

*Conference “Chemical Industries 2005”*  
(CD-ROM), B-1-2, 2005

G. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

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

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・腎泌尿器外科学・教授

研究要旨

低用量エストロゲン様化学物質の暴露によるマウス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た。ビスフェノール A (BPA) によるマウス前立腺の形態組織学的変化を評価し、さらに、BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子発現を解析した。BPA 経胎盤投与により仔雄マウス成獣時前立腺において認められる squamous change は、ER $\alpha$  の発現量に依存した腺領域特異性を示し、細胞増殖因子 TGF $\alpha$  による MAPK 経路の活性化が関与していることを見出した。BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子はケラチン化に関与する遺伝子群のほか、性分化に関与する SF1 および、その関連遺伝子群であった。BPA は DES の作用と一部共通した形態組織学的変化や腺領域特異性を示すが、遺伝子発現解析からは BPA に、より特徴的な作用が存在する可能性が示唆された。

A. 研究目的

低用量エストロゲン様化学物質（ビスフェノール A: BPA）の暴露によるマウス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た。すなわち、性ステロイドホルモンに依存する前立腺では、細胞の分化や増殖、そして腺管分枝形態発生など、上皮や間質細胞に存在する性ステロイドホルモン受容体を介した上皮-間質の相互作用に制御されてい

る。我々は、前立腺の異常増殖性病変が体内ホルモンバランスの不均衡に起因していると考え、低用量エストロゲン様化学物質 BPA 暴露によるマウス前立腺の異常増殖機構に着目した。

B. 研究方法

BPA によるマウス前立腺の形態組織学的変化を評価し、さらに、BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子発現を解析した。すなわち、

#### 1. BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

9 週齢の雄 BALB/c マウスに対して 3 週間、0.2, 2, 20, 200 mg BPA もしくは 2 mg ジエチルスチルベステロール (DES) を自家製ペレットにして皮下投与した。前立腺は anterior prostate (AP), dorsolateral prostate (DLP), ventral prostate (VP) という 3 つの lobe (腺) へと微小解剖し、形態組織学的な変化を評価した。

#### 2. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺の形態組織学的変化

妊娠 13-18 日目の間、雌 BALB/c マウスに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 µg/kg/day) もしくは DES (0.2 µg/kg/day) を強制胃内投与し、生後 12 週齢まで育てた。前立腺は上記 3 つの lobe へと微小解剖し、形態組織学的な変化を評価した。

#### 3. 無血清器官培養法における成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

9 週齢の雄 BALB/c マウス前立腺を AP, DLP, VP へと微小解剖し、培地に浮かせたフィルター上に静置させた。培地に DES や BPA, TGF $\alpha$ , EGF を添加し、2, 4, 6 日目に形態組織学的変化を評価した。

#### 4. エストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) の発

#### 現・分布

12 週齢の雄 BALB/c マウス前立腺を AP, DLP, VP へと微小解剖し、各 lobe より RNA 抽出後、リアルタイム PCR を施行した。また、免疫組織化学染色法によりマウス前立腺組織における ER $\alpha$  の発現・分布を検討した。

#### 5. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時の前立腺変化に関する遺伝子群の同定

妊娠 13-16 日目の間、雌 C57BL/6 マウスに対して、トコフェロール除去済みのコーンオイルに溶解した BPA (20 µg/kg/day) もしくは DES (0.2 µg/kg/day) を強制胃内投与し、出生前後 (E17, E18, P0) の泌尿生殖洞を回収した。網羅的遺伝子発現変動解析については五十嵐 勝秀 班員に依頼し、Perccellome 手法を適用した Affymetrix 社の Genechip システムによる解析を実施した。

#### (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

BPA 経胎盤投与により仔雄マウス成獣時前立腺において認められる squamous change は、ER $\alpha$ の発現量に依存した腺領域特異性を示し、細胞増殖因子 TGF $\alpha$ による MAPK 経路の活性化が関与していることを見出した。BPA 経胎盤投与により変化する泌尿生殖洞の遺伝子はケラチン化に関与する遺伝子群のほか、性分化に関与する SF1 および、その関連遺伝子群であった。すなわち、

### 1-1. BPA 経皮下投与による成獣マウスの体重と生殖器重量に対する影響

体重について、DES 投与群で有意な体重減少が認められたが、BPA 投与群では変化しなかった。

前立腺について、DES 投与群では AP および DLP の重量が有意に減少したものの、BPA 投与群における影響は認められなかった。精囊腺重量は、DES (2 mg) と 20 mg および 200 mg BPA 処理群において有意に減少した。

