、厚生労働省の内分泌かく乱化学物質・試験スキームに則り、内分泌かく乱性を検討する必要がある数十万種の対象化合物について、ホルモン活性に焦点を置いたスクリーニング手法の開発と確立と詳細試験に資する優先リストの作成を進めることと並行して実施するものである。また、国際的な協調の可能性についても検討を加える。

A. 研究目的

厚生労働省 EDCs の健康影響に関する検討会に於いて策定された試験スキーム（スクリーニング試験系及び詳細試験）に則り、ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（EDCs）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い確定試験法を開発する。

その一環として、未だ確立されていない低用量域の EDCs の生体影響を評価する検出指標、試験方法の 1 つの可能性として、EDCs のラット子宮内・経乳汁暴露によって誘導される雌出生仔の遅発性の性周期異常に焦点を当て、これが低用量影響を検出する検査項目になり得るかを検討する。

B. 研究方法

EDCs による生体影響の検討は、従来、生殖毒性にその焦点が置かれてきた。しかし、低用

量問題や遅発影響の検討が進むにつれ、EDCs の有害作用は、個体の発生、成長、成熟、老化に関わる広範なものであることが示唆されることとなった。

ホルモン様生体影響を及ぼす化学物質と、その延長線上で生体障害性を発揮する化学物質（内分泌かく乱化学物質）のスクリーニング試験等による優先順位設定を経て、最終的にそれらの EDCs としての生体障害性に対する検出確度の高い方法体系を開発することに重点を置き、内分泌かく乱性確定試験開発詳細試験（確定試験）としての「齧歯類一生涯試験法」を提案した。

「試験スキーム」のスクリーニングに於いて形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ため、本申請班の前身となる第 2 期研究班において種々の調査研究を実施してきた。その結果、ここでは既存の

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、及び老化に渡る一生を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生試験」を構築することを目指す。これは、経済開発協力機構（OECD）の Conceptual Framework Level 5 に対応し、「齧歯類一生試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素から成る。

本分担研究者は、（１）齧歯類一生試験の構築に必要と考えられる各項目を調整する際の取り纏めを行うと共に、実際の試験への応用の可能性を明らかにする為に、（２）Bisphenol A を雌性動物の新生児期に低用量暴露した際の性ホルモン系に対する低用量影響に関する動物実験を実施した（委託研究：委託先：（財）化学物質評価研究機構）。さらに、（３）OECD/EDTA/VMG-Mammalian(the Validation Management Group for Mammalian Testing)における国際協調の場で本研究の紹介を行ってきた経緯に基づいて、その対応を検討した。

（１）齧歯類一生試験取り纏め事項

神経・行動

- ・ Bisphenol A 妊娠期・授乳期暴露による行動影響の評価と機序
- ・ マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価
- ・ 脳の性分化への影響

免疫

- ・ 免疫反応や免疫異常状態に及ぼす影響

内分泌（生殖器発達・老化等）

- ・ 雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響
- ・ 胎生期・新生児期暴露が雌性生殖器に与える影響
- ・ 生殖器系の老化に至る過程に対する影響

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

・ 確定試験に関わる核内受容体転写活性等迅速確認系構築

・ 多分化能修飾メカニズムとしての ES 細胞分化増殖影響解析

・ 生殖器制御メカニズムに基づいた内分泌かく乱作用点解析

・ 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

詳細試験（確定試験）

- ・ 「齧歯類一生試験法」の開発の継続と完成

（２）Bisphenol A の雌性動物・新生児期・低用量暴露による性ホルモン系低用量影響に関する実験（委託研究：委託先：（財）化学物質評価研究機構）

10 週齢の雌 Cj: CD (SD) IGS BR ラット(日本チャールス・リバー株式会社、日野飼育センター)を 60 匹、雄を 30 匹購入した。5 日間の検疫・馴化期間終了後、健康である事が確認された雌を雄ラットと共に夕刻に交配用ケージに移し、1 対 1 の割合で一晩同居させた。翌朝陰栓及び陰垢中の精子の存在をもって交尾が成立したものとみなし、その日を妊娠 0 日と定めた。交尾確認日ごとに確認順に各群に振り分けた。BPA の 0、0.5、5、50 $\mu\text{g/kg/day}$ の用量を、各群 10、10、10 及び 10 匹の交尾が確認された雌に対し妊娠 6 日から分娩後 20 日(離乳前日)まで毎日強制経口投与した。投与量は最新の体重値を基に算出した。

母動物の全例について、妊娠 0 日から哺育状態も含めて分娩後 21 日(出生仔の離乳日)まで毎日 1 回以上観察した。体重は妊娠 0、6、14、17 及び 20 日、分娩後 0、4、7、14 及び 21 日(出生仔の離乳日)に測定した。妊娠動物の全例

を自然分娩させ妊娠期間、出産数(率)を求めた。分娩日を分娩 0 日とした。交尾が確認された全動物は分娩 21 日(離乳日)にエーテル麻酔下で安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。子宮は切開して硫酸アンモニウムに浸漬後着床痕数を算出し、出生数(率)を求めた。出生子については、出生日(0 日齢)に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、出產生仔数、出產生仔性比、出產生仔外表(口腔内を含む)の検査を行った。一般状態については剖検日まで毎日 1 回以上観察した。体重は 0、4、7、14 及び 21 日齢(出生子の離乳日)、以降週 1 回に加え、包皮分離日、陰開口日及び剖検日に測定した。4 日齢に同腹出生仔数を雌 6 匹、雄 2 匹になるよう無作為抽出法を用いて調整した。哺育期間中を通して仔数、死亡仔数の検査を行った。生存する雌離乳仔全例について、21 日齢から陰開口を観察した。また、生存する雄離乳仔全例について、35 日齢から陰茎包皮分離検査を実施した。

