

ているが、まだ構造は決まっていない。

【AhR リガンドと TNF- α による細胞増殖抑制作用】ヒト白血病細胞株 ML-1 にインディルビンや TCDD などの AhR リガンドと、TNF- α を同時曝露すると増殖が相乗的に抑制された。細胞増殖関連遺伝子、p15, p16, p18, p19, p21, p57, CyclinD1, D2, D3, E1, E2, CDK2, 4, 6 について調べた結果、この処理により変動があったのは p21 と CDK6 のみであった。p21 は相乗的に誘導され、CDK は相乗的にダウンレギュレートされた。また、IL-1 β , IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β , TNFR2 などのサイトカイン、4 種類の NF κ B 遺伝子、AhR, Arnt, CYP1A1 についてそれぞれ調べた結果、IL-1 β , TNF- α , COX2 遺伝子などで、AhR リガンドと TNF- α による相乗的な発現誘導がみられた。

次に、p21 の相乗的誘導のメカニズムであるが、p21 のプロモーターを組み込んだレポータープラスミドを作成した。残念ながら ML-1 にトランスフェクトすることができず、代わりに MCF-7 細胞を用いて実験を行った。この系では、ML-1 で見られたような劇的な相乗作用は再現できなかったが、わずかながら相乗作用が確認された。解析の結果、下流の 400bp に AhR と TNF α により制御される領域があることが明らかとなった。現在、可能性の高い部位にポイントミューテーションを導入してさらに詳細な解析を行っている。

D. 考察

AhR リガンドと TNF α によって p21 が誘導され、CDK6 がダウンレギュレートされ

ることは、細胞増殖のメカニズムを良く説明している。また、IL-1 β や TNF α などのサイトカインも AhR によって相乗的に発現することがわかり、ダイオキシンの免疫毒性との関連性が示唆された。

E. 結論

食品中の AhR リガンドについてはその存在は知られているものの、その化学構造に関する知見はまだほとんど得られていない。我々も 2, 3 の物質について解析を進めているが、構造決定にはもう少し時間が必要である。

AhR は p21 を介して細胞周期の調節をすることが明らかになった。この調節には、p21 のプロモーター領域の下流 400bp のいずれかの部位が係っていることが明らかとなった。

F. 健康危険情報

特に無し

G. 研究発表

- Lee BC, Matsui S, Shimizu Y, Matsuda T. Characterizations of the first flush in storm water runoff from an urban roadway, *Environ. Tech.*, 26, 773-782, 2005
- ◎ Chou P, Matsui S, Misaki K, Matsuda T. Isolation and Identification of a New AhR Ligand 3'-Hydroxybenzo[b]quinophthalone in Dyeing Wastewater, *Organohalogen Compounds (CD-ROM of Proceedings of Dioxin 2005)*, vol. 67, 1746, 2005

- © Kaji H, Kida Y, Adachi J, Mori Y, Sakata Y, Saeki K, Watanabe H, Matsui S, Matsuda T. A natural aryl hydrocarbon receptor ligand, indirubin, causes the p21 (waf1/cip1) up-regulation cooperated with tumor necrosis factor- α , *Organohalogen Compounds (CD-ROM of Proceedings of Dioxin 2005)*, vol. 67, 745, 2005
- © Chou P, Matsui S, Matsuda T. Detection and Identification of Dyes Showing AhR Binding Affinity in Treated Sewage Effluents, *Proceedings of IWA international Conference "Chemical Industries 2005" (CD-ROM)*, B-1-2, 2005
- H. 知的所有権の取得状況
特に無し

厚生労働省研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

低容量 estrogenic chemicals による前立腺重量、発育などに対する
影響に関する研究

分担研究者 杉村 芳樹 三重大学大学院医学系研究科・病態修復医学講座・
腎泌尿器科学分野・教授

研究要旨

エストロゲン様物質（ビスフェノール A:BPA）暴露による前立腺の異常増殖機構解明に向けて、独自の発生生物学的手法に分子生物学的手法を組み合わせた解析を試みる。前立腺の腺管分枝構造に対する BPA の作用は、当科で樹立した無血清器官培養法により解析した。また、泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) の発現・分布は免疫組織化学染色法および RT-PCR 法により評価した。無血清器官培養法において、高用量の BPA はエストラジオール ($E2$) と同様の扁平上皮化生 (SQM) を誘導し、そのとき Transforming Growth Factor alpha ($TGF\alpha$) の過剰発現を認めた。泌尿生殖洞における $ER\alpha$ の発現は間充織細胞に局限しており、さらに領域による発現・分布の差を認めた。よって、BPA による前立腺の SQM 誘導は、間質細胞における $ER\alpha$ の発現に強く依存し、 $ER\alpha$ を介した $TGF\alpha$ の過剰発現が大きな要因となっている可能性が示唆された。

A. 研究目的

エストロゲン様物質（ビスフェノール A:BPA）暴露による前立腺の異常増殖機構解明に向けて、独自の発生生物学的手法に分子生物学的手法を組み合わせた解析を試みる。すなわち、前立腺上皮細胞の分化や増殖、そして腺管分枝形態発生は間質細胞からのパラクライン的な刺激が制御しているため、胎生期の前立腺器官発生に関連する間質由来誘導遺伝子に着目し、エストロゲン様物質暴露による前立腺の異常増殖機構を解明する。

B. 研究方法

前立腺の腺管分枝構造に対する BPA の作用は、当科で樹立した無血清器官培養法により解析した。また、泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体 α ($ER\alpha$) の発現・分布は免疫組織化学染色法および RT-PCR 法により評価した。すなわち、成獣マウス前立腺を解剖学的に 3 つの異なる領域に分けて BPA の影響を検討した。すべての実験系において、エストラジオール ($E2$) を陽性対照として使用した。 $ER\alpha$ の発現検討には、出生前後の泌尿生殖