### 1-2. BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

DES 投与群では、AP において顕著な扁平上皮化生 (squamous metaplasia: SQM) が認められた。SQM とは、CK14 陽性の基底上皮細胞が過増殖・重層化し、さらに CK10 発現誘導を伴う変化である。AP とは対照的に、DLP および VP においては基底上皮細胞数の増加 (重層化なし) と、CK10 発現誘導が認められるだけであり、これ

を squamous change と定義付けた。

BPA 投与群では、どの lobe においても腺管構造の形態学的な変化は認められなかった。しかし、 $>2$  mg BPA 投与群の AP と DLP では squamous change が認められた。この変化は BPA の濃度依存的に強く認められ、今回の検討で最も高濃度であった 200 mg BPA 投与群では、すべての lobe で基底上皮細胞が CK10 陽性であった。さらに、BPA による squamous change は、lobe (腺) により感受性が異なることも示された (AP $>$ DLP $>$ VP)。

### 2. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時前立腺の形態組織学的変化

BPA (20  $\mu$ g/kg/day) および DES (0.2  $\mu$ g/kg/day) 投与群ともに、12 週齢マウス前立腺における腺管構造の形態組織学的な変化は認められなかった。しかし、両群ともに、BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺での変化と同様の squamous change が確認された (AP $>$ DLP $>$ VP)。

### 3. 無血清器官培養法における成獣マウス前立腺の形態組織学的変化

BPA (1  $\mu$ M) および DES (1 nM) 処理群で、顕著な SQM の誘導を認めた。しかし、BPA (1 nM) では何の変化も認めなかった。一方、TGF $\alpha$  (20 ng/mL) 処理群でも BPA (1  $\mu$ M) と同様の SQM を誘導した。本実験における SQM の誘導についても、全ての処理群で一致して、腺領域特異性が示された (AP $>$ DLP $>$ VP)。

#### 4. エストロゲン受容体 $\alpha$ (ER $\alpha$ ) の発現・分布

成獣マウス前立腺における ER $\alpha$  の mRNA 発現量は、BPA による squamous change の腺領域特異性と一致して、AP > DLP > VP の順であった。また、病理組織学的な検討により ER $\alpha$  がマウス前立腺の上皮細胞にも発現していることを見出した。

#### 5. BPA 経胎盤投与による仔雄マウス成獣時の前立腺変化に関与する遺伝子群の同定

DES および BPA 投与群ともに、E17 泌尿生殖洞におけるエストロゲン受容体  $\alpha$  の発現が対照群に比較して有意に高値を示した。BPA 投与群に特徴的な遺伝子発現の変化はケラチン化に関与するものが多かったが、今回、興味深い遺伝子として steroidogenic factor-1 (SF1) が得られた。性分化に強く関与する SF1 の発現上昇に伴い、そのターゲット遺伝子である anti-Mullerian hormone (AMH), AMH receptor 2, Cyp11a1、さらに SF1 の関連遺伝子 Gata4 の発現上昇も認められたことから、胎盤を経て胎児へ移行した BPA は、泌尿生殖洞における SF1 および、その関連遺伝子群の発現変化に大きく関与している可能性が示された。

#### 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。特に、3) の腺内の異質性 (heterogeneity) について、ヒト前立腺では肥大症結節が transitional zone: TZ (移行領域) から発生し、癌は主に peripheral zone: PZ (辺縁領域) から発生することが知られているが、このような前立腺内における領域特異的な増殖性疾患の発生機序については未だ解明されていない。また、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ことから、腺管構造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、ヒト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。

我々の実験動物を用いた検討において、低用量エストロゲン様化学物質 (BPA や DES) に対する感受性は、成獣マウス前立腺の lobe (腺) に特徴的であった (AP > DLP > VP)。そこで、各 lobe における ER $\alpha$  の mRNA 発現量をリアルタイム PCR により検討したところ、BPA や DES に対する感受性と ER $\alpha$  の発現量に強い相関が認められた。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 $\alpha$  の発現が弱く、BPA や DES 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、腺領域特有の異常増殖性疾患を引き起こす要因と考えられた。

