

【厚生労働科学研究】

平成 16-18 年度 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（主任研究者 小野 宏）

1	平成 16 年度 (2004)	分担研究者 菅野 純	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） 分担研究報告書
2	平成 17 年度 (2005)		
3	平成 18 年度 (2006)		ラットを用いた BPA および DES の経胎盤・経母乳暴露による晩発影響についての検討試験（委託研究） 分担研究報告書
4	平成 18 年度 (2006)	分担研究者 宮川 宗之	マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価

【厚生労働科学研究】

平成 19-21 年度 高感受性期に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明及び評価手法開発にかかる総合研究（主任研究者 小野 宏）

5	平成 19 年度 (2007)	分担研究者 宮川 宗之	発達神経毒性評価のための次世代認知機能影響を中心とした行動試験法の高度化に関する研究
---	--------------------	----------------	--

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16年度 (2004)

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17 (2005) 年4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・経胎盤曝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 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。

A. 研究目的

厚生労働省内分泌かく乱性化学物質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（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、最終的にそれらの内分泌かく乱化学物質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内分泌かく乱化学物質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、内分泌かく乱性化学物質のラット子宮内・経乳汁曝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、これが低用量の内分泌かく乱影響が次世代に及ぼす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

内分泌かく乱化学物質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、内分泌かく乱化学物質の有害作用は、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、最終的にそれらの内分泌かく乱化学物質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、一個人の受精、発生、発達、成熟、及び老化に渡る一生涯を標的とした有害性評価試験系「齧歯類一生涯試験」を構築することを目指す。これは、経済開発協力機構 (OECD) の Conceptual Framework Level 5 に対応し、「齧歯類一生涯試験」試験開発研究及び支援基盤研究の 2 要素から成る。

本分担研究者は齧歯類一生涯試験の構築に必要と考えられる各項目を (1) 下記の如く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)。

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

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)

「齧歯類一生涯試験法」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 Crj: 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、健常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、2 対 1 の割合で一晩同居させた。翌朝陰栓及び膣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、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day (陽性対照

群として EE 0.05 mg/kg 群を設定)の用量を、各群 10、10、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。投与用量は当機構で実施した投与用量設定試験を基に決定した。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。

出生仔については、出生日(0 日齢)に産仔数、死産仔数、出産死亡仔数、出産生存仔数、出産生存仔性比、出産生存仔外表(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(出生仔の離乳日)、以降週 1 回に加え、包皮分離日、腔開口日及び剖検日に測定した。4 日齢に生存する全出生仔について肛門-生殖突起間距離をデジタル式ノギス(Digimatic Caliper CD-15CP、株式会社ミットヨ、神奈川)を用いて 0.01 mm 単位で測定した後、同腹出生仔数を 10 匹(雌雄各々 5 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生存数、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 日齢から腔開口を観察した。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。

1 匹/腹の雌出生仔について、10 週齢から 14 日間以上腔垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物を CO₂+O₂ 麻酔下で放血し安楽致死させ、尿道開口部スリット長、ファラス先端-尿道開口部間距離、尿道開口部-腔開口部間距離をデジタル式ノギスを用いて 0.01 mm 単位で測定した後、器官・組織の肉眼的観察を行った。1 匹/腹の雄出生仔については 13 週齢に達した動物を順次 CO₂+O₂ 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。

雌雄各 2 匹/腹の出生仔について生殖能力検査を実施した。雌は 10 週齢に達した時点で同用量群の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。翌朝腔栓及び腔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。交尾が確認された雌は妊娠 20 日に帝王切開し、帝王切開時に妊娠黄体数、着床数、胚・胎仔死亡数(早期、後期吸収胚及び死亡胎仔に分類)、生存胎仔数、生存胎仔性比、生存胎仔体重、生存胎仔胎盤重量、生存胎仔外表を調べた。また、生殖能力検査群の雄 2 匹/腹の出生仔については、交配相手の生殖能力検査が終了した 16 週齢以降、順次 CO₂+O₂ 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。各剖検日に卵巣、精巣、精巣上体、腹葉前立腺、精囊、陰茎龟头(陰茎骨を含む)、肝臓、副腎、腎臓、甲状腺、下垂体を採取

し、湿重量を測定した。尚、帝王切開した動物の子宮、卵巣重量測定は実施しなかった。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。

雌雄各 2 匹/腹の出生仔については、遅発性の影響の有無を確認する目的で、7 ヶ月齢まで継続して観察を行った。雌については、3 ヶ月齢以降、長期間性周期観察を実施した。

膣スメアは AM 9:00 から 11:00 の間に採取した。14 日間連続採取後、2 週間休止のサイクルを 7 ヶ月齢まで繰り返し行い、ギムザ染色後性周期を観察後、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) に分類した。7 ヶ月齢に達した動物は 14 日間以上膣垢を採取し、性周期を観察、休止期を呈する動物を CO₂+O₂ 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。雄出生仔については 7 ヶ月齢に達した動物を CO₂+O₂ 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。

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、Bisphenol A 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となった。

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・内分泌・免疫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)

母動物の一般状態において、妊娠期間及び授乳期間を通して異常はみられず、分娩状況に異常はみられなかった。

妊娠期間、母動物の体重推移においては BPA 400 mg/kg 群及び EE 50 mg/kg 群で媒体対照群と比較し低値がみられた。哺育期間では統計学的有意差はみられなかった (Fig. 1)。

離乳から 10 週齢まで、雌出生仔において何れの BPA 投与群においても一般状態に異常はみられず、媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示したが (Fig. 2)、雄出生仔では、BPA 400 mg/kg 群で 6 週齢以降有意な低値がみられた (Fig. 3)。膣開口検査では、何れの BPA 投与群でも膣開口日齢及び膣開口日体重に媒体対照群との間に差はみられなかった

(Table 1)。陰茎龟头包皮分離検査では、何れの BPA 投与群でも包皮分離日齢及び包皮分離日体重に媒体対照群との間に差はみられなかった (Table 2)。13 週齢時の解剖では、何れの BPA 投与群でも投与に起因すると考えられる異常はみられず、BPA 投与群の雌外性器形体計測学的検査においても媒体対照群との間に差はみられなかった (Fig. 4)。器官重量では雌雄出生仔の絶対及び相対重量共に BPA 投与に起因すると考えられる異常はみられなかった (Figs 5-8)。

10 週齢以降では、BPA 400 mg/kg 群雌の 1 例において、4 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に結節 (190 mm×60mm×50 mm) がみられた。また、BPA 0.005 mg/kg 群の雌 1 例において、5 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、皮下に結節 (Ø30 mm) がみられた。雄では、0.005 mg/kg 群の 1 例で 4 ヶ月齢時に左腹部の膨大がみられ、切迫屠殺したところ、腎臓に結節 (100 mm×80mm×70 mm) がみられた。この他、一般状態に異常はみられなかった。体重では、雌出生仔に於いて何れの BPA 投与群に於いても媒体対照群とほぼ同様な体重推移を示したが、雄出生仔では、BPA 0.05、400 mg/kg 群で最終屠殺時まで継続して有意な低値がみられた (Fig. 9)。

性周期検査結果を Tables 3, 4 に示す。3 ヶ月齢時に於いては、BPA400 mg/kg 群の 2/17 例で性周期の異常がみられたほか媒体対照群とその他の BPA 投与群で異常はみられなかった。4 ヶ月齢時には媒体対照群で異常はみられなかったが、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 2/20、1/19、3/24、3/17 例が性周期の異常を示した。5 ヶ月齢時には媒

体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、7/20、3/19、5/24、6/17 例が性周期の異常を示した。6 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、8/19、4/19、6/24、6/17 例が性周期の異常を示した。7 ヶ月齢時には媒体対照群、BPA0.005、0.05、40、400 mg/kg 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17 例が性周期の異常を示した。尚、BPA0.005 mg/kg 群では 5 ヶ月齢以降、その他の BPA 投与群では 7 ヶ月齢時に性周期異常を示す動物数が統計学的有意に増加した。EE 投与群では、3 ヶ月齢時には 6/22 例が既に異常周期を呈しており、5 ヶ月齢以降異常性周を示す動物数は統計学的有意に増加した。

D. 考察

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

この中で、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。

(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)

化学物質評価研究機構において以前に、本研究とは離れるが、EE(0、0.5、5、50 mg/kg/day)をSD(IGS)ラットの妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、出生仔の生殖能力の検討に加え6ヵ月齢における性周期検査及び剖検を行った結果、10週齢時での生殖能力検査では異常を示さないが、雌の出生児に外性器の形態異常(cleft phallus)、pre-middle ageにおける性周期検査及び病理学的検査によって50 µg/kg群で性周期の異常及び卵胞嚢胞等、ラットの生殖機能の老化過程においてみられる所見と同等の所見を得ている。ラットにおいて、通常(2-3ヵ月齢)の生殖能力検査で異常を示さないが、その後性周期の異常、無排卵状態に陥る病態は、delayed anovulation syndromeとして、テストステロンの新生児期投与などによって引き起こされることが知られており、生殖機能の老化が早期に現れる結果として生じることが示唆されている。

今回、弱いエストロゲン作用を有するとされるbisphenol A (BPA)の0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/dayをSD(IGS)ラットの妊娠6日から分娩後20日まで母ラットに経口投与し、7ヵ月齢時における性周期検査での異常周期をBPA0.005 mg/kg群から観察した。持続して休止期が見られる場合、手技的要因により偽妊娠状態に陥った可能性も疑われる。そこで、persistent estrus及びconstant estrus発現状況に注目したところ、媒体対照群では、5ヵ月齢以降1例にみられ

たが、BPA 0.005 mg/kg群では4ヵ月齢以降観察され、7ヵ月齢時においては10/19例と約半数に上った。その他のBPA投与群においても7ヵ月齢時にはpersistent estrus若しくはconstant estrusを呈する動物が観察例数の約半数を占めていた。以上のことから低濃度BPAの子宮内・経乳汁暴露によっても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。なお、EE暴露群においては、既に3ヵ月齢時点から性周期の異常を示す動物が観察され、7ヵ月齢の時点では殆どの動物が性周期の異常を示していた。このことから、EEの子宮内・経胎盤暴露によって誘導されたpre-middle ageにおける性周期の異常に関しては、再現性のある変化であることが確認された。

生殖機能の老化の本態は、未だ解明されてはいない。子宮内・経胎盤暴露によって引き起こされる性周期異常の原因としては中枢の神経内分泌系の異常や卵巣側すなわちoocyte reserve減少等が考えられるが、人においてはDES daughterとcontrolでoocyte reserveは変わらなかったという報告(Sangvaiら、1997)もある。現在、7ヵ月齢時の剖検で採取した雌の下垂体、卵巣、子宮、膈、及び肉眼的病変部について、病理組織学的検査を実施中である。いずれにせよ、BPA及びEEの子宮内・経胎盤暴露によりpre-middle ageにおける性周期の異常がみられた原因については不明であり、今後、本実験結果の再現性、他のエストロゲン作用を有する物質による確認及びそのメカニズムの解析等が必要と考えられる。今後、ポリカーボネート製ケージ、床敷き、給水ビン等BPAのラット飼育環境中濃度を測定する予定である。

尚、BPA で EE と比較により低濃度で性周期の異常がみられた原因については不明であるが、 α フェト蛋白(AFP)やアルブミン等の血中蛋白との結合力に差がある可能性が考えられる。また、BPA は様々な核内受容体とも結合することが知られていることから、エストロゲン受容体を介さないメカニズムによって引き起こされた可能性も考えられる。

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おらず、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に亘る性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。

E. 結論

(1) 齧歯類一生涯試験取り纏め事項

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改めて示された。

今後、OECD 試験法ガイドライン化を視野に入れた試験法の開発、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。

懸念される毒性指標としては、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する。

受容体原性毒性の立場を踏まえた試験スキームを構築し、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。

「詳細試験(確定試験)」として一生涯(発生、生育、成熟、老化)の全ての段階において内分泌かく乱作用により懸念される毒性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(支援基礎研究を含む)ことにより、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)

