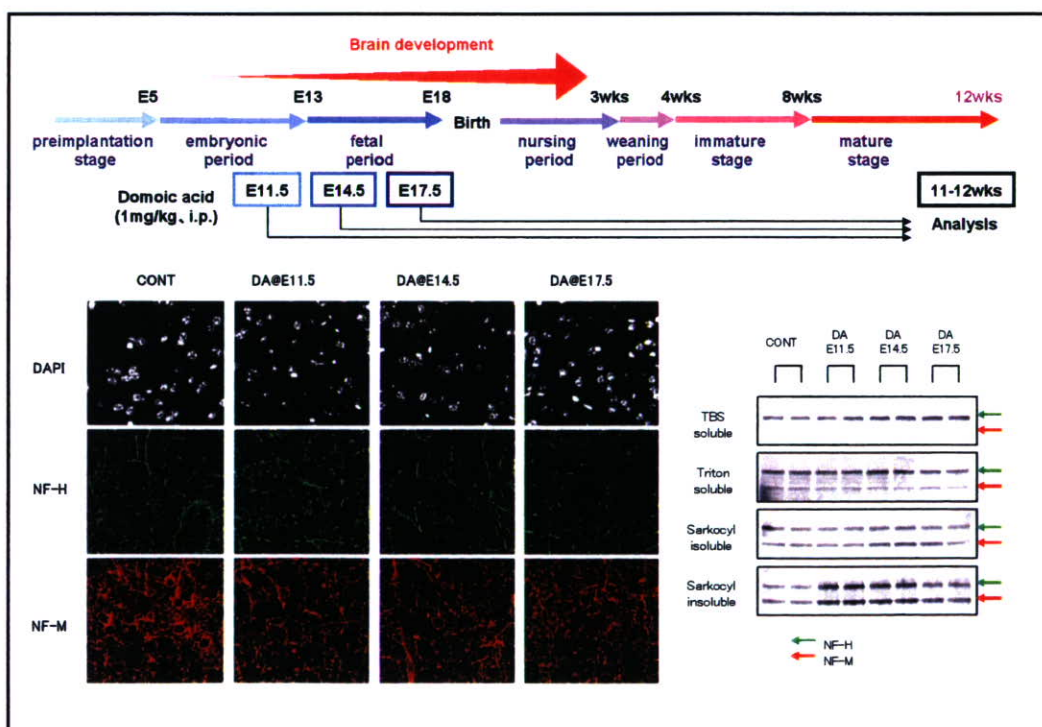
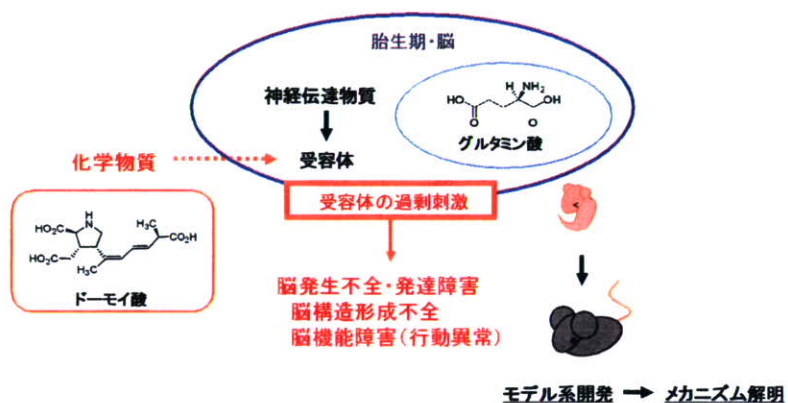
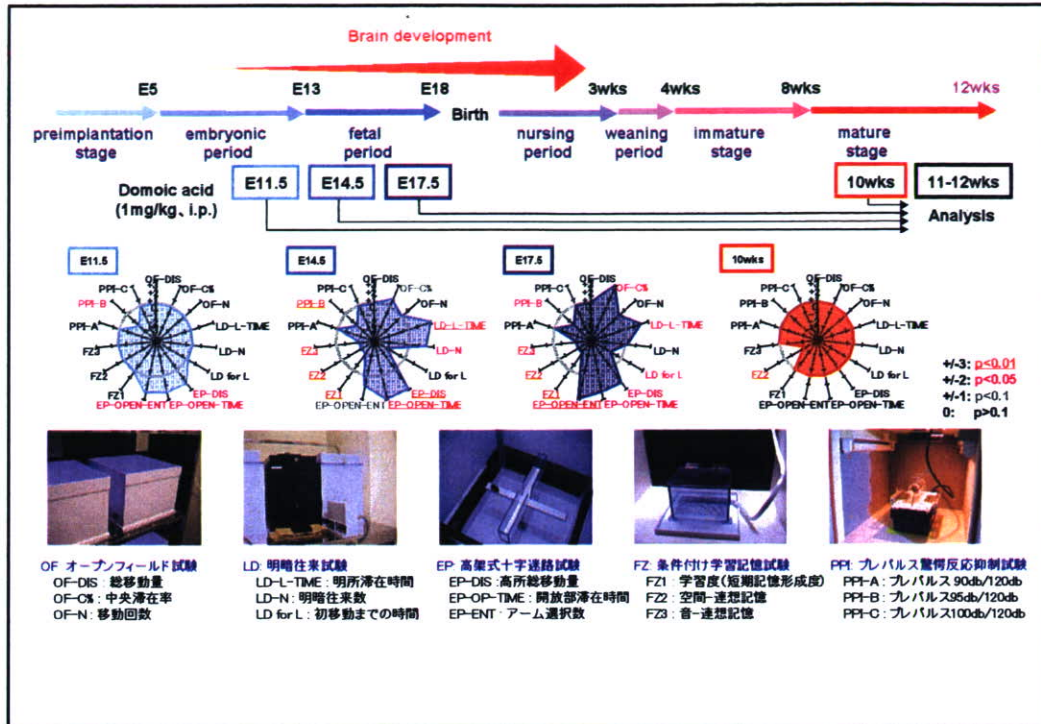


