

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センター  
教授

井口泰泉

「内分泌かく乱物質の動物への  
発生内分泌学的影響」

研究期間：平成11年11月1日～平成16年10月31日

## 1. 研究実施の概要

### 研究の概要

「化学物質が人間を含めて動物に対して悪影響を及ぼすとすれば、どのような発生の時期に、どのくらいの量が入って、どのようなメカニズムで作用するのかを分子レベルで明らかにする」ことを研究目的とした。特に、哺乳動物だけではなく、魚類・両生類・爬虫類を含め、さらに無脊椎動物まで広げて、正常発生とともに、化学物質の影響をも理解しながら動物の個体群への影響、個体群が構成するエコシステム全体への影響を研究する方法論の基礎を構築することを目標として研究を展開した。分子レベルで化学物質の作用メカニズムを解明するためには、化学物質がどのような受容体に結合して、どの組織の、どの細胞に、どのような遺伝子発現を増加させるのか、あるいは低下させるのかを明らかにしなくてはならない。エストロゲン類似作用、アンドロゲン拮抗作用あるいは甲状腺ホルモン阻害作用が懸念されていることから、その分子生物学的機序解明のために各種動物のホルモン受容体遺伝子の塩基配列を明らかにすることが必要である。また、無脊椎動物の場合には、遺伝子情報と併せて内分泌系自体の理解も必要である。また、ラットやマウスでは性ホルモンや化学物質の影響に対して系統差が存在することが知られている。広範囲の動物種を念頭におけば、同一のホルモンや化学物質でも動物種によって、受容体との相互作用による作用の強さや代謝の早さ、あるいは胎児や受精卵への化学物質の移行の速さなどが異なる可能性が考えられる。環境省の行ったメダカのエストロゲン受容体 (ER) とヒトの ER へのノニルフェノール (NP) の結合試験から、NP はヒトよりもメダカの ER に対して約 100 倍も高い結合を示した。従って、ヒトあるいは哺乳動物を中心にした研究結果は、そのままでは野生動物には外挿できない場合が考えられる。最近の報告では、除草剤のアトラジンは水道基準の 1/30 でもカエルに雌雄同体を引き起こしている。さらに、スチレンダイマー・トリマーに関しては、ヒトへの影響はないであろうとされたが、ミジンコに対してごく微量で生殖抑制を示すことを明らかにした。この作用メカニズムに関しても分子生物学的に明らかにすべく取り組んでいる。

哺乳動物では母親に取り込まれた化学物質が胎盤を通して胎児に届くことが考えられる。胎児が曝露している濃度の研究とともに、化学物質の胎児移行の研究も重要である。成体では肝臓の解毒酵素により、大半の化学物質は速やかに体外に排出される。しかしダイオキシン類やPCB類を含む残留性有機塩素系物質などは肝臓で解毒できず、脂肪に蓄積することが問題となっている。合成エストロゲンのジェチルスチルベストロール (DES) は妊娠マウスに投与すると速やかに胎児に移行することが知られている。妊娠動物への化学物質投与から胎児への移行を明らかにするために、妊娠 150 日目のニホンザルと、妊娠 18 日目のマウスにビスフェノールA (BPA) を投与したところ、ニホンザルでは 1 時間後、マウスでは 30 分後には胎児の脳からBPAが検出され、胎盤は化学物質のバリアーとはならず、短時間に胎盤を経由し胎仔に移行することを見出した。胎児期の肝臓の解毒作用についての研究は行っていない。

内分泌かく乱物質については多くの未解明の問題がある中で、化学構造の中にフェノール基が存在し、エストロゲン作用を持つ物質が多く存在することが明らかとなってきた。女性ホルモン作用をもつ化学物質が何らかの悪影響及ぼすとすれば、遺伝子発現を介した結果と考えられる。しかしながら、エストロゲンに応答する遺伝子は、プロゲステロン受容体 (PR)、ERやラクトフェリンなどを含めて数種類しか知られていなかった。従って、動物の組織を用いて、エストロゲンに応答する遺伝子を整理することを第一目標に掲げた。このために、エストロゲンおよびエストロゲン作用を有する化学物質を投与したマウスの組織と、対照群の組織からmRNAを抽出し、一度に数万の遺伝子の発現変化を網羅的に解析することが可能なマイクロアレイ法を用いて、

遺伝子を比較した。特に、卵巣を摘出した成熟マウスにエストロゲンおよびエストロゲン作用を有する化学物質を投与し、子宮、膣、乳腺、肝臓での遺伝子発現について整理した。エストロゲンの影響で最初に発現変動する遺伝子を整理する目的で、エストロゲン投与 6 時間後に子宮で発現変動する遺伝子を中心に解析したところ、約 300 程度の遺伝子が発現増加し、同じ 300 程度の遺伝子発現が低下した。NPでは高用量投与の場合にはエストロゲン応答遺伝子の発現変動が起こるが、低用量投与では発現変動遺伝子は少ない。しかしNP投与時の肝臓での遺伝子発現パターンはエストラジオール (E2) と大きく異なり、NPに反応して多くの遺伝子の発現変動が認められた。ダイオキシンによって発現変動する遺伝子も解析した。さらに、マイクロアレイを用いた解析では、子宮、膣、乳腺での発現変動遺伝子に組織特異的な違いがあることを明らかにした。さらに、アフリカツメガエル胚へのE2、BPA、NP処理の影響をマイクロアレイで解析し、エストロゲン応答遺伝子を明らかにした。

出生直後のマウスやラットに対するエストロゲンの悪影響として、視床下部・下垂体系からの生殖腺刺激ホルモンの周期的な分泌がなくなり、したがって無排卵となることが知られていた。また、我々の研究から、本来はエストロゲンの標的器官でありエストロゲンに依存して細胞増殖をおこす膣上皮が、出生直後のマウスへのエストロゲン投与により恒久的な細胞増殖を起こし、エストロゲンの刺激を必要としなくなる不可逆的な増殖を示すことが明らかとなっていた。この膣上皮は加齢に伴い腫瘍化する。このようなエストロゲンによる不可逆的な組織異常には臨界期が存在し、生後 10 日を過ぎると、脳の性分化異常も膣上皮の不可逆的な異常も起こらず、エストロゲンに可逆的に反応する。このことから、発生の特定の時期に、エストロゲンやエストロゲン類似物質が作用することが様々な異常の原因となる可能性がある。したがって、マウスの発生に伴ってエストロゲンに対して不可逆化反応を起こす時期を特定すること、すなわち化学物質の影響の臨界期および臨界濃度を明らかにすることが重要である。これは、マウス以外の動物種でも同じであり、魚類や両生類の性分化に対するエストロゲンやエストロゲン類似物質の臨界期、爬虫類での温度依存性の性分化を雌の方向に向けるエストロゲンの作用の臨界期等も併せて理解することが必要である。マウスのエストロゲンに対する組織不可逆化の臨界期は、視床下部・下垂体系の異常は生後 10 日、膣上皮のエストロゲン非依存的細胞増殖、分化は生後 3 日、多卵性卵胞の生成は生後 5 日、骨盤形成の性差は生後 30 日と組織によって異なる。また、アフリカツメガエルの頭部奇形を誘起するE2、NP、BPAの臨界期および臨界濃度、アンドロゲンによるカダヤシの尻鰭突起の形成の臨界濃度などを明らかにした。

臨界期内でのエストロゲン投与により、マウスの膣ではエストロゲン非依存な膣上皮の細胞増殖が起こり、加齢とともに腫瘍化する。この組織不可逆化のメカニズムを解析し、周生期のエストロゲン曝露により、膣では上皮成長因子 (EGF) 関連の遺伝子が恒久的に発現し、これらのタンパク質は **erbB** 受容体に結合して細胞内シグナル伝達系を活性化させ、エストロゲン受容体のリン酸化を引き起こし、さらに EGF 関連遺伝子の発現を誘起する、オートループが形成されていることを明らかにした。**erbB** 受容体およびエストロゲン受容体の阻害剤を用いて、細胞内シグナル伝達を遮断するとエストロゲン受容体あるいは **erbB** 受容体のリン酸化が起こらず、細胞増殖も停止した。したがってこの系には E2 の有無に関わらず ER が不可欠である。また、出生直後の DES 投与により組織異常が起こる精嚢や精巣での遺伝子発現をマイクロアレイを用いて解析し、組織異常に対するマーカー遺伝子を発見した。

内分泌かく乱の大きなテーマとなっている低用量影響に関しては、BPAを妊娠マウスに投与し、生まれた雌の仔マウスに見られる影響を調べ、膣の開口日が有意に早まることを見出した。しかし成熟後に正常雄マウスと交配した結果、少なくとも初産で

は、妊娠率、産仔数、性比には影響が認められなかった。また、BPAを高用量で出生直後の雌雄ラットに投与した結果、雄ラットへの影響については有意な変化は認められなかったが、雌ラットに於いて視床下部・下垂体系の異常による無排卵とともに、膣の不可逆的異常が認められた。また、出生直後の雌ラットへ数日間BPAを投与することにより、遅延性の無排卵が認められた。興味ある現象であり、解析を継続している。

さらに、内分泌かく乱の代表と考えられている、アメリカフロリダ州アポプカ湖のアメリカワニ、およびイギリスの河川に棲息するコイ科の魚のローチに対する内分泌かく乱物質の影響を分子生物学的に解明するために、ステロイドホルモンの受容体遺伝子、ステロイドホルモン産生に關与する酵素の遺伝子、性分化に關与する遺伝子のクローニング等を行う必要がある。イギリスのエクセター大学のタイラー教授から送付されたローチから、2種類のエストロゲン受容体遺伝子、2種類のアロマターゼ遺伝子、アンドロゲン受容体（AR）をはじめとした20種類程度の性分化に関連するであろう遺伝子をクローニングするとともに、ローチの発生段階及びエチニルエストラジオール曝露されたローチに於けるERとアロマターゼ遺伝子の発現等を解析した。また、フロリダ大学のジレット教授とともに採取したアメリカワニの組織から、ER、AR、アロマターゼ遺伝子などをクローニングし、cDNAライブラリーを作成し、遺伝子断片の解読を行い、数千のESTsを解析している。マイクロアレイ化も進めており、温度依存性の性分化機構の解明に進む予定である。採取したアメリカワニの卵は、雄になる温度および雌になる温度、雄になる温度にエストロゲン曝露等を組み合わせて、性分化前後の胚を採取しており、遺伝子解析を行う予定である。アメリカの河川で問題となりつつある家畜の肥育ホルモンとして用いられているトレンボロンのカダヤシへの影響を解析するとともに、カダヤシのステロイドホルモン受容体のクローニングを行った。日本での内分泌かく乱の代表である、有機スズによる海産巻貝のイボニシのインポセックス誘起の機構に対しては、いくつかの仮説を検証しながらアプローチした。

センチュウはゲノム解析が終了し、ヒトと共通の遺伝子も見出され、マイクロアレイも作成されている。センチュウのマクロアレイを活用し、E2、NP、BPA等を中心として遺伝子発現に対する影響を調べたが、低用量での影響は顕著ではなかった。しかし、重金属に対しては多くの遺伝子の発現変動が起こり、特にチトクローム系の遺伝子の発現変動を中心に解析した。

オオミジンコはOECDの毒性評価にも用いられ、幼若ホルモンと変態ホルモン（エグジソン）がその内分泌系を制御していると考えられるが、ほとんど理解されていない。無脊椎動物への内分泌かく乱の可能性を探る目的で、E2、NP、BPAとともに幼若ホルモンアゴニストを曝露した。エストロゲン類似物質の影響はほとんど認められないが、幼若ホルモンアゴニストでは低濃度で濃度依存的に生殖率が低下し、雄の仔が多く生まれることが判明した。ミジンコは単為生殖であり、雌が雌を産むのが一般的であるが、環境の悪化や餌不足などで雄が生まれることも知られている。この現象はオオミジンコに限らず、属のことなる複数のミジンコでも認められたことから、かなり一般化できると思われる。また、エグジソン受容体をクローニングし、レポーター遺伝子アッセイ系を作成している。幼若ホルモンアゴニストを曝露し続けた場合に雄が多く生まれ、絶滅するかという実験も継続している。さらに、オオミジンコの遺伝子を解析し、マイクロアレイ化を行っている。これを用いてミジンコの性決定機構を調べる予定である。

動物への化学物質の影響には、系統差とともに種差が大きいことが推定される。ラットで得られた結果がどの程度ヒトに外挿出来るかという問題もある。大量の化学物質が体内に入った時にそれを感知して、解毒の系を活性化する核内受容体Steroid and

Xenobiotic Receptor (SXR) が知られている。ちなみにBPAはヒトやウサギのSXRは活性化するが、ラットやマウスのSXRは活性化しない。ウサギ、ラット、マウス、ヒトに加えて、ニホンザル、イヌ、ウズラ、アフリカツメガエル、メダカ、アメリカワニなどのSXR (PXR) をクローニングし、レポーター遺伝子アッセイ系を構築した。多種類の化学物質を用いて、SXR活性化の種差を検討している。また、この過程で、有機スズ化合物がヒトやアフリカツメガエルの核内受容体のRXRを低濃度で活性化することを見出したので、発生中のアフリカツメガエルおよびマウス胎仔への有機スズ化合物の影響を解析している。有機スズ化合物はRXRとともにPPARの活性化も引き起こすことから、RXR特異的なリガンドを併用して、マウス胎仔およびアフリカツメガエルへの個体への影響を解析している。

## 2. 研究構想

当初の研究構想として、内分泌かく乱物質と考えられる影響が認められているのは野生動物に限られていたこと、CRESTの内分泌かく乱物質研究で採択されたチームの中で、野生動物を対象にしている研究が無かったことから、できるだけ広い動物相を含み、それぞれの動物の特異性を配慮した研究を行うことを前提とした。さらに、それまでの研究経験の蓄積としては、周生期マウスへのエストロゲンの影響を解析しており、動物の発生中には、ホルモンおよびホルモン類似物質に対して不可逆的に反応する臨界期（高感受性の窓）があり、この時期を明らかにすることが重要であることを認識していた。また、従来の毒性学と異なり、低用量の化学物質でも悪影響が出ることが報告されていたことから、化学物質の影響を遺伝子発現を元に、できるだけ作用メカニズムに基づいて解析することを目標にした。5年間で、内分泌かく乱物質の影響が認められる動物のホルモン受容体のクローニングを完了すること、遺伝子情報の整理が必要な動物種を選定し、いくつかの動物種ではマイクロアレイ化に向けた準備を行うこと、動物の発生中の臨界期を明らかにすることを全体の目標とした。このような構想で開始した研究であり、下記の4つの研究グループを立て、その中には研究機関を超えて研究者を配置した。

ホルモン応答遺伝子解析グループ（井口泰泉、森 千里、太田康彦、有菌孝司）では、ホルモン応答遺伝子の探索を第1とし、ホルモンおよび内分泌かく乱物質の哺乳類の形態形成遺伝子発現と組織分化、胚性幹細胞への作用、視床下部・下垂体系、生殖系への作用、胎盤形成、及び胎盤透過性を解析するとともに、センチウでのホルモン応答遺伝子の探索を行い、哺乳類の遺伝子解析に寄与することとした。

神経系・行動解析グループ（阿相皓晃、竹内浩昭、佐藤真彦、漆谷博志、井口泰泉）では、神経系及び行動への作用解析を目的に、鳥類の発生・行動、魚類の嗅覚・行動・発生および哺乳動物の神経系への作用を解析することとした。

両生類発生・生殖・行動解析グループ（菊山 栄、河野郷通、井口泰泉）では、両生類の発生・生殖・行動への作用解析を行うとともに、カエルおよびイモリの発生・生殖行動、カエル皮膚からの水分調節への作用を解析することとした。

水棲動物生殖グループ（鑪迫典久、堀口敏宏）では、水棲動物の生殖への作用メカニズムの解析を中心に、ミジンコ、海産巻貝でのステロイドホルモンの有無の解析、および内分泌かく乱物質の不可逆的作用を解析することとした。

ホルモン応答遺伝子解析グループでは、化学物質の胎盤透過性に関しては、妊娠マウスとニホンザルでBPAを用いて調べるとともに、ヒトの臍帯血を用いて胎盤透過性と胎児曝露を調べた。また、当初の目的に沿って、エストロゲン応答遺伝子の解析や化学物質に反応する遺伝子の解析、また、発生時期に投与されたエストロゲンの不可逆

的影響に関与する遺伝子を解析するために、マイクロアレイを導入した。また、エストロゲン応答遺伝子を選択したカスタムアレイを作成した。さらに、ヒトの臍帯を用いた遺伝子発現と、臍帯中の血液での化学物質汚染との関連をマイクロアレイで解析し、化学物質の人体汚染と遺伝子発現で新たな展開があり、ヒトへの調査にマイクロアレイの導入を提案した。その後の研究の展開により、センチュウでは当初予想していたよりもエストロゲン作用をもつ化学物質の影響が弱いことが明らかとなったが、一方で、重金属では強い影響が明らかとなった。カドミウム等の重金属も内分泌かく乱作用があるとも言われており、センチュウは主として重金属への影響を調べる系として開発した。また、胚性幹細胞への影響に関しては研究の進展が見込めないことから研究を中止した。

さらに、研究代表者は、SETAC（国際環境毒性学会）USEPA（米国環境保護庁）主催で、2002、2004年に開催された、野生動物への新たな遺伝子技術である（Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics）の応用を主題にした国際会議にも招待され、CRESTでの研究の展開を解説するとともに、国際的な Ecotoxicogenomics の立ち上げに貢献した。2004年10月には京都で OECD の Ecotoxicogenomics のワークショップが開催される。この分野では、世界をリードしていると自負している。

神経系・行動解析グループに関しては、環境省がOECDの試験法に対応する鳥類の研究班を組織したことに伴い、鳥類に関する研究を取りやめると共に、サケ・マスを用いた大掛かりな魚類の行動試験も取りやめてスリム化し、哺乳動物の神経系への影響に絞ってBPAの脳のグリア細胞への影響の研究を展開した。

両生類発生・生殖・行動解析グループでは、行動解析に関しては研究を中止したが、アフリカツメガエルの胚発生に対する化学物質の影響を形態学的に解析するとともに、基礎生物学研究所で開発されたマクロアレイを用いて、エストロゲン及びエストロゲン作用を持つ物質に対する発現変動遺伝子を明らかにするとともに、作用時期を確定した。さらに、甲状腺ホルモン系のかく乱を調べるための両生類の変態試験はOECDの試験法として取り上げられ、環境省でも両生類研究班が立ち上がったことから実際の変態試験に関する研究は中止したが、性分化に関する研究に方向を変え、ホルモン受容体のクローニングは行った。さらに、フロリダ大学のジレット教授からの共同研究の申し込みもあり、爬虫類のアメリカワニの基礎生物学的な情報の整備を行った。すなわち、ステロイドホルモン受容体のクローニング、ESTライブラリーの整備とともに、雄になる温度及び雌になる温度で孵卵した卵から性分化時期の胚を取り出し、遺伝子ライブラリーを作成し、数千の遺伝子断片を解読した。爬虫類に特徴的な温度依存性の性分化に関与する遺伝子の探索に進んでいる。また、アメリカワニ、クロコダイル、カメからクローニングしたERの塩基配列を元に、系統樹を作成するとワニのERはトカゲよりもニワトリに近いことが明らかとなり、爬虫類の中での系統関係、鳥類とのつながりなどで新たな系統関連が提案できる可能性を明らかにした。このグループは、新たに、爬虫類・両生類発生・生殖解析グループとした。

水棲動物生殖グループでは、無脊椎動物であるミジンコと巻貝への化学物質の影響のみを研究対象とする予定であったが、研究体制を組み替えたため、魚類を用いた研究をこのグループに組み込んだ。ミジンコに関しては単為生殖で雌しか産まないオオミジンコの雄を生ませる幼若ホルモン類似体を見出したことで、従来のOECDテストガイドラインにあるミジンコの毒性試験法（TG211）を改良することにより、幼若ホルモン類似作用を調べることのできる試験系（改定TG211）をOECDに提案して採択された。さらに、エグジソン受容体をクローニングし、レポーター遺伝子アッセイ系を作成している。また、オオミジンコの遺伝子を整理するために数千の遺伝子断片を読み、マイクロアレイ化し、実際に幼若ホルモン類似体で発現変動する遺伝子を見出してい

る。巻貝のイボニシではERの類似配列をクローニングしたが、リガンド非依存性の遺伝子活性化を示した。イボニシではTBTはRXRを介して作用していることが明らかとなった。魚類の研究の展開としては、海産魚での内分泌かく乱物質試験法の開発のために、マミチヨグ（海産メダカ）を用いて、エストロゲンの発生影響を調べるとともにERをクローニングし、レポーター遺伝子アッセイ系を作成した。また、イギリスのエクセター大学のタイラー教授からの共同研究の申し込みにより、世界的にも内分泌かく乱の代表例となっている、イギリスのローチ（コイ科）のホルモン受容体、性ホルモン産生関連酵素の遺伝子、アロマターゼ遺伝子、性分化関連遺伝子をクローニングした。現在、性分化でのホルモン受容体遺伝子及びアロマターゼ遺伝子発現、エチニルエストラジオールの発生影響を調べており、精巣卵の発症機構の解明に向かっている。また、アメリカでは、牛の肥育促進剤として用いられたアンドロゲンであるトレンボロンはし尿から河川を汚染し、ファットヘッドミノーやカダヤシへの影響が知られている。カダヤシを研究材料にして、トレンボロンの影響を調べるとともにAR及びERのクローニングも併せて展開した。

結果的に、現在、内分泌かく乱物質の影響を受けていると考えられている動物種では、アメリカワニ、ローチ、イボニシ、カダヤシを研究対象とし、基礎生物学的な側面と臨界期を重視しながら研究を展開するとともに、核内受容体を介した新たな系を持ち込み、RXR, SXRを介した化学物質の影響についても研究を展開した。

### 3. 研究成果

#### 3. 1 ホルモン応答遺伝子解析グループ

#### **DNA マイクロアレイによるホルモン作用と内分泌かく乱物質影響の解析：渡邊 肇、井口泰泉（自然科学研究機構）**

##### (1) 研究内容及び成果

内分泌かく乱物質に代表される化学物質の影響は、そのエンドポイントが内分泌、生殖に関連している事象が多いことから、ホルモン様作用によるものとされてきた。こうした中で従来まで進められてきた解析の多くは、培養細胞や実験動物を用いての化学物質自体が有するエストロゲン活性の評価等が中心であった。こうした化学物質が直接的にエストロゲン受容体（ER）に作用することを前提としたアプローチとは別に、その他の化学物質影響を包括的に評価し、その作用機構を解明するための手段として、我々は遺伝子の転写産物に着目し、DNA マイクロアレイを用いることにより、遺伝子発現変化による化学物質の評価の可能性について検討した。

これまで本来のホルモンが引き起こす遺伝子発現パターンについて知見が得られていなかったことから、まずホルモン投与による遺伝子発現変化について DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析を試みた。これにより、マウス子宮では数百という非常に多くの遺伝子の発現が変動していることが明らかになり、コレステロール合成系やプロテオソーム、ヌクレオシドやヌクレオチドの代謝系に関連する遺伝子の誘導がかかっていることが明らかになった (Watanabe *et al.*, 2002)。

これらの遺伝子の中には、従来全く別の組織で機能していると考えられていた遺伝子なども含まれていた (Watanabe *et al.*, submitted)。またこうした遺伝子発現変化の経時的な変化についても解析を進め、機能的に異なる遺伝子群が経時的に入れ替わることにより、一連の遺伝子発現のカスケードが生じていることを示した (Watanabe *et al.*, 2003a)。特にこうしたカスケードの端緒となる初期のイベントに着目し、ER がどの程度遺伝子発現の誘導に直接的に関与しているのかについて、ゲノムレベルで解明をすすめている (Watanabe *et al.*, in preparation)。

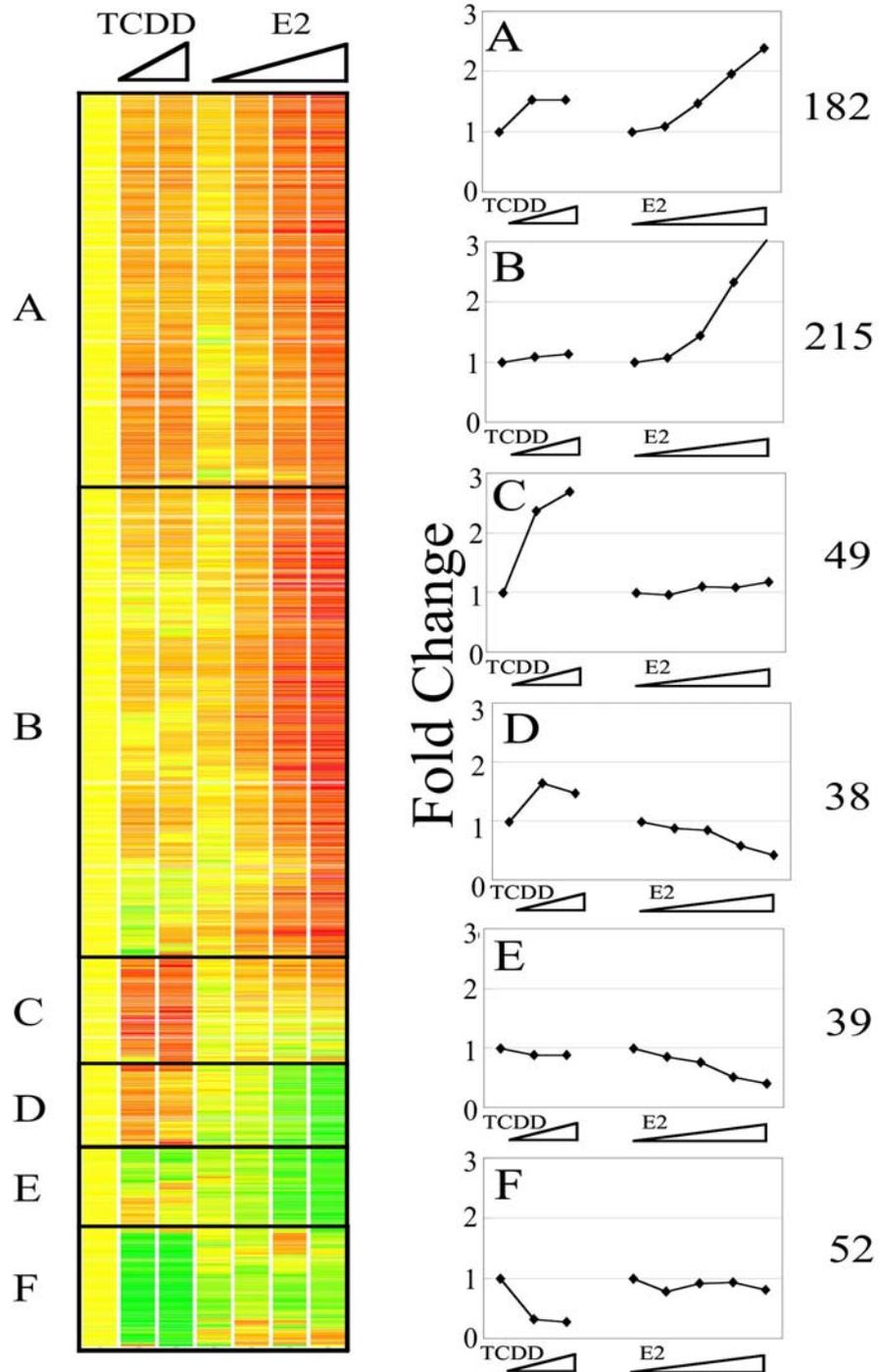
こうした知見をもとにエストロゲン作用をもつ化学物質で誘導される遺伝子発現変化についても解析を進めた。その結果、例えば合成エストロゲンとして知られる DES については、用量依存的な遺伝子発現誘導のパターンの変化は E2 と必ずしも一致しなかった。

すなわち遺伝子毎の反応性は異なり、E2 に対し反応性の高い遺伝子群、DES に反応性の高い遺伝子群などが存在することが明らかになり、エストロゲン様化学物質は遺伝子発現において選択的なモジュレーター様の活性を有していることが示唆された。しかし、誘導のかかる遺伝子とかからない遺伝子に大別した場合、E2 と DES の影響はほとんど一致していると結論付けることができた (Watanabe *et al.*, 2003b)。また NP に関しても、子宮における遺伝子発現を調べた場合、用量依存的な遺伝子発現パターンは異なるものの、ほぼ一致した遺伝子群について E2 でも NP でも誘導がかかる事が示された。したがって、エストロゲンにより発現誘導される遺伝子群に着目することにより、化学物質が内在的に有しているエストロゲン様作用を評価できることを示した (Watanabe *et al.*, 2004)。またこうした化学物質に依存的な遺伝子発現の変化は、臓器や、曝露する時期によっても大きく異なることが明らかになってきた (Watanabe *et al.*, 2004)。

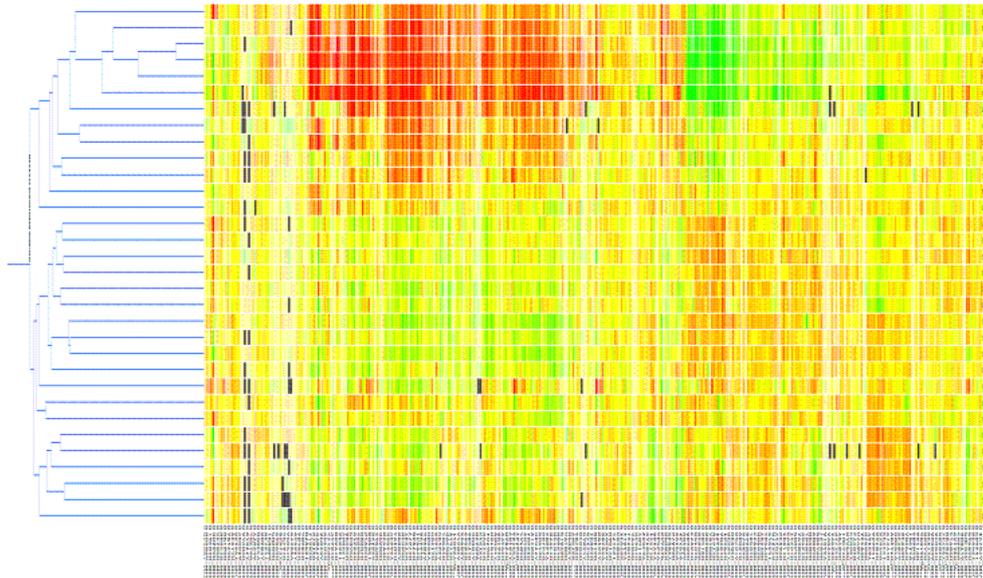
しかし、一方でエストロゲンと類似した作用を有し、アンタゴニストとしても機能するとされる TCDD については、その遺伝子発現の誘導パターンは大きくことなり、エストロゲンで誘導のかかる遺伝子群とは別の遺伝子を活性化していることを明らかにし、TCDD はその他のエストロゲン様化学物質とは異なったメカニズムで遺伝子発

現の誘導を引き起こしていることを示した(Watanabe *et al.*, in press)。

これらの知見をもとに、DNA マイクロアレイにより明らかになったエストロゲン応答遺伝子を中心に、およそ 900 遺伝子を選択し、エストロゲン様活性評価用の DNA マイクロアレイを作製した。このマイクロアレイの作製にあたっては、ガラス基板の素材の検討、オリゴ DNA の長さや配列、RNA のラベル化方法などの検討などを行い、条件の最適化を行った。その結果、非常に高い再現性でデータ取得が可能な DNA マイクロアレイを作製する事ができた。この DNA マイクロアレイの作製コストは市販の DNA マイクロアレイに比較して廉価であることから、被験化学物質の種類、用量、繰り返し数などの増大に対しても柔軟に対応することが可能であり、エストロゲン様活性のスクリーニングなどにも用いることができる (Watanabe *et al.*, in preparation)。



## 新規の遺伝子セットにおける化学物質影響の解析パターン



### (2) 研究成果の今後期待される効果

一連の研究から、化学物質に依存的な遺伝子発現の変化は、臓器や、曝露する時期によっても大きく異なることが明らかになってきた。例えば子宮において非常に類似した遺伝子の発現誘導を引き起こしていた E2 と NP についても、肝臓ではその発現パターンは大きく異なっていた。これらの遺伝子発現誘導のパスウェイを明らかにすることによって、内分泌かく乱物質について、どこまでエストロゲンと類似しているのか、またどういう局面で異なった振る舞いをするのかについて明らかにしていくことができる。現在、一連の化学物質について同様の解析を進めており、それぞれの化学物質に共通した遺伝子、あるいは特徴的な遺伝子の抽出と機能解析を進めている。これらを明確にすることにより、ホルモン本来の作用とホルモン様活性などを有する化学物質の作用機構の解明が可能になると思われる。

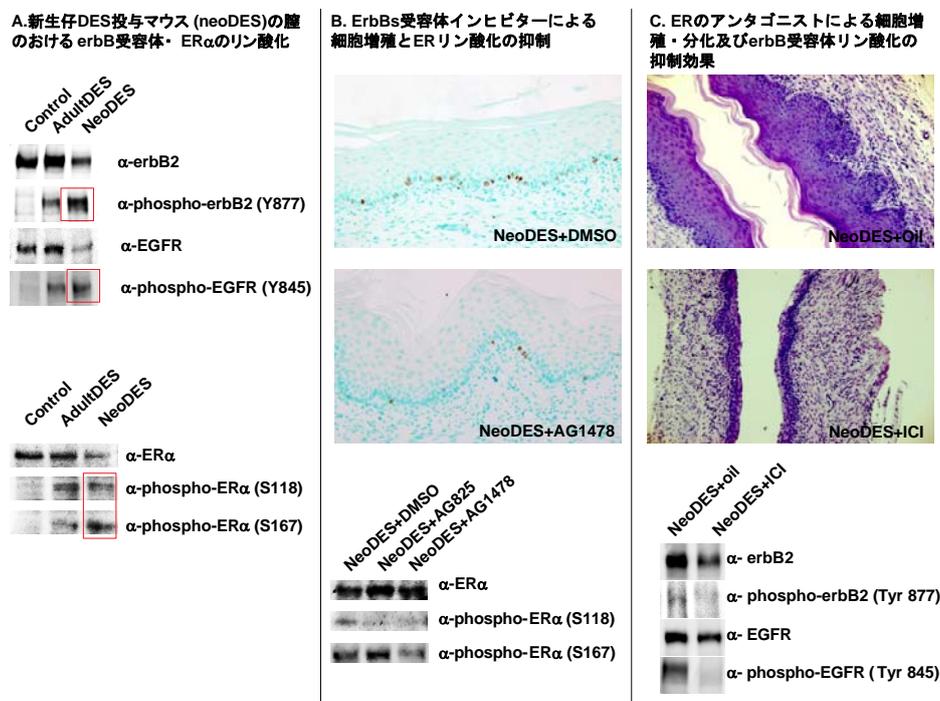
### エストロゲン非依存の細胞増殖・分化の機構：宮川信一（総合研究大学院大学博士課程）、井口泰泉（自然科学研究機構）

#### (1) 研究内容及び研究成果

エストロゲンは、生物の生殖機能を調節しているほか、ER は体内の様々な器官に発現しており、ホメオスタシスを調節している。エストロゲンは経口避妊薬や閉経後のホルモン補充療法薬として広く用いられているが、その有用性の反面、乳癌や子宮癌のリスク要因としてよく知られている。実際に 1970 年代には、それまでヒトに流産防止薬として処方された DES が、胎児期に DES を曝露された女子の、若年での膣癌の原因となることが示されている。DES はヒトで臍帯経路による胎児曝露で発癌が認められた唯一の薬害の例であり、DES を曝露された女性は現在においても同世代の女性よりも発癌のリスクが高いとされている。

生殖器官の細胞増殖はエストロゲンによって一過性に、つまりエストロゲン依存的に調節されているので、生殖器官の癌とは、いわばエストロゲン非依存の細胞増殖と

いえる。マウスでは新生児（ヒトの3~4ヶ月の胎児に相当する）にエストロゲンを投与すると、成熟後に膣でエストロゲン非依存の上皮の細胞増殖・角質化が誘起され、加齢に伴い腫瘍化する。ヒトでのDES曝露を模したこのモデルは、エストロゲンの細胞増殖機構とともに、発癌に至るプロセスの解明を生体レベルで行うことができる有用な系である。我々はこの新生仔マウスDES投与モデルを用いてエストロゲン非依存の細胞増殖について、組織・個体レベルでの研究を行った。

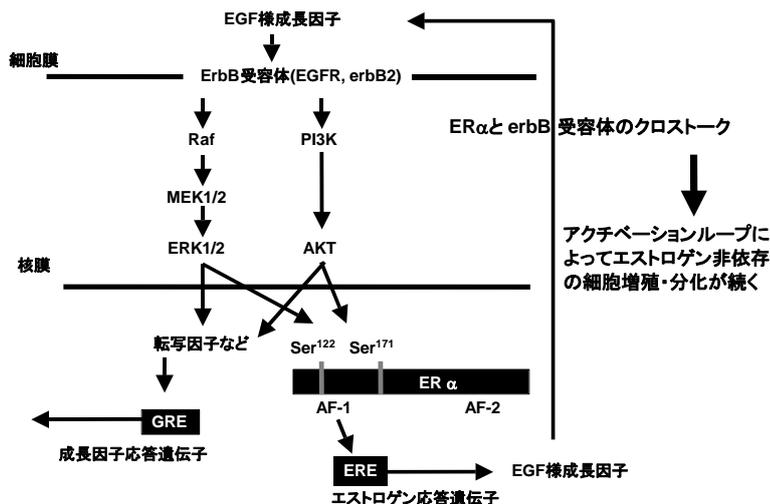


一般に生殖器官での細胞増殖・分化には、エストロゲンと成長因子のクロストークが存在していることがよく知られている。間質細胞の ERα を介して、間質からの分泌性因子 (=成長因子) が上皮細胞の増殖・分化を促すというモデルである。本研究では、まず、エストロゲン刺激に応答し発現が誘導される成長因子を探索した。卵巣を摘出したマウスにエストロゲンを投与すると、EGF ファミリーの成長因子 (EGF、TGFα、ヘパリン結合性 EGF 様成長因子、アンフィレギュリンなど) の mRNA の発現が上昇することが分かった。新生仔 DES 投与マウスの膣でも同様に、卵巣を除去して体内のエストロゲンを除去した後も、EGF ファミリーの成長因子が高発現しており、これら EGF ファミリーの成長因子は主に上皮で発現していた。一般に成長因子受容体はリン酸化を受けることによって活性化される。EGF ファミリーの成長因子の受容体 (erbB 受容体) の中で、マウスの膣上皮に強く発現している EGF 受容体 (EGFR=erbB1) と erbB2 のリン酸化状態を調べてみると、確かにリン酸化されており、このことは、エストロゲン非存在下で EGF 様成長因子-erbB 受容体系が上皮組織で活性化されていることを示している。

次に erbB 受容体の下流で活性化する因子の同定を試みた。特に注目したのが ERα である。ERα にはリガンド依存的に活性化される AF-2 と、リガンド非依存的に活性化される AF-1 という 2 つの転写活性化領域が存在する。これまでに ERα の AF-1 は、MAPK や Akt 等の経路によって特定のセリン残基がリン酸化されることで、その転写活性が上昇することが示されている。卵巣を除去したマウスに EGF を投与すると、EGFR と erbB2 のリン酸化とともに ERα のリン酸化が起こることが分かった。また、

新生仔 DES 投与マウスの膺でも ER $\alpha$ がリン酸化されており、さらに ER $\alpha$ をリン酸化する因子 (p90RSK や Akt) も活性化されていた。つまり AF-1 領域のリン酸化による ER $\alpha$ のエストロゲン非依存的な転写活性化が、新生仔 DES 投与マウスの膺で誘起されていることが明らかとなった。また、erbB 受容体の阻害剤を投与することによって上皮基底細胞の細胞増殖率の減少とともに、ER $\alpha$ のリン酸化レベルも減少した。このことは erbB 受容体とその下流の因子が ER のリン酸化に寄与していることを意味する。さらに ER の阻害剤である ICI182,780 により、膺上皮層の厚さが減少するほか、成長因子の発現減少、erbB 受容体の脱リン酸化が認められた。ER $\alpha$ のリン酸化は上皮において起きていることも確認している。したがって ER の AF-1 の転写活性化が成長因子の発現を誘導し、erbB 受容体のリン酸化を制御していることが明らかとなった。

これまでエストロゲン標的器官の腫瘍化には成長因子やその受容体、そして ER の関与が示唆されていたが、多くの研究が培養細胞での研究であるため、それぞれの因子を関係づけることはできていなかった。本研究では、ER による成長因子発現、erbB 受容体のリン酸化とそれに伴う細胞内シグナル因子の活性化、ER のリン酸化による成長因子発現…というアクチベーションループが存在する事実を明らかにした (図参照)。さらにこの活性化のループは間質組織からの因子に依存せず、上皮組織内で完結している。このことはこれまでの生殖器官における間質を介した正常な上皮の細胞増殖・分化の概念と異なっており、この上皮・間質相互作用の破綻が、エストロゲン非依存的な異常な細胞増殖の特色であると思われる。また、これまで ER を始めとする核内ステロイドホルモン受容体のリガンド非依存的な活性化の研究は、培養細胞の実験系で行われており、マウス生体で実際に ER がリガンド非依的にリン酸化・活性化されて、それが細胞増殖・分化を制御することを明らかにしたのは本研究が最初である (Miyagawa *et al.*, 2004a)。



雌性生殖器官におけるエストロゲン非依存的細胞増殖・分化のメカニズム

さらに、新生仔 DES 投与マウスの膺では erbB 受容体-ER 系だけでなく、IGF-I 経路も活性化されていることを明らかにした。IGF-I を投与すると、マウスの膺で Akt が活性化し、また、新生仔 DES 投与マウスの膺では、Akt と共に IGF-I 受容体のリン酸化も認められた。IGF-I mRNA は新生仔 DES 投与マウスの膺では間質分画で対照群と比べて有意に発現が増加している一方、上皮分画では変わっていない。従ってこの IGF-I 受容体は間質からの IGF-I によって活性化されているものと推測される。さらに DNA マイクロアレイの結果では、IGF-I の作用を調節する IGF 結合タンパク質 (IGFBP) のなかで、しばしば癌細胞で過剰発現が報告されている IGFBP2 の発現の増加も認められた。したがって、エストロゲン非依存的な膺上皮細胞増殖には、上皮の erbB-ER のアクチベーションループのほか、間質からの IGF-I シグナルも寄与していることが明らかになった (Miyagawa *et al.*, 2004b)。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

周生期のエストロゲンによる組織不可逆化機構の一端が明らかになったが、ER によるリガンド非依存的な成長因子の遺伝子の発現メカニズム等についての解析が残されている。この現象の発見以来 40 年が経過し、ようやく臨界期でのエストロゲンの作用メカニズムに踏み込むことが可能となりつつある。子宮癌、膣癌と組織不可逆化との関連の研究にも進むことが期待できる。

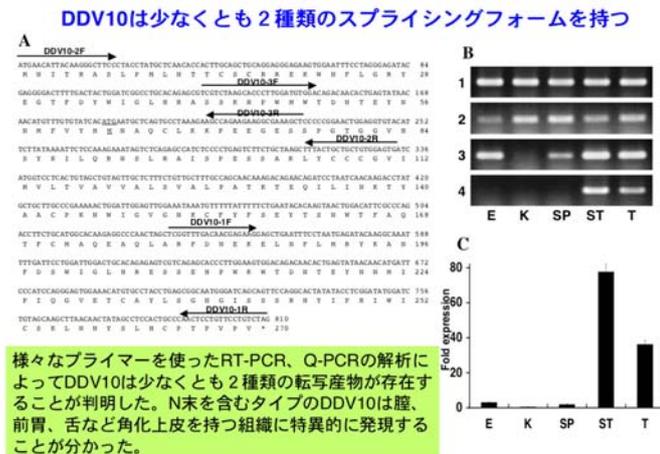
## エストロゲンによる膣上皮組織の増殖・分化誘導機構の解析：勝 義直、井口泰泉（自然科学研究機構）

### (1) 研究内容及び研究成果

マウス雌性生殖器官である膣はエストロゲンの標的器官であり、通常エストロゲンの作用によって膣上皮組織は増殖・分化を起こす。さらに、新生児期にエストロゲンを投与されたマウスでは、エストロゲン作用により変化する膣上皮の増殖・退縮が認められず、エストロゲン非存在化でも増殖し続ける。このように、マウス膣はエストロゲンの作用を解析するため非常に興味深い器官である。エストロゲンによる膣上皮組織の増殖・分化誘導機構を解析するために、一度に数種類のサンプル間における遺伝子の発現パターンを網羅的に解析することが可能であるディファレンシャル・ディスプレイ (D-D) 法を用いて特異的発現を示す遺伝子の探索を行った。

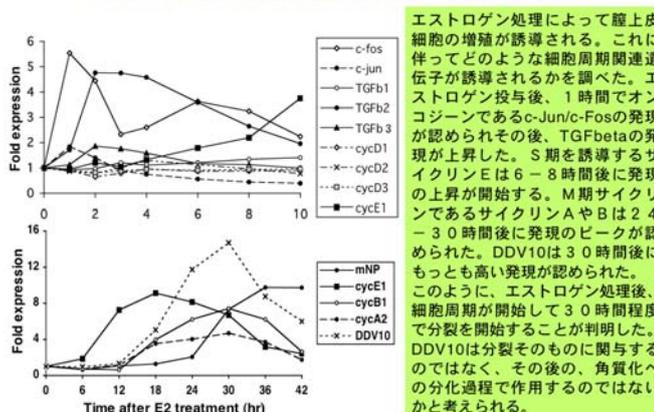
これまでに同定された遺伝子のうちで解析の進んでいるものは、セリンプロテアーゼであるニューロプシンと新規レクチンである。ニューロプシンは神経系に発現するプロテアーゼとして同定されているが、本研究によりマウス膣の上皮組織に発現することを初めて示した。エストロゲン処理後、30 時間後から発現増加が見られることから上皮組織分化の最終段階で必要な因子であることが予想された (Katsu *et al.*, 2002)。