Bisphenol A (BPA)の 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg/day を SD(IGS)ラットの妊娠 6 日から分娩後 20 日まで母ラットに経口投与し、低用量域及び大量曝露時の出生仔への cleft phallus の誘導、並びに pre-middle age における性周期異常の誘導の有無について検討した。その結果、いずれの BPA 投与群においても肛門-生殖突起間距離、膈開口日齢、陰茎亀頭包皮分離日齢、10 週齢時に実施した剖検、雌外性器形体計測学的検査、器官重量測定、生殖能力検査に異常はみられなかった。しかしながら、7 ヶ月齢時における性周期検査では異常周期を示す動物が BPA 0、0.005、0.05、40、400 mg/kg 群、EE 群で各々 1/16、11/19、8/19、11/24、11/17、19/22 匹に観察され、低濃度 BPA の子宮内・経乳汁暴露によっても 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。以上の結果、内分泌かく乱化学物質暴露においては長期間に渡る性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。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Takahashi Y, Kitajima S, Inoue T, Kanno J, Saga Y. Differential contribution of *Mespl* and *Mesp2* to the epithelialization and rostro-caudal patterning of somites. *Development*, 132, 787-796, 2005
- Ishikawa A, Kitajima S, Takahashi Y, Kokubo H, Kanno J, Inoue T, Saga Y. Mouse *Nkd1*, a Wnt antagonist, exhibits oscillatory gene expression in the PSM under the control of Notch signaling. *Mech Dev*. 2004 Dec;121(12):1443-53.
- Hirabayashi Y, Yoon BI, Li GX, Kanno J, Inoue T. Mechanism of benzene-induced hematotoxicity and leukemogenicity: current review with implication of microarray analyses. *Toxicol Pathol*. 2004 Jul-Aug;32 Suppl 2:12-6.
- Fujimoto N, Igarashi K, Kanno J, Honda H, Inoue T. Identification of estrogen-responsive genes in the GH3 cell line by cDNA microarray analysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Jul;91(3):121-9.
- Tsuboi I, Morimoto K, Hirabayashi Y, Li GX, Aizawa S, Mori KJ, Kanno J, Inoue T. Senescent B lymphopoiesis is balanced in suppressive homeostasis: decrease in interleukin-7 and transforming growth factor-beta levels in stromal cells of senescence-accelerated mice. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Jun;229(6):494-502.
- Nagao T, Wada K, Kuwagata M, Nakagomi M, Watanabe C, Yoshimura S, Saito Y, Usami K, Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol*. 2004 Jan-Feb;18(1):109-20.
- Yoon BI, Hirabayashi Y, Kawasaki Y, Tsuboi I, Ott T, Kodama Y, Kanno J, Kim DY, Willecke K, Inoue T. Exacerbation of benzene pneumotoxicity in connexin 32 knockout mice: enhanced proliferation of CYP2E1-immunoreactive alveolar epithelial cells. *Toxicology*. 2004 Jan 15;195(1):19-29.
- 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之、トキシコゲノミクス、ゲノム研究実験ハンドブック、p329-337 実験医学別冊 2004
- 菅野 純、相崎健一、五十嵐勝秀、小野 敦、中津則之 ゲノム毒性学形質非依存型トキシコゲノミクスの導入、細胞工学 Vol.23 No.6、2004、685-693、株式会社秀潤社
- 菅野 純：医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、医薬品開発におけるわが国のトキシコゲノミクスの取り組み、2004年5月、Vol.46, No.6 株式会社じほう
- 菅野 純：化学物質の毒性 化学と教育 52巻5号『化学物質とリスク評価』 2004年302-305 (社)日本化学会

2. 学会発表

Iun Kanno, Screening/Testing Scheme for Endocrine Disrupting Chemicals, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

Iun Kanno, Endocrine Disrupting Chemicals Researches, Current Topics, 19th Scientific Meeting of the Malaysian Society of Pharmacology and Physiology (MSPP), May17-18, 2004, Malaysia

菅野 純 「前向き」Toxicogenomics、第88次日本法医学会総会、2004年6月2~4日、旭川

高橋 雄、北嶋 聡、菅野 純、相賀裕美子、「Notch リガンド D113 は Mesp2 の欠損による体節形成と前後パターン形成の異常を回復する」、日本発生生物学会第37回大会、2004年6月4~6日、名古屋

平林容子、壺井 功、菅野 純、井上 達、「造血器における細胞間ギャップ結合の病理-コネクシン欠失による造血障害と実験白血病高甘感受性について-」、第93回日本病理学会総会、2004年6月9~11日、札幌

I Kanno, K Aisaki, A Ono, N Nakatsu, Y Kodama, K Igarashi , PHENOTYPE-INDEPENDENT TOXICOGENOMICS USING "PERCELLOME" AND "MILLE-FEUILLE" DATA SYSTEM, 第31回日本トキシコロジー学会学術年会(特別講演)、2004年7月6~8日、大阪

中津則之、相崎健一、五十嵐勝秀、小野敦、北嶋聡、児玉幸夫、菅野純、「日内変動遺伝子群プロファイルの解析」第31回日本トキシコロジー学会学術年会(口演)、2004年7月6~8日、大阪

I Kanno, K Aisaki, A Ono, K Igarashi , TOXICOGENOMICS USING "PERCELLOME" AND "MILLE-FEUILLE" DATA SYSTEM, 10th International Congress of Toxicology, 11-15 July, 2004; Tampere, Finland

鈴木孝昌、Palanisamy Rajaguru、小原有弘、本間正充、林 真、高木篤也、菅野 純、「GeneChipによる遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か Use of the gene expression analysis by the GeneChip for a prediction of the target organs in Aristolochic acid-induced genotoxicity in mice.」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日~10月1日、福岡

菅野 純、藤井寿一、菅野 仁、相崎健一、「解糖系障害で誘導される赤芽球アポトーシスと p53 の関連、p53 involvement in glycolysis disorder-induced apoptosis of erythroid cell」第63回日本癌学会学術総会、2004年9月29日~10月1日、福岡

Iun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama "Percellome" Analysis of Hormonally Active Compounds. Toxicogenomics International Forum 2004, 12-13 October, 2004

12月15日、名古屋

五十嵐勝秀、高橋芳樹、萱野 純、内分泌かく乱化学物質の胎児神経幹細胞に対する作用、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

中津則之、相崎健一、小野 敦、五十嵐勝秀、児玉幸夫、萱野 純、マウス肝臓におけるダイオキシン類による遺伝子発現変動解析、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

椎名博子、佐藤隆史、五十嵐勝秀、松本高広、宮本純子、高田伊知郎、中村貴、盛真友、萱野純、吉川裕之、加藤茂明、アンドロゲン受容体は卵胞発育必須因子である、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

高橋芳樹、五十嵐勝秀、萱野 純、マウス胎児神経幹細胞の維持におけるDNAメチル化の役割、第27回日本分子生物学会年会、2004年12月8日～12月11日、神戸

渡辺裕介、小久保博樹、宮川-富田幸子、五十嵐勝秀、萱野 純、相賀裕美子、マウス心臓におけるNotch1 シグナリングの機能解析、2004年12月8日～12月11日、神戸

Iun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Katsuhide Igarashi, Noriyuki Nakatsu, Atsushi Ono, Yukio Kodama, "Percellome" method application to the analysis of hormonally active compounds and its possible contribution to the ecotoxicogenomics. 環境ホルモン学会第7回研究発表会、2004年

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

その他

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

Table 1. Vaginal opening of offspring

Dose (mg/kg/day)	n	Mean age at VO	body weight at VO
VC	39	34.1 ± 3.0	129.5 ± 18.5
0.005	39	33.8 ± 2.5	127.0 ± 18.0
0.05	43	33.5 ± 2.0	123.0 ± 13.4
40	50	33.9 ± 2.3	127.6 ± 14.6
400	45	33.9 ± 1.8	123.8 ± 14.0
EE 0.05	50	33.3 ± 1.7	118.2 ± 12.2

Not significant.

Table 2. Preputial separation of offspring

Dose (mg/kg/day)	n	Mean age at PPS	body weight at PPS
VC	41	39.8 ± 1.2	204.5 ± 13.0
0.005	48	40.0 ± 1.0	206.8 ± 35.0
0.05	55	40.3 ± 1.5	204.7 ± 13.3
40	49	40.3 ± 1.6	209.7 ± 17.0
400	45	40.5 ± 1.5	202.9 ± 14.2
EE 0.05	50	41.5 ± 1.8	200.8 ± 14.7

Not significant.

Table 3. Summary of estrus cycle.

	VC	BPA 0.005	BPA 0.05	BPA 40	BPA 400	EE 0.05
	mg/kg/day					
3 months of age						
Normal cycle	16/16	20/20	19/19	24/24	15/17	16/22
Abnormal cycle					2/17	6/22
Persistent diestrus					1/17	3/22
Constant diestrus						3/22
Persistent estrus						
Constant estrus					1/17	
4 months of age						
Normal cycle	16/16	18/20	18/19	21/24	14/17	15/22
Abnormal cycle		2/20	1/19	3/24	3/17	7/22
Persistent diestrus			1/19		2/17	2/22
Constant diestrus		1/20		3/24		5/22
Persistent estrus		1/20				
Constant estrus					1/17	
5 months of age						
Normal cycle	15/16	13/20	16/19	19/24	11/17	10/22
Abnormal cycle	1/16	7/20	3/19	5/24	6/17	12/22**
Persistent diestrus		5/20	2/19		2/17	3/22
Constant diestrus		1/20	1/19	5/24	4/17	7/22
Persistent estrus	1/16	1/20				2/22
Constant estrus						
6 months of age						
Normal cycle	15/16	11/19	15/19	18/24	11/17	5/22
Abnormal cycle	1/16	8/19*	4/19	6/24	6/17	17/22**
Persistent diestrus		1/19	3/19	1/24	3/17	5/22
Constant diestrus		6/19	1/19	5/24	3/17	10/22
Persistent estrus	1/16	1/19				1/22
Constant estrus						1/22
7 months of age						
Normal cycle	15/16	8/19	11/19	13/24	6/17	3/22
Abnormal cycle	1/16	11/19**	8/19*	11/24*	11/17**	19/22**
Persistent diestrus					1/17	1/22
Constant diestrus		1/19			1/17	7/22
Persistent estrus		1/19	4/19	3/24	2/17	1/22
Constant estrus	1/16	9/19	4/19	8/24	7/17	10/22

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Chi-square test)

Table 4-1. Individual representation of estrus cycle.

Vehicle control

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N
7	N	N	N	N	N
8	N	N	N	N	N
9	N	N	PE	PE	CE
10	N	N	N	N	N
11	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N
13	N	N	N	N	N
14	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N

BPA 0.005 mg/kg/day

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	CD	CD	CD	PE
5	N	N	N	PE	CE
6	N	N	N	CD	CE
7	N	PD	PD	CD	CE
8	N	N	PE	CD	CE
9	N	N	PD	CD	CE
10	N	N	PD	CD	CE
11	N	N	PD	PD	CE
12	N	N	PD	N	CE
13	N	N	N	N	CE
14	N	N	N	N	N
15	N	N	N	N	N
16	N	N	N	N	N
17	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	CD

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)
 CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)
 PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)
 CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

Table 4-2. Individual representation of estrus cycle.

BPA 0.05 mg/kg/day

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	N	N	PD	PD	N
7	N	N	N	N	PE
8	N	N	N	N	N
9	N	N	N	N	N
10	N	N	N	N	CE
11	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	PE
13	N	N	N	N	N
14	N	PD	PD	PD	PE
15	N	N	N	PD	N
16	N	N	CD	CD	CE
17	N	N	N	N	CE
18	N	N	N	N	CE
19	N	N	N	N	PE

BPA 40 mg/kg/day

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	CE
2	N	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	CD	CD	PE
5	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	CE
7	N	N	CD	CD	CE
8	N	CD	CD	PD	CE
9	N	CD	CD	CD	CE
10	N	N	N	N	PE
11	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N
13	N	N	N	PD	CE
14	N	CD	N	N	N
15	N	N	N	N	CE
16	N	N	CD	CD	CE
17	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	PE
20	N	N	N	N	N
21	N	N	N	N	N
22	N	N	N	N	N
23	N	CD	N	CD	N
24	N	N	N	N	N

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)
 CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)
 PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)
 CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

Table 4-3. Individual representation of estrus cycle.

