

「内分泌かく乱物質」

平成11年度採択研究代表者

井口 泰泉

(岡崎国立共同研究機構 統合バイオサイエンスセンター 教授)

「内分泌かく乱物質の動物への発生内分泌学的影響」

1. 研究実施の概要

本研究の主目的は、ステロイドホルモンや内分泌かく乱物質の、動物に対する発生影響のメカニズムを解明することであり、受容体- 遺伝子発現- 何らかの影響、という軸からの研究を展開し、最終的には影響に関連する遺伝子を明らかにすることを目指している。内分泌かく乱物質の多くはエストロゲン作用を示すことから、発生中の脊椎動物、及び成体での生殖系、神経系、及び行動をもとに、哺乳類、爬虫類、両生類、魚類にエストロゲンがどのような不可逆的な影響を及ぼすか、作用機構を含めて明確にし、エストロゲンに敏感な発生中の臨界期を解析する。これを元にして、内分泌かく乱物質の環境濃度での発生影響をも明らかにする。マイクロアレイ法を用いて、ホルモン応答遺伝子を整理する。また、マウスやサルを用いて内分泌かく乱物質の胎児影響を調べる科学的な根拠として胎盤透過性を解析する。内分泌かく乱物質の生態系に対する影響を、内分泌かく乱物質の影響が明確な海産巻貝を用いて作用機構を明らかにすると共に、環境影響評価に用いられるミジンコへの発生影響、世代交代に対する影響、及び作用機構を明らかにする。

平成14年度までに、マウスの子宮を用いてマイクロアレイ法によりエストロゲン応答遺伝子を整理するとともに、エストロゲン作用を示す化学物質に対する応答遺伝子も整理し、化学物質に反応する遺伝子とエストロゲンに反応する遺伝子は一致しないものが多く、化学物質特異的に反応する遺伝子があることが示唆されている。マウスの生殖腺では、生後5日まで、脳では生後10日が臨界期であることを明らかにした。臨界期内にエストロゲンを投与されたマウスの膣はエストロゲン非依存的に増殖するが、それに伴って不可逆的に発現する遺伝子を幾つかクローニングした。さらに、不可逆的増殖を示す膣上皮細胞ではエストロゲン受容体のリン酸化、上皮成長因子関連の増殖因子の不可逆的発現等を見出した。また、ビスフェノールはマウスおよびニホンザルで胎盤透過が容易であることを見出すとともに、マウス胎児期の低用量のビスフェノール曝露で膣開口が早まることを見出した。しかし、それらの初産の子供への影響は認められなかった。高用量では無排卵など不可逆的影響が認められた。ラットの新生児へのビスフェノールの投与から、遅延性の無排卵が起こることが見出された。さらにオスへの合成エストロゲンの新生児投与により、副精巣で発現が変化する遺伝子を見出している。爬虫類のワニのエストロゲン受容体、ア

ンドロゲン受容体、海産メダカのマミチヨグのエストロゲン受容体をクローニングした。なお、カダヤシのステロイドホルモン受容体をクローニングするとともに、尻鰭突起へのトレンボロンの影響を調べている。両生類ではアマガエルの皮膚からの水分調節に関与するバソトシン受容体・メソトシンの受容体をクローニングした。また、発生初期のアフリカツメガエルの胚への化学物質の影響を、形態学およびマイクロアレイを用いてしらべ、エストロゲン応答遺伝子を明らかにしている。さらに、ツチガエルのホルモンによる性分化で発現が変化する遺伝子を解析している。水棲無脊椎動物のイボニシの性ホルモンの存在を明らかにし、エストロゲン受容体の塩基配列を解析中であるとともに、アロマトーゼ阻害剤のインポセックスへの影響を解析している。ミジンコは、極めて低濃度でスチレンが生殖抑制作用をする事を明らかにした。これを受けて、作用メカニズムを解析することを目的に、ミジンコの遺伝子の配列を読み続けている。形態学的影響から遺伝子レベルの影響まで、エストロゲン及び内分泌かく乱物質の作用機構を明らかにするための基礎データを集積し、これを元に飛躍的な研究の発展をめざす。生殖内分泌学、比較内分泌学、発生内分泌学、神経発生学的知見を総合して、脊椎動物の発生・生殖・行動・神経を標的に、また、無脊椎動物の発生、生殖、行動を標的にし、主にホルモン及び内分泌かく乱物質の不可逆化機構を、遺伝子レベルで解明する事を主目的に研究を展開し、研究の発展とともに、比較生物学的に、脊椎動物と無脊椎動物の研究方向を統合させる。