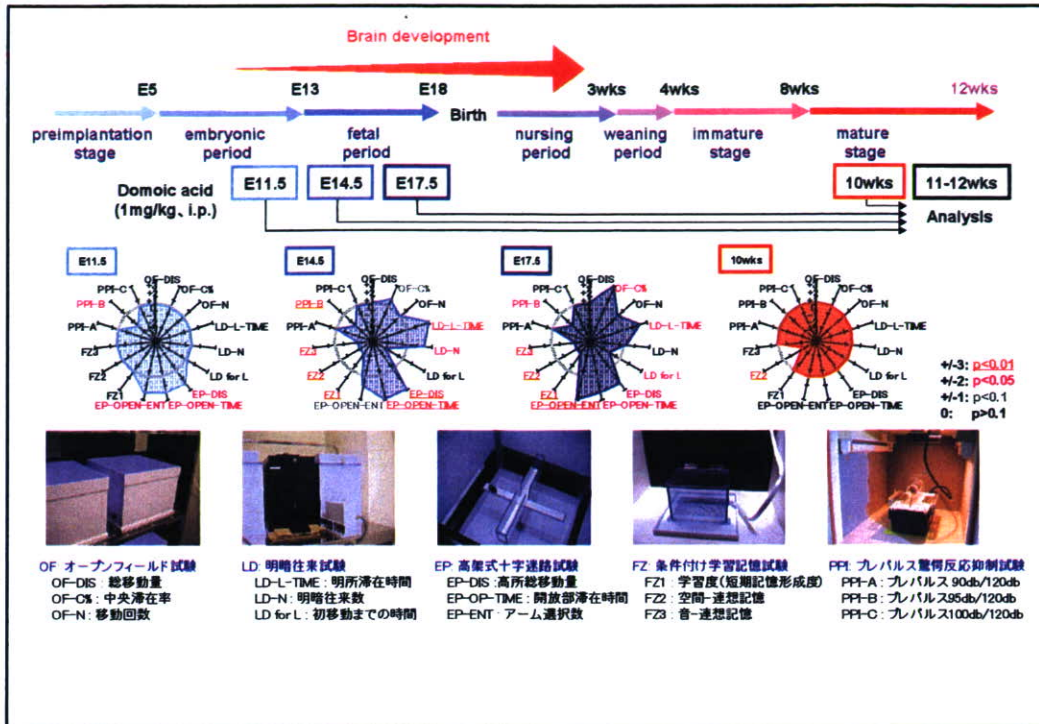
研究目的

グルタミン酸様構造を持つ化学物質を胎生期マウスに経胎盤投与し、
脳発生過程におけるグルタミン酸受容体の過剰刺激による
不可逆的な脳機能発達障害について検討する。

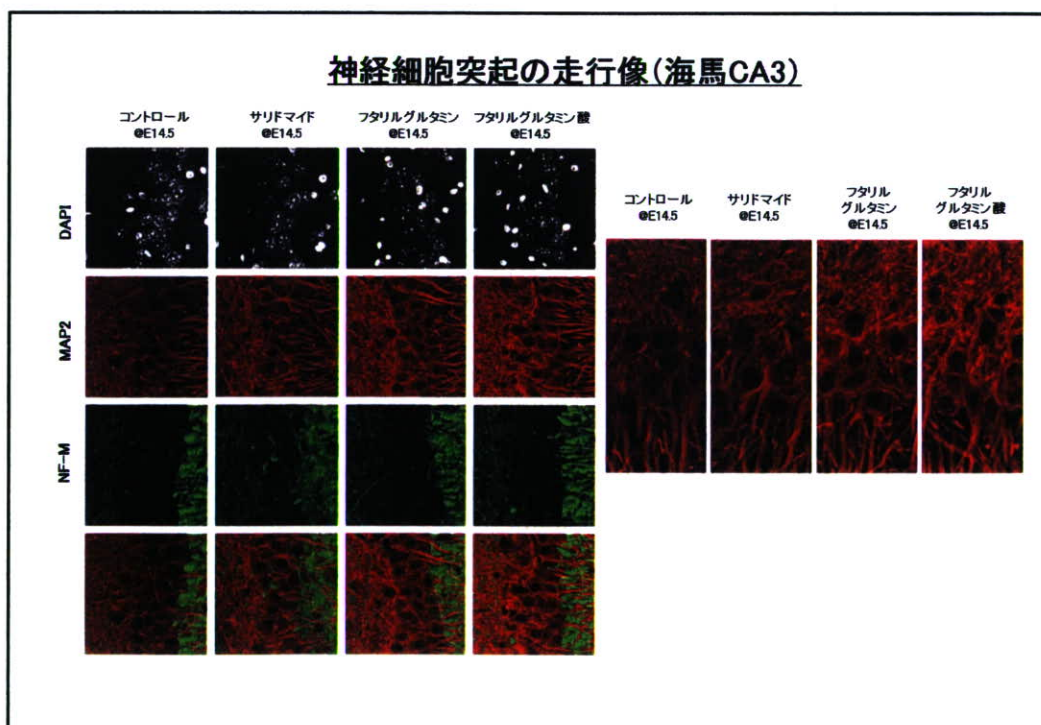
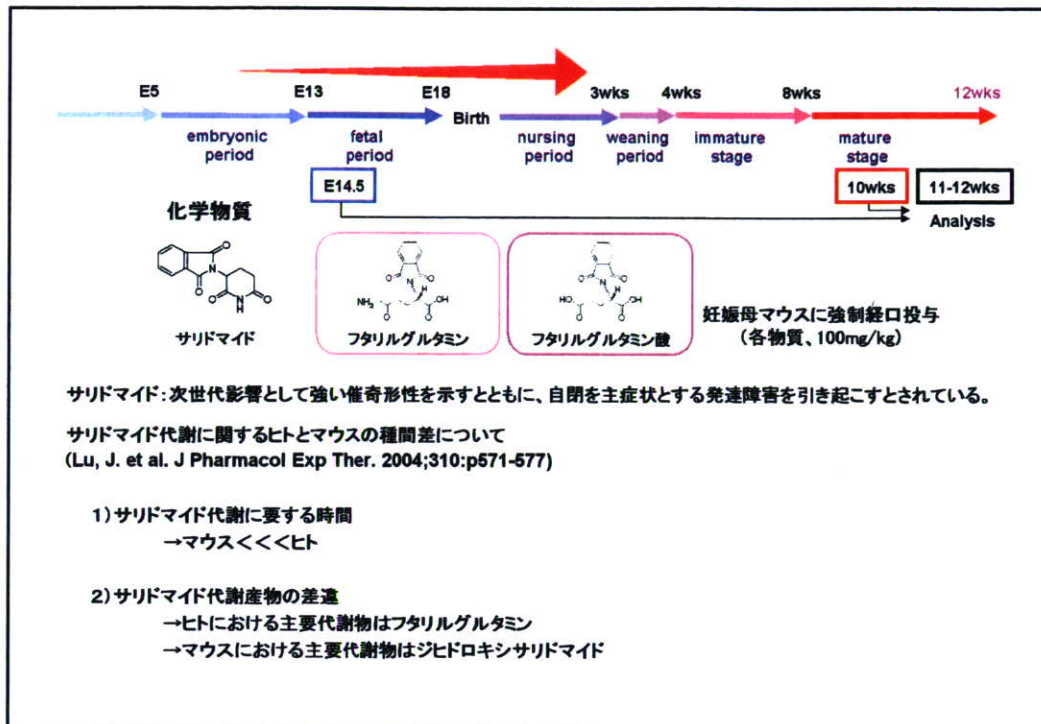