BPA 400 mg/kg/day

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	N	N	N
2	N	N	N	N	CE
3	N	PD	CD	PD	PD
4	N	N	N	N	N
5	N	N	CD	CD	PE
6	N	N	N	N	PE
7	N	N	N	N	CE
8	N	N	PD	N	CE
9	N	N	N	N	CD
10	N	N	N	N	N
11	N	CD	CD	CD	CE
12	N	N	N	N	N
13	CE	N	CD	PD	CE
14	PD	N	N	PD	N
15	N	N	PD	CD	CE
16	N	PD	N	N	CE
17	N	N	N	N	N

EE 0.05 mg/kg/day

	months of age				
	3	4	5	6	7
1	N	N	PD	CD	CE
2	N	N	N	N	CE
3	CD	PD	PD	CD	CE
4	CD	CD	CD	CD	CE
5	N	N	N	N	CE
6	N	N	N	N	CD
7	PD	N	PD	CD	CD
8	N	CD	CD	PD	CD
9	N	N	PE	CD	CD
10	N	N	CD	CD	PD
11	PD	CD	PE	CE	CE
12	N	CD	CD	CD	PE
13	N	N	N	CD	CE
14	N	N	N	PE	CE
15	N	N	N	PD	CE
16	N	N	CD	PD	CE
17	PD	PD	CD	CD	CD
18	N	N	N	N	N
19	N	N	N	N	N
20	N	N	N	PD	N
21	N	CD	N	CD	CD
22	CD	N	CD	PD	CD

PD, persistent diestrus (prolonged diestrus periods lasting 5-9 days)

CD, constant diestrus (prolonged diestrus periods lasting 10 days or more)

PE, persistent estrus (prolonged estrus periods lasting 3-7 days)

CE, constant estrus (prolonged estrus periods lasting 8 days or more)

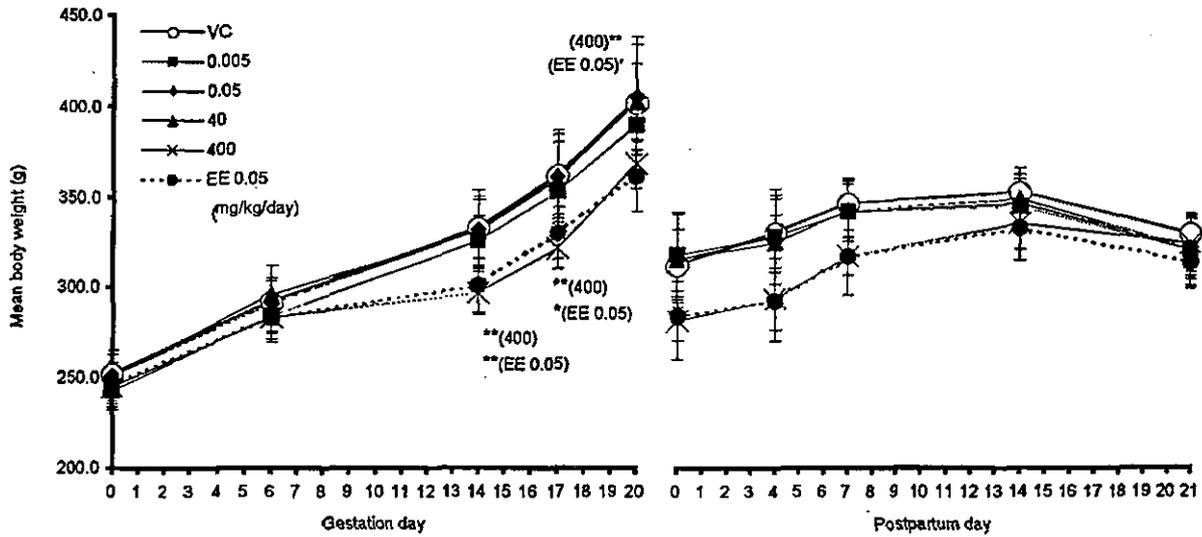


Fig. 1. Mean body weight of dams.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

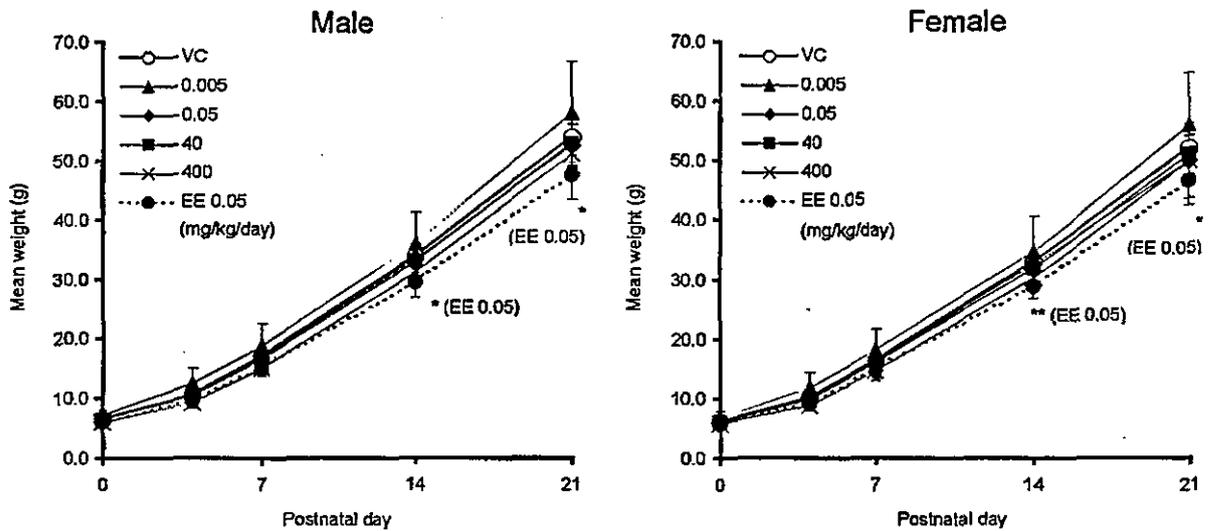


Fig. 2. Mean body weight of offspring

(birth to weaning).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

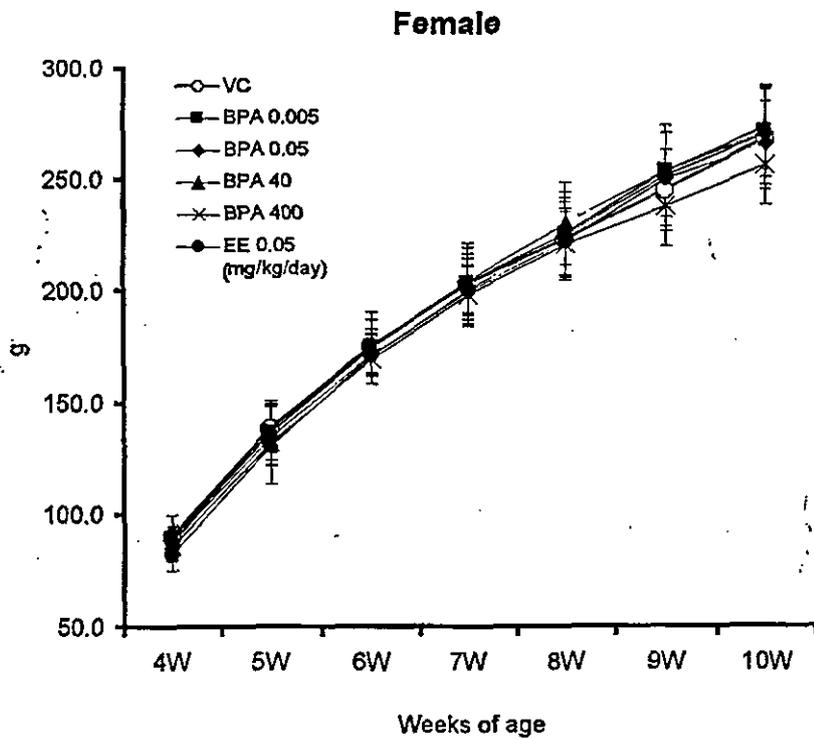
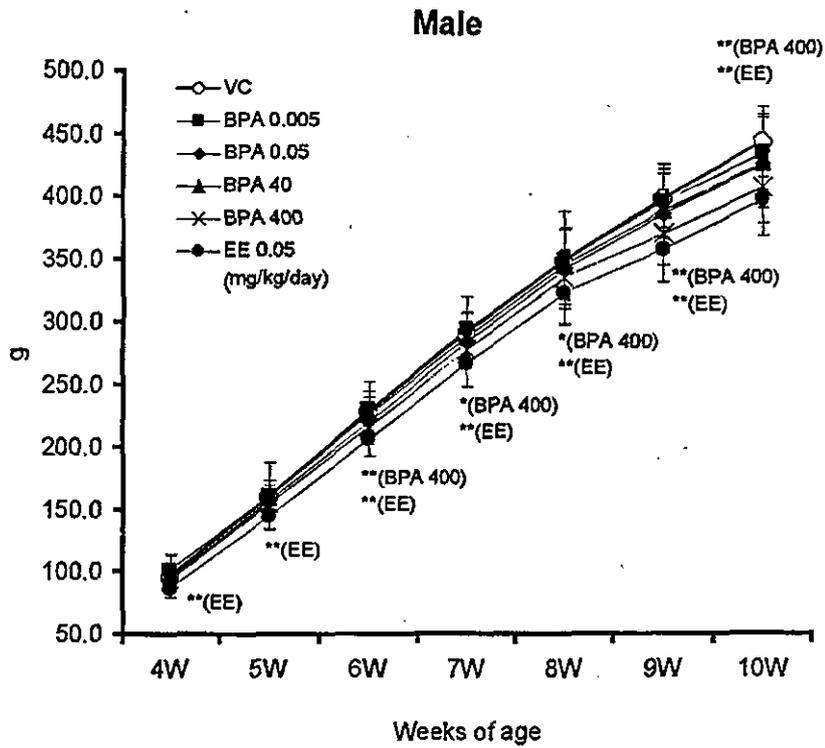


Fig. 3. Mean body weight of offspring (4-10 weeks of age).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

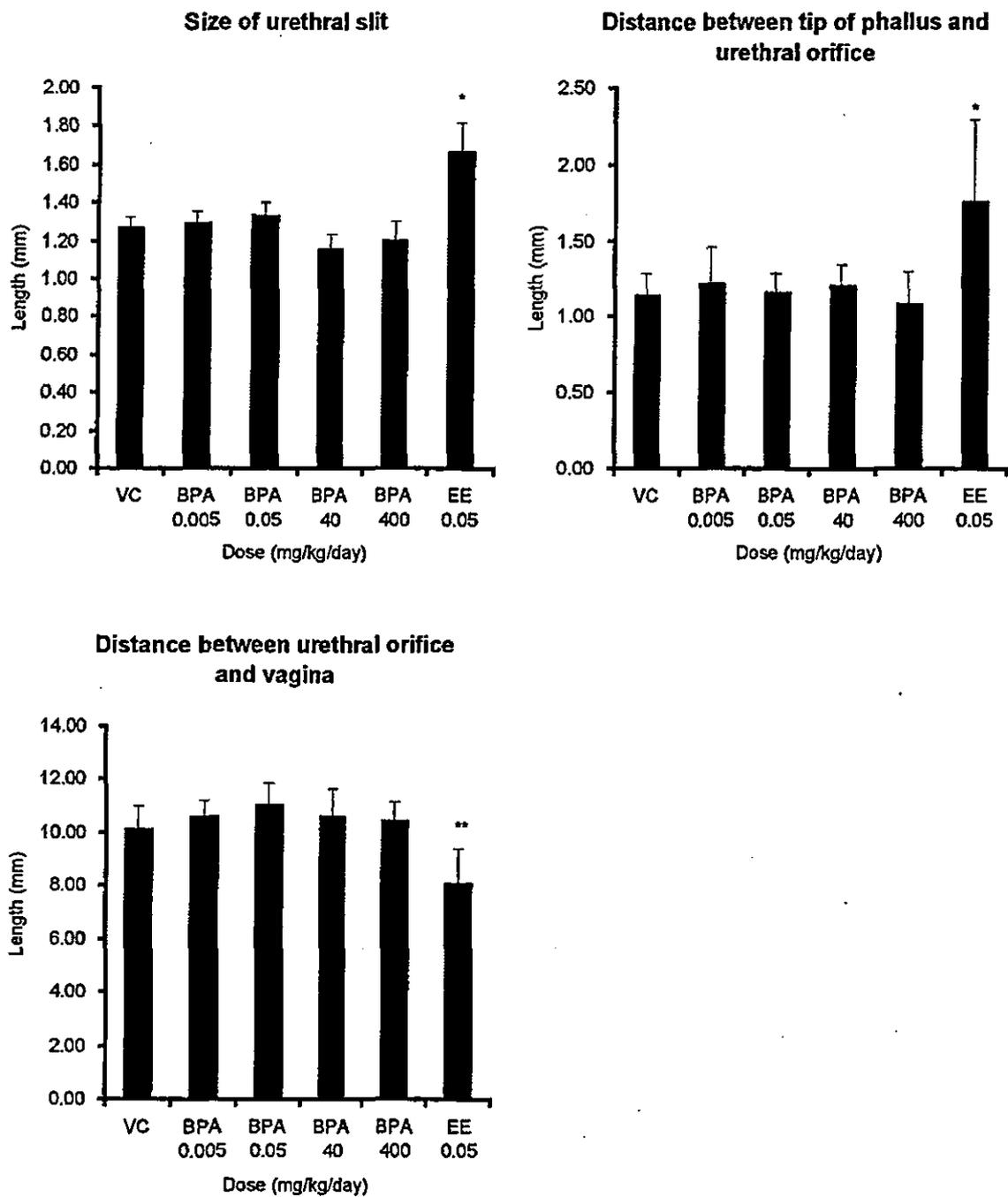


Fig. 4. Morphometry of the female external genitalia on 10 weeks of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