生存する雌出生子については、12 ヶ月齢まで継続して性周期の観察を行う。膣スメアは AM 9:00 から 11:00 の間に採取する。14 日間連続採取後、2 週間休止のサイクルを 12 ヶ月齢まで繰り返し行い、ギムザ染色後性周期を観察、発情前期、発情期、発情後期、休止期の 4 区分に分類後、さらに normal、persistent diestrus (休止期が 5-9 日継続)、constant diestrus(休止期が 10 日以上継続)、persistent estrus (発情期が 3-7 日継続)、constant estrus(発情期が 8 日以上継続)に分類する。

個体数調整後の同腹出生児のうち、全雄出生子は 12 ヶ月齢剖検群に振り分ける。

生存する雌出生子のうち、2 ヶ月例時に測定した体重を基に 2 匹を体重送別無作為抽出法により抽出し、3 ヶ月齢剖検群に振り分け、発

情前期を呈する動物を CO_2+O_2 麻酔下で放血し安楽致死させた後、器官・組織の肉眼的観察を行った。剖検時に子宮、卵巣、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体を採取し、湿重量を測定した。甲状腺、下垂体については 10%中性緩衝ホルマリン液で固定、約 24 時間後に測定を行った。

生存する雌出生子のうち、6 ヶ月例時に測定した体重を基に 2 匹を体重送別無作為抽出法により抽出し、7 ヶ月齢剖検群に振り分け、残る 2 匹は 12 ヶ月齢剖検群に振り分ける予定である。但し、同腹雌出生子が 6 匹に満たない場合、先ず 12 ヶ月齢剖検群に 2 匹、次に 3 ヶ月齢剖検群に 2 匹を優先して振り分ける。

(3) OECD/EDTA/VMG-Mammalian

国際協調下における試験法開発、ガイドライン化等について、EDTA/VMG-M 参加各国との調整、検討を行う。

C. 研究結果

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

神経・行動に関しては、BPA 妊娠期・授乳期暴露をモデルとし、dopamine 及び serotonin (5-HT) 神経系に着目した行動影響の評価と機序、マウス・オペラント条件付けによる神経系高次機能影響の評価及び脳の性分化への影響解析を実施することになった。

免疫系に関しては、自己免疫発症に関わるモデルの改良、Local Lymph Node Assay を用いた免疫機能の修飾影響の解析を実施することになった。

内分泌系に関しては、従前の生殖毒性に限定せず、中枢を含む性分化への影響、生殖関連臓器の形成、発達、機能、及びその加齢変化に対する影響を視野に入れた研究を実施することと

なった。

詳細試験については、神経・免疫・内分泌ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した「齧歯類一生涯試験法」の開発を推進することとなった。

(2) Bisphenol A の雌性動物・新生児期・低用量暴露による性ホルモン系低用量影響に関する実験（委託研究：委託先：(財) 化学物質評価研究機構）

母動物

媒体対照群、0.5、5、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の交尾確認動物数は、各々10、10、10、10匹であった。妊娠期間中、母動物の一般状態、体重(Fig. 1)に異常はみられなかった。

分娩日の検査において、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の一例(母動物 No.13)が妊娠 22 日目に分娩開始を確認したが、雄出生仔 2 匹、雌出生仔 6 匹を娩出後、死亡、一例(母動物 No.17)が妊娠 22 日目に死亡及び一例(母動物 No.20)が妊娠 22 日目に正常分娩したものの、仔の胎盤処理、哺育を行わず、分娩後 2 日に全腹仔の死亡が確認された。5 $\mu\text{g/kg}$ 群では一例(母動物 No.23)が妊娠 22 日目に正常分娩したものの、分娩後一般状態の悪化がみられ仔の哺育を行わず、分娩後 3 日に死亡したため、当該動物の腹仔は殺処分した。また、同群の一例(母動物 No.27)が妊娠 22 日目に正常分娩したものの、仔の胎盤処理、哺育を行わず、分娩後 4 日に全腹仔の死亡が確認された。50 $\mu\text{g/kg}$ 群の一例(母動物 No.35)が妊娠 22 日目に正常分娩したものの、仔の胎盤処理、哺育を行わず、分娩後 4 日に全腹仔の死亡が確認された。

その他の母動物では分娩時及び哺育期間中一般状態、哺育状態に異常はみられず、体重も媒体対照群とほぼ同様な推移を示した。

出生仔

哺育期間中、一般状態に異常はみられず、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示した(Figs. 2)。

生後 21 日に、媒体対照群、0.5、5、50 $\mu\text{g/kg}$ 群で各々46、34、35、46 匹の雌離乳仔と、20、12、14、18 匹の雄離乳仔を得て、後の検査に供した。現時点において離乳以降の雌雄出生仔の一般状態及び体重推移に異常はみられていない(Figs. 3、4)。