新規レクチンはカルシウム依存性であり、エストロゲン処理で発現量が増加するが、プロゲステロンでの発現増加は認められなかった。さらに、上皮組織に発現が認められた。またこのレクチンにはスプライシングの違いによって少なくとも 2 種類のバリエーションが存在することが分かった (右図)。この結果から、新規レクチンは目 (E)、腎臓 (K)、脾臓 (SP) などの組織には発現は認められず、胃 (ST) や舌 (T) といった多層化・角質化を示す上皮組織を持つ臓器にのみ発現していることが分かった。このような、いわゆる角質化に関連したレクチンの同定は世界初である。この新規レクチンはエストロゲン処理後 18 時間後から発現が認められることから、上皮細胞の増殖ではなく角質化への分化過程で機能していると考えられる (Katsu *et al.*, 2003)。

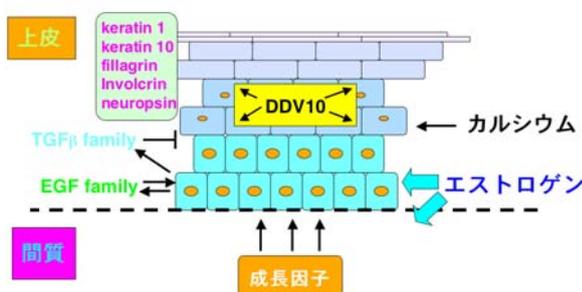


一般に、マウス雌性生殖器官である膺は、エストロゲンによって上皮組織の増殖・分化が誘導される。細胞の増殖には細胞周期を制御する様々な因子が関与するが、それらがどのようなタイミングで発現しているのかは不明である。我々は、細胞周期を制御する因子であるサイクリンの発現パターンを調べた。さらに、エストロゲン誘導因子である *jun*, *fos* 細胞増殖を制御する *TGFβ* の発現も調べた (右図)。

エストロゲンによって誘導される遺伝子の発現解析



その結果、エストロゲン処理後まずエストロゲン誘導因子である *jun*, *fos* の発現が上昇することが分かった。さらに、*TGFβ*のうちのタイプ2の発現が2時間から4時間にかけて増加が認められた。細胞周期のS期の進行に重要な役割をなすサイクリンEの発現は8時間から10時間にかけて発現上昇が開始する。その後、M期サイクリンであるサイクリンAとBの発現が認められる。興味深いことに、G1期の進行を制御するサイクリンDの遺伝子発現はほとんど変動しないことが判明した。サイクリンDはタンパク質としてすでに存在しており、エストロゲン処理後に翻訳後の修飾(リン酸化、タンパク-タンパク結合)によって制御されていると考えられる。また、角質化上皮組織の基底細胞にのみ発現する *p53* ファミリーの一員である *p63* の発現解析を行っており、マウス膺にはN末が欠損したデルタNのフォームが発現することが確認され、さらにその転写調節領域の解析から、AP-2認識配列を含む少なくとも3箇所の領域が転写に必要であることが判明している。今後、エストロゲン処理後の細胞増殖の分子機構について、さらに詳しく解析していくことが必要となる。



(2) 研究成果の今後期待される効果

新規に単離したレクチンは角質化との関連が明らかであり、角質化上皮細胞の分化マーカーとしての利用が考えられる。また、上皮細胞の増殖・分化・細胞分裂のメカニズムを解析するとともに、エストロゲン依存性の細胞増殖の分子機構について、さらに詳しく解析していくことが必要となる。エストロゲンによる細胞増殖のメカニズムの解析を目指したい。

**DNA マイクロアレイによるマウス雌性生殖器官でのエストロゲン応答遺伝子の探索：鈴木敦子 (CREST 技術員)、井口泰泉 (自然科学研究機構)**

(1) 研究内容及び研究成果

- a) 合成エストロゲン投与によるマウス子宮と膺での時期特異的遺伝子発現変化
  - 発生途上にある動物は、成熟個体に比べて、外因性の女性ホルモン様物質・化学物質に対する感受性が成熟個体に高い。さらにその効果は固定され、生涯にわたって影響を及ぼす。これは1) 成熟個体では外因性因子に対するホメオスタシスのシステムを備えているのに対し、発生途上にある動物はその備えが準備されていない、2) 発

生段階の組織は様々な遺伝子発現パターンがゲノムレベルで確立され、徐々に固定されていく時期であるために、外因性の刺激による遺伝子発現も同時に固定される可能性があるためであると推測される。我々は発生途上の新生仔と成熟個体の雌性生殖器官における、外因性エストロゲン刺激に対する遺伝子発現応答パターンという面から、新生仔型、成熟個体型の境界（臨界期）を明らかにしようと試みた。また、その両者の比較を念頭に置きながら、外因性の女性ホルモン様物質・化学物質の影響の生体への影響を解析した。

始めに外因性エストロゲンが、出生前後の周生期といわれる時期のマウスに与えられることによって生ずる表現型を明らかにした。例えば胎仔期あるいは新生仔のマウスに DES を投与すると、子宮や膣に形態異常が誘起される (Suzuki *et al.*, 2002, Miyagawa *et al.*, 2002, Suzuki *et al.*, submitted)。また、そのようなエストロゲン処理マウスが成長すると、本来エストロゲンに反応して細胞増殖する膣上皮が、その刺激なしで常に細胞増殖が起こってしまうようになる。この現象は、高濃度の BPA を新生仔期に投与しても起こることも明らかにしている (Suzuki *et al.*, 2002)。

さらにこうした現象の臨界期を、DES 投与による生殖器官への影響について、視床下部-下垂体系、子宮、膣それぞれの異常について調べた。C57BL/6J 系マウスを用いてそれぞれの日齢のマウスに、単回 DES 2 mg/g bw を投与し、56 日齢で卵巣除去し、体内のエストロゲンを除いた後、70 日齢に組織学的解析を行った。視床下部・下垂体系（排卵の有無）の臨界期は生後 7 日である（表 1）。一方、子宮筋の乱れの臨界期は 5 日齢子宮間質の異常（コラーゲンの過剰合成）の臨界期は 1 日齢、膣上皮のエスト

表 1. DES 投与によるマウス雌性生殖器官の異常の頻度

DES 投与 開始日	マウス の数	雌性生殖器官の異常			
		黄体のない マウスの数	子宮間質の 異常	子宮筋の 乱れ	膣上皮の不可 逆的多層化
対照群	7	0	0	0	0
0 (出生日)	5	5*	5*	5*	3*
1	7	7*	6*	6*	
5	9	9*		5*	
7	12	7*			
9	7	0	0	0	0
11	8	0	0	0	0
13	6	0	0	0	0

ロゲン非依存の

多層化の臨界期

は出生日である

ことが明らかと

なった（表 1）。

このように器官

によって外因性

刺激に対する臨

界期は異なり、

子宮ではその表

現型によっては同一器官でありながら臨界期がそれぞれ異なることが明らかとなった。

次にこのような形態学的解析によって行った表現型とその臨界期を、遺伝子発現のパターン化で評価しようと試みた。0、5、20、70 日齢で DES を単回投与し、6 時間後に子宮と膣で発現変化する遺伝子について DNA マイクロアレイ法を用いて調べた。70 日齢については 56 日齢で卵巣を除去したマウスを用いた。通常 0-70 日齢のマウスでは、発現している遺伝子数は日齢よらず約 5,000 が検出される。しかし DES 投与によって発現が変化する遺伝子数は日齢が上がるにつれて増加した（図 1、2）。つまり、新生仔（0 日齢）では DES で発現誘導または抑制される遺伝子数は子宮、膣ともに成熟マウスの 1/20-1/10 と少ない。それに対して 5 日齢では、DES によって発現がする遺伝子の種類は子宮では 1/2 が、膣では 1/5 が成熟マウスのそれと共通し、クラスタリング解析による遺伝子発現パターンは 20、70 日齢に似ていた（図 3）。

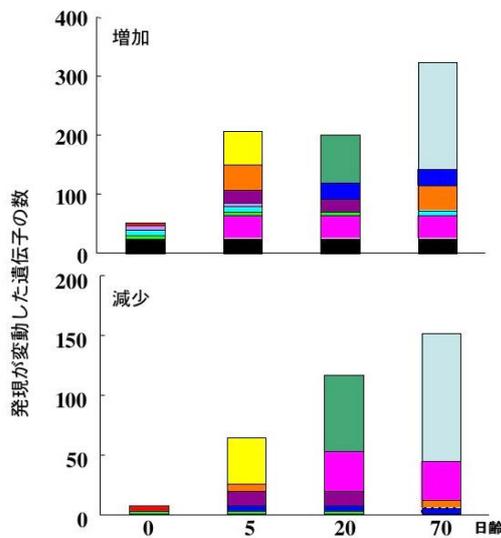


図2. DES投与後の膣で2倍以上発現変化した遺伝子の数

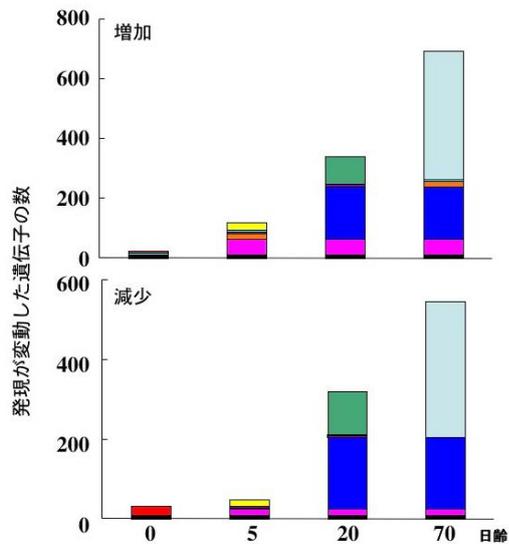


図1. DES投与後の子宮で2倍以上発現変化した遺伝子の数

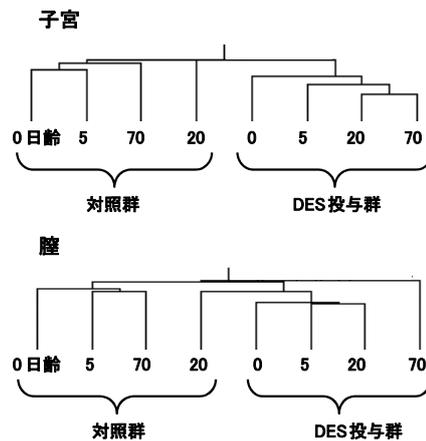


図3. クラスタリング解析によるエストロゲン応答遺伝子の群間の相違

いくつかの日齢依存的・非依存的に制御されている遺伝子は、エストロゲンが子宮や膣に対して作用するエンドポイントである細胞増殖・分化を伴う器官重量増加や、形態形成異常という面から興味を持っている。定量的 RT-PCR によるより詳細な結果から、子宮・膣共に、細胞周期関連遺伝子 (MAD2、cyclin G2、G1 to phase transition1、p21、Klf4、14-3-3 sigma) が DES で日齢依存的に制御されていることがわかった。一方成長因子である IGF-I やインヒビンβBなどは日齢に依存せず、エストロゲンによって発現が誘導された。免疫組織染色の結果からインヒビンβB は子宮上皮細胞に発現し、その受容体となる ALK1 は既に 0 日齢から子宮上皮と間質に発現していることから、これらの成長因子が子宮上皮の多層化や間質の分化に関与している可能性が考えられる。

以上の結果は組織学的に得られた表現型の臨界期が、遺伝子発現パターンでも評価できることを示している。言い換えれば外因性刺激による形態学的な異常は、細胞中の遺伝子発現のパターンが新生仔型か、あるいは成熟型の状態にあるかに依存していることがより明確となったといえる。今後、エストロゲン応答遺伝子発現変化と子宮・膣の形態学的変化を結び付け、臨界期での遺伝子制御機構について解明する必要

がある。

b) エストロゲンによるマウス乳腺、子宮、膣での組織特異的遺伝子発現変化

エストロゲンの多様な作用は、体中の器官・組織にユビキタスに発現しているERを介する遺伝子発現の結果生じるものである。さらにそれぞれの器官・組織によって誘導される遺伝子発現は異なり、それゆえエストロゲン刺激に対するアウトプットとしての表現型は器官・組織特異性が見られる。その中でも子宮・膣・乳腺などの生殖器官では、エストロゲンに対する反応は、他の器官に比べて急激かつドラスティックである。実際これらの器官では、血中エストロゲン濃度の増減に伴い細胞増殖・分化、さらには妊娠、着床、授乳といった様々なイベントが制御されている。そこで我々は、成熟マウスの子宮・膣・乳腺において、エストロゲンで制御されている遺伝子についてDNAマイクロアレイ法で調べた。C57BL/6J系マウスを56日齢で卵巣除去した後、70日齢に体重1kg当たりE2 5mgを投与し、6時間後に各器官での遺伝子発現変化を検討した。

まず単純にエストロゲンに依存して変化する遺伝子の数を検討した。対照群に比べてE2投与群で2倍以上発現が増加した遺伝子数は、乳腺では15個、子宮では352個、膣では701個となり、膣での発現増加が顕著であった(図4)。一方、発現が減少した遺伝子数は、乳腺では68個、子宮では341個、膣では143個であった(図4)。E2に反応する遺伝子数は乳腺で最も変化が少なかった。また、子宮と膣では、発現増加した遺伝子では約半数(207個)、発現減少した遺伝子では26遺伝子が共通していた(図4)。

遺伝子の機能的分類を行ったところ、子宮と膣では、細胞増殖や生合成、転写など様々な機能の遺伝子が発現変化する一方、乳腺では代謝等に関わる遺伝子が主に発現変化していた。我々はエストロゲンに対する各器官の応答のうち、細胞増殖・分化さらに形態形成に興味をもっていたので、細胞増殖・分化関連遺伝子、

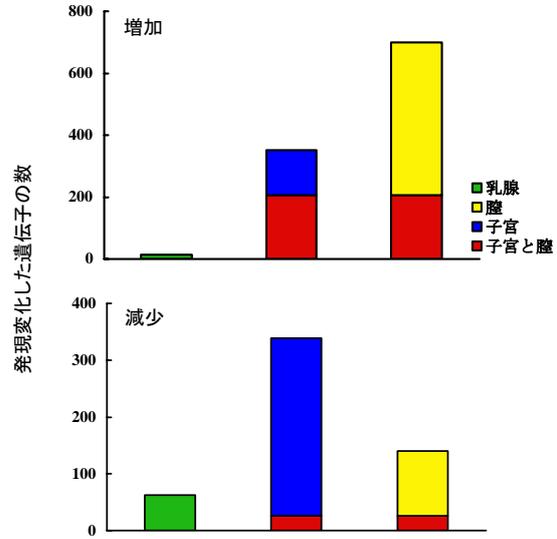


図4.E2投与により発現変化した遺伝子の数

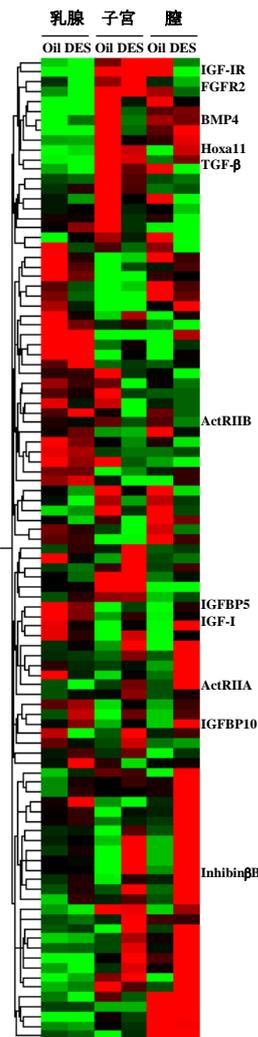


図5. 細胞増殖や形態形成に関わる遺伝子のクラスタリング解析

形態形成遺伝子についてさらにクラスタリング解析及び定量的 RT-PCR による詳細な検討を行った。子宮と膣でのみ、TGF- $\beta$ 、FGFR2、Hoxa11、IGF-IR、BMP4、などが発現変化した。(図 5; 緑、発現減少; 赤、発現増加; Oil、対照群; E2、E2 投与群)。また、すべての組織で、インヒビリン $\beta$ B、アクチビン受容体 (ActRIIA, IIB)、IGFBP5、10 などが発現変化した。さらに、Hoxa11 と Wnt5a は E2 投与 6 時間後に膣で発現が増加し、Hoxd4 は子宮で発現減少した。Hoxa11 については、乳腺で発現が認められなかった。一方、IGF-I は子宮と膣でのみ発現が増加した。さらに、E2 投与によって子宮では IGF-R の発現量が減り、膣では IGFBP2 と 5 の発現量が増えた。また、E2 投与によって子宮と膣でステロイド合成に関わる Kallikrein 1 の発現量が増え、Kallikrein 6 は膣でのみ増えた。次に、細胞増殖率を調べるために、E2 投与後 24 時間の乳腺と子宮、膣で細胞の BrdU の取り込みを調べた。子宮と膣では、E2 投与によって BrdU の取り込みが増加したが、乳腺では変化なかった。

今回用いた E2 の投与量では、乳腺では BrdU の取り込みが対照群と有意に変わらず、細胞増殖が起こっていなかった。そのため子宮・膣に比べて乳腺では E2 で発現変化する遺伝子も少ないのであろう。さらに乳腺では、プロゲステロンやプロラクチンのような別のホルモンの影響が大きいことが考えられる。また子宮と膣は、同じミューラー管から分化しているためエストロゲンによる反応も類似していると考えられる。しかし、IGF-I 関連の遺伝子発現結果からも、エストロゲンによる子宮と膣の細胞増殖は IGF-I 受容体や結合タンパク質によって、組織特異的な制御を受けている。また、形態形成遺伝子である Hox や Wnt についても、エストロゲンによって発現変化する遺伝子が子宮と膣で異なることから、これも組織特異性を担っていると考えられる。ミューラー管から子宮や膣が分化する際に Hoxa10、a11 が子宮に、Hoxa13 が膣で発現し、胎児期のエストロゲン曝露によって発現抑制されることが知られている。さらにマイクロアレイの解析から成熟マウスの子宮と膣では違ったクラスター群の Hox 遺伝子も発現していることがわかった。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

エストロゲン応答遺伝子の発現は組織の発達時期に応じて変化しており、生後 5 日の前後で、大きく新生仔型と成熟型に分かれることが明らかとなった。ホルモン感受性臨界期の意味づけを遺伝子発現の面から明らかにするための基礎ができたことから、どのような遺伝子群の発現調節系が臨界期を意味づけているかを解明したい。これにより、内分泌かく乱物質の影響の一端に迫ることができると考える。また、組織特異性をエストロゲン応答遺伝子の発現から明らかにすることも可能と思われる。エストロゲンの標的器官での遺伝子発現を整理し、組織特異性と臨界期を統合的に理解できるものと思われる。

## **BPA のラット新生児期投与による生殖系への影響：加藤英男・太田康彦（山口大学連合大学院・博士課程、鳥取大学）**

### (1) 研究内容及び研究成果

妊娠中に投与した低用量の BPA により雌の仔マウスの膣開口が早期化すること (Honma *et al.*, 2002)、高用量の BPA を出生直後から 5 日間雌マウスに投与すると、視床下部・下垂体系の無排卵とともに、膣上皮の不可逆的増殖が起こることも報告した (Suzuki *et al.*, 2002)。最近の報告では、BPA がヒト臍帯あるいはヒト卵濾胞液から検出され、また我々はマウスやサルの実験から、BPA が容易に胎児移行することも明らかにした (Uchida *et al.*, 2002)。ヒトも化学物質の汚染から免れない状況において、疫学的調査による尿道下裂の増加、地域的な精子数の減少が報告され、ヒト生殖器異常、

生殖能力と化学物質との関係が危惧されている。我々は、BPA をラット新生児期（生後 0 日～9 日）に皮下投与し、生殖影響を検討した。これはげっ歯類の新生児期がヒト胎児月齢 3～4 ヶ月の発生段階に相当することを利用したモデルである。

雄では、低用量として BPA 24 ng～3 μg 群（公比 5 で 4 群）と高用量として 1mg 群の計 5 群を設けた。さらに E2 10 μg 群を設けた。BPA 群では、全ての検査で異常を認めなかった。一方、E2 群では、包皮分離遅延、交配成績低下、精子数減少、生殖腺重量減少（生後 10、35、150 日）、精巣の mRNA 発現変化（3β-HSD、P450<sub>scc</sub>、PR）（生後 10 日）、精巣では巨細胞およびアポトーシス像（生後 35 日）がみられた。このように、雄では、BPA は E2 とは異なり、異常を誘起しなかった（Kato *et al.*, in preparation）。

一方雌に於いては、BPA 1 mg 群では、会陰部開裂、膺早期開口、発情周期の不規則化、卵巣断面に占める黄体面積の減少、子宮の E2 反応性の低下を認めた。さらに 4mg 群では、体重増加量の変化、連続発情および黄体欠損を認めた。このように高用量の BPA は視床下部-下垂体-卵巣軸に不可逆的な異常を誘発することが判明した。加えて、同様に投与された E2 10 μg 群の変化は、ほぼ 4 mg 群と同等であった（Kato *et al.*, 2003）。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

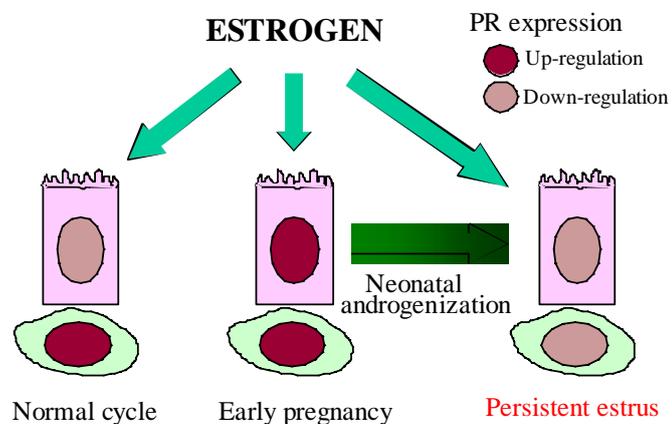
このことから、BPA は E2 換算すると 1/400 に相当するエストロゲン活性を有すると考えられた。*in vitro* 系では、BPA のエストロゲン活性は、E2 の 1/10,000 とされていることから、エストロゲン活性により新生児期への影響を評価するためには、*in vitro* の結果のみでなく、動物実験による検証が必要と考えられた。

## 哺乳類の胎盤形成への影響—特に脱落膜形成に関して：太田康彦（鳥取大学）

### (1) 研究内容及び研究成果

内分泌かく乱物質の生殖機能への影響は、雄において注目されているが、周生期に投与した性ホルモンの影響は雄よりも雌においてより深刻で、雌性生殖器官における持続的变化は雄よりも少ないホルモン量とより少ない処理期間で生じる。例えば、周生期のアンドロゲン処理ラットでは子宮自体に機能的低下が起こっている事が、子宮側の着床反応である脱落膜形成能（脱落膜腫）を、性ホルモン処理ラットで調べる事で明らかにされている。これらの雌ラットでは、

春期発動期（約 30 日齢）以降、卵巣から少量のエストロゲンが持続的に分泌され、これが子宮機能低下に貢献することから、性ホルモン処理連続発情ラットは、内分泌かく乱物質の雌性生殖機能への影響を追究する有用なモデルとなり得る。そこで、周生期にエストロゲンあるいはアンドロゲンをラットに投与して、連続発情状態を作り、性ホルモン投与に対するホルモン受容体の変化、妊卵着床刺激に対する反応などを免疫組織化学的および分子生物学的に調べ、内因性エストロゲンの持続的曝露で生じた不妊現象を解明し、更に周生期に投与した BPA の子宮への影響を追究することで、内分泌かく乱物質の雌性不妊への影響に関する研究の一助としたい。



Effect of persistent estrus on the PR expression in rat endometrial cells.

妊卵着床環境を設定した連続発情ラットで、雌性ホルモン受容体 (ER、PR) の変化を免疫組織化学的に観察して、脱落膜腫形成不能の原因を追究し、子宮における内分泌かく乱物質の影響を評価するための指標を検索した。5 日齢 T 系雌ラットに 0.1 または 1.25 mg の testosterone propionate (TP) を投与して連続発情ラットを作成した。正常周期ラットを対照群として、全てのラットは成熟後卵巣除去し、妊娠初期のホルモン環境を模した性ホルモン処理 (P4 及び E2) を行った。

その結果、正常ラット子宮上皮および間質の PR 発現は、P4 投与 3 日後に低下するが、投与 3 日目に E2 を加えると、発現が回復した。これに対して連続発情ラットでは、PR 発現が低下しており、E2 により上皮の PR 発現が殆ど消失した。また、正常ラット子宮上皮の ER 発現は 3 回の P4 投与により消失したが、連続発情ラット子宮上皮では発現は抑制されなかった。連続発情ラット内膜における PR の変化は、ER 発現の増加により生じ、細胞増殖活性の結果もこれを支持している。EGF、TGF $\alpha$  と EGFR 発現は、性ホルモン投与に対して大きな変動を示さず、定量的 RT-PCR によるこれらの成長因子の遺伝子発現は、免疫染色の結果同様にホルモン処理による有意な変動は示さなかった。

以上の結果から、a) 連続発情ラットの子宮は、上皮および間質細胞のホルモン依存性受容体発現が変化し、子宮側の着床能に影響し、b) 子宮における内分泌かく乱物質の影響を評価する上で、性ホルモン受容体発現の検索は有用だと考えられる。

次に、周生期のラットに BPA を投与して、性周期に及ぼす影響を調べた。更に連続発情ラットで得られた指標を用いて着床反応への影響について、子宮内膜のホルモン受容体などの発現を実験形態学および分子生物学的に解析した。これによりラット内膜における内分泌かく乱物質の影響の機構解析を目指した。

出生日より 7 日間 BPA (0.1 – 1 mg/day) を皮下投与した T 系ラットを、60 および 120 日齢で供試した。それぞれの日齢での性周期性、生殖器官重量などを測定し、性ホルモン受容体発現を免疫染色法で検索した。さらに正常雄と交配実験を行い、排卵数、妊娠率、着床率、胎児数等、子宮内膜ゴマ油注入による脱落膜腫形成能を調べ、妊娠中期における血中ホルモン濃度も併せて測定した (E2、P4、プロラクチン (PRL))。

その結果、性周期：周生期に BPA を投与された T 系ラットは、60 日齢で投与量に関わらず正常性周期をしめすが、1 mg 投与群は 120 日齢で主に連続発情状態を示す、いわゆる delayed anovulatory syndrome (遅延性無排卵症) となった。60 日齢の卵巣除去後に与えた P4 及び E2 に対する内膜細胞の反応性を性ホルモン受容体発現および細胞分裂活性で検索したが、正常ラットとの間に顕著な差は認められなかった。また、30 日齢で卵巣を除去し、90 日齢で幼若ラットの卵巣を移植し、30 日後に摘出し、性周期

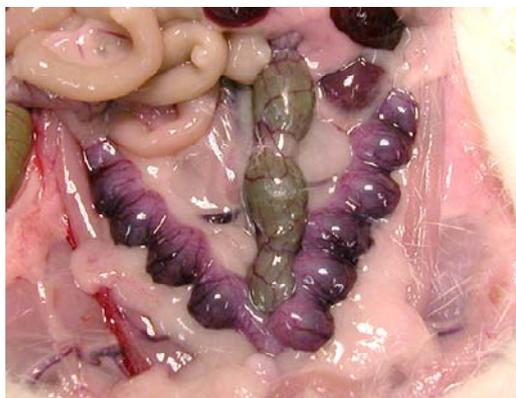


Fig. 1. Uterus in a control rat mated with a normal male on the day following the 1st proestrus after 60 days and sacrificed on PD10. Showing a number of normal fetal swellings.

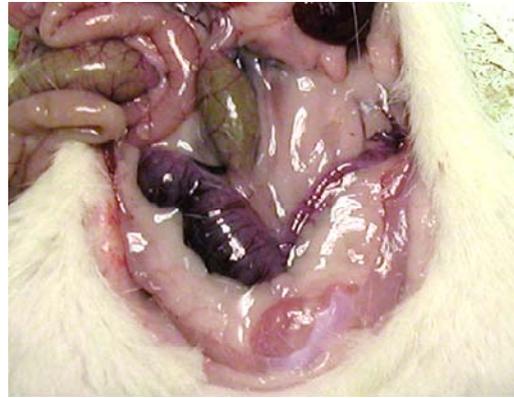


Fig. 2. Uterus in an 1mg BPA-rat mated with a normal male on the day following the 1st proestrus after 60 days and sacrificed on PD10. Showing abnormal uterine swellings.

及び卵巣の組織観察を行った。卵巣を移植されたラットは、周生期の BPA 処理を問わず、120 日齢ではほぼ正常な性周期を示した。移植卵巣中には黄体が認められた。

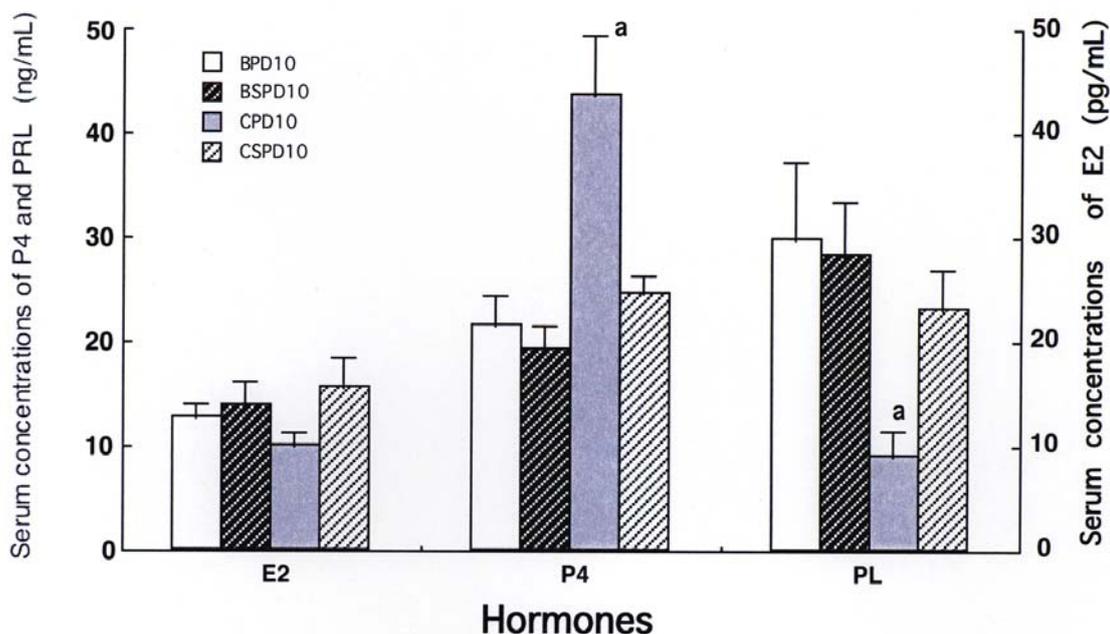
脱落膜形成能は、60 日齢で BPA の投与量依存性に減少するが、形成能は維持されている。1mg 投与 120 日齢連続発情ラットは、脱落膜形成能が著しく低下していた。正常性周期を示す 60 日齢で正常雄と交配した BPA 処理ラットは、1 mg 投与群を除いて正常な妊娠が継続した。1 mg 投与群では全て交尾後妊娠したが、胎仔の減少、妊娠の中断が認められた。さらに、妊娠 10 日齢で 7 例中 5 例が着床様腫瘍を散逸的に子宮に示したのみで、これらには胎児が認められず、ただの脱落膜（腫）であった。発情期の 1 mg 投与ラット輸卵管中の卵を組織切片を用いて計測したところ、輸卵管中に卵が認められたのは 9 例中 1 のみであった。

輸精管を結紮した雄と交配した 1 mg BPA 処理ラットは、交尾後 9 例中 8 例が擬妊娠状態となり、これは採材日の 10 日目まで続いた。対照群の子宮中には、着床を示す瘤は認められなかったが、BPA 処理群では 8 例中 5 例に様々な大きさの瘤が認められた。組織学的にこれらの瘤は単なる脱落膜腫で、胎児の存在は確認できず、正常雄と交配後妊娠 10 日齢で認められた BPA 処理子宮の状態と酷似していた。



Fig. 3. Uterus in an 1mg BPA-rat mated with a sterilized male on the day following the 1st proestrus after 60 days and sacrificed on PD10. Showing uterine swellings.

60 日後正常雄あるいは輸精管切断雄と交尾させ、その 10 日後に血液を採取して、ホルモン濃度を測定した。正常雄と交尾させた 1 mg BPA 処理ラットの P4 濃度は、不妊雄と交尾させた擬妊娠個体に近く、PRL は正常妊娠個体より有意に高値であった。



a) 周生期にT系ラットへ投与した高容量 BPA は、過性無排卵症を引き起こし、視床下部-脳下垂体-卵巣系に恒久的変化を及ぼすと判断できるが、周生期に投与した BPA の視床下部への影響に加えて春期発動機移行卵巣から周期的に分泌される性ホルモン、特にエストロゲンの相加効果によるものと結論される。

b) 脱落膜形成能は、60 日齢で投与量依存性に減少するが、形成能は維持されている。120 日齢の連続発情ラットは脱落膜形成能の著しい低下を示し、周生期の性ホルモン投与による変化と同様と思われる。

c) 60 日齢で正常雄と交配した周期性発情 BPA 処理ラットは、1 mg 投与群で全て交尾後妊娠したが、胎仔の減少、妊娠の中断が認められた。これらの減少は、子宮の着床能低下と云うより、BPA 処理ラット卵管中における卵数低下によると考えられる。排卵数の変化あるいは、卵管における卵の輸送を調べる必要がある。

d) 周生期に投与を受けた BPA ラットの着床障害が、BPA の視床下部-脳下垂体、卵巣、あるいは子宮に影響によるのかは不明である。また、加齢により連続発情となった個体における脱落膜腫形成能の低下は、既に報告されている周生期に性ホルモン処理されたラットあるいは加齢（8 ヶ月以降）により連続発情となった同系統ラットの結果と類似していた。

e) BPA 処理ラットの妊娠 10 日齢の血中 P4 は、擬妊娠個体と同様、妊娠個体より有意に低く、PRL は逆に高値を示した。従って交尾後の BPA 処理ラットのホルモン環境は、擬妊娠ラットと酷似しており、PRL 濃度が、異常な脱落膜形成の直接的原因とは考えにくく、副腎機能の変化による可能性を否定できない。

f) 周生期に投与した BPA は、雌性ラットの生殖機能に投与量依存的な障害を引き起こすと結論付けられる (Ohta *et al.*, in preparation)。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

BPA の哺乳類への影響、特に生殖器系におよぼす影響は依然として極めて不明確である。高用量を投与した実験においても、種差・系統差が極めて大きく、BPA の評価実験は雌雄ともに減少傾向にある。本実験でも周生期投与可能最大用量（1 mg）を用いて雌性生殖機能に影響が観察された。酵母のレポーターアッセイに評価を引用するれば 1 mg BPA は E2 換算で 0.1 µg となり、実際の環境中で暴露される量よりはるかに大である。その影響はラットにおいても極めて出にくいと云わざるを得ないが、現在一般的に行われている若成体における評価のみでは、不十分であることを今回の結果は示している。つまり、周生期における曝露は内因性のエストロゲンと相加的に作用することが示され、器官形成期の曝露、成体時の曝露を問わず、曝露期間終了後も長期間影響を追跡する必要であることを示唆しており、曝露短時間で確たる影響が見られないとしても、内分泌かく乱物質が女性不妊の原因となり得ないと結論付けることは出来ない。現在不妊となっている女性の胎子期あるいは周産期の曝露調査が必要であろう。

## 雄性生殖器官への内分泌かく乱物質の発生内分泌学的影響：森 千里（千葉大学大学院医学研究院環境生命医学）

### (1) 研究内容及び成果

胎児（仔）期あるいは新生児（仔）期の動物が内分泌かく乱物質に曝露されると様々な異常をきたすことが認められており、特に雄性生殖系は化学物質に影響されやすい器官の一つであることが知られている。そこで、胎仔期および新生仔期における雄性生殖系への内分泌かく乱物質曝露による影響について、モデル動物や細胞を用いて以下の 5 項目を中心に研究を進めた。

1. 新生仔期での合成女性ホルモン曝露による雄性生殖器官への影響
2. 植物エストロゲンの雄性生殖器官への影響
3. 内分泌かく乱物質曝露による DNA メチル化への影響
4. ビスフェノール A (BPA) の脂肪細胞への影響
5. ヒト臍帯の化学物質曝露と遺伝子発現変化のトキシコゲノミクス解析

これらの検討にあたり、本研究グループでは、DNA サブトラクション法、cDNA マイクロアレイ法、二次元電気泳動法、Restriction Landmark Genomic Scanning (RLGS) 法を用いて、様々な解析法から検討を行った。

さらに、胎児期での内分泌かく乱物質曝露の原因として、母体との繋がりが重要であると考えられるため、パイプラインであるヒト臍帯を用いてヒト臍帯の内分泌かく乱物質含量と遺伝子発現との関連について検討した。

#### ①新生仔期での合成女性ホルモン曝露による雄性生殖器官への影響

新生仔期に合成女性ホルモンとして知られるジエチルスチルベストロール (DES) を投与することによって、雄性生殖器官 (精巣、精巣上体) への影響を遺伝子発現のレベルから検討するべく、DNA サブトラクション法、cDNA マイクロアレイ法を用いた解析を行った。

##### a) 停留精巣のメカニズムの解明

停留精巣は生殖系の発達異常のひとつとして知られているが、その機序に関しては明らかではない。そこで、アンドロゲンのアンタゴニストであるフルタミドによる停留精巣の発症と精巣挙筋の発達との関連について検討した。Wistar 系ラット妊娠 14~16 日にフルタミドを 3 日間皮下注射 (100 mg/kg/day) し、停留精巣の生じた雄ラットを用いた。対照群は無処置のものを用いた。4 週齢精巣挙筋の性ホルモン受容体 (ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、AR) の免疫染色において、停留精巣群は対照群と比較し差を認めなかったが、幼若ミオシン抗体での免疫染色によって停留精巣群では幼若ミオシンの発現が認められ、細胞増殖マーカーである Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) も認められた。また幼若ミオシンの発現は、停留精巣群の精巣挙筋に特異的な現象であることが認められた (Yang *et al.*, 2002; Matsuno *et al.*, 2003; Tobe *et al.*, 2002)。

##### b) 化学物質投与により遺伝子発現が変化する遺伝子の同定

ICR 系マウス新生仔に DES (5  $\mu$ g/mouse/day) を出生後 1 日目から 5 日間皮下投与し、8 週齢雄性生殖器 (精巣、精巣上体) で発現変化する遺伝子を DNA サブトラクション法で検索したところ、精巣 (Matsuno *et al.* 2004) や精巣上体 (ADAM7 遺伝子、Adachi *et al.* 2003) で長期にわたり発現に変化が認められた遺伝子の存在が確認された (表 1)。

表 1. Homologous gene (GenBank ID)*	
Up-regulated genes in testis	
T+1	Axonemal dynein heavy chain 8 alternatively spliced (AF356521)
T+2	Testis specific SSeCK (AF326230)
T+3	$\beta$ -Adaptin (AK004975)
T+4	Aurora-related kinase 1 (ARK1) (BM237156)
T+5	EST (AW682573)
Down-regulated genes in testis	
T-1	EST (AK017044)
T-2	EST (AK017130)

\*: The top hit of genes on GenBank database was described.