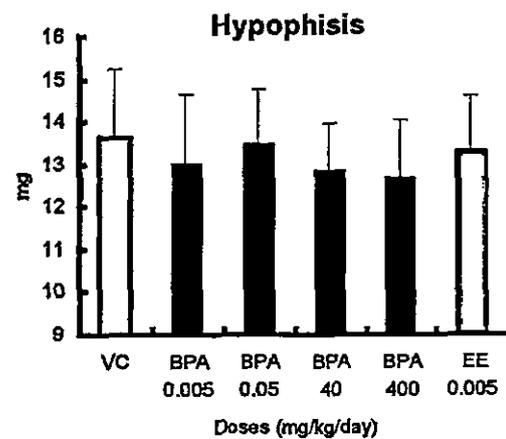
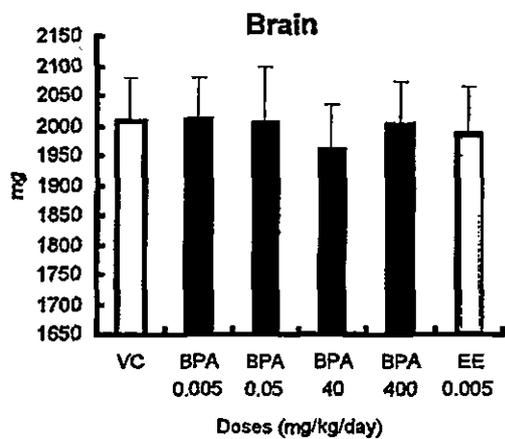
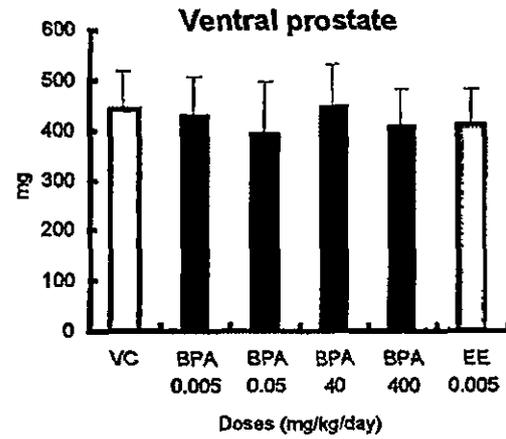
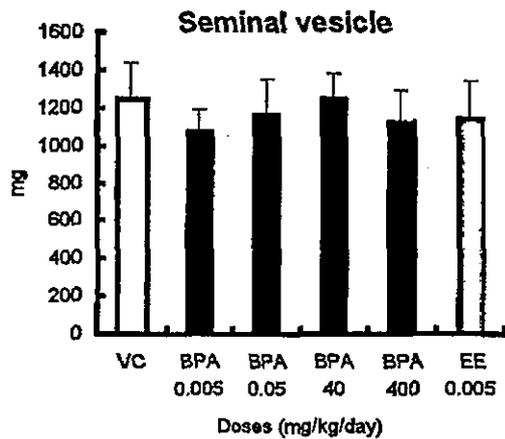
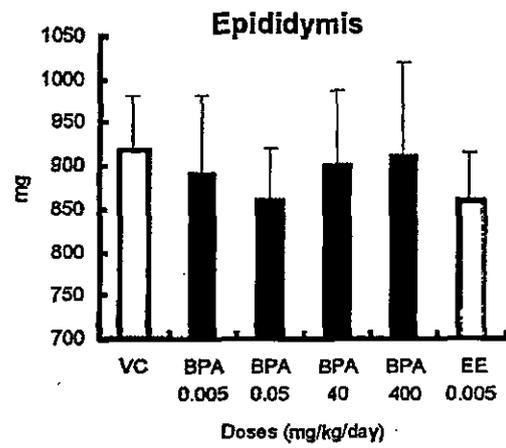
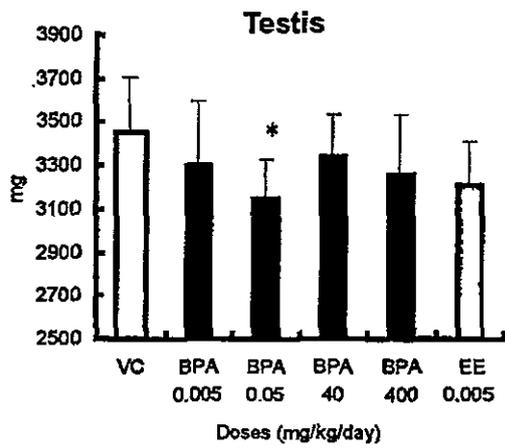


Fig. 5-1. Absolute organ weights of male rats on 13 weeks of age.

* $p < 0.05$ (Dunnett's test)

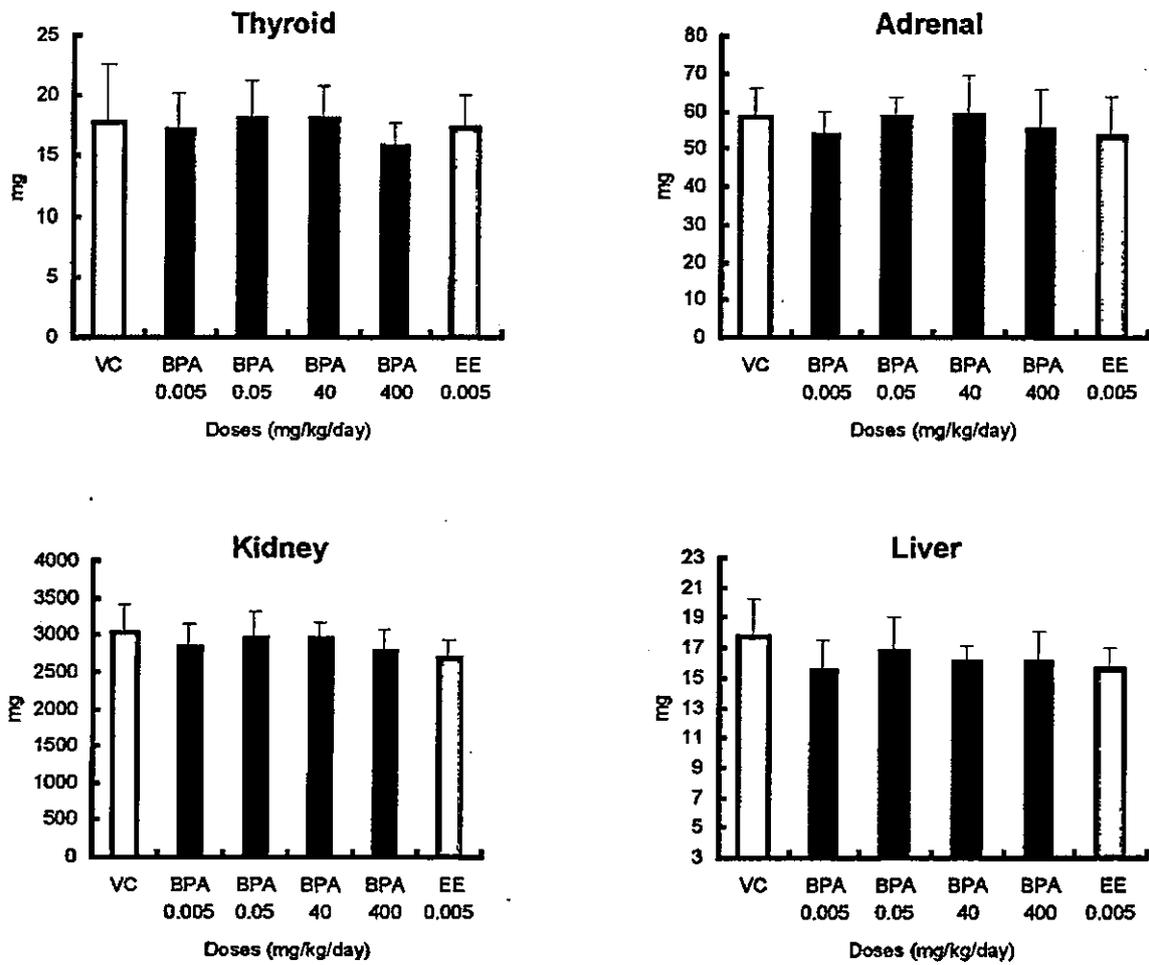


Fig. 5-2. Absolute organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant

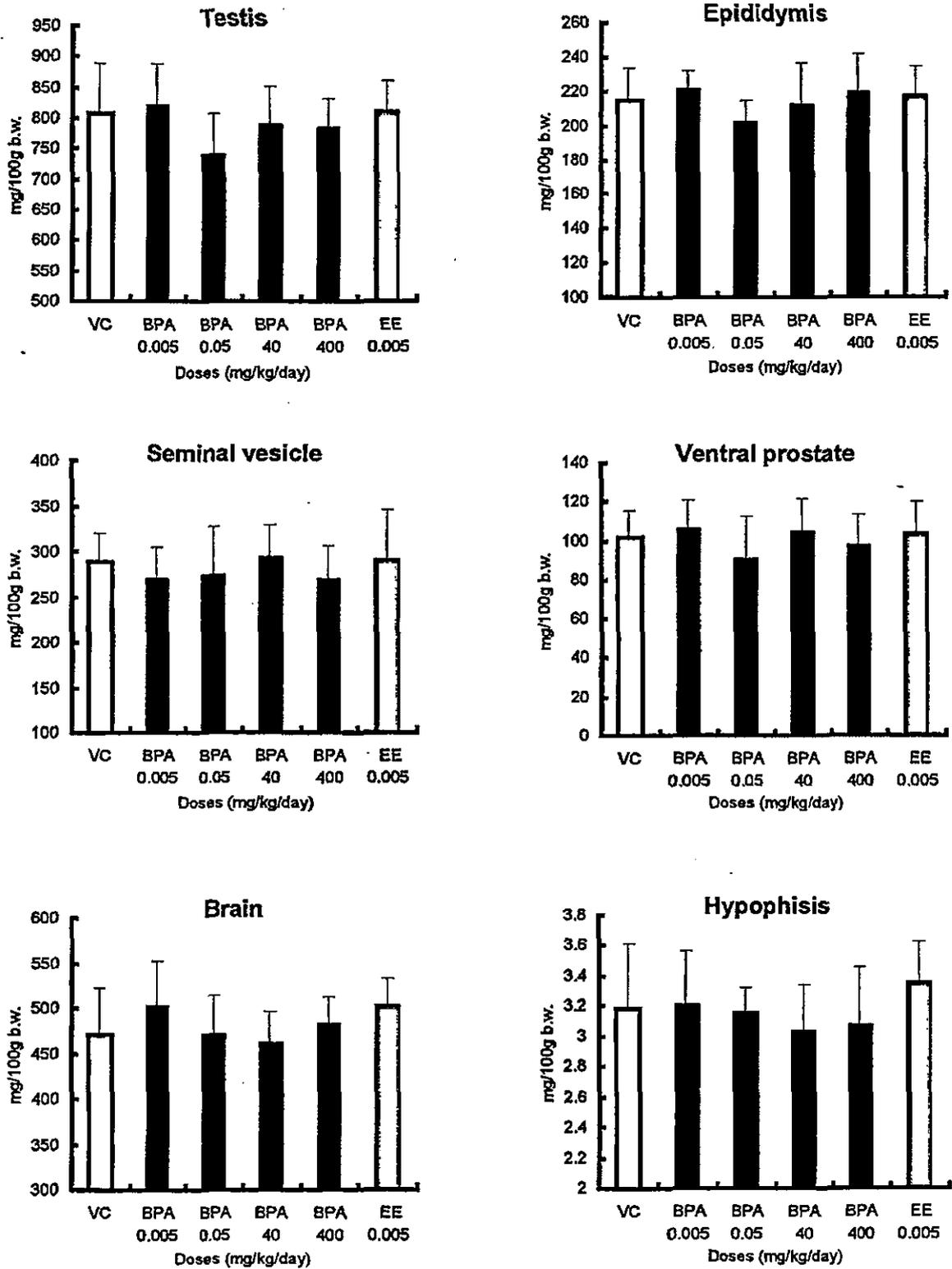


Fig. 6-1. Relative organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant.