膣開口検査において、媒体対照群、0.5、5、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の平均膣開口日齢は各々 34.2 ± 2.2 、 33.2 ± 2.3 、 35.0 ± 2.1 、 34.3 ± 2.5 、平均膣開口日は各々 132.5 ± 15.5 、 124.3 ± 16.5 、 140.3 ± 15.6 、 133.2 ± 22.8 であり、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群との間に差はみられなかった(Table 1)。

包皮分離検査において、媒体対照群、0.5、5、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の平均包皮分離日齢は各々 40.5 ± 1.1 、 40.2 ± 1.3 、 40.7 ± 0.6 、 41.4 ± 1.6 、平均包皮分離日体重は各々 222.0 ± 20.4 、 212.1 ± 22.8 、 224.4 ± 18.2 、 218.1 ± 19.2 であり、いずれの BPA 投与群においても媒体対照群との間に差はみられなかった(Table 2)。

雌出生仔の性周期検査 (Table 3)

膣開口直後から開始した性周期検査では、異常周期を示す動物はみられなかった。

3 ヶ月齢時の性周期検査では、異常周期を示す動物はみられなかった。

4 ヶ月齢時の性周期検査において、媒体対照群、50 $\mu\text{g/kg}$ 群では異常周期を示す動物はみられなかったが、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 1/23 例で Persistent estrus、5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 2/22 例で Constant diestrus がみられた。

5 ヶ月齢時の性周期検査において、媒体対照群

の 1/31 例で Persistent diestrus、1/31 例で Constant diestrus、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 2/23 例で Constant diestrus、1/23 例で Persistent estrus、5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 1/22 例で Persistent diestrus、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の 1/30 例で Persistent diestrus がみられた。

6 ヶ月齢時の性周期検査において、媒体対照群では異常周期を示す動物はみられなかった。0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 1/23 例で Persistent diestrus、1/23 例で Persistent estrus、5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 2/22 例で Persistent diestrus、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の 3/30 例で Persistent estrus がみられた。

(3) EDTA/VMG-Mammalian

子宮肥大試験の次のテーマとして、「一生涯試験」に類する「確定試験」の国際協調下での開発を掲げる点について、US-EPA との調整に入った。

D. 考察

(1) 齧歯類一生涯試験取り組み事項

神経障害性に関しては、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る。本研究班では、高次行動異常を当面の焦点に、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の確認実験系の導入を進める。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）、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の影響を当面の対象として解析する。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、早発閉経等のモデルの一つとしての成熟後の機能異常の発生を中心とした解析をさらに推進する。本

研究により、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あると示されたと考える。

懸念される毒性指標として、神経・行動、免疫毒性等、従来の多世代繁殖試験の指標に限定されない一連の指標を設定し、引き続き網羅的に確認しつつ、受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームに則り、クロストーク問題、低用量問題等に的確に対応可能な体制を確立すべく、研究開発を更に進める。これをもって、内分泌かく乱性の試験評価に関する包括的なガイドラインの開発に的確に貢献する。

(2) Bisphenol A の雌性動物・新生児期・低用量暴露による性ホルモン系低用量影響に関する実験（委託研究：委託先：（財）化学物質評価研究機構）

平成 16 年度の研究において、BPA の大量投与(40、400 mg/kg/day)時のみならず、低濃度(5、50 $\mu\text{g/kg/day}$)の妊娠期・授乳期投与によっても pre-middle age における性周期異常が誘導される可能性が示唆された。現在、ヒトでの BPA 許容摂取量は 50 $\mu\text{g/kg/day}$ とされている。しかしながら、昨年度の実験結果はそれ以下の投与用量で遅発性の性周期異常がみられた。実験結果の再現性を確認することが本年度の最重要課題であると考えられる。

6 ヶ月齢において、媒体対照群では異常周期を示す動物はみられなかったが、0.5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 1/23 例で Persistent diestrus、1/23 例で Persistent estrus、5 $\mu\text{g/kg}$ 群の 2/22 例で Persistent diestrus、50 $\mu\text{g/kg}$ 群の 3/30 例で Persistent estrus がみられた。しかしながら、これら BPA 投与でみられた変化に統計学的有意差はなく、前年度に実施した「Bisphenol A のラットを用いた妊娠期・授乳期投与試験によ

る低用量影響の検討)においては、5 ヶ月齢以降、媒体対照群の 1/16 例で Persistent estrus を呈する動物がみられたことから、本研究の 6 ヶ月齢時点における結果をもって、0.5 µg/kg 群の 1/23 例、50 µg/kg 群の 3/30 例でみられた Persistent estrus が BPA の低用量投与の影響であるか否か、結論することは出来ない。現在、7 ヶ月齢時の性周期検査を実施中であり、今後、最長 12 ヶ月齢まで継続して検査する予定である。

E. 結論

これまでリスク評価のための試験法として考えられてきた多世代繁殖試験や、EPA によって提案されている *in utero* through lactational exposure 案には、遅発性の性機能異常を評価するための観察項目は設定されていないが、EDCs 暴露においては長期間に亘る神経、免疫及び内分泌機能への影響に関する評価が必要である可能性が示唆される。引き続き、OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた「齧歯類一生試験」に代表される試験法の開発、バリデーション、OECD で取り上げられている新たな内分泌かく乱性試験法の我が国としての評価を進展させる。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shiina H, Matsumoto T, Sato T, Igarashi K, Miyamoto J, Takemasa S, Sakari M, Takada I, Nakamura T, Metzger D, Chambon P, Kanno J, Yoshikawa H, Kato S. Premature ovarian failure in androgen receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 3;103(1):224-9. Epub 2005 Dec 22.