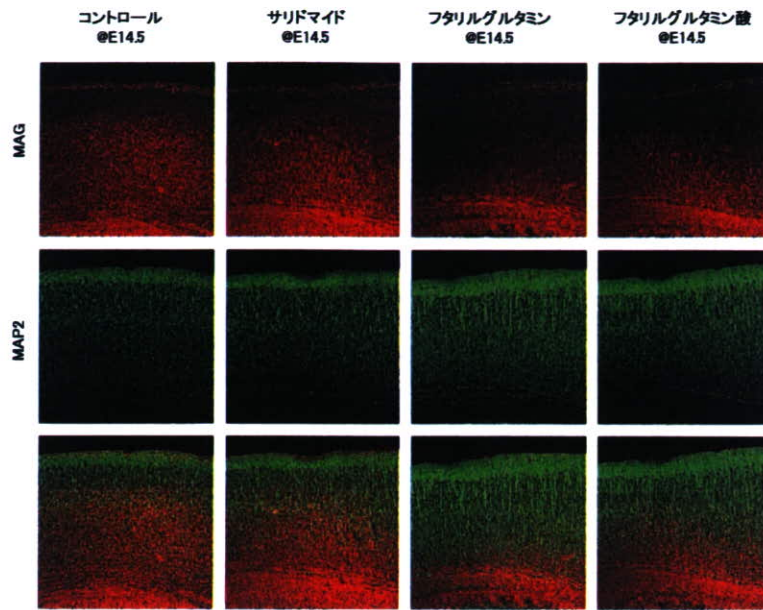
- Brain development**
- E5 → E13 → E18 → Birth → 3wks → 4wks → 8wks → 12wks
- embryonic period → fetal period → nursing period → weaning period → immature stage → mature stage
- Domoic acid (1mg/kg, i.p.) at E11.5, E14.5, E17.5
- Analysis at 10wks and 11-12wks
- (1) 発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激は大脳皮質及び海馬に、神経細胞突起発達不全を主体とする脳構造形成不全を引き起こす。
 - (2) 上記影響に対する感受性は胎生前期(胎生11.5日齢ごろ)よりも胎生後期(胎生14.5~17.5日齢ごろ)の方が高い。
 - (3) 発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激は上記の脳構造形成不全を原因として矛盾しない情動・認知行動異常を選発性的中枢神経毒性として引き起こす。
 - (4) これまでに報告されている複数の統合失調モデルマウスの表現型は、本系の示す一連の表現型の一部に該当することが指摘される。



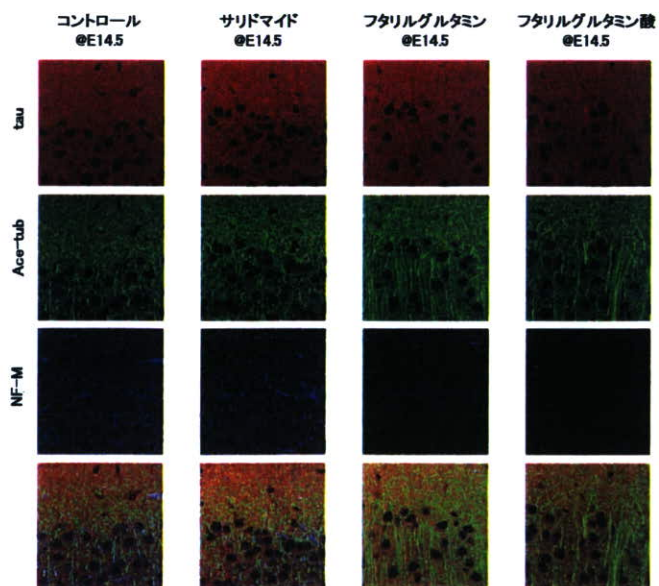
- Brain development**
- E5 → E13 → E18 → Birth → 3wks → 4wks → 8wks → 12wks
- embryonic period → fetal period → nursing period → weaning period → immature stage → mature stage
- Domoic acid (1mg/kg, i.p.) at E11.5, E14.5, E17.5
- Analysis at 10wks and 11-12wks
- (1) 発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激は大脳皮質及び海馬に、神経細胞突起発達不全を主体とする脳構造形成不全を引き起こす。
 - (2) 上記影響に対する感受性は胎生前期(胎生11.5日齢ごろ)よりも胎生後期(胎生14.5~17.5日齢ごろ)の方が高い。
 - (3) 発生期のグルタミン酸受容体過剰刺激は上記の脳構造形成不全を原因として矛盾しない情動・認知行動異常を遅発性の中樞神経毒性として引き起こす。
 - (4) これまでに報告されている複数の統合失調モデルマウスの表現型は、本系の示す一連の表現型の一部に該当することが指摘される。



髄鞘の形成(大脳皮質)



微小管の安定性(外顆粒層)