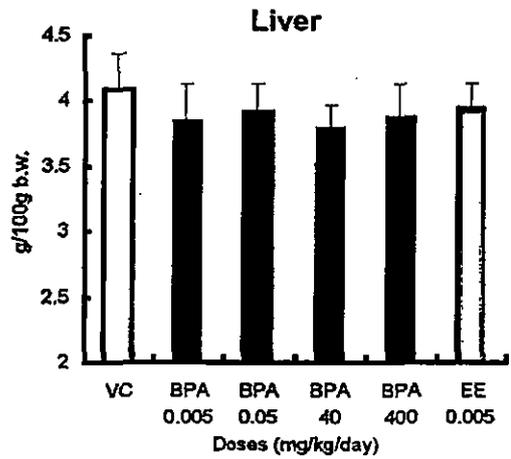
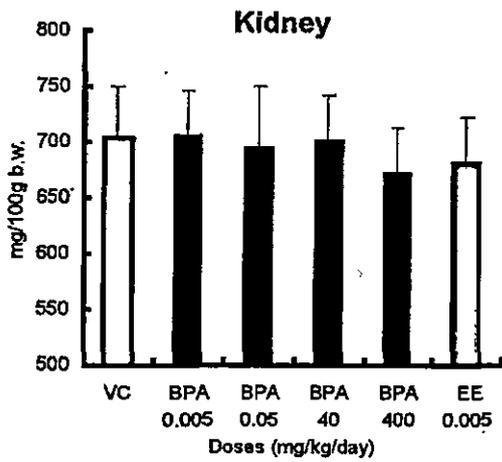
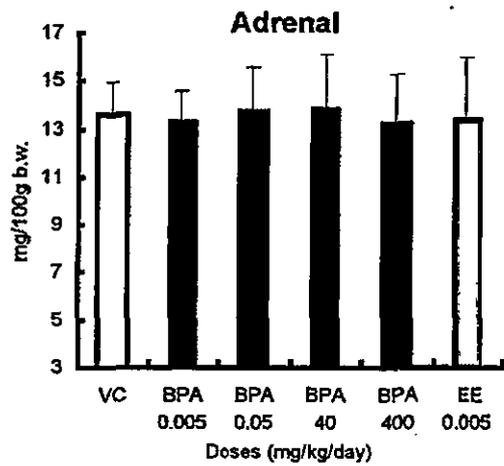
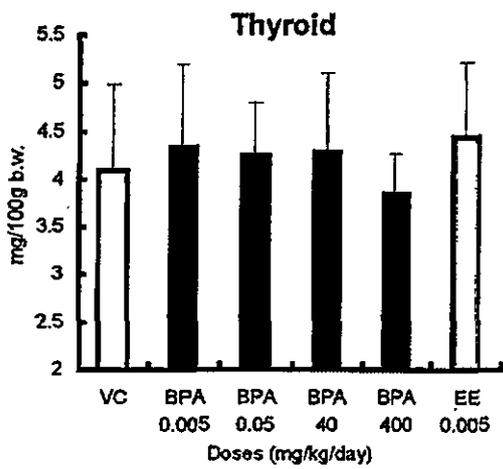


Fig. 6-1. Relative organ weights of male rats on 13 weeks of age.

Not significant.

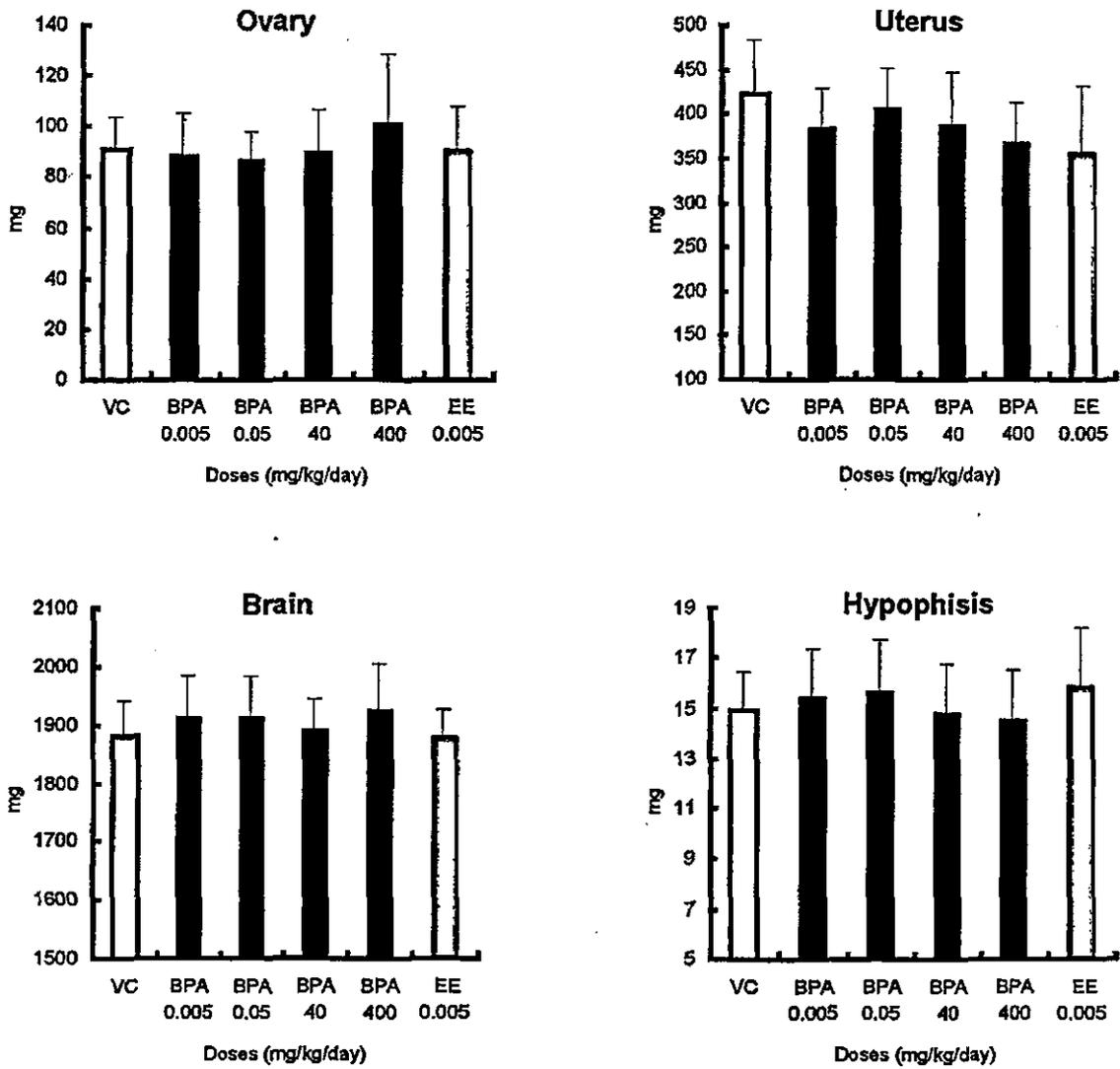


Fig. 7-1. Absolute organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

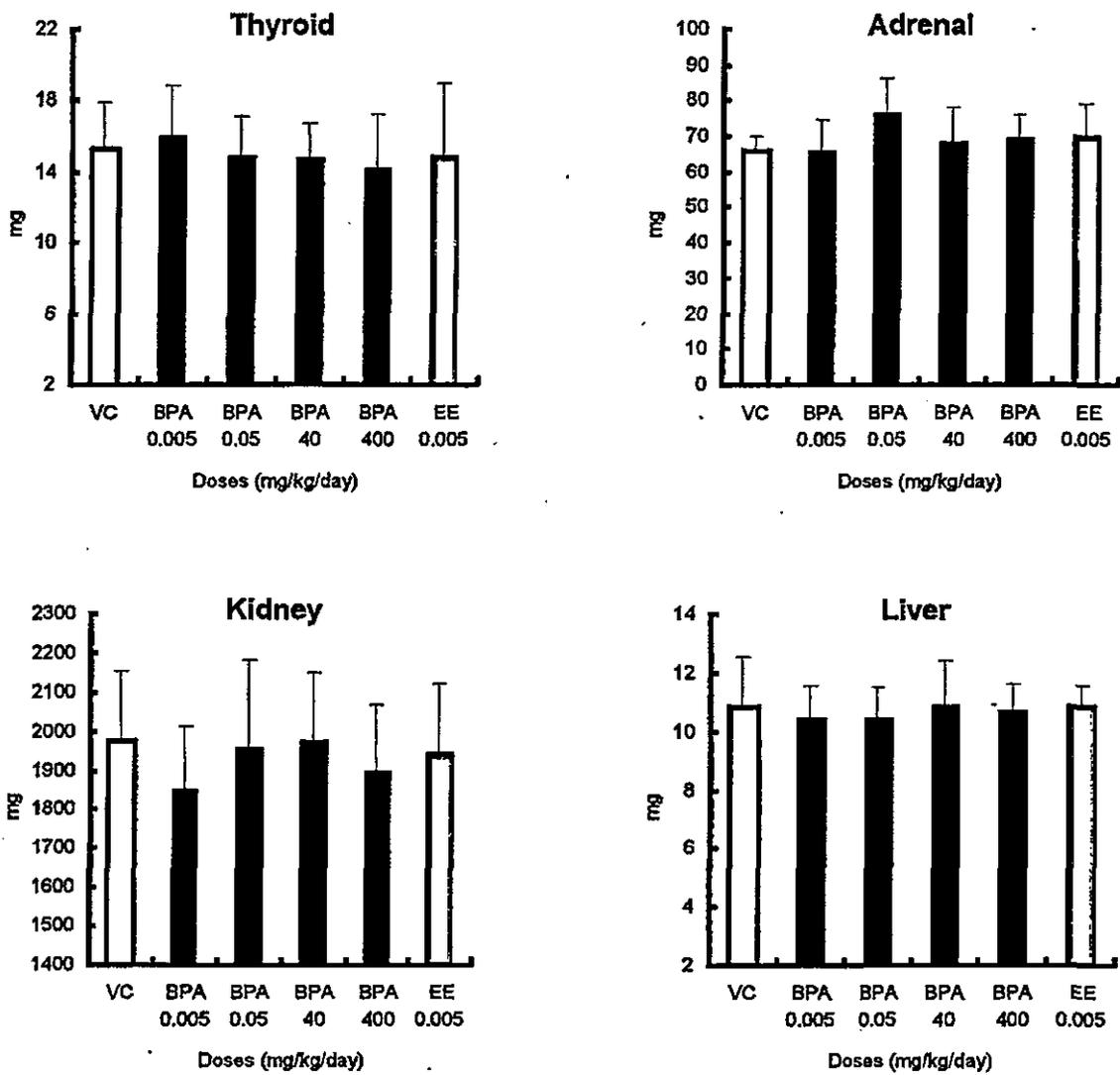


Fig. 7-2. Absolute organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

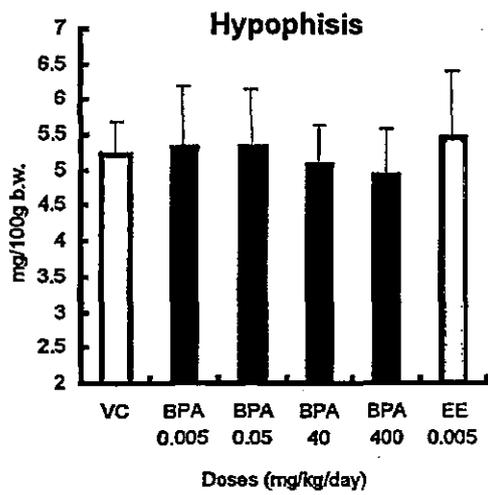
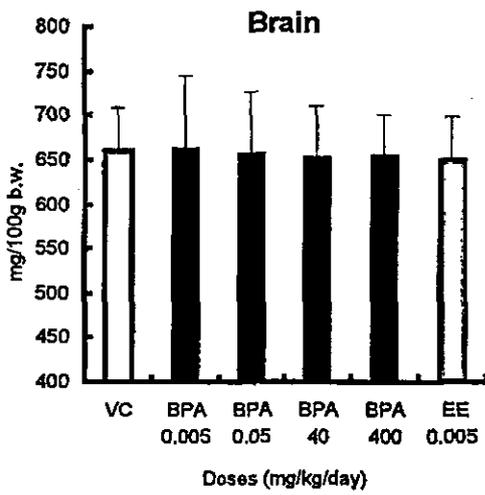
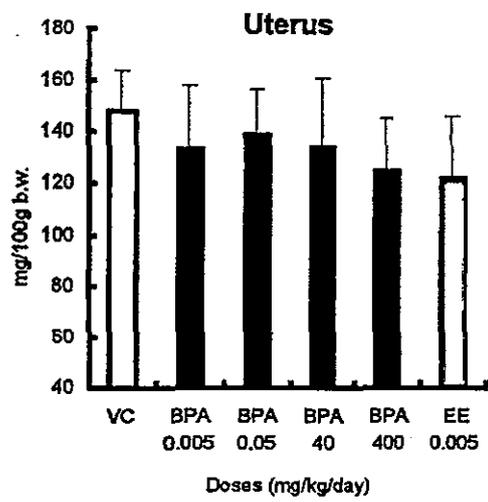
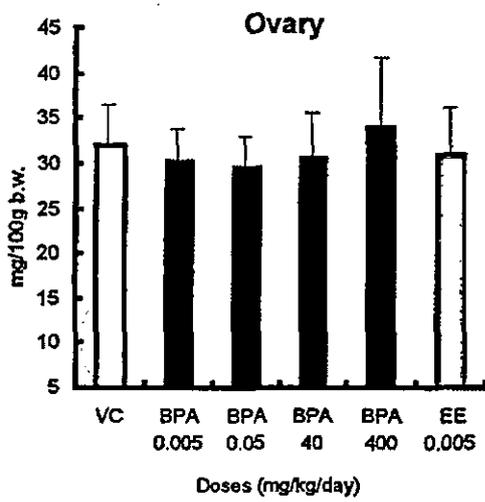