また、妊娠 13-16 日目の間、BPA や DES に暴露した胎児では泌尿生殖洞における ER $\alpha$  の発現上昇が確認されており、確かに BPA は ER $\alpha$  を介した作用を発揮していることが理解できる。しかし、BPA 経皮下投与による成獣マウス前立腺の形態組織学的変化を観察してみると、いくら投与量を高濃度 (200 mg) に上げてみても、低用量 DES (2 mg) と同じ現象 (扁平上皮化生 SQM) は認められない。Genechip 解析の結果でも、BPA 投与により変化する泌尿生殖洞内の遺伝子すべてが DES 投与の結果と一致することはなく、むしろ BPA に特徴的な発現変化が多く認められる。よって、BPA の作用は、合成エストロゲン剤 DES が有するエストロゲン作用の一部と共通しているものの、より特徴的な作用を有する可能性が示唆された。これまで我々は、DES を陽性対照として BPA の作用を検討してきたが、今後、BPA に特徴的な作用を検討する必要があると考えられた。

#### E. 結論

低用量 BPA に暴露したマウス前立腺では、DES の作用と一部共通した形態組織学的変化 (squamous change) や ER $\alpha$  の発現量に依存した感受性 (AP>DLP>VP) を示すため、BPA は ER $\alpha$  を介して作用を発揮すると考える。しかし、高用量 BPA の投与で DES と同じ形態組織学的変化を示すことはなく、さらに遺伝子発現変化の結果からも、BPA に、より特徴的な作用が存在する可能性が示唆された。我々の検討にお

いて、マウス胎児期に低用量 BPA の暴露を受けると、成長後の前立腺でも形態組織学的変化を認めたことから、ヒトにおいても母体が BPA に暴露した場合、中高年で発症する肥大症結節や癌の発生への関与が推察された。

#### F. 健康危害情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamada Y, Toyota M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. *Int. J. Cancer*, 112: 840-845, 2004.

Fukatsu T, Hirokawa Y, Araki T, Hioki T, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Tsukino H, Qiu D, Katoh T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Genetic polymorphisms of hormone-related genes and prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res.*, 24: 2431-2437, 2004.

Ishii K, Otsuka T, Iguchi K, Usui S, Yamamoto H, Sugimura Y, Yoshikawa K, Hayward SW, Hirano K. Evidence that the prostate-specific antigen (PSA)/Zn<sup>2+</sup> axis may play a role in human prostate cancer cell invasion. *Cancer Lett.*, 207: 79-87, 2004.

Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Ishii K, Onishi T, Sugimura Y, Hirano K. Zinc and metallothionein levels and expression of zinc transporters in androgen-independent subline of LNCaP cells. *J. Androl.*, 25: 154-161, 2004.

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.*, 25: 1881-1888, 2005.

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*, 65: 355-364, 2005.

Iguchi K, Otsuka T, Usui S, Sugimura Y, Hirano K. Correlation between ZIP2 messenger RNA expression and zinc level in rat lateral prostate. *Bio. Trace*

*Elem. Res.*, 112: 159-168, 2006.

Shibahara T, Onishi T, Franco OE, Arima K, Nishikawa K, Yanagawa M, Hioki T, Watanabe M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Sugimura Y. A G/A polymorphism in the androgen response element 1 of prostate-specific antigen gene correlates with the response to androgen deprivation therapy in Japanese population. *Anticancer Res.* 26: 3365-3372, 2006.

© Ogura, Y., Ishii, K., Kanda, H., Kanai, M., Arima, K., Wang, YZ., Sugimura, Y. Bisphenol A induces permanent squamous change in mouse prostatic epithelium, *Differentiation*, in press

Uchida K, Kanai M, Yonemura S, Ishii K, Hirokawa Y, Sugimura Y. Proprotein convertases modulate budding and branching morphogenesis of rat ventral prostate. *Int. J. Dev. Biol.*, in press

## 2. 学会発表

米村重則、O.E. Franco、内田克典、蘇 晶石、金原弘幸、有馬公伸、杉村芳樹：低用量エストロゲン誘による前立腺の発育に関する影響：第92回日本泌尿器科学会総会（大阪）2004年4月10-13日

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

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

小倉友二、石井健一朗、金井優博、神田英輝、有馬公伸、杉村芳樹：低用量ビスフェノールAがマウス前立腺に与える影響の検討：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15日

神田英輝、石井健一朗、小倉友二、金井優博、金原弘幸、有馬公伸、杉村芳樹：  
マウス前立腺の形態発生に関連するlobe特異的な遺伝子の検索：第94回日本泌尿器科学会総会（福岡）2006年4月12-15日