Kitajima S, Miyagawa-Tomita S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Mespl-nonexpressing cells contribute to the ventricular cardiac conduction system. *Dev Dyn*. 2006 Feb;235(2):395-402.

Takagi A, Sekita K, Saitoh M, Kanno J. Acute, subchronic and chronic toxicity studies of a synthetic antioxidant, 2,2'-isobutylidenebis (4,6-dimethylphenol) in rats. *J Toxicol Sci*. 2005 Dec;30(4):275-85.

Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of Mespl and Mespl2 to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005

五十嵐勝秀、萱野 純：内分泌攪乱化学物質の神経幹細胞分化に及ぼす影響、生体統御システムと内分泌攪乱、シュエプリング・フェアラーク東京 2005 年 p79-88

2. 学会発表

萱野 純、毒性メカニズム解析を目指した“Percellome”トキシコゲノミクス、東京大学分子細胞生物学研究所セミナー、2005 年 4 月 12 日、東京

萱野 純、五十嵐勝秀、松島裕子、相埒健一、中津則之、トキシコゲノミクスからのアプローチ、第 15 回環境ホルモン学会講演会、2005 年 6 月 2 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Per cell" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. Gordon Research Conference "Toxicogenomics", Jun 5-10, 2005, NH, USA

菅野 純、神経幹細胞モデルに於けるエピジェネティック制御機構障害のPercellome トキシコゲノミクス研究、第32回日本トキシコロジー学会学術年会、2005年7月1〜3日、東京

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、飼料中植物性エストロジェンが内分泌かく乱候補化学物質による遺伝子発現変動に及ぼす影響の Percellome 手法を用いた解析、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1〜3 日、東京

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、中津 則之、相賀裕美子、菅野 純 Gene expression profiling of a gene targeted mouse embryo using the "Percellome" system as a model for molecular developmental toxicity、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1〜3 日、東京

小川幸男、関田清司、北嶋 聡、斉藤 実、松島裕子、山本雅也、児玉幸夫、井上達、菅野 純、Toxicity study of Garcinia cambogia extract: Testicular toxicity of Hydroxycitric acid in mice、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1〜3 日、東京

中津則之、北嶋聡、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、児玉幸夫、菅野 純、Ahr 作動性化学物質の初期遺伝子発現の Percellome 手法を用いた手法、第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会、2005 年 7 月 1〜3 日、東京

菅野 純、WHO Children's Program の概説と本邦での現状と取り組みについて、第 17 回神経行動毒性研究会、2005 年 8 月 5 日、東京

Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Satoshi Kitajima, Yukio Kodama, Percellome and Mille-Feuille data system for toxicogenomics, 5th World Congress on Alternatives", August 21-25, 2005, Berlin, Germany

Jun Kanno, Expression Profiling in Mechanistic Toxicology, 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

Jun Kanno, Ken-Ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" mRNA normalization system for microarrays and quantitative PCR. 9th ICEM Satellite Meeting on Toxicogenomics, August 30 - September 2, 2005, USA

中津則之、相崎健一、菅野 純、Diethylnitrosamine によるマウス肝遺伝子発現変動解析、第 64 回日本癌学会学術総会、2005 年 9 月 14-16 日、札幌

五十嵐勝秀、中津則之、松島裕子、相崎健一、
北嶋 聡、萱野 純、飼料中の植物エストロジ
ェンがトランスクリプトームに及ぼす影響、
環境ホルモン学会第 8 回研究発表会、2005
年 9 月 27-29 日、東京

萱野 純、中津則之、松島裕子、相崎健一、
北嶋 聡、五十嵐勝秀、雌性マウスにおける視
床下部-下垂体-性腺系の性周期遺伝子発現の
PerceLLome 解析、環境ホルモン学会第 8 回研
究発表会、2005 年 9 月 27-29 日、東京

Jun Kanno, Approaches by Basic Biology to
Reinforce the Screening and Testing
Strategy for the Endocrine Disruptors,
KFDA/NITR International Symposium, Oct
11-12, 2005, Korea

萱野 純、ナノマテリアルの安全性確認に関
する課題、三菱安全化学研究所講演会、2005
年 12 月 1 日、東京

Shinya Matsumoto, Kenichi Aisaki, Jun
Kanno, Mass Distributed Clustering: A New
Clustering Algorithm for Repeated
Measurements in Gene Expression Data, The
16th International Conference on Genome
Informatics, Dec 19-21, Yokohama

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、
萱野 純、Diethylnitrosamine 及び N-
ethyl-N-nitrosourea によるマウス肝遺伝子
発現変動解析、第 28 回日本分子生物学会、
2005 年 12 月 7-10 日、福岡

高木篤也、中津則之、五十嵐勝秀、萱野純、
マウス口蓋形成過程に発現する遺伝子のマイ
クロアレイ解析、第 28 回日本分子生物学会、
2005 年 12 月 7-10 日、福岡