洞を使用し、腺管分枝構造の成長に伴う発現・分布の変化を領域別に評価した。このとき、免疫組織化学染色法による検討だけでなく、Laser Capture Microdissection (LCM)法により上皮細胞、間充織細胞を選別、回収し、RT-PCR による mRNA の発現を検討した。

(倫理面への配慮)

本研究では、やむを得ず実験動物を使用した。その使用数は最小限にとどめ、当大学の実験動物取り扱い倫理規定に準拠し、十分な配慮を行った。

C. 研究結果

無血清器官培養法において、高用量の BPA は E2 と同様の扁平上皮化生 (SQM) を誘導し、そのとき Transforming Growth Factor alpha (TGF α) の過剰発現を認めた。泌尿生殖洞における ER α の発現は間充織細胞に局限しており、さらに領域による発現・分布の差を認めた。すなわち、成獣マウス前立腺を微小解剖し、BPA (1-1000 nM) の影響を無血清器官培養にて検討した結果、BPA は濃度依存的、時間依存的にサイトケラチン 14 (CK14) の発現を特徴とする基底細胞の過増殖と、サイトケラチン 10 (CK10) の発現により特徴づけられる SQM を誘導し、そのとき病変部位では Transforming Growth Factor alpha (TGF α) が過剰発現していることを免疫染色法により明らかとした。これは、既に報告している E2 (1 nM) や

TGF α (20 ng/mL) 単独で成獣マウス前立腺を処理した場合と全く同様の形態学的変化であった。さらに、BPA による SQM の誘導は、前立腺の領域で頻度・程度が異なっており、感受性が高い順から前葉 (anterior) > 後側葉 (dorsolateral) > 腹葉 (ventral) であった。また、前立腺が器官発生する元となる泌尿生殖洞における ER α の発現は間充織細胞に局限しており、その発現分布は無血清器官培養法における BPA への感受性の差と一致するものであった。

D. 考察

前立腺の生物学的特性として、1) アンドロゲン依存性、2) 上皮—間質細胞の相互作用、3) 腺内での解剖学的・機能的な異質性が挙げられ、これらの特性と前立腺の異常増殖機構との関連が示唆されている。

臓器の発生・分化・増殖は、上皮—間質の相互作用により起こり、特に前立腺は間質成分が多いことから重要な意味を持つ。ヒト前立腺は解剖学的に4つの異なる領域に分けることができ、癌の高発部位である peripheral zone: PZ (辺縁領域)、前立腺肥大結節が生じるのは、transitional zone: TZ (移行領域) というように、組織内の領域により異常増殖のタイプも異なる不均一性が問題となる。このことは前立腺癌を発生する遺伝子改変マウスにおいてもヒト前立腺と同様に、癌が発生しやすい領域が存在するため、

その発生生物学的な差異を作り出すメカニズムを解明することは、前立腺の異常増殖性疾患を考える上で非常に重要となる。

今回の検討で、マウス前立腺の BPA に対する感受性は領域ごとに異なっており、前立腺の元となる泌尿生殖洞における ER α の発現分布と強く相関する（前葉 > 後側葉 > 腹葉）ことが明らかとなった。一方、アンドロゲン受容体（AR）の発現とは逆相関しており、AR の発現が強い領域ほど ER α の発現が弱く、BPA に対する反応性も低かった。これらの結果より、組織内の不均一性が BPA に対する感受性を左右し、領域特有の異常増殖性疾患を引き起こす要因となると考えられた。

今回の問題点は、無血清器官培養法において高用量の BPA (>100 nM) は E2 (1 nM), TGF α (20 ng/mL) と同様の SQM を誘導したものの、低用量での形態学的変化は認められなかったことである。そのため、マウスへ BPA を投与し、前立腺の形態学的変化を検討する場合、投与量だけでなく投与時期、体内での蓄積などの諸問題を慎重に検討していく必要があると考えられた。また、昨年度から引き続き、Epidermal Growth Factor (EGF) や Keratinocyte Growth Factor (KGF) と同様に前立腺上皮細胞の増殖を刺激する TGF α に焦点を絞っているものの、BPA に

よる TGF α の発現誘導メカニズムが解明できておらず、早急な検討が必要と考えている。

今後、前立腺の形態発生過程において、泌尿生殖洞の単一上皮細胞が、解剖学的に異なる領域に分かれるメカニズムを解明し、前立腺の領域別発生から、それぞれに特徴を有する腺管構造の構築までを制御する泌尿生殖洞間充織細胞に特異的な因子の発見と、領域特異性に関連する働きを明らかにすることで、エストロゲン様物質暴露による前立腺の異常増殖性疾患に対する効果的な治療方法の開発、もしくは疾患を予防する方法が考案されることを期待する。

E. 結論

BPA は、E2 や TGF α と同様に前立腺の異常増殖性疾患である SQM を誘導し、その頻度・程度は泌尿生殖洞間充織細胞における ER α の発現・分布と一致していた。また、BPA が前立腺の SQM を誘導すること、さらに TGF α の発現誘導や前立腺の領域特異性による感受性の差と関連付けた報告はなく、全くの新たな知見と考えられる。

F. 健康危害情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibahara T, Onishi T, Franco OE, Arima K, Sugimura Y. Down-regulation of Skp2 is correlated with p27-associated cell cycle arrest induced by phenylacetate in human prostate cancer cells. *Anticancer Res.* 2005; 25(3B):1881-8.
2. Fujikawa S, Matsuura H, Kanai M, Fumino M, Ishii K, Arima K, Shiraishi T, Sugimura Y. Natural history of human prostate gland: Morphometric and histopathological analysis of Japanese men. *Prostate.* 2005;65(4):355-64.