Fig. 8-1. Relative organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

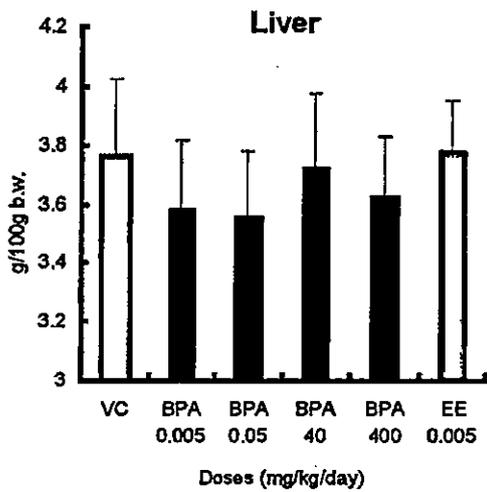
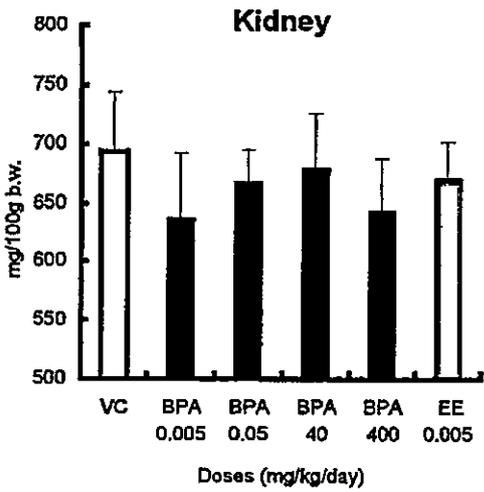
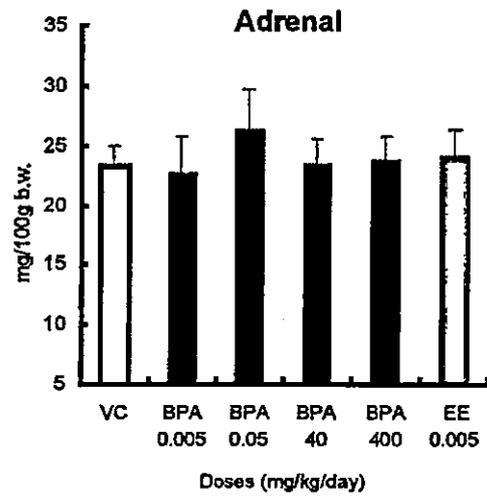
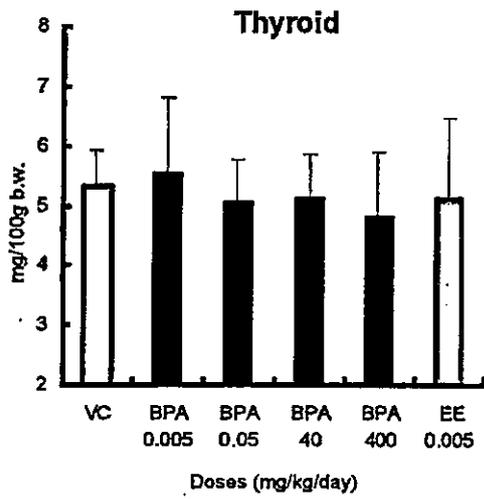


Fig. 8-2. Relative organ weights of female rats on 13 weeks of age.

Not significant.

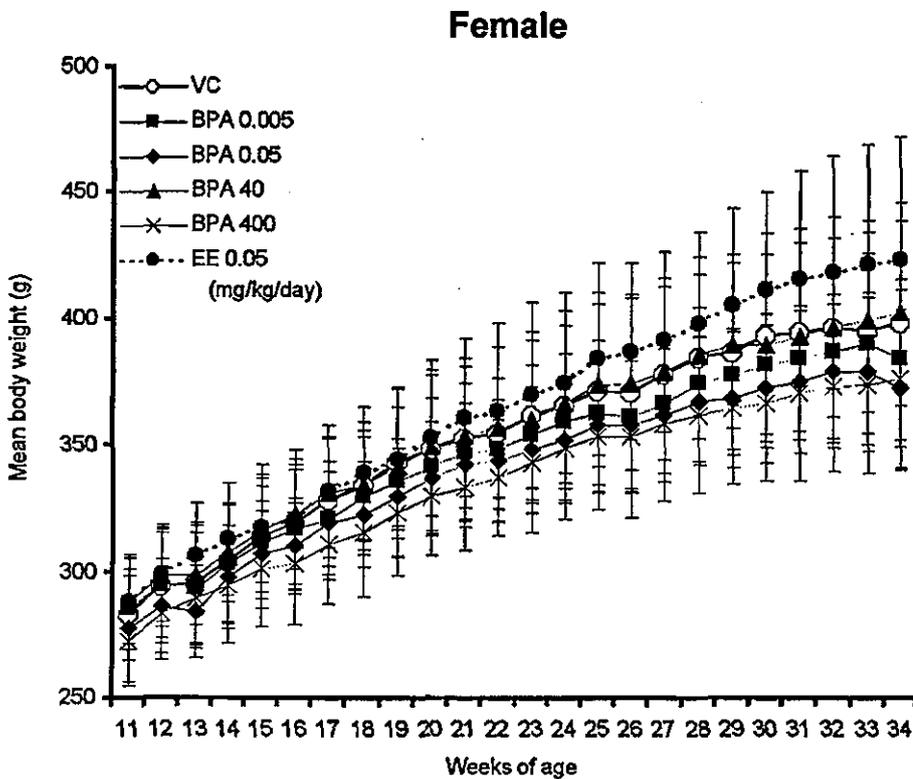
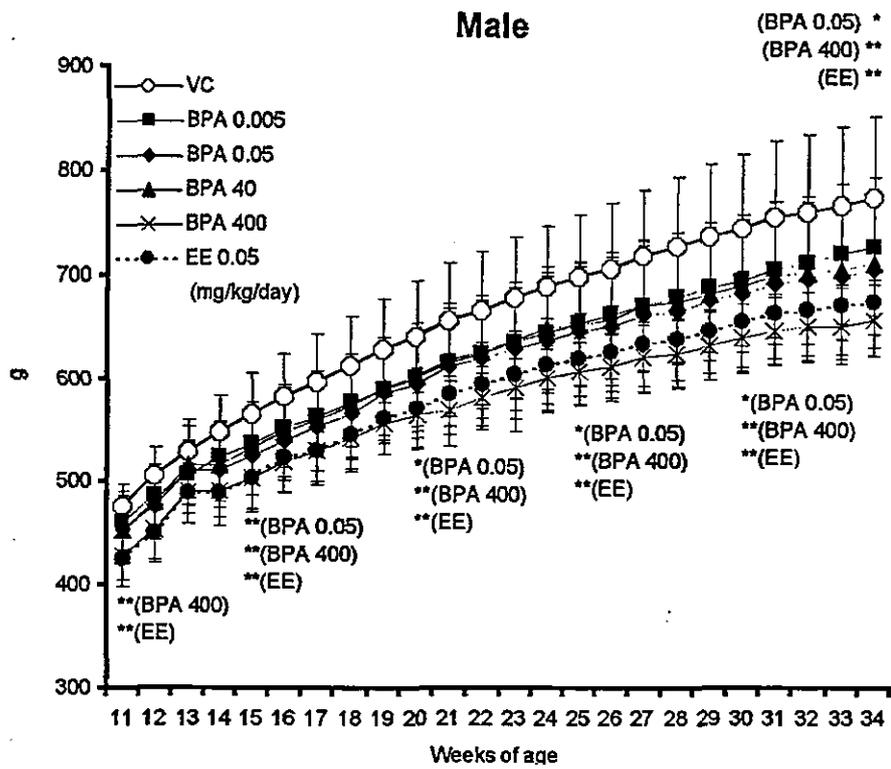


Fig. 9. Mean body weight of offspring (11-34 weeks of age).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

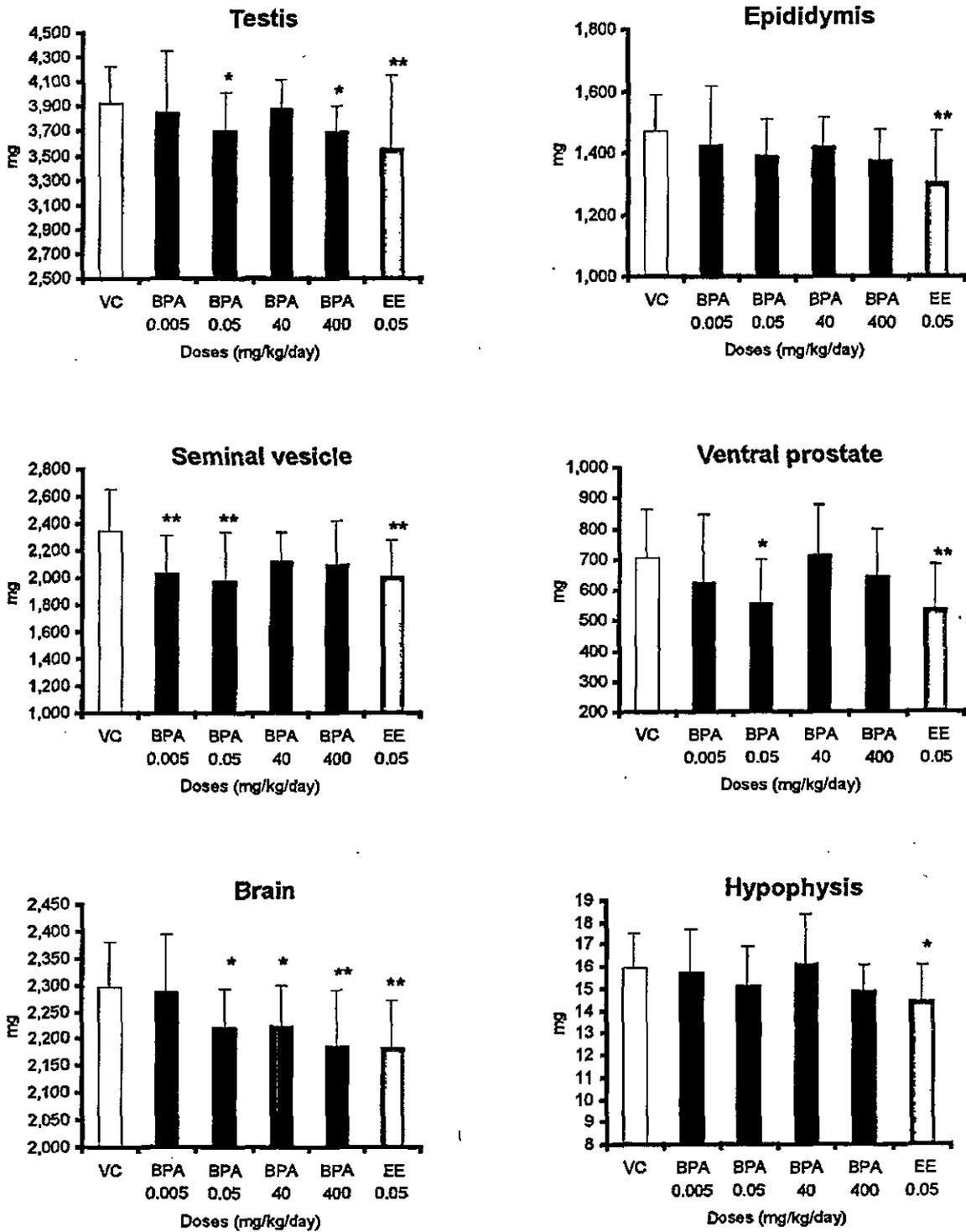


Fig. 10-1. Absolute organ weights of male rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