##### c) 化学物質により遺伝子発現が変化する遺伝子の同定

C57BL/6 系マウス新生仔に DES (5  $\mu$ g/mouse/day) を出生後 1 日目から 5 日間皮下投与し、精巣で発現変化した遺伝子が多数見いだされ、その内の 12 種の遺伝子の臓器間での発現をリアルタイム PCR 法を用いて定量的に解析・比較すると精巣上体に有意に発現することが確認された (表 2、表 3) (Adachi *et al.*, 2002; Adachi *et al.*, 2004a; Komiyama *et al.*, 2003; Takano *et al.*, 2002)。一部の遺伝子 (Genbank accession No. U69699 など) については、精巣上体での局在が変化することが分かった (図 1)。

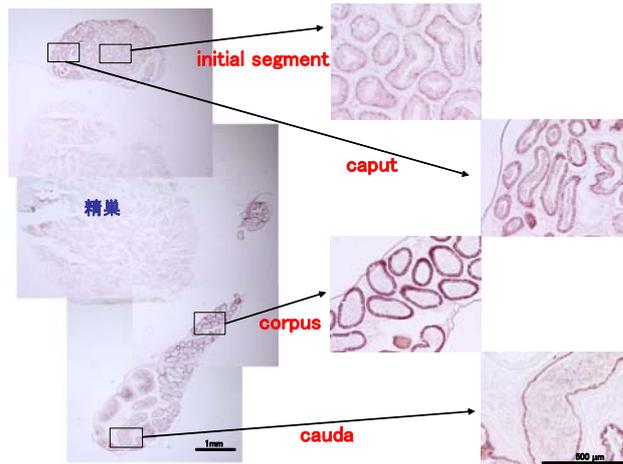
表 2

Gene name (Accession No.)	Array ratio	PCR ratio
- Mouse ribosomal protein L3(BC008655)	62.9	2.2
- Mouse adult male kidney cDNA homolog to Alpha-1-Antitrypsinase Precursor (AK002574)	50.2	>100
- Mouse adult male tongue cDNA, RIKEN clone:2310021L10(AK009449)	45.6	>100
- Integral membrane-associated protein 1 (Itmap1) (U69699)	39.7	>100
- Life Tech mouse embryo 10.5dpc 10665016(AA087734)	38.3	1.4
- Soares mouse 3NIMS Mus musculus cDNA clone(AK008856)	27.0	1.8
- Mus musculus, clone(BC014812)	22.9	3.6
- Mouse 11 days embryo cDNA, RIKEN clone:2700017M01(AK012256)	21.7	>100
- Mouse adult male liver cDNA, RIKEN clone:330008G01(AK004942)	19.6	55.2
- Mouse adult male epididymis cDNA, RIKEN clone. 9230001H03(BB583831)	18.5	>100
- Mouse mammary tumor virus LTR DNA(AFI19342)	18.2	>100
- Mouse adult male epididymis cDNA, RIKEN clone 9230104L09(AK02314)	9.5	>100

表 3

Accession No.	脳	心臓	肺	肝臓	腎臓	脾臓	腸	精巣	精巣上体
- BC009855	11.8	3.2	4.0	29.2	12.8	5.8	3.2	6.7	100
- AK002574	0	0.1	0	0	0.1	0	0	0	100
- AK009449	0	0	0	0	0	0	0	0	100
- U69699	0	0	0	0	0	0	0	0	100
- AA087734	11.2	9.2	3.4	33.2	19.8	37.2	1.8	15.3	100
- AK008856	38.5	5.5	4.2	18.8	15.4	40.1	10.3	10.3	100
- BC014812	0.3	0.3	0	0	0	0.1	0	0	100
- AK012256	0	0	0	0	0	0	0	0	100
- AK004942	0.3	1.5	1.4	0.2	119	2.8	0.2	0.4	100
- BB583831	0	0	0	0	0	0	0	0	100
- AF119342	0	0	0	0	0	0	0	0	100
- AK02314	0	0.2	0	0	0	0	0	0.2	100

(精巣上体を100%とする)

図 1. 精巣上体における U69699 の *in situ* hybridization 像

8 週齢マウス精巣上体の U69699 の ISH 像。精巣上体の管腔上皮に発現が認められ、特に corpus において強い発現が観察された。精巣に発現は観察されなかった。

## ②植物エストロゲンの雄性生殖器官への影響

### a) マウス精巣への影響

妊娠前から経胎盤・経母乳曝露を含み新生仔に植物エストロゲン的一种であるイソフラボンを慢性的に曝露し、マウス新生仔の性発達への影響について検討した。その結果、イソフラボンフリー飼料摂取群と比較して、0.05%イソフラボン添加飼料摂取群の雌において、膈開口の早期化や多卵胞の出現等がみられたが、雄においては精巣組織像および性ホルモン受容体遺伝子発現量などにおいても特に影響がみられなかった。ICR 系マウス新生仔にゲニスタイン (1000 µg/mouse/day) を皮下投与(生後 1~5 日目)すると、形態的には変化が見られなかったが、精巣でのマイクロアレイ解析では ERα および AR 遺伝子を含む多くの遺伝子の発現が 12 週齢時でも変化していた(Adachi *et al.*, 2004b; Shibayama *et al.*, 2001)。

### b) セルトリ細胞由来株化細胞 TM4 への影響

精巣セルトリ細胞由来の TM4 を用いて植物エストロゲン (ゲニスタイン、ダイゼイン) 曝露による影響を、網羅的な遺伝子発現 (mRNA) および遺伝子産物 (タンパク) を指標に、エストロゲン活性物質 (E2、DES) やチロシンキナーゼ阻害剤 (staurosporin) の影響と比較検討した。遺伝子発現変化は *in house* cDNA マイクロアレイ (ED アレイ II) を用いた (図 2)。その結果、クラスタリング解析により、ゲニスタインはエストロゲン活性物質とチロシンキナーゼ阻害剤の中間的作用を持つことが示された (図 3)。またタンパク発現について、二次元電気泳動法によるタンパクスポットプロファイリングを行った結果、マイクロアレイ法と同様の結果が得られた (図 4、図 5)。植物エストロゲンは弱い女性ホルモン様作用しか持たないため、その生体への影響については十分な知見がなかったが、本研究により遺伝子発現やタンパク質発現に影響しており、そのクラスタリング解析から女性ホルモンの作用に近いことが明らかとなった。

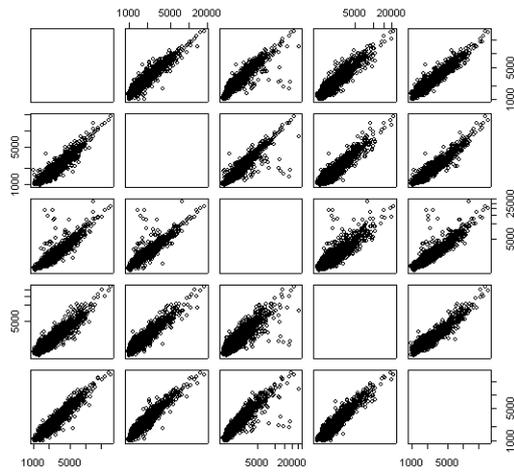


図 2. In-house cDNA マイクロアレイ (3704

解析

遺伝子) を用い、発現強度をグローバルノーマリゼーション後、それぞれについてプロットした。

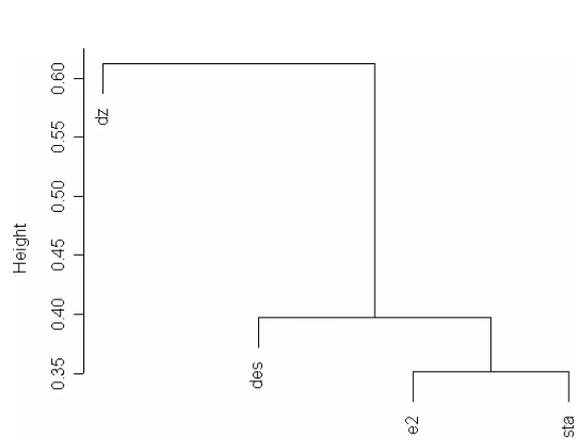


図 3. cDNA マイクロアレイの結果によるクラスター

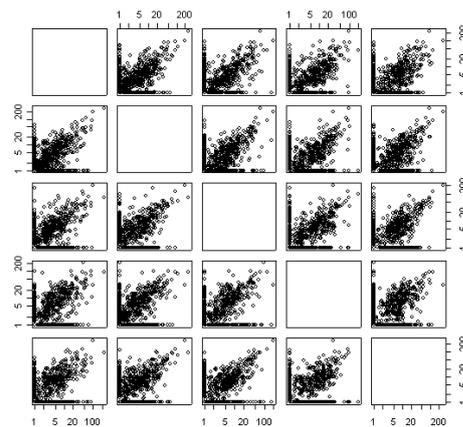
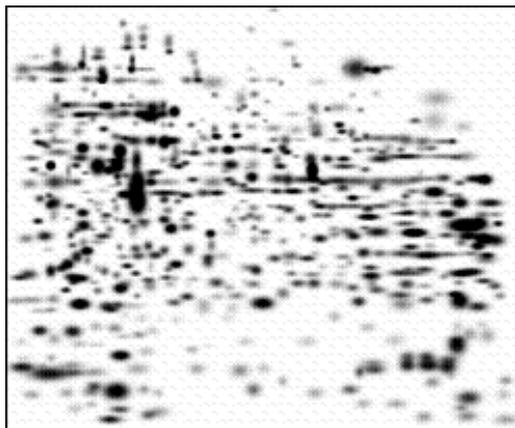


図 4. 二次元電気泳動像 (左) とタンパク質スポットのプロット (右)

スポットのタンパクの強度を数値化し、発現強度をグローバルノーマリゼーション後、それぞれについてプロットした。

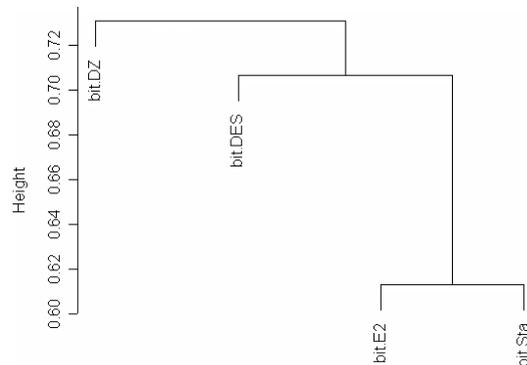


図 5. 二次元電気泳動のスポットによるクラスター解析

③内分泌かく乱物質曝露における DNA メチレーションへの影響

内分泌かく乱物質の影響を遺伝子配列には影響しないが細胞分裂を経ても維持され

る変化としてエピジェネティック変異の視点から検討を行った。

C57BL/6 系マウス新生仔に DES (0.003, 0.3, 3  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$ ) を生後 1 日目から 5 日間皮下投与し、30 日齢時に雄から精巣上体、雌から子宮を摘出し、そのゲノムの DNA メチル化の変化を RLGS 法 (図 6) で網羅的に調べたところ、DES 濃度依存的な DNA メチル化の変化が認められた。すなわち、対照群の精巣上体と子宮ではメチル化の違いが 4 カ所であったのに対し、3  $\mu\text{g}/\text{mouse}/\text{day}$  の投与では精巣上体では対照群に対し 6 カ所の脱メチル化、1 カ所のメチル化が、子宮では対照群に対し 6 カ所の脱メチル化、5 カ所のメチル化が引き起こされた (図 7)。DNA メチル化状態の変化は遺伝子発現を長期にわたり変化させることがあるので、DES による DNA メチル化状態の変化が精巣上体の発生・分化に影響を与えたり、長期・晩発的影響を引き起こしたりする可能性が考えられた。

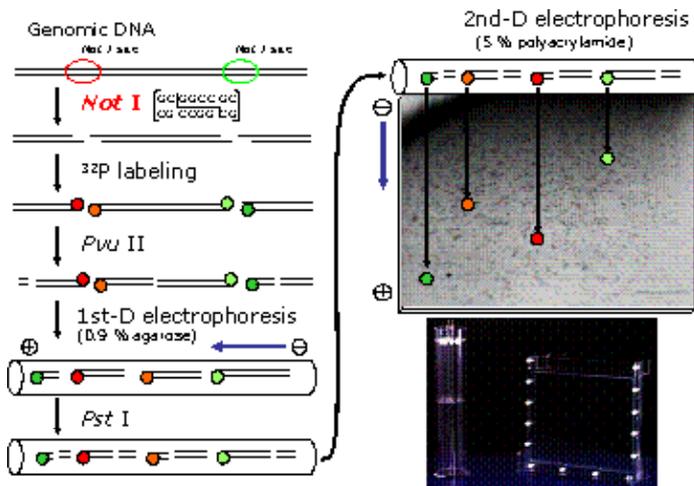


図 6. RLGS 法の概略

ゲノム DNA をメチル化感受性制限酵素 (個々では *Not I*) で消化したとき、メチル化されていると消化されない (スポットが現れない) ことを利用した 2 次元電気泳動で、一度に 1000 ヶ所程度の制限酵素部位のメチル化状態を調べることができる

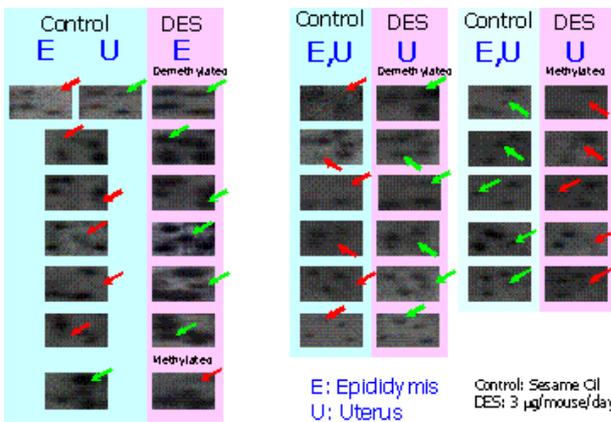


図 7. DES 投与で引き起こされるメチル化変化

RLGS 法で変化が見られた精巣上体 (E) と子宮 (U) のスポットを示した。左上の例では精巣上体の DNA メチル化状態が子宮様に変化している。

#### ④ビスフェノール A の脂肪細胞への影響

BPA は弱いエストロゲン作用を有しているが、胎盤を通して胎仔に移行することがマウスやニホンザルを用いた研究で分かった (Uchida *et al.*, 2002)。次に、脂肪細胞 3T3-F442A をターゲットとしての影響について検討を行った。BPA は濃度依存的に脂肪細胞の糖 (実験では 2-deoxy-glucose (2-DG) を使用) の取り込み能を上昇させることが明らかとなり (図 8)、このときインスリン反応性の糖輸送担体である GLUT4 タンパク質量が増加していた (図 9)。糖取り込み亢進に関する BPA の作用が ER を介しているかどうかを確かめるため、ER の阻害剤である ICI182,780 を脂肪細胞に作用させたところ、ICI182,780 は BPA による糖の取り込み能の亢進 (図 10) にも GLUT4 タンパ

ク質の増加 (図 11) にも影響を与えなかったため、ER を介していない作用であると考えられた (Adachi *et al.*, 2003b; Sakurai *et al.*, 2004)。今後、どのような経路を介して BPA が作用しているのか明らかにする必要がある。

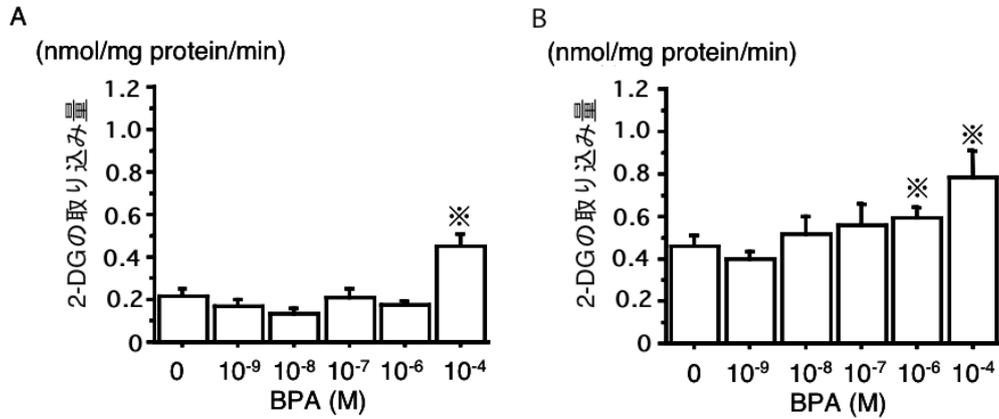


図 8. BPA による 2-deoxy-glucose の取り込み量の変化

脂肪細胞 3T3-F442A に BPA ( $10^{-9}$ ~ $10^{-4}$  M) を 24 時間作用させた後に、2-deoxy-glucose (2-DG) uptake アッセイを行った。すべての濃度の BPA で、処理した細胞の分化の状態に違いはなかった。A: インスリン非刺激時における変化、B: インスリン (100 nM) 刺激時における変化。2-DG の取り込みは BPA を添加していない細胞における取り込み (control) のパーセントで示した。 ( $p < 0.05$  vs. control)

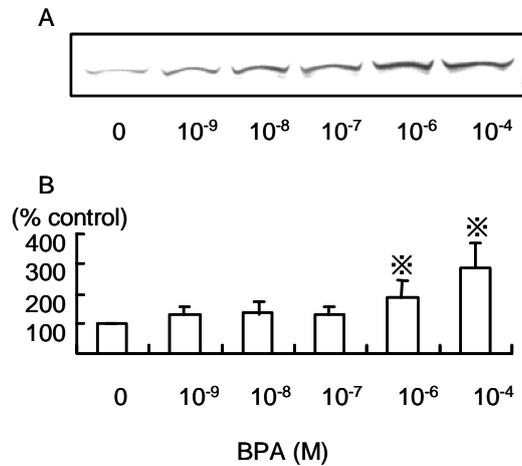


図 9. BPA 処理に伴う GLUT4 タンパク発現量の変化

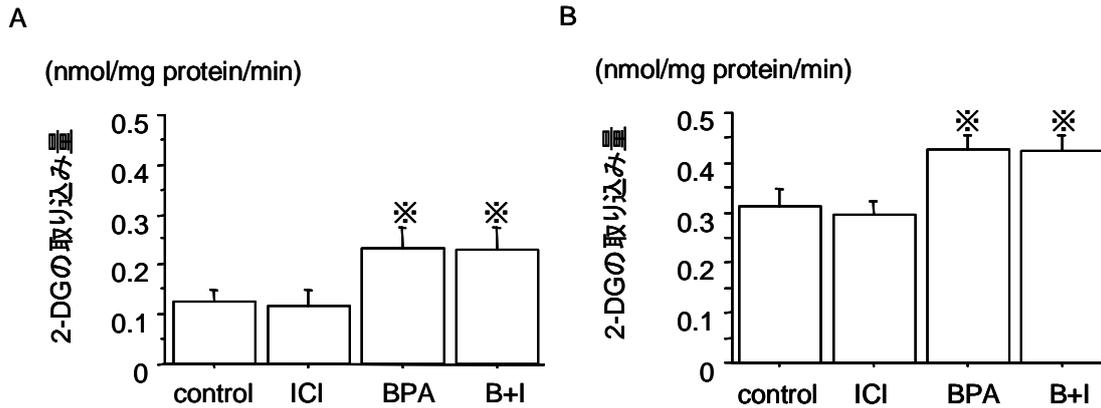


図 10. エストロゲンレセプター阻害剤による影響

A: インスリン非刺激時における変化、B: インスリン(100 nM)刺激時における変化。

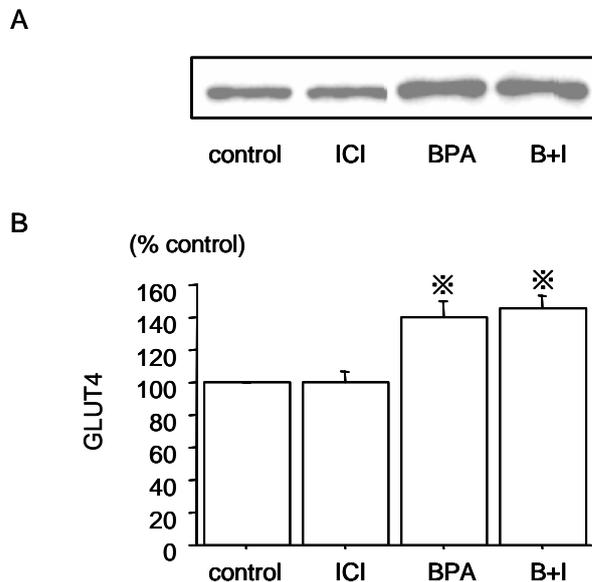


図 11. BPA 処理による GLUT4 タンパク質量増加に対する ICI182,780 の影響

A: ウェスタンブロット、B: BPA/ICI の転化に対する GLUT4 タンパク質量の対照群に対する相対量。

### ⑤ヒト臍帯の化学物質曝露と遺伝子発現変化のトキシコゲノミクス解析

内分泌攪乱物質はヒトにも影響し、精子を減少させるなどの調査報告があるが、精子数を計数する方法は技術的な困難があるので、ヒト精巣重量調査を行った。組織学的検討から精巣重量は精子形成能と相関があることが分かり、1985 年以降生まれでは身長・体重は増加しているが精巣重量は低下する傾向が認められた (Mori *et al.*, 2002)。

インフォームドコンセントを得て採取した臍帯を用いた調査から、ヒトは胎児のときからすでに多くの化学物質に曝露されていることが分かった (Todaka & Mori, 2002)。ヒトの化学物質曝露の影響を評価するには、実際の曝露量と生体影響を比較検討する必要があるが、本研究では生体影響を遺伝子発現の変化として捕らえ、曝露調査とトキシコゲノミクス解析を組み合わせるリスク評価法の開発を進めた (Mori *et al.*, 2003)。9 例の臍帯 (A~I) の化学物質含量と (表 4、図 12)、その同じ臍帯での網羅的な遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いて解析 (図 13) し、化学物質含量と遺伝子発現との関連性を検討した (図 14、図 15)。その結果、化学物質含量の高いグループ (E, H など) と低いグループ (B, C など) で遺伝子発現プロファイルが異なることが示唆された。しかし、臍帯 D は化学物質に最も低曝露であるにもかかわらず、遺伝子発現パターンは主成分解析 (図 14) やクラスターリング解析 (図 15) で高曝露群にグルー

ピングされることから、臍帯 D は、他の要因も考えられるが、化学物質に対し高感受性である可能性が示唆された。ヒト体内には残留性化学物質が蓄積することが分かったが、これらを体内から除く方法を確立する必要がある。そこでモルモットを用いてそのモデル系を確立した (Sakurai *et al.*, 2002)。

	Umbilical Cords								
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Di-PCBs	1.0	0.08	1.1	3.4	1.9	1.8	5.4	2.3	2.5
Tri-PCBs	4.2	1.1	0.94	2.9	3.8	1.8	3.5	5.5	4.7
Tetra-PCBs	9.5	0.1	0.3	0.93	19.0	2.8	5.3	16.0	13.0
Penta-PCBs	14.0	0.1	0.2	0.2	19.0	0.2	0.3	25.0	19.0
Hexa-PCBs	28.0	13.0	14.0	3.6	72.0	18.0	22.0	53.0	26.0
Hepta-PCBs	14.0	11.0	13.0	6.3	33.0	14.0	14.0	20.0	11.0
Oct-PCBs	2.9	3.0	4.4	2.3	6.5	3.8	3.1	4.1	2.3
HCB	25.0	17.0	15.0	9.0	42.0	23.0	24.0	27.0	20.0
HCH	16.0	18.0	17.0	15.0	78.0	26.0	32.0	21.0	10.0
cis-Chlordane	0.32	0.48	0.8	0.09	0.43	0.73	0.75	0.54	0.59
trans-Chlordane	0.59	1.3	1.3	0.17	1.0	1.0	1.2	0.67	0.95
trans-Nonachlor	8.0	3.4	5.9	0.14	11.0	4.2	7.4	7.6	7.7
p,p'-DDT	3.1	1.5	0.46	2.0	11.0	3.4	2.3	11.0	3.7
p,p'-DDE	28.0	28.0	67.0	16.0	180.0	47.0	59.0	140.0	56.0
Dieldrin	7.0	2.8	4.1	2.6	12.0	3.1	4.4	3.9	4.3
Heptachlor-epoxide	2.4	1.2	1.3	0.1	3.3	1.1	2.6	1.3	1.3

表 4. 臍帯から検出された化学物質の濃度

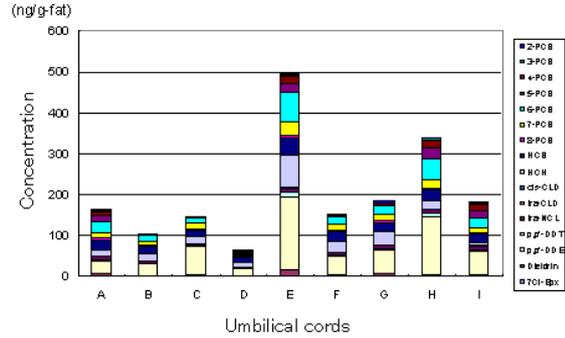


図 12. 化学物質曝露状況

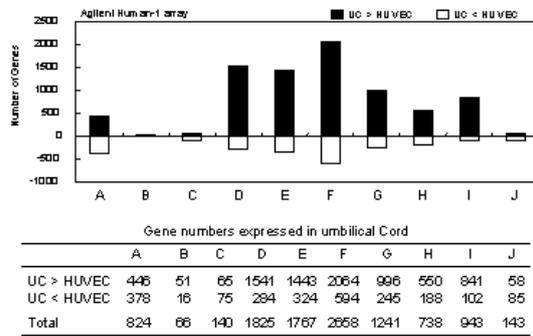


図 13. マイクロアレイを用いた臍帯での遺伝子発現

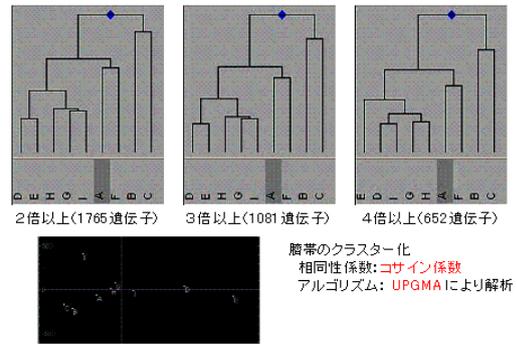


図 14. 臍帯遺伝子発現パターンのクラスター化と第一主成分上の 3 つの樹形図は、臍帯遺伝子発現が HUVEC に比して 2 倍、3 倍、4 倍以上であるものを対象にクラスター解析したときのそれぞれの図。下は、第一主成分への臍帯での遺伝子発現の順位の投影。

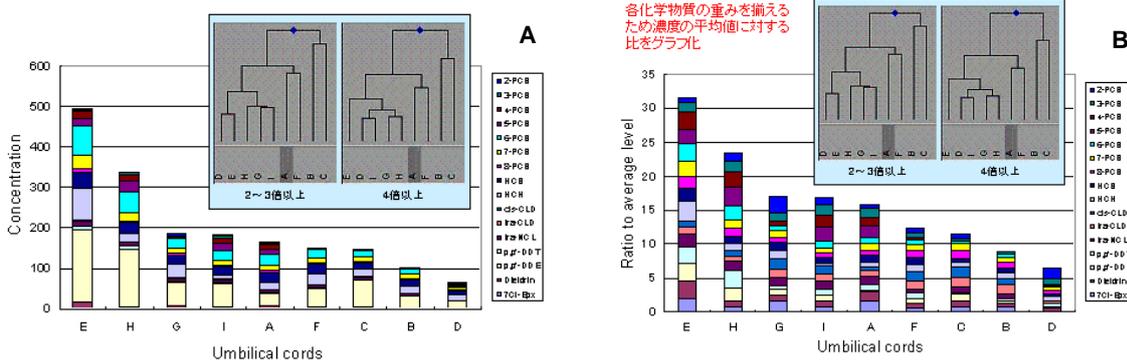


図 15. 化学物質濃度と臍帯遺伝子発現パターンのクラスター解析

化学物質曝露状況と遺伝子発現のクラスター解析と比較。A: 図 12 の濃度をそのまま濃度の高い順に並べて比較。B: 化学物質の曝露を単純な合計でなく、各化学物質の濃度の平均値に対する比の合計と臍帯遺伝子発現パターンのクラスター解析を比較

## (2) 研究成果の今後期待される効果

化学物質を新生仔期に曝露すると成長後も雄性生殖器で多くの遺伝子の発現変化していることがマイクロアレイによる網羅的解析で明らかとなったが、検出された遺伝

子の多くがESTであり遺伝子の機能は依然不明である。これらの遺伝子は新生仔へのDESあるいはE<sub>2</sub>投与による精巣上体機能の低下に関与している可能性があるため、今後、機能との関連に的を絞った解析を進める必要がある。これら遺伝子についてさらに研究を進めれば化学物質曝露の指標に発展する可能性がある。また、化学物質は遺伝子発現だけでなくDNAのメチル化状態（エピジェネティック）にも影響を及ぼし、これが長期影響や晩発影響の原因となっている可能性が示唆された。化学物質によりメチル化が変化しやすい遺伝子やその時期を特定することで、化学物質のリスク評価に応用することが可能となる。植物エストロゲンが雄性生殖器に影響することが明らかになったが、新生児期に豆乳等をサプリメントとして摂取させることは、その量などに十分な注意を払って行う必要がある。

BPA はいまだ通常の生活でも摂取しうる化学物質であるが、これが脂肪細胞の糖代謝に影響を及ぼし、生活習慣病にも関与している可能性が示唆された。近年、生活習慣病が増加しているが、化学物質曝露量を削減することで生活習慣病の発症を予防することが可能となるかもしれない。

臍帯を用いた研究から、ヒトは母体内ですでに化学物質に曝露されていることが明らかとなった。近年、幼児のアレルギー・行動異常などが問題となっており、化学物質曝露との関連も示唆されているが、その関連を明確にする必要がある。特に、臍帯の遺伝発現解析から高感受性群の存在が示唆されたので、高感受性群・高感受期に的を絞った対策を講ずる必要性が明確になった。

## センチュウ (*C. elegans*) を用いた環境化学物質応答遺伝子の解析：有菌幸司（熊本県立大学）

### (1) 研究内容及び研究成果

土壌自活センチュウ (*C. elegans*) は、コンパクトな体と短い生活史を持ち、飼育や実験操作が簡便で、すでに解読された全ゲノム配列より、ヒトの遺伝子と高い相同性があることが示されていることより、ヒトの遺伝病原因遺伝子やガン遺伝子などの機能や作用機構解明のためのモデル生物として注目されている。

センチュウを用いた生体影響評価試験法の確立及び、環境化学物質がセンチュウの致死、成長・成熟、繁殖に与える影響を明らかにした。また、その影響濃度をもとに独自チップを用いた DNA マイクロアレイを行い、遺伝子レベルでの影響評価を行った。その一方で、化学物質の作用機構解明を目的とし、BPA に対する感受性の異なる変異型センチュウを単離し、その遺伝的変異部位の同定を行い、今後の内分泌かく乱物質研究への応用を図った。

#### ①環境化学物質がセンチュウの成長や繁殖に与える影響

無脊椎動物に対する化学物質の生体影響評価を行うために、ミジンコ (Tatarazako *et al.*, 2002) やアミ (Hirano *et al.*, 2004) に加え、センチュウの標準化した致死影響試験法、成長・成熟影響試験法、繁殖影響試験法が必要と考え、下記のような試験法を確立した (Ura *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2003)。

試験用幼虫の調整：野生型センチュウを大量に培養し受精卵を採集した後、NGM プレート上で L1 幼虫まで同調培養を行った。致死影響試験：L1 幼虫を洗浄・回収し、あらかじめ各濃度の化学物質を含む試験溶液に幼虫を入れ、24 穴培養プレートに各穴 10 匹となるよう幼虫を分注した。無給餌条件下で曝露試験を行い、24 時間後の生存率を算出した。

成長・成熟影響試験：24 穴培養プレートを用い、各濃度の化学物質を含む試験液に L1 幼虫を各穴 10 匹となるよう分注し、餌を含む条件で約 60 時間曝露試験を行った。

曝露終了後に体長を測定すると共に、受精卵を有する個体の割合を算出した。

繁殖影響試験：24 穴培養プレートを用い、各濃度の化学物質を含む試験溶液に各穴 1 匹のセンチウを分注し、産卵開始から生涯産仔数を数えた。

確立した試験法を用いて、E2、BPA、NP、ベンゾピレン、ベンゾフェノン、4-メチル-2,4-ビス(4-ヒドロキシフェニル)ペンタ-1-エン(MBP)、スチレンモノマー、スチレンダイマー、スチレントリマー、アルジカーブ、ポナステロン A、 $\alpha$ -エクジソン、 $\beta$ -エクジソンの計 13 種類の化学物質を対象とした生体影響評価試験を行った。その結果、成長、成熟あるいは産仔数に影響が認められたのは、E2、ベンゾフェノン、アルジカーブ、NP、ベンゾピレン、MBP であった。これら 6 種類のうち、ベンゾピレンおよび NP は成長、成熟さらには産仔数の減少を誘起した(表 1)。

### 生体影響評価試験結果

表 1. 環境化学物質がセンチウの致死、成長・成熟、繁殖に与える影響

試験物質	致死影響 (LC <sub>50</sub> )	成長影響 (LOEC)	成熟影響 (LOEC)	繁殖影響 (LOEC)
17 $\beta$ -Estradiol	>340.5mg/L	6.8mg/L	6.8mg/L	>54.5mg/L
Bisphenol A	324.7mg/L	>114.1mg/L	>114.1mg/L	>114.1mg/L
4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene	78.2mg/L	67.1mg/L	33.5mg/L	67.1mg/L
Nonylphenol	7.2mg/L	11.0mg/L	5.5mg/L	88.1mg/L
Benzo(a)pyrene	50.5 $\mu$ g/L	25.2 $\mu$ g/L	50.5 $\mu$ g/L	50.5 $\mu$ g/L
Benzophenone	56.8mg/L	9.1mg/L	4.6mg/L	>18.2mg/L
Aldicarb	>475.7mg/L	4.8mg/L	38.1mg/L	>38.1mg/L
Styrene monomer	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L
trans-1,2-Diphenylcyclobutane	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L
2,4,6-Triphenyl-1-hexene	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L
-Ecdysone	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L
-Ecdysone	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L	>20.0mg/L
Ponasterone A	>10.0mg/L	>10.0mg/L	>10.0mg/L	>10.0mg/L
Cadmium chloride	277.2mg/L	0.6mg/L	0.6mg/L	0.6mg/L
Sodium arsenate dibasic heptahydrate	>3120.0mg/L	48.8mg/L	24.4mg/L	780.1mg/L
Sodium arsenite	154.9mg/L	16.2mg/L	8.1mg/L	129.9mg/L

E2 およびベンゾフェノン曝露では幼虫は死に至らないものの、成長ならびに成熟に抑制が認められたが、産仔数の減少は観察されなかった。アルジカーブは E2、ベンゾフェノン同様に致死作用は低く、産仔数に影響を及ぼさなかった。BPA の代謝物である MBP は、BPA では影響の認められなかった濃度で、成長の抑制、成熟の遅延、ならびに産仔数の減少が認められ、MBP は BPA よりもセンチウに対して高い毒性を有することが明らかになった。一方、他の化学物質(BPA、スチレンモノマー、スチレンダイマー、スチレントリマー、ポナステロン A、 $\alpha$ -エクジソン、 $\beta$ -エクジソン)は、センチウの成長・成熟、産仔数に影響を及ぼさなかった。さらに、これらの結果をもとに、環境化学物質によるセンチウの致死作用、成長・成熟への影響、繁殖への影響を指標とする環境化学物質のクラスタリングが可能となった(Matsuno *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2004)。

### ②金属類がセンチウの成長や繁殖に与える影響

環境中に残留し、ヒトや野生生物への影響が懸念される化学物質として挙げられる塩化アルミニウム、塩化ニッケル、塩化銅、酸化クロム、酢酸鉛、塩化カドミウム、亜ヒ酸ナトリウム、ヒ酸 2 ナトリウムの計 8 種類の金属類を対象とした生体影響評価試験を行った。その結果、すべての金属について、致死、成長・成熟あるいは繁殖への影響が確認された。塩化カドミウムや塩化銅は高い致死毒性を有し、低濃度で成長・成熟の遅延、産仔数の減少を示した。一方、塩化アルミニウムや塩化ニッケルは他の金属に比べて致死毒性が低いにもかかわらず、きわめて低濃度で成長・成熟の遅延を示した。これらのことより、金属類がセンチウに及ぼす影響は、各種金属により作用濃度および作用点が異なることが明らかとなった(Morita *et al.*, in preparation)。

### ③センチュウにおけるチトクローム P450 遺伝子群の生理的機能の解析

チトクローム P450 (CYP) 遺伝子群は、生物種を超えて広く分布し、ステロイドホルモンの生合成や薬物・異物の代謝などに関わるヘムタンパク質である。土壌自活センチュウ *C. elegans* には、約 80 種の CYP 遺伝子群が存在していることが知られているが、その生理的機能は不明なものが多い。そこで、本研究では、DNA マイクロアレイを用いて、哺乳類における CYP の誘導剤曝露により発現変動を受ける遺伝子群の解析を試み、センチュウ CYP 遺伝子群の生理的機能を明らかにすることを目的とした。その結果、哺乳類において CYP 1A の誘導剤とされている 3-メチルコラントレン曝露によりセンチュウ CYP 35A、CYP 35B、CYP 35C の発現誘導が認められた (表 2)。これらの遺伝子群は、 $\beta$ -ナフトフラボンや PCB 52 などの CYP 1A 誘導剤により発現誘導するという報告もなされている。このことから、センチュウの CYP 35 遺伝子群は哺乳類における CYP 1A の生理的機能を有する可能性が高いことが示唆された (Koga *et al.*, in preparation)。

表 2. 各種化学物質曝露による発現変動遺伝子

name	Ratio				
	E2	BPA	MBP	NP	BZP
CYP13A1	1.19	1.47	2.13	2.44	1.29
CYP13A4	0.83	1.90	2.69	3.96	0.76
CYP13A5	0.97	2.36	2.94	4.64	0.76
CYP13A6	0.84	2.65	2.24	1.97	0.68
CYP13A7	0.87	1.94	2.73	2.85	0.99
CYP13A8	0.92	1.96	3.18	1.49	0.94
CYP13A10	0.91	1.31	1.68	3.67	0.97
CYP13A11	1.31	4.32	5.01	4.84	0.89
CYP13A12	1.22	4.25	5.58	4.99	1.52
CYP13B2	1.27	1.35	2.13	1.70	0.97
CYP14A1	1.14	0.98	0.93	3.57	1.78
CYP14A2	0.91	0.70	0.55	6.14	1.74
CYP14A3	1.11	1.09	0.90	8.61	2.15
CYP14A5	0.89	0.81	0.71	2.10	1.28
CYP25A2	0.94	0.63	0.57	0.99	2.08
CYP29A3	1.26	0.92	0.42	1.26	1.28
CYP29A4	0.83	0.67	0.48	1.11	0.92

17 $\beta$ -Estradiol (E2), Bisphenol A (BPA), 4-Methyl-2,4-bis(4-hydroxyphenyl)pent-1-ene (MBP), Nonylphenol (NP), Benzophenone (BZP)

### ④カスタムチップを用いた環境化学物質の生体影響評価

環境化学物質の遺伝子レベルでのより厳密な生体影響評価試験法の確立を目的として、コレステロールや薬物の代謝およびトランスポーターに関わる遺伝子群をスポットしたカスタムチップを作製した。このカスタムチップを用いて、E2 および脊椎動物において内分泌かく乱作用を持つと疑われている NP、ベンゾフェノン、アルジカーブ、BPA、BPA の代謝物である MBP を対象とした DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、アルジカーブにおいては発現変動が認められなかったものの、その他の 5 種の化学物質においては、発現変動が認められた。CYP 35C の発現誘導は、5 種の化学物質に共通して認められた。一方、CYP 14A および CYP 34A の発現誘導は、NP やベンゾフェノンに特異的であった。また、MBP 曝露により CYP13B の発現誘導および CYP29A の発現抑制が認められ、MBP に対し、特異的であることが明らかになった。このように、発現変動する遺伝子群の種類および数は、各種化学物質に特異的であり、本カスタムチップを用いた DNA マイクロアレイ法は化学物質の影響を評価する有用な手法となり得ることが示唆された。また、センチュウに対する作用機構は、各種化学物質によって異なることが示唆された (Koga *et al.*, in preparation)。

### ⑤センチュウ変異体を用いた作用機構解明

化学物質の生体作用機構解明を目的とし、化学物質に対する感受性の異なる変異体を選抜し、その遺伝的変異部位の同定を行った。ベンゾピレンを曝露した際に、野生型とは異なる体型 (Sma 様体型：体長が短い) を表現型として示すセンチュウが見ら

れた。そこで、この変異体と野生型雄個体を用いた戻し交配を行い、余分な遺伝子変異部位を取り除くと共に、遺伝的ホモ接合変異体を作成した。変異体および野生型センチウに BPA を曝露し、24 時間後の生存率および最終成虫到達率を調べた結果、変異体は野生型に比べて、BPA に対して高い感受性を有していることがわかった。また、変異体および野生型の異なる発生ステージにおける BPA 感受性の変化を調べたところ、野生型ではどの発生ステージから曝露を行っても、死に至らず全個体が成虫に到達したにもかかわらず、変異体では、発生ステージが進むにつれ生存率、成虫到達率が高くなったが、明らかに野生型に比べ BPA に対し高い致死性を示した。次に、BPA の関連化合物であるビスフェノール B および MBP を用いて致死影響試験を行った結果、変異体は今回試験を行った BPA 関連化合物に対して、高感受性型であることがわかった。さらに、BPA の作用機構解明の端緒として、変異体において snip-SNPs 法による遺伝的マッピングを行ったところ、変異体は第 4 染色体上に変異箇所が存在することが明らかとなった。これらの結果より、変異体は、ゲノム上に変異が起きたことにより、発生に伴う遺伝子発現が異常となり、BPA に高い感受性を示している可能性が考えられた (Nomura *et al.*, 2004; Nakamoto *et al.*, in preparation)。

#### ⑥環境化学物質の多世代影響評価

環境中に存在している化学物質の中には、脊椎動物の内分泌系に作用し、正常な発生や発達に影響を与えるものが知られている。さらに、これら化学物質の中には、残留性が高い物質や、長期にわたり極微量で連続的に体内に摂取されている可能性が高い物質も含まれており、次世代に影響を及ぼす可能性が指摘されている。そこで、長期間にわたり連続的に環境化学物質に曝露されたときの生体影響を検討するために、センチウを用いた多世代影響試験法の確立を目指した。

NP が多世代にわたり曝露された場合、センチウの繁殖に与える影響について検討したところ、世代を経るにつれ、その影響が低濃度に移行することが明らかとなり、環境化学物質の影響評価には、多世代にわたる曝露影響を考慮する必要があることが示唆された (図 1) (Kohra *et al.*, 2002; Tominaga *et al.*, 2003)。

#### (2)研究成果から期待される効果

センチウは、コンパクトな体と短い生活史を備えた多細胞生物で、固体あるいは液体培地中で大量飼育が可能であり、飼育に大掛かりな設備を必要としない。本研究で報告した致死、成長・成熟、繁殖および多世代影響を指標とした生体影響評価試験法は、これらセンチウの生物的特性を最大限に利用した手法であり、低コストで短期間に高感度で再現性の高い化学物質の生体影響評価が可能である。さらに、致死、成長、成熟、繁殖影響を指標とすると、化学物質の生体影響を 6 種のカテゴリーに分類できた。そのカテゴリーをもとに、様々な化学物質の生体影響評価が可能となることが期待される。

センチウでは全ゲノム配列が既に決定され、遺伝子の約 40% がヒトと相同であることから、遺伝子破壊や発現解析などの手法を組み合わせるとヒトの遺伝病原因遺伝子

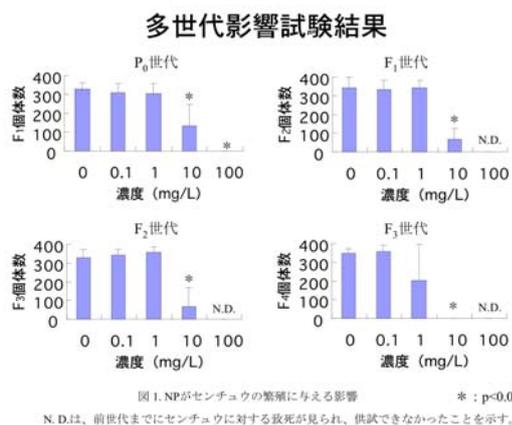


図 1. NP がセンチウの繁殖に与える影響 \* : p<0.05  
N.D. は、前世代までにセンチウに対する致死が見られ、供試できなかったことを示す。

やガン遺伝子などの機能や作用機構を解明するためのモデル生物としても注目されている。現在、これらセンチュウの遺伝子、タンパク、細胞、遺伝変異体情報において他に類を見ないデータベースが構築され、常に更新されている。本研究で報告したアレイ法は、一度に多くの遺伝子の発現変動を検索できる有用な手法であり、今回作製したステロイド代謝や薬物の代謝に関わる遺伝子群をスポットしたカスタムチップを用いたアレイ解析により、環境化学物質の遺伝子レベルでの影響評価が可能となった。このことは、代謝変動を詳細に確認できるだけでなく、より正確な代謝過程の理解に繋がると考えられる。さらに、化学物質の遺伝子レベルでの分化・発生などへの生物影響を経時等多角的に解析できるようになり、影響に伴った新たな遺伝子間の相互作用や代謝変動等の従来知られていなかったメカニズムの解明が行えると考えられる。以上のように、本研究により得られた結果は、化学物質に曝露された場合のヒトや他の野生生物の分化・発生などへの影響を類推できるだけでなく、新たな作用機構・代謝経路を解明するための有効なツールになる可能性が十分ある。

薬物および化学物質の作用や分化・発生などへの生物影響評価は、*in silico* や培養細胞等の *in vitro* では十分な評価ができず、*in vivo* で行う必要性が高い。しかしながら、高等な生物を大量に使用することは許されないことから、一次スクリーニングの役割が重要になっている。生物学的性質が明らかになって、ヒトや他の動物との相同性・類似性が明確になっているセンチュウをモデルに一次スクリーニングすることは、*in vitro* 試験等では得られない多くの情報が得られ、より信頼性の高いスクリーニングが行える可能性が高い。特に本研究により示された評価系を用いることで、より実効性の高いスクリーニング系が構築できると考えられる。

## ***In vitro* における実験動物用飼料のエストロゲン活性の評価: 加藤英男・太田康彦 (山口大学連合大学院・博士課程、鳥取大学)**

### (1) 研究内容及び研究成果

実験動物の飼料の原料である大豆や牧草は、ゲニステイン、ダイゼインやクメステロールを含み、これら植物性エストロゲンは *in vitro*、*in vivo* ともにエストロゲン活性を示すことが知られている。また、原料中に含まれる含量が季節や産地により変動することが知られている。このことから、飼料の有するエストロゲン活性(E 活性)の観点から、同一組成の飼料でのロット差やクローズドフォーミュラ間での差異が実験結果に及ぼす影響が危惧されている。ホルモン作用の検出が期待される内分泌かく乱化学物質の評価実験の中で特に低用量問題を扱う実験では、含有 E 活性の影響は無視され得ないと考えられる。しかしながら、餌の E 活性を評価した報告はほとんどみられない。そのため、(a)各種飼料の E 活性の測定、(b)E 活性を有する原料の特定、(c)原料が寄与する E 活性の割合の算出、(d)同一組成の飼料でみられる E 活性のロット間変動の検討、(e)原料の E 活性の変動(1年間)の検討を行った。E 活性の測定は、E 活性を有する物質を検出することを目的に開発されたヒト  $ER\alpha$ 組替え酵母を用いた。なお、(b)~(d)はマウスおよびラット用飼料に関して検討した。

(a)22種類の飼料中、21種類に E 活性が検出され、E 活性のみられなかったものは大豆およびアルファルファを含まない NIH-07 (PLD) であった。げっ歯類飼料では、E 活性はウサギおよびモルモット(E2 換算量として約 0.5  $\mu\text{g/g}$ )で高く、マウスおよびラット(約 0.06  $\mu\text{g/g}$ )では低かった。しかし、ラットがこの餌を摂取した場合、BPA に換算すれば約 2  $\text{mg/kg/day}$  の投与量となる。(b)E 活性の認められた原料は、アルファルファ、大豆、脱脂粉乳、魚粉であった。(c)餌の E 活性に寄与する原料の割合では、アルファルファが約 80%であり、残りのほとんどは大豆であった。脱脂粉乳および魚粉はほとんど寄与していなかった。(d)ロット間差は比較的小さかった(0.059~0.085

μg/g)。 (e)E 活性は年間を通じて魚粉 (n.d.~0.012 μg/g) および脱脂粉乳 (n.d.~0.009 μg/g) は低度、大豆では中等度 (0.032~0.112 μg/g)、アルファルファでは高度 (0.395~1.729 μg/g) であった。大豆およびアルファルファでは、E 活性は約 4 倍変動した (Kato *et al.*, 2004)。

## (2)研究成果から期待される効果

以上の如く、実験動物用の飼料のほとんどは E 活性を有し、その活性は原料である大豆およびアルファルファに由来していることが示された。飼料の E 活性は変動すること、飼料の有する E 活性は内分泌かく乱物質に換算すれば相当量 (BPA では 2 mg/kg/day) になる可能性があることから、低用量実験の実施および施設間差の評価には、飼料は重要な因子となるであろう。

## 3. 2. 神経系解析グループ

### 哺乳類の神経栄養細胞 (グリア細胞) の分化に及ぼす内分泌かく乱物質の影響とその作用機序の解明: 阿相皓晃 (東京都老人総合研究所)

#### (1) 研究内容及び研究成果

内分泌かく乱物質が中枢神経系の初期発生とその後の脳の形態形成にどのような影響を与えるかについての報告は少なく、特にグリア細胞の発生・分化とグリア機能異常を引き起こすメカニズムの解明についてはほとんどなされていない。このような背景の中で内分泌かく乱物質が哺乳類のグリア細胞の発生・分化に及ぼす影響とその作用メカニズムを明らかにすることが本研究のねらいである。

哺乳類では BPA は短時間に胎盤を通して脳へと移行することから、BPA の胎生期の曝露によってグリア前駆細胞がどのような影響を受けるか調べるための目的材料として、神経幹細胞から分化し前駆細胞を経てミエリン形成を担当する細胞へと成長するグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトに着目した。オリゴデンドロサイトは中枢神経系において髄鞘 (ミエリン) を形成する細胞で前述のように神経幹細胞からオリゴデンドロサイト前駆細胞 (OPC) を経て分化誘導される。ミエリンは OPC から分化したオリゴデンドロサイトの形質膜が渦状に軸索に巻かれることで始まり、最初は粗であるが、成熟とともに強固に圧密化 (コンパクション) され豊富な脂質に富んだ「絶縁体」として脳内情報伝達の高速回路網の機能を担っている。このため、ミエリン形成不全は重度の精神・神経障害を呈するようになる。このような機能を持つオリゴデンドロサイトの初期発生と分化・成熟過程に BPA がどのような影響を及ぼすかに