北嶋 聡、Glenn I. Fishman、富田幸子、
井上 達、萱野 純、相賀裕美子、転写因子
Mespl 非発現細胞はマウス刺激伝導系細胞に
寄与する、第 28 回日本分子生物学会、2005
年 12 月 7-10 日、福岡

安彦 行人、原口 清輝、高橋 雄、萱野 純、
相賀 裕美子、Notch シグナルは *Tbx6* 依存
的に *Mesp2* 発現を活性化する、第 28 回日本
分子生物学会、2005 年 12 月 7-10 日、福岡

Shinya Matsumoto, Ken-ichi Aisaki, Jun
Kanno, Mass Distributed Clustering: A New
Clustering Algorithm for Repeated
Measurements in Gene Expression Data
The 16th International Conference on
Genome Informatics Dec 19-21, 2005,
Yokohama.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定 も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

国内特許申請中（特願 2003-317031、
特願 2004-219285）

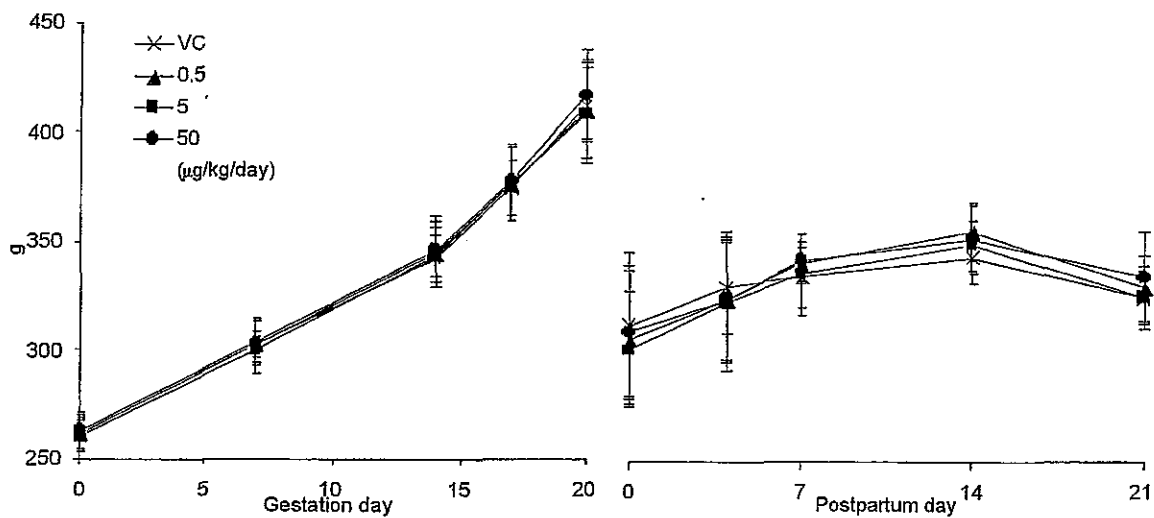


Fig. 1. Mean body weight of dams.

Not significant.

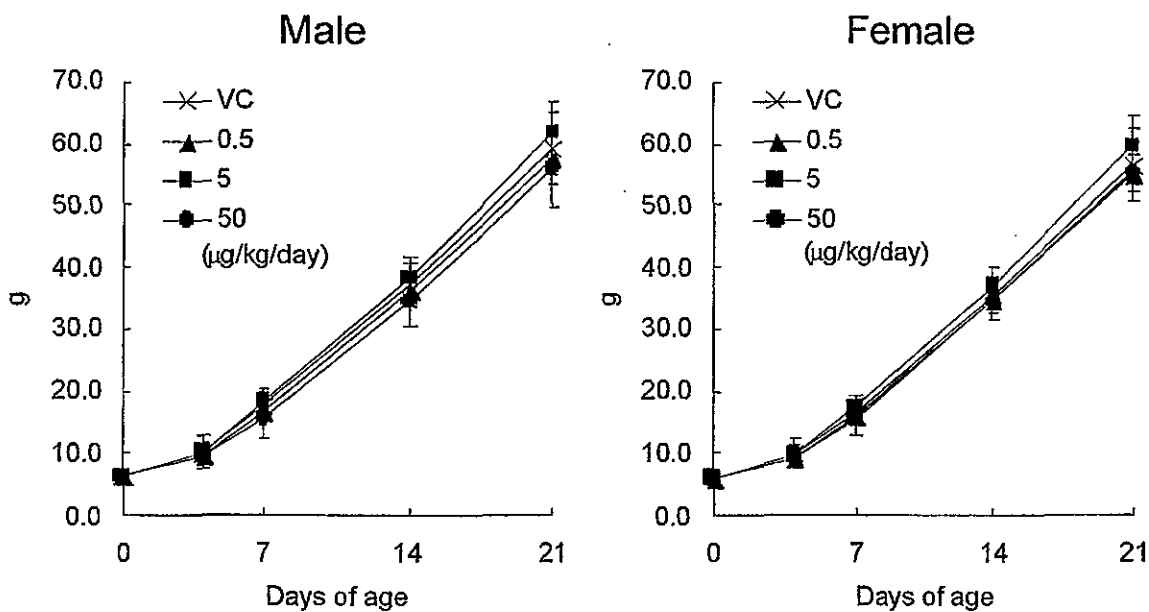


Fig. 2. Mean body weight of offspring

(birth to weaning).