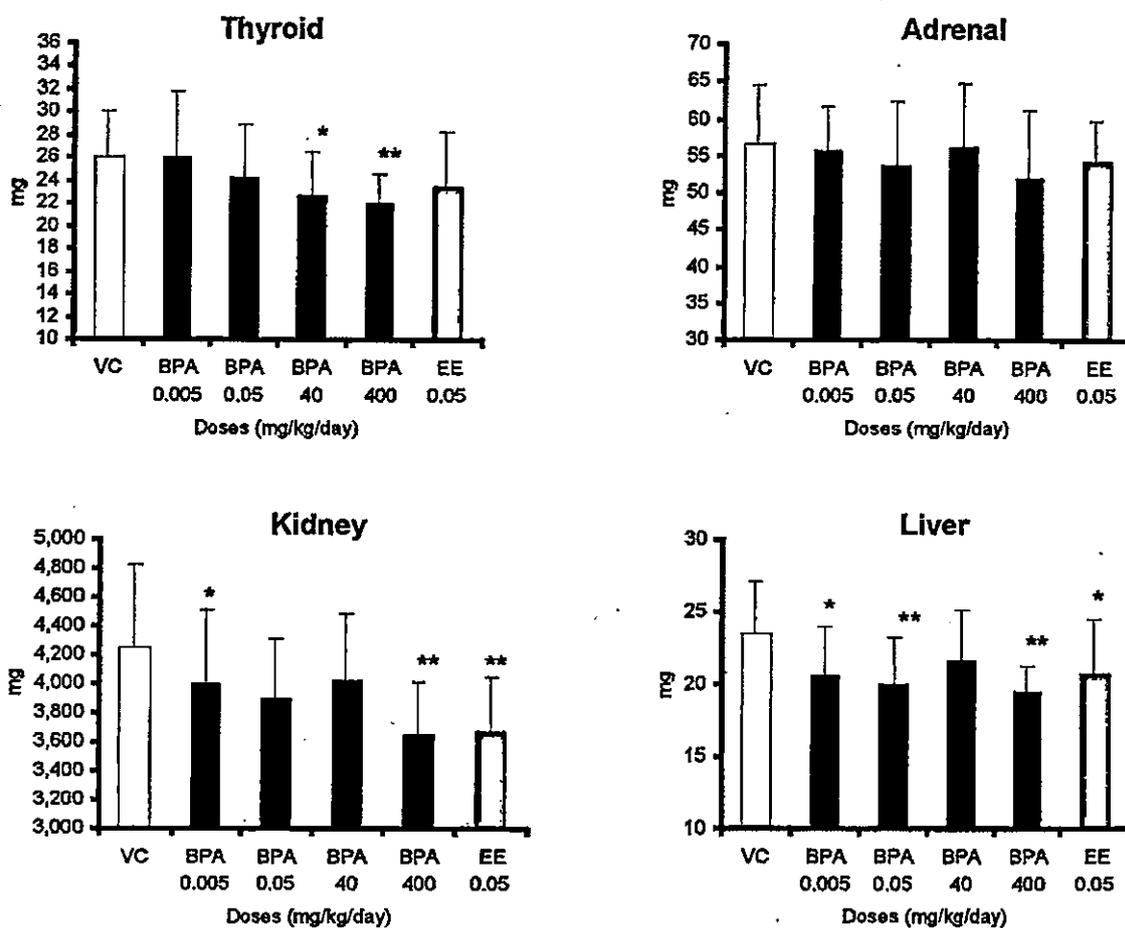


Fig. 10-2. Absolute organ weights of male rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

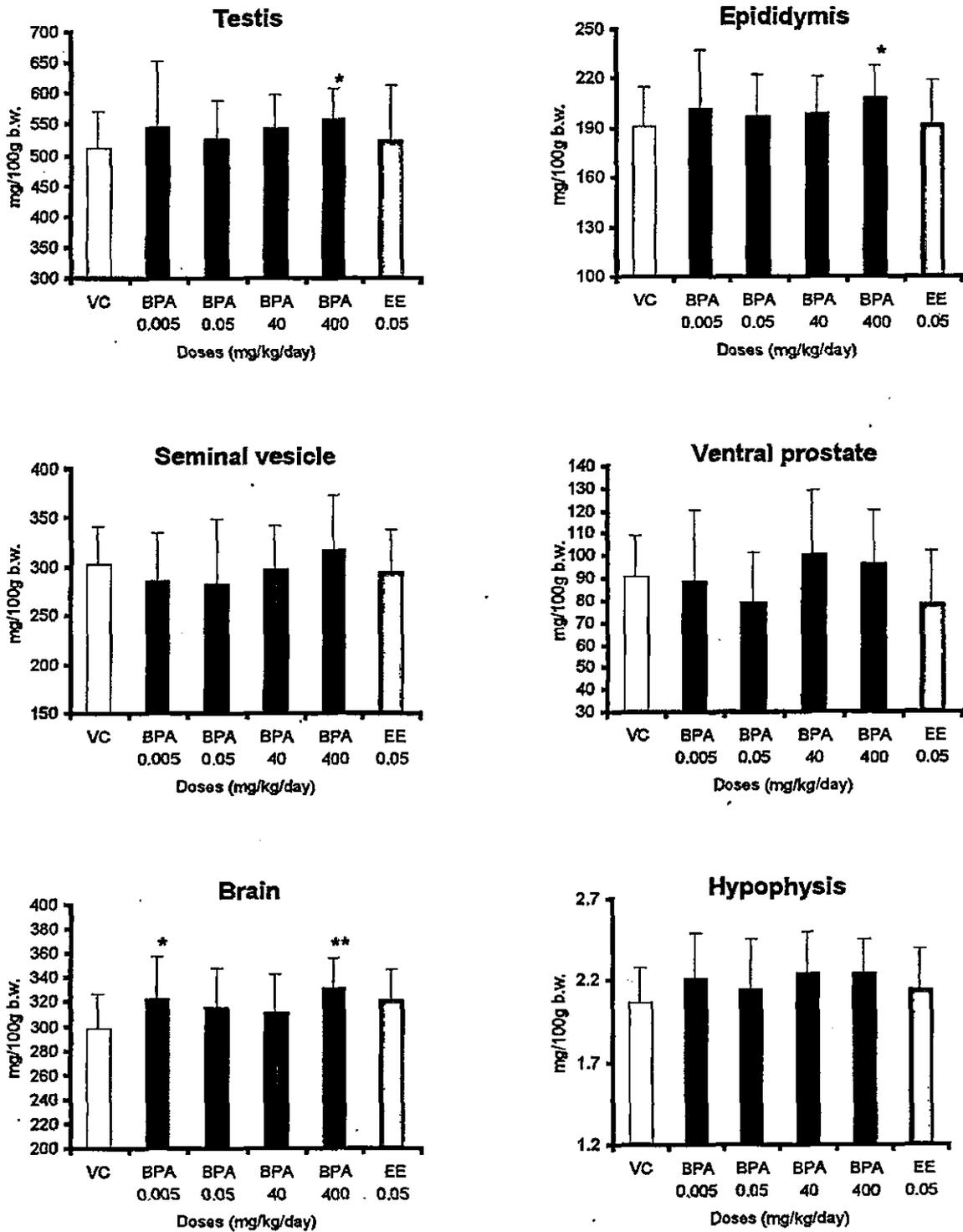


Fig. 11-1. Relative organ weights of male rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

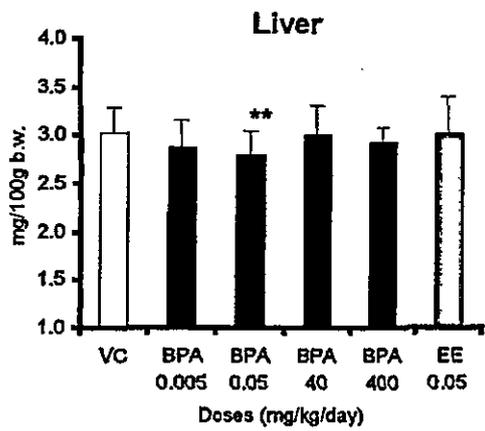
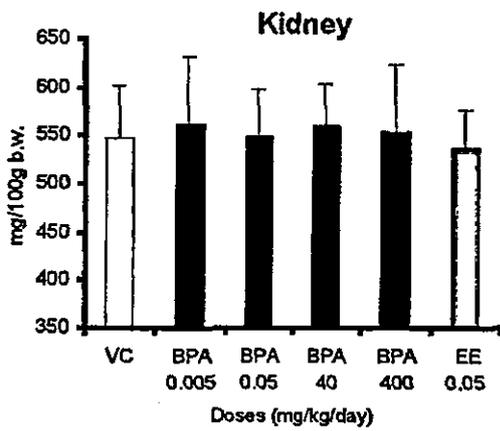
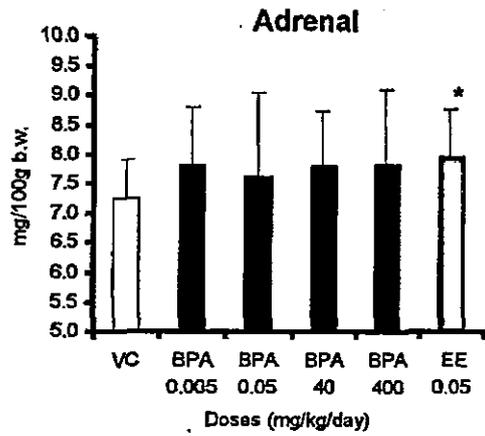
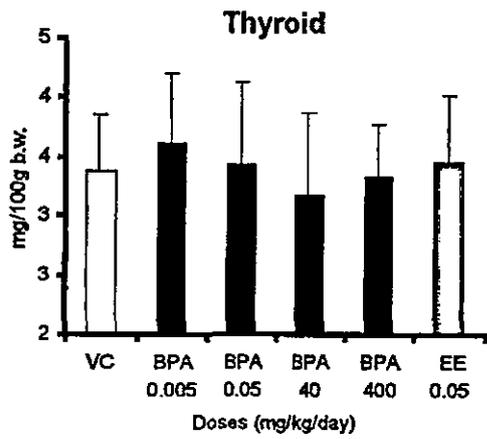


Fig. 11-2. Relative organ weights of male rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

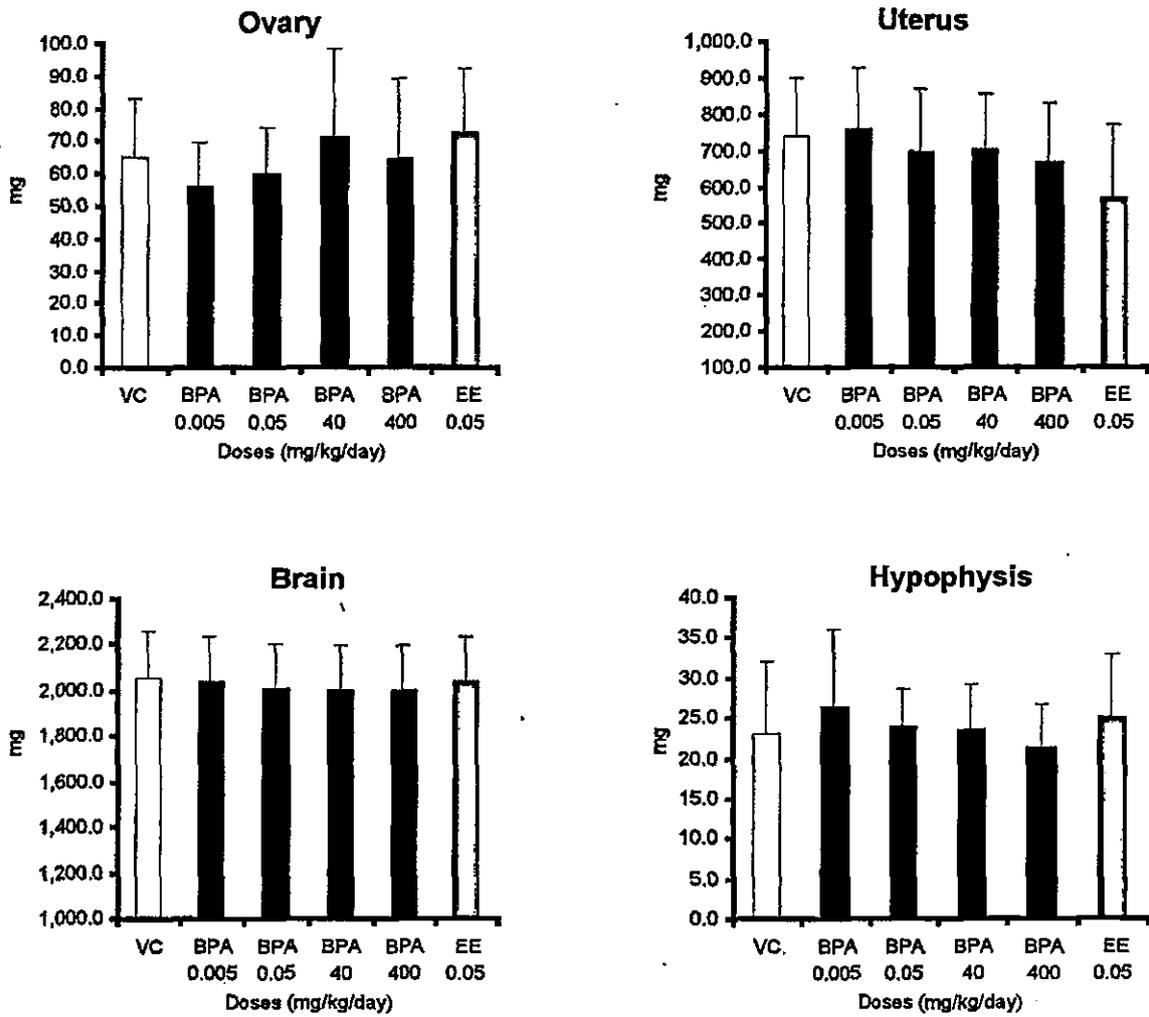


Fig. 12-1. Absolute organ weights of female rats on 7 months of age.

