

「内分泌かく乱物質」

平成 10 年度採択研究代表者

遠山 千春

(国立環境研究所 領域長)

「リスク評価のためのダイオキシンによる内分泌かく乱作用の解明」

1. 研究実施の概要

我々は、マウスやラットなどの実験動物を、妊娠時期を中心に感受性が高い期間に、低用量のダイオキシンに曝露し、いかなる影響が現れるかを観察し、メカニズムの解明を行うことを目指して研究を進めている。このプロジェクトが開始されて実質2年を経て、低用量ダイオキシンの生殖機能、脳機能・行動、免疫機能に及ぼす作用について、様々な知見が得られてきた。本年度の主な結果の概略を記す。

低用量ダイオキシン曝露による雄の生殖器官発達に及ぼす影響を肛門生殖突起間距離 (AGD) の短縮、および前立腺重量の減少を指標として検討したところ、これらの影響が生じるためには Ah 受容体 (AhR) が必要であることが判明した。さらに、胚は、発育段階でダイオキシンに対する感受性が違うことも判明した。胎仔への作用として、糖代謝に関与する GUT3mRNA の発現の低下が生じることが、感受性が高い Holtzman 系ラットの実験からわかり、糖尿病モデルとの類似性が今後の検討課題となった。

脳機能・行動に関しては、膣の形態形成に毒性を生じない用量のダイオキシンによってこれまでの知見とは反対に、卵巣重量増加、膣開口時期、性周期開始時期がいずれも早まることが判明した。他方、ダイオキシンに曝露したラットから生まれた雄の仔の脳における SDN-POA のサイズが小さくなる傾向が認められ、雄性行動の変化が認められた。ダイオキシンに曝露した C57B6 マウスの脳において、いくつかの新規遺伝子の発現量に変化が観察された。

免疫機能については、B 細胞と T 細胞に対する TCDD の作用で新たな知見が得られた。TCDD が B 細胞の活性化および脾臓の胚中心における B 細胞の増殖を抑制して胚中心の形成を抑制する結果、血清中 IgG のレベルが下がることが判明した。T 細胞が増殖・分化する際に放出するサイトカインのうち、Th2細胞由来のサイトカインの産生が抑制されることが判明した。

リスク評価手法のため、TCDD の母親から胎仔への移行を調べた。AhR 欠損マウスと野生型におけるダイオキシンの蓄積傾向の違いは、胎仔においては、ダイオキシンの組織における蓄積に AhR が関与していることが判明した。

また、これまでの毒性影響と体内負荷量との関係をプロットして、量と影響の関係をおりまとめた。実測値が無いものは、投与量から体内負荷量推定値 (一次反応式モデルにもとづき投与量の

86%を使用)を算出したが、体内負荷量推定値は、実測値よりも約 45%低い値を示した。今後、体内負荷量から TDI を推定をより精密に行うことができるであろう。

2. 研究実施内容

本研究課題は、生殖機能、脳機能・行動、免疫機能という 3 つの独立したサブテーマ、ならびにこれらに共通するサブテーマとしてリスク評価の計 4 つのサブテーマから構成され、それぞれが独立した研究グループを構成している。すなわち、対象とする生体反応は様々であるが、可能な限り、ダイオキシンを曝露した共通の動物を共用すること、また、共通の実験技術などはグループを越えて研究者の相互協力体制の元に遂行すること、また、研究結果については、それぞれのグループの独自の研究課題ごとにとりまとめると同時に、リスク評価グループを中心に総合的に研究成果のとりまとめができるように構想されている。以下に本年度に得られた成果の一部を紹介する。

(1) 生殖機能への影響

① 受精卵、初期胚への影響

これまで、ダイオキシンの胚発生と胚内における遺伝子発現への影響を解析してきた。マウス受精卵の体外培養系で各ステージの着床前胚に対する TCDD 曝露を行ったが、以前の報告と異なり分化率に影響は無く、胚盤胞への分化は TCDD によって影響されないことを示した。そこで、各培養胚から RNA を抽出し、各種遺伝子の発現を半定量的 RT-PCR で測定した。その結果、1 細胞期および胚盤胞において AhR の発現は観察されるが、8 細胞期においてはほとんど発現が観察されないことがわかった。ところが、CYP1A1 の TCDD による誘導は胚盤胞ではあるものの、1 および 8 細胞期胚ではないことがわかった。これらの結果は各ステージの着床前胚のダイオキシンに対する感受性が異なることを示唆している。