2. 学会発表

1. © 金井優博、石井健一朗、神田英輝、フランコ・オマール、有馬公伸、杉村芳樹: マウス前立腺におけるエストロゲン誘発性増殖性病変の誘導メカニズム: 第93回日本泌尿器科学会総会 (東京) 2005年4月13-16日
2. 石井健一朗、大塚崇史、井口和弘、大西毅尚、平野和行、杉村芳樹: ホルモン依存性 LNCaP 細胞のホルモン不応性獲得による生化学的変化: 第93回日本泌尿器科学会総会 (東京) 2005年4月13-16日
3. 石井健一朗、木瀬英明、サイモン・ヘイワード、杉村芳樹: 上皮-間質の相

互作用から学ぶ前立腺の発生と発癌メカニズム-組織組み替え実験の基礎から応用-: 第24回日本アンドロロジー学会総会 (横浜) 2005年7月22-23日

4. 石井健一朗、金井優博、有馬公伸、杉村芳樹: 組織組み替え実験を応用したステロイドホルモン誘発性前立腺癌モデル: 第64回日本癌学会学術総会 (札幌) 2005年9月14-16日
5. 金井優博、石井健一朗、山田泰司、有馬公伸、杉村芳樹: 腫瘍内血管新生能における前立腺特異抗原 (PSA) の役割-マウス腎被膜下移植モデルを用いた検討-: 第64回日本癌学会学術総会 (札幌) 2005年9月14-16日
6. ヒト尿路系組織移植モデルの確立と薬剤感受性予測システムの構築: 石井健一朗、大西毅尚、内田克典、金井優博、小倉友二、神田英輝、有馬公伸、白石泰三、杉村芳樹: 第55回日本泌尿器科学会中部総会 (神戸) 2005年10月28-30日
7. © 小倉友二、米村重則、石井健一朗、金井優博、神田英輝、杉村芳樹: 低用量 estrogenic chemicals がマウス前立腺に与える影響と病変誘導因子の同定: 第10回日本生殖内分泌学会学術集会 (東京) 2005年11月3日
8. Ishii K, Kanai M, Iguchi K, Otsuka T, Ohnishi T, Hirano K, Sugimura Y: Androgen dependency of human prostate cancer cells controls cellular levels

zinc and formation of tumor vessels:
15th Annual Fall Meeting of the
Society for Basic Urologic Research
(SBUR) in Miami Beach, FL, 2005年12
月1-4日

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他 (データベース等)

なし

厚生労働省研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

低用量暴露による遺伝子発現、たんぱく発現データの解析による
ホメオスタシスに関する研究

分担研究者 福島 昭治 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

内分泌かく乱物質であり、かつ発がん性をもつ α -benzene hexachloride (α -BHC)の低用量暴露による発がん作用を検証した。我々はこれまでに、 α -BHCのラット肝発がん作用を diethylnitrosamine をイニシエーターとする発がん二段階法を用いて検討し、 α -BHC の発がん作用にはホルミシス現象が強く示唆されることを報告した。今年度、 α -BHC のラット肝発がん作用をイニシエーションせずに単独投与法を用いて検討した。肝前がん病変の指標である Glutathione S-transferase placental form (GST-P)陽性細胞巢の発生は 0.01~50 ppm では対照群と差がなく、500 ppm で有意な増加を示した。また、酸化 DNA 障害の指標である 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)の形成レベルと代謝酵素である CYP2B1 の発現量についても同様な傾向を示した。マイクロアレイ法を用いて各投与群の肝組織における遺伝子プロファイリングを解析した結果、500 ppm 投与群において特異的に異常発現している遺伝子を 135 個同定した。以上、 α -BHC 単独投与の本モデルでは、ホルミシス現象が見られなかったが、 α -BHC の発がん作用には閾値があることが確認された。

A. 研究目的

本研究では発がん性をもつ α -BHC の低用量暴露による発がん作用について検証する。すなわち、内分泌攪乱化学物質には齧歯類へ高用量長期投与により発がん性を発揮するものがあり、農薬として日本でも使われていた α -BHC もその一つである。これまで我々は肝発がん二段階モデルを用いて発がん物質 α -BHC のホルミシス現象とともに発がん閾値の存在を明らかにした。今回、低用量単独暴露での発がん作用について検討した。

B. 研究方法

21 日齢、雄性 F344 ラット 140 匹を 7 群に分け α -BHC を 0、0.01、0.05、0.1、1、

50、500ppm の用量で混餌投与した。実験開始 16 週にてラットを屠殺し、肝臓について肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢、酸化 DNA 障害の指標である 8-OHdG の形成レベル、および解毒代謝酵素である CYP2B1 の発現量を検索した。また、各投与群での肝組織における遺伝子プロファイリングをオリゴマイクロアレイ法を用いて検索した。

(倫理面での配慮)

屠殺にあたってはエーテル麻酔下に脱血して行った。また、医学研究科の実験動物取り扱い規定に対応してラットを飼育した。

C. 研究結果

肝前がん病変の指標である GST-P 陽性細胞巢の発生は 0.01~50 ppm では対照群と差がなく、500 ppm で有意な増加を示した。また、酸化 DNA 障害の指標である 8-OHdG の形成レベルと代謝酵素である CYP2B1 の発現量についても同様な傾向を示した。

マイクロアレイ法を用いて各投与群の肝組織における遺伝子プロファイリングを解析した結果、500 ppm 投与群において特異的に異常発現している遺伝子を 135 個同定した。