胎生期サリドマイド暴露マウス

神経細胞突起の発達状態に異常は認められない。

胎生期フタルルグルタミン暴露マウス

大脳皮質、海馬でのMAP2染色性が増強

大脳皮質でのMAG染色性が極めて減弱

大脳皮質でのアセチル化チューブリンの染色性が極めて増強

胎生期フタルルグルタミン酸暴露マウス

大脳皮質、海馬でのMAP2染色性が増強

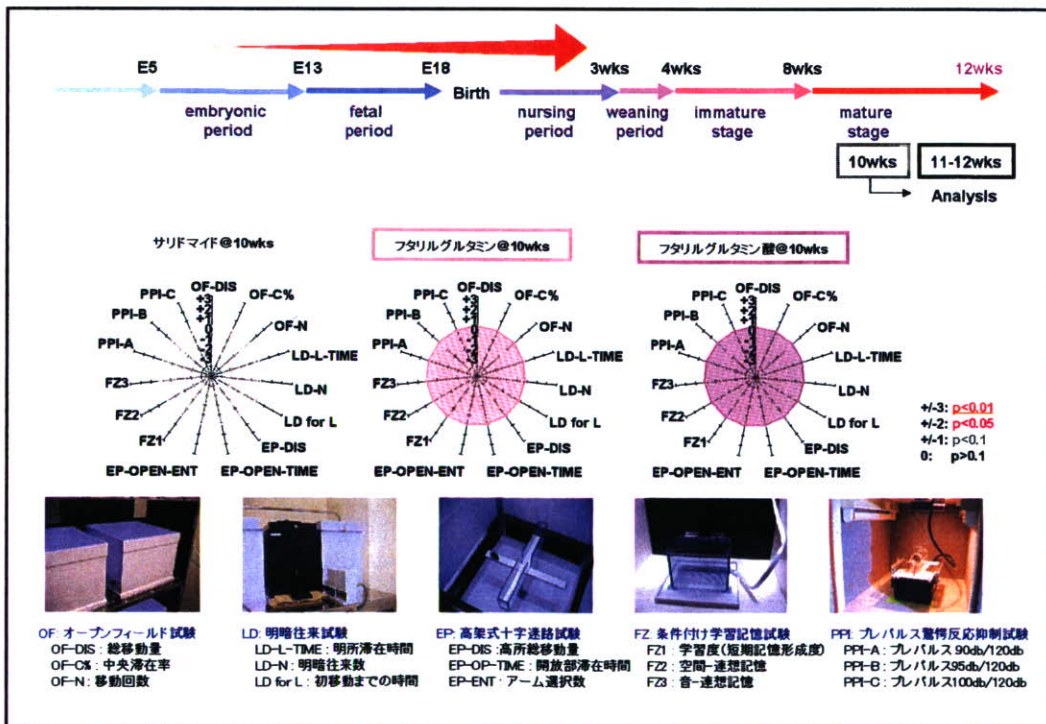
大脳皮質でのMAG染色性がやや減弱

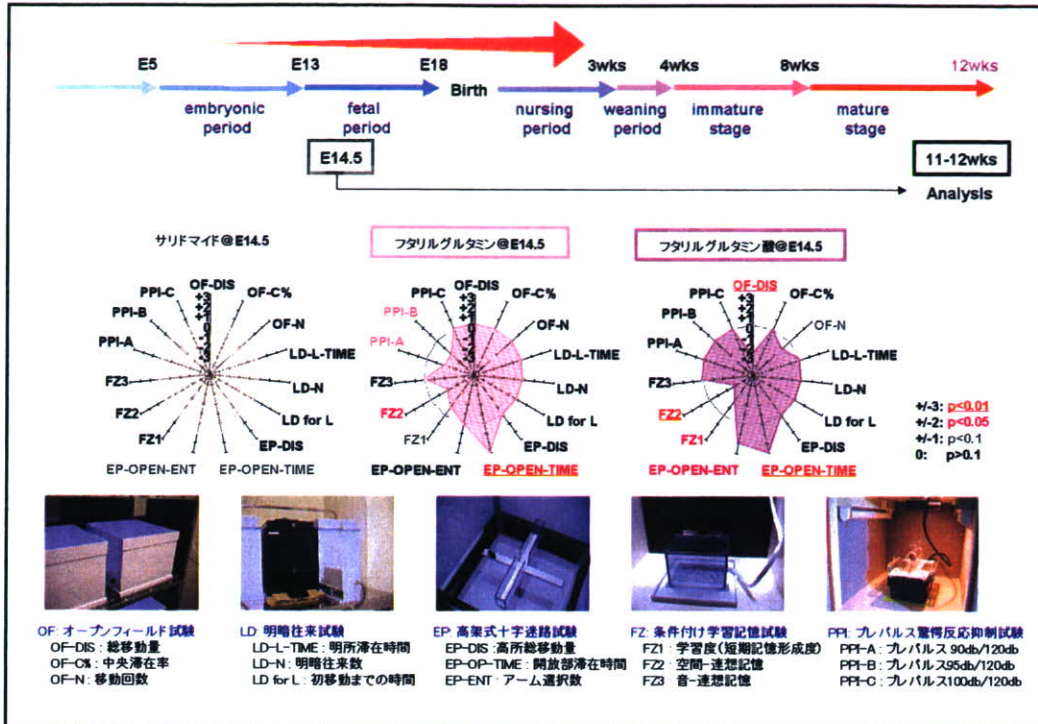
大脳皮質でのアセチル化チューブリンの染色性が増強

成熟期（生後10週齢）マウスへのサリドマイド、

フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸投与マウス

神経細胞突起の発達状態に異常は認められない。





胎生期サリドマイド暴露マウス

情動・認知行動に関する逸脱は殆ど認められない。

胎生期フタルリグルタミン暴露マウス

高架式十字迷路試験での開放部滞在時間の増加、
 条件付け学習記憶試験での空間-連想記憶力の低下、
 プレパルス驚愕反応抑制試験での抑制度の低下が認められた。

胎生期フタルリグルタミン酸暴露マウス

オープンフィールド試験での総移動量減少、
 高架式十字迷路試験での開放部滞在時間の増加、
 条件付け学習記憶試験での空間-連想記憶力の低下が認められた。

成熟期(生後10週齢)マウスへのサリドマイド、
 フタルリグルタミン、フタルリグルタミン酸投与マウス
 情動・認知行動に関する逸脱は認められない。

結論

(1) サリドマイドのヒト型代謝物質であるフタルルグルタミン、及び、その類似構造を持つフタルルグルタミン酸の経胎盤暴露は大脳皮質及び海馬に、神経細胞突起走行異常、髄鞘形成不全等の脳微細構造形成不全を引き起こす。

(2) フタルルグルタミン、フタルルグルタミン酸の経胎盤暴露は上記の脳構造形成不全を原因として矛盾しない情動・認知行動異常を遅発性の中樞神経毒性として引き起こす。

分担研究報告書

自然免疫系の子どもの成長に応じた発達の分子基盤

分担研究者 竹田 潔

大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

生体の恒常性維持に重要な役割を果たす免疫系で、自然免疫系の活性化機構が近年明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。子どもの自然免疫系の活性を解析するため、2週齢と8週齢のマウスの腹腔マクロファージの機能を解析した。TLR 刺激による TNF- α や IL-6 産生は両週齢のマウス間で差はないが、IL-12 産生は2週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。また、マクロファージの重要な機能である細菌の貪食能も2週齢マウスのマクロファージでやや低下していた。また、貪食後の貪食胞の成熟も2週齢マウスのマクロファージで遅れていた。それに伴い、大腸菌の殺菌能力も2週齢マウスのマクロファージで低下していた。これらの結果は、自然免疫系の細胞も、獲得免疫系を担当するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達する可能性を示唆している。

A. 研究目的

生体の恒常性維持において、病原体などの外界異物の生体内侵入を非自己として感知し、排除する免疫系が重要な役割を果たしている。この免疫系は、大きく自然免疫系と獲得免疫系から成り立っている。外界異物を抗原として認識するリンパ球を主体とする獲得免疫系の活性化機構がこれまで詳細に解析されてきたのに比して、自然免疫系の活性化機構は永年不明のままであった。し

かし、近年、病原体の構成成分を特異的に認識する Toll-like receptor (TLR)の機能解析により、自然免疫系の活性化機構が明らかになった。そして、TLRによる病原体認識が、自然免疫系の活性化のみならず、抗原特異的な獲得免疫系の活性化をも制御していることが明らかになった。しかし、自然免疫系の子どもの成長に応じた発達機構についてはまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、自然免疫系の活性を制御する分子機構を解

析し、さらに子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、マウスを用いて解析し、生体の恒常性維持に関わる自然免疫系の活性制御機構を明らかにする。