② 雄性生殖細胞系列に対する影響

ダイオキシン類が雄配偶子(精子発生)に対して直接的に影響するのか検討するため、出生直後の ICR マウス精巣を摘出し、co-PCB(0, 10, 100, 1000 nM)を含む培地で 48 時間器官培養し、各細胞の増殖率および各種の遺伝子発現を解析した。まず CYP1A1 mRNA は co-PCB の用量依存的に上昇した。生殖細胞および支持細胞の BrdU ラベリングインデックスに変化はなく、また細胞マーカーの発現レベルにも影響はなかったため、ダイオキシン類は新生仔精巣の細胞分化に対する影響は少ないものと考えられた。一方、ステロイド合成酵素である P450_{scc} mRNA レベルは用量依存的に減少し、P450_{c17} mRNA レベルは用量依存的に上昇した。この結果はダイオキシン類が新生仔精巣におけるステロイド合成に影響する可能性を示唆している。

③ 雄性生殖器官発生に及ぼす影響

これまで、ダイオキシン類の胎仔期曝露によりもっとも顕著な変化を示すとされる雄の外部生殖器官・副生殖腺の発生影響における作用メカニズムの解明を目的に、関連する遺伝子の発現変化と、最も影響の現れやすい投与時期を検討してきた。妊娠 15 日(GD15)のラットに TCDD を単回経口投与による、産仔の腹側前立腺内 5 α -reductase mRNA の発現上昇 androgen receptor mRNA は発現減少を報告した。また GD15, GD18, PND2 に TCDD 投与したところ、GD15 投与

で AGD と腹側前立腺の減少、androgen receptor mRNA の前立腺内での減少が見られたが、GD18とPND2 投与群では変化がなく、前立腺重量の減少は、GD15より後の妊娠期間中における曝露では引き起こされないこと、すなわちクリティカルウインドウの存在が示された。本年度は、TCDD によるこの現象が AhR 遺伝子依存性であるか検討するため、AhR 遺伝子ノックアウトマウスを用いた。AhR(+/-)雌雄を交配し、GD13 に 10 μ gTCDD/kg を投与、PND14 に AGD を測定、尿生殖器複合体内の Probasin 発現を観察した。その結果、AhR(+/+)および(+/-)の TCDD 投与群のみに AGD の短縮が生じ、他方、Probasin の発現が見られなくなったことから、ダイオキシンによる雄性生殖器発生影響は AhR 依存性であることが判明した。

④ 胎盤・妊娠子宮機能に及ぼす影響

本年度の研究では、まず妊娠ラットに TCDD を投与し、胎盤への影響を、特に栄養代謝の変化の観点から解析した。Holtzman 系ラットの GD15 に、TCDD を 0.8 μ g/kg、1.6 μ g/kg の投与量で単回経口投与した。妊娠後期における胎仔死亡が、対照群、0.8 μ g/kg および 1.6 μ g/kg 投与群においてそれぞれ 0%、3.0%および 12.9%観察された。胎盤の組織レベルの解析を行ったところ、TCDD 投与群の GD20 の胎盤において、グリコーゲン細胞数及び間質液に満たされた空砲部の増大が観察された。胎盤のグリコーゲン濃度は、TCDD 投与群において増加傾向が見られた。これら TCDD 投与群における組織変化およびグリコーゲン量の増加は、胎盤が母体血液から取り込むグルコース量の増加に依存している可能性が考えられたため、同機能に重要な役割を担う GLUT3 の mRNA 発現を RT-PCR により調べた。その結果、GD20 において TCDD 投与群では対照群に比べ約 2 倍に上昇していることが明らかとなった。TCDD 曝露により胎盤グルコース動態の変調がおきていることが示唆された。