Not significant.

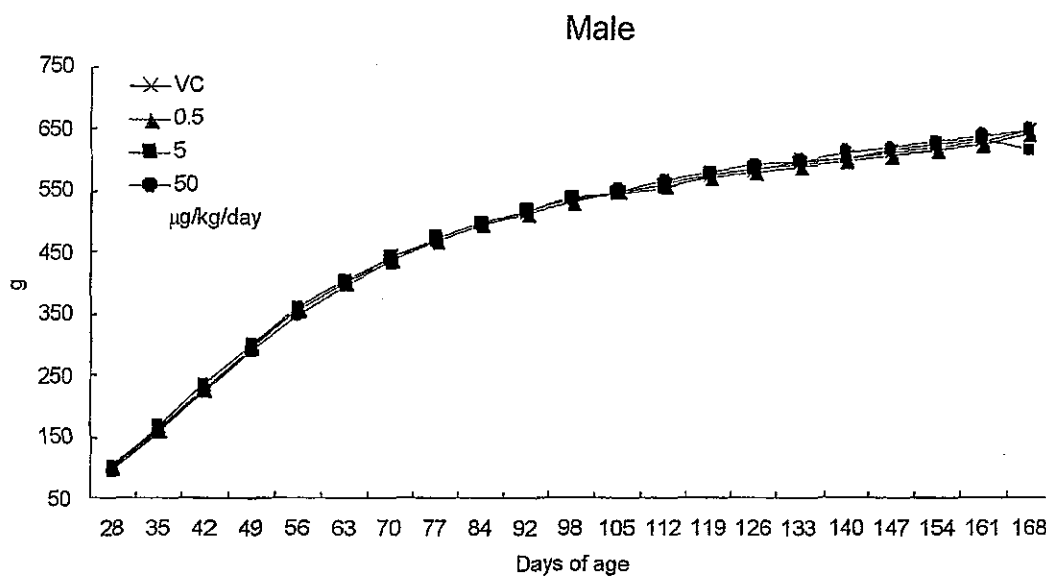


Fig. 3. Mean body weight of male offspring (28-168 days of age).

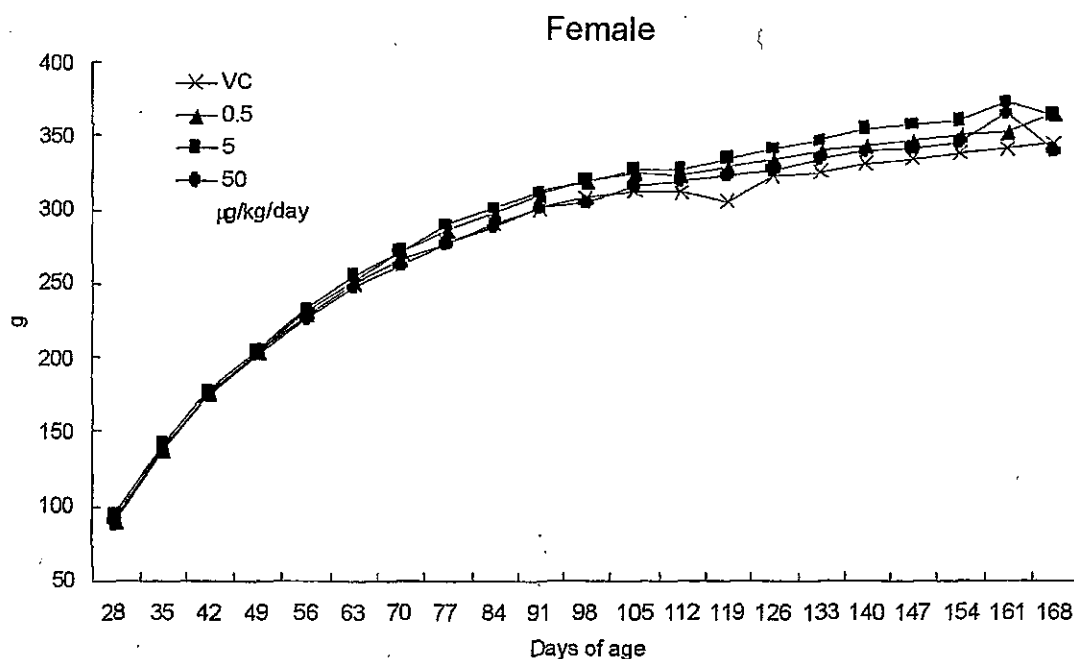


Fig. 4. Mean body weight of female offspring (28-168 days of age).

Table 1. Vaginal opening of offspring.

Maternal dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	age at vaginal opening (days)	body weight at vaginal opening (g)
0	34.2 ± 2.2	132.5 ± 15.5
0.5	33.2 ± 2.3	124.3 ± 16.5
5	35.0 ± 2.1	140.3 ± 15.6
50	34.3 ± 2.5	133.2 ± 22.8

Not significant.

Table 2. Preputial separation of offspring.

Maternal dose ($\mu\text{g/kg/day}$)	age at complete separation (days)	body weight at complete separation (g)
0	40.5 ± 1.1	222.0 ± 20.4
0.5	40.2 ± 1.3	212.1 ± 22.8
5	40.7 ± 0.6	224.4 ± 18.2
50	41.4 ± 1.6	218.1 ± 19.2

Not significant.