D. 考察

肝臓における α -BHC 単独投与による前がん病変の発生、酸化 DNA 障害および代謝酵素のレベルが 50 ppm までは対照群と差がなく、500 ppm で有意な増加を示した。このことは α -BHC のラット肝発がんの作用には発がんの閾値が存在することを示唆している。また、本実験で α -BHC のホルミシス現象が見られなかったのはイニシエーションを受けずの 0 ppm α -BHC 対照群での GST-P 陽性細胞巢の発生が非常に低値を示したためと考えられる。

さらに、500 ppm 投与群において特異的に異常発現している 135 個の遺伝子が α -BHC のラット肝発がんに関係すると考えられる。

E. 結論

低用量から高用量の α -BHC 単独投与による肝前がん病変の発生、酸化 DNA 障害、および解毒代謝酵素のレベルを検討した結果、以前の肝発がん二段階モデルを用いた実験の結果と同様に、 α -BHC の肝発がん作用には無作用量が存在することを確認した。従って、以前の結果を合わせると閾値が存在すると結論できる。

E. 健康危険情報

特段無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wei M, Morimura K, Wanibuchi H, Shen J, Salim E I, Moku M, Hakoi K, Fukushima S. JTE-522, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, inhibits induction but not growth and invasion of 1,2-dimethylhydrazine-induced tubular adenocarcinomas of colon in rats. *Int. J. Cancer*, 113: 354-358, 2005.
- 2) ©Kuroda K, Yoshida K, Yoshimura M, Endo Y, Wanibuchi H, Fukushima S., Endo G. Genotoxicity of dimethylarsinous acid: high induction of tetraploids. *Appl. Organometal. Chem.* 19: 221-225, 2005.
- 3) Kang JS, Morimura K, Salim EI, Wanibuchi H, Yamaguchi S, Fukushima S. Persistence of liver cirrhosis in association with proliferation of nonparenchymal cells and altered location of α -smooth muscle actin-positive cells. *Toxicol. Pathol.* 33: 329-335, 2005.
- 4) Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Puatanachokchai R, Salim EI, Hagihara A, Seki S, and Fukushima S. Enhancement by estradiol 3-benzoate in thioacetamide-induced liver cirrhosis of rats. *Toxicol. Sci.* 85: 720-726, 2005.
- 5) ©Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura, K, Nakae D, Tsuda H, Imaida K, Shirai

- T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F. Lack of potential of low dose *N*-nitrosodimethylamine to induce preneoplastic lesions, glutathione *S*-transferase placental form-positive foci, in rat liver. *Cancer Lett.* 222: 11-15, 2005.
- 6) ©Doi K, Wanibuchi H, Salim EI, Morimura K, Kinoshita A, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S. Lack of large intestinal carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine at low doses in rats initiated with azoxymethane. *Int. J. Cancer*, 115: 870-878, 2005.
- 7) Hagiwara A, Murai T, Miyata E, Nabae K, Doi Y, Yoshino H, Ichihara T, Mori S, Fukushima S. Influence of strain and diet on hepatocarcinogenicity of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) in rats: slight inhibition of preneoplastic liver lesion development by uracil. *J. Toxicol. Pathol.* 18: 105-110, 2005.
- 8) ©Fukushima S. Morimura K, Wanibuchi H, Kinoshita A, and Salim EI. Current and emerging challenges in toxicopathology: carcinogenic threshold of phenobarbital and proof of arsenic carcinogenicity using rat medium-term bioassays for carcinogens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207: S225-S229, 2005.
- 9) ©Fukushima S, Kinoshita A, Puatanachokchai R, Kushida M, Wanibuchi H, Morimura K. Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens. *Carcinogenesis*, 26:1835-1845, 2005.
- 10) Murai T, Mori Y, Tatematsu K, Koide A, Hagiwara A, Makino S, Mori S, Wanibuchi H, Fukushima S. Differences in susceptibility to *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine-induced urinary bladder carcinogenesis between SD/gShi rats with spontaneous hypospermatogenesis and SD/cShi rats with spontaneous hydronephrosis. *Cancer Sci.* 96: 637-644, 2005.
2. 学会発表
- <特別講演、シンポジウム、ワークショップ、国際会議>
- 1) 渡邊直人、吉田 緑、五十嵐麻希、高橋正一、木下アンナ、鰐淵英機、福島昭治、中江 大：*Mmh/OGG1* ノックアウトマウスにおける pentachlorophenol による肝発癌感受性。ワークショップ講演，第 21 回日本毒性病理学会，1 月 20-21 日，東京，2005（第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集 W-3-1，p. 49）
- 2) ©福島昭治：化学発がん物質に閾値はあるか。シンポジウム講演，文科省特定領域「発がんと防御」個体レベルでの新しい病理形態学的がん研究の推進と支援に関する委員会 動物発がんヒト発がんの架け橋，2 月 18 日，第一ホテルシーフォート，2005（Program and Abstracts p.10）
- 3) 鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、福島昭治：発がん性評価における前がん病変の意義。ワークショップ講演，第 94 回日本病理学会，4 月 14-16 日，横浜，2005（日本病理学会誌第 94 巻第 1 号