2. 研究実施内容

①ビスフェノールAの Maus およびラットに対する影響

ICR系マウスの妊娠17日、ニホンザル (*Macaca fuscata*) の妊娠150日目にBisphenol A (BPA) を皮下投与し、マウスでは、投与後、30分、1, 2, 3, 6, 12, 24時間後、ニホンザルでは投与後1時間後にBPAの胎児への移行をGC-MSを用いて測定した。マウスでは親の脳、肝臓、血清、胎盤、胎児の脳、血清、肝臓、子宮、精巣、ニホンザルでは、親の血清、胎児の血清、臍帯、心臓、腸、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺、筋肉、脳で測定した。マウスでは、BPA投与後30分で胎児の脳、生殖器官に移行が認められた。ニホンザルでは投与1時間後には調べた臓器すべてに移行が認められた。従って、BPAは胎盤を透過することが明らかである。

ICR系マウスに、妊娠11~17日にBPA (2, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、DES (0.02, 0.2, 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を投与し、F1マウスの、体重、肛門-生殖突起間距離を、出生日、11, 22, 60日齢で記録するとともに膣開口日を記録した。さらに、膣スメアを膣開口日から30日間調べた。90日齢から120日齢まで、F1雌を無処理雄と交配し、出産仔数、性比を調べた。膣開口日は2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAを除いて有意に早くなった。無処理雄と交配したF1は全処理群で、出産仔数、性比に有意差は認められなかった。従って、低濃度のBPAとDESはF1雌の膣開口を早めるが、少なくとも初産に関しては影響は認められない。ICR系の妊娠マウスへのDES投与により、生涯産仔総数が、DESの濃度依存的に減少したとの報告もあり、BPA投与では、生涯産仔総数を調べるなどの研究が必要である。

妊娠10-18日のICR系マウスに、DES (0.0067, 0.067, 0.67, 6.7, 67 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、BPA (10, 100 mg/kg)を投与し、F1雌30日齢で卵巣の黄体の有無を調べた結果、DES6.7, DES67, BPA10で黄体形成率が有意に低かった。30日齢で卵巣を摘出し、40日齢で膣および子宮上皮の多層化を調べた結果、DES67でのみ卵巣非依存的な上皮の多層化が認められた。DES6.7のF1では膣スメアの周期性が正常なものは56%にすぎず、DES67のF1雌では膣スメアは連続発情状態を示した。DES67は無排卵となっていることが示唆された。事実、正常雄との交配実験の結果も、DES67では妊娠は認められなかった。DES6.7, BPA10, BAP100では出産仔数、性比に有意差は認められなかった。一方、出生後5日間BPA (15, 150 $\mu\text{g}/\text{pup}$)、DES (0.3, 3 $\mu\text{g}/\text{pup}$)を投与された雌では、30日齢で卵巣を摘出し、40、90日齢で子宮および膣の組織学的変化を調べた。BPA150, DES0.3, DES3では卵巣非依存の膣上皮の増殖が認められた。さらに、これら3群では多卵性卵胞の出現率が有意に高かった。これらの結果から、高濃度のBPAは視床下部・下垂体系の異常とともに膣上皮の卵巣非依存の不可逆的变化を誘起することが明らかである。