Table 3. Summary of estrus cycle.

	0	0.5	5	50
	Maternal dose ($\mu\text{g/kg/day}$)			
Just after vaginal opening				
Cycle length (mean days)	4.3 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.5	4.5 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 0.4
Normal cycle	46/46	34/34	35/35	46/46
Persistent diestrus	0/46	0/34	0/35	0/46
Constant diestrus	0/46	0/34	0/35	0/46
Persistent estrus	0/46	0/34	0/35	0/46
Constant estrus	0/46	0/34	0/35	0/46
3 months of age				
Cycle length (mean days)	4.1 $\pm$ 0.3	4.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.3
Normal cycle	31/31	23/23	22/22	30/30
Persistent diestrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Constant diestrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Persistent estrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Constant estrus	0/31	0/23	0/22	0/30
4 months of age				
Cycle length (mean days)	4.2 $\pm$ 0.4	4.3 $\pm$ 0.6	4.1 $\pm$ 0.4	4.1 $\pm$ 0.2
Normal cycle	31/31	22/23	20/22	30/30
Persistent diestrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Constant diestrus	0/31	0/23	2/22	0/30
Persistent estrus	0/31	1/23	0/22	0/30
Constant estrus	0/31	0/23	0/22	0/30
5 months of age				
Cycle length (mean days)	4.2 $\pm$ 0.4	4.2 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.4
Normal cycle	29/31	20/23	21/22	29/30
Persistent diestrus	1/31	0/23	1/22	1/30
Constant diestrus	1/31	2/23	0/22	0/30
Persistent estrus	0/31	1/23	0/22	0/30
Constant estrus	0/31	0/23	0/22	0/30
6 months of age				
Cycle length (mean days)	-	-	-	-
Normal cycle	31/31	22/23	20/22	27/30
Persistent diestrus	0/31	1/23	2/22	0/30
Constant diestrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Persistent estrus	0/31	1/23	0/22	3/30
Constant estrus	0/31	0/23	0/22	0/30
Persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)				
Constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)				
Persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)				
Constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)				



ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT
ENVIRONMENT DIRECTORATE

Division de l'Environnement, Santé et Sécurité
Environment, Health and Safety Division

Le Chef de Programme
The Head of Programme

ENV/EHS/LM/jh/2006.02

Paris, 13 January 2006

To: EDTA Validation Management Group for Mammalian Testing (VMG-Mammalian)

Cc: Working Group of National Co-ordinators of the Test Guidelines Programme (WNT)
Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA)
EDTA Validation Management Groups (VMG-eco and VMG-non animal)
European Commission, BIAC, TUAC, EEB, IPCS
National Delegations (letter only)

5th Meeting of the Validation Management Group for Mammalian Testing (4-5 April 2006)

Dear Madam/Sir,

I am pleased to inform you that the 5th meeting of the Validation Management Group for Mammalian Testing (VMG-mammalian) of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) will be held in Washington on **4-5 April 2006**. The venue of the meeting will be:

Hamilton Crowne Plaza Hotel
14th and K Streets NW
Washington DC 20005
United States

Practical information is included as an annex to this letter. A draft agenda and most of the documents will be posted on the password protected site (see details below), under "VMG mammalian 5", by 21 February 2006.

<http://webdominol.oecd.org/comnet/env/tf-edta.nf>
<Username: more> <password: estrogen>

The draft final report of Phase 2 of the validation of the enhanced Test Guideline 407 will be posted on the above website on 16 January to allow you sufficient time for the review of this important document. Please provide comments on this document by **16 February**. Please feel free to send information documents for the meeting; they will be posted on the protected website. Please note that the Secretariat will not provide paper copies of the documents posted on the website before the meeting.

I would like to remind you that government representatives should register for the meeting through their National Delegations to the OECD in Paris (see attached list for contact persons). Other participants should register via their affiliation. For practical information, please contact Jennah Huxley (jennah.huxley@oecd.org). If you have any queries regarding the upcoming meeting, please do not hesitate to contact me.

Yours sincerely,
Laurence Musset
Environment, Health and Safety Division



Practical Information

The hotel check-in time is 3:00 PM (15:00). The room rate of \$187 (plus tax) will be guaranteed until **March 4**, so it is important for delegates to call the hotel before that time and make reservations. Reservations should be made by calling 1-800-263-9802. Delegates should identify themselves as attendees of the OECD meeting so that they can receive the discount rate (The normal rate is \$250). Participants can view the facilities on the hotel website.

Directions to the hotel from Dulles International Airport:

Dulles International Airport (IAD) is approximately 42 kilometers from downtown Washington, DC.

By Taxi:

Go to the "Taxi Passengers" area on the lower level of the Main Terminal, where a Taxicab Dispatcher is on duty 24 hours a day. Tell him you want to go to Washington DC and provide the driver the name of the hotel and address (14th and K Streets NW). The fare should run approximately \$45.

By Supershuttle:

Go down the ramps located near either of the escalators, towards Ground Transportation/Shared Ride Vans. SuperShuttle ticket counters are located on the lower level, just before exiting the building. The Supershuttle may involve a wait and several other intermediate stops at other hotels but can deliver you to the hotel for \$22.