小倉友二、石井健一朗、金井優博、神田英輝、有馬公伸、杉村芳樹：低用量ビスフェノールAがマウス前立腺に与える影響：第2回前立腺生物学シンポジウム（鳥羽）2006年6月15-16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



## 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

### 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、雌性生殖器官における遺伝子応答を解析した。エストロゲン、アンドロゲンによる雌性生殖器官不可逆化はエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )—上皮成長因子—上皮成長因子受容体—ER $\alpha$  のオートループが形成されること、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し、そのパスウェイは成熟時とは異なっていることを明らかにした。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組織不可逆化に関与している可能性が高く、メチル化の変動を含め、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、エストロゲンおよびアンドロゲンにより誘起される組織異常の分子的背景を理解すること、さらにエストロゲンによ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

新生児マウスへのエストロゲンおよびアンドロゲン投与により誘起された、膈上皮の卵巣非依存的な細胞増殖の分子メカニズムを解析した。また、この現象には特定の臨界期があることから、生育過程にあるマウスに、臨界期の前後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。すなわち、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スチルベストール (2  $\mu\text{g/g}$  b.w. DES) を投与した。投与後、通常 6 時間で子宮および膈を摘出し 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 を精製後、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(ER)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、周生期におけるエストロゲン活性を持たない内分泌かく乱化学物質曝露による核内受容体への影響を調べるために、トリブチルスズ(TBT)を妊娠マウスに投与し、仔に及ぼす影響をマイクロア

レイ法および組織学的に解析した。

(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

(1) 出生直後にエストロゲンを投与して不可逆的な細胞増殖を示す膺においては、ER $\alpha$ が必須であること、ER $\alpha$ のリン酸化—上皮成長因子の発現—上皮成長因子受容体のリン酸化—細胞内シグナル—ER $\alpha$ リン酸化—細胞増殖のオートループが形成されていることを明らかにした。

(2) さらに、出生直後のアンドロゲン投与によっても組織不可逆化が起こり、アンドロゲンは ER $\alpha$ を介して作用しており、上記と同様の分子メカニズムが働いている可能性を示唆した。

(3) 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

ストロゲンに応答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、マウスの膺でも観察され、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。

(4) さらに、エストロゲン応答遺伝子について、クロマチン免疫沈降法により詳細な解析を行い、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を明らかにした。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ERによる直接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。

(5) また、胎児期のTBT投与により、出生直後のマウスの肝臓、乳腺などで、脂肪合成が誘導されることを明らかにした。一連の解析から、TBTはRXR $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ 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

ER 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である。思春期以前の ER 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 ER 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、膣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。不可逆的に細胞増殖する膣に発現す

る遺伝子も同定した。これらの遺伝子のメチル化の変異等について解析する必要があり、現在この点に関して解析を継続している。

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 ER 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 $\alpha$ およびPPAR $\gamma$ 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かく乱は、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。

#### F. 健康危険情報

なし

#### E. 結論

臨界期でのエストロゲンおよびアンドロゲン曝露によるマウス雌性生殖器官不可逆化には ER $\alpha$ が必須であり、ER $\alpha$ のリン酸化—上皮成長因子発現—上皮成長因子受容体リン酸化—細胞内シグナル—ER $\alpha$ リン酸化—細胞増殖のカスケードが

形成されることが明らかとなった。また、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。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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.
2. 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.
3. 井口泰泉：森田昌敏編、考えよう地球環境 7 化学物質と健康の本. ポプラ社. 2004.
4. 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.
5. 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.
6. 井口泰泉：環境ホルモンの最新動向. 生活と環境, 49 (9): 9-13, 2004.
7. 井口泰泉：日本がリードする環境ホルモン問題. 時報, 37 (10): 32-33, 2004.
8. 鎌迫典久, 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, 17: 439-449, 2004.
9. 井口泰泉：ゴードン会議に参加して. 環境ホルモン学会ニュースレター. 7(2): 4, 2004.
10. 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.
11. 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, 2004.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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, 2004.
20. Okada, A., Y. Ohta, S.L. Brody, H. Watanabe, 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.
21. Watanabe, H., A. Suzuki, M. Goto, D.B. Lubahn, H. Handa and T. Iguchi: Tissue-specific estrogenic and non-estrogenic effects of a xenoestrogen, nonylphenol. *J. Mol. Endocr.*, 33: 243-252, 2004.
22. 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.
23. 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.
24. Kohno, S., M. Fujime, Y. Kamishima and T. Iguchi: Sexually dimorphic basal water absorption at the isolated pelvic patch of