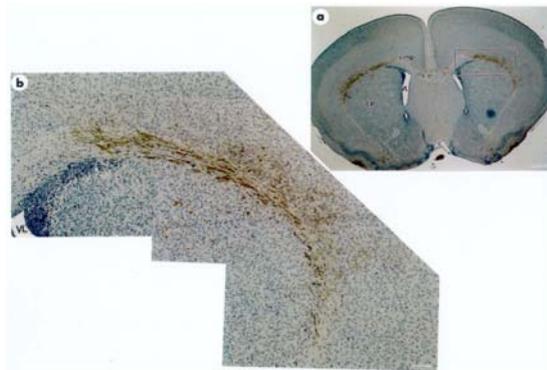


図1 正常対照群 (a) マウス脳 (10日目) の抗MBP抗体による免疫組織化学像。CC: 脳梁, VL: 側脳室

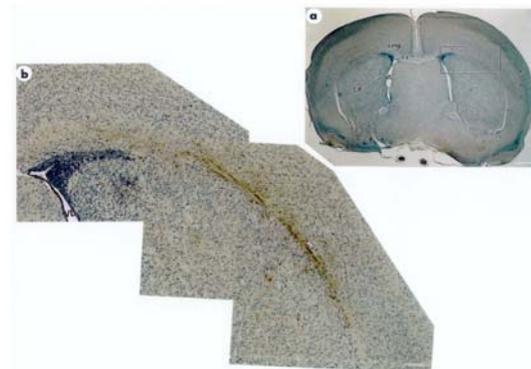


図2 BPA投与群 (b) 母体 (妊娠17日目) にBPA (1mg/ml) を投与したマウス脳の抗MBP抗体による免疫組織化学像

ついてマウスの脳でグリア前駆細胞の出現が最大となる胎生期 17 日目の母親に高濃度 BPA (1.0 mg/ml) を投与し生後 10 日目で脳組織切片を作製して、ミエリンマーカートンパクに対する抗体 (ミエリン関連糖タンパク : MAG、ミエリン塩基性タンパク : MBP) を用いた免疫組織化学的方法を用いてセサミオイルのみを投与したコントロール群と比較検討したところ、BPA 投与群ではオリゴデンドロサイト活性とミエリン形成能が著しく低下していた (図 1、2)。さらに BPA の OPC とミエリン形成担当細胞に及ぼす発生・分化・機能異常のメカニズムを直接解明するため、胎児脳 (E17) より新しく確立した OPC の採取方法を用いて OPC を培養した系に BPA を添加して内分泌かく乱物質のターゲット分子と考えられているホルモンレセプターの発現を調べたところ、BPA は甲状腺ホルモン受容体 (TR) の発現を抑制して OPC からミエリン形成担当細胞へと分化するのを阻害するためにその後のミエリン形成不全におちいることが明らかになった (Seiwa *et al.*, 2004)。

前述のようにミエリン形成不全 (脱髄) は重篤な脳機能障害におちいるだけでなく人としての自立と尊厳を保つのに必要とされる QOL をも著しく低下させるのが特徴で、現在のところ病因も有力な治療法もみつかっていない。したがって、BPA によるミエリン形成不全のメカニズムが解明されれば今後広く脱髄疾患の解明および治療法・予防法の確立へのつながりを得ることができるようになり、社会的貢献度も大きいと考えられる。

BPA が神経系の初期発生に与える影響、特に哺乳類中枢神経系のグリア細胞の発生・分化における及ぼす影響とグリア細胞機能異常のメカニズムの解明を行った。妊娠 17 日齢マウスに高濃度の BPA (1 mg/ml sesame oil) あるいは低濃度 BPA (0.01 mg/ml sesame oil) を投与後、生後 10 日目、50 日目で脳組織切片を作製して神経細胞・グリア細胞の発生・分化・成熟に及ぼす影響を、グリア細胞の特異的なマーカートンパク (ミエリン関連糖タンパク : MAG、ミエリン塩基性タンパク : MBP) に対する抗体を用いた免疫組織化学的な染色法および神経細胞を染色するニッスル染色法によって解析した。(図 3)。

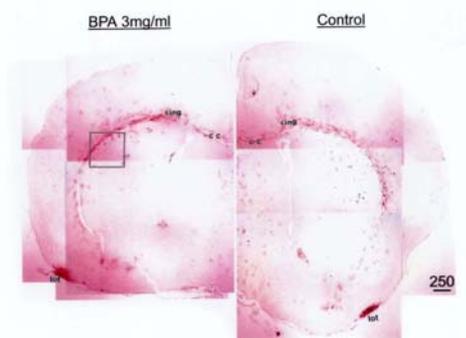


図 1 抗MAG抗体による免疫組織化学像

その結果、高濃度の BPA 投与群の 10 日目でオリゴデンドロサイト活性およびミエリン形成能が著しく低下していた。また、大脳皮質の菲薄化が認められたが神経細胞には異常が認められなかった。しかし大脳皮質は生後 50 日目でコントロール群と同じレベルまで回復していた。一方、BPA 低用量投与群では脳実質の大きさに変化が認められず、MAG 陽性の未分化オリゴデンドロサイトの蓄積が認められた他に、ミエリン形成が活発化していた。

これらの結果から、BPA が中枢神経系では神経細胞よりむしろグリア細胞、とりわけ中枢神経系のミエリン形成担当細胞であるオリゴデンドロサイトの発生・分化に大きな影響を与えていることが示唆された。

BPA が中枢神経系の発生と分化過程で最も大きな影響を与えるのがミエリン担当細胞とミエリン形成であることが前述の結果から明らかになったが、ミエリンを形成する細胞は神経幹細胞から派生した OPC が分化・成熟してその形質膜を軸索に巻きつけることから、BPA の作用機序を解明するためには OPC の分化機構を解き明かすことが最も重要であると考え、胎児脳 (E17) より OPC を採取する方法を考案しその方法を確

立した (Seiwa *et al.*, 2002)。最初に *In vitro* の系で OPC の分化に伴い、BPA のターゲット分子と考えられる ER や TR の発現をイムノブロット法で検討した。その結果、TR は発現が認められたが、ER は分化した OPC (ミエリン形成担当細胞) でその発現が顕著であった (図 4)。

BPA が OPC の分化メカニズムにどのようなメカニズムで作用しているかを明らかにするために、OPC に BPA と  $T_3$  の組み合わせを添加してターゲット受容体の発現と分化マーカーとしてのオリゴデンドロサイトの転写因子 (Id2、Id4) の発現を調べた。最近の報告によれば BPA は TR に対し弱いリガンドであるといわれているが、BPA の分化誘導について BPA は TR の発現を阻害し、OPC からミエリン形成担当細胞への分化を抑制していることが明らかになった (Seiwa *et al.*, 2004)。

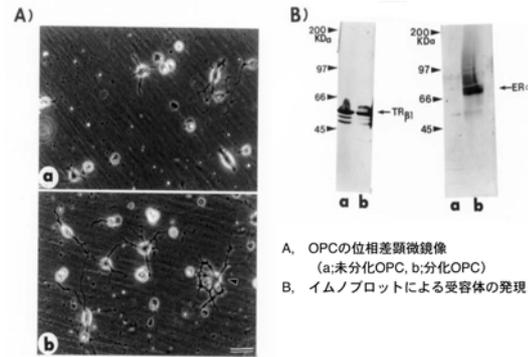


図 2 OPC の分化とホルモン受容体の発現

今回明らかになった BPA が OPC の分化を阻害してその後のミエリン形成を抑制する分子カスケードとして  $T_3$ -TR-MBP の系が考案されたが、この TR は転写共役活性因子 (コアクチベーター) であることが明らかになっている。私達はさらに OPC/オリゴデンドロサイトでリガンド ( $T_3$ /BPA) 未結合時に発現しているコリプレッサーを同定することに成功した。RT-PCR 法によればこのコリプレッサーは  $T_3$  添加時に発現が低下し、BPA 添加時ではその発現が維持しており、その時にエクソン 2 を含んだ MBP の発現の増加が認められた。エクソン 2 を含んだ MBP はミエリン形成に必須のタンパクであり、今後は標的遺伝子 MBP の発現・調節に影響を与える新たなコリプレッサーの機能解析を進めてゆく予定である。

## (2) 研究成果から期待される効果

胎生期に BPA (1mg/ml) を投与された子供の脳では著しいミエリン形成不全 (脱髄) が起こることが判明し、そのメカニズムとして BPA がグリア (オリゴデンドロサイト) 前駆細胞からミエリン形成担当細胞へ分化するのを阻害するために脱髄が生じることが本研究のなかで解明された (Seiwa *et al.*, 2004)。脱髄疾患は重篤な脳機能障害をもたらすだけでなく、QOL をも著しく低下させるのが特徴で、現在のところ治療方法も見つかっていない。本研究成果により脱髄のメカニズム解明の手掛かりが得られた事から、今後、治療法・予防法の確立へ向けて一步前進することが期待される (Nakahara *et al.*, 2003; Seiwa *et al.*, 2004)。

## 3. 3. 爬虫類・両生類発生・生殖解析グループ

アメリカワニ、ナイルワニ、カメのエストロゲン受容体クローニング：勝 義直、井口 泰泉 (自然科学研究機構) (Prof. Louis Guillet, Univ. Florida, USA, Dr. Jan Myburgh, Univ. Pretoria, Rep. South Africa の協力を得た)

### (1) 研究内容及び研究成果

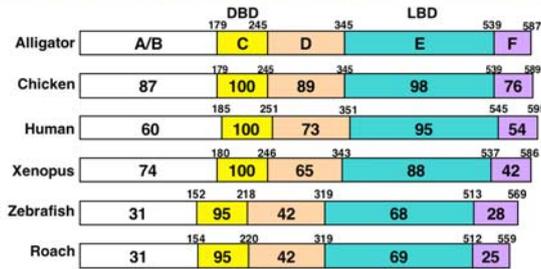
ステロイドホルモンは脊椎動物の初期発生・生殖・成長において多くの必須の役割を持っており、エストロゲンは正常な生殖や性決定において直接的に働いていることが知られている。爬虫類の中には、孵化時の温度によって性が決定することが知られている。この現象を TSD (Temperature-dependent sex determination: 温度による性決

定)と呼んでいる。また、これまでの研究から、エストロゲンで処理すると通常雄になる温度でも雌になるということが分かっている。このことは、性の決定には ER を介した経路が重要な役割をなしていることを示唆している。ワニにおけるエストロゲン作用の分子機構を理解する第一歩として、ER をコードする cDNA の単離を試みた。まず、様々な種の ER に共通した配列を基にして重合プライマーを準備し、アメリカワニ肝臓から抽出した RNA を鋳型にして cDNA を合成し、それをを用いて PCR を行った。その結果、2 種類 (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) の DNA 断片を得ることができ、さらにアルファ型の全長を含む cDNA を単離した。他の生物の ER $\alpha$ との相同性を調べたところ、両生類よりも鳥類と非常に高い相同性を持つことが判明した。さらに、PR の部分配列を決定しており、ER と同様に、鳥類との相同性が高いことが判明した。これらの遺伝子について、エストロゲン投与による発現を調べたところ、ER $\alpha$ はエストロゲンによって有意に発現レベルが低下するが、ER $\beta$ や PR はエストロゲンによる影響を受けないことが分かった (Katsu *et al.*, 2004)。

次に、同じワニの仲間であるニールワニの ER のクローニングも行った。ミシシippリアリゲーター、カイマン、ニールワニの ER の配列を比較したところ、お互いに非常に似ている (95% 以上の相同性) ことが分かった。ミシシippリアリゲーターとニールワニは別の科に属するが、相同性が非常に高いためワニ目における科の分け方は他の生物よりもかなり曖昧だと考えられる。また、ワニと同じ爬虫類であるカメのステロイドホルモン受容体 (ER, PR, AR) の cDNA を単離することに成功している。

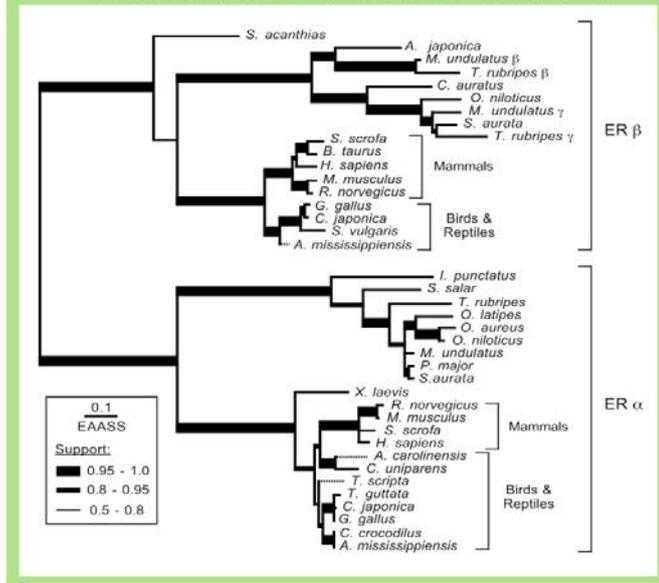
これまで、ヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、酵母などゲノム解析、cDNA 解析の進んでいる生物種が増えてきている。爬虫類は、その飼育・繁殖の難しさから、

ミシシippリアリゲーターエストロゲン受容体と他の生物のエストロゲン受容体の比較

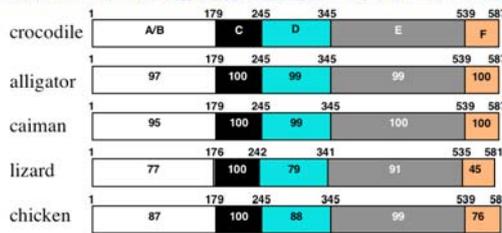


エストロゲン受容体はN末よりA/B domain, C domain (DNA-binding domain), D domain, E domain (ligand-binding domain), F domainに分けることができる。爬虫類であるワニ、鳥類であるニワトリ、哺乳類であるヒト、両性類であるアフリカツメガエル、魚類であるゼブラフィッシュ、ローチのエストロゲン受容体と比較したところ、DNA-binding domain と Ligand-binding domainはお互いに高い相同性を示した。また爬虫類であるワニのエストロゲン受容体は鳥類であるニワトリと非常に高い相同性を示した (全長の比較で91%一致)。

アミノ酸配列を基にしたエストロゲン受容体の進化系統樹



クロコダイルのエストロゲン受容体と他の爬虫類及びニワトリのエストロゲン受容体の比較



	Crocodile	Alligator	Caiman	Lizard	Chicken
Crocodile	100%	98%	98%	82%	92%
Alligator	100%	100%	98%	82%	91%
Caiman			100%	81%	91%
Lizard				100%	81%
Chicken					100%

エストロゲン受容体をA/B domain, C domain (DNA-binding domain), D domain, E domain (ligand-binding domain), F domainに分け、ワニの仲間であるクロコダイル、アリゲーター、カイマン、およびトカゲとニワトリの比較をしたところ、DNA-binding domainとLigand-binding domainはお互いに高い相同性を示した。またワニ同士は非常に高い相同性を示すことが分かった (全長の比較で98%の一致)。

遺伝子解析はほとんど手が付けられていない状態である。しかし、実験動物に限らず様々な生物種での遺伝子の比較は今後、非常に重要になってくると思われる。我々は、爬虫類であるワニの遺伝情報の整理及び、性分化・性決定の分子機構解明のために、EST 解析を進めている。現在、初期胚から作製した cDNA ライブラリーを用いて、雄、雌の胚からそれぞれ 4500 クローンの EST 解析を行っている。さらに、両者を比較することによって雄特異的、雌特異的に発現を示すクローンの探索を行っている。また、約 700 個のクローンの全長の配列を決定しつつある。さらに、アメリカワニ ER $\alpha$  に対する抗体も作成した。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

今後、初期発生段階における ER や他のステロイドホルモン受容体の発現様式を詳細に調べるとともに性分化・性決定における役割を解析していく。本研究は、アメリカフロリダ州の湖で見られる、環境化学物質が原因と考えられるワニの生殖異常の分子機構の解析にも繋がるものと期待できる。また、雄に分化する温度および雌に分化する温度で孵卵した胚を用いて、cDNA ライブラリーを作成し、EST の配列を準備している。さらに、今年度は性分化前後および、雄になる温度で孵卵したものにエストロゲン処理を施した胚などを準備しており、アメリカワニの温度依存性性分化にかかわる遺伝子群の解析に向かう予定である。ほとんど明らかにされていない爬虫類の遺伝情報の解読は、進化学、比較内分泌学など多方面に寄与することが多いと考えられる。アメリカで開始されようとしている、アメリカワニのゲノムプロジェクトからも遺伝子供与の打診が来ている。また、南アフリカ共和国のプレトリア大学との共同研究により、ナイルワニの遺伝子情報整備にも向かう予定である。

ツチガエルとトロピカリスを用いた内分泌かく乱物質の作用メカニズムの解明にむけたアプローチ：高瀬 稔（広島大学）・井口泰泉（自然科学研究機構）（Dr. John Nielsen, Dr. Henrick Lefers, Prof. Niels Skakebaek, Denmark National Hospital の協力を得た）

### (1) 研究内容及び研究成果

両生類は、性ホルモン処理による性転換、甲状腺ホルモンによる尾の退縮などの変態、そして PRL による卵成熟など、ホルモンに対して感受性が高い。また、水陸共に棲息場所を持ち、食性も幼生期と変態後とは異なるなど、様々な環境に対応できる生態を示すため、内分泌かく乱物質に対する環境指標動物として大変有用である。一方、内分泌かく乱物質はそのホルモン様作用により性分化に影響する可能性がある。そこで、両生類を用いた内分泌かく乱物質の作用メカニズムの解明およびスクリーニング系の確立を目指して本研究は行われた。作用メカニズムの解明には性ホルモン処理により雄および雌への性転換が誘導されるツチガエル (*Rana rugosa*) を使い、スクリーニング系の確立には飼育が容易であり、ホルモン処理により年中受精卵を得ることが可能なトロピカリス (*Silurana tropicalis*) を用いた。

#### a) 作用メカニズム、特に性ホルモンによる性転換作用の解析

内分泌かく乱物質の作用メカニズム解明のためのモデルとして、正常発生における雄化よりも解析し易いアンドロゲン処理による雄化に着目し、エストロゲンの影響を解析した。全雌幼生集団を用いて、雌から雄への性転換を誘導するアンドロゲンの種類、投与量、投与時期、投与期間について解析し、最も有効な投与方法を用いて、卵巣から精巣への分化転換過程を組織学的に調べた結果、注射後 16 日目には肥大卵母細胞の退化および精巣構造の分化が認められ、32 日目には卵巣から精巣への分化転換が完了することが確かめられた。また、雌雄 1 対 1 からなる幼生集団を用いて、雄から雌への性転換を誘導するエストロゲンの投与量、投与時期、投与期間およびその組織

学的変化について解析した。さらに、ツチガエルの ER および ARcDNA を単離し、各々の性転換過程における性ホルモン受容体遺伝子発現量の変化を解析した結果、常に高発現していることを確かめた。

次いで、分化した卵巣を持つステージ XIII-XIV の全雌幼生集団に TP を単回腹腔内投与して雄化を誘導した後、E2 を含む水で飼育したところ雄化が抑制された。その雄化抑制作用には TP 投与 16 日目の前後 8 日間が重要であることを確かめた。さらに、EE2 および NP でも雄化抑制作用が認められた。

性転換をモデルとした雄化抑制機構を知るために、ディファレンシャル・ディスプレイ法を用いて、TP 投与後 16 日目に発現変化を示す遺伝子を網羅的に解析した。その結果、発現量が増加すると思われる 113 個の遺伝子および発現量が減少すると思われる 131 個の遺伝子を同定した。また、孵化後 13 日目から EB 処理を行い、処理後 4, 8, 16 日目の生殖腺および腎臓で発現変化が認められた遺伝子を単離し、175 個の遺伝子の塩基配列を解析した。従って、エストロゲンにより影響を受ける雄化遺伝子がこれらの遺伝子の中に含まれていることが考えられる。今後、その影響を受ける遺伝子を同定する予定である。

#### b) スクリーニング系確立のためのアプローチ

内分泌かく乱物質に対する高感度スクリーニング方法を確立するためには、鋭敏に発現変化を示す遺伝子マーカーが必要である。そこで、トロピカリスを用いて、有用と思われる特定遺伝子の単離と、cDNA ライブラリーからの網羅的な遺伝子の単離を併用して解析した。

有用遺伝子マーカーの単離には、ER 遺伝子を高発現している組織および時期を知ることが不可欠である。そこで、RT-PCR 法、RACE 法およびオリゴキャッピング法を用いて、全長の ER $\alpha$ 、ER $\beta$ cDNA を単離した。単離された 2 種類の ER はこれまでに報告されているトロピカリス ER $\alpha$  cDNA とは異なる可能性が示唆された。

変態後 2 ヶ月齢の雌雄トロピカリスの脳、心臓、肝臓、胃、背側皮膚、大腿筋、生殖腺・腎臓における ER 遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した結果、雄または雌の脳、肝臓および生殖腺・腎臓において高発現していることを確かめた (図 1a, 1b)。

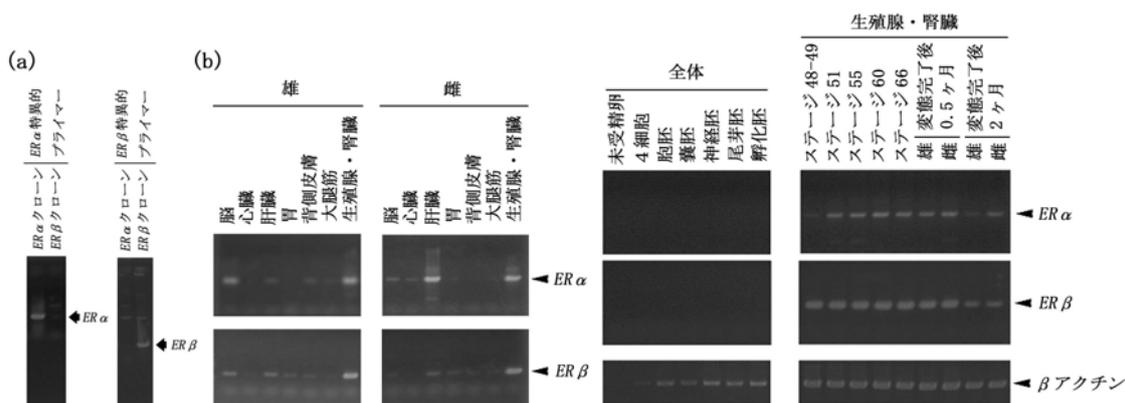


図 1. トロピカリス各組織における ER 遺伝子発現

図 2. トロピカリス発生過程における ER 遺伝子発現

RT-PCR 法を用いて発生過程における ER 遺伝子発現を解析した結果、受精卵から孵化胚までの ER 遺伝子発現はほとんど認められなかったが、ステージ 48 以降の生殖腺・腎臓において ER 遺伝子発現が認められ、特にステージ 50 以降では ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 共に常に高発現を示した (図 2)。また、組織学的な解析から、生殖腺の性分化はステージ 55~60 の間に起こることを確かめた。ER 遺伝子の高発現が見られた肝臓からは甲

状腺ホルモン受容体 TR $\alpha$ 遺伝子を単離し、生殖腺からはアロマターゼ遺伝子を単離した。

cDNA ライブラリーからの網羅的な遺伝子の単離は、ER 遺伝子の高発現を示した肝臓に注目し、雌トロピカリス肝臓 RNA 由来の cDNA ライブラリーを作製した。これまで、cDNA ライブラリーから任意に選んだ 474 個のコロニーについてシーケンス解析を行い、262 個の異なる遺伝子を単離した。今後、内分泌かく乱物質処理により発現変動する遺伝子を選択する予定である。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

ツチガエルは日本の固有種として、性分化機構の解明とともに、どのような化学物質に対する影響が大きいのかを明らかにすることが期待されている。また、トロピカリスは 2 倍体であり世代交代が 6 ヶ月程度と、アフリカツメガエルの 4 倍体で世代交代が 2 年に比べて、化学物質の世代影響を調べる系に有利であると認識されつつあり、OECD や USEPA でも、アフリカツメガエルから、トロピカリスへと試験動物としての興味に移りつつある。さらに、ゲノムプロジェクトも完了しそうな勢いであり、本研究で明らかにした性分化ステージや幾つかの受容体配列も有用に活用されると思われる。

## ニホンアマガエル (*Hyla japonica*) 皮膚の水分調節機構と内分泌かく乱：河野郷通 (横浜市立大学大学院総合理学研究科博士課程)、井口泰泉 (自然科学研究機構)

### (1) 研究内容及び研究成果

近年、世界的に両生類の種の絶滅、個体数の減少が報告されており、この原因の一つとして内分泌かく乱物質の影響が危惧されている。一般に化学物質は、環境水中に存在し生物の内分泌機構に影響を与えると考えられている。このことから、カエルの皮膚は水分を摂取する際に直接化学物質に曝されており、水分と同時に化学物質も体内に取り込むと考えられる。これらのことから、カエルの皮膚での水分調節に関与する内分泌機構のより深い理解が必要である。

陸上生活を営む動物種は、水中とは異なり容易に水分を失う厳しい環境下になり、飲水行動により水分を摂取し、主に腎臓の調節機構によって体液浸透圧を一定に保っている。しかし、カエルは、腹側皮膚の一部のペルビック・パッチと呼ばれる部分を通して水分を吸収している。一方、背側の皮膚では能動的に水分を分泌し、体熱の放散を助けている。このカエルの皮膚の水分調節には、脳下垂体後葉ホルモンが重要な役割を果たしている。後葉ホルモンの一つであるバソトシン (VT) は、皮膚、腎臓および膀胱で水分吸収を促進する。またカエルには、メソトシン (MT) という後葉ホルモンがある。

MT の皮膚での働きは明らかではない

が、腎臓では血液濾過を促進する。VT の皮膚や腎臓、膀胱での水分吸収促進はセカンドメッセンジャーである cAMP の増加を伴う。この cAMP の増加に伴い細胞表面の水チャンネルが増加し、水分吸収が促進されると考えられている。これらのことから、

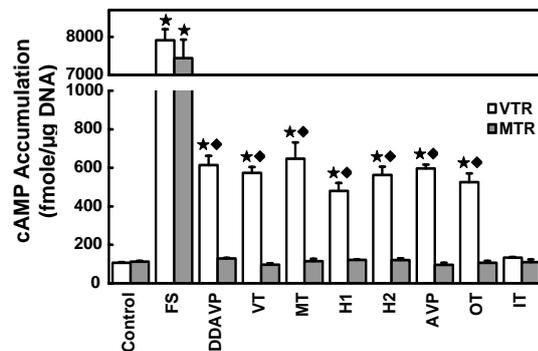


図 1. VTRおよびMTRを発現している細胞の各種後葉ホルモン (1  $\mu$ M) に対する反応。★, vs Control; ◆, vs MTR ( $P < 0.05$ ). Control, 0.1% DMSO; FS, 10  $\mu$ M forskolin; DDAVP, [deamino-Cys<sup>1</sup>, D-Arg<sup>8</sup>] vasopressin; VT, [Arg<sup>8</sup>] vasotocin; MT, mesotocin; H1, hydrin 1; H2, hydrin 2; AVP, [Arg<sup>8</sup>] vasopressin; OT, oxytocin; IT, isotocin.

カエル皮膚の後葉ホルモンによる相互作用をも含めた水分調節機構解明には、VT および MT の受容体 (VTR および MTR) の単離、同定が不可欠である。本研究では、ニホンアマガエル (*Hyla japonica*) を用い、VTR、MTR cDNA の単離・同定を行った。これらを指標としてニホンアマガエルの皮膚を通しての水分調節機構を、後葉ホルモンの作用機構を中心に解明し、両生類の水分調節に関与する内分泌機構を理解することを目的とした。

a) 後葉ホルモン受容体 cDNA の単離・同定

ラットバソプレシンV<sub>1a</sub>受容体のアミノ酸配列、およびヒキガエルMTRのcDNA配列のプライマーを用いて、RT-PCRおよび3'-rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR、5'-RACE-PCRを行った。得たcDNAをCHO細胞に導入し、この細胞に各種リガンドを添加して細胞内cAMP濃度を測定した。

さらに、ノーザン・ブロット解析によりVTR および MTR の転写サイズを調べ、リアルタイム RT-PCR 法により各器官の VTR mRNA および MTR mRNA 発現を調べた。

その結果、2 種類のcDNAを得、1 つは、哺乳類のバソプレシンV<sub>2</sub>タイプ受容体 (V<sub>2</sub>R) と 48-50%の相同性を持ち、他はヒキガエルMTRと 94% の相同性があり、それぞれをVTR、MTRとした。VTRを発現させた培養細胞ではVTを添加すると細胞内cAMPが増加したが、MTRを導入した細胞では観察されなかった (図 1)。またRT-PCRでVTR mRNAは脳、心臓、腎臓、ペルビク・パッチ、膀胱で強く発現していた。

一方、MTR mRNAは脳、脂肪体、心臓、腎臓、膀胱で強く発現していた。さらに、皮膚でVTRはペルビク・パッチで胸部、背側より強く発現しており、逆にMTRは背側で腹側のペルビク・パッチや胸部より強く発現していた (Kohno *et al.*, 2003) (図 2)。

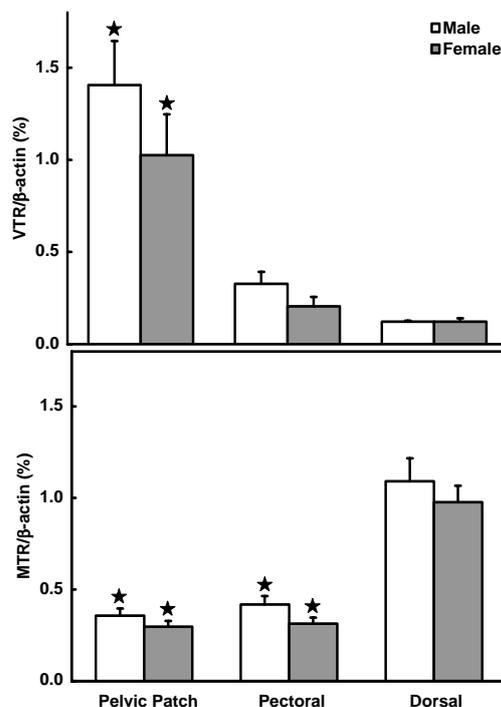


図 2. リアル・タイムRT-PCR法による皮膚の各部位のVTRおよびMTRのmRNA発現の定量。★, vs Dorsal (P<0.05)

b) 定常状態の水分吸収速度の雌雄差

水分を十分に与え、乾燥やホルモンなどにより水分吸収が促進されていない定常状態の個体から、腹側皮膚のペルビク・パッチを切除し、メンブレンフィルターホルダーに組み込み、水分吸収量を 100 分間測定した (図 3)。また、E2、TP、PRL、および化学物質を成体に投与、あるいは測定時のリンガー液に添加し、同様に水分吸収量を測定した。

その結果、定常状態のペルビク・パッチの水分吸収速度は雄で雌よりも

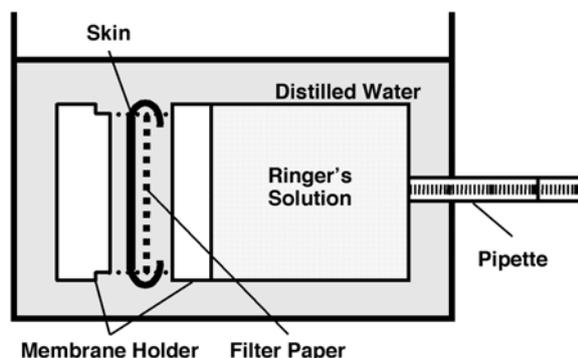


図3. 水分吸収測定装置。切除した皮膚をメンブレン・ホルダーに組み付け、装置内をリンガー液で満たす。この液量の増加をピペットで読み取り、輸送される水の動きを調べる。

早い、雌雄差があることを見出した。この雌雄差に対して、E2 投与および PRL 投与は雄に対して抑制的に、逆に TP 投与はメスに対しては促進的に作用した。しかし、皮膚を切除した後にこれらの性ホルモンや PRL で処理しても変化は観察されなかった。また女性ホルモン様作用を持つ化学物質である BPA およびメトキシクロールの投与も E2 と同様にオスで抑制作用を示した (Kohno *et al.*, 2004) (図 4)。

## (2)研究成果の今後期待される効果

VTR および MTR は発現の局在から体液浸透圧調節に重要な役割を果たしていると推察される。特に、VTR は哺乳類以外の脊椎動物で未同定の新規のタンパク質であり、これを指標とした今後の研究の発展が期待できる。さらに、皮膚の VTR および MTR の局在から、水分吸収および分泌を行う部位が限定されている可能性が示唆された。ペルビック・パッチの定常状態の水分吸収の雌雄差は、新規な発見である。エストロゲン作用を持つ化学物質もエストロゲン同様な作用を示すことから、ニホンアマガエルがホルモン様作用を持つ化学物質の検出に有用な動物である可能性が示唆された。ニホンアマガエルで、皮膚の部域による水分調節の違いが、新たに単離した後葉ホルモンの受容体である VTR および MTR 発現の局在の違いにより生じている可能性が示唆され、ペルビック・パッチの定常状態の水分吸収速度には雌雄差があり、性ホルモンによって制御されている。この水分吸収の雌雄差が性ホルモン感受性であることを利用し、化学物質のホルモン様作用の検出も可能である。

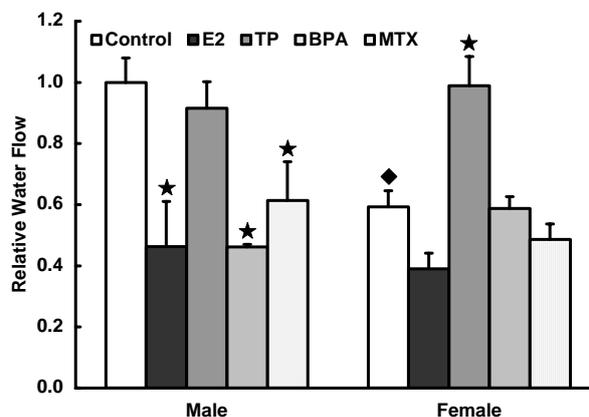


図4. 性ホルモンおよび女性ホルモン様作用を持つ化学物質のペルビック・パッチの定常状態の水分吸収への影響。腹腔内投与24時間後に観察。Control, sesame oil; E<sub>2</sub>, 17 $\beta$ -estradiol; TP, testosterone propionate; BPA, bisphenol A; MTX, methoxychlor. ◆, vs Male; ★, vs Control (P<0.05) .

## エストロゲン類似化学物質によるアフリカツメガエルの発生異常と遺伝子発現変化：曾根清明 (CREST 研究員)、井口泰泉 (自然科学研究機構)

### (1) 研究内容及び研究成果

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のオタマジヤクシを E2 等で処理すると雄から雌への性転換を起こすことが知られているが、発生初期での化学物質の影響については明らかにされていない。そこで本研究では初期発生期にあるアフリカツメガエルにエストロゲンおよびエストロゲン様化学物質が及ぼす影響について孵化 4 日目までに着目して解析を行った。

受精後間もないアフリカツメガエル胚を受精後 96 時間までの期間、E2 およびエストロゲン様活性のある NP、BPA 存在下で培養し、その発生・発達に及ぼす影響を明らかにすることを目的として解析を行った。さらに E2、NP および BPA による影響が明らかでないオタマジヤクシについて DNA マクロアレイ法を用いてその遺伝子発現様式を解析した。

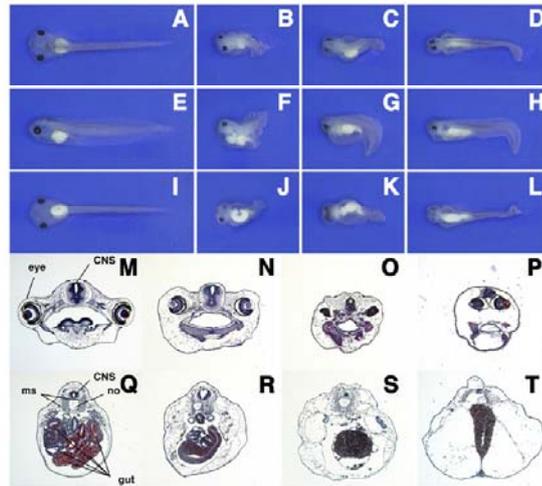
人工授精により得られたアフリカツメガエル胚を受精後 3 時間から 96 時間までの間に 1-50  $\mu$ M NP、E2 もしくは 1-30  $\mu$ M BPA を含む培養液中で曝露した。その後、それぞれの被検物質が発生・発達に及ぼす影響を検討した。さらに発生・発達に及ぼす影

響が顕著に認められる濃度においてそれぞれの被検物質が遺伝子発現に及ぼす影響について DNA アレイ法を用いて検討した。

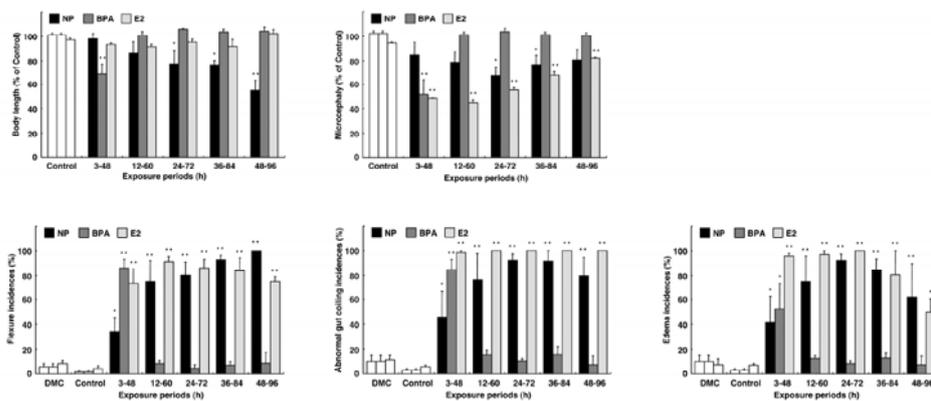
3-96 時間までの間、種々の濃度の NP、BPA および E2 で連続曝露した結果 10  $\mu$ M E2 もしくは 20  $\mu$ M BPA、NP の濃度以上で処理した際に高頻度で体長の短縮・小頭・屈曲・浮腫・腸の形成異常等に顕著に影響が認められた（次頁右上図）。

また、曝露期間を 45 もしくは 48 時間に短縮した結果、BPA 曝露による影響は発生のより前期、特に 12 時間までであり、NP 曝露による影響はより後期であった。

さらに、受精後から 4 日間曝露した際の遺伝子発現変化を DNA アレイ法により解析した。その結果、E2、NP、BPA 曝露群で、それぞれ発現が増加するクローンを 58、18、179、また減少するクローンを 29、77、103 同定した。このうち 3 種類の被検物質に共通して発現が増加もしくは減少するクローンを、アフリカツメガエルで既知の遺伝子 6 種類（XIRG、alpha skeletal tropomyosin、cyclin G1、HGF、troponin C2、ribosomal protein L9）を含め 27 同定した（Sone *et al.*, 2004）。



NP、BPA および E2 は発生・発達段階にあるアフリカツメガエルに体長の短縮・小頭・屈曲・浮腫および腸の形成不全等を引き起こすことが明らかになった。特に、BPA については発生のより前期（特に受精後 12 時間まで）における曝露でのみ、その影響が顕著に認められた。



## (2) 研究成果の今後期待される効果

DNA アレイ法を用いた解析により 3 種類の被検物質で増加、もしくは減少するクローンを 27 同定した。このうち特に HGF はエストロゲン-ER を介した遺伝子発現調節機構の制御下にあることが知られており、エストロゲン様活性を持つ物質が遺伝子発現におよぼす影響をよく反映していると考えられる。発生毒性の影響をマイクロアレイで遺伝子発現まで調べた研究は画期的であり、General and Comparative Endocrinology

誌の表紙を飾ることになっている。Ecotoxicogenomics として、今後の発展が期待される分野である。

### 3. 4. 水棲動物生殖グループ

#### 海産メダカのマミチョグの初期発生に対するエストロゲン作用の解析：漆谷博志（基礎生物学研究所非常勤研究員）、井口泰泉（自然科学研究機構）

##### (1) 研究内容及び研究成果

環境中に放出された多くの化学物質、特に、水系環境に放出される化学物質について、水棲動物の内分泌環境や性分化に影響を与える可能性が危惧されている。エストロゲン様活性を持つ化学物質の影響は、ER を介する経路で引き起こされている。どのような外来的な化学物質が水棲生物に対し、エストロゲン様の作用をおよぼすのかを知る上で ER 遺伝子の単離・同定は重要である。そこで、エストロゲン作用を持つ物質の影響を考察する上での基礎的な知見を得るために、海産メダカであるマミチョグ (*Fundulus heteroclitus*) を用い、a) 初期発生段階から E2 処理を行い、どのような影響が出るのかを組織学的及び形態学的見地から考察し、b) 初期発生のどの時期からエストロゲンが影響を及ぼすのか、すなわち臨界期を調べるため、ER $\alpha$ 型遺伝子の単離と、ER $\alpha$ 型遺伝子のタンパク質発現の系を作製し、初期発生過程での発現を解析することを目的として研究を行った。

マミチョグは横須賀市長井荒崎の実験所の天然条件下で飼育していたものを用い、規定濃度になるように E2 を水槽に滴下した。孵化後 12 週齢まで処理を行い、組織学的及び形態学的観察を行った。

ER 遺伝子の単離により得られた候補クローンのリガンド結合部位の塩基配列を用いて、部分的なタンパク質の発現系を共同研究により作成した。GST-リガンド結合部位融合タンパクを合成し、化学物質との結合を測定した。

受精後 2 週間目での孵化率を調べたところ、未処理群においては 54%であった。また E2 処理を行った各群についてはそれぞれ、 $10^{-10}$ M 処理群で 49.3%、 $10^{-8}$ M 処理群で 35.9%、 $10^{-6}$ M 処理群で 0.4%であった。また孵化後 8 週齢での生存率は、未処理群で 31.2%であったのに対し、E2 処理  $10^{-10}$ M 処理群で 21.3%、 $10^{-8}$ M 処理群で 12.5%であった。

E2 処理群では、背曲がり、体色変化、眼球突出の 3 種類の形態的異常が認められた。これらの異常を解析するため、孵化後 12 週齢の稚魚について骨格標本を作成し、硬骨化の程度を観察した結果、 $10^{-8}$ M 処理群で頭部及び脊椎骨の硬骨化が完全でなく、特に肋骨は薄く、彎曲していることが分かった (Urushitani *et al.*, 2002) (図 1 C、D)。

8 週齢における生殖腺の分化を組織学的に観察した。その結果、未処理群で 56.7%、 $10^{-10}$ M 処理群で 50%の個体が雄であった。また雌は、未処理群で 43.3%、 $10^{-10}$ M 処理群で 50%、 $10^{-8}$ M 処理群では 100%であった。

cDNA ライブラリーのスクリーニングにより、8 種類のクローンを選び、塩基配列の解析を行った。その結果、約 2kb の遺伝子断片を含むクローンを得、620 残基のアミノ酸へ完全に翻訳できた (図 2)。このアミノ酸と他種の ER との相同性を比較したとこ

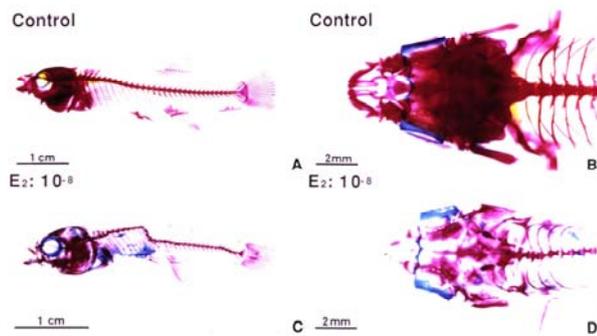
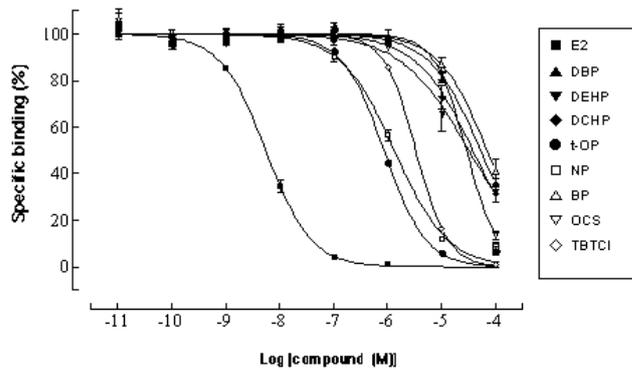


図1. 未処理及びE2処理群稚魚の骨標本。  
A,B: 未処理群、C,D:  $10^{-8}$ M E2処理群。



オクタクロロスチレン(OCS)、トリブチルスズ(TBTCl)の8種類の化学物質を用い、様々な濃度で放射性ラベルしたE<sub>2</sub>と競合的にfhER $\alpha$ リガンド結合部位と結合させ、その値を測定した(図6)。また、放射性同位元素で標識されたE<sub>2</sub>とfhER $\alpha$ リガンド結合部位との結合を50%阻害した濃度をIC<sub>50</sub>として測定した。その結果、標識されていないE<sub>2</sub>で5.5 x 10<sup>-9</sup> Mの濃度であった(表1)。このE<sub>2</sub>のIC<sub>50</sub>の値を100とし、それぞれの化学物質がIC<sub>50</sub>となる濃度を相対的に表したものを相対的結合能(RBA)として表1に示した(Urushitani *et al.*, 2003)。



Chemicals	IC <sub>50</sub> (M)	RBA (%)
17 $\beta$ -estradiol	5.5 x 10 <sup>-9</sup>	100
dibutyl phthalate	5.3 x 10 <sup>-3</sup>	0.010
di(2-ethylhexyl) halate	3.2 x 10 <sup>-3</sup>	0.017
dicyclohexyl phthalate	3.8 x 10 <sup>-3</sup>	0.014
4- <i>t</i> -octylphenol	8.5 x 10 <sup>-7</sup>	0.65
4-nonylphenol	1.3 x 10 <sup>-6</sup>	0.42
benzophenone	7.3 x 10 <sup>-3</sup>	0.0075
octachlorostyrene	2.9 x 10 <sup>-3</sup>	0.019
tributyltin chloride	3.3 x 10 <sup>-6</sup>	0.17

図6 fhER $\alpha$ リガンド結合部位タンパク質と化学物質の結合能の測定

水系環境におけるエストロゲン様作用をもつ化学物質の影響を調べるため、マミチヨグを用い、エストロゲンが発生に対しどのような影響を及ぼすかについて研究を行った。今回観察されたような、エストロゲン処理による孵化率及び、生存率の低下や、背曲がり、体色変化、眼球突出等の形態的異常については同様の報告が、アフリカツメガエルを用いた同様の実験系でも報告されている。この外形異常の原因として、骨染色の結果より得られた、頭蓋骨や脊椎骨の形成不全が考えられる。これまでの哺乳類での研究より、成体へのエストロゲン投与は骨量の増加させることが分かっている。今回の結果は骨形成を抑えており、発生段階におけるエストロゲンの作用機構が成体のそれとは異なっている可能性が示唆される。また、生殖腺の組織学的解析から、エストロゲン処理により性転換が引き起こされることも明らかとなった。