Sprague-Dawley系ラットに出生直後からBPA (0.25, 1, 4 mg/pup)、エストラジオール (E2, 10 $\mu\text{g}/\text{pup}$)を皮下に10日間投与し、80日齢で卵巣を摘出し、94-96日齢に1 mgE2 を3日間投与した。BPA1で性周期の乱れ、膣開口の早期化、黄体の減少が認められ、94日齢からのE2刺激による子宮の水の貯留も減少した。BAP4では、これらの変化に加えて、連続発情、黄体の欠如が認められた。E210ではBPA4と同じ異常が認められた。これらの結果から、高濃度のBPAを出生直後に与えると視床下部・下垂体系の異常による無排卵となるとともに、子宮のエストロゲンに対する反応性も低下することが明らかとなった。

②BPAの無脊椎動物に対する影響

ミジンコの生殖に対するBPAを含む、各種化学物質の影響を調べた。スチレン、エグジソン、ノニルフェノール、テストステロン、エストラジオール、ポナステロンAを用いて、21日間曝露試験を行った。スチレンダイマー、スチレントリマー、スチレンモノマーおよびポナステロンAは極めて低濃度でミジンコの生殖を低下させた。一方、テストステロンおよびBPAに関しては極めて高濃度でのみ影響が認められたが、エストラジオールは極めて高濃度であっても影響は認められなかった。オオミジンコを用いて、雄を特異的に発生させる化学物質を見出すとともに、遺伝子の塩基配列に関して、イギリスのグループとの共同研究を開始した。

センチュウの生殖に対しては、ベンゾピレンが比較的低濃度で作用する以外には、BPAを含めて、エストロゲン類似作用をもつ物質に関しても極めて高濃度でのみ影響が認められたにすぎなかった。センチュウは内分泌かく乱が疑われる物質に対しては影響を受けにくいと考えられる。ベンゾピレン処理により、BPA感受性の高い変異体を単離して、その遺伝的変異部位の同定をsnip-SNPs法により解析した。

イボニシのTBTによるインポセックス誘導メカニズムに迫るために、イボニシ体内での芳香化が起こることを確認した。しかし、アンドロゲンの直接投与ではインポセックスは誘導できない。また、アロマターゼの阻害剤であるファドロゾールを投与してもインポセ

ックスは誘導できなかつた。

③ラット胎児のミューラー管の発生過程でのステロイドホルモン受容体発現

SD系ラットを用いて、妊娠15日から21日までのミューラー管で、輸卵管、子宮および膣に分化する部分での、エストロゲン受容体(ER) α , β の発現を免疫組織化学的に検出するとともに、定量PCRによりmRNA量を測定した。さらに、プロゲステロン受容体発現についても同様の研究を行うとともに、胎児期に投与されたDESの受容体発現に対する影響も調べた。輸卵管特異的に発現する遺伝子をマーカーとして、輸卵管細胞の細胞分化とエストロゲンの関連も調べている。

④マウス生殖器官での遺伝子発現に関する研究

卵巢摘出マウスにエストロゲンを投与し、その6時間後に発現する遺伝子を、マイクロアレイ法を用いて解析した。エストロゲン投与後のmRNA発現量から、6-12

時間がピークであり、その後発現が減少することを明らかにした。投与したエストロゲンの体内濃度は数時間がピークであり、3時間以後には急速に減少したことから、エストロゲンの体内濃度とmRNA発現量との関連から、6時間を解析の時間とした。マイクロアレイによる発現変動遺伝子の解析から、ステロール合成に関連する酵素の遺伝子3個が、マイクロアレイで発現増加が認められたことから、その他の関連酵素遺伝子の発現を、定量PCRで調べたところ、それらも発現が増加していることが明らかになり、エストロゲン受容体欠損マウスではこれらの遺伝子の発現変動は起こらないことの確認も行った。マイクロアレイで発現変動する遺伝子の解析から、ステロール合成経路に関わる遺伝子が明らかにできるなどの応用ができることが明らかとなった。さらに、エストロゲンで発