- Japanese tree frog, *Hyla japonica*. J. Exp. Zool., 301A: 428-438, 2004.
25. 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: 21-30, 2004.
26. 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: 228-236, 2004.
27. 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*. BBRC, 322: 508-513, 2004.
28. Tominaga, N., S. Kohra, T. Iguchi and K. Arizono: Effects of perfluoro organic compound toxicity on nematode *Caenorhabditis elegans* fecundity. J. Health Sci., 50: 545-550, 2004.
29. 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., 33: 763-771, 2004.
31. Nakada, N., H. Nyunoy, M. Nakamura, A. Hara, T. Iguchi and H. Takada: Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. Environ. Toxicol. Chem., 23: 2807-2815, 2004.
32. Inudo, M., H. Ishibashi, N. Matsumura, M. Matsuoka, T. Mori, S. Taniyama, K. Kadokami, M. Koga, R. Shinohara, T. Hutchinson, T. Iguchi and K. Arizono: Levels of estrogenicity, dietary phytoestrogen and organochlorine pesticide in an experimental fish diet and reproduction and hepatic vitellogenin expression in medaka (*Oryzias Latipes*). Comp. Med., 54: 673-680, 2004.
33. 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.
34. 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.
35. 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.
36. 井口泰泉: 化学物質と生活環境. 聖教新聞, 5月19日, 2005.
37. 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・フェアラーク東京, pp. 3-13, 2005.
38. 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・フェアラーク東京, pp. 321, 2005.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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 $\beta$ -trenbolone on masculinization of mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, 143: 151-160, 2005.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
47. 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*, 61: 11-18, 2006
48. 井口泰泉: 環境ホルモン研究の新たな話題. *医学のあゆみ*, 216: 616-617, 2006.
49. 永田恵美子、井口泰泉: 内分泌攪乱物質への国際的取り組み. *ホルモンと臨床*, 54: 253-260, 2006.
50. Watanabe, H., E. Takahashi, M. Kobayashi, M. Goto, A. Krust, P. Chambon and T. Iguchi: The estrogen-responsive adrenomedullin and receptor-modifying protein 3 gene identified by DNA microarray analysis are directly regulated by estrogen receptor. *J. Mol. Endocr.*, 36: 81-89, 2006.
51. Katsu, Y., J. Myburgh, S. Kohno, G.E. Swan, L.J. Guillette Jr. and T. Iguchi: Molecular cloning of estrogen receptor a of the Nile crocodile. *Comp. Biochem. Physiol., Part A*, 143: 340-346, 2006.
52. Katsu, Y. and T. Iguchi: Tissue specific expression of Clec2g in mice. *Europ. J. Cell Biol.*, 85: 345-354, 2006.
53. Inada, K., S. Hayashi, T. Iguchi and T. Sato: Establishment of a primary culture model of mouse uterine and vaginal stroma for studying *in vitro* estrogen effects. *Exp. Biol. Med.*, 231: 303-310, 2006.
54. Matsuno, T., N. Tominaga, K. Arizono, T. Iguchi and Y. Kohara: Graphical Gaussian modeling for gene association structures based on expression deviation patterns induced by various chemical stimuli. *Ice Trans. Inf. Syst.*, E89-D: 1563-1574, 2006.
55. Oka, T., N. Mitui, M. Hinago, M. Miyahara, T. Fujii, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, T. Iguchi, Y. Hanaoka and H. Mikami: All ZZ male *Xenopus laevis* provides a clear sex reversal test for