クローニングにより得られた fhER $\alpha$ 遺伝子のリガンド結合部位の部分塩基配列を用いて、リガンド結合部位部分のみのタンパク質の発現系を確立した。このタンパク質を用い、8種類の化学物質について結合力の測定を行った。このうち、4-*t*-オクチルフェノール、4-ノニルフェノールはE<sub>2</sub>の結合力の1/150と1/240の値を示した。これはヒトER $\alpha$ のこれらの物質に対する結合力に比べて高い値であった。

マミチヨグを用いた研究から、a) マミチヨグの発生段階に外来的なエストロゲンが存在することで、稚魚や胚発生に対する致死作用、成長抑制、背曲がりや眼球突出といった催奇性、硬骨化の抑制や性転換が引き起こされることが分かった。また、頭部や脊椎骨でみられた不完全な硬骨形成が、成長の抑制や背曲がりの原因となる可能性が示唆された。b) ER遺伝子のクローニングを行い、ER $\alpha$ 型遺伝子の完全長cDNAを得た。c) ER $\alpha$ 型遺伝子の発現解析により、2種類のアイソフォームが存在する可能性が示唆された。また、エストロゲン刺激により転写のパターンが変化することが明らかとなった。d) ER $\alpha$ 型遺伝子のタンパク質発現の系の開発を行い、今回得られたクローンが、エストロゲン及び、エストロゲン作用を持つ化学物質と結合することを明らかにした。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

マミチヨグの ER $\alpha$ はヒトの ER $\alpha$ と比較して、アルキルフェノールに対する親和性が高いことが明らかとなった。このような結果はメダカでも見出されており、ヒトの ER を用いたスクリーニング系のみで ER への化学物質の結合を判断するすると、魚類に対して影響の強い物質を見逃すおそれがあり、メダカやマミチヨグなどを含め、それぞれの ER を用いたレポーター遺伝子アッセイ系の構築が必要である。また、この研究の成果は、環境省のノニルフェノールのリスク評価にも用いられた。

## ゼブラフィッシュの性分化機構の解析：内田大介（横浜市立大学大学院総合理学研究科の協力による）、井口泰泉（自然科学研究機構）

### (1) 研究内容及び研究成果

魚類の性決定や性分化は、遺伝的要因とともに水温や pH などの環境要因に加えて、外因性の性ホルモンにも強い影響を受ける。ゼブラフィッシュの生殖腺の発生過程では、雌雄ともに卵巣様の組織が形成された後に、雄では卵母細胞が消失して精巣に分化し、雌ではそのまま卵巣が分化し卵母細胞が発達する、幼時雌雄同体性とも呼ばれている。ゼブラフィッシュの性分化機構を調べるために、紫外線照射により遺伝子を壊した精子と野生型から採取した未受精卵を人工授精させ、雌性発生 2 倍体の雄を作り、野生型雌と交配して遺伝的全雌系統を作成した。遺伝的全雌と野生型の生殖腺の分化を観察し、遺伝的全雌にアロマターゼの阻害剤を投与し、エストロゲン産生を阻害した時の生殖腺の分化を調べるとともに、遺伝的全雌を性分化感受性時期に高水温（35-37 °C）で飼育し手生殖腺の雄への分化過程を調べた。

ゼブラフィッシュの生殖腺は孵化後 20 日までに卵母細胞および卵巣腔を有する卵巣様に分化した。孵化 23 日以降の野生型雌および遺伝的全雌系統では、周辺仁期卵母細胞の発達が確認されたが、雄の生殖腺では孵化後 23-29 日にアポトーシスによる卵母細胞の消失と、孵化後 23-35 日での卵巣腔の消失が観察された (Uchida *et al.*, 2002)。遺伝的全雌系統ができたことから、ゼブラフィッシュには遺伝的な性決定機構が存在し、ホモでは表現系が雌となるので XY 染色体系であることが推察される。遺伝的全雌系統にアロマターゼ阻害剤処理 (100, 1000  $\mu\text{g/g}$  diet) を行うと、遺伝的全雌から雄に性転換した。その過程では、卵母細胞のアポトーシスとともに、精原細胞の増殖・分化が認められた。孵化後 40 日の高水温処理では、35 °C で 71%、37 °C ですべての遺伝的全雌が雄に性転換した。野生型雄の性分化とアロマターゼ阻害剤による性転換のメカニズムは異なると思われる。また、温度による性決定、性分化機構が存在することも明らかとなり、野生型雄の性分化と高水温飼育による性転換過程は類似していた (Uchida *et al.*, 2004)。

### (2) 研究成果の今後期待される効果

ゼブラフィッシュはヨーロッパでは化学物質の毒性試験に使用されるとともに、神経系の胚発生の研究に用いられており、ゲノム解析も終盤となりつつある。また、OECD では内分泌かく乱物質の魚類試験にも用いられている。本研究で、ゼブラフィッシュの性分化はまず、卵巣様組織ができ、卵母細胞がアポトーシスにより消失するとともに精原細胞の増殖・分化が起こることを明らかにした。これにはアロマターゼ活性の減少が関与している。高水温飼育でも、卵母細胞のアポトーシスを伴って、雌から雄への性転換が起こることを見出した。今後、ゼブラフィッシュを用いた生殖試験の基礎データとして重要な貢献ができると思われる。

ローチに起こる内分泌かく乱作用の分子機構解析：勝 義直、井口泰泉（自然科学研究機構）（Prof. Charles Tyler, Exeter Univ. UK, Dr. Susan Jobling, Brunel Univ. UK の協力を得た）

(1) 研究内容及び研究成果

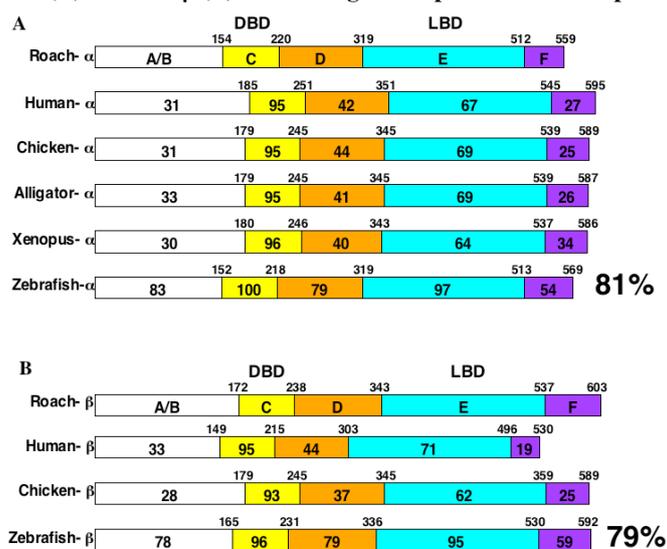
イギリスの河川に生息するコイ科の魚であるローチでは、卵精巢が認められることから雌化の現象が現れている。これは羊毛工場から排出される NP、下水処理排水中の排卵防止剤の EE2 やヒトからの E2, E1 などによる影響であると考えられている。しかし、このようなエストロゲンやエストロゲン様化学物質により、ローチの生殖変異がどのような機構で発生するのかは不明である。この内分泌系かく乱の分子機構を解析する目的で、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン合成系に必要な遺伝子及び性分化関連遺伝子の同定を行い、それらを用いて遺伝子発現の解析・マクロアレイの作成を行うことを目的として本研究を行った。

ERalpha	Full-clone	Steroid hormone receptor	vasa	Partial clone	Germ cell formation
ER beta	Full-clone	Steroid hormone receptor	DMRT-1	Partial clone	Germ cell differentiation
AR/GR	Partial clone	Steroid hormone receptor	SOX-9	Partial clone	Testis development
MR	Full-clone	Steroid hormone receptor	DAZ	Partial clone	Testis development
Aromatase-G	Full-clone	Steroidogenic enzyme	Pumilio	Partial clone	Gonad development
Aromatase-B	Full-clone	Steroidogenic enzyme	SF-1	Full-clone	Transcription factor
StAR	Full-clone	Steroidogenic enzyme	WT-1	Full-clone	Gonad development
p450-SCC	Partial clone	Steroidogenic enzyme	Wnt4	Partial clone	Gonad development
p450C17	Partial clone	Steroidogenic enzyme	EF-1	Partial clone	House-keeping gene
17β-HSD	Partial clone	Steroidogenic enzyme	β-actin	Full-clone	House-keeping gene
3β-HSD	Partial clone	Steroidogenic enzyme	L8	Partial clone	House-keeping gene

これまで、ローチに関する遺伝子の情報はほとんどなく内分泌系かく乱の分子機構を解析するためのツールとして、ステロイドホルモン受容体、ステロイドホルモン合成系に必要な遺伝子及び性分化関連遺伝子の単離を試みた。表に示したように、ステロイドホルモン受容体である ER・AR・グルココルチコイド受容体（GR）・ミネラルコルチコイド受容体（MR）、ステロイドホルモン合成関連遺伝子であるアロマターゼ・StAR・p450-SCC・p450-C17・17β-HSD・3β-HSD、性分化関連遺伝子である vasa・DMRT-1・SOX-9・DAZ・Pumilio・SF-1・WT-1・Wnt4 のそれぞれ全長及び部分配列を決定した。現在、これらの遺伝子の情報を基にしてマクロアレイの作製を行っており、遺伝子発現解析の基本となるツールとなりうると考えられる。

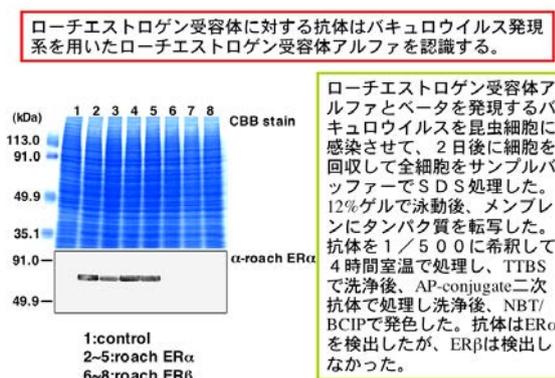
次に、ER とアロマターゼに関して詳細な解析を行った。2 種類の ER はそれぞれアルファ型が 559 アミノ酸、ベータ型が 603 アミノ酸からなることが分かった。ER は

Domain structure and homology percentages of rERα (A) and rERβ (B) with estrogen receptors of several species



DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインを含む 6 つのドメインに分けることができる。それぞれのドメイン毎を他の生物種の ER と比較したものを図に示した。DNA 結合ドメイン、リガンド結合ドメインはお互いに相同性が高いことが判明した。やはり魚類の ER との相同性が高く、ゼブラフィッシュとはアルファ型で 81%、ベータ型で 79%の相同性を持つことが判明した。次に、ER の発生ステージにおける発現変動を調べたところ、アルファ型とベータ型の両方でハッチ後 84 日目から発現量の増加が認められた。また、EE2 の影響を調べるために、受精時から 80 日間 EE2 処理 (0, 0.1, 1, 10 ng/L) を行ない頭部と体部に分けて発現変動を定量性 PCR により測定したところ、10 ng/L で処理した時、体部においてアルファ型の発現増加が認められた。

アロマターゼは、T を E2 へ変換するために必要な酵素であるが、これまでに 2 種類 (生殖腺タイプと脳タイプ) のタイプが存在することが判明している。ローチにおいても 2 種類のアロマターゼをコードする cDNA を得ることが出来た。生殖腺タイプは 517 アミノ酸、脳タイプは 507 アミノ酸からなることがわかり、脳タイプは脳でのみ発現が見られることを確認した。ER と同様に、魚類の遺伝子との相同性が高く、さらにメダカよりもキンギョやゼブラフィッシュとの相同性が高いことが分かった。また、ER と同様にアロマターゼの発生ステージにおける発現変動を調べたところ生殖腺タイプのアロマターゼは発生後徐々に発現量が増加しており、脳タイプは成熟個体の脳でのみ高発現が認められた。また、受精時から 80 日間 EE2 処理 (0, 0.1, 1, 10 ng/L) を行ない頭部と体部に分けて発現変動を定量性 PCR により測定したところ、0.1 と 1 ng/L の濃度で処理した時、体部において生殖腺タイプの発現増加が認められた。さらに、脳タイプのアロマターゼは 10 ng/L の濃度で処理したときに脳における高発現が認められた。さらに、ER タンパク質の発現を調べるための ER $\alpha$ に対する抗体を作製している (右図)。



## (2) 研究成果の今後期待される効果

EE2 処理により ER やアロマターゼの発現変化が見られたように、詳細な発現解析は生殖腺異常の分子機構を理解するのに役立つと思われる。また、マクロアレイの作成ができれば、網羅的な解析も可能になり、多くの知見を得ることができるだろう。ローチに関しては、イギリスのエクセター大学 (C. Tyler 教授) およびブルーネル大学 (S. Jobling 講師) との共同研究でもあり、今後精巣卵の発症機構を分子生物学的に解明する予定である。

## トレンボロンによるカダヤシの雄性化：曾根清明 (CREST 研究員)、井口泰泉 (自然科学研究機構) (Louis Guillette フロリダ大学教授)

### (1) 研究内容及び研究成果

カダヤシ (*Gambusia affinis affinis*) は、本来は北アメリカ大陸の南東部に分布する淡水魚であるが、現在では世界各地に生息している。日本へは 1916 年に移入され、現在は沖縄から北限とされる福島までの各地に広く分布している。卵胎生魚であり、とりわけ尻鰭の一部が変形した交接器は成熟した雄に顕著な特徴である。近年、フロリダ州の河川などにおいて交接器を発達させた雌の例が報告され、環境中に存在するアンドロゲン様物質の野生生物に及ぼす影響が懸念されている。トレンボロン (TB) はアンド

ロゲン様活性を持った肥育ホルモンとして、北米で広く牛に投与されている。この物質が河川等の環境中から検出されることからその影響が危惧されているが水生生物に及ぼす影響については不明な点が多い。そこで、本研究では TB がカダヤシの二次性徴に及ぼす影響を明らかにすることを目的として解析を行った。さらに、カダヤシの精巢 cDNA ライブラリーより AR $\alpha$  および AR $\beta$  を単離し、カダヤシ成魚の尻鰭における TB もしくはメチルテストステロン(MT) 処理による AR 発現変化を RT-PCR 法により解析した。

妊娠マークの発達したカダヤシ成魚を産卵箱に移して一晩放置し、翌日回収した稚魚を出生後 0 日として以後の解析に供した。出生後 0 日から 28 日の期間で、0.1、0.3、1.0、10  $\mu\text{g/L}$  の TB 存在下で連続曝露試験を行った。またカダヤシ雌成魚を 7 日間 0.1、1.0、10  $\mu\text{g/L}$  の TB もしくは MT 存在下で連続曝露試験を行った。さらに degenerated primer を用いて、精巢由来の mRNA を用いて合成した cDNA を鋳型にして RT-PCR 法によりそれぞれ AR $\alpha$  および AR $\beta$  と相同性の高い PCR 断片を得た。これら PCR 断片を鋳型に用いてカダヤシ精巢 cDNA ライブラリーより、それぞれ AR $\alpha$  および AR $\beta$  遺伝子を単離した。さらに 5'-RACE 法を用いて全 ORF 領域を得た。

28 日連続曝露の結果、何れの試験区においても TB 曝露による体長の変化は認められなかった。しかしながら、体長に対する交接器の長さの割合は 0.3、1.0、10  $\mu\text{g/L}$  の試験区では有意に高くなった(図 1)。また、このような鰭に対する影響は尻鰭に特異的であった。

図 1

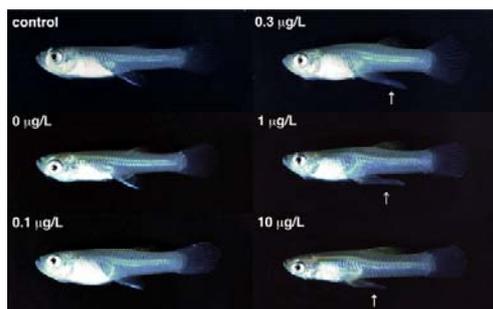
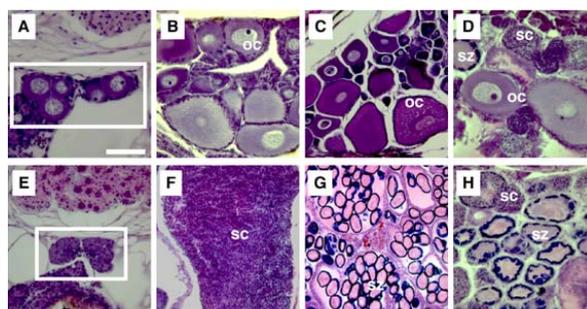


図 2



OC:oocyte, SC:spermatocyte, SZ:spermatozoa

更に、生殖腺の分化に対する影響を組織学的に解析した。出生直後の個体における生殖腺の卵巣(図 2A) : 精巣(図 2E) の割合はおよそ 1 : 1 であり、かつ、28 日後(図 2B と F) の割合も同様であることが明らかになった。更に、28 日連続曝露の結果、1.0、10.0  $\mu\text{g/L}$  処理区で、卵精巣の分化が顕著に認められた(図 2D)。また TB 処理により精子形成が促進されることも明らかになった(図 2H)。

図 3

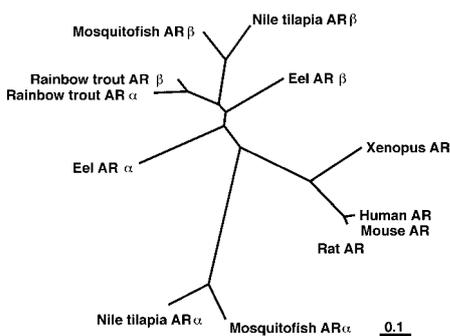
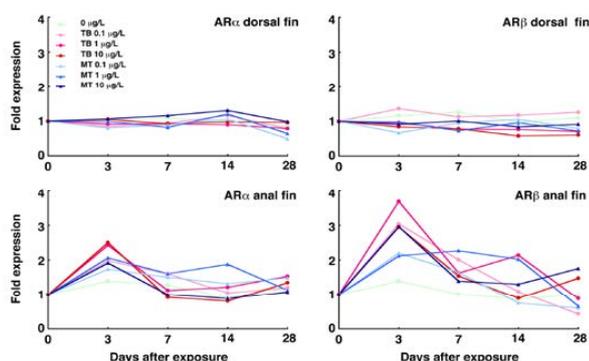


図 4



0.3 µg/L もしくはそれ以上の濃度の TB 曝露により出生後 28 日までにカダヤシ稚魚に交接器の形成が認められた。また成体においても雌臀鰭にゴノポディウム様の構造がみとめられ、この過程は AR $\alpha$  および AR $\beta$  遺伝子の発現量の増加を伴うことが明らかとなった。このことから、TB は交接器の分化時期を早めることが明らかとなり、更に雌においても交接器の分化を誘導することが示唆された。また、1.0、10.0 µg/L の TB 存在下では卵巣中に精細胞の分化が誘導されることが明らかになった (Sone *et al.*, Submitted)。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

トレンボロンは牛のし尿を通して河川に流出すると、そのアンドロゲン作用により、カダヤシやファットヘッドミノアの生殖にも影響を与える懸念がある。今後の研究課題として、雄化したカダヤシの生殖は可能なのか、どの程度の卵巣の雄化まで生殖が可能なのかを検討する必要がある。環境中のトレンボロン濃度は報告されていないが、環境中の濃度と、今回得られた実験での最小作用濃度との関連を調べ、リスク評価することが必要である。

## ミジンコを用いた甲殻類への化学物質の影響評価：鏑迫典久（独立行政法人 国立環境研究所）、渡邊 肇、井口泰泉（自然科学研究機構）

### (1) 研究内容及び研究成果

内分泌かく乱物質の研究はヒトを含む脊椎動物を中心に進められており、甲殻類を含む無脊椎動物については、地球上に最も多く存在している生物であるにもかかわらず巻貝を除いて注目されていない。一方、有害昆虫に対するホルモンかく乱を利用した農薬の研究は約 30 年前から行われている。内分泌系は脊椎動物と無脊椎動物とで異なることから、昆虫の内分泌系を乱す農薬は人体に悪影響を及ぼすことなく害虫を駆除できると期待されて盛んに用いられた。しかし昆虫類、エビ・カニなど十脚類に代表される甲殻類の内分泌系は、共通して脱皮ホルモンと幼若ホルモンの 2 種類の末梢神経系ホルモンから構成されており、環境中の生物多様性維持の視点からは、それら昆虫の内分泌系を乱す農薬の使用には注意が必要である。環境中にそれらの農薬が流出することは稀であると考えられるが、有害昆虫以外の生物に及ぼす影響を明らかにしておく必要がある。また、昆虫の内分泌系かく乱作用が明らかになっている既存の農薬や化学物質についても、非意図的に昆虫をはじめとする節足動物の内分泌系に影響を与える可能性があり、甲殻類の内分泌をかく乱する物質の検出系の開発が必要である。

水環境中の化学物質の影響を評価するために用いられる手法の一つに、ミジンコを用いた毒性試験がある。ミジンコはさまざまな化学物質に対して鋭敏に反応することから (Tatarazako *et al.*, 2002)、試験生物として古くから用いられ、急性毒性のデータも多く存在し、OECD のテストガイドライン TG202, 211、Environment Canada のテスト法、EPA のテストガイドライン、および日本の改正化審法などで広く採用されている (鏑迫、2003)。

小型甲殻類の仲間であるミジンコは枝角類に属し、主に動物プランクトンとして水界生態系で重要な生態的地位を占め、大部分は周期的単為生殖という繁殖様式を持ち、通常は単為生殖によって雌親から遺伝的に同一な雌仔虫を生じる。しかし、環境条件の悪化に伴い個体群内に雄が出現し、減数分裂を行った卵と受精することにより有性生殖が行われる。ミジンコにおける雄の出現や雌による休眠卵生産開始などの機構は未解明であるが、脱皮ホルモンと幼若ホルモンが影響していると推察される。実験生物としての取り扱い手法が確立されており、様々な毒性データの蓄積があるミジンコ

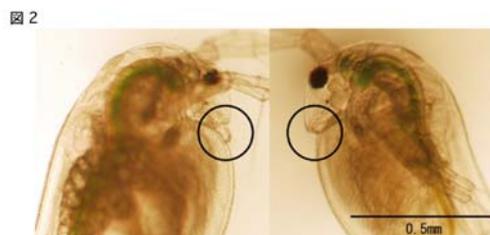
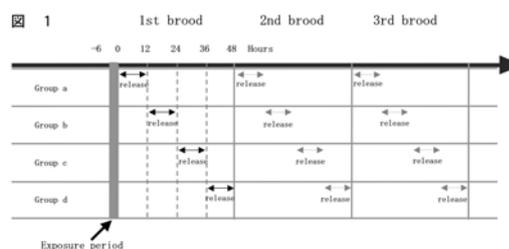
を用いて甲殻類の内分泌かく乱物質の有効な試験法の開発が必要である。

使い捨てのポリエチレン製の飼育カップ (Plastic Inc., USA) からミジンコの繁殖を阻害する物質、1,2 ジフェニルシクロブタン (スチレン 2 量体) を検出した。ガラスカップを用いて、1,2 ジフェニルシクロブタンおよび 1,3 ジフェニルプロパンを用いて、*Ceriodaphnia dubia* の繁殖阻害試験をおこなった結果、1,2 ジフェニルシクロブタンの IC25 は 3.89 ppb, 1,3 ジフェニルプロパンは 1.75 ppb であった (Tatarazako *et al.*, 2002)。スチレンダイマーは *Daphnia magna* の 21 日間繁殖阻害試験では IC25 が 30 ppb で産子数の減少を示したが、3.125-12.5 ppb で有為に脱皮回数が増えた。このように、スチレンがミジンコの生殖に影響を与えることが明らかとなった。

また、国立環境研究所で 10 年以上前から継代飼育されてきている単一遺伝系統のオオミジンコ (*Daphnia magna*) を用いて、JH III、メチルファネゾエート、メトプレン、フェノキシカルブ (Fnc)、ピリプロキシフェンなどの幼若ホルモン様物質によって雄仔虫が誘導されることを明らかにした。この遺伝系統は良好な飼育環境下における雄仔虫出現率はほぼ 0 であるので、雄仔虫誘導の実験に適している。オオミジンコに上記の幼若ホルモン様物質を産仔直後から連続曝露すると、仔虫性比が濃度依存的に雄に偏る。曝露 21 日経過後に曝露を停止すると、1 週間後にはまた産仔虫の性比が雌だけにもどる。性決定時期は育房内の胚発生段階ではなく、卵巣内の卵であり、30-40 時間程度の高感受性時期が存在することを明らかにした。これらの結果から、幼若ホルモンはミジンコ仔虫の性比または有性生殖と無性生殖の切り替えに関与しておりその反応は可逆的であることを明らかにした (Tatarazako *et al.*, 2003)。

さらに、雄化誘導に関して Fnc を用いて詳細な実験を行うとともに、BPA、NP、OP、脱皮ホルモンの 20 ヒドロキシエクジソン (Ecd) の生殖および性比への影響を調べた。①卵の成熟と曝露のタイミングによる雄仔虫の発生について

オオミジンコは卵巣で作られた卵が産卵によって育房内に移行し、その後 48 時間程度育房内に留まって仔虫となる。これら一連の産卵から産仔、脱皮は通常 48 時間周期で行われる。同じ日に生まれたミジンコを一定時間 Fnc に曝露し、曝露終了後に生まれてくる第 1 仔の産仔までに必要とした時間によって 4 群に分け、遡って曝露時の体内での卵の発達程度を推察した。生後 3 週目の 40 個体をまとめて 1 L ガラス製ビーカーにて、Fnc 2  $\mu\text{g/L}$  に 6 時間曝露した。Fnc の曝露濃度については、1  $\mu\text{g/L}$  でほぼ 100% の仔虫が雄となる (Tatarazako *et al.*, 2003) が、本実験では Fnc 2  $\mu\text{g/L}$ 、曝露時間を 6 時間に設定した。曝露終了後 1 L ビーカーを用いて曝露個体は飼育水で 3 回洗浄し、体表面に付着した Fnc を除去した。その後 12 時間以内に第 1 回目の産仔を行った個体群を a、12 時間以降 24 時間以内に第 1 回目の産仔を行った個体群を b、同様に 24 時間以降 36 時間以内に産仔した個体群を c、36 時間以降に産仔した個体群を d とした。6 時間の曝露期間



中に産仔した個体は、曝露程度が不明確なため後の解析から除外した（図 1）。仔虫は、シャーレ上で水を減らしてミジンコの動きを制限しながら、実体顕微鏡下で観察し、主に第一触角の長さや形態の違いで仔虫の性判別を行った（図 2）。

その結果、曝露後最初の腹仔は全ての実験処理区において雌であった。これら 1 腹目の仔虫はすべて Fnc に曝露されているときに、母親の育房内に保持されていたものである。2 腹目では a で 100%、b でも 22%ほど雄が確認されたが、c、d では雄は全く確認されなかった。3 腹目ではどのグループでも仔虫は雌となった。

### ②雄仔虫産出の可逆性について

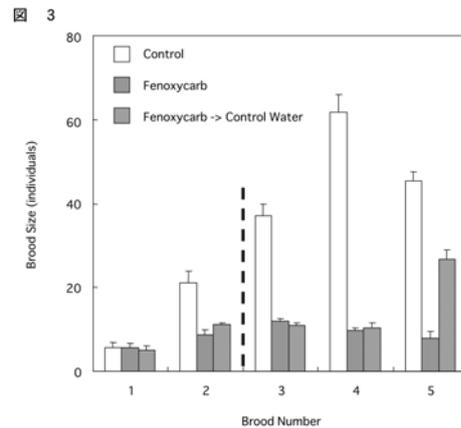
成熟個体に Fnc を曝露して雄仔虫を発生させ、その後曝露を停止することにより雄仔虫が発生しなくなることを観察した。生後 10 日経過した抱卵個体 12 個体を 1 群とし、Fnc 2  $\mu\text{g/L}$  を曝露した後途中で飼育水に戻した群、Fnc 2  $\mu\text{g/L}$  を継続曝露群、飼育水のみを非曝露群を用意した。Fnc 曝露停止群では、全ての個体で雄仔虫の発生が確認された日の翌日から Fnc の曝露を停止し、通常の飼育水に置換して飼育観察を続けた。なお曝露停止群の個体は体表に付着した薬液を洗浄した。

実験開始後の 1 腹目は、実験開始時に育房に持っている仔虫の数となるため、1 腹目の仔虫数は実験処理区を通じてほぼ同じであった（図 3）。対照区における 1 腹仔の数は、産仔回数とともに徐々に増加したが、これはミジンコが繁殖を開始してからも、産仔の度に脱皮に伴って成長を続け、育房のサイズ増大とともに産卵数も増加するためである。Fnc 曝露区では、2 腹目以降の産仔数は平均で 10 頭であった。同様に、Fnc 曝露停止区に於いても産仔数は対照区に比して、ほぼ Fnc 曝露区と同程度まで低く抑えられた。Fnc 曝露の産仔数への影響は、曝露停止後 2 腹目まで顕著にあらわれ、その後産仔数はやや増加傾向を見せた（図 3）。対照区では実験期間中を通じて全く雄仔虫は確認されなかったが、Fnc 曝露区では、曝露開始後 1 腹目では仔虫はすべて雌、2 腹目からは仔虫はすべて雄となり、その後も雌仔虫は観察されなかった。Fnc 曝露停止区でも仔虫の性は 1 腹目の全て雌から 2 腹目では雄だけとなった。この後の曝露停止操作後の腹仔（3 腹目）も、全て雄の仔虫であった。4 腹目になると仔虫は雌のみとなり、この傾向はそのまま 5 腹目においても確認された。

### ③脊椎動物の内分泌かく乱物質と脱皮ホルモンによる繁殖阻害と雄仔虫産出

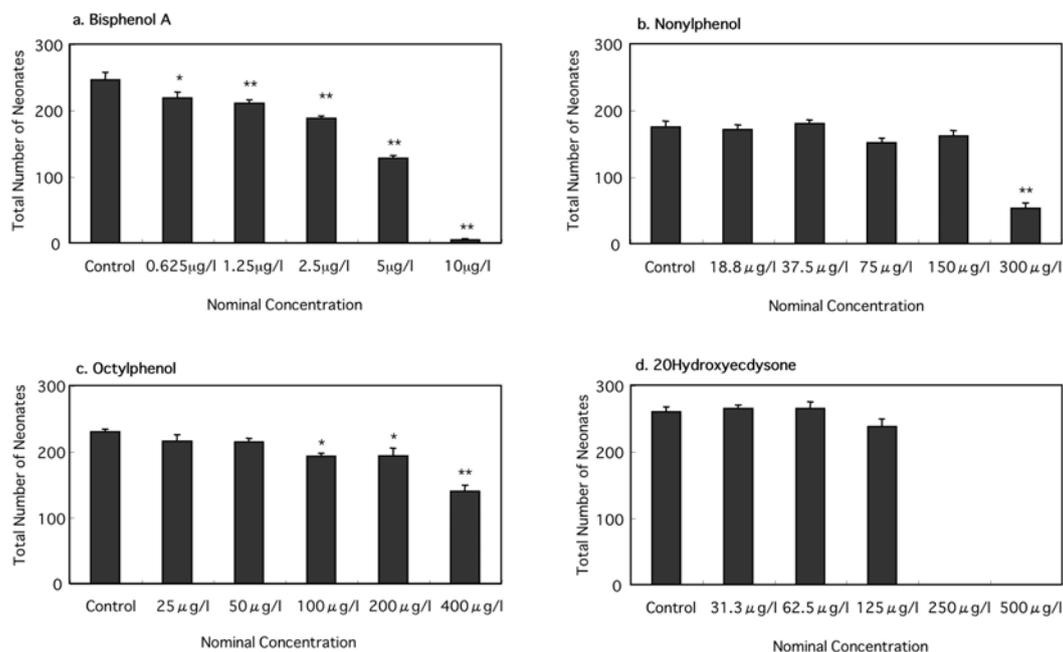
OECD ガイドライン TG211 に準拠して、BPA、NP、OP および昆虫や甲殻類の Ecd を用いて繁殖阻害試験を行った。育房内に発生途中の胚を持つ個体を選び、個別飼育を行った。供試個体はカップ一つにつき 1 個体にした。同じ親から生まれた供試個体がすべての試験区に配置されるようにし、これを繰り返しの数（N=10）だけ用意した。換水は 1 週間に 3 回行った。

BPA、NP、OP、Ecd のいずれにおいても雄仔虫の出現は確認されず、産仔数については、BPA、OP で濃度依存的に産仔数が低下し、NP は最高濃度区で産仔数が著しく低下した。なお、BPA で最小影響濃度は 630  $\mu\text{g/L}$  以下、NP で 300  $\mu\text{g/L}$ 、OP で 100  $\mu\text{g/L}$  であった。一方、Ecd では、低濃度 3 区（31-125  $\mu\text{g/L}$ ）では対照区と比較して産仔数の減少は見られなかった。これ以上の濃度区（250、500  $\mu\text{g/L}$ ）では全実験個体が



実験終了までに死亡した (図 4)。

図 4



以上の結果から、オオミジンコが幼若ホルモン様物質の刺激を受けて、雄仔虫を産出するためには 6 時間以内の短時間処理で十分であるが、曝露後 1 腹目では雄仔虫が発生しないことから、産卵後育房内で発生途中の胚ではすでに性が決定済みであること、親ミジンコの卵巣内に存在する卵の特定のステージが性決定の影響を受けやすいことが判明した。育房内に産卵された卵は良好な実験環境下ではおよそ 48 時間で仔虫となり放仔され、つづく親個体の脱皮後に次の腹仔が育房内に産卵される。今回の結果から、仔虫の性決定時期は育房への産卵の数時間から 24 時間程度前であるものと推測される。

成熟抱卵個体に Fnc を曝露しても、雄仔虫が産出されること、および曝露を停止すると停止後 2 腹目以降にはまた雌仔虫を産仔することから、Fnc 効果の残留性は乏しく、比較的速やかにミジンコ体内で効果を失うことが示された。ただし、停止後 2 腹目までは若干雄が混ざる場合も存在した。前研究によって、5 種類の幼若ホルモン様物質によるオオミジンコにおける仔虫性比の変化は、曝露停止後長くても 1 週間で雌のみに戻ることがわかっており、産仔数の低下についても同様の回復傾向が観察されている (Tatarazako *et al.*, 2003)。幼若ホルモン様物質によるミジンコの雄仔虫発生作用機構は、可逆性のホルモンかく乱によって引き起こされた可能性が高いことが示唆される。幼若ホルモン様物質による、ミジンコ個体群、群集あるいは水界生態系全体への影響評価する上では、産仔数の低下に加え集団の増殖に寄与しない雄仔虫が増えることの影響、そして雄出現から有性生殖開始のタイミングのかく乱などによる休眠卵生産への影響などを考慮する必要がある。これらの要因に加えて、個体レベルでは短時間曝露で効果が現れて、曝露停止により速やかに効果が消失するという今回新たに得られた知見が、生態系レベルではどのような影響を及ぼすかについては今後慎重に考慮する必要がある。

BPA、NP、OP について 21 日間繁殖阻害試験を行ったが、雄仔虫誘導による仔虫性比の変化は確認されなかった。これらの 3 物質は、魚類等に対して VTG 生産や外観・

生殖腺の雌化をひきおこすことが知られており、エストロゲン様作用が確認されている。無脊椎動物の内分泌かく乱を研究する際には、脊椎動物とは異なる内分泌機構を考慮した研究が必要である。Ecd についても 21 日間繁殖阻害試験を行ったが、雄仔虫の出現は確認されなかった。また、21 日間の実験期間中に高濃度区 (250、500 µg/L) では実験個体がすべて死亡した。死亡個体は脱皮殻が体に付着したままの個体も見られ、脱皮阻害が死亡要因と考えられた。これらの 21 日間繁殖阻害試験の結果から、オオミジンコの雄仔虫誘導は、産仔数の低下や実験個体の死亡をもたらすような化学物質のストレスによってもたらされるものではない。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

Tatarazako *et al.* (2003) , Olmstead and LeBlanc (2002, 2003) から、幼若ホルモン様物質が、通常雌仔虫しか生まないオオミジンコの仔虫性比を雄に偏らせることが明らかになり、濃度依存性も確認され、オオミジンコの通常の生殖方法である単為生殖から有性生殖への切り替えに幼若ホルモンが関与していることが示唆された。このことは、このオオミジンコの仔虫性比の変化を利用することによって、幼若ホルモン様物質のスクリーニングを行うことが十分可能であることを意味する。また、本研究から、幼若ホルモン様物質曝露によるオオミジンコの雄仔虫誘導が、卵が卵巣内に存在している、限られた時期にだけ有効に作用し、育房内に産卵した後ではその効果はない。また、曝露個体にその効果を及ぼすまでに要する時間は曝露開始から数時間以内と考えられる。これらのことから、化学物質を親個体に短時間曝露した後に雄仔虫の出現を調べる方法により、化学物質の幼若ホルモン様作用に関する簡易スクリーニングを行うことができる。オオミジンコ 21 日間繁殖阻害試験、さらに短期親曝露試験のいずれも、雄仔虫の発生を観察することによって、幼若ホルモン様物質の簡易スクリーニングを行うことができると考えられる。本研究を基にして、オオミジンコを用いた無脊椎動物の内分泌かく乱影響評価法として OECD に提案し採択された。今後、フィンランドなどの協力の下でリングテストに向かうことになる。

## ミジンコにおける内分泌攪乱化学物質影響の遺伝子レベルからの解析: 渡邊 肇、井口 泰泉 (自然科学研究機構)

### (1) 研究内容及び研究成果

無脊椎動物の内分泌系は、脊椎動物のそれと大きく異なっており、脊椎動物での評価系をそのまま利用することは不可能である。脊椎動物をモデルとした内分泌かく乱影響の評価系は、様々な方法が確立されているものの、無脊椎動物においては、いまだ急性毒性と生殖毒性を性比あるいは産仔数で評価せざるをえない状況である。そこで無脊椎動物の 1 種であるミジンコをモデルとして化学物質影響を遺伝子レベルから評価することを目標とし、化学物質曝露における遺伝子発現変化の解析および評価系の構築を試みた。

まず無脊椎動物 (ミジンコ) の遺伝子情報が非常に限られていることから、ミジンコの cDNA ライブラリーを構築し、ランダムに抽出したクローンの塩基配列を多数解析することにより、EST (expression sequence

The result of similarity search against the public non-redundant database by Blastx.

	Number of Groups	Number of Clones
Genes from <i>D. magna</i>	10	252
Genes from other organisms	1208	4115
No similarity	1740	2843
Total	2958	7210

The number of EST groups and clones that showed similarity to registered genes are indicated.

得られた配列情報をもとに、BlastX により相同性を持つ遺伝子を NCBI のデータベースから検索した。

1 E-14 以下のスコアのもの有意としてカウントした。

tag) 配列情報を取得した。

この EST 配列情報をおよそ 10,000 取得し、塩基配列の類似性からクラスタリング解析を行い、およそ 3,000 の遺伝子に相当する部分配列を取得した。

半数以上のグループ (コンティグ) については、相同性が見られる遺伝子がデータベース上に見出せず、ミジンコの解析により遺伝子情報の上でも今までにない情報を提供することができた (Watanabe *et al.* submitted)。

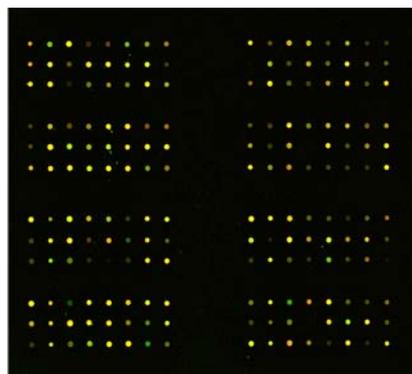
さらにこれと並行してアレイ化に必要な遺伝子の 3' 領域の塩基配列の解析を行い、これらの 3' 領域遺伝子情報をもとにコンティグの再解析を行った

さらにこれらの遺伝子情報をもとに、プロトタイプ DNA マイクロアレイを作製した。200 弱の遺伝子を選択し、ガラス基板上にオリゴ DNA を固定化した。この DNA マイクロアレイを用いて、化学物質曝露を行ったミジンコにおいて発現している遺伝子の解析を行ったところ、化学物質特異的に発現変動している遺伝子を検出することができた。これにより、ミジンコにおける化学物質影響を遺伝子レベルから評価、解析する新たな手法を確立するための基盤ができた。

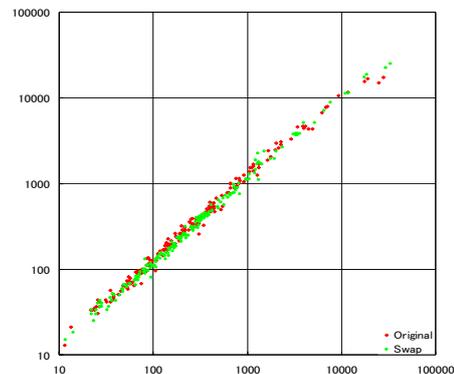
List of genes that have large number of clones in a group

Number of clones	Description	Organism
139	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain I	Daphnia pulex (m)
139	H <sup>+</sup> -transporting two-sector ATPase (EC 3.6.3.14) protein	Daphnia pulex (m)
132	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain II	Daphnia pulex (m)
112	cytochrome-c oxidase (EC 1.9.3.1) chain III	Daphnia pulex (m)
128	vitellogenin fused with superoxide dismutase	Daphnia magna
81	ubiquinol-cytochrome-c reductase (EC 1.10.2.2)	Daphnia pulex (m)
83	ferritin	Daphnia pulex
64	trypsin	Aplysina fistularis
52	putative elongation factor 1-alpha	Oncometopia nigricans
44	Chymotrypsin BII	Litopenaeus vannamei
45	hemoglobin - gp:AB021134_2	Daphnia magna
40	Myosin regulatory light chain 2	Drosophila melanogaster
39	gram negative bacterium-binding protein	Anopheles gambiae
35	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain	Daphnia pulex (m)
32	actin	Daphnia magna
31	hemoglobin - gp:AB021134_2	Daphnia magna
34	hemoglobin - gp:AB021134_3	Daphnia magna
28	Cuticle protein 7 (BcNCP15.0).	Blaberus craniifer
29	actin 403	Artemia sp.
24	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC 1.6.5.3) chain	Daphnia pulex (m)

Numbers of clones that showed same description in Blastx search were counted and top 20 genes that have large clones are indicated. Description of the groups and organism showed highest similarity to the groups are indicated with the number of clones (number of read in this study). (m) indicates mitochondrial gene.