- WS-10-3, p.172)
- 4) Yamaguchi T, Morimura K, Naito S, Miyazi N, Yoshida M, Nakae D, Wanibuchi H, Fukushima S. Development of a multi-organ rat model for mammary, uterine and ovarian carcinogenesis. 96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 16-20, Anaheim, CA, U.S.A., 2005 (AACR proceedings, vol. 46, April 2005, 1078, p. 251)
 - 5) © Puaranachokchai R, Morimura K, Wanibuchi H, Kinoshita A, Kang JS, Funae Y, Fukushima S. Biphasic effect of alpha benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis and possible hormesis mechanism in rats. 96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 16-20, Anaheim, CA, U.S.A., 2005 (AACR proceedings, vol. 46, April 2005, 1190, p. 277)
 - 6) Wei M, Morimura K, Wanibuchi H, Shen J, Fukushima S. Chemoprevention of colon cancer in rats by JTE-522, a selective cyclooxygenase-2inhibitor. 96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 16-20, Anaheim, CA, U.S.A., 2005 (AACR proceedings, vol. 46, April 2005, 2486, p. 583)
 - 7) Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Hagihara A, Salim EI, Fukushima S. Enhancement of hepatocarcinogenicity by MeIQx in thioacetamide-treated liver. 96th Annual Meeting, American Association for Cancer Research, April 16-20, Anaheim, CA, U.S.A., 2005 (AACR proceedings, vol. 46, April 2005, 5716, p. 1344)
 - 8) 福島昭治:発がん物質に閾値はあるか. 特別講演, 第 20 回発癌病理研究会, 8 月 23-25 日, 旭川, 2005 (第 20 回発癌病理研究会プログラム集 特別講演, p. 14)
 - 9) 福島昭治, 鰐淵英機、魏 民、森村圭一朗:ハイリスク膀胱癌の自然史. シンポジウム講演, 第 55 回日本泌尿器科学会中部総会, 10 月 28-30 日, 神戸, 2005 (プログラム・抄録集 シンポジウム 膀胱癌 2, p. 54)
 - 10) 鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、福島昭治:有機砒素化合物、MMA、DMA、TMAO の発がん機序解析. シンポジウム講演, 第 12 回ヒ素シンポジウム, 11 月 5-6 日, 岩手, 2005 (講演要旨集 シンポジウム 2A-09, p. 90)
- <一般演題>
- 1) 山口智晴、木下アンナ、サリムエリサイド、森村圭一朗、鰐淵英機、福島昭治:エゾマツ樹皮の主成分であるトリテルペン類 PJ-1 の癌抑制効果; DMBDD 誘発ラット多臓器発癌モデルでの検討. 第 21 回日本毒性病理学会, 1 月 20-21 日, 東京, 2005 (第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集 P-16, p. 59)
 - 2) 串田昌彦、森村圭一朗、鰐淵英機、木下アンナ、福島昭治:エタノールの MeIQx 誘発ラット肝発がん促進作用. 第 21 回日本毒性病理学会, 1 月 20-21 日, 東京, 2005 (第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集 P-45, p. 74)
 - 3) 柚木孝之、鰐淵英機、木下アンナ、萩原淳司、市原敏夫、高場克己、加国雅和、福島昭治:伊東モデルを用いた無機 3 化ヒ素、無機 5 価ヒ素、及びアルセノベタインの肝発癌性及び修飾作用. 第 21 回

- 日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-46, p. 74)
- 4) © Puatanachokchai R, Morimura, K, Wanibuchi H, Kinoshita A, Kang JS, Funae Y, Fukushima, S. Hormetic effect of alpha benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis and possible mechanisms in rats. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-49, p. 76)
- 5) 宮地夏子、鰐淵英機、山口貴嗣、村井隆、森 聖、福島昭治: 遺伝毒性発がん物質 Diethylnitrosamine (DEN) の低用量域における肝発がん性と in vivo 変異原性の閾値の存在. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-53, p. 78)
- 6) Kang JS, Wanibuchi H, Hagihara A, Morimura K, Salim EI, Tagawa Y, Fukushima S. Enhancement of hepatocarcinogenicity by 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) in thioacetamide-induced liver damage. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-54, p. 78)
- 7) 鰐淵英機、木下アンナ、魏 民、萩原淳司、柚木孝之、福島昭治: 有機ヒ素化合物の MMA、DMA、TMAO の肝発がん促進作用の分子病理学的解析. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-57, p. 80)
- 8) 林 修次、鈴木 智、二宮芙美子、入村兼司、福島昭治: SD ラットにみられた甲状腺濾胞上皮細胞の空胞化/水腫性変性. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-68, p. 85)
- 9) 萩原淳司、森村圭一朗、木下アンナ、魏 民、鰐淵英機、福島昭治: チェルノブイリ原発事故後の膀胱炎及び膀胱上皮内がんにおける遺伝子変異の検索. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-89, p. 96)
- 10) 木下アンナ、鰐淵英機、魏 民、野田哲生、西村 暹、福島昭治: *Mmh/OGGI* ミュータントマウスにおける Dimethylarsinic acid の発がん性. 第21回日本毒性病理学会, 1月20-21日, 東京, 2005 (第21回日本毒性病理学会講演要旨集 P-96, p. 99)
- 11) 山口貴嗣、鰐淵英機、魏 民、宮地夏子、カンジンソック、串田昌彦、福島昭治: 臭素酸カリウムの低用量域における腎毒性- Big Blue rat での検討-. 第94回日本病理学会, 4月14-16日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第94巻第1号 P2-I-109, p. 305)
- 12) 山口貴嗣、鰐淵英機、魏 民、宮地夏子、カンジンソック、串田昌彦、福島昭治: 臭素酸カリウムの低用量域における腎毒性- Big Blue rat での検討-. 第94回日本病理学会, 4月14-16日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第94巻第1号 P2-I-109, p. 305)
- 13) カンジンソック、鰐淵英機、森村圭一朗、木下アンナ、福島昭治: Analysis of gene expression from early stages and tumors in MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis. 第94回日本病理学会, 4月14-16日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第94巻第1号 P3-I-42,