B. 研究方法

子どもの成長に応じた自然免疫系の活性の変化を、2週齢と8週齢のマウスの腹腔に存在するマクロファージを用いて解析した。まず、両週齢のマウスの腹腔を Hanks 液で洗浄し、細胞を回収し、CD11b 陽性細胞を単離し実験に用いた。TLR4 リガンドである LPS で刺激し、TNF-alpha, IL-6 および IL-12p40 の産生を ELISA 法で解析した。次に、これらマクロファージの貪食能を蛍光ラベルした非病原性大腸菌を用いて flowcytometry で比較解析した。また、貪食後の貪食胞の成熟について、貪食胞の pH 測定、Lamp1 の発現集積を指標に、蛍光顕微鏡、電子顕微鏡を用いて解析した。さらに、各マクロファージにおける殺菌能を、非病原性大腸菌の CFU を測定し、解析した。さらに、貪食胞の成熟に関わる細胞内シグナルを伝達する MAPキナーゼ p38の活性化を western blot 法で、また p38 の標的遺伝子の発現誘導を real time PCR 法で解析した。

(倫理面への配慮)

本研究は実験動物を用いたものであるが、実験動物の飼育は、空調設備、照明の時間制御の整った SPF 環境化で週に1回の床敷交換、餌水分補給を専門職員に委託し、行っている。また、毎年秋に動物慰霊祭を行っている。また実験に当たっては、麻酔操作を行い、極力苦痛の軽減を行うよう配慮している。

C. 研究結果

2週齢と8週齢のマクロファージを LPS 刺激し、

TNF-alpha, IL-6 産生を解析したところ、両週齢のマクロファージ間で差は認められなかった。しかし、IL-12p40の産生は2週齢マウスのマクロファージで有意に低下していた。非病原性大腸菌の取り込み能を flowcytometry で解析したところ、2週齢マウス由来のマクロファージで低下が認められた。貪食胞の成熟を、電子顕微鏡を用いた Lamp1 の免疫染色解析したところ、Lamp1 の貪食胞膜への集積が2週齢マウスのマクロファージでは不十分であった。また、貪食胞の pH 低下も2週齢マウス由来マクロファージでは障害されていた。このように、2週齢マウス由来マクロファージでは、細菌の取り込み、およびその後の貪食胞の成熟に障害を認めた。これらの障害に伴い、2週齢マウス由来のマクロファージでは、大腸菌の殺菌能も低下しており、大腸菌の感染後のマクロファージ内の大腸菌の生菌数は2週齢マウスのマクロファージで有意に増加していた。さらに、貪食胞の成熟に関与する細胞内シグナルを伝達する p38の活性化を p38 のセリン残基のリン酸化を指標に解析したところ、2週齢マウス由来マクロファージでは、5分後のリン酸化誘導が8週齢マウス由来マクロファージに比較すると有意に低下していることが明らかになった。また、p38 の標的遺伝子でマクロファージの貪食に関わる SR-A や MARCO 遺伝子の大腸菌感染による発現誘導も、2週齢マウス由来マクロファージでは低下していた。

D. 考察

2週齢、8週齢マウスの腹腔マクロファージを用いた解析から、子どものマクロファージでは、貪食能、貪食胞の成熟、殺菌能が有意に低下していることが明らかになった。獲得免疫系に比べて原始的な自然免疫系も、獲得免疫系に属するリンパ球のように子どもの成長に応じて発達していくことが示された。

E. 結論

子どものマウスのマクロファージでは、まだ、発達が充分ではなく、貪食能、貪食胞の成熟、殺菌能が不十分であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kayama, H., Rairez-Carrozzi, V. R., Yamamoto, M., Mizutani, T., Kuwata, H., Iba, H., Matsumoto, M., Honda, K., Smale, S. T., and Takeda, K.: Class-specific regulation of pro-inflammatory genes by MyD88 pathways and I κ B ζ . *J. Biol. Chem.* in press
2. Nakamura, K., Miyazato, A., Gang, X., Hatta, M., Inden, K., Aoyagi, T., Takeda, K., Akira, S., Saijo, S., Iwakura, Y., Adachi, Y., Ohno, N., Suzuki, K., Fujita, J., Kaku, M., and Kawakami, K.: Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.* in press
3. Nishimura, J., Saiga, H., Sato, S., Okuyama, M., Kayama, H., Kuwata, H., Matsumoto, S., Nishida, T., Sawa, Y., Akira, S., Yoshikai, Y., Yamamoto, M., and Takeda, K.: Potent antimycobacterial activity of mouse secretory leukocyte protease inhibitor. *J. Immunol.* in press
4. Hisaeda, H., Tetsutani, K., Imai, T., Moriya, C., Tu, L., Hamano, S., Duan, X., Chou, B., Ishida, H., Aramaki, A., Shen, J., Ishii, K., J., Coban, C., Akira, S., Takeda, K., Yasutomo, K., Torii, M., and

Himeno, K.: Malaria parasites require TLR9 signaling for immune evasion by activating regulatory T cells. *J. Immunol.* in press

5. Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Mizoguchi, I., Fukai, F., Takeda, K., Mizoguchi, J. and Yoshimoto, T.: STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production. *J. Immunol.* in press
6. Yamamoto, M., Uematsu, S., Okamoto, T., Matsuura, Y., Sato, S., Kumar, H., Satoh, T., Saitoh, T., Takeda, K., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Kawai, T., and Akira, S.: Enhanced TLR-mediated NF- κ B dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 204, 2233-2239 (2007).
7. Sakamori, R., Takehara, T., Ohnishi, C., Tatsumi, T., Ohkawa, K., Takeda, K., Akira, S., Hayashi, N.: STAT3 signaling within hepatocytes attenuates systemic inflammatory response and lethality in septic mice. *Hepatology* 46, 1564-1573 (2007).
8. Nemoto, Y., Kanai, T., Makita, S., Okamoto, R., Totsuka, T., Takeda, K., and Watanabe, M.: Bone marrow retaining colitogenic CD4⁺ T cells may be a pathogenic reservoir for chronic colitis. *Gastroenterology* 132, 176-189 (2007).