- feminizing endocrine disruptors. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 63: 236-243, 2006.
56. Watanabe, H. and T. Iguchi: Using ecotoxicogenomics to evaluate the impact of chemicals on aquatic organisms. *Marine Biol.*, 149: 107-115, 2006.
57. Suzuki, A., H. Watanabe, T. Mizutani, T. Sato, Y. Ohta and T. Iguchi: Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages. *Exp. Biol. Med.*, 231: 632-640, 2006.
58. Oda, S., N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita and T. Iguchi: Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*, 63: 1477-1484, 2006.
59. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. *Environ. Health Perspect.*, 114 Suppl.1: 101-105, 2006.
60. Gunderson, M.P., S. Kohno, B. Blumberg, T. Iguchi and L.J. Guillette, Jr.: Up-regulation of an alligator Cyp3A gene by toxaphene and dexamethasone and its effect on plasma testosterone concentrations. *Aquat. Toxicol.*, 78: 272-283, 2006.
61. Mitsui N, T. Fujii, M. Miyahara, T. Oka, A. Kashiwagi, K. Kashiwagi, H. Handa, H. Urushitani, N. Santo, O. Tooi and T. Iguchi: Development of metamorphosis assay using *Silurana tropicalis* for the detection of thyroid hormone disrupting chemicals. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 64: 281-287, 2006.
62. Kato, H., T. Furuhashi, M. Tanaka, Y. Katsu, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod. Toxicol.*, 22: 20-29, 2006.
63. Iguchi, T., F. Irie, H. Urushitani, O. Tooi, Y. Kawashima, M. Roberts, L. Norrgren and T.H. Hutchinson: Availability of *in vitro* vitellogenin assay for screening of estrogenic and anti-estrogenic activities of environmental chemicals. *Environ. Sci.*, 13: 161-183, 2006.
64. Grün, F., H. Watanabe, Z. Zamanian, L. Maeda, K. Arima, R. Chubacha, D.M. Gardiner, J. Kanno, T. Iguchi and B. Blumberg: Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol. Endocrinol.*, 20: 2141-2155, 2006.
65. Katsu, Y., S. Kohno, T. Oka, N. Mitsui, O. Tooi, N. Santo, H. Urushitani, Y. Fukumoto, K. Kuwabara, K. Ashikaga, S. Minami, S. Kato, Y. Ohta, L.J. Guillette, Jr., and T. Iguchi: Molecular cloning of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ ; ESR1) of the Japanese giant salamander, *Andrias japonicus*. *Mol. Cell. Endocr.*, 257-258: 84-94, 2006.
66. Kajiwara, M., S. Kuraku, T. Kurokawa, K. Kato, S. Toda, H. Hirose, S. Takahashi, Y. Shibuya, T. Iguchi, T. Matsumoto, T. Miyata, T. Miura and Y. Takahashi: Tissue preferential expression of estrogen receptor gene in the marine snail, *Thais clavigera*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 148: 315-326, 2006.
67. Kobayashi, M., E. Takahashi, S. Miyagawa, H. Watanabe and T. Iguchi:



- Chromatin immunoprecipitation-mediated identification of aquaporin 5 as a regulatory target of estrogen in the uterus. *Genes Cells*, 11: 1133-1143, 2006.
68. Orlando, E.F., Y. Katsu, S. Miyagawa and T. Iguchi: Cloning and differential expression of estrogen receptor and aromatase genes in the self-fertilizing hermaphrodite and male mangrove Rivulus, *Kryptolebias marmoratus*. *J. Mol. Endocrinol.*, 37: 353-365, 2006.
69. Kato, H., K. Naito, Y. Katsu, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Ontogenic expression of estrogen receptor  $\alpha$  in female rat corneas. *Ophthalmic Res.*, 38: 358-362, 2006.
70. Takashima-Sasaki, K., M. Komiyama, T. Adachi, K. Sakurai, H. Kato, T. Iguchi and C. Mori: Effect of exposure to high isoflavone containing diets on prenatal and postnatal offspring mice. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 70: 2874-2882, 2006.
71. Kirigaya, A., S. Hayashi, T. IGUCHI and T. Sato: Developmental effects of ethinylestradiol on reproductive organs of female mice. *In Vivo*, 20: 867-873, 2006.
72. 井口泰泉: 基礎生物学から環境問題を探る. 総研大ジャーナル, no. 10, 2006 秋: 11-13, 2006.
73. 井口泰泉: 巻頭言: 多様な作用メカニズムの解明と研究体制の整備. 環境ホルモン学会ニュースレター, 9 (3) : 1, 2006.
74. Cook, J., T. Iguchi, E. Linney, A. Miracle, J. Shaw, M. Viant and T. Zacharewski: "Omic" Approaches in the context of environmental toxicology. In Benson, W.H. and Di Giulio, R.T. (eds.) *Genomic Approaches for Cross-Species Extrapolation in Toxicology*. Taylor and Francis CRC Press, pp. 1-31, 2007.
75. Watanabe, H., E. Takahashi, Y. Nakamura, S. Oda, N. Tatarazako and T. Iguchi: Development of *Daphnia magna* DNA microarray for the evaluation of toxicity of environmental chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, (in press).
76. Hara, A., K. Hirano, M. Shimizu, H. Fukada, T. Fujita, F. Itoh, H. Takada, M. Nakamura and T. Iguchi: Carp (*Cyprinus carpio*) vitellogenin: characterization of yolk proteins, development of immunoassays and use as a biomarker of exposure to environmental estrogens. *Environ. Sci.*, (in press).
77. Sumi, M., Y. Kawashima, T. Fukumaki, H. Ishibashi, K. Arizono, T. Iguchi and M. Shimizu: Comparison of serum vitellogenin steroid hormone, gonad histology and bioaccumulation in common carp (*Cyprinus carpio*) of two rivers and a lake in Japan: Potential for endocrine disruption. *Environ. Sci.*, (in press).
78. Oda, S., N. Tatarazako, M. Dorgerloh, R. Johnson, O. Kusk, D. Leverett, S. Marchini, T. Nakari, T. Williams, and T. Iguchi: Strain difference in sensitivity to 3,4-dichloroaniline and insect growth regulator, fenoxycarb, in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, (in press).
79. Suzuki, A., H. Urushitani, T. Sato, H. Watanabe, Y. Ohta and T. Iguchi: Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol

*in utero*. Exp. Biol. Med., (in press).

80. Kobayashi, T., T. Iguchi and Y. Ohta: A betalipoproteinemia induced by ORP150 over-expression in mice. Comp. Med., (in press).

81. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Toxicogenomics and Ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption and basic biology in vertebrates and invertebrates. Gen. Comp. Endocr., (in press).

82. Kato, Y., K. Kobayashi, S. Oda, N. Tatarazako, H. Watanabe and T. Iguchi: Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. J. Endocrinol., (in press).

## 2.学会発表

1. A cDNA Microarray For Measuring Global Gene Expression Profiles In *Daphnia magna*: Giving Biomarkers Ecological Relevance (2004).

2. David J. Moore, Fei Ling Lim, Richard Connon, Helen L. Hooper, Steve Maund, Tom Hutchinson, Hajime Watanabe, Wim De Coen, Amanda Callaghan George Orphanides and Richard M. Sibly: British Toxicology Society Meeting 2004/4/7 Edinburgh

3. 勝 義直、宮川信一、井口泰泉: タイトル: マウス臍に発現する 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 4-6 日.

4. 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.

5. 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.

6. 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.

7. Kirigaya, A., T. Sato, T. Iguchi and S. Hayashi: Involvement of MIS and ER $\beta$  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.

8. 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.

9. Oda, S. N. Tatarazako, H. Watanabe, M. Morita, and T. Iguchi Genetic differences in production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. The SETAC North America 26th Annual Meeting Nov. 13-17, 2005. Baltimore Convention Center, Baltimore, Maryland, USA.

10. Watanabe, H.: Ecotoxicogenomics. Annual Meeting and International Conference on Toxicogenomics-2005. Promising Next Generation Technology of

- Toxicogenomics in Drug and Food Safety, and Environmental Health. Oct. 30-Nov. 1, 2005, KIST, Korea.
11. Watanabe, H.: Toxicogenomics approach on endocrine disruptor issue. Toxicogenomics. Nov. 2-5, 2005, Hotel Tirol, Muju, Korea.
  12. Watanabe, H. and Iguchi, T.: Tissue dependent effects of estrogenic chemicals estimated by gene expression profile. 9<sup>th</sup> ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
  13. Iguchi, T. and Watanabe, H. Focused array for evaluation of estrogenic effect of chemicals on mice. 9<sup>th</sup> ICEM Satellite meeting on toxicogenomics. Aug. 30-Sep. 2, 2005, Kauai, Hawaii
  14. Iguchi, T.: Current progress of research on endocrine disrupting chemicals-Possible mechanism of chemicals on developing animals. IWA International Conference, Tsukuba, July 14-16, 2005.
  15. Iguchi, T.: Recent progress of endocrine disrupting chemical issues in Japan. JST China-Japan Collaborative Work, May 31, 2005, Tokyo.
  16. Iguchi, T.: Recent progress of endocrine disrupting chemical issues in Japan and application of ecotoxicogenomics for studying endocrine disruption in vertebrates and invertebrates. Nanjing Medical University, Oct. 26, 2005, China.
  17. Iguchi, T.: Persistent gene expression in mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. Nanjing Medical University. Oct. 26, 2005, China.
  18. Watanabe, H.: Evaluation of chemical contaminants by gene expression profiling of *Daphnia magna*. SETAC, May, 2005,
  19. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質の作用メカニズム. 鳥取大学 まなびぴあ鳥取、10月9日、2005.
  20. 井口泰泉: 内分泌かく乱物質(環境ホルモン)研究の進展と今後の取り組み. 信州大学工学部, 2005年10月21日, 長野.
  21. Guillette, L.J. Jr. and Iguchi, T.: Sex determination in reptiles: genes, hormones and environmental contaminants. 15<sup>th</sup> International Congress of Comparative Endocrinology, Boston, May 22-27, 2005, USA.
  22. Watanabe, H. Evaluation of estrogenic chemicals by gene expression profile. The endocrine society's 87<sup>th</sup> annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego Endocrine Society
  23. Sato, T. Differential expression of BMP2, BMP4 and growth factors in uterus and vagina of neonatal mice. The endocrine society's 87<sup>th</sup> annual meeting (ENDO2005), Jun. 4-7, 2005, San Diego
  24. Iguchi, T.: Molecular Approaches to Understanding Estrogenic Contaminants and the Reproductive System. Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Facultad de Ciencias, Mexico City, Mexico. 2006年3月13日
  25. Iguchi, T.: Molecular approaches to understanding estrogenic contaminants and the reproductive system. Universidad Juarez Autonoma de Tabasco, Villahermosa, Tabasco, Mexico., 2006年3月15日