次に、Holtzman 系ラットと比較的低感受性である SD ラットを用い、TCDD による種や系統による胎仔死亡の感受性の相違やそのメカニズムについて検討を行った。SD ラットに 0、2、5、10 μ g/kg、Holtzman 系ラットに 0、0.8、1.6 μ g/kg の TCDD を GD15 に単回経口投与し GD20 に解剖した。SD ラットでは高用量の 10 μ g/kg の TCDD 曝露によっても、胎仔死亡、ならびに胎盤のグリコーゲン細胞の形態変化は観察されなかった。更に、胎盤のグルコース輸送を担う GLUT3 mRNA 発現量の変化も認められなかった。以上、SD ラットでは、胎仔死亡や胎盤グルコース動態の変化は示されず、低感受性を示した。これら胎仔死亡および胎盤糖代謝の変化の Holtzman 系と SD 系との間の系統差について検討を行うため、両系統ラットの胎盤における CYP1A1 の発現量を比較検討した。両系統とも対照群に比べ TCDD 曝露により CYP1A1 の誘導が認められたが、予想に反し、各系統の TCDD 投与量の違いによって発現量に差は見られなかった。このことは胎仔死亡および胎盤グルコース動態の変化と、胎盤の CYP1A1 の発現量には相関性がないことを示唆している。胎仔死亡や胎盤グルコース動態の変化の系統差は、胎盤 CYP1A1 発現量以外の他の要因に依存していると考えられた。現在、TCDD 曝露による胎盤変化のメカニズムを説明できる分子基盤を設けることを目的として、ホルツマンラットの胎盤において TCDD 曝露により発現量が増加するタンパク質を二次元電気泳動法により解析を行っている。

(2) 脳機能・行動への影響

① 遺伝子改変マウスを用いた性ステロイド産生系への影響解析

これまでに、胎仔期および新生仔期の脳の aromatase 活性や 5α -reductase 活性が TCDD 曝露により阻害される事を見出ししている。これらの結果は、TCDD が性ステロイド産生系酵素に影響を及ぼすことを示唆している。そこで、ステロイド産生系酵素に及ぼす影響を詳しく調べるため、AhR(+/-) 雌雄マウスを交配し、GD12.5 に $10\mu\text{g}/\text{kg}$ の TCDD を投与後、GD18.5 の脳及び PND21 の脳についてステロイド産生系酵素の発現を調べることにした。

また、同様のプロトコールで aromatase(+/-) 雌雄マウスを交配し、TCDD 曝露の影響を併せて検討した。交配によるマウスの準備が遅れたため、本年度は、CYP1A1 の発現量を調べた。GD19 の AhR(+/-)では、TCDD 曝露による CYP1A1 mRNA の発現の有意な上昇が認められたが、AhR(-/-)型では、発現の上昇は認められなかった。脳においても TCDD 曝露による CYP1A1 の応答は AhR 依存性であることが確認できた。

② 内分泌・生殖腺への影響

Long-Evans 系雌ラットの性成熟に対する TCDD の周生期曝露の影響を調べた。これまでに、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ (GD15) の TCDD 曝露により膣の形態形成に異常が見られ、その結果膣開口が遅延することが報告されていた。今回は、膣の形態形成には影響が見られない低用量曝露が雌ラット性成熟に及ぼす影響を調べた。その結果、200 または 800 ng/kg の TCDD 曝露により、卵巢重量増加、膣開口、性周期発来(膣スミアによる)が用量依存的に早くなっていることが確認された。800 ng/kg 曝露群では、対照群に比べて初発排卵も 7-12 日早くなっていた。さらに代償性卵巢肥大も 10 日以上早い時期から観察されたことから、低用量 TCDD 曝露は、卵巢および外性器だけでなく視床下部・下垂体のエストロゲン・フィードバック機構の成熟も早めることがわかった。以上の結果から、膣の形態形成に異常をもたらさないレベルの低用量 TCDD の周生期曝露は、雌ラットの早熟化を引き起こすことが示され

③ 脳における性決定機構へのダイオキシンの影響とそのメカニズム解析

妊娠 15 日目の Holtzman 系ラットに 200 または 800 ng/kg の TCDD を経口投与し、仔の脳における SDN-POA の神経核の体積を測定した。その結果、雄においては対照群に比べ 200 ng/kg の TCDD 曝露群に SDN-POA の体積の有意な減少が認められた。一方、雌においては SDN-POA の体積に TCDD 曝露による有意な変化は認められなかった。本年度の結果は、これまでの甘味嗜好試験における TCDD 曝露による雄性化の阻害や、新生仔期の脳 aromatase 活性の変化などとの結果と合わせて、胎仔及び新生仔脳で estradiol の産生量が低下した結果、SDN-POA の発達が阻害され、雄性行動に変化が生じたと考えられた。

④ ダイオキシソ類の脳の発達過程における毒性発現機構の解析(山梨医大・前田秀一郎担当)