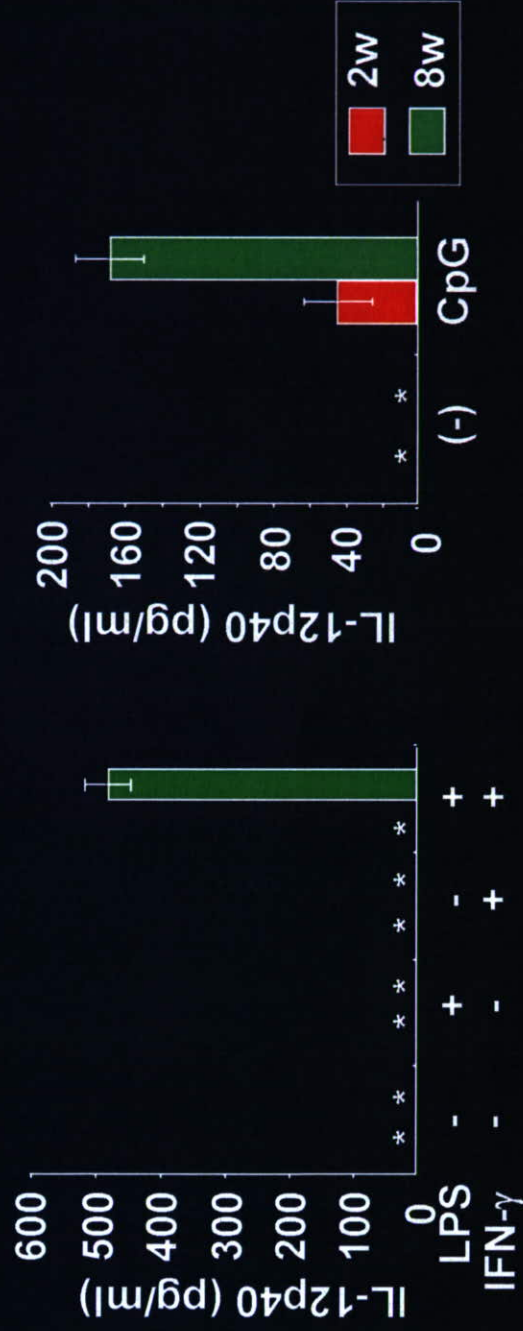
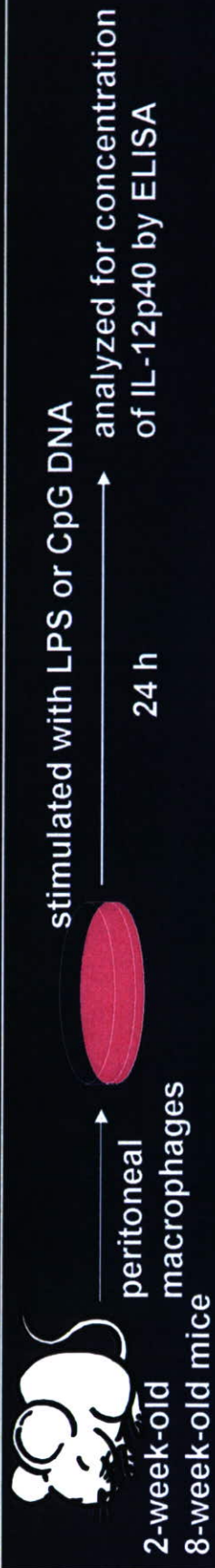
2. 学会発表

1. Kiyoshi Takeda, Regulation of inflammatory responses by nuclear I κ B proteins. 8th International Society of Exercise and Immunology Symposium, 2007.10.25, Sendai, Japan
2. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. The 9th International Colloquium on Paratuberculosis, 2007. 10.29, Tsukuba, Japan
3. 竹田潔, 自然免疫系による結核感染防御機構, 第60回日本細菌学会九州支部総会、2007.10.12、長崎
4. Kiyoshi Takeda, Lipocalin 2 mediates host defense against Mycobacterial infection. 42th US-Japan Conference on Tuberculosis and leprosy, 2007.9.11-14, Henan, China
5. 竹田潔, 自然免疫シグナルの制御機構第28回日本炎症・再生医学会、2007.8.2、東京
6. Kiyoshi Takeda, Regulation of innate immune responses. Awaji Forum, 2006.9.3-6, Hyogo, Japan

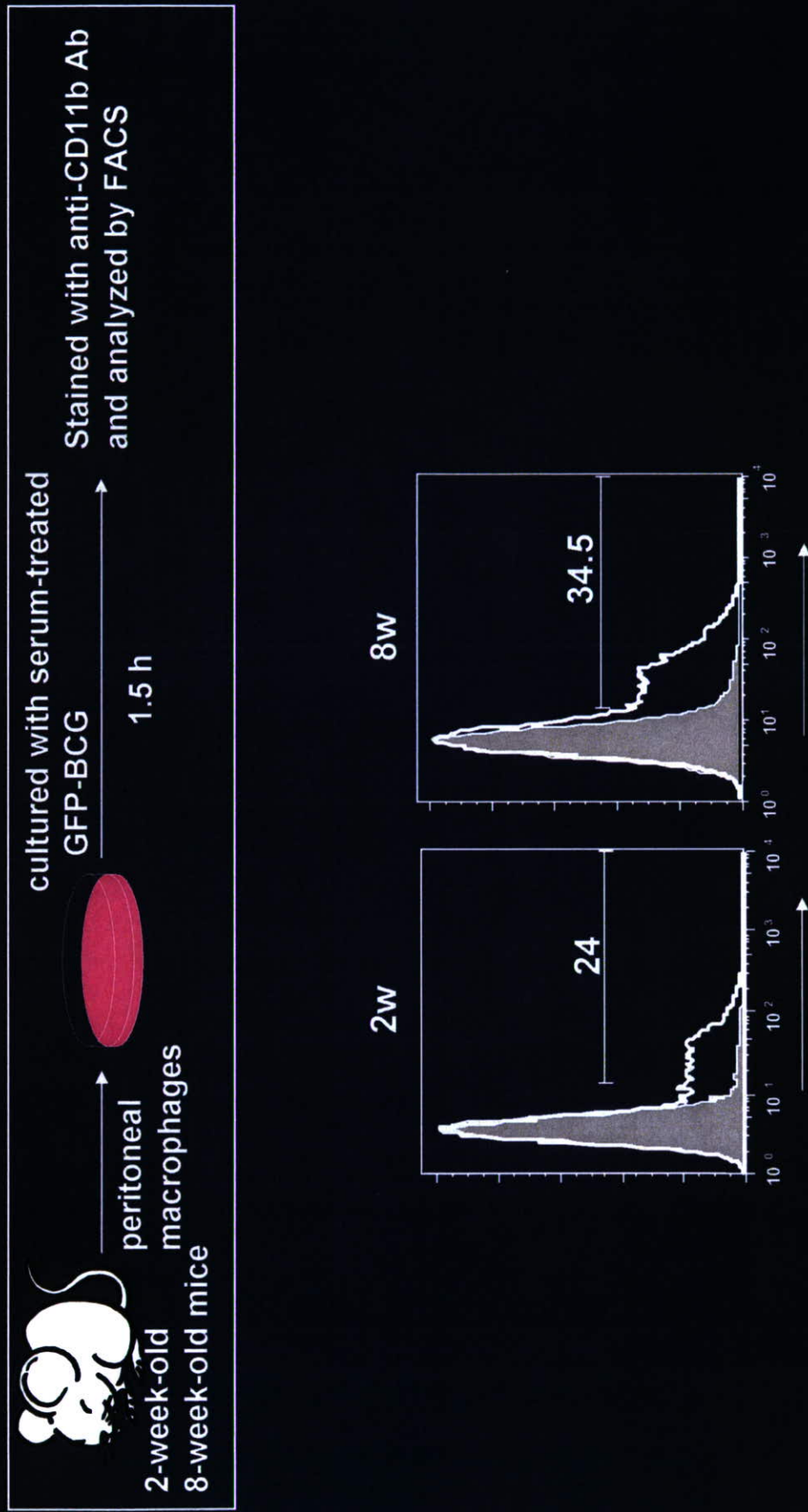
G. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