By bus and Metro:

The Washington Flyer Bus will take you to the West Falls Church Metro Station of the Orange Line for \$8 or \$14 round trip. The bus runs approximately every 20 minutes. Tickets may be purchased and the bus boarded at Door 4 of the Arrivals/Baggage Claim level of the airport. The Metro fare is approximately \$2. Take the Orange Line in the direction of New Carrollton to the McPherson Square Metro Station (15th and I Streets NW). The hotel (14th and K Streets) is two blocks from the Metro Station.

別添資料 2

Overview of conference call with Jun Kanno Jan 26, 2006

(Compiled by Don, Jan 27, 2006)

On the call from 8:00 to 9:00 am ET: Gary Timm, Don Bergfelt, Ralph Cooper and Jun Kanno

Topic: To learn more of the Japanese effort to incorporate a one life span test into their endocrine screening and testing program.

Comment: Jun has provided us with three references (two have not been completely translated) and an email indicating his efforts as well as those of colleagues of MHLW EDC Research Groups, for example, one group lead by Dr. Hiroshi Ono (Food and Drug Safety Center).

Action: Distribute or redistribute to Gary, Don, Vicki and Ralph.

Comment: Jun had been sent a copy of the Life-Stages report in advance of the conference call and was initially confused by the ILSI-HESI Tiered approach and that of the EDSP.

I think I was not confused. The approach was totally opposite, so that I was not sure how our proposal could be of any help to ILSI-HESI approach. Especially it was not clear how you handle "low-dose effect", which is the reason why we are considering actual human exposure levels, but in your document, "human relevant exposure level" was used in very different ways. The last issue has not been clarified, for me, at this teleconference, I believe Ralph said it is still a point of discussion in ILSI-HESI.

Gary, clarified, if adopted by the EPA/OPPTS, the Life Stages F1-extended one-generation reproductive toxicity test would be used as a Tier-2 test in the EDSP and a Tier-1 base test in OPP. **Action:** Send Jun additional reports for ADME, systemic toxicity and the overall review to complete the picture of the ACSA initiative.

Gary: introduced the basis for our call was, in part, to ask Jun to clarify to the EPA the Japanese reason for considering a one-generation test so that the EPA could get an idea of the similarities and/or differences to the ILSI-HESI Life Stages F1-extended one-generation reproductive toxicity test of which the EPA is considering to adapt into its EDSP program. In addition, the EPA wanted to determine if Jun would be interested in presenting the Japanese effort at a mammalian VMG meeting of the OECD in Wash DC April 4 or 5.

Jun: indicated that the Japanese Ministry of Agriculture & Forestry currently uses a

two-generation test (OECD TG 416, 2001) similar to the OPPTS 970.3800, 1998 guideline used by OPP in FIFRA but, it is likely that the ministry believes the modified test is insensitive in detecting endocrine disruptors.

Jun: indicated his efforts are focused on "low-dose" effects using BPA (5 ug/kg) and other estrogenic chemicals plus dioxin and identifying alternative end points sensitive to low dose exposure to detect endocrine effects as well as neurological and immunological effects. He discussed specific end points that were indicated in an email sent in advance of the conference call (this email has since been distributed or redistributed to Gary, Don, Vicki and Ralph).

Ralph: indicated that a group at SOT 2005 suggested including endo-, neuro- and immunological test in one test. The ILSI-HESI ACSA initiative has done just this and, apparently, so has the Japanese.

Jun: indicated their interest is primarily on ER-mediated, AR mediated, TR mediated, and AhR mediated, and if necessary any other receptors especially of nuclear receptor groups, but may include membrane receptors as well in the future, but in practice, "low-dose effect" endpoints are monitored (believed to be monitored) by estrogenic chemicals and dioxin. Androgenic and thyroid receptor mediated low dose endpoints are not available yet for designing the one-life span test. Apparently, thyroidogenic responses are difficult to detect at low doses because of diffuse target tissue distribution; although, the brain may be a sensitive target organ. Thyroid peroxidase inhibitors are out of the scope for the time (we believe that TPO inhibitors have been effectively detected by current protocols)

Ralph and Jun: continued to engage in a technical discussion about the similarities and differences between the Life-Stages one-gen and the Japanese one-life span (please give me better name !) (e.g., time and length of dosing and number of animals/sex/ group at necropsy) including alternative end points to detect low-dose effects (e.g., multi-oocyte follicles, transgenic mouse model, estrogen and androgen receptors), dose selection, issues surrounding low-dose response curves (i.e., non-monotonic) and species extrapolation. Ralph also clarified to Jun that the ILSI-HESI ACSA initiative was more than the Life-Stages. Results from the ADME and systemic toxicity components of the paradigm help determine how the Life Stages one-generation test will be designed and run.

Gary and Ralph: emphasized the apparent common interest that the US and Japan have in developing a one-generation reproductive toxicity test tailored to detect endocrine activity as well as related neurological and immunological effects and, that a concerted effort to develop a test protocol by the US, Japan and OECD, is in the interest of

international collaboration and harmonization.

Gary: concluded the conference call by inviting Jun to do a presentation of his work with the one-generation reproductive toxicity test at the VMG meeting in early April.

Jun: agreed to attend the mammalian VMG meeting of the OECD in Wash DC on April 4 and 5, 2006 to do a 20 min presentation of the Japanese version of the one-generation (one life-span) test.