スキャンイメージ



セルフハイブリダイゼーションの例

## (2) 研究成果の今後期待される効果

従来、ミジンコについては基礎的な知見が欠如しており、そのホルモン作用や生殖毒性について解析を行う場合にも、脱皮の観察や産仔数のカウントのみであった。本研究により、エンドポイントが単なる生死や脱皮ではなく、遺伝子発現からの詳細な解析、評価を行うための基盤作りができた。今後、こうした解析方法を展開していくことにより、無脊椎動物における内分泌かく乱の問題にアプローチできるだけでなく、さらに広範な化学物質の毒性影響のメカニズム、無脊椎動物のバイオロジーに踏み込んでいくことが期待できる。

## 有機スズによるインポセックスの誘導機構の解析：堀口敏宏（独立行政法人 国立環境研究所）

### (1) 研究内容及び研究成果

船底塗料などとして使用されてきた有機スズ化合物がごく低濃度で巻貝類に特異的にインポセックスと呼ばれる雌の雄性化を引き起こすことが明らかにされているが、その誘導・発現機構の詳細は明らかでない。これは巻貝類の生殖生理に関する基礎的な知見が不足しているためである。本研究では巻貝類の生殖に関する生理・生化学的知見の集積に努め、インポセックスと呼ばれる雌の巻貝類の雄性化現象をめぐり、有機スズ化合物の作用機構の解析を目的とした。

現在までに得られた新腹足類及び中腹足類のインポセックスと雌アワビ類の雄性化現象に関する知見に基づいて、“腹足類の神経中枢である神経節に有機スズが高濃度に蓄積した結果、神経内分泌系が攪乱され、雌における雄性生殖器官の発達や付属生殖器官の構造の変化、卵巣での精子形成などの内分泌攪乱現象の顕在化に帰結する”との作業仮説を設定した。この作業仮説の検証に際して、不足している腹足類の生殖生理に関する基礎的知見の獲得と蓄積に努めた。CREST では、ステロイドホルモンとその受容体、アロマトラーゼに代表される性ステロイドホルモン代謝酵素について、他の予算で、神経ペプチド、生体アミンと神経作用性アミノ酸、及びレチノイド X 受容体 (RXR) に焦点を当てて研究を推進し、以下の結果を得た。

#### ①巻貝からのステロイドホルモンの検出

2000年7月と8月に茨城・平磯で採集したイボニシ及び2000年9月に新潟・寺泊で水揚げされたバイを用いて、それぞれの卵巣及び精巣からメタノール抽出画分を得て、精製とシリル化の後、高分解能 GC/MS によりステロイドホルモンの同定と定量(内部標準法)を行った。その結果、イボニシの卵巣から E2、精巣から T がそれぞれ検出・同定された。またバイの卵巣から E2、エストロン及び EE2、精巣から T 及びアンドロステロンがそれぞれ検出・同定された。EE2 は合成ステロイドであるため、バイが固有に有していたものか、腐肉食性であるために食物網を通じて、あるいは生息域の海水から体内に取り込んだ汚染を示唆する結果であるかの判断が困難であった。なお、E2 と T について内部標準法で定量した結果、イボニシの卵巣及び精巣でそれぞれ  $1.10 \pm 0.20$  及び  $0.80 \pm 0.20$  ng/g 湿重、またバイの卵巣及び精巣でそれぞれ  $0.90 \pm 0.22$  及び  $0.95 \pm 0.29$  ng/g 湿重であった(Mutsu *et al.*, 2001)。

また、ELISA 法を用いてイボニシの生殖巣中の T を個体別に定量するための測定条件を確立した。抗 T 抗体キットの選択、試料の前処理法を詳細に検討することにより、ELISA 法で問題となる測定値のばらつきを克服し、測定値は GC/MS の値と良い一致を示した。これにより、GC/MS ではできなかった個体別の定量が初めて可能になった。この方法を用いて有機スズ汚染及び非汚染域で採集したイボニシ(メス)を分析した結果、インポセックス罹患個体の T が高い傾向を示すことが確認された。これにより、海産巻貝類においても高等動物と同様のステロイドホルモンと生合成経路が存在することが示唆され、T とインポセックスとの何らかの関連性が推察された(Mutsu *et al.*, 2001)。

#### ②イボニシ組織でのステロイドホルモンの代謝（勝 義直、渡邊 肇、井口泰泉）

イボニシの内分泌を理解するために、実際にイボニシが T を E2 に変換する能力(いわゆるアロマトラーゼ活性)を持つかどうか調べた。イボニシの生殖器官と消化器官からの抽出液を T と混ぜて、エストロゲンの生成量を ELISA 法を用いて測定した。その結果、確かに対照と比較して有為にエストロゲン量が生成されていることが確認された。このことは、イボニシは、体内にアロマトラーゼ活性を有しているということの意味する。今後は、これがアロマトラーゼによるものなのか、イボニシの体内にステ

ロイドホルモン (T やエストロゲンなど) がどの程度の種類、どの程度の量で存在しているのかを調べなければならない。

③イボニシでのエストロゲン受容体の単離(勝 義直、太田康彦、渡邊 肇、井口泰泉)

船底防汚塗料として使用されてきた有機スズ化合物が前鰓類 (海産巻貝類) の新腹足類と中新腹足類に対し、インポセックスを引き起こすことが知られている。しかし、このインポセックスの誘導機構については分かっていない。また、これまで海産巻貝類の内分科学の詳細な報告はない。本研究では、海産巻貝類であるイボニシのインポセックス誘導機構解明を最終目標にし、またその詳細な記載がない内分科学的な解析の一步として ER のクローニングを試みた。これまでに報告されている ER をもとに保存されている領域を用いた重合プライマーを使って DNA 断片を得て、5'側 3'側の配列を決定した。DNA 結合領域は他の ER とよく似ていた (ヒトとのホモロジーは 89%) が、リガンド結合領域は 40%程度 のホモロジーしか認められなかった。また、他の生物種 (鳥類、爬虫類、両生類、魚類) の ER との比較でも、DNA 結合領域は相同性が高いが、リガンド結合領域を含む他の領域では相同性が低いことが分かった。最近報告されたウミウシの ER とはホモロジーが高くリガンド結合領域では 70%の一致を示した。また、ホモロジー検索をすると、他のステロイドホルモン受容体 (アンドロゲン、プロゲステロン受容体など) とのホモロジーは認められないことから得られたクローンはイボニシの ER であると判断した。

ER は、リガンド (エストロゲン) 依存的に遺伝子の転写調節領域に存在する ER 認識配列 (ERE) を介した転写活性を持っている。次に、我々は実際に得られたクローンが転写活性を持っているかを調べた。その結果、非常に興味深いことにリガンド (エストロゲン) が存在しない状態でも ERE を介した転写活性を持つことが判明した。これらの結果は無脊椎動物の内分科学を進化学の観点から解明するうえで重要な知見を提供すると思われる。しかし、これまで『エストロゲン受容体はリガンド依存的に転写活性を持つ』と云われていることから、イボニシから得られたクローンはこれに当てはまらない。このことから、我々は得られたクローンをイボニシの ER 類似遺伝子と呼ぶことにした。また、最近クローニングされたウミウシの ER 類似遺伝子もイボニシと同様にリガンド非依存的な転写活性を有することが報告されている。様々なプライマーを用いて、更なる ER 類似遺伝子のクローニングを試みたが、現在まで新たなクローンは得られていない。このことは、イボニシは、今回得られた ER 類似遺伝子が脊椎動物で見られる ER と同じ (似た) 機能を持つことが示唆される。

2001 年 4 月と 5 月に茨城・平磯及び神奈川・城ヶ島で採集したイボニシの卵巣、精巣及びペニス形成部位に対する AR、ER 及び P450<sub>Arom</sub> の各抗体 (Novocastra 社製、Dako 社製、Biogenesis 社製及び北野 健博士 (熊本大学理学部) から分与の抗体) による免疫組織化学染色並びに中和抗原処理を行った。その結果、イボニシの卵巣、精巣及びペニス形成部位に対する AR、ER 及び P450<sub>Arom</sub> の免疫組織化学染色並びに中和抗原処理の結果、生殖巣では AR と ER に対する特異的染色が、またペニス形成部位では AR に対する特異的染色が、認められたのに対し、P450<sub>Arom</sub> に対してはいずれの組織においても特異的染色が認められなかった。また AR について、神経節と輸精管に対する免疫染色を改めて行った結果、いずれの組織においても特異的に染色される細胞を見出した。

④インポセックスに及ぼすアロマトーゼ阻害剤とアンドロゲンの影響 (井口泰泉)

2002 年 5 月に平磯で採集したイボニシから、雌のみを選び出して 20 個体ずつの 4 グループ: a: 対照、b: 塩酸フラドゾール (Fad)、c: Fad+T 及び d: TPTCl に分けて、それぞれのエタノール溶液を MgCl<sub>2</sub>/6H<sub>2</sub>O 溶液で麻酔したイボニシの足部に注射した。注射量は、Fad が約 5

μg/g 体重、Fad及びTestが、それぞれ、約 5 μg/g 体重及び約 0.1 μg/g 体重、またTPTClは約 1 μg/g 体重とした。また溶媒対照はエタノールとし、他の実験区における最大注射量となるようにした。飼育、解剖観察した後、インポセックス出現率とペニス長及び輸精管順位(VDS)について、それぞれ対照区との有意差検定を行った。その結果、インポセックス出現率が対照区より有意に高かったのはTPTCl 区(p<0.01)のみであり、Fad区及びFad+T区では対照区と有意差なしであった。またペニス長は個体差が大きく、Fad区では対照区との間に有意差が認められた(p<0.05)ものの、Fad+T区ではペニス形成が認められなかった。TPTCl 区では対照区より有意に伸びた(p<0.001)。一方、VDSについては、Fad区及びFad+T区で対照区との有意差が認められず、TPTCl 区で有意であった(p<0.001)。

他の予算で行った研究成果では、神経ペプチドのうち、少なくとも APGWamide と、T の還元型代謝物である DHT はイボニシに対する微弱なインポセックス促進能を有することが示唆された。但し、APGWamide の効果に再現性と用量-反応関係は観察されていない。一方、本研究の、Fad 及び Fad+T がイボニシに対してインポセックス促進能を有することはほとんどないか、きわめて微弱な効果にとどまると推察された。Fad 及び Fad+T(3 濃度)を流水式曝露試験装置によりイボニシに 2 ヶ月間連続曝露させた実験においてもインポセックス促進能が観察されず(堀口ら、未発表)、したがって、アロマターゼ阻害剤及びそれに T を付加した場合のイボニシにおけるインポセックス症状の促進は見られないと言えよう。本実験結果は、Bettin *et al.* (1996)の結果とは異なる結果である。両者において使用されたアロマターゼ阻害剤に構造上の差があり、実験に用いられた種も異なっているとはいえ、類似の曝露方法によって対照的な結果が生じたことは興味深く、アロマターゼ阻害剤やTがインポセックスに及ぼす影響について、種差を含めて、さらに詳細に検討する必要がある。

#### ⑤ペニス及び輸精管の形成過程 (太田康彦)

イボニシにおいては、インポセックス症状のごく初期の段階では、輸精管形成がペニス様隆起形成とほぼ同時期に起こる。また輸精管は陥入した表皮が結合して形成され、陥入部位は 3-4 箇所であり、ペニス様隆起形成に伴ってペニス基部の輸精管が進入する。さらにペニスは表皮の細胞塊から形成される。またイボニシのインポセックスの場合、ヨーロッパチヂミボラの場合と少し異なり、卵嚢腺側に輸精管形成が生じるのは右触角後部のペニス形成部位にペニスの隆起と表皮の陥入による輸精管の形成が始まってからであると推察された。

#### ⑥CREST 予算以外の研究の概説

インポセックス研究の対極を把握していただくために、他の研究を概説する。神経ペプチドおよびペプチド系生理活性物質野インポセックスへの影響を調べるため、6 種類のペプチドを単離・精製して筋肉注射を行ったが、インポセックスは誘起されていない。また、イボニシの神経節からセロトニン、ドーパミン、エピネフリン、オクトパミンを検出した。生体アミンおよび神経作用アミノ酸のインポセックスへの影響を調べる予定である。さらに、核内受容体の RXR のリガンドである 9-*cis* レチノイン酸 (RA) を用いてイボニシのインポセックスに及ぼす影響を検討し、RA は用量依存的にインポセックスを発症させることを見出している (Nishikawa *et al.*, in press)。

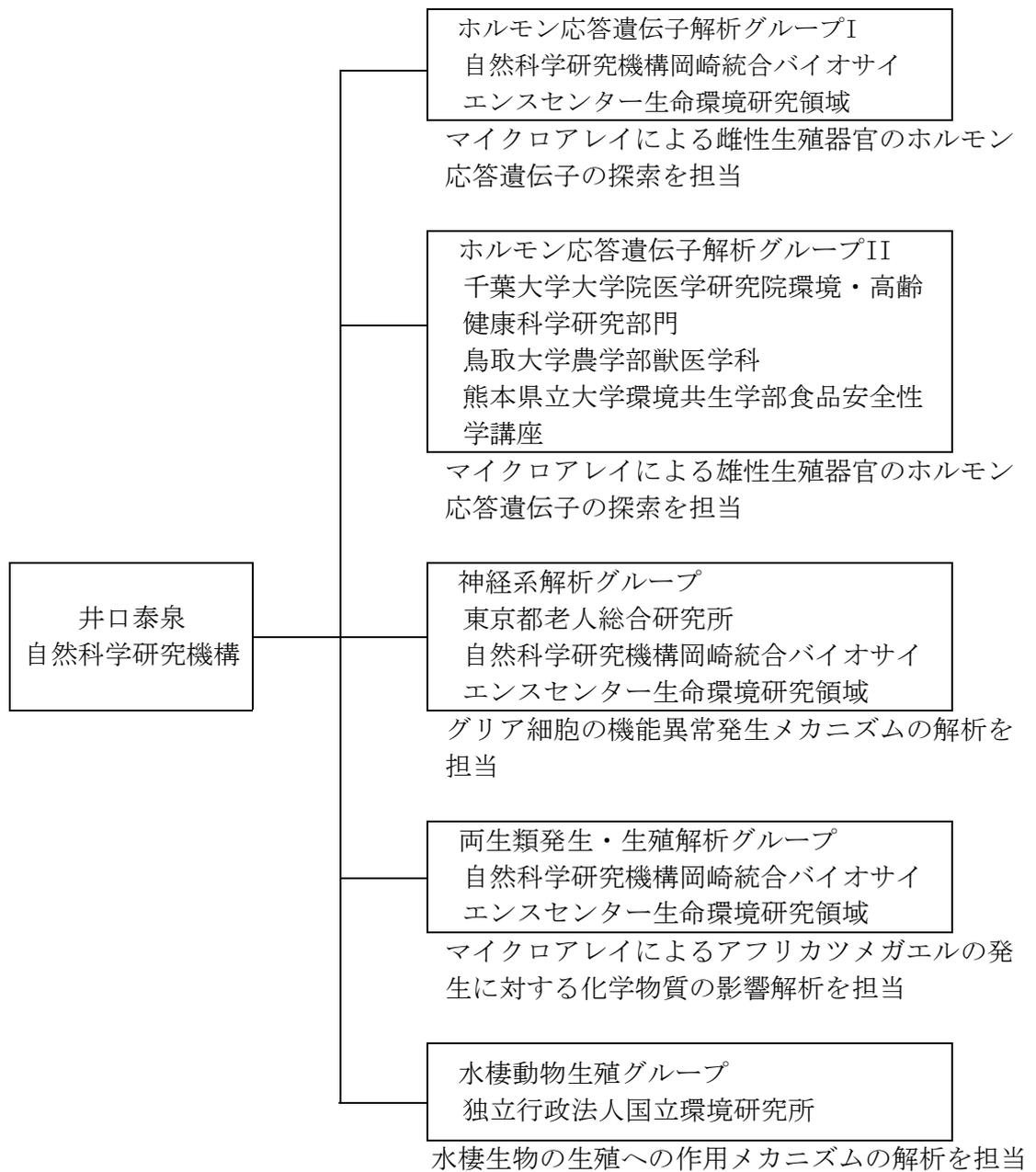
#### (2) 研究成果の今後期待される効果

巻貝のインポセックス発症メカニズムに関しては、有機スズ化合物によりアロマターゼが阻害され、蓄積されたアンドロゲンがインポセックスを発症させるという説があったが、イボニシで脊椎動物と同様なステロイド産生が行われているか研究されていない。本研究から、イボニシ体内でのステロイドホルモンの存在、アンドロゲ

ンからエストロゲンへの芳香化の可能性が示唆された。しかし、アロマターゼの阻害やアンドロゲンがインポセックスを発症させているとは考えにくい。また、神経ペプチドやアミンがインポセックスの発症に関連しているという説も否定的である。有機スズ化合物が核内受容体の **RXR** を介してインポセックスを発症させる結果を得ているので、今後はこの方面の研究を展開する必要がある。無脊椎動物のように内分泌系が解明されていない動物を対象にする場合には、今後も基礎的な研究が不可欠である。**RXR** を介した系が他の巻貝にも当てはまる一般的な現象であるのかを検証することも必要である。さらに、**ER** 類似配列をもつ受容体のリガンド非依存性の遺伝子の活性化が起こることを見出した。**ER** が進化的にいつからできてくるのかなど、系統進化学の分野への貢献も期待される。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制



##### (2) メンバー表

###### ①ホルモン応答遺伝子解析グループI

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
井口泰泉	自然科学研究機構	教授	ホルモン応答遺伝子の解析	H11,11～
渡邊 肇	〃	助教授	受容体の解析	H12,4～

勝 義直	〃	助手	ホルモン応答遺伝子の解析	H12,4～
水谷 健	〃	技術職員		H12,2～
David Buchanan	〃	CREST研究員	ホルモン応答遺伝子の探索	H12,4～ H13,7
奥村弘樹	〃	非常勤研究員	雌マウスからのホルモン応答遺伝子の解析・胎盤透過性	H12,5～ H13,7
鈴木敦子	〃	CREST技術員	ホルモン応答遺伝子の解析	H13,6～
市川理恵	〃	CREST技術員	ホルモン応答遺伝子の解析	H15,4～
梶山千恵子	〃	CREST研究補助員	ホルモン応答遺伝子の探索	H12,4～ H15,4
日名子恵	〃	CREST研究補助員	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,4～
後藤麻友	〃	CREST研究補助員	ホルモン応答遺伝子の探索	H15,4～
今泉妙依子	〃	CREST研究補助員		H12,4～
永富恵美子	〃	CREST研究補助員		H11,11～ H12,3
宮川信一	〃	博士課程3年	ホルモン応答遺伝子の探索	H13,10～
永田恵美子	〃	博士課程3年	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,10～
加藤英男	〃	博士課程3年	ホルモン応答遺伝子の探索	H15,10～
小林美佳	〃	博士課程2年 (CREST技術員 H14,4～H15,3)	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,4～
石本洋一	〃	博士課程1年	ホルモン応答遺伝子の探索	H16,4～
内田 薫	〃	博士課程1年	ホルモン応答遺伝子の探索	H11,11～ H12,9
高橋絵理	〃	派遣技術員	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,4～
板本明咲枝	〃	派遣技術員	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,9～ H16,3
高須絵里	〃	CREST研究補助員(時給制)	ホルモン応答遺伝子の探索	H13,9～ H14,4

小林かおる	〃	短時間契約 職員	ホルモン応答遺伝子の探索	H14,4～
-------	---	-------------	--------------	--------

②ホルモン応答遺伝子解析グループ II

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
森 千里	千葉大学	教授	雄マウスからのホルモン応答遺伝子の解析・胎盤透過性	H11,11～
足達哲也	千葉大学	CREST研究員	ホルモン応答遺伝子の探索	H12,4～ H14,3
芝山孝子	千葉大学	CREST技術員	ホルモン応答遺伝子の探索	H12,2～ H14,1
太田康彦	鳥取大学	教授	胎盤形成への影響	H11,11～
仁科行雄	横浜市立大学	助教授	生殖細胞への影響	H11,11～ H14,3
有菌幸司	熊本県立大学	教授	センチュウのホルモン応答遺伝子の解析・胎盤透過性	H11,11～
浦 和寛	熊本県立大学	CREST研究員	センチュウのホルモン応答遺伝子の解析	H12,6～H15,3
宮原真紀	熊本県立大学	CREST研究補助員	センチュウのホルモン応答遺伝子の解析	H12,4～H14,3
坂田幸子	熊本県立大学	CREST研究補助員	センチュウのホルモン応答遺伝子の解析	H14,4～H15,3
古賀由香里	熊本県立大学	CREST研究補助員	センチュウのホルモン応答遺伝子の解析	H15,4～

③神経系解析グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
竹内浩昭	静岡大学	助教授	鳥類の神経・行動	H11,11～ H14,3
佐藤真彦	横浜市立大学	教授	魚類の神経・行動	H11,11～ H14,3
阿相皓晃	東京都老人総合研究所	研究室長	神経発生・分化	H11,11～
漆谷博志	自然科学研究機構	非常勤研究員	ホルモン応答遺伝子の探索	H11,11～ H13,12 H15,2～
井口泰泉	自然科学研究機構	教授	魚類の発生影響	H11,11～

④両生類発生・生殖解析グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
菊山 栄	早稲田大学	教授	カエル・イモリの生殖行動	H11,11～ H14,3
曾根清明	自然科学研究機構	CREST研究員(H15,10～)	アフリカツメガエルのホルモン応答遺伝子の解析	H13,10～
河野郷通	自然科学研究機構	特別協力研究員	アマガエル皮膚の水分吸収機構	H11,11～ H15,7
井口泰泉	自然科学研究機構	教授	アマガエル皮膚の水分吸収機構	H11,11～

⑤水棲動物生殖グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
堀口敏宏	独立行政法人 国立環境研究所	主任研究員	海産巻き貝インポセックス機構	H11,11～
鑪迫典久	独立行政法人 国立環境研究所	主任研究員	水棲無脊椎動物への発生影響	H11,11～

5. 研究期間中の主な活動

(1)ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H11.12.13-14	環境ホルモン ワークショップ	パシフィックホテル横浜、はまぎんホール・ヴィアマーレ	200名	内分泌かく乱物質の動物及びヒトに与える影響
H12.2.10-11	第1回チーム会議	横浜市立大学国際交流会議室	20名	研究進捗状況の報告
H13.1.6	第2回チーム会議	自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター	20名	研究進捗状況の報告
H13.3.3-5	45 <sup>th</sup> International NIBB Conference - 内分泌攪乱物質研究の最新動向	自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター	450名	市民講座、内分泌攪乱作用メカニズム解明および試験法開発
H13.6.17	千葉大学環境生命医学市民講座	千葉大学けやき会館	300名	環境に関する市民講座

H13.10.27	千葉大学環境生命医学市民講座	千葉大学けやき会館	300名	環境に関する市民講座
H13.11.25	千葉大学環境生命医学市民講座	千葉大学けやき会館	300名	環境に関する市民講座
H14.1.7	第3回チーム会議	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	20名	研究進捗状況の報告
H14.2.22	第1回千葉大学DNAマイクロアレイ Workshop	千葉大学けやき会館、共同研究推進センター	40名	研究者間の交流および情報交換、共同研究立案、DNAマイクロアレイ研究推進、
H14.3.10	千葉大学環境生命医学市民講座	千葉大学けやき会館	300名	環境に関する市民講座
H14.6.7	第4回チーム会議	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	20名	研究進捗状況の報告
H15.1.9	第5回チーム会議	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	20名	研究進捗状況の報告
H15.10.6-7	エコトキシコゲノミクス シンポジウム	自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター	40名	遺伝子レベルにおける生物への環境影響の評価・解析
H16.1.30	第6回チーム会議	自然科学研究機構岡崎統合バイオサイエンスセンター	20名	研究進捗状況の報告

(2) 招聘した研究者等

無し

6. 主な研究成果物、発表等

(1) 論文発表 (国内 67 件、海外 118 件)

1. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, **T. Iguchi** and Y. Ohta.: Differences in methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumor lines. *Cancer Lett.*, 138: 167-174, 1999.
2. Cunha, G.R., J.-G. Forsberg, R. Golden, A. Haney, **T. Iguchi**, R. Newbold, S. Swan and W. Welshons.: New approaches for estimating risk from exposure to diethylstilbestrol. *Environ. Health Perspect.*, 107 (Suppl. 4): 625-630, 1999.
3. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K.: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, 48: 1-17, 1999.
4. Hirabayashi, H., T. Sato, S. Kohno, M. Tanaka, S. Kobayashi, Y. Ohta and T. Iguchi.: Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. *Anat. Rec.*, 254: 205-213, 1999.
5. Fukazawa, Y. and T. Iguchi.: Effects of steroid hormones and growth factors on the development of the male mouse reproductive tract *in vitro*. *Zool. Sci.*, 16: 153-160, 1999.
6. Murakami, K., Asou, H., Kunimoto, M., Adachi, T., and Uyemura, K. Neural glycolipid and ganglioside composition of type-1 and type-2 astrocytes from rat cerebral hemisphere. *J. Neurosci. Res.*, 55: 382-393, 1999.
7. Toda, M., Miura, M., Asou, H., Sugiyama, I., Kawase, T., and Uyemura, K.: Suppression of glial tumor growth by expression of glial fibrillary acidic protein. *Neurochem. Res.*, 24: 339-343, 1999.
8. Akiyama, K., Sakurai, Y., Asou, H., and Senshu, T.: Localization of peptidylarginine deiminase type 2 in a stage specific immature oligodendrocyte. *Neurosci. Lett.*, 273: 53-56, 1999.
9. Yamane, Y., Shiga, H., Asou, H., Haga, H., Kawabata, K., Abe, K., and Ito, E.: Dynamics of astrocyte adhesion as analyzed by a combination of atomic microscopy and immunocytochemistry; the involvement of actin filaments and connexin 43 in the early stage of adhesion. *Arch. Histol. Cytol.*, 62: 355-361, 1999.
10. Seiwa, C., Sugiyama, I., Yagi, T., Iguchi, T., and Asou, H.: Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath formation in the central nervous system. *Neurosci. Res.*, 23: 1-11, 2000.
11. Osaki, E., Y. Nishina, J. Inazawa, N. Copeland, D. Gilbert, N.A. Ohsugi, T. Tezuka, M. Yoshida, and K. Semba.: Identification of a novel SSry-related gene and its germ cell-specific expression. *Nuc.Acids Res.* 27: 2503-2510, 1999.
12. Kudo, Y., Satou, M., Kitamura, S., Iwata, M. and Takeuchi, Y.: A newly designed underwater antenna and its application to underwater radio-telemetry for measuring electroencephalographic activity from the rainbow trout freely swimming in natural environments. *Frontiers Med. Biol. Engineer.*, 9 (4), 285-294, 1999.
13. M. Huruno and M. Satou.: Long-term potentiation and olfactory memory formation in the carp olfactory bulb. In: *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, ed. by T. Kato, Elsevier Science, Amsterdam, pp25-26, 2000.
14. R. Hoshikawa, Y. Sato and M. Satou.: An *in vitro* study of long-term potentiation in the carp olfactory bulb. In: *Frontiers of the Mechanisms of Memory and Dementia*, ed. by T. Kato, Elsevier Science, Amsterdam, pp27-28, 2000.

15. Hashimoto, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, **T. Iguchi** and K. Fujita: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, Japan. *Marine Environ. Res.*, 49: 37-53, 2000.
16. **Iguchi, T.**: Hormonal Chaos. *Nature Med.*, 6: 246-247, 2000.
17. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, **T. Iguchi** and **Y. Ohta**: Further study of methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumors. *Anticancer Res.*, 20: 379-384, 2000.
18. **Iguchi, T.**: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs. *Trabajos del Instituto Cajal. Tomo LXXVII*: 52-53, 2000.
19. **Iguchi, T.**: Embryonic and neonatal exposure to endocrine-altering contaminants: effects on mammalian female reproduction. In: *Environmental Endocrine Disruptors*. Eds. L. Guillette, Jr. and D.A. Crain, Taylor & Francis, New York, pp. 234-268, 2000.
20. **Iguchi, T.** and T. Sato: Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zoologist*, 40: 402-411, 2000.
21. Seiwa, C., I. Sugiyama, T. Yagi, **T. Iguchi** and **H. Asou**: Fyn tyrosine kinase participates in the compact myelin sheath formation in the central nervous system. *Neurosci. Res.*, 37, 21-31, 2000.
22. Watanabe, H., D.L. Buchanan, H. Handa and **T. Iguchi**: Global analysis of gene expression induced by environmental endocrine disruptors. *Perspective in Comparative Endocrinology: Unity and Diversity*, Goos, H.J.Th., Rastogi, R.K., Vaudry, H. and Pierantoni, R. (eds.), Monduzzi Editore, pp.147-151, 2001.
23. Yamamura, Y., **Y. Ohta**, **T. Iguchi** and A. Matsuzawa: Metallothionein expression and apoptosis in pregnancy-dependent and -independent mouse mammary tumors. *Anticancer Res.*, 21: 1145-1150, 2001.
24. Yamamura, Y., M. Tamano, **T. Iguchi** and **Y. Ohta**: Methallothionein expression and tumor growth in the transplantable pregnancy-independent mouse mammary tumor. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 687-689, 2001.
25. Okada, A., T. Sato, **Y. Ohta**, D. L. Buchanan and **T. Iguchi**: Effect of diethylstilbestrol on cell proliferation and expression of epidermal growth factor in the developing female rat reproductive tract. *J. Endocrinol.*, 170:539-554, 2001.
26. **Iguchi, T.**, H. Watanabe and Y. Katsu: Developmental effects of estrogenic agents on mice, fish and frogs: a mini review. *Horm. Behav.*, 40: 248-251, 2001.
27. Shibayama, T., H. Fukata, K. Sakurai, T. Adachi, M. Komiyama, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Neonatal exposure to genistein reduces expression of estrogen receptor  $\alpha$  and androgen receptor in testes of adult mice. *Endocr. J.*, 48: 655-663, 2001.
28. Miyagawa, S., D.L. Buchanan, T. Sato, **Y. Ohta**, Y. Nishina and **T. Iguchi**: Characterization of diethylstilbestrol-induced hypospadias in female mice. *Anat. Rec.*, 266: 43-50, 2002.
29. Suzuki, A., A. Sugihara, K. Uchida, T. Sato, **Y. Ohta**, Y. Katsu, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod. Toxicol.*, 16: 107-116, 2002.
30. Buchanan, D.L., S. Ohsako, C. Tohyama, P.S. Cooke and **T. Iguchi**: Dioxin inhibition of estrogen-induced mouse uterine epithelial mitogenesis involves changes in cyclin and transforming growth factor- $\beta$  expression. *Toxicol. Sci.* 66: 62-68, 2002.
31. Okada, A., **Y. Ohta**, D.L. Buchanan, T. Sato, S. Inoue, H. Hori, M. Muramatsu and **T. Iguchi**: Changes in ontogenetic expression of estrogen receptor  $\alpha$  and not of estrogen receptor  $\beta$  in the female rat reproductive tract. *J. Mol. Endocrinol.*, 28: 87-97, 2002.

32. Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and **T. Iguchi**: Oocyte apoptosis during the transition from ovary-like tissue to testes during sex differentiation of juvenile zebrafish. *J. Exp. Biol.*, 205: 711-718, 2002.
33. Honma, S., A. Suzuki, D.L. Buchanan, Y. Katsu, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Low dose effect of *in utero* exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod. Toxicol.*, 16: 117-122, 2002.
34. Shimamura, M., K. Kodaira, K. Hino, Y. Ishimoto, H. Tamura and **T. Iguchi**: Comparison of antiandrogenic activities of vinclozolin and d,l-camphorquinone in androgen receptor gene transcription assay *in vitro* and mouse *in utero* exposure assay *in vivo*. *Toxicology*, 174: 97-107, 2002.
35. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, S. Kohno, D.B. Lubahn, H. Handa and **T. Iguchi**: Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen. *Genes Cells*, 7: 497-507, 2002.
36. **Iguchi, T.**, H. Watanabe, Y. Katsu, T. Mizutani, S. Miyagawa, A. Suzuki, K. Sone and H. Kato: Developmental toxicity of estrogenic chemicals on rodents and other species. *Congen. Anorm.*, 42: 94-105, 2002.
37. **Iguchi, T.**, M. Sumi and S. Tanabe: Endocrine disruptor issues in Japan. *Congen. Anorm.*, 42: 106-119, 2002.
38. **Iguchi, T.**: Endocrine disruptors and sexual differentiation. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, 11 (Suppl. 18): 51-58, 2002.
39. **Tatarazako, N.**, Y. Takao, K. Kishi, N. Onikura, **K. Arizono** and **T. Iguchi**: Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnia (*Ceriodaphnia dubia*). *Chemosphere*, 48: 597-601, 2002.
40. **Tatarazako, N.**, Oda, S., Sonobe, H., Watanabe, H., Morita, M., and **Iguchi, T.**: Insecticides for juvenile hormone agonists exert the influence on the occurrence of the male daphnid. *Proc. Jpn. Soc. Comp. Endocrinol.*, 17:87, 2002.
41. Ishibashi, H., M. Kobayashi, T. Koshiishi, T. Moriwaki, K. Tachibana, M. Tsuchimoto, K. Soyano, **T. Iguchi**, **C. Mori** and **K. Arizono**: Induction of plasma vitellogenin synthesis by the commercial fish diets in male goldfish (*Carassius auratus*) and dietary phytoestrogens. *J. Health Sci.*, 48: 427-434, 2002.
42. Adachi, T., M. Komiyama, Y. Ono, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, M. Kato, T. Yoshikawa, N. Seki, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Toxicogenomic effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol on mouse testicular gene expression in the long term: a study using cDNA microarray analysis. *Mol. Reprod. Devel.*, 63: 17-23, 2002.
43. **Arizono, K.**, K. Ura, N. Tominaga, T. Kai, Y. Kohara and **T. Iguchi**: *C. elegans* as a tool for environmental toxicology. In *Toxicogenomics*, Inoue, T. and Pennie, W.D. (eds.), Springer, p. 129-134, 2002.
44. Sonoda, R., T. Matsuno, K. Ura, H. Uesugi, Y. Kohara, **T. Iguchi**, **K. Arizono** and N. Tominaga.: Detection of testosterone target genes using *Caenorhabditis elegans* cDNA microarray. *Environmental Sciences*, 9, 145, 2002.
45. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, H. Handa and **T. Iguchi**: Large-scale gene expression analysis for evaluation of endocrine disruptors. In *Toxicogenomics*, Inoue, T. and Pennie, W.D. (eds.), Springer, p. 149-155, 2002.
46. Katsu, Y., E. Takasu and **T. Iguchi**: Estrogen-independent expression of neuropsin, a serin protease in the vagina of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 195: 99-107, 2002.

47. Urushitani, H., A. Shimizu, Y. Katsu and **T. Iguchi**: Early estrogen exposure induces abnormal development of *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.*, 293: 693-702, 2002.
48. Okada, A., Y. Ohta, D.L. Buchanan, T. Sato and **T. Iguchi**: Effect of estrogens on ontogenic expression of progesterone receptor in the fetal female rat reproductive tract. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 195: 55-64, 2002.
49. Uchida, K., A. Suzuki, Y. Kobayashi, D.L. Buchanan, T. Sato, H. Watanabe, Y. Katsu, J. Suzuki, K. Asaoka, C. Mori, **K. Arizono** and **T. Iguchi**: Bisphenol-A administration during pregnancy results in fetal exposure in mice and monkeys. *J. Health Sci.*, 48: 579-582, 2002.
50. Ura, K., T. Kai, S. Sakata, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Aquatic acute toxicity testing using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Health Sci.*, 48: 583-586, 2002.
51. Ura, K., T. Kai, S. Sakata, N. Tominaga, R. Sonoda, H. Uesugi, Y. Kohara, **T. Iguchi**, and **K. Arizono**.: Effects of estrogenic compounds on development in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Sciences*, 9 Suppl: 155, 2002.
52. Kai, T., K. Ura, S. Sakata, N. Tominaga, R. Sonoda, H. Uesugi, Y. Kohara, **T. Iguchi**, and **K. Arizono**.: Analysis of biological effect of heavy metal exposure using *C. elegans*. *Environmental Sciences*, 9 Suppl: 156, 2002.
53. Matsuno, T., K. Ura, R. Sonoda, Y. Kohara, H. Uesugi, **K. Arizono**, **T. Iguchi** and N. Tominaga: Sensing of chemical substances using gene expression patterns in *C. elegans*. *Sensors Materials*, 14: 395-406, 2002.
54. Ohko, Y., K.-I. Iuchi, C. Niwa, T. Tatsuma, T. Nakashima, **T. Iguchi**, Y. Kubota and A. Fujishima: 17 $\beta$ -Estradiol degradation by TiO<sub>2</sub> photocatalysis as a means of reducing estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.*, 36: 4175-4181, 2002.
55. **Iguchi, T.** and H. Watanabe: Developmental effects of hormonally active agents on animals: from daphnia to humans. *Environ. Sci.*, 10 Suppl.: 43-60, 2003.
56. Watanabe, H. and **T. Iguchi**: Evaluation of endocrine disruptors based on gene expression using a micorarray. *Environ. Sci.*, 10 Suppl.: 61-67, 2003.
57. Tominaga, N., K. Ura, M. Kawakami, T. Kawaguchi, S. Kohra, Y. Mitui, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: *Caenorhabditis elegans* responses to specific steroid hormones. *J. Health Sci.* 49: 28-33, 2003.
58. Adachi, T., Y. Matsuno, A. Sugimura, K. Takano, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, **T. Iguchi**, **C. Mori** and M. Komiyama: ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Mol. Reprod. Devel.*, 64: 414-421, 2003.
59. Kato, H., T. Ota, T. Furuhashi, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod. Toxicol.*, 17: 283-288, 2003.
60. Sato, T., Y. Fukazawa, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Multiple mechanisms are involved in apoptotic cell death in the mouse uterus and vagina induced by ovariectomy. *Reprod. Toxicol.*, 17: 289-297, 2003.
61. Katsu, Y., D. Lubahn and **T. Iguchi**: Expression of novel C-type lectin in the mouse vagina. *Endocrinology*, 144: 2597-2605, 2003.
62. Urushitani, H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and **T. Iguchi**: Cloning and characterization of estrogen receptor  $\alpha$  in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Mol. Cell. Endocr.*, 203: 41-50, 2003.
63. Okada, A., Y. Ohta, S. Inoue, H. Hiroi, M. Muramatsu and **T. Iguchi**: Expression of estrogen, progesterone and androgen receptors in the oviduct of developing, cycling and

- pre-implantation rats. *J. Mol. Endocr.*, 30: 301-315, 2003.
64. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Kobayashi, D. Lubahn, H. Handa and **T. Iguchi**: Analysis of temporal changes in the expression of estrogen regulated genes in the uterus. *J. Mol. Endocr.*, 30: 347-358, 2003.
  65. Kohno, S., Y. Kamishima and **T. Iguchi**: Molecular cloning of an anuran V<sub>2</sub> type [Arg<sup>8</sup>] vasotocin receptor and mesotocin receptor: functional characterization and tissue expression in the Japanese tree frog (*Hyla japonica*). *Gen. Comp. Endocr.*, 132: 485-498, 2003.
  66. Guillette, L.J.Jr. and **T. Iguchi**: Interspecies variation in the estrogenicity of *p,p'*-DDE. *Organohalogen Compounds*, 65: 71-73, 2003.
  67. **Tatarazako, N.**, S. Oda, H. Watanabe, M. Morita and **T. Iguchi**: Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, 53: 827-833, 2003.
  68. Guillette, L.J.Jr. and **T. Iguchi**: Contaminant-induced endocrine and reproductive alterations in reptiles. *Pure Appl. Chem.*, 75: 2275-2286, 2003.
  69. Inui, M., T. Adachi, S. Takenaka, H. Inui, M. Nakazawa, M. Ueda, H. Watanabe, **C. Mori**, **T. Iguchi** and K. Miyatake: Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology*, 194: 43-50, 2003.
  70. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Kobayashi, D.B. Lubahn, H. Handa and **T. Iguchi**: Similarities and differences in uterine gene expression patterns caused by treatment with physiological and non-physiological estrogen. *J. Mol. Endocr.*, 31: 487-497, 2003.
  71. Miyahara, M., H. Ishibashi, M. Inudo, H. Nishijima, **T. Iguchi**, L.J.Jr. Guillette and **K. Arizono**: Estrogenic activity of a diet to estrogen receptors- $\alpha$  and  $-\beta$  in an experimental animal. *J. Health Sci.*, 49: 481-491, 2003.
  72. Tominaga, N., S. Kohra, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: A multi-generation sublethal assay of phenols using the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Health Sci.*, 49: 459-463, 2003.
  73. Adachi, T., K.-B. Koh, H. Tainaka, Y. Matsuno, Y. Ono, K. Sakurai, H. Fukata, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol. Reprod. Devel.*, 67: 19-25, 2004.
  74. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Estrogen-independent activation of ErbBs signaling and estrogen receptor  $\alpha$  in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Oncogene*, 23: 340-349, 2004a.
  75. Uchida, D., M. Yamashita, T. Kitano and **T. Iguchi**: An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. *Comp. Biochem. Physiol. Part A*: 137: 11-20, 2004.
  76. Katsu, Y., D.S. Bermudez, E.L. Braun, C. Helbing, S. Miyagawa, M.P. Gunderson, S. Kohno, T.A. Bryan, L.J. Guillette, Jr. and **T. Iguchi**: Molecular cloning of the estrogen and progesterone receptors of the American alligator. *Gen. Comp. Endocr.*, 136: 122-133, 2004.
  77. Matsuno, Y., T. Adachi, K.B. Koh, H. Fukata, A. Sugimura, K. Sakurai, T. Shibayama, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol on testicular gene expression in adult mouse: comprehensive analysis with cDNA subtraction method. *Internat. J. Androl.*, 27: 115-122, 2004.
  78. Adachi, T., Y. Ono, K.B. Koh, K. Takashima, H. Tainaka, Y. Matsuno, S. Nakagawa, E. Todaka, K. Sakurai, H. Fukata, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Long-term alteration of gene expression without morphological change in testis after neonatal exposure to

- genistein in mice: Toxicogenomic analysis using cDNA microarray. *Food Chem. Toxicol.*, 42: 445-452, 2004.
79. Kato, H., T. Iwata, Y. Katsu, H. Watanabe, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using *in vitro* assay. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 1410-1414, 2004.
  80. Adachi T, K.B. Koh, H.. Tanikawa, Y. Matsuno, Y. Ono, K. Sakurai, H. Fukata, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Toxicogenomic difference between diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol in mouse testicular gene expression by neonatal exposure. *Mol. Reprod. Devel.*, 67: 19-25, 2004.
  81. Kohno, S., M. Fujime, Y. Kamishima and **T. Iguchi**: Sexually dimorphic basal water absorption at the pelvic patch of Japanese tree frog *Hyla japonica*. *J. Exp. Zool.*, 301A: 428-438, 2004.
  82. **Tatarazako, N.**, M. Koshio, H. Hori, M. Morita and **T. Iguchi**: Validation of an enzyme-linked immunosorbent assay method for vitellogenin in the medaka. *J. Health Sci.*, 50: 301-308, 2004.
  83. Miyagawa, S., A. Suzuki, Y. Katsu, M. Kobayashi, M. Goto, H. Handa, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *J. Mol. Endocr.*, 32: 663-677, 2004b.
  84. Okada, A., **Y. Ohta**, S.L. Brody, A. Krust, P. Chambon and **T. Iguchi**: Essential role of foxj1, but not of estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct. *J. Mol. Endocr.*, 32: 615-625, 2004.
  85. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, D.B. Lubahn, H. Handa and **T. Iguchi**: Tissue-dependent estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocr.*, 33: 243-252, 2004.
  86. Okada, A., **Y. Ohta**, S.L. Brody and **T. Iguchi**: Epithelial c-jun and c-fos are temporally and spatially regulated by estradiol during neonatal rat oviduct differentiation. *J. Endocrinol.*, 182: 219-227, 2004.
  87. Sato, T., Y. Fukazawa, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Sustained mRNA expressions of growth factors participate in inducing estrogen-independent persistent proliferation of vaginal epithelium of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.*, 19: 43-51, 2004.
  88. Kohno, S., M. Fujime, Y. Kamishima and **T. Iguchi**: Sexually dimorphic basal waterabsorption at the isolated pelvic patch of Japanese tree frog, *Hyla japonica*. *J. Exp. Zool.*, 301A: 428-438, 2004.
  89. Seiwa, C., K. Tanaka, J. Nakahara, T. Komiyama, Y. Katsu, **T. Iguchi** and **H. Asou**: Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cell. *Neuroendocrinology*, 80(1): 21-30, 2004.
  90. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effect of 17 $\beta$ -estradiol, nonylphenol and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *Gen. Comp. Endocr.* 138(3): 228-236, 2004.
  91. Yoshinaga, N., E. Shiraishi, T. Yamamoto, **T. Iguchi**, S.-I. Abe and T. Kitano: Sexually dimorphic expression of a teleost homologue of Mullerian inhibitory substance (MIS) during gonadal sex differentiation in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 322(2): 508-13, 2004.
  92. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, S. Ohsako, C. Tohyama, H. Handa and **T. Iguchi**: Comparative uterine gene expression analysis after dioxin and estradiol administration. *J.*

- Mol. Endocr.* (in press).
93. **Iguchi, T.**, H. Watanabe and Y. Katsu: Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. *Environ. Health Perspect.*, (in press).
  94. Tominaga, N., S. Kohra, **T. Iguchi**, and **K. Arizono**: Effects of perfluoro organic compound toxicity on nematode *Caenorhaditis elegans* fecundity. *J. Health Sci.* (in press).
  95. Sakurai, K., E. Todaka, Y. Suzuki and **C. Mori**: An experimental model using guinea pigs to reduce accumulated dioxins in the body. *Cong. Anom. Kyoto*, 42: 323-326, 2002.
  96. Tobe, T., N. Toyota, Y. Matsuno, M. Komiyama, T. Adachi, H. Ito and **C. Mori**: Embryonic myosin heavy chain and troponin T isoforms remain in cremaster muscle of adult cryptorchid rats induced with flutamide. *Arch. Histol. Cytol.*, 65: 279-290, 2002.
  97. Yang, Y.-G., N. Toyota, T. Tobe, Y. Matsuno, K. Takano, K.-B. Koh, M. Komiyama M and **C. Mori**: Immunohistochemical changes of androgen receptor and estrogen receptors alpha and beta in the gubernaculum of cryptorchid rats during testicular descent. *Acta Histochem. Cytochem.*, 35: 281-286, 2002.
  98. **Mori, C.**, A. Hamamatsu, H. Fukata, K.-B. Koh, N. Nakamura, S. Takeichi, T. Kusakabe, T. Saito, M. Morita, S. Tanihara, F. Kayama, M. Shiyomi, J. Yoshimura and K. Sagisaka: Temporal changes in testis-weight during the last 50 years in Japan. *Anat. Sci. Int.*, 77: 109-116, 2002.
  99. Todaka, E. and **C. Mori**: Necessity to establish new risk assessment and risk communication for human fetal exposure to multiple endocrine disruptors in Japan. *Cong. Anom. Kyoto*, 42: 87-93, 2002.
  100. Takano, K., M. Komiyama, N. Toyota and **C. Mori**: Alteration of androgen receptor immunoexpression by neonatal DES-treatment in mouse epididymis. *Cong. Anom. Kyoto*, 42: 36-37, 2002.
  101. Sugiyama, I., K. Tanaka, M. Akita, K. Yoshida, K. Kawase and **H. Asou**: Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old rat. *J. Neurosci. Res.*, 70: 309-317, 2002.
  102. Sugawa, M., Y. Sakurai, Y. Ishikawa-Ieda, H. Suzuki and **H. Asou**: Effects of erthropoietin (Epo) on glial cell development ; Oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *J. Neurosci. Res.*, 44: 391-404, 2002.
  103. Matsuno, Y., M. Komiyama, T. Tobe, N. Toyota, T. Adachi and **C. Mori**: Association of testicular undescend induced by prenatal flutamide treatment with thickening of the cremaster muscle in rats. *Reprod. Med. Biol.*, 2: 109-113, 2003.
  104. Nakagawa. S. and **C. Mori**: Detection of mitomycin C-induced testicular toxicity by micronucleus assay in mice. *Reprod. Med. Biol.*, 2: 69-72, 2003.
  105. Nakamura, N., M. Komiyama, M. Fujioka and **C. Mori**: Sorting specificity of spermatogenic cell specific region of mouse hexokinase-s (mHk1-s). *Mol. Reprod. Dev.*, 64: 113-119, 2003.
  106. **Mori, C.**, M. Komiyama, T. Adachi, K. Sakurai, D. Nishimura, K. Takashima and E. Todaka: Application of toxicogenomic analysis to risk assessment of delayed long-term effects of multiple chemicals including endocrine disruptors in human fetuses. *Environ. Health Perspect.*, 111: 803-809, 2003.
  107. Komiyama, M., T. Adachi and **C. Mori**: Analysis of toxicogenomic response to endocrine disruptors in the mouse testis. In: Toxicogenomics, T. Inoue and W.D. Pennie (eds.), Springer-Verlag Tokyo, Tokyo, pp. 156-162, 2003.
  108. Adachi, T, **C. Mori**, K. Sakurai, K. Shihara and K. Yasuda: Morphological changes and

- increased sucrase and isomaltase activity in small intestines of insulin-deficient and type 2 diabetic rats. *Endocrine J.*, 50: 271-279, 2003.
109. Nakahara, J., C. Seiwa, A. Shibuya, S. Aiso and **H. Asou**: Expression of Fc receptor for IgM in oligodendrocytes and myelin of mouse CNS. *Neurosci.Lett.*, 337: 73-76, 2003.
  110. Nakahara, J., K. Tan-Takeuchi, C. Seiwa, T. Kaifu, A. Ujike, M. Inui, T. Yagi, M. Ogawa, T. Aiso, T. Takai and **H. Asou**: Signaling via immunoglobulin Fc receptors induce oligodendrocyte precursor cell differentiation. *Dev.Cell*, 4: 841-852, 2003.
  111. Hirano, M., H. Ishibashi, N. Matsumura, Y. Nagao, N. Watanabe, A. Watanabe, N. Onikura, K. Kishi, and **K. Arizono**: Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *J. Health Sci.*, 50: 97-100, 2004.
  112. Sakurai, K, M. Kawazuma, T. Adachi, T. Harigaya, Y. Saito, H. Hashimoto and **C. Mori**: Bisphenol A affects to glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *Brit. J. Pharmacol.*, 141: 209-214, 2004.
  113. **Tatarazako, N.**, H. Ishibashi, K. Teshima, K. Kishi, and **K. Arizono**: Effects of triclosan on various aquatic organisms. *Environ. Sci.*, 11: 133-140, 2004.
  114. Nomura, Y., M. Okazaki, W. Teshima, T. Kawahara, N. Tanaka, H. Ishibashi and **K. Arizono**: Genotoxicity of dental resin polymerization initiators *in vitro*. *J. Materials Sci.*, 15: 1-4, 2004.
  115. **Horiguchi, T.**, Z. Li, S. Uno, M. Shimizu, H. Shiraishi, M. Morita, J.A.J. Thompson, and C.D. Levings: Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada. *Mar. Environ. Res.*, 57: 75-88, 2003.
  116. Nakada N., H. Nyunoi, M. Nalamura, A. Hara, **T. Iguchi**, H. and Takada: Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
  117. Oda, S., **Tatarazako, N.**, Watanabe, H., Morita, M., and **Iguchi, T.**: Production of male neonates in 4 cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. (Submitted)
  118. Oda, S., **Tatarazako, N.**, Watanabe, H., Morita, M., and **Iguchi, T.**: Induction of male neonates in *D. magna* (*Crustacea, Cladocera*) by juvenile hormones and their analogs. (in preparation)
  119. 阿相皓晃、永吉道子、清和千佳：グリア異常のモデル動物. *Clinical Neuroscience*, 17: 982-985, 1999.
  120. 阿相皓晃：“培養系におけるオリゴデンドロサイト” in 脳と神経：分子神経生物学入門(分担)、金子、川村、植村編、共立出版(東京), p.p. 198-205, 1999.
  121. 阿相皓晃：“Neural Development”, Vol. 1, Vol. 2, (K. Uymura, K. Kawamura, T. Yazaki, Eds.) (分担) Springer-Verlag, (Tokyo) p.p. 249-245, p.p. 267-272, p.p. 298-303, p.p. 333-336, p.p. 355-360, p.p. 526-532, 1999.
  122. 井口泰泉：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の野生動物への影響. *性差医学* 6: 36-44, 2000.
  123. 井口泰泉：生活環境と生殖機能. *医学のあゆみ*, 192: 1118-1119, 2000.
  124. 井口泰泉：内分泌攪乱物質と生殖腺附属器官の不可逆的異常. *実験医学*, 18: 747-751, 2000.
  125. 井口泰泉：内分泌攪乱物質と野生生物の生殖異常. *産婦人科の実際*. 49: 1031-1038, 2000.
  126. 井口泰泉：化学物質のリスクと安全性. *化学工業*, 51: 770-776, 2000.
  127. 井口泰泉：巻頭言 環境ホルモン研究に期待されること. *科学*, 70: 909, 2000.
  128. 井口泰泉：内分泌攪乱物質（環境ホルモン）. *医学のあゆみ*, 195: 1074-1076, 2000.