Not significant.

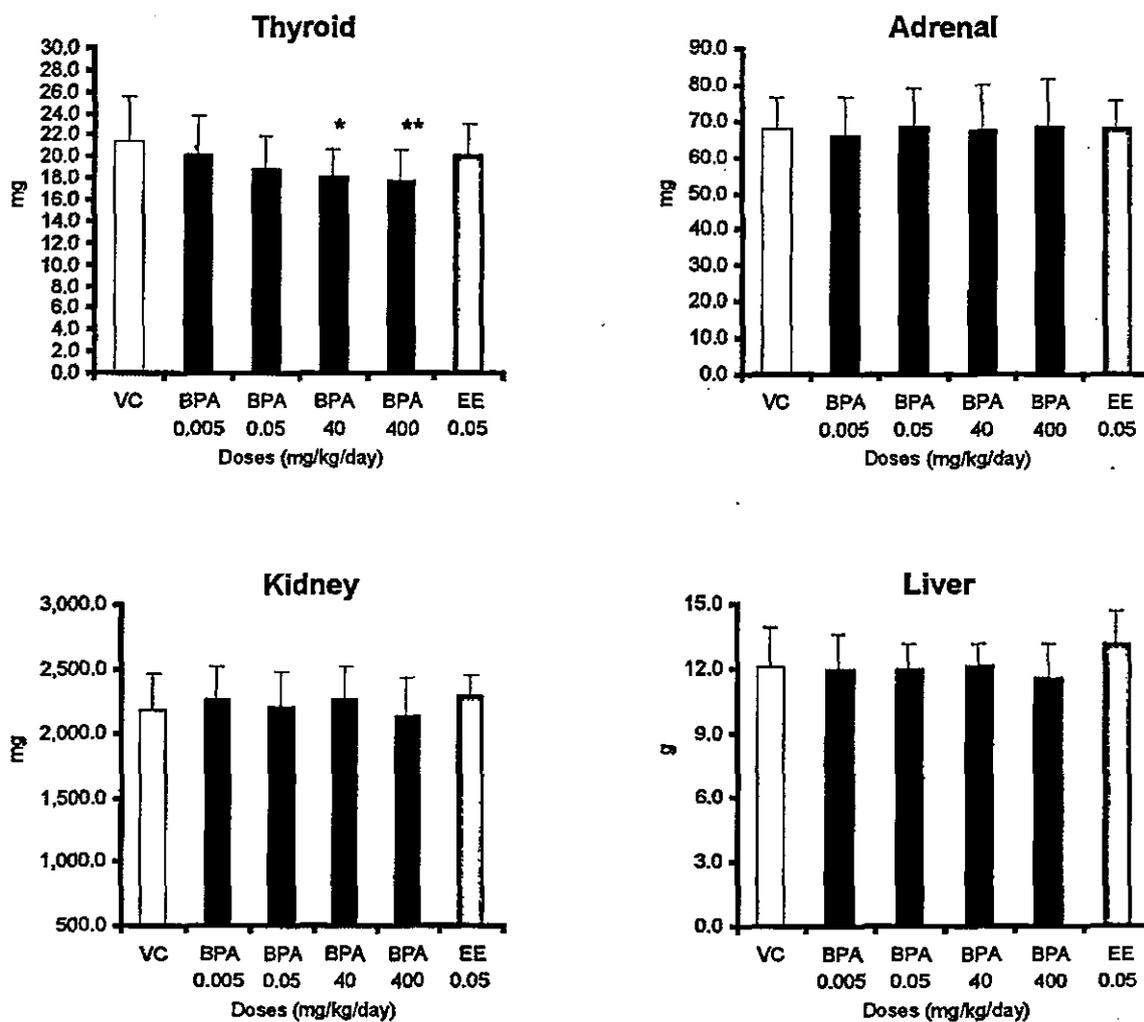


Fig. 12-2. Absolute organ weights of female rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

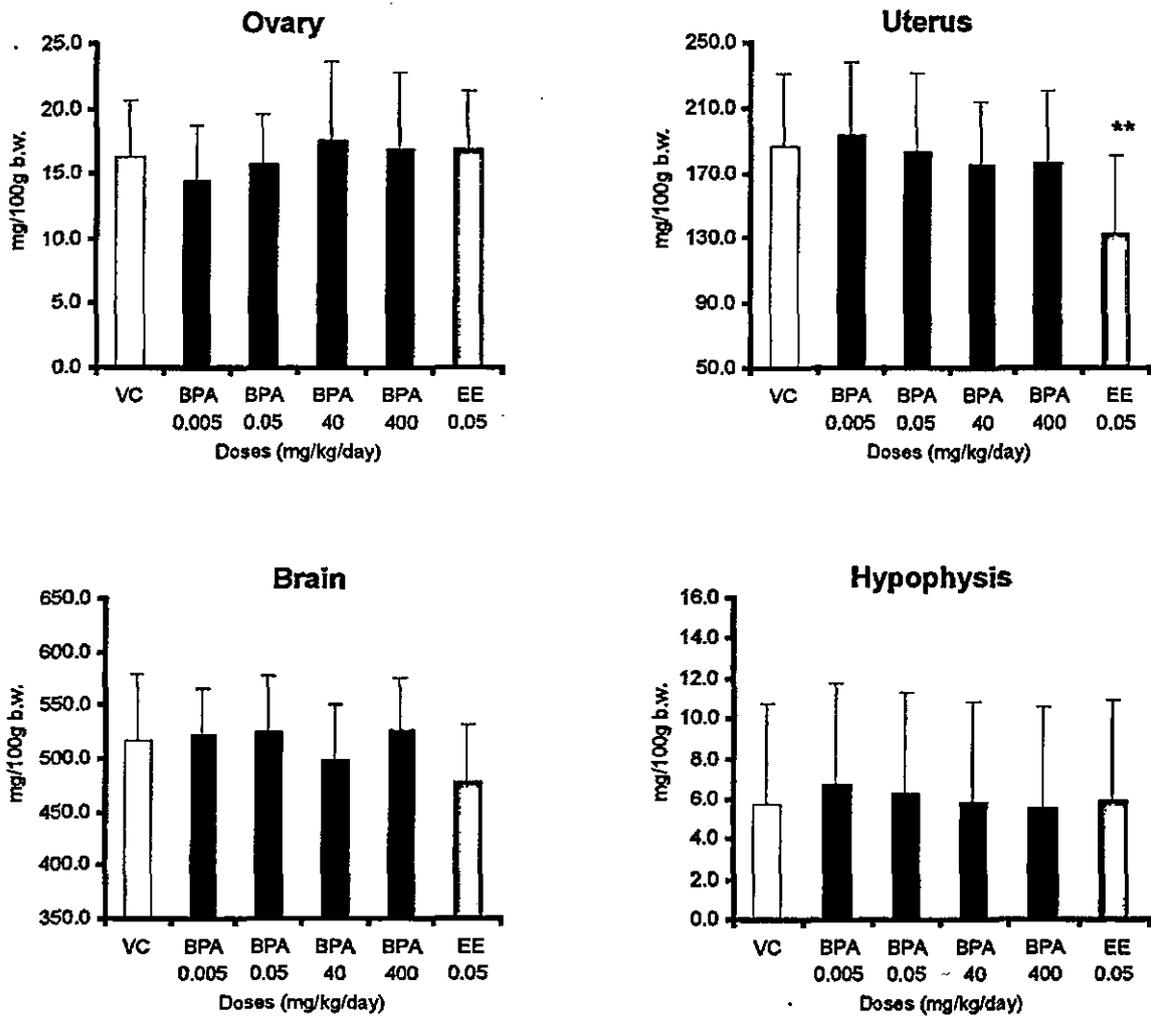


Fig. 13-1. Relative organ weights of female rats on 7 months of age.

** $p < 0.01$ (Dunnett's test)

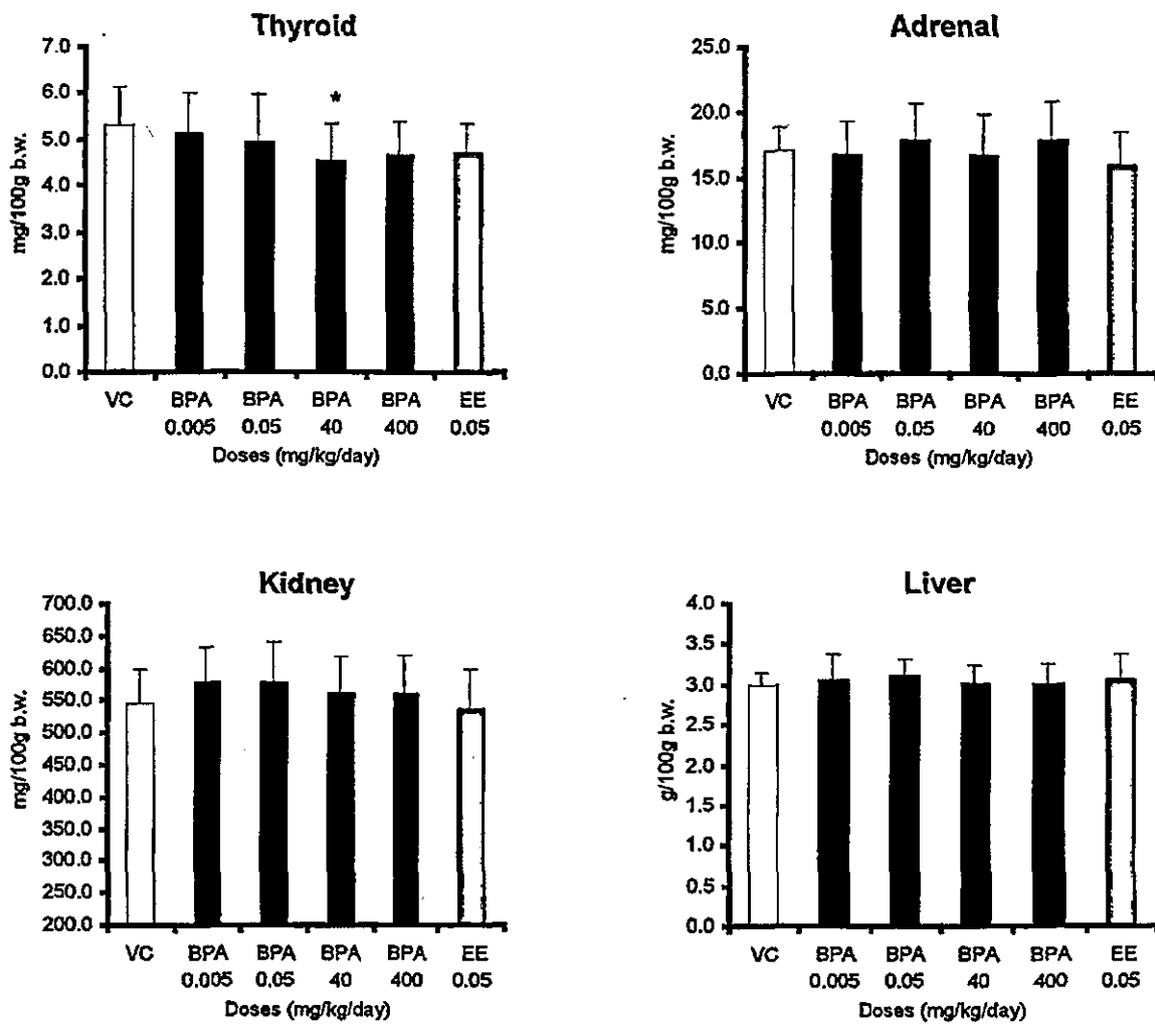


Fig. 13-2. Relative organ weights of female rats on 7 months of age.

* $p < 0.05$ (Dunnett's test)