昨年に引き続き、C57BL/6 系マウスを用いて TCDD の周生期曝露による遺伝子発現の影響を解析した。昨年ディファレンシャル・ディスプレイ法で見出した差異のある cDNA クローン、SFRP2 及び c-MYC の発現について、別の GD 18.5 日目の 2 匹の仔の脳から RNA 標本を調製し、ノーザンブロット法で調べた。いずれも非投与群に比べ、投与群においては、

mRNA 量が2倍程増加をしていることを確認した。また、胎仔脳及び頭部から抽出した mRNA を、マイクロアレイ法で解析した結果、唾液腺で発現している uncoupling protein 1 (UCP-1)、demilune cell-specific protein や salivary alpha-amylase の変動を新たに見出した。これら新知見をもとに今後、TCDD の脳及び唾液腺におよぼす影響の分子機構を明らかにする予定である。

(3) 免疫機能への影響

今年度は、免疫したマウスの成獣に TCDD を直接曝露した時の、免疫系への影響のメカニズム、およびアレルギー反応への影響について以下の結果を得た。またこれらの知見を踏まえて、現在マウスにおける経胎盤、授乳曝露の影響について検討中である。また、T 細胞特異的に活性化型 AhR を発現させたトランスジェニックマウスを作成中である。

① 抗体産生反応における B 細胞の増殖、分化に対する TCDD の影響

TCDD は、主要な感染防御機構である抗体産生を抑制することが知られている。外来異物に反応して活性化された B 細胞は、増殖して胚中心を形成し長寿命抗体産生細胞に分化した後、異物に対して抗体を産生する。この一連の反応に及ぼす TCDD の影響について検討を行った。C57BL/6 系マウスを卵白アルブミン(OVA)で免疫すると同時に、0 および 20 μ g/kg の TCDD を単回経口投与し、血中の OVA 特異的 IgG1 値、脾臓のリンパ球亜集団の変動および胚中心形成について解析した。その結果 TCDD 投与群において血中の抗 OVA IgG1 量が減少し、胚中心形成が抑制されることが明らかとなった。さらに胚中心内で B 細胞の増殖が抑制されることが認められた。また、活性化マーカーを発現する B 細胞の割合が TCDD 投与群で減少することがわかった。以上の結果より TCDD が B 細胞の活性化および胚中心における B 細胞の増殖を抑制して胚中心形成を抑制し、その結果血中の抗 OVA IgG1 量が減少することが示唆された。

② 抗体産生反応における Th2 細胞由来サイトカイン産生に対する TCDD の影響

抗体産生反応において、抗原と反応した B 細胞が活性化し抗体産生細胞に分化するためには、同じく抗原を認識した T 細胞から分化した Th2 細胞との相互作用や、Th2 細胞が分泌するサイトカインの働きが不可欠である。本研究では、TCDD が Th2 細胞におけるサイトカイン産生に及ぼす影響について、OVA 免疫した C57Bl/6 マウスの一次免疫反応において検討した。その結果、TCDD (20 μ g/kg) は Th2 細胞由来の IL-4、IL-5、IL-6 の産生を抑制し、特に IL-5 についてはその反応の初期からほぼ完全に産生を抑制することが明らかとなった。この IL-5 産生量を指標として抑制の用量依存性を調べたところ、1 μ g/kg と低濃度から抑制効果が見られた。さらに in vitro 再構成実験から、TCDD は抗原提示細胞ではなく主に T 細胞に影響を及ぼしていることが明らかとなった。以上の結果から、TCDD は T 細胞に影響を及ぼしてその機能を低下させ、抗体産生を抑制することが示唆された。

③ T 細胞特異的活性化型 AhR トランスジェニックマウスの作成

TCDD による抗体産生の抑制や胸腺の萎縮は、Ah レセプター (AhR) を介していると考えられている。しかし、その AhR の活性化がどの細胞において誘導されることが免疫系への影響をもたらしているのかは証明されていない。そこで我々は、T 細胞における AhR の活性化が免疫系に

いかなる影響を及ぼすかを明らかにするために、活性化型 AhR(TCDD の有無に関わらず活性化している変異体)を、ヒト CD2 プロモーター(T 細胞特異的に発現する)の下流につないだ遺伝子を構築し、これを用いてトランスジェニックマウスの作成を試みた。現在までに、1 系統が樹立され、さらに多くの系統を作成中である。

④ アトピー性皮膚炎自然発症マウスにおけるアレルギー反応に及ぼす影響

これまでに、抗原 OVA 感作した NC/Nga マウスへの TCDD 投与は抗原特異的 IgE 産生を抑制し、同時に Th2 タイプのサイトカイン産生も顕著に抑制することを明らかにした。また、TCDD 投与によるアトピー性皮膚炎様症状の発症は認められなかった。そこで、リンパ球幼若化反応によるサイトカイン産生への TCDD 曝露の影響を調べた。その結果、LPS と PHA 刺激による IL-4 産生では TCDD の投与、1 週、4 週、8 週後のいずれにおいても抑制はみられなかった。しかしながら、LPS 刺激による IFN- γ 産生では顕著な増加がみられ、B 細胞への TCDD 曝露による影響が示唆された。