- p. 345)
- 14) 魏 民、鰐淵英機、串田昌彦、カンジンソック、プアタナチョックチャイライウィワン、福島昭治：プロポリスの Diethylnitrosamine 誘発ラット肝発癌に対する修飾作用. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-46, p. 346)
 - 15) 串田昌彦、森村圭一朗、鰐淵英機、木下アンナ、福島昭治：エタノールの MeIQx 誘発ラット肝発がん促進作用. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-44, p. 346)
 - 16) ◎プアタナチョックチャイライウィワン、鰐淵英機、カンジンソック、魏 民、木下アンナ、串田昌彦、福島昭治：Long-term exposure of α -BHC on hepatocarcinogenesis and gene expressions in rat pretreated with DEN. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-47, p. 346)
 - 17) 柚木孝之、鰐淵英機、木下アンナ、市原敏夫、串田昌彦、福島昭治：BCAA (分枝鎖アミノ酸) の肝発癌修飾作用の検討. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-52, p. 347)
 - 18) チューシリヤオワレス、プアタナチョックチャイライウィワン、魏 民、木下アンナ、鰐淵英機、福島昭治：Low dose of alpha-benzene hexachloride on early stage of rat hepato-carcinogenesis. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-112, p. 357)
 - 19) 木下アンナ、鰐淵英機、魏 民、福島昭治：Mmh/OGG1 ミュータントマウスにおける Diemthylarsinic acid の発がん性試験. 第 94 回日本病理学会, 4 月 14-16 日, 横浜, 2005 (日本病理学会誌第 94 巻第 1 号 P3-I-219, p. 375)
 - 20) 木下アンナ、鰐淵英機、山口智晴、魏 民、田中麗子、福島昭治：エゾマツ樹皮の主成分であるトリテルペン類 PJ-1 のがん予防の効果. 日本食品化学学会第 11 回総会・学術大会, 4 月 27-28 日, 東京, 2005 (日本食品化学学会第 11 回総会・学術大会抄録集 一般演題 7, p. 27)
 - 21) カンジンソック、鰐淵英機、森村圭一朗、木下アンナ、尾崎圭介、福島昭治：MeIQx 誘発ラット肝発癌における網羅的遺伝子解析. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PA1-0030, p. 76)
 - 22) 魏 民、鰐淵英機、柚木孝之、カンジンソック、プアタナチョックチャイライウィワン、高場克己、福島昭治：プロポリスの Diethylnitrosamine 誘発ラット肝発癌に対する修飾作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP1-0496, p. 213-4)
 - 23) 柚木孝之、鰐淵英機、市原敏夫、串田昌彦、田川義章、福島昭治：BCAA (分枝鎖アミノ酸) の肝発癌修飾作用の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0773, p. 359)
 - 24) 須方督夫、宇和川 賢、尾崎圭介、串田昌彦、森村圭一朗、鰐淵英機、福島昭治： α 2-マクログロブリン：グルタチオン S-トランスフェラーゼ胎盤型酵素陰性ラット肝前癌病変に特異的な新規マーカー. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0776, p. 359)
 - 25) アルサミハムド、木下アンナ、鰐淵英機、魏 民、福島昭治：Mmh/OGG1 ミュ

- ー タントマウス肺における Dimethylarsinic acid の発がん性メカニズム解析. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0778, p. 359-360)
- 26) 大森雅子、魏 民、森村圭一朗、カンジンソック、津田洋幸、福島昭治: ヒト正常型 c-Ha-ras トランスジェニックラットにおける Socium L-ascorbate の膀胱発がん性の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0779, p. 360)
- 27) 今井則夫、吉野裕子、市原敏夫、萩原昭裕、玉野静光、福島昭治、津田洋幸: 中期肝発がん性試験法 (伊東法) を用いた遺伝毒性発癌物質 Quinoline の低用量域における発がん性評価. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0781, p. 360)
- 28) 辻村和也、一瀬文雄、今田中伸哉、山崎寛治、福島昭治: ラット中期肝発がん性試験 (伊東法) を用いた四塩化炭素吸入暴露による発がん性の検討. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0782, p. 360)
- 29) チューシリヤオワレス、プアタナチョックチャイラウィワン、木下アンナ、魏民、鰐淵英機、須方督夫、福島昭治: Diethylnitrosamine 誘発ラット肝中期発癌試験法を用いた Methyleugenol と Phenobarbital の肝発癌に及ぼす複合作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0784, p. 361)
- 30) 串田昌彦、森村圭一朗、鰐淵英機、木下アンナ、山口修司、福島昭治: エタノールの MeIQx 誘発ラット肝発がん促進作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0785, p. 361)
- 31) 萩原淳司、鰐淵英機、プアタナチョックチャイラウィワン、カンジンソック、加国雅和、関守一、福島昭治: F344 ラット肝中期発がん試験 (伊東法) における phenobarbital 肝発がん感受性の breeder 間の差. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0788, p. 362)
- 32) アネトジョンイブハビミエン、カンジンソック、鰐淵英機、森村圭一朗、サリムエリサイド、林 修次、福島昭治: Thioacetamide 誘発肝硬変における estradiol3-ben-zoate の促進作用. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0914, p. 387)
- 33) 木下アンナ、鰐淵英機、魏 民、山口貴嗣、北野光昭、福島昭治: フェノバルビタール投与により誘発したラット肝前がん病変 (GST-P 陽性細胞巢) のプロテオーム解析. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP2-0992, p. 403)
- 34) 土井賢一郎、鰐淵英機、魏 民、柚木之、村井 隆、工藤新三、福島昭治: AOM-PhIP 誘発ラット大腸腺癌組織での、3 次元 cDNA マイクロアレイ法を用いた遺伝子発現解析. 第 64 回日本癌学会学術総会, 9 月 14-16 日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP3-1117, p. 474)
- 35) 山口貴嗣、魏 民、宮地夏子、鰐淵英機、福島昭治: 臭素酸カリウムの低用量域における腎発癌性- Big Blue ラットでの検討-. 第 64 回日本癌学会学術総