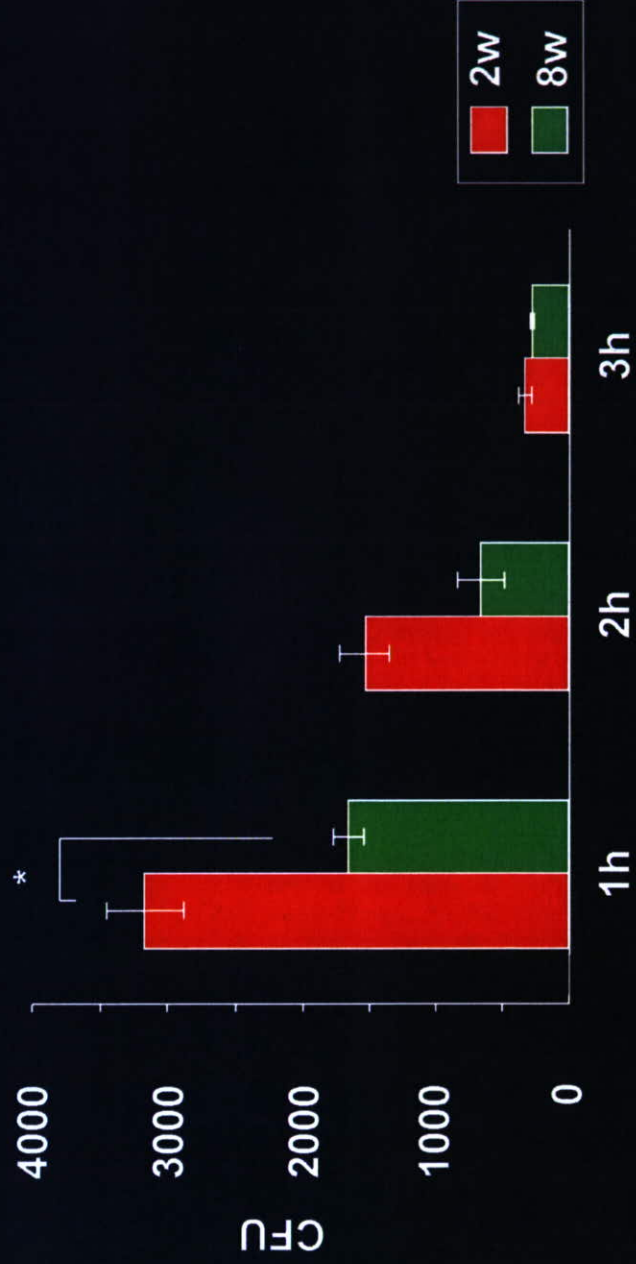
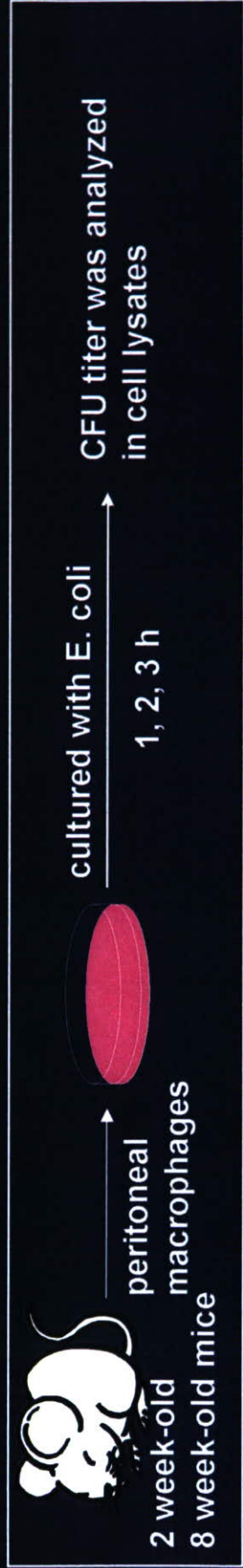
Impaired TLR-dependent IL-12p40 production in peritoneal macrophages from 2-week-old mice



Defective phagocytosis of BCG in peritoneal macrophages from 2-week-old mice



Impaired bacterial clearance of Peritoneal macrophages from 2-week-old-mice



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

子どもに対する化学物質曝露影響の内分泌的観点からの解明

分担研究者 渡邊 肇

自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 准教授

研究要旨

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なり、胎仔期や子どもへのホルモン様化学物質の曝露は標的器官において不可逆的な影響を及ぼす事が知られている。本研究では、マウスをモデルとして新生仔期にホルモン様作用を有する化学物質の曝露を行い、その内分泌学的影響について遺伝子発現変化のレベルから解析を行った。ゲノクス解析の導入により、新生仔期にホルモン影響を受ける遺伝子の探索を行い、これら遺伝子の一部は成熟期まで発現が変化していることを明らかにした。さらにこの分子メカニズムを明らかにするためにエピジェネティックな変化からの解析を行った。

A. 研究目的

性ホルモンなどに対する感受性は、子供と大人で大きく異なることが知られており、胎児期を含む子どもへの化学物質曝露は不可逆的な影響を及ぼす事が懸念されている。本研究では、マウスをモデルとして胎仔期、新生仔期にホルモンまたは化学物質曝露を行い、その内分泌学的影響について解析を行う。

マウス新生仔期のホルモン作用による悪影響は比較的多数の報告があるが、その作用機序はいまだ不明であり、的確なリスク評価ができていない。マウスを用いて胎仔期、新生仔期のホルモン影響解明し、その長期的な悪影響に至る過程を解明することにより、化学物質によるリスクに関して総合的な評価をするための知見を得る。

B. 研究方法

本研究では、周生期の化学物質曝露により通常ホルモン制御から逸脱する際の作用メ

カニズムについて、膈上皮への影響を中心に遺伝子レベルからの解明を行う。

まず、マウスの新生仔期にエストロゲン曝露を行い、発達段階に応じたマウス膈における遺伝子発現プロファイルを取得する。解析段階としては、出生直後、臨界期直後、思春期前、成熟後の4点を基本とする。それぞれの段階で、新生仔期に曝露群と対照群において発現レベルが異なっている遺伝子を明らかにする。

さらに、発現レベルが異なっていた遺伝子について、発達段階を追って発現を解析することにより、発現異常が見出される時期を特定し、遺伝子発現異常に至る要因を特定する。この解析には主として、遺伝子をコードしているDNA自体の解析とそれに作用する因子の解析を行う。前者については、DNAのメチル化を中心として、恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす変化が生じている可能性について検討を加える。