- 129.井口泰泉、渡邊 肇、有菌幸司：内分泌攪乱化学物質による生態系への影響－ゴードン会議から－. 日本臨床, 58: 2401-2408, 2000.
- 130.井口泰泉：海外におけるダイオキシン曝露地域住民の長期健康調査研究. 日本臨床, 58: 2502-2507, 2000.
- 131.足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、小宮山政敏、芝山孝子、井口泰泉、森千里：植物エストロゲンおよび内分泌攪乱物質の精子形成への影響評価に対するDNAマイクロアレイを用いた判定法. Chiba Med. J. 77: 151-158, 2001
- 132.井口泰泉：解説, 奪われし未来. 増補改訂版, 翔泳社, pp.435-466, 2001.
- 133.井口泰泉：生命と環境. 妊娠の生物学. 永井書店、29-35, 2001.
- 134.井口泰泉：環境ホルモン（内分泌攪乱化学物質）問題からみた科学. 科学, 71: 1567-1569, 2001.
- 135.渡邊 肇、井口泰泉、諸橋憲一郎：内分泌攪乱物質の生体内作用発現にかかわる性ステロイド受容体の役割. 日本臨床, 60: 397-403, 2002.
- 136.井口泰泉：魚類に対するノニルフェノールの影響評価および可塑剤のリスク評価. 医学のあゆみ. 201: 123-126, 2002.
- 137.井口泰泉、鷺見 学：野生生物の変異と解明された機序. 最新医学, 57: 221-228, 2002.
- 138.井口泰泉：環境ホルモン対策. 産業調査会編「食品設備・機器事典～食品流通・加工技術・環境衛生～」, 1085-1090, 2002.
- 139.井口泰泉：環境ホルモンの野生動物への影響と研究の状況. かんきょう, 27(3): 15-17, 2002.
- 140.井口泰泉：第4章 動物の新生児の発達への環境ホルモンの影響. 松井、田辺、森、井口、吉原、有菌、森沢著, 「環境ホルモンの最前線」, pp. 89-134. 有斐閣選書, 2002.
- 141.井口泰泉：論あいち、朝日新聞 2002年10月12日.
- 142.井口泰泉（監修）環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 334, 2003.
- 143.井口泰泉、鷺見 学、川嶋之雄：ノニルフェノール. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 120-133, 2003.
- 144.井口泰泉、宮川信一：サンスクリーン. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp. 321-328, 2003.
- 145.鈴木敦子、井口泰泉：野生動物への影響. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発, CMC 出版, pp.79-112, 2003.
- 146.井口泰泉：鍵と鍵穴の謎. 中日新聞, 7月5日 夕刊, 2003.
- 147.井口泰泉：白い粉 DDT. 中日新聞, 7月12日 夕刊, 2003.
- 148.井口泰泉：カエル. 中日新聞, 7月19日 夕刊, 2003.
- 149.井口泰泉：薬と環境. 中日新聞, 7月26日 夕刊, 2003.
- 150.井口泰泉：カエルが危ない. 中日新聞, 8月2日 夕刊, 2003.
- 151.井口泰泉：ワニの調査. 中日新聞, 8月9日 夕刊, 2003.
- 152.井口泰泉：日ごろの注意. 中日新聞, 8月16日 夕刊, 2003.
- 153.井口泰泉：ダイオキシンの内分泌攪乱作用に新たな知見. 現代化学, No. 390: 8-9, 2003.
- 154.井口泰泉：課題は山積. 中日新聞, 8月23日 夕刊, 2003.
- 155.井口泰泉：アルママータ. 中日新聞, 8月30日 夕刊, 2003.
- 156.井口泰泉：母乳の味と匂い. 中日新聞, 9月6日 夕刊, 2003.
- 157.井口泰泉：環境保護と法律. 中日新聞, 9月13日 夕刊, 2003.
- 158.井口泰泉：キスの研究. 中日新聞, 9月20日 夕刊, 2003.
- 159.井口泰泉：恩師のノート. 中日新聞, 9月27日 夕刊, 2003.

- 160.井口泰泉：論文の別刷. 中日新聞, 10月4日 夕刊, 2003.
- 161.井口泰泉：サケとPCB. 中日新聞, 10月11日 夕刊, 2003.
- 162.井口泰泉：動物のストレス. 中日新聞, 10月18日 夕刊, 2003.
- 163.井口泰泉：薬害の予防. 中日新聞, 10月25日 夕刊, 2003.
- 164.井口泰泉：容器の劣化. 中日新聞, 11月1日 夕刊, 2003.
- 165.井口泰泉：ミジンコ. 中日新聞, 11月8日 夕刊, 2003.
- 166.井口泰泉：偶然と必然. 中日新聞, 11月15日 夕刊, 2003.
- 167.井口泰泉：弱る森林. 中日新聞, 11月22日 夕刊, 2003.
- 168.井口泰泉：睡眠のリズム. 中日新聞, 11月29日 夕刊, 2003.
- 169.井口泰泉：文化の情報交換. 中日新聞, 12月6日 夕刊, 2003.
- 170.井口泰泉：複合影響. 中日新聞, 12月13日 夕刊, 2003.
- 171.井口泰泉：より安全な環境. 中日新聞, 12月20日 夕刊, 2003.
- 172.井口泰泉：新たな成果. 中日新聞, 12月27日 夕刊, 2003.
- 173.井口泰泉：DESと女性性器悪性腫瘍. 産婦人科の実際. 52: 2353-2362, 2003.
- 174.井口泰泉：環境ホルモン研究と野生動物・生態系. 科学 74: 53-58, 2004.
- 175.井口泰泉：野生動物の内分泌攪乱のメカニズムを探る. 現代化学 No. 397: 34-39, 2004.
- 176.井口泰泉：環境ホルモンによる生態系の攪乱. 環境研究, No. 132: 60-68, 2004.
- 177.井口泰泉：化学物質管理の必要性. 「化審法改正のポイント」. 中園繁克、塚島順一編. 化学工業日報社. pp. 458, 2004.
- 178.井口泰泉：内分泌攪乱物質の作用メカニズム：ステロイドホルモン受容体からオーファン受容体へ. 化学と生物, (印刷中).
- 179.中原仁、阿相皓晃：中枢神経系におけるミエリン形成機構. 生化学, 75: 395-399, 2003.
- 180.鑓迫典久： *Ceriodaphnia dubia* を用いたミジンコ繁殖阻害試験. 日本環境毒性学会編. 生態影響試験ハンドブック. 朝倉書店, 83-87, 2003.
- 181.堀口敏宏：環境ホルモンが生態系に及ぼす影響 (2)-巻貝類のインポセックスの原因物質・有機スズ化合物に対する規則及び対策-. 環境ホルモン 文明・社会・生命, 3, pp.217-229, 2003.
- 182.堀口敏宏：第 I 編 環境ホルモン研究の最新動向 第 2 章 2.1 イボニシやアワビ類などの海産腹足類. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発(井口泰泉監修, CMC 出版, 334p.), pp.55-62, 2003.
- 183.堀口敏宏：第 I 編 環境ホルモン研究の最新動向 第 3 章 4 有機スズ化合物に対する規制と対策. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発 (井口泰泉監修, CMC 出版, 334p.), pp.145-153, 2003.
- 184.堀口敏宏：第 II 編 環境ホルモンの測定・分析・試験・機器開発 第 1 章 5 有機スズ化合物の分析法. 環境ホルモンの最新動向と測定・試験・機器開発 (井口泰泉監修, CMC 出版, 334p.), pp.179-192, 2003.
- 185.鑓迫典久、小田重人、阿部良子、森田昌敏、井口泰泉：ミジンコを用いた甲殻類に対する内分泌攪乱化学物質のスクリーニング法開発. 環境科学会誌 (印刷中).

(2) 口頭発表

① 招待、口頭講演 (国内 15 件、海外 18 件)

1. **Iguchi, T.:** Developmental Effects of Estrogenic Agents on Mice, Fish and Frogs. Joint Meeting of the VI th International Conference on Hormones, Brain and Behavior & The Society for Behavioral Neuroendocrinology, (Madrid Spain), August 8, 2000.
2. **Iguchi, T.:** Endocrine disruptor issue: developmental effects of estrogenic agents in animals. Annual Symposium of the Korean Society of Endocrinology, November 24, 2000.
3. **Iguchi, T.:** Gordon Research Conference, (Mass., USA.), July 2002.
4. **Iguchi, T.:** OECD Workshop on Fish Histopathology, (Netherlands), September 2002.
5. **Iguchi, T.:** Environmental endocrine disruptor issues in Japan. Chemicas in the Environment: Hazards for Human Development, (University of California at Irvine), December 2, 2000.
6. **Iguchi, T.:** Medaka: current studies in Japan. Colloquim on the Use of Japanese Medaka Fish in Risk Assessment Process. Mid-Continent Ecology Division, (Duluth, MN, USA.), July 30-Augst 1, 2002.
7. **Iguchi, T.:** Endocrine disruptor issues in Japan. the 2<sup>nd</sup> POPs Conference, (Taiwan University), December 6, 2002.
8. **Iguchi, T.:** Current strategies against environmental endocrine disrptors by the Ministry of Environment, Government of Japan. Water Research Consevation: EDC and Toxins, (Stellenbosh University, Republic of South Africa), May 5, 2003.
9. **Iguchi, T.:** Recent works using molecular techniques –from daphnia to mouse-. Water Research Consevation: EDC and Toxins, (Stellenbosh University, Republic of South Africa), May 6, 2003.
10. **Iguchi, T.:** Changes in my life and research after Wingspread meeting. Wingspread II, (Western State College of Colorado, USA), July 18, 2003.
11. **Iguchi, T.:** Research evolution from irreversible changes by early estrogen treatment to developmental disorders exposed to environmental endocrine disruptors. e. hormone. (New Orleans, USA.), October, 2003.
12. **Iguchi, T.:** Cloning of genes from America alligators and roach. (University of Pretoria, Republic of South Africa), March 2004.
13. **Iguchi, T.:** Situation in Japan. Environmental Endocrine Issue with Review Pesticides: Policy and Procedure, AGCHEM Forum, (London, U.K.), June 17-19, 2003.
14. **Iguchi, T.:** Sience for Assessing the Impacts of Human Pharmaceuticals on Aquatic Ecosystems. SETAC Pellston Workshop. (Salt Lake City, USA.), July, 2003.
15. **Iguchi, T.:** Endocrine disruptor issues in Japan and OECD: current strategies and our own research from Daphnia to mouse. Endocrine Disrupting Chemicals (EDC) Symposium in conjunction with the 19<sup>th</sup> Scientific Meeting Malaysian Society of Pharmacology and Physiology. (University of Malaya, Kuala Lumpur, Malyasia), May 17-18, 2004.
16. **Iguchi, T.:** Evaluation of endocrine disruptors based on gene expression using a DNA microarray. Gordon Research Conference: Environmental Endocrine Disurptors, (Colby-Sawyer College, New London, USA.), June 6-11, 2004.
17. **Iguchi, T.:** Endocrine disruption studies in Japan – a focus on molecular advances. CREDO Ecological Relevance of Chemically-Induced Endocrine Disruption in Wildlife. (University of Exeter, U.K.), July 5-7, 2004.
18. **Iguchi, T.:** SETAC Pellston Workshop: Emerging Molecular and Computational Approaches for Cross-Species Extrapolations, (Portland, Oregon, USA.), July 18-22 , 2004.

19. 井口泰泉：動物学から見た内分泌攪乱物質（環境ホルモン）．公開シンポジウムー 1．日本動物学会第 71 回大会，(東京)，2000 年 9 月 23 日．
20. 井口泰泉：第 41 回日本先天異常学会、(横浜) 2001 年 7 月．
21. 井口泰泉：第 14 回国際発生生物学会（京都）2001 年 7 月．
22. 井口泰泉：Developmental Effects of Estrogenic Chemicals on Animals and Some Efforts on Endocrine Disruptor Issues in Japan. 前立腺生物学シンポジウム伊勢志摩 2002（鳥羽）2002 年 10 月．
23. 井口泰泉：Chemicals and Environment (Endocrine Disruptor Issues in Japan). 環境医学研究所国際シンポジウム（名古屋）2002 年 10 月．
24. 井口泰泉：動物と環境ホルモン．親と子の動物学探検 - 動物と環境（松江）2002 年 11 月．
25. 井口泰泉：内分泌攪乱物質の最新動向．日本総合健診医学会第 31 回大会（横浜）2003 年 1 月．
26. 井口泰泉：内分泌かく乱問題の動向 - トキシコジェノミクスの応用．特別講義（熊本）2003 年 5 月．
27. 井口泰泉：内分泌攪乱化学物質研究の最近の動向．内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム（湘南）2003 年 6 月．
28. 井口泰泉、渡邊 肇、鈴木敦子：マイクロアレイ方によるエストロゲン応答遺伝子の探索．第 13 回乳癌基礎研究会（鳥取）2003 年 8 月．
29. 井口泰泉：内分泌攪乱化学物質の動物への影響について考える．日本動物学会第 74 回大会（函館）2003 年 9 月．
30. 井口泰泉：財団法人食品農医薬品安全性評価センター第 11 回学術講演会．2003 年 11 月 6 日．
31. 井口泰泉：これまでの取組について-研究者の取組．第 6 回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム（仙台）2003 年 12 月．
32. 井口泰泉：Toxicogenomics と生態毒性．環境科学研究会，(東京) 2004 年 1 月．
33. 井口泰泉：内分泌攪乱物質問題から Ecotoxicogenomics へ．日本学術会議環境保健学研連主催公開シンポジウム 「内分泌攪乱物質問題と健康リスクー研究の最前線と到達点ー」（東京）2004 年 9 月 17 日．

② ポスター発表（国内 174 件、国際 90 件）

1. Fan, O-W., *et al.*, Expression and regulation of apolipoprotein E receptors in the cells of the central nervous system in culture. Society for Neuroscience, 29<sup>th</sup> Annual Meeting,, (Miami Beach, Florida, USA), October 1999.
2. Itoh, K., *et al.*, Relationship between immature oligodendrocytes and myelination in vitro. Society for Neuroscience, 29<sup>th</sup> Annual Meeting, (Miami Beach, Florida, USA), October 1999.
3. Nagai, I., *et al.*, Novel migration of Cns neuroblasts in three-dimensional matrices of a collagen lattice with laminin: a self-squeezing hypothesis for migration. Society for Neuroscience, 29<sup>th</sup> Annual Meeting,, (Miami Beach, Florida, USA), October 1999.
4. Yamane, Y., *et al.*, Time-dependent dynamics of fine three-dimensional structures of astrocytes observed by atomic force microscopy. Society for Neuroscience, 29<sup>th</sup> Annual Meeting, (Miami Beach, Florida, USA), October 1999.
5. Adachi, T., *et al.*, The role of type-1 astrocytes on the differentiation of A2B5-positive glial progenitor cells isolated from embryonic rat brain. Society for Neuroscience, 29<sup>th</sup> Annual Meeting, (Miami Beach, Florida, USA), October 1999.

6. Kohno, S., Y. Kamishima, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of estrogenic chemicals on water absorption in skin of Japanese Tree Frog, *Hyla arborea japonica*. Gordon Research Conferences, Environmental Endocrine disruptors, (New Hampshire, USA), June 2000.
7. Kohno, S., Y. Kamishima, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of estrogenic chemicals on water absorption in skin of Japanese Tree Frog, *Hyla arborea japonica*. United States-Japan Workshop on Environmental Hormones, Center for Bioenvironmental Research, (Tulane and Xavier Universities, New Orleans, USA), June 2000.
8. **Arizono, K.**, Y. Mitsui, T. Kai, K. Ura, **T. Iguchi**, S. Kohra and N. Tominaga: DNA microarray system by *C. elegans* to detect environmental estrogen. SETAC 21<sup>st</sup> Annual Meeting in North America., (Tennessee, USA), November 12-16, 2000.
9. Uchida K, A. Suzuki, D. Buchanan, H. Watanabe, Y. Kobayashi, J. Suzuki, K. Asaoka, **C. Mori** and **T. Iguchi**: Administration of bisphenol A during pregnancy results in direct fetal exposure. e. hormone 2000, (Tulane and Xavier Universities, New Orleans, USA), 2000.
10. **Mori, C.**, K. Sakurai and **T. Iguchi**: Detection of several endocrine disruptors in human umbilical cords and cord serum in Japan. e. hormone 2000, (Tulane and Xavier Universities, New Orleans, USA), 2000.
11. Sakurai, K., T. Adachi, T. Shibayama, K. Asaoka, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Fetal exposure to phytoestrogens in monkeys. e. hormone 2000, (Tulane and Xavier Universities, New Orleans, USA), 2000.
12. Ura, K., N. Tominaga, H. Uesugi, R. Sonoda, T. Kai, M. Miyahara, Y. Kohara, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Detection of estrogen and bisphenol A target genes using cDNA microarray in *C. elegans*. The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference, (Okazaki), March 3-5, 2001.
13. **Horiguchi, T.**, H.S. Cho, M. Lu, H. Shiraishi, M. Morita, A. Okubo and S. Yamazaki: Endocrine disruption and populations decline in gastropod molluscs, caused by organotins from antifouling paints. Abstract Book of the 45<sup>th</sup> NIBB International Conference, "Recent Progress in Endocrine Disruptor Research", p.32, (Okazaki), March 3-5, 2001.
14. **Mori, C.** and **T. Iguchi**: Increasing Importance of Biological Markers and DNA Microarray Analysis for Assessing Fetal Exposure on Endocrine Disruptors. The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference: Abstracts: 46, (Okazaki), March 3-5, 2001.
15. Takano, K., M. Komiyama and **C. Mori**: Analysis of expression pattern of sex hormone receptor during normal and diethylstilbestrol-treated epididymis development in mice. XVIth Testis Workshop, Regulatory Mechanisms of Testicular Cell Differentiation, Final program and abstract book, pp 82, (Okazaki), March 3-5, 2001.
16. Komiyama, M., K. Takano, T. Adachi, N. Seki and **C. Mori**: Effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol (DES) on expression patterns of sex hormone receptors in mouse epididymis during postnatal development. The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference Abstracts: 75, (Okazaki), March 3-5, 2001.
17. Sakurai, K., K. Asaoka, M. Teraoka, H. Miyakawa, M. Uzuki, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Transplacental transfer of phytoestrogens in humans and monkeys. The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference: Abstracts: 76, (Okazaki), March 3-5, 2001.
18. Adachi, T., K. Sakurai, M. Komiyama, N. Seki, T. Shibayama, **T. Iguchi** and **C. Mori**: A DNA microarray analysis for the effect of spermatogenesis to endocrine disruptors in mice. The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference Abstract: 74, (Okazaki), March 3-5, 2001.
19. **Takeuchi, H.** and H. Muraoka: Effects of bisphenol A on the development and learning behavior in the chick, The 45<sup>th</sup> International NIBB Conference "Recent Progress in Endocrine Disruptor Research": abstract p.84, (Okazaki), March 3-5, 2001.

20. Kohno, S., A. Shinohara, A. Suzuki, M. Araki, T. Sato and **T. Iguchi**: Effects of prenatal exposure to DES and bisphenol A on male mice. The 45th International NIBB Conference "Recent Progress in Endocrine Disruptor Research": Abstract p.79, (Okazaki), March 3-5, 2001.
21. Watanabe, H., A. Suzuki, T. Mizutani, H. Handa and **T. Iguchi**: Evaluation of endocrine disruptors by DNA microarray. Abst. #33, e, hormone, (Tulane Univ., New Orleans, USA), Oct. 18-20, 2001.
22. Ura, K., N. Tominaga, H. Uesugi, R. Sonoda, S. Sakata, T. Kai, M. Miyahara, Y. Kohara, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Analysis of endocrine disrupting chemicals using *C. elegans* cDNA microarray. 国際会議 SETAC/AP2001., (kanazawa), November 2, 2001.
23. Katsu, Y., L.J. Guillette Jr., S. Miyagawa and **T. Iguchi**: Molecular cloning of hormone receptors of the American alligator. Gordon Research Conference, (Mass., USA.), July, 2002.
24. Watanabe, H. and **T. Iguchi** : Genome-wide analysis of changes in early gene expression induced by estrogen. Gordon Research Conference, (Mass., USA.), July, 2002.
25. **Tatarazako, N.**, M. Koshio, K. Kawabe, M. Morita, H. Watanabe, and **T. Iguchi**: Insecticides for juvenile hormone agonists exert the influence on the occurrence of the male daphnid. Abstract, SETAC 23<sup>rd</sup> Annual Meeting in North America p271, 2002.
26. Nakahara, J., K. Takeuchi, C. Seiwa, T. Kaifu, A. Ujike, T. Yagi, T. Aiso, M. Ogawa, T. Takai and **H. Asou**: The gamma chain of immunoglobulin Fc receptors triggers myelinogenesis of oligodendrocytes. Society for Neuroscience 32<sup>th</sup> Annual Meeting, (Orland, Florida, USA), November, 2002.
27. Komiyama, M, T. Adachi and **C. Mori**: The long-term effects of neonatal exposure to endocrine disruptors on testicular gene expression in mice. Society of Toxicology 41<sup>st</sup> Annual Meeting, (Nashville, USA), March 17-21, 2002.
28. Sakurai, K, E. Todaka, H. Miyakawa, M. Uzuki, H. Osada, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi and **C. Mori**: Fetal hormonal condition is affected by phytoestrogen transferred from mother. Society of Toxicology 41<sup>st</sup> Annual Meeting, (Nashville, USA), March 17-21, 2002.
29. Komiyama, M., T. Adachi and **C. Mori**: Alteration of gene expression profile in adult mouse testes by neonatal exposure to endocrine disruptors. The 3<sup>rd</sup> Asian Pacific International Congress of Anatomists, (Hamamatsu, Japan), March 29-31, 2002.
30. Sato, K., T. Adachi, M. Komiyama, K.-B. Koh, Y. Ono, H. Tainaka and **C. Mori**: Gene expression analysis during mouse testis development using in-house cDNA microarrays. The 3<sup>rd</sup> Asian Pacific International Congress of Anatomists, (Hamamatsu, Japan), March 29-31, 2002.
31. Toyota, N., T. Tobe, Y. Matsuno, K. Takano, K.-B. Koh, M. Komiyama and **C. Mori**: Immunohistochemical study on protein isoforms of cremaster muscle during testicular descent. The 3<sup>rd</sup> Asian Pacific International Congress of Anatomists, (Hamamatsu, Japan), March 29-31, 2002.
32. Ono, Y., T. Adachi, M. Komiyama, K.-B. Koh, H. Tainaka, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Neonatal exposure to diethylstilbestrol and genistein changes gene expression and morphology in mouse testes. The 3<sup>rd</sup> Asian Pacific International Congress of Anatomists, (Hamamatsu, Japan), March 29-31, 2002.
33. Adachi, T., K.-B. Koh, Y. Ono, H. Tainaka, M. Komiyama, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol on mouse testicular gene expressions. EUROTOX2002 (Budapest, Hungary), Sep. 2002.

34. Todaka, E. and **C. Mori**: Necessity to establish a new method of risk avoidance by multiple chemicals exposure to human fetus. 30<sup>th</sup> Conference of the European Teratology Society, (Hannover, Germany), September 7-11, 2002.
35. Adachi, T., K. Koh, Y. Ono, H. Tainaka, M. Komiyama, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Toxicogenomic effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and estradiol on mouse testicular gene expressions. 30<sup>th</sup> Conference of the European Teratology Society, (Hannover, Germany), September 7-11, 2002.
36. Komiyama, M., T. Adachi, Y. Ono, N. Seki and **C. Mori**: Construction of mouse epididymis DNA microarray for the evaluation of molecular effects of exposure to endocrine disruptors. 30<sup>th</sup> Conference of the European Teratology Society, (Hannover, Germany), September 7-11, 2002.
37. Adachi, T., M. Komiyama, Y. Matsuno, A. Sugimura, K. Koh, K. Sakurai, K. Yamazaki, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Effect of neonatal exposure to diethylstilbestrol on epididymal gene expression using cDNA subtraction method. Asian Andrology Forum, (Shanghai, China), October 17-20, 2002.
38. Nishimura, D., K. Takashima, T. Adachi, K. Sakurai, M. Komiyama and **C. Mori**: Toxicogenomic analysis of endocrine disrupters effect on human umbilical vein endothelial cells. Toxicogenomics International Forum 2002, (Okazaki, Japan), October 23-24, 2002.
39. Takashima, K., D. Nishimura, T. Adachi, K. Sakurai, M. Komiyama and **C. Mori**: Toxicogenomic analysis of gene expression in human umbilical cords. Toxicogenomics International Forum 2002, (Okazaki, Japan), October 23-24, 2002.
40. Adachi, T., Y. Matsuno, K. Koh, A. Sugimura, Y. Ono, H. Tainaka, K. Sakurai, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Toxicogenomic analysis of mouse testicular gene expression on neonatal exposure to exogenous estrogen. Toxicogenomics International Forum 2002, (Okazaki, Japan), October 23-24, 2002.
41. Todaka, E., K. Sakurai, H. Miyakawa, M. Uzuki, H. Osada, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi and **C. Mori**: Phytoestrogens in cord serum and maternal serum in Japan. 2nd Copenhagen Workshop on Endocrine Disruptors, (Copenhagen, Denmark), December 7-9, 2002.
42. **Ohta, Y.**, N. Saishu, T. Ishibashi and **T. Iguchi**: Effect of neonatal treatment with bisphenol-A on the rat uterus with reference to decidual response. e. hormone 2002., (New Orleans, USA.), Oct., 2002
43. Komiyama, M., D. Nishimura, K. Takashima, T. Adachi and **C. Mori**: Gene expression analysis of human umbilical cords for risk assessment of fetal exposure to multiple chemicals. Teratology Society 43<sup>rd</sup> Annual Meeting, (Philadelphia, Pennsylvania USA), June 21-26, 2003.
44. Anahara, R., Y. Ono, Y. Toyama and **C. Mori**: Effects of flutamide on mouse spermatogenesis : morphological study. Teratology Society 43<sup>rd</sup> Annual Meeting, (Philadelphia, Pennsylvania USA), June 21-26, 2003.
45. Todaka, E., K. Sakurai, H. Miyakawa, M. Uzuki, H. Osada, M. Omori, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Relationship between maternal and cord serum concentrations of phytoestrogens in human. Teratology Society 43<sup>rd</sup> Annual Meeting, (Philadelphia, Pennsylvania USA), June 21-26, 2003.
46. Anahara, R., Y. Ono, Y. Toyama and **C. Mori**: Morphological changes in mouse tests after treatment with flutamide. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy) September 28- October 1, 2003.
47. Fukata, H., T. Adachi, M. Komiyama, K. Sakurai and **C. Mori**: Analysis of microarray data

- revealed the long-term effects of neonatal exposure to genistein and bisphenol A on gene expression in mice. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy), September 28- October 1, 2003.
48. Yamazaki, K., Y. Ono, T. Adachi, N. Seki, **C. Mori** and M. Komiyama: The effects of neonatal exposure to endocrine disruptors (EDs) in mouse epididymis. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy), September 28- October 1, 2003..
  49. Nishimura, D., T. Adachi, K. Sakurai, H. Fukata, M. Komiyama and **C. Mori**: Endocrine disruptors change gene expression of human umbilical vein endothelial cells but do not affect on cell proliferation. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy), September 28- October 1, 2003..
  50. Todaka, E., K. Sakurai, H. Miyakawa, M. Uzuki, H. Osada, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Analysis of phytoestrogen which are transferred from mother to fetus: Focusing on equol-daizein metabolite. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy), September 28- October 1, 2003..
  51. Komiyama, M., D. Nishimura, K. Takashima, T. Adachi and **C. Mori**: Toxicogenomics analysis of human umbilical cords to establish a new risk assessment of human fetal exposure to multiple chemicals. 41<sup>st</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, (Florence, Italy), September 28- October 1, 2003..
  52. Yamazaki, K., Y. Ono, T. Adachi, H. Fukata, K. Kojima, K. Chiba, **C. Mori** and M. Komiyama: The effects of neonatal exposure to exogenous estrogen in mouse epididymis. Toxicogenomics International Forum, (Tokyo, Japan), October 9-10, 2003.
  53. Fukata, H., K. Koh, K. Sato, K. Yamazaki and **C. Mori**: Toxicogenomics on reproductive organs of male mouse. e.hormone Symposium 2003 (New Orleans, Louisiana, USA), October 16, 2003.
  54. Anahara, R., Y. Toyama and **C. Mori**: Histological observation of mouse testes after single treatment of flutamide, and combined treatment of flutamide and beta-estradiol 3-benzoate. Workshop on Low Dose Effects of Endocrine Active Compounds, (Berlin, Germany), November 20-22, 2003.
  55. Komiyama, M., K. Takashima, D. Nishimura, T. Adachi, H. Fukata, H. Osada and **C. Mori**: Relationship between gene expression and concentration of chemicals in human umbilical cords. Workshop on Low Dose Effects of Endocrine Active Compounds, (Berlin, Germany), November 20-22. 2003.
  56. Todaka, E., H. Osada, M. Omori, H. Miyakawa, M. Uzuki, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, K. Sakurai, H. Fukata, **T. Iguchi** and **C. Mori**: Analysis of phytoestrogen in maternal and fetal serum -- Does equol, diadzein metabolite, affect the level of endogenous estrogens of fetus? Workshop on Low Dose Effects of Endocrine Active Compounds, (Berlin, Germany), November 20-22. 2003.
  57. Takashima, K., H. Fukata, E. Todaka, H. Kato, **T. Iguchi**, T. Adachi, M. Komiyama and **C. Mori**: Chronic exposure to isoflavone during pregnancy affects postnatal development in mice? Workshop on Low Dose Effects of Endocrine Active Compounds, (Berlin, Germany), November 20-22. 2003.
  58. Koga, Y., K. Ura, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Application of DNA microarray analysis using CYP Chip in *C. elegans*. Ecotoxicogenomics Forum, (Okazaki), October 6-7, 2003.
  59. Koga, Y., K. Ura, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Application of DNA microarray analysis using CYP Chip in *C. elegans*. Toxicogenomics International Forum 2003, (Tokyo), October 9-10, 2003.

60. **Arizono, K.**, Y. Koga, T. Nakamoto, S. Sakata, H. Ishibashi, H. Kimura, K. Ura and **T. Iguchi**: Effect of environmental chemicals on post-embryonic development in *C.elegans*. SETAC Europe 13<sup>th</sup> Annual Meeting, (Hamburg, Germany), April 27-May 1, 2003.
61. Sone K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* -Analysis of gene expression using macroarray- SETAC 24<sup>th</sup> Annual Meeting, (Texas, USA), November 2003.
62. Ishibashi T., **Y. Ohta**, H. Kato and **T. Iguchi**: Age-related changes of reproductive function in female rats given bisphenol-A neonatally. E .hormone 2003, (Louisiana, USA), October 2003.
63. Miyagawa S., Y. Katsu, H. Wanatabe and **T. Iguchi**: Estrogen-independent activation of ErbBs signalling and estrogen receptor  $\alpha$  in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. e.hormone 2003, (Louisiana, USA), October 2003.
64. Kohno S., Y. Katsu, T. Bryant, D. Bermudez, M. Gunderson, B. Moore, **T. Iguchi** and Guillette L.J.Jr.: Gene expression patterns in juvenile American alligator (*Alligator mississippiensis*) exposed to environmental contaminants. e.hormone2003, (Louisiana, USA), October 2003.
65. Sone K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* embryos -Analysis of gene expression using DNA array-.Toxicogenomics International Forum, (Tokyo), October 2003.
66. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of estrogenic chemicals on developing *Xenopus laevis* embryos-Analysis of gene expression using DNA array- Ecotoxicogenomics, (Okazaki), October 2003.
67. Sone K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Molecular cloning of cDNAs encoding two androgen receptors and DMRT1 from mosquito fish. Ecotoxicogenomics, (Okazaki), October 2003.
68. **Horiguchi, T.**, Y. Katsu, **Y. Ohta**, H. Watanabe, **T. Iguchi**, F. Morishita, O. Matsushima, H. Shiraishi and M. Morita.:Is Inhibition of aromatase activity due to TBT exposure the primary factor for gastropod imposex?, 12<sup>th</sup> International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (Primo 12), (Tampa, Florida, U.S.A.), Abstracts, p.134, May 2003.
69. **Horiguchi, T.**, F. Morishita, H. Minakata, O. Matsushima, H. Shiraishi and M. Morita:Preliminary results on effects of neuropeptides on the development of imposex in the rock shell, *Thais clavigera*. SETAC ASE, (Christchurch, NZ), SETAC ASE Programme and Abstracts, p.283, Sep. 2003.
70. Treuner, A., A. Sugimoto and **T. Horiguchi** : Molluskan organ culture for the study of mode of action of TBT-induced imposex development in the rock shell *Thais clavigera*. SETAC ASE, (Christchurch, NZ), SETAC ASE Programme and Abstracts, p.284, Sep. 2003.
71. **Horiguchi, T.**, H.S. Cho, M. Kojima, M. Kaya, H. Shiraishi, M. Morita and M. Shimizu: Abalone endocrine disruption, caused by organotins from antifouling paints. 5<sup>th</sup> International Abalone Symposium, (Qingdao, China), 5<sup>th</sup> International Abalone Symposium Program & Abstracts, pp.70-71, Oct. 2003.
72. Kim, D.M., **T. Horiguchi**, H. Shiraishi and O. Nakasugi: Ecological modeling for organic chemicals in marine environment using coupled 3D hydrodynamic and ecotoxicological model, SETAC 24<sup>th</sup> Annual Meeting in North America, (Austin, Texas, U.S.A.), SETAC 24<sup>th</sup> Annual Meeting in North America Abstract Book, pp.277-278, Nov. 2003.
73. **Horiguchi, T.**, H. Shiraishi and M. Morita: Specific tissue distributions of organotin

- compounds in prosobranch gastropods. SETAC 24<sup>th</sup> Annual Meeting in North America, (Austin, Texas, U.S.A.), SETAC 24<sup>th</sup> Annual Meeting in North America Abstract Book, p.290, Nov. 2003.
74. **Horiguchi, T.**, H. Shiraishi, H.S. Cho, Y. Katsu, **Y. Ohta**, **T. Iguchi**, F. Morishita, O. Matsushima, T. Nishikawa, F. Shiraishi, M. Morita, and J. Nishikawa: Current status of contamination by organotin compounds and imposex in gastropods from Japan and possible physiological / biochemical mechanism of organotin-induced imposex in gastropods, 第6回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム, 仙台, 第6回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウムプログラム・アブストラクト集, p.28, Dec. 2003.
  75. **Horiguchi, T.**, H. Shiraishi, H.S. Cho, Y. Katsu, **Y. Ohta**, **T. Iguchi**, F. Morishita, O. Matsushima, T. Nishikawa, F. Shiraishi, M. Morita and J. Nishikawa: Endocrine disruption and population declines, caused by organotin compounds in marine snails, ICEBAMO 03, (Pau, France), Abstracts: p.23, Dec. 2003.
  76. Cho, H.S., S.W. Seol and **T. Horiguchi**: Less recovery from imposex in the rock shell, *Thais clavigera* and organotin pollution in Korea. Proceedings of International Symposium on Antifouling Paint and Marine Environment (InSAfE), pp.107-110, 2004.
  77. **Horiguchi, T.**, H. Shiraishi, H.S. Cho, Y. Katsu, **Y. Ohta**, **T. Iguchi**, F. Morishita, O. Matsushima, T. Nishikawa, F. Shiraishi, M. Morita and J. Nishikawa: Endocrine disruption caused by organotin compounds in Japanese gastropods: Current status and the mode of action of organotin compounds. Proceedings of International Symposium on Antifouling Paint and Marine Environment (InSAfE), pp.111-115, 2004.
  78. **Arizono, K.**, Y. Koga, K. Ura, H. Kimura, N. Tominaga, H. Uesugi, Y. Kohara and **T. Iguchi**: Effects of endocrine disruptors on *Caenorhabditis elegans* and cytochrome P450 gene expressions using DNA microarray analysis. SETAC Europe 14<sup>th</sup> Annual Meeting, April 18-22, 2004 (Prague).
  79. Koga, Y., K. Ura, H. Kimura, N. Tominaga, H. Uesugi, Y. Kohara, **T. Iguchi** and **K. Arizono**: Effects of endocrine disruptors on *Caenorhabditis elegans* and cytochrome P450 gene expressions using DNA microarray analysis. CREDO Ecological Relevance of Chemically-Induced Endocrine Disruption in Wildlife, (University of Exeter, U.K.), July 5-7, 2004.
  80. Katsu, Y., A. Lange, R. Ichikawa, S. Jobling, C.R. Tyler and **T. Iguchi**: Molecular cloning of aromatases and oestrogen receptors and their expression in the gonad and brain during early development of roach (*Rutilus rutilus*). CREDO Ecological Relevance of Chemically-Induced Endocrine Disruption in Wildlife, (University of Exeter, U.K.), July 5-7, 2004.
  81. Takashima, K., H. Fukata, H. Kato, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Effect of chronic exposure to isoflavone on postnatal development of mice. The Society of Toxicology (SOT) Annual Meeting 2004, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
  82. Anahara, R., Y. Toyama and **C. Mori**: Combined effects of flutamide and  $\beta$ -estradiol 3-benzoate on adult mouse testes. Society of Toxicology 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & TOXEXPO, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
  83. Yamazaki, K., Y. Ono, T. Adachi, H. Fukata, K. Kojima, K. Chiba, **C. Mori** and M. Komiyama: The effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and 17 $\beta$ -estradiol in mouse epididymis. Society of Toxicology 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & TOXEXPO, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
  84. Komiyama, M. and **C. Mori**: A trial of toxicogenomic analysis of human umbilical cords

- for developing a new risk assessment method of fetal exposure to multiple chemicals. Society of Toxicology 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & TOXEXPO, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
85. Takashima, T., H. Fukata, H. Kato, **T. Iguchi**, M. Komiyama and **C. Mori**: Effects of chronic exposure to isoflavone on postnatal development of mice. Society of Toxicology 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & TOXEXPO, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
  86. Sato, K., H. Fukata, Y. Kogo, J. Ohgane, K. Shiota and **C. Mori**: Global analysis of aberrant DNA methylation induced by neonatal exposure to diethylstilbestrol using restriction landmark genomic scanning (RLGS). Society of Toxicology 43<sup>rd</sup> Annual Meeting & TOXEXPO, (Baltimore, Maryland, USA), March 21-25, 2004.
  87. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and **Iguchi T.**: Estrogen-independent activation of ErBb signaling and estrogen receptor alpha in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. Environmental Gordon research conference: Environmental Endocrine Disruptors, (New London, New Hampshire, USA), June 6-11, 2004.
  88. Suzuki, A., H. Watanabe and **Iguchi T.**: Comparison of estrogen responsive genes in mouse uterus, vagina and mammary gland. Gordon research conference: Environmental Endocrine Disruptors, (New London, New Hampshire, USA), June 6-11, 2004.
  89. Kobayashi, M., H. Watanabe and **T. Iguchi**: Exploration of estrogen receptor regulated genes in mouse uterus. Gordon research conference: Environmental Endocrine Disruptors, (New London, New Hampshire, USA), 6-11 June, 2004.
  90. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, D. Lubahn, H. Handa and **T. Iguchi**: Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. Gordon research conference: Environmental Endocrine Disruptors, (New London, New Hampshire, USA), June 6-11, 2004.
  91. Suzuki, A., Sugihara, A. and **Iguchi, T.**: Developmental effects of diethylstilbestrol and bisphenol A on reproductive organs in female mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会 (神戸) アブストラクト D64, 1999.
  92. Uchida, K., Kobayashi, Y., Sato, T., **Ohta, Y.** and **Iguchi, T.**: Effects of estrogenic compounds on osteogenesis of mice in utero. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会, (神戸) アブストラクト D65, 1999.
  93. 内田薫、佐藤友美、**太田康彦**、**井口泰泉**: マウス胎仔の骨形成に対する女性ホルモンの影響. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 15, 1999.
  94. 鈴木敦子、佐藤友美、**太田康彦**、**井口泰泉**: 胎仔期に投与されたエストロゲン様化学物質の雌マウス生殖器官への影響. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 15, 1999.
  95. 杉原秋香、佐藤友美、**太田康彦**、**井口泰泉**: 出生直後のマウス雌性生殖器官に対するエストロゲン様化学物質の影響. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 15, 1999.
  96. 漆谷博志、佐藤友美、**井口泰泉**: マミチヨグのエストロゲン受容体遺伝子のクローニング及び発現段階での発現変化について. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 14, 1999.
  97. 岡田晃宣、佐藤友美、**井口泰泉**: 出生前の雌ラット生殖輸管細胞の増殖及び EGF の発現. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 15, 1999.
  98. 河野郷通、藤目誠、上島孝久、**井口泰泉**: ニホンアマガエルの皮膚での水分吸収量の性差と下垂体後葉ホルモン受容体発現量. 日本動物学会第70回大会 (山形) *Zool. Sci.* 16, Suppl.: 8, 1999.