会, 9月14-16日, 札幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事 PP3-1134, p. 477)

- 36) ◎プアタナチョックチャイラウィワ
ン、鰐渕英機、カンジンソック、チュー
シリヤオワレス、魏 民、森 聖、福島
昭 治 : Alpha-Benzene
hexachloride (alpha-BHC) のラット肝発
癌ホルミシス現象の機序解明. 第64回
日本癌学会学術総会, 9月14-16日, 札
幌, 2005 (日本癌学会学術総会記事
PA3-1135, p. 478)

G. 知的所有権の所得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他 (データベース等)

以上

Ⅱ. 分担研究報告書

Ⅱ. 基盤研究

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

雌性生殖器官への作用メカニズムの解明

分担研究者 井口泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター教授

研究要旨

臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的として、それぞれの生育過程にあるマウスにエストロゲンを曝露し、雌性生殖器官における遺伝子応答を解析した。その結果、新生仔期には比較的少数の遺伝子がエストロゲンに応答することが明らかになった。これらの遺伝子について、そのパスウェイについて解析したところ、成熟時とは異なっていることが示唆された。臨界期に特異的に発現変動する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その解析を進めている。

A. 研究目的

臨界期における内分泌かく乱化学物質曝露が生体に影響を及ぼすメカニズムを明らかにする。すなわち、エストロゲンにより誘起される組織異常の臨界期の概念を明確にするために、臨界期前後でのエストロゲン処理により発現変動する遺伝子をマイクロアレイ法を用いて探索するとともに、組織異常に関連する遺伝子を明らかにし、化学物質の低用量および複合影響の結果と照合させる。

B. 研究方法

それぞれの生育過程にあるマウスにエストロゲンを曝露し、雌性生殖器官における応答を解析した。すなわち、遺伝子発現の C57BL/6J マウスを動物実験に関する指針に従い飼育し交配したのち、新生仔マウスを得た。出生直後、出生後 5 日、20 日、70 日にそれぞれジエチルstilbestrol (DES) を 1g 体重あた

り 2 μ g 投与した。対照群にはごま油を用いた。投与後、通常 6 時間で子宮および膣を摘出し RNA を調製した。生後 70 日のマウスの解析にあたっては、その 2 週間前に卵巣摘出を行った。

調製した RNA を精製した後、cDNA 合成、ラベル化 cRNA プロブの合成を行い、合成した 15 μ g の cRNA プロブを用いて、DNA マイクロアレイ (Mouse U74Av2 ; Affymetrix 社) にハイブリダイゼーションを行い、規定の方法に従い約 1 万 2 千遺伝子の発現について解析を行った。

また、エストロゲン処理により発現が変動する一連の遺伝子について、直接的にエストロゲン受容体によって遺伝子発現が制御されている遺伝子を同定するために、クロマチン免疫沈降法を用いて候補遺伝子の転写制御領域の解析を行った。

一方で、周生期における他の内分泌か

く乱化学物質曝露他の核内受容体の影響を調べるために、トリブチルスズ(TBT)妊娠マウスに投与し、仔に及ぼす影響を解析した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験においては、自然科学研究機構動物実験委員会の「自然科学研究機構における動物実験に関する指針」に準拠した。(使用する動物の屠殺にあたっては、頸椎脱臼法を用いた。)

C. 研究結果

様々な生育段階にあるマウスにエストロゲンを投与し、雌性生殖器官における応答遺伝子について解析を行った。その結果、新生仔期(0日、5日)と成熟期(70日)で応答遺伝子が大きく異なることが明らかになった。

新生仔にエストロゲンを曝露し、子宮における遺伝子発現変化を解析したところ、解析した1万2千の遺伝子のうちおよそ30遺伝子が発現上昇していた。これに対し、出生70日後のマウスにおいては600以上の遺伝子がエストロゲンにより発現が誘導されていた。また新生仔期に発現が誘導される遺伝子の多くは出生70日後のマウスにおいて誘導される遺伝子とは異なっており、新生仔期に特有のエストロゲン応答をすることが示唆された。これらと同様の遺伝子発現変化は、マウスの膣でも観察され、新生仔期には少数の遺伝子がエストロゲンに応答するのに対して、成熟期でははるかに多数の遺伝子がエストロゲンに応答した。こうした新生仔期特有のエストロゲン応答性が急速に変化していくことから、これらの遺伝子が臨界期において重要な役割を果た

している可能性が示唆された。これは、新生仔期のエストロゲン曝露による雌性生殖器官への不可逆的な影響を解明する上でも重要な知見である。

さらに、エストロゲン応答遺伝子について、詳細な解析を行い、クロマチン免疫沈降法により、エストロゲンが受容体を介して直接的に発現を制御している遺伝子を同定した。アドレノメジュリン遺伝子はその1つであり、エストロゲン投与後1-2時間後にすみやかに遺伝子発現制御領域に結合し、その遺伝子発現を誘導することが明らかになった。また、アドレノメジュリンの受容体の機能を変換する遺伝子であるRAMP3もエストロゲン受容体により直接エストロゲン受容体の制御を受けることが明らかになり、これらが強制的にマウス子宮の間質において重要な機能を果たしていることが示唆された。

また、胎児期のTBT投与により、出生直後のマウスの肝臓で、脂肪合成が誘導されることが明らかになった。一連の解析から、TBTはRXR α およびPPAR γ のリガンドとして機能することが明らかになった。さらに、遺伝子発現プロファイルの解析から、脂肪合成に関連した一連の遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。

D. 考察

エストロゲン受容体は胎仔期から発現していることが知られているが、実際にエストロゲンを産生するのは思春期以降である。思春期以前のエストロゲン受容体が機能しているのかについては、いまだ明確になっていない。しかし本研究の