(4) 内分泌攪乱作用に基づいたダイオキシンのリスク評価手法の提示

① TCDD の母親から仔への移行および体内分布における Ah 受容体(AhR)の関与

TCDD の母親から仔への移行および体内分布における Ah 受容体(AhR)の関与を明らかにする目的で、AhR(+/-)マウス同士を交配し、妊娠 12.5 日のマウスに 10 μ g/kg-体重の TCDD を経口投与した。妊娠 18.5 日目に解剖し、親の臓器ならびに、胎盤、胎仔を、また、生後 21 日目の仔を解剖し、脂肪組織、肝臓および腎臓を採取し、GC/MS を用いて、その TCDD 含量を測定した。一方、生後 21 日目の仔の肝臓について、CYP1A2mRNA の発現を RT-PCR 法により解析した。

その結果、胎盤中の TCDD 濃度は、遺伝型による差は認められなかったが、胎仔の TCDD 濃度は、AhR(-/-)では AhR(+/-)や AhR(+/)に比べ有意に低かった。

離乳時(PND21)には、AhR(+/-)型の肝臓中には、AhR(-/-)型のものに比べ、14.3 倍も高い濃度の TCDD が存在していた。一方、AhR(-/-)型の脂肪組織と腎臓中には、AhR(+/-)型に比べ、それぞれ 2.5、1.8 倍高い TCDD 濃度が検出された。PND21 の出生仔肝臓中 CYP1A2mRNA の発現は、TCDD 曝露群では AhR(+/-)型のみ、その発現量が有意に増加していた。

遺伝型による母親から胎仔への TCDD の移行の違いには、TCDD と AhR との結合が関与していると考えられた。PND21 の仔における TCDD の体内分布は遺伝型により大きく異なり、AhR(-/-)の肝臓中濃度は、AhR(+/-)の 1/10 以下であった。AhR(-/-)では、TCDD と結合する肝 CYP1A2 の誘導増加が起きないこと、さらに AhR(-/-)では、血管系の発達不全により、肝血流量が少ないこと、これらが肝臓中の TCDD 濃度を低くしている要因と考えられた。以上より、TCDD の親から仔への移行、仔の体内分布には AhR が大きく関与していることが示された。

② TCDD の血清 T4 および肝レチノイド低下における AhR の関与

TCDD の血清 T4 および肝レチノイド低下における AhR の関与を明らかにする目的で、AhR(+/-)マウス同士を交配し、妊娠 12.5 日の雌マウスに TCDD 10 μ g/kg-体重 を経口投与した。生後 21 日目に雌雄仔マウス(AhR+/- と AhR-/-)を解剖し、血清甲状腺ホルモン(Total T4;

TT4、Free T4;FT4、Total T3;TT3、TSH)の定量、肝臓レチノイドの定量、肝臓 TCDD 誘導遺伝子(UDP-glucuronosyltransferase-1A6;UGT1A6、cytochrome P4501A1;CYP1A1、CYP1A2)の解析を行った。その結果、TCDD 曝露の生後 21 日目の AhR+/-雌雄マウスでは、対照マウスと比べて血清 TT4 および FT4 レベルの有意な低下、肝臓中レチノイド量の有意な減少、肝臓 UGT1A6、CYP1A1 および CYP1A2 mRNA の有意な誘導が認められた。しかしながら AhR-/-マウスでは甲状腺ホルモンレベルや肝臓レチノイド、肝臓代謝酵素系遺伝子の誘導は認められなかった。以上の結果から TCDD 曝露による甲状腺機能障害およびレチノイド代謝異常に AhR が関与していることが明らかとなった。