後者については、化学物質曝露により発現が大きく異なる転写関連因子について検討を加えるとともに、クロマチン構造の変化などエピジェネティックな変化について解析を行う。これらの解析から新生仔期のホルモン曝露により恒常的に遺伝子発現に影響を及ぼす分子メカニズムについて明らかにする。

(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

マウスの成育過程におけるエストロゲンの影響を明確にするために、様々な生育段階にあるマウスにエストロゲン(DES)を投与し、雌性生殖器官におけるエストロゲン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)ではエストロゲン曝露による初期応答遺伝子が子宮や膣において大きく異なることが明らかになった。

一方で、新生仔期のエストロゲン曝露を5日間行った場合、成熟期にエストロゲン非依存的な膣上皮の増殖を確認できた。この場合、5日間曝露後のエストロゲン応答遺伝子は、初期応答遺伝子に比べてその応答遺伝子数が増加していることが明らかになった。さらに、これら新生仔期にエストロゲン応答した遺伝子の一部は、その活性化状態が成熟期まで続くことが明らかになった。こうした長期的な遺伝子発現変化に関する要因として、エピジェネティックな変化が考えられたため、発現変化が顕著な遺伝子の制御領域を中心として、ゲノムレベルでのメチル化、ヒストンの修飾状態の解析

を進めている。

一連の解析から、膣で特異的にメチル化されている遺伝子などを同定しており、これら遺伝子が個体の発生、発達段階でどのようなエピジェネティックな変化をうけているのか、解析を進めている。

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、さらに新生仔期の遺伝子発現状態の変化が成熟期まで続くことが示された。すなわち、臨界期(出生5日以内)においてエストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現制御において長期的な影響を受け、これにより、最終的に不可逆的な影響が引き起こされる可能性が考えられた。

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エピジェネティックなプログラムに変化が生じている可能性が示唆された。

E. 結論

マウスの新生仔期のエストロゲン曝露による

影響を遺伝子発現レベルの変化から解析した。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に、エストロゲンに応答する遺伝子の一部は、その発現が長期的に継続し、成獣でもその遺伝子発現レベルが上昇していた。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、エピジェネティックな影響により発現が変化している可能性が高く、現在その解析を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Watanabe H, Tatarazako N, Kato Y, Oda S, Iguchi T.

Transcriptome profiling in crustacean as a tool for ecotoxicogenomics

Cell Biology and Toxicology (2007) (in press)

2. Suzuki A, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, Iguchi T, Kobayashi T, Ohta Y. Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland.

Journal of Veterinary Medical Science (2007) 69:725-31.

3. Kato Y, Kobayashi K, Oda S, Tatarazako N, Watanabe H and Iguchi T. Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. Journal of Endocrinology (2007) 193:183-194

4. Iguchi, T., Y. Katsu, T. Horiguchi, H. Watanabe, B. Blumberg and Y. Ohta: Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of imposex in gastropods and adipogenesis in vertebrates. Mol. Cell. Toxicol., 3: 1-10, 2007.

5. Watanabe H., Takahashi E., Nakamura Y., Oda S., Tatarazako N. and Iguchi T.

Development of a *Daphnia magna* DNA microarray for evaluating the toxicity of environmental chemicals.

Environmental Toxicology and Chemistry (2007) 26:669-76

6. Suzuki A., Urushitani H., Sato T., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T.

Gene expression change in the Müllerian duct of the mouse fetus exposed to diethylstilbestrol in utero.

Experimental Biology and Medicine (2007) 232-503-14

7. Kabe Y., Ohmori M., Shinouchi K., Tsuboi Y., Hirao S., Azuma M., Watanabe H., Okura I. and Handa H.

Porphyrins Accumulate in Mitochondria via 2-oxoglutarate Carrier

Journal of Biological Chemistry (2006) 281:31729-35

8. Grun F., Watanabe H., Zamanian Z., Maeda L., Arima K., Cubacha R., Gardiner D.M., Kanno J., Iguchi T. and Blumberg B.

Endocrine disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates.

Molecular Endocrinology (2006) 20:2141-55

9. Kobayashi M., Takahashi E., Miyagawa S., Watanabe H. and Iguchi T.

Chromatin immunoprecipitation-mediated target identification proved aquaporin 5 is regulated directly by estrogen in the uterus.

Genes to Cells (2006) 11:1133-43

10. Kato H, Naito K, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T.

- Ontogenic expression of estrogen receptor- α in female rat corneas. *Ophthalmic Research* (2006) 38:361-5
11. Kato H., Furuhashi T., Tanaka M., Katsu Y., Watanabe H., Ohta Y. and Iguchi T.
Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reproductive Toxicology* (2006) 22:20-29.
12. Ogura Y., Azuma M., Tsuboi Y., Kabe Y., Yamaguchi Y., Wada T., Watanabe H. and Handa H.
TFII-I down-regulates a subset of estrogen-responsive genes through its interaction with an initiator element and estrogen receptor α . *Genes to Cells*. (2006) 11:373-81.
13. Suzuki A., Watanabe H., Mizutani T., Sato T., Ohta Y. and Iguchi T.
Global gene expression in mouse vaginae exposed to diethylstilbestrol at different ages. *Experimental Biology and Medicine* (2006) 231:632-40.
14. Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.
Genetic differences in the production of male neonates in *Daphnia magna* exposed to juvenile hormone analogs. *Chemosphere*. (2006) 63:1477-84
15. Watanabe H., Takahashi E., Kobayashi M., Goto M. and Iguchi T.
The estrogen-responsive adrenomedullin gene identified by DNA microarray analysis is directly regulated by estrogen receptor α . *Journal of Molecular Endocrinology* (2006) 36:81-9
16. Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.
Production of male neonates in *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea) exposed to juvenile hormones and their analogs. *Chemosphere*. (2005) 61:1168-74.
17. Watanabe H., Tatarazako N., Oda S., Nishide H., Uchiyama I., Morita M., and Iguchi T.
Analysis of expressed sequence tags of the water flea *Daphnia magna*. *Genome*. (2005) 48:606-9.
18. Oda S., Tatarazako N., Watanabe H., Morita M. and Iguchi T.
Production of male neonates in four cladoceran species exposed to a juvenile hormone analog, fenoxycarb. *Chemosphere*. (2005) 60:74-8
19. Shimizu N., Ouchida R., Yoshikawa N., Hisada T., Watanabe H., Okamoto K., Kusuhara M., Handa H., Morimoto C. and Tanaka H.
HEXIM1 forms a transcriptionally abortive complex with glucocorticoid receptor without involving 7SK RNA and positive transcription elongation factor b. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (2005) 102:8555-60.
20. Sone K., Hinago M., Itamoto M., Katsu Y., Watanabe H., Urushitani H., Tooi O., Guillette L.J. Jr. and Iguchi T.
Effects of an androgenic growth promoter 17 β -trenbolone on masculinization of Mosquitofish (*Gambusia affinis affinis*).