結果、新生仔期にエストロゲン曝露により強制的にエストロゲン受容体を機能させた場合、雌性生殖器官における反応は成育段階で異なっていることが示された。すなわち、新生仔期の雌性生殖器官はその時点でエストロゲンに適切に応答する準備ができていなかったとも考えられる。臨界期が終了する生後 5 日では、エストロゲンにより誘導される遺伝子数はさらに遺伝子の種類も異なっていた。したがって臨界期（出生 5 日以内）においてのみエストロゲンに応答する遺伝子を明らかにすることは、臨界期について分子レベルで明らかにする上でも重要であると考えられ、これにより、最終的に引き起こされる不可逆的な影響の発現メカニズムを解明できると思われる。

マウスの新生仔期によるエストロゲン影響は既に多くの報告があるが、不可逆的な影響を受けるのは、出生後一定の期間に限定される。こうした感受性の高い期間は臨界期とよばれ、膈上皮のエストロゲン非依存的な増殖は、出生後 5 日以内にエストロゲン曝露があると誘発される。こうした臨界期のメカニズムについては不明であったが、本研究によりエストロゲン曝露により引き起こされる初期の変化について明らかにすることができた。

一方で、クロマチン免疫沈降法をマウスの組織に適用することにより、子宮内でエストロゲン受容体の直接のターゲットとなっている遺伝子を同定できた。この解析系をさらに発展させ、新生仔のマウスにも適用することにより、臨界期におけるエストロゲンの直接のターゲット

遺伝子を同定できる可能性がある。

また、妊娠時期のTBT曝露により新生仔に誘導される脂肪合成は、RXR α およびPPAR γ などの核内受容体を強制的に活性化させることにより、その下流にある脂肪合成経路を不適切な時期に活性化していると考えられる。不適切な時期における核内受容体の活性化による遺伝子発現の攪乱は、エストロゲン様化学物質についても同様であり、今後、エストロゲンのみならず、TBTなどの影響も並行して解析をすすめることにより、臨界期における問題とその作用メカニズムについて明らかにできると思われる。

E. 結論

マウス雌性生殖器官のエストロゲン応答遺伝子は個体の発育につれ大きく変化することが明らかになった。すなわち、エストロゲンが不可逆的な影響を及ぼしうる出生直後の臨界期では、発現が変動する遺伝子は限られており、成獣で応答する遺伝子群とも異なっていた。これら新生仔期特異的にエストロゲンに応答する遺伝子は、エストロゲン曝露による不可逆的な影響の誘発に関与している可能性が高く、現在その解析を進めている。

こうした解析において、今回確立したクロマチン免疫沈降法によるターゲット遺伝子の同定や、関連遺伝子の探索は有効な手法として重要な位置を占める。

またTBTによる影響も、臨界期におけるエストロゲン作用を理解する上で対照ともなる現象であり、今後の詳細な解析が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 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, 43: 61-66, 2005.
2. 井口泰泉：有機溶媒が妊婦に及ぼす影響. 現代化学, No. 406, 12, 2005.
3. 井口泰泉：カラー版 現代生命科学の基礎—遺伝子・細胞から進化・生態まで—都筑幹夫編 教育出版, p. 399, 2005.
4. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Production of male neonates in 4 cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. Chemosphere, 60: 74-78, 2005.
5. Okada, A., T. Sato, Y. Ohta and T. Iguchi: Sex steroid hormone receptors in the developing female reproductive tract of laboratory rodents. J. Toxicol. Sci., 30: 75-89, 2005.
6. 井口泰泉：化学物質と生活環境. 聖教新聞, 5月19日, 2005.
7. 井口泰泉：環境と生物. 生体統御システムと内分泌攪乱. 井上 達、井口泰泉編, シュプリンガー・フェアラー東京, pp. 3-13, 2005.
8. 井上 達・井口泰泉編. 「生体統御システムと内分泌攪乱」. シュプリンガー・フェアラー東京. pp. 321, 2005.
9. 渡邊 肇・井口泰泉：トキシコゲノミクスのニューパラダイム. 医学のあゆみ, 213: 237-241, 2005.
10. 井口泰泉：野生動物観察の重要性. 保健医療科学 (J. Natl. Inst. Public Health), 54: 2-6, 2005.
11. 井口泰泉：内分泌かく乱物質問題の解明のための Ecotoxicogenomics の重要性. 日本衛生学雑誌, 印刷中.
12. Sone, K., M. Hinago, M. Itamoto, Y. Katsu, H. Watanabe, H. Urushitani, O. Tooi, L.J. Guillette, Jr. and T. Iguchi: Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). Gen. Comp. Endocrinol., 143: 151-160, 2005.
13. Watanabe, H., N. Tatarazako, S. Oda, H. Nishide, I. Uchiyama, M. Morita and T. Iguchi: Analysis of expressed sequence tags of the waterbrea *Daphnia magna*. Genome, 48: 606-609, 2005.
14. Todaka, E., K. Sakurai, H. Fukuta, H. Miyagawa, M. Uzuki, M. Omori, H. Osada, Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, T. Iguchi and C. Mori: Fetal exposure to phytoestrogens – the difference in phytoestrogen status between mother and fetus. Environ. Res., 99: 195-203, 2005.
15. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. Chemosphere, 61: 1168-1174, 2005.
16. Ankley, G.T., M.C. Black, J. Garric, T.H. Hutchinson and T. Iguchi: Chapter 6: A framework for assessing the hazard of pharmaceutical materials to aquatic species. In Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts on Aquatic Ecosystems. R.T. Williams ed. SETAC press, pp.183-237, 2005.
17. Mitsui N, T. Fujii, M. Miyahara, T. Oka,