26. 井口泰泉:地球環境と生物—窒素の功罪一. 第15回日本有病者歯科医療学会総会, 岡崎市, 2006年3月26日
27. Iguchi, T.: Current progress of endocrine disruptor research in Japan. Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9, 2006.
28. Watanabe, H., Tatarazako, N., Oda, S. and Iguchi, T.: Toxicogenomic approach on *Daphnia magna*. Gordon Research Conference 2006: Environmental Endocrine Disruptors, Il Ciocco, Italy, June 4-9, 2006.
29. 井口泰泉:化学物質による内分泌かく乱の幾つかのメカニズムについて. 日本リスク研究学会第19回春期講演シンポジウム. 東京大学山上会館. 2006年6月16日.
30. Iguchi, T.: Temperature-Dependent Sex Determination in Alligators. University of Florida, Gainesville, FL, USA. 2006年7月26日
31. Iguchi, T., H. Watanabe and Y. Katsu: Application of Toxicogenomics for Studying Endocrine Disruption and Basic Biology in Vertebrates and Invertebrates. 23<sup>rd</sup> Congress of European Comparative Endocrinologist, Manchester, UK. 2006年9月1日
32. Iguchi, T.: Application of Toxicogenomics for Studying Endocrine Disruption and Basic Biology in Vertebrates and Invertebrates. IGB, Leibniz-Institute, Inland Fisheries Research Institute, Berlin, Germany. 2006年9月4日
33. Iguchi, T.: Recent Progress of Endocrine Disrupting Chemical Issues in Japan and Application of Ecotoxicogenomics for Studying Endocrine Disruption in Vertebrates and Invertebrates. Kyung Hee University, Korea. 2006年9月21日
34. Iguchi, T.: Application of Toxicogenomics for Studying Endocrine Disruption and Basic Biology in Vertebrates and Invertebrates. Korea Genome Organization (KOGO), Annual Meeting, Soeul, Korea. 2006年9月22日.
35. Iguchi, T.: Developmental Effects of Sex Hormones on Fish. Ecophysiology in Marine Organisms. Center for Marine Bioscience and Biotechnology, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan. 2006年10月3-4日.
36. Katsu, Y. and T. Iguchi: Development of roach estrogen receptor reporter gene assays (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and their application to screen doe environmental estrogens. The 8<sup>th</sup> UK-Japan Annual Scientific Workshop, UK, 2006年10月10日.
37. 井口泰泉:内分泌かく乱物質の生体影響に関する最近の知見と今後の課題. 第50回全国環境衛生大会、2006年11月1日.
38. Iguchi, T.: Application of microarray for identification of estrogen response element, estrogen responsive genes and unpredictable effects through nuclear receptors. Korean Society of Toxicogenomics & Toxicoproteomics, Incheon, Korea. 2006年11月6日.
39. 加藤泰彦、小林かおる、勝義直、渡邊肇、井口泰泉: オオミジンコ DM ドメイン遺伝子の cDNA 単離と発現解析. 日本動物学会第77回大会 島根, 2006年9月21-24日.