③ 実験動物における TCDD の体内負荷量と各種エンドポイントとの関係

用量-反応関係の解析において、実験動物とヒトとはダイオキシン類の半減期が大きく異なるため、どのような用量尺度を用いるかが問題となる。1998 年の WHO におけるダイオキシン類の耐容一日摂取量(TDI)の見直しにおいて、体内負荷量の概念が導入され、TDI が算出された。この際、ダイオキシン類の体内動態を一次反応式で類推し、ダイオキシンが体内に均一に分布しているとの前提で、体内負荷量推定値が用いられた。従って、実測値と推定値との比較検討、ならびに、より適切な用量尺度の検討が必要とされる。そこで、体内負荷量を測定もしくは推定して、この用量尺度とこれまでラット、マウスの実験から得られた各種エンドポイントとの関係を求めた。用量尺度として、妊娠ラットの投与一日後の脂肪組織中 TCDD 濃度を GC/MS で測定し、体内負荷量の代替用量(surrogate dose)として用いた。ダイオキシン濃度が実測できなかった実験については、投与量から体内負荷量推定値(一次反応式モデルにもとづき投与量の 86%を使用)を算出した。体内負荷量推定値は、実測値よりも約 45%低い値を示した。今後さらにデータを蓄積し、血清濃度と各組織中濃度との関係、標的組織の濃度とエンドポイントとの関係を検討し、LOAEL や LOEL をもっともよく反映する用量尺度を決めることが必要である。

3. 研究実施体制

(1) 総括グループ

- ① 遠山千春(国立環境研究所環境健康研究領域長)
- ② 研究全体

(2) 生殖機能グループ

- ① 大迫誠一郎(国立環境研究所環境健康研究領域分子細胞毒性研究室主任研究員)
- ② 受精卵・初期胚及び性比
生殖細胞系列・生殖器官発生
胎盤機能

(3) 脳機能・行動グループ

- ① 曾根秀子(国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト主任研究員)
- ② 脳の性分化・性行動
甲状腺ホルモン系

(4) 免疫機能グループ

① 野原恵子(国立環境研究所環境健康研究領域分子細胞毒性研究室長)

② 免疫機能の抑制

アトピー性疾患

(5) リスク評価グループ

① 米元純三(国立環境研究所環境ホルモン・ダイオキシンプロジェクト総合研究官)

② リスク評価

ダイオキシン分析

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

- Nohara K., Fujimaki H., Tsukumo S., Inouye K., Sone H., Tohyama C. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on T cell-derived cytokine production in ovalbumin (OVA)-immunized C57Bl/6 mice. *Toxicology*, 172; 49-58, 2002.
- Nohara K., Izumi H., Tamura S., Nagata R., Tohyama C. Effects of low-dose 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on influenza A virus-induced mortality in mice. *Toxicology*, 170(1-2); 131-138, 2002.
- Kakeyama M., Sone H. and Tohyama C. Changes in expression of the NMDA receptor subunit mRNA in the neocortex and hippocampus by perinatal exposure to dioxin. *Neuro Report*, 12(18); 4009-4012, 2001.
- Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Yonemoto J. and Tohyama C. Immunohistochemical localization of thyroid stimulating hormone induced by a low oral dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in female Sprague-Dawley rats. *Toxicology*, 171; 73-82, 2002.
- Nishimura N., Miyabara Y., Suzuki JS., Sato M., Aoki Y., Satoh M., Yonemoto J. and Tohyama C. Induction of metallothionein in the livers of female Sprague dawley rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Life Sciences*, 69; 1291-1303, 2001.
- Ohsako S., Miyabara Y., Nishimura N., Kurosawa S., Sakaue M., Ishimura R., Sato M., Aoki Y., Sone H., Tohyama C., and Yonemoto J. Maternal exposure to a low dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) suppressed the development of reproductive organs of male rats: dose-dependent increase of mRNA levels of 5 α -reductase type 2 in contrast to decrease of androgen receptor in the pubertal ventral prostate. *Toxicol Sci*, 60; 132-143, 2001.
- Nohara K., Ushio H., Tsukumo S., Kobayashi T., Kijima M., Tohyama C. and Fujimaki H. Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, *Toxicology*, 145, 227-235, 2000.

- Doi H., Tsukumo S., Baba T., Tohyama C. and Nohara K. Primary lymphocytes have a function aryl hydrocarbon reseptor. Organohalogen Compounds 53; 395-397, 2001.
 - Nishimura N., Miyabara Y., Sato M., Tohyama C. and Yonemoto J. Alterations in Thyroid Function in Holtzman Rats Following Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds 53; 14-16, 2001.
 - Nohara K., Izumi H., Tamura S. and Tohyama C. Host resistance to influenza A virus in mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. Organohalogen Compounds 53; 395-397, 2001.
 - Miyabara Y., Ohsako S., Nohara K., Tohyaa C. and Yonemoto J. Fetal and infant body burden of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin causing a short anogenital distance and immunotoxicity in male Holtzman rats. Organohalogen Compounds 53; 54-56, 2001.
- (2) 特許出願
なし