99. 平山瑞穂、中山淳美、山村祐一、岡本宗裕、**太田康彦**: 出生後のマウス精巣発達におけるエストロゲンの役割に関する研究. 日本獣医学会 (熊本) 1999 年 10 月 15 日.
100. 永吉道子、松谷天星丸、清和千佳、**阿相皓晃**: shiverer ミュータントマウスにおける細胞接着分子について. 第 76 回生理学会 (長崎) 1999 年 3 月.
101. 桜井洋子、伊藤康一、吉村和法、中井陽子、清和千佳、鶴尾吉宏、足立知也、**阿相皓晃**: オリゴデンドロサイトで動くタンパク(14F7/4F2)の解析. 第 22 回神経科学学会 (大阪) 1999 年 7 月.
102. 足立知也、桜井洋子、吉村和法、相原公德、灘孝雄、**阿相皓晃**: 未成熟オリゴデンドロサイトの増殖について. 第 22 回神経科学学会 (大阪) 1999 年 7 月.
103. 木村一、黒田純子、**阿相皓晃**、永田功: 小脳顆粒細胞の神経突起接着に関わる L1 分子の役割 -レーザー分子不活性法による解析. 第 22 回神経科学学会 (大阪) 1999 年 7 月.
104. 伊藤康一、桜井洋子、梅田真郷、**阿相皓晃**: 培養条件下における未成熟型オリゴデンドロサイトのミエリン形成. 第 22 回神経科学学会 (大阪) 1999 年 7 月.
105. 中井陽子、伊藤康一、桜井洋子、足立遼美、国本学、植村慶一、**阿相皓晃**: オリゴデンドロサイトの細胞系譜におけるスフィンゴミエリン. 第 42 回神経化学学会 (広島) 1999 年 9 月.
106. 秋山颯一、桜井洋子、**阿相皓晃**、千秋遼雄: オリゴデンドロサイト中の II 型ペプチジルアルギニンディイミナーゼとその反応産物の検出. 第 42 回神経化学学会 (広島) 1999 年 9 月.
107. 伊藤康一、中井陽子、山路顕子、梅田真郷、**阿相皓晃**: スフィンゴミエリンに特異的に結合するライセニンの神経細胞とグリア細胞への結合性のちがい. 第 72 回日本生化学大会 (横浜) 1999 年 10 月.
108. 吉村和法、田中嘉代子、山室裕、桜井洋子、北村邦彦、野村正彦、**阿相皓晃**: 中枢神経組織の白質を認識する抗体 12F7 の組織障害作用. 第 4 回グリア研究会 (仙台) 1999 年 11 月.
109. 山根ゆか子、志賀葉月、**阿相皓晃**、川端和重、伊藤悦郎: 培養アストロサイトの融合過程に対するアクチンフィラメントとコネキシン 43 の関与. 第 4 回グリア研究会 (仙台) 1999 年 11 月.
110. 吉村和法、藤牧香代、山室裕、桜井洋子、北村邦彦、野村正彦、霜田靖、**阿相皓晃**: ラット小脳白質に存在する抗体 12F7 の加齢による発現パターンの変化. 第 77 回日本生理学会大会 (東京) 2000 年 3 月.
111. 中井陽子、伊藤廣一、**阿相皓晃**: オリゴデンドロサイトの細胞系譜におけるスフィンゴミエリン(2). 第 77 回日本生理学会大会 (東京) 2000 年 3 月.
112. 斉藤友昭、橋本光一郎、**仁科行雄**: マウスの精粗細胞と Sertoli 相棒の体外共培養. 日本発生生物学学会 (神戸) 1999 年 5 月 28-30 日.
113. **佐藤真彦**: サケの母川回帰と嗅覚記録. 第 24 回日本比較内分泌学会大会シンポジウム要旨集, p24, 1999 年.
114. **佐藤真彦**、酒井謙之、星川 亮、古野正樹、佐藤木綿子、小林孝聡、山本和博、工藤雄一、生田和正、東 照雄、北村章二: ヒメマス母川選択行動の Y 迷路を用いた実験行動学的解析-孵化場からの匂いが母川選択行動に及ぼす影響-. 平成 12 年度日本水産学会春期大会講演要旨集, p67, 2000 年.
115. Okada, A., T. Sato, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Developmental effects of diethylstilbestrol (DES) on the rat reproductive tracts in utero. 第 6 回国際先天異常学会連盟学術集会・第 40 回日本先天異常学会学術集会 (島根) 2000 年 7 月.

- 116.内田薫、鈴木敦子、小林良夫、鈴木樹里、浅岡一雄、井口泰泉：マウスとサルにおけるビスフェノール A の胎盤透過性. 日本動物学会第 71 回大会 (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 117.岡田晃宣、太田康彦、佐藤友美、井口泰泉：出生前の雌ラット生殖腺付属器官におけるエストロゲン受容体の発現について. 日本動物学会第 71 回大会 (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 118.鈴木敦子、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：合成エストロゲンによる胎仔雌マウス生殖器官での Hox 遺伝子の発現変化. 日本動物学会第 71 回大会 (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 119.漆谷博志、野坂史恵、井口泰泉：マミチヨグの FTZ-F1 遺伝子のクローニング及び、各器官における発現について. 日本動物学会第 71 回大会 (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 120.宮川信一、佐藤友美、仁科行雄、太田康彦、井口泰泉：Occurrence of Hypospadias Induced by Neonatal Diethylstilbestrol Exposure in Female Mice. 日本動物学会第 71 回大会 (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 121.Suzuki, A., T. Sato, Y. Nishina, **Y. Ohta** and **T. Iguchi**: Expression of Hox Gene on Female Reproductive Organs Exposed to DES *in utero*. 日本動物学会第 71 回大会, (東京) 2000 年 9 月 21 日.
- 122.河野郷通、上島孝久、井口泰泉：ニホンアマガエル腹側皮膚における水分吸収機構の性的二型. 第 25 回日本比較内分泌学会 (能登) 2000 年 11 月 3 日.
- 123.漆谷博志、井口泰泉：マミチヨグ(*Fundulus heteroclitus*)のエストロゲン受容体 (ER) の単離及び発現解析.第 25 回日本比較内分泌学会 (能登) 2000 年 11 月 3 日.
- 124.竹内悠子、沢柳綾子、山村裕一、岡本宗裕、井口泰泉、太田康彦：連続発情ラット子宮における、性ホルモン受容体発現の変化. 第 130 回日本獣医学会学術集会 2000 年
- 125.中山淳美、平山瑞穂、岡本宗裕、井口泰泉、太田康彦：ラット子宮間膜腺形成過程における線維芽細胞様間質細胞の動態. 第 130 回日本獣医学会学術集会 2000 年
- 126.平川朋美、平山瑞穂、井口泰泉、太田康彦：周生期にエストロゲンおよびアンドロゲン投与を受けたマウス精巣における性ホルモン受容体発現について. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 127.Nakada, N., H.Takada, H. Nyunoya, M. Nakamura and **T. Iguchi**: Identification of the organic compounds contributing to the total estrogenic activities in municipal sewage treatment plant effluent. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 128.Kohno, S., A. Shinohara, A. Suzuki, M.Araki, T. Sato and **T. Iguchi**: Effects of prenatal exposure to DES and bisphenol A on male mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 129.Uchida, K., A. Suzuki, D. Buchanan, H.Watanabe, Y. Kobayashi, J. Suzuki, K. Asaoka, **C. Mori** and **T. Iguchi**: Bisphenol A during pregnancy results in direct fetal exposure. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 130.Honma, S. and **T. Iguchi**: Prenatal effect of diethylstilbestrol and bisphenol-A on female mouse reproduction. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 131.Suzuki, A., L. Ma, Y. Nishina and **T. Iguchi**: Expression of Hox genes in Mullerian duct in mice exposed to diethylstilbestrol *in utero*. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 3 回研究発表会 2000 年 12 月 15-16 日.
- 132.Miyagawa, S., D.L. Buchanana, T. Sato, **Y. Ohta**, Y. Nishina and **T. Iguchi**:

- Characterization of female hypospadias in neonatally diethylstilbestrol- and bisphenol-A-exposed mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会 2000年12月15-16日.
133. Katsu, Y. and **T. Iguchi**: Differential display identification of several genes with altered expression in estrogen-treated mouse uterus. 日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会 2000年12月15-16日.
134. Buchanan, D.L., S. Ohsako, C. Tohyama, P.S. Cook and **T. Iguchi**: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) does not alter early estrogen-induced increases in uterine weight but inhibits epithelial mitogenic activity in mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第3回研究発表会 2000年12月15-16日.
135. 佐藤元子、二場恵美子、本庄卓、杉本綾子、吉見立也、三浦卓、高橋勇二、堀口敏宏：有機スズ化合物によるインポセックス発症機構の解明 性特異的に発現する遺伝子の検索. 環境ホルモン学会第3回研究発表会要旨集, p.221, 2000年.
136. 杉本綾子、堀口敏宏、高橋勇二、三浦卓：イボニシ(*Thais clavigera*)の神経節及びペニス形成部位の培養法の確立. 環境ホルモン学会第3回研究発表会要旨集, p.220, 2000年.
137. 高橋勇二、工楽樹洋、加藤健一、榎本瞳、梶原昌朗、佐藤元子、宮田隆、堀口敏宏、三浦卓：イボニシ貝の核内受容体 cDNA のクローニングと分子進化. 環境ホルモン学会第3回研究発表会要旨集, p.209, 2000年.
138. 村岡秀俊、竹内浩昭：ヒヨコの学習・記憶系に与えるビスフェノール A の影響, 日本動物学会中部支部大会 (伊勢) 2000年8月3-4日.
139. 村岡秀俊、竹内浩昭：鳥類の発生と学習に及ぼすビスフェノール A の影響, 日本内分泌攪乱化学物質学会 第3回研究発表会, 要旨集 p.242, (横浜) 2000年12月15-17日.
140. 森千里、櫻井健一、井口泰泉：日本人の臍帯及び臍帯血中において検出される内分泌攪乱物質に関する検討. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
141. 櫻井健一、浅岡一雄、寺岡雅之、宮川秀則、卯月昌子、井口泰泉、森千里：植物エストロゲンの胎児移行に関するヒトとサルでの検討. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
142. 足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、井口泰泉、森千里：新生仔期内分泌攪乱物質曝露で起こる精巣での遺伝子発現変化の検討 (DNA マイクロアレイ法を用いて). 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
143. 豊田直二、楊雅改、川端由香、石橋史博、納屋聖人、森千里：内分泌攪乱により誘発された精巣挙筋の変化. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
144. 芝山孝子、大熊麻衣子、佐々木恵美、足達哲也、櫻井健一、井口泰泉、森千里：新生仔期 Diethylstilbestrol 曝露における精巣で誘導される遺伝子に関する検討. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
145. 深田秀樹、足達哲也、櫻井健一、芝山孝子、井口泰泉、森千里：DNA マイクロアレイ法を用いた内分泌攪乱物質のマウス遺伝子発現に及ぼす長期的影響の解析. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
146. 楊雅改、豊田直二、小宮山政敏、森千里：停留睾丸における精巣導帯の形態的検討. 環境ホルモン学会第3回研究発表会 (横浜) 2000年12月15-16日.
147. 高野海哉、小宮山政敏、鶴谷悠也、森千里：マウス精巣上体における性ホルモンレセプターの Diethylstilbestrol 投与による局在変化. 環境ホルモン学会第3回研

- 究発表会 (横浜) 2000 年 12 月 15-16 日.
- 148.有菌幸司、浦 和寛、園田理紗、上杉裕子、小原雄治、富永伸明、井口泰泉: DNA tip を用いた線虫での遺伝子発現の解析. 第 5 回精子形成・精巣毒性研究会 (宮崎) 2000 年 9 月 29-30 日.
  - 149.浦 和寛、富永伸明、上杉裕子、園田理紗、甲斐利典、宮原真紀、小原雄治、井口泰泉、有菌幸司: 線虫 cDNA マイクロアレイを用いたエストロゲン応答遺伝子の検索. 環境ホルモン学会第 3 回研究発表会 (横浜) 2000 年 12 月 15-16 日.
  - 150.有菌幸司、浦 和寛、富永伸明、上杉裕子、園田理紗、坂田幸子、甲斐利典、宮原真紀、小原雄治、井口泰泉: *C. elegans* as a tool for environmental toxicology. トキシコゲノミクス国際フォーラム 2001 (東京) 2001 年 11 月 1 日.
  - 151.宮原真紀、柳英碩、西島治香、犬童真紀子、石橋弘志、白石不二雄、西原力、有菌幸司、井口泰泉、Guillette, L.J. Jr.: The estrogenic activity on feeding diet evaluated with yeast two-hybrid assay *in vitro*. (酵母 Two-Hybrid 法による各種実験動物用飼料中のエストロゲン様物質評価) .フォーラム 2001 衛生薬学・環境トキシコロジー. (金沢) 2001 年 10 月 31 日.
  - 152.宮原真紀、柳英碩、西島治香、犬童真紀子、石橋弘志、白石不二雄、西原力、有菌幸司、井口泰泉、Guillette, L.J. Jr.: The estrogenic activity on feeding diet evaluated with yeast two-hybrid assay *in vitro*. 国際会議 SETAC/AP 2001 (金沢) 2001 年 11 月 1 日.
  - 153.勝 義直、高須絵理、井口泰泉 : Differential Expression of C-Type Lectins in the Mouse Vagina. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月.
  - 154.宮川信一、勝 義直、渡邊 肇、仁科行雄、井口泰泉 : Changes in expression of glutathione peroxidase 3 and some growth factors in neonatally DES-exposed mouse vagina. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月.
  - 155.渡邊 肇、鈴木敦子、河野郷通、半田 宏、井口泰泉 : DNA マイクロアレイを用いたエストロゲン作用の解析 第 24 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2001 年 12 月.
  - 156.渡邊 肇、鈴木敦子、河野郷通、半田 宏、井口泰泉 : Evaluation of endocrine disruptors by DNA microarray 日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月.
  - 157.鈴木敦子、渡辺 肇、井口泰泉 : Gene expression analysis by microarray in neonatal uterus exposed to diethylstilbestrol. 日本内分泌攪乱化学物質学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月.
  - 158.勝 義直、高須絵理、井口泰泉 : マウス膣に発現する新規 c-type lectin の単離. 日本動物学会第 72 回大会 (博多) 2001 年 10 月.
  - 159.宮川信一、佐藤 守、勝 義直、渡邊 肇、土橋香織、大石正道、前田忠計、井口泰泉 : 新生仔期 DES 投与により不可逆的増殖・角質化を示すマウスの膣における蛋白質発現. 日本動物学会第 72 回大会 (博多) 2001 年 10 月.
  - 160.勝 義直、高須絵理、井口泰泉 : マウス膣に発現する新規 c-type lectin の単離. 第 6 回日本生殖内分泌学会 2001 年 10 月.
  - 161.鈴木敦子、太田康彦、井口泰泉 : 胎仔雄マウス生殖器官での Hox 遺伝子の発現と合成エストロゲンによる発現変化. 日本動物学会第 72 回大会 (博多) 2001 年 10 月.
  - 162.渡邊 肇、鈴木敦子、河野郷通、半田 宏、井口泰泉 : DNA チップを用いた環境ホルモン作用の研究、日本動物学会中部支部大会特別講演 (岡崎) 2001 年 8 月.
  - 163.竹内悠子、最首信和、太田康彦、河野郷通、井口泰泉 : Effect of ovarian steroids on the expression of progesterone and estrogen receptors in the uterus of persistent estrous rats given androgen neonatally. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 14-15 日.

- 164.最首信和、竹内悠子、**太田康彦**、**井口泰泉**: 周生期雌ラットに投与したビスフェノール A の生殖器官へおよび影響. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 14-15 日.
- 165.小野祐新、足達哲也、小宮山政敏、高 圭範、田井中 均、**井口泰泉**、**森千里**: 新生仔期 Diethylstilbestrol および Genistein 曝露により誘発されるマウス精巣における遺伝子発現変化と組織学的変化の関連性. 第 6 回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会 (シオノギ研修所: 西宮市) 2001 年 10 月 28 日.
- 166.足達哲也、小宮山政敏、高 圭範、小野祐新、芝山孝子、関 直彦、**井口泰泉**、**森千里**: 新生仔期 Diethylstilbestrol 曝露における精巣への遺伝子発現に及ぼす影響. 第 6 回 Testis Workshop 精子形成・精巣毒性研究会 (シオノギ研修所: 西宮市) 2001 年 10 月 28 日.
- 167.足達哲也、小宮山政敏、櫻井健一、高 圭範、関 直彦、**井口泰泉**、**森千里**: 新生期内分泌攪乱物質曝露における雄性生殖系への遺伝子発現に及ぼす影響 (シンポジウム). 第 10 回日本バイオイメーキング学会 (国立感染症研究所・東京都) 2001 年 10 月 11 日.
- 168.**森千里**、足達哲也、小宮山政敏、小野祐新、芝山孝子、関 直彦、**井口泰泉**: 雄マウス生殖器官の内分泌攪乱物質 (環境ホルモン) 応答遺伝子の解析. 日本アンドロロジー学会第 20 回学術大会 (宇都宮市) 2001 年 7 月 20-21 日.
- 169.足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、高 圭範、**井口泰泉**、**森千里**: 植物エストロゲン Genistein のマウス新生仔期曝露による精巣への影響. 第 55 回日本栄養・食糧学会大会 (京都) 2001 年 5 月 6-8 日.
- 170.足達哲也、櫻井健一、深田秀樹、芝山孝子、**井口泰泉**、**森千里**: 内分泌攪乱物質曝露におけるマウス精巣での遺伝子発現の変化について (DNA マイクロアレイ法を用いて). 第 106 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高知医科大学: 南国市) 2001 年 4 月 2-4 日.
- 171.芝山孝子、足達哲也、櫻井健一、高野海哉、高 圭範、小野祐新、**井口泰泉**、**森千里**: Diethylstilbestrol (DES) 曝露により誘発される精巣特異的遺伝子について. 第 106 回日本解剖学会総会・全国学術集会 (高知医科大学: 南国市) 2001 年 4 月 2-4 日.
- 172.浦 和寛、甲斐利典、坂田幸子、富永伸明、園田理紗、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有菌幸司**: 内分泌かく乱物質の線虫の発生に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 15 日.
- 173.甲斐利典、浦 和寛、坂田幸子、富永伸明、園田理紗、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有菌幸司**: 線虫 *C. elegans* を用いたカドミウム曝露による生体影響の解析. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 15 日.
- 174.園田理紗、松野哲也、浦 和寛、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有菌幸司**、富永伸明: *C. elegans* cDNA マイクロアレイを用いたテストステロン応答遺伝子の検索. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 15 日..
- 175.犬童真紀子、宮原真紀、柳英碩、石橋弘志、西島治香、白石不二雄、西原 力、Guillette, L.J. Jr.、川越信秀、宮川秀則、中村優子、**井口泰泉**、**有菌幸司**: 飼料中に含まれる植物エストロジェンの分析及びエストロジェン活性評価. 環境ホルモン学会第 4 回研究発表会 (つくば) 2001 年 12 月 15 日.
- 176.足達哲也、高 圭範、小野祐新、佐藤浩二、田井中 均、小宮山政敏、**井口泰泉**、**森千里**: 新生期外因性エストロゲン曝露における精巣での遺伝子発現に及ぼす影響. 環境ホルモン学会 第 4 回 研究発表会 (つくば). 2001 年 12 月 14-15 日.
- 177.高野海哉、小宮山政敏、芝山孝子、門田朋子、豊田直二、**森千里**: 新生仔期ジ

- エチルスチルベストロール (DES) 投与による精巣上体上皮細胞の形態変化. 環境ホルモン学会 第4回 研究発表会 (つくば). 2001年12月14-15日.
178. 櫻井健一、宮川秀則、卯月昌子、長田久夫、生月弓子、堤 治、森 千里: 臍帯血を用いた植物エストロゲンと胎児ホルモン環境との関連に関する検討. 環境ホルモン学会 第4回 研究発表会 (つくば). 2001年12月14-15日.
179. 豊田直二、戸邊豊絵、松野義晴、高 圭範、高野海哉、小宮山政敏、森 千里: Flutamideにより誘発された停留精巣の精巣挙筋における筋蛋白質の免疫組織学的変化について. 環境ホルモン学会 第4回 研究発表会 (つくば). 2001年12月14-15日.
180. 小宮山政敏、足達哲也、高野海哉、関 直彦、井口泰泉、森 千里. マウス精巣上体において優位に発現する遺伝子. 環境ホルモン学会 第4回 研究発表会 (つくば). 2001年12月14-15日.
181. 鈴木敦子、渡辺 肇、半田 宏、井口泰泉: 合成エストロゲンによるマウス生殖器官の相対的遺伝子発現変化 日本動物学会第73回大会 (金沢) 2002年9月.
182. Suzuki, A., H. Watanabe, S. Miyagawa and T. Iguchi: Gene expression by estrogenic chemicals in mouse uteri of neonates and adults and neonatally DES-exposed mice. Toxicogenomics International Forum 2002 (岡崎) 2002年10月.
183. Suzuki, A., S. Miyagawa, H. Watanabe, H. Handa and T. Iguchi: Gene expression analysis by microarray in uterus and vagina of neonatal mice exposed to diethylstilbestrol. 第5回環境ホルモン学会研究発表会 (広島) 2002年11月.
184. Katsu, Y., S. Miyagawa, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular Cloning of Steroid Hormone Receptors of the American alligator. 第5回環境ホルモン学会研究発表会 (広島) 2002年11月.
185. 勝 義直、井口泰泉: マウス膺に発現する新規 C-type lectin. 日本動物学会第73回大会 (金沢) 2002年9月.
186. 宮川信一、勝 義直、渡邊 肇、井口泰泉: 新生仔期 DES 投与マウスの膺における成長因子・受容体の発現. 日本動物学会第73回大会 (金沢) 2002年9月.
187. Miyagawa, S., H. Watanabe, A. Suzuki, Y. Katsu and T. Iguchi: Analysis of gene expression in neonatally DES-exposed mouse vagina. Toxicogenomics International Forum 2002 (岡崎) 2002年10月.
188. Miyagawa, S., Y. Katsu, H. Watanabe and T. Iguchi: Estrogen-independent activation of ErbB2 in neonatally DES-exposed mouse vagina. 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会 (広島) 2002年11月.
189. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and T. Iguchi: Gene expression profiles of developing *Xenopus laevis* in response to estrogenic chemicals using DNA array. 日本内分泌攪乱化学物質学会第5回研究発表会 (広島) 2002年11月.
190. 足達哲也、高 圭範、小野裕新、田井中 均、小宮山政敏、井口泰泉、森 千里: 新生仔期エストロゲン様物質曝露による精巣での遺伝子発現への影響. 第2回日本分子生物学会春期シンポジウム (広島) 2002年5月.
191. 足達哲也、高 圭範、小野裕新、田井中 均、小宮山政敏、井口泰泉、森 千里: エストロゲン様物質の新生仔期曝露による精巣での遺伝子発現に及ぼす影響. 日本アンドロロジー学会第21回学術大会 (高槻市) 2002年7月.
192. 西村太輔、高島杏佳、足達哲也、櫻井健一、小宮山政敏、森 千里: 内分泌攪乱化学物質がヒト臍帯静脈内皮細胞へ与える影響. 第25回日本分子生物学会年会 (横浜) 2002年12月.
193. 澤柳綾子、井口泰泉、太田康彦: ラット子宮間膜腺形成におけるエストロゲンの

- 役割.第 134 回日本獣医学会学術集会 (岐阜市) 2002 年 9 月.
- 194.石橋つぐみ、最首信和、**太田康彦**、**井口泰泉**：周生期にビスフェノール A を投与されたラット子宮における脱落膜形成について. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 (広島市) 2002 年 11 月.
  - 195.**堀口敏宏**、**太田康彦**、**井口泰泉**、森下文浩、松島 治、白石寛明、森田昌敏：イボニシのインポセックスに及ぼすアロマターゼ阻害剤、アンドロゲン及び神経ペプチドの影響. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会要旨集, pp120, 2002 年.
  - 196.**堀口敏宏**、勝 義直、**太田康彦**、渡邊 肇、**井口泰泉**、陸 明、安保 充、大久保明、山崎素直、白石寛明、柴田康行、森田昌敏：イボニシにおけるステロイドホルモンとその代謝能及び受容体に関する実験的検討. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会要旨集, pp265, 2002 年.
  - 197.足達哲也、小野祐新、小宮山政敏、高 圭範、田井中 均、**井口泰泉**、**森 千里**：新生期 Genistein 曝露によるマウス精巣の遺伝子発現に及ぼす影響. 日本農芸化学会 2002 年度大会 (仙台) 2002 年 3 月 25-27 日.
  - 198.足達哲也、高 圭範、小野祐新、田井中 均、小宮山政敏、**井口泰泉**、**森 千里**：新生仔期エストロゲン様物質曝露による精巣での遺伝子発現への影響 (cDNA マイクロアレイを用いた解析). 日本分子生物学会・第 2 回春季シンポジウム (広島) 2002 年 5 月 13-14 日.
  - 199.足達哲也、高 圭範、小野祐新、田井中 均、小宮山政敏、**井口泰泉**、**森 千里**：新生仔期 DES 曝露による精巣での遺伝子発現への影響 (エストラジオール曝露との影響比較). 第 42 回 日本先天異常学会学術集会 (浜松) 2002 年 7 月 10-12 日.
  - 200.足達哲也、高 圭範、小野祐新、田井中均、小宮山政敏、**井口泰泉**、**森 千里**：エストロゲン様物質の新生仔期曝露による精巣での遺伝子発現に及ぼす影響. 日本アンドロロジー学会第 21 回学術大会 (高槻) 2002 年 7 月 19-20 日.
  - 201.深田秀樹、濱松晶彦、高 圭範、**森 千里**：日本人精巣重量の変化に関する解析 (1948~2001). 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 202.戸高恵美子、櫻井健一、宮川秀則、卯月昌子、長田久夫、生月弓子、堤 治、**森 千里**：臍帯血中に存在する植物エストロゲンの検討. 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 203.中本貴士、浦 和寛、古賀由香里、甲斐利典、坂田幸子、富永伸明、**井口泰泉**、**有 菌幸司**：線虫(*C. elegans*)の成長に及ぼすベンゾピレンの影響. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 204.古賀由香里、浦 和寛、中本貴士、甲斐利典、坂田幸子、富永伸明、**井口泰泉**、**有 菌幸司**：線虫 *C. elegans* を用いた環境化学物質の生体影響の解析. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 205.浦 和寛、中本貴士、古賀由香里、甲斐利典、坂田幸子、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有 菌幸司**：センチュウ *C. elegans* の成長に及ぼすビスフェノール A の影響解析. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 206.富永伸明、松野哲也、園田理紗、浦 和寛、高良真也、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有 菌幸司**：線虫 *C. elegans* の遺伝子発現パターンによるステロイドホルモンのセンシング. 環境ホルモン学会第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  - 207.**阿相皓晃**、中原仁、清和千佳：シバラーミュータントマウス由来オリゴデンドロサイト前駆細胞を用いたミエリン形成機構の解析. 第 45 回日本神経化学学会大会 (札幌) 2002 年 7 月 17-19 日.
  - 208.後藤真里、酒井智美、清和千佳、中原 仁、高井俊行、松本勲武、**阿相皓晃**：Fc レセプターを介したオリゴデンドロサイトの分化メカニズムについて. 第 7 回グリ

- 研究会 (東京) 2002 年 11 月 30 日.
209. 鎌迫典久、阿部良子、小塩正朗、河辺 聖、小田重人、森田昌敏、渡邊 肇、井口泰泉: ミジンコの内分泌攪乱 (1). 第 8 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2002 年 9 月 24-25 日.
  210. 鎌迫典久、阿部良子、小塩正朗、河辺 聖、小田重人、森田昌敏、渡邊 肇、井口泰泉: ミジンコの内分泌攪乱 (2). 第 8 回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2002 年 9 月 24-25 日.
  211. 鎌迫典久、小田重人、森田昌敏、園部治之、渡邊 肇、井口泰泉: 甲殻類 (ミジンコ) の内分泌攪乱. 第 27 回日本比較内分泌学会大会, 2002 年 11 月 29-30 日.
  212. 森 千里、小宮山政敏、深田秀樹、戸高恵美子、櫻井健一: ヒト胎児の複合曝露とその対策の方向性. 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会 (広島) 2002 年 11 月 25-26 日.
  213. 深田秀樹、寺岡雅之、高田秀重、戸高恵美子、森 千里: HPLC と ELISA による血清・尿中ビスフェノール A 濃度の測定比較. 環境ホルモン学会 (日本内分泌攪乱化学物質学会) 第 6 回研究発表会 (仙台市) 2003 年 12 月 2-3 日.
  214. 小宮山政敏、高島杏佳、西村太輔、足達哲也、森 千里: DNA マイクロアレイによるヒト臍帯のトキシコゲノミクス解析 (ワークショップ). 平成 14 年度 科学研究費補助金特定領域研究(1)「内分泌攪乱物質の環境リスク」研究成果報告会 (松山) 2003 年 1 月 20-23 日.
  215. 深田秀樹、濱松晶彦、高 圭範、森 千里: 日本人精巣重量の変化および背景因子に関する解析 (1948~2001) 第 108 回 日本解剖学会総会・全国学術集会 (福岡) 2003 年 4 月 1-3 日.
  216. 穴原玲子、小野祐 新、外山芳郎、森 千里: 抗アンドロゲン物質 flutamide 新生仔期投与によるマウス精巣における微細形態変化. 第 43 回 日本先天異常学会学術集会 (豊中) 2003 年 7 月 2-4 日.
  217. 小宮山政敏、高島杏佳、西村太輔、足達哲也、深田秀樹、長田久夫、森 千里: ヒト臍帯のトキシコゲノミクス解析. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  218. 乾 まどか、足達哲也、乾 博、中澤昌美、上田光宏、森 千里、井口泰泉、宮武和孝: UV スクリーンおよび防腐剤におけるオスメダカのビテロゲニン、コリオゲニン産生に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  219. 松田和之、高島杏佳、竹中重雄、足達哲也、田井中 均、山崎康司、西村太輔、外山芳郎、井口泰泉、森 千里、宮武和孝: 植物イソフラボン曝露による精巣細胞の増殖および遺伝子発現に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  220. 高島杏佳、深田秀樹、戸高恵美子、小宮山政敏、櫻井健一、足達哲也、加藤英男、井口泰泉、森 千里: マウス新生仔におけるイソフラボン経母胎・経母乳曝露の影響. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  221. Anahara, R., Y. Toyama and C. Mori: Effect of flutamide and beta-estradiol 3-bezoate on mouse spermatogenesis. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  222. 佐藤浩二、深田秀樹、向後泰司、大鐘 潤、塩田邦郎、森 千里: 新生仔ジエチルスチルベストロール投与による DNA メチル化の変化—RLGS 法による網羅的解析—. 環境ホルモン学会第 6 回研究発表会 (仙台) 2003 年 12 月 2-3 日.
  223. 大森万里子、深田秀樹、戸高恵美子、長田久夫、森 千里: PCB の胎児曝露状況.

- 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 224.戸高恵美子、長田久夫、大森万里子、宮川秀則、卯月昌子、生月弓子、堤 治、櫻井健一、深田秀樹、**井口泰泉**、**森 千里**：臍帯血中に存在する植物エストロゲンの検討ーイクオールに注目してー. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 225.深田秀樹、足達哲也、大森万里子、長田久夫、**森 千里**：マイクロアレイデータを集合的に取り扱うことによる内分泌攪乱化学物質の長期的影響の解析. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸) 2003年12月10-13日.
- 226.山崎康司、小野祐新、足達哲也、深田秀樹、小島健介、千葉 寛、**森 千里**、小宮山政敏：新生仔期内分泌攪乱物質曝露により精巣上体で発現変化した遺伝子. 第26回日本分子生物学会年会 (神戸) 2003年12月10-13日.
- 227.清和千佳、中原仁、酒井智美、**井口泰泉**、**阿相皓晃**：内分泌かく乱物質ビスフェノール A がオリゴデンドロサイト前駆細胞に与える影響について. 第64回日本神経化学学会・第41回日本生物物理学会合同大会 (新潟) 2003年9月23-26日.
- 228.酒井智美、清和千佳、小山内たか、田中嘉代子、松本勲武、**阿相皓晃**：老齢脳におけるミエリン形成不全の新展開. 第64回日本神経化学学会・第41回日本生物物理学会合同大会 (新潟) 2003年9月23-26日.
- 229.古賀由香里、浦 和寛、木村宏和、富永伸明、上杉裕子、小原雄治、**井口泰泉**、**有菌幸司**：DNA マイクロアレイを用いた線虫 (*C. elegans*) の環境化学物質曝露による遺伝子発現変動の解析. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 230.前田浩江、古賀由香里、中本貴士、浦 和寛、高良真也、吉原新一、**井口泰泉**、**有菌幸司**：ビスフェノール A 関連化合物が線虫 *C. elegans* の幼生に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 231.守田文代、中本貴士、古賀由香里、木村宏和、浦 和寛、富永伸明、甲斐利典、佐々木一志、**井口泰泉**、**有菌幸司**：センチウ *C. elegans* の成長・成熟に及ぼす金属類の影響. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 232.井上大輔、古賀由香里、中本貴士、石橋弘志、高良真也、上江田一雄、富永伸明、吉原新一、**有菌幸司**：ビスフェノール A 代謝物 MBP の線虫 *C. elegans* を用いた評価. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 233.富永伸明、松野哲也、小原雄治、**井口泰泉**、**有菌幸司**：ステロイドホルモンによる代謝系遺伝子の発現変動. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月2-3日.
- 234.渡邊 肇、鈴木敦子、小林未佳、**井口泰泉**：リガンド依存的なエストロゲン受容体標的遺伝子の解析. 第26回日本分子生物学会 (神戸) 2003年12月.
- 235.小林未佳、渡邊 肇、**井口泰泉**：マウス子宮におけるエストロゲン受容体標的遺伝子群の探索. 第26回日本分子生物学会 (神戸) 2003年12月.
- 236.加藤英男、古橋忠和、勝 義直、渡邊 肇、**太田康彦**、**井口泰泉**：ビスフェノール A の新生児期投与による雄ラットの性発達および生殖能に及ぼす影響. 環境ホルモン学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.
- 237.Katsu, Y., R. Matsumoto, C. Tyler, S. Jobling and **T. Iguchi**: Molecular cloning of sex-determination and sex-differentiation related genes of a teleost fish, Roach. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.
- 238.Sone K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe, L. Guillette and **T. Iguchi**: Molecular cloning of cDNAs encoding two androgen receptors and DMRT1 from mosquito fish. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.

239. Miyagawa, S., A. Suzuki, H. Watanabe, Y. Katsu, M. Goto and **T. Iguchi**: Estrogen-independent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to DES. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.
240. Suzuki A., W. Watanabe H. Handa and **T Iguchi**: Comparison of estrogen responsible genes in mouse uterus, vagina and mammary gland. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.
241. Urushitani H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and **T. Iguchi**: Characterization of estrogen receptor alpha mRNA in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. 日本内分泌攪乱化学物質学会第6回研究発表会 (仙台) 2003年12月.
242. 勝 義直、井口泰泉: 膈上皮の角質化に關与する新規レクチン. 日本動物学会第74回大会 (函館) 2003年9月.
243. 宮川信一、勝 義直、渡邊肇、井口泰泉: マウス膈の不可逆的増殖における成長因子とエストロゲン受容体の作用. 日本動物学会第74回大会 (函館) 2003年9月.
244. 岡田晃宜、太田康彦、ステイーブン ブロディー、井口泰泉: ラット新生児におけるエストロゲンによる輸卵管細胞の増殖・分化の解析. 日本動物学会第74回大会 (函館) 2003年9月.
245. Katsu, Y., M. Gunderson, L. Guillette, Jr. and **T. Iguchi**: Molecular cloning of the estrogen receptor, c-Jun and DJ-1 of the American alligator. 第28回日本比較内分泌学会 (富山) 2003年8月.
246. Sone, K., M. Hinago, A. Kitayama, J. Morokuma, N. Ueno, H. Watanabe and **T. Iguchi**: Effects of bisphenol-A and nonylphenol on developing *Xenopus Laevis*. 第28回日本比較内分泌学会 (富山) 2003年8月.
247. Urushitani, H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu and **T. Iguchi**: Cloning, expression, and characterization of estrogen receptor alpha mRNA in mummichog, *Fundulus heteroclitus*. 第28回日本比較内分泌学会 (富山) 2003年8月.
248. 佐藤友美、井口泰泉: マウス子宮、膈における合成エストロゲンおよびビスフェノール A 投与後の転写共役因子の発現変化. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
249. 渡邊 肇、井口泰泉: DNA マイクロアレイを用いた内分泌攪乱物質の評価. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
250. 平井俊朗、松原 創、佐藤 将、名古屋博之、北浦 優、原 彰彦、井口泰泉、榎 克子、中村 将: 遺伝的全雄個体群を用いた環境ホルモンの影響評価. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
251. 高島杏佳、深田秀樹、戸高恵美子、小宮山政敏、足立哲也、加藤英雄、井口泰泉、森 千里: 妊娠前からの植物エストロゲン慢性的曝露によるマウス新生仔への影響. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
252. 戸高恵美子、長田久夫、大森万里子、宮川秀則、卯月昌子、生月弓子、堤 治、櫻井健一、深田秀樹、井口泰泉、森 千里: 日本における臍帯血および母体血中の植物エストロゲンの検討-続報. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
253. 宮川信一、勝 義直、渡邊 肇、井口泰泉: マウス膈上皮のエストロゲン非依存の細胞増殖と分化. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.
254. 曾根清明、日名子 恵、L.J. Guillette, Jr.、井口泰泉: トレンボロンがカダヤシの二次性徴に及ぼす影響. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会 (京都) 2004年1月.

- 255.勝 義直、井口泰泉：爬虫類・魚類ステロイドホルモン受容体のクローニング. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会（京都）2004年1月.
- 256.加藤英雄、古橋忠和、勝 義直、渡邊 肇、太田康彦、井口泰泉：ビスフェノール A の新生児期投与による雄ラットの性発達および生殖能に及ぼす影響. 内分泌攪乱物質の環境リスク研究成果報告会（京都）2004年1月.
- 257.宮川信一、勝 義直、渡邊 肇、井口泰泉：新生仔期エストロゲン曝露により誘起される恒常的なシグナル伝達系の変化. 環境と遺伝子研究会（岡崎）2004年3月.
- 258.勝 義直、宮川信一、井口泰泉: タイトル：マウス膣に発現する deltaNp63 の転写調節機構解析. 日本発生生物学会（名古屋）2004年6月4日-6日
- 259.穴原玲子、外山芳郎、前川眞見子、年森清隆、森 千里：抗アンドロゲン flutamide と抗エストロゲン ICI182.780 がマウス精子形成に及ぼす影響とその作用機構に関する考察. 日本アンドロロジー学会第23回学術大会（甲府）2004年7月17-18日.
- 260.有菌幸司、古賀由香里、守田文代、中本貴士、木村宏和、浦 和寛、井口 泰泉: 金属類がセンチュウ (*C. elegans*) の発生や繁殖に与える影響. 第14回金属の関与する生体関連反応シンポジウム（静岡）2004年6月10-11日.
- 261.小田重人、阿部良子、鎌迫典久、森田昌敏、井口泰泉: オオミジンコの系統による幼若ホルモン様物質に対する感受性の違い. 第10回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 2004年9月3-4日.
- 262.Sato, T. and T. Iguchi: Differential expression of BMP2, BMP4 and homeobox genes in mouse uterus and vagina. 日本動物学会（名古屋）2004年9月.
- 263.Kirigaya, A., T. Sato, T. Iguchi and S. Hayashi: Involvement of MIS and ERβ in induction of polyovular follicles in mouse ovary treated with DES neonatally. 日本動物学会（名古屋）2004年9月.
- 264.Koga, Y., H. Kimura, N. Tominaga, T. Iguchi and K. Arizono.: Cytochrome P450 (CYP) genes in *C. elegans*: a potential bioindicator for evolution of toxicity of various environmental chemicals. Toxicology International Forum 2004 (Kyoto) 2004年10月12-13日.

(3)特許出願  
無し

(4)新聞報道等

① 新聞報道

無し

② 受賞

JTS 優秀発表奨励賞: 岡田晃宜、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉、2000年7月.

③ その他

無し

(5)その他特記事項

無し

## 7. 結び

内分泌かく乱が疑われるとされていた事象は、主として無脊椎動物の海産巻貝類、魚類のローチ、カダヤシ、ユキマス、ニジマス、両生類では無尾類のカエル、爬虫類のアメリカワニ、鳥類のハクトウワシ、カモメ類など、海棲哺乳動物のシロイルカ、アザラシ、大型哺乳動物のシロクマ、ヒョウなどが、野生動物で観察されていた。しかし、これらの動物では、化学物質の作用メカニズムが議論できるような、分子生物学的および基礎生物学的な情報が十分ではなかった。この中の、ローチ、カダヤシ、アメリカワニおよび日本の内分泌かく乱の代表例となっているイボニシに絞って、ホルモン受容体をはじめとする遺伝子解析を行うとともに、遺伝子情報の整理にも着手し、基礎研究レベルを上げることを目指した。これに関しては、当初の目的どおり、ステロイドホルモン受容体のクローニング、アロマターゼ遺伝子のクローニングに加えて、ステロイドホルモン産生に関連する遺伝子のクローニングも行った。また、マイクロアレイ化に向けて遺伝子情報の整理をしながら、発生の臨界期の特定も行った。現在までの研究は、主として基礎の整備に重点をおき、ほぼ達成できたと考えている。今後も継続して、影響を及ぼしていると考えられる化学物質の影響を遺伝子発現をもとに、作用機構を明らかにしながら、解明してゆきたいと考えている。特に、ローチではイギリスの研究者との連携が、アメリカワニとカダヤシではアメリカのフロリダ大学、カナダのビクトリア大学の研究者との連携ができています。事実、イギリスのエクセター大学からは博士研究員が来て、マイクロアレイ化の整備を行うなどの交流が開始されており、フロリダ大学からは大学院博士課程の学生が 2003, 2004 年度に研究にきている。我々の研究室からは、博士研究員としてフロリダ大学に採用されている。

研究代表者は、SETAC（国際環境毒性学会）USEPA（米国環境保護庁）主催で、2002, 2004 年に開催された、野生動物への新たな遺伝子技術である（Genomics, Transcriptomics, Proteomics, Metabolomics）の応用を主題にした国際会議にも招待され、CREST での研究の展開を解説するとともに、国際的な Ecotoxicogenomics の立ち上げに貢献した。2003 年には岡崎で Ecotoxicogenomics の国際ワークショップを開催した。2004 年 10 月には京都で OECD の Ecotoxicogenomics のワークショップが開催され、この会議の世話も担当する。この分野では、現時点では世界をリードしていると自負している。2006 年度に開催予定のゴードン会議の「Environmental Endocrine Disruptors」でも、マイクロアレイやプロテオミクスなど新たな研究手法を中心としたセッションの設定も決まっている。

井口チームでは、研究機関を横断したグループを形成しており、グループにとらわれることなく協力を行った。特に鳥取大学の太田教授は、本来のラットを用いた研究に加えて、アメリカワニの ER に対する抗体の評価に加えて、イボニシにクロスする哺乳類抗体の探索とともに、イボニシのインポセックス発症の形態学的な研究の側面を支えた。また、自然科学研究機構の渡邊助教授はマウスおよびオオミジンのマイクロアレイをはじめとした遺伝子情報整理を行った。自然科学研究機構の勝助手は、マウスの研究に加えて、ローチ、アメリカワニ、クロコダイル、カメなどのホルモン受容体遺伝子、性分化関連遺伝子のクローニングを行い、研究の基礎を支えた。従来型の研究では、交流することの無い、無脊椎動物の研究者から、ヒトを対象とする医学者までが遺伝子をキーワードに集合して、研究チームを組めたことは、お互いの研究分野を知る上でも重要であったと考えている。

若手研究者の育成としては、千葉大学の森教授のグループでは大勢の大学院生が研究に参加し、熊本大学の有菌教授の研究グループでも大勢の学生が研究に参加した。当初、博士研究員として採用した研究員は、それぞれ、北海道大学、京都大学等に職を得た。また、大学院生として参加した多くの方々も博士号を取得し、フロリダ大学

の博士研究員、基礎生物学研究所の非常勤研究員、大学助手、博士研究員等に進路を得ている。自然科学研究機構では学部および修士課程を持っていなかったため、若い学生の育成ができなかったのは残念であった。

クレストの研究費では、博士研究員とともに研究支援の技術員や事務職員を採用することができ、研究の進行がスムーズにできたと考える。このように自由な研究経費の使用ができたことはまことにありがたく感謝している。

今後の研究の展開としては、本研究で基礎を固めたローチおよびアメリカワニの研究は、ローチでは精巣卵発症メカニズムの解明に向かい、アメリカワニでは温度依存性の性分化機構の解明を目指したい。また、オオミジンコでも性分化機構の解明を目指すとともに、幼若ホルモン結合タンパク質あるいは受容体を解明したいと考えている。マウスでは、臨界期の意味を分子生物学的に詳細に解明することが必要である。周生期のエストロゲンによって誘起される不可逆化機構の一端は明らかにできたが、上皮成長因子の恒久的な発現機構などに関して、さらに詳細に検討すべきであると考ええる。子宮でのエストロゲン応答遺伝子の整理はできたが、乳腺、肝臓、腎臓などでのエストロゲン応答遺伝子の整理とともに、化学物質による発現遺伝子のデータベース化も、近い将来完成すると思われる。遅延性の無排卵症の分子機構も積み残した。センチウでは重金属によって発現変動する遺伝子群の整理とデータベース化が行われ、環境化学物質の影響のデータベース化行われるであろう。ヒトの組織を用いたマイクロアレイと人体影響との関連もさらに進歩することが期待される。

最後に本研究において多大な援助を頂いた科学技術振興機構に感謝するとともに、チームのサポート等に多大の御尽力を頂いた、研究統括である鈴木継美先生（東大名誉教授）並びに技術参事である岸本文貴氏、事務参事である福田美哉氏、堀元氏、また領域アドバイザーである加藤順子先生（三菱化学安全科学研究所 副センター長）、井村伸正先生（日本薬剤師研修センター 理事長）、井上達先生（国立医薬品食品衛生研究所 センター長）、安野正之先生（滋賀県立大学 教授）、紫芝良昌先生（三宿病院 院長）、松下秀鶴先生（静岡県顧問）にこの場をお借りして感謝の意を捧げたい。



2001年3月3-5日岡崎コンファレンスセンターで開催された  
第45回基生研コンファレンス”内分泌攪乱物質研究の最新動向”の参加者



2003年10月6-7日 岡崎コンファレンスセンターで開催された  
国際会議”Ecotoxicogenomics Symposium”の参加者と  
熊本県立大学 有菌幸司グループ



千葉大学大学院医学研究院環境生命医学  
森 千里グループ



東京老人総合研究所 神経生物学部門 脳機能改善（グリア）  
阿相皓晃グループ



自然科学研究機構 基礎生物学研究所 統合バイオサイエンスセンター  
井口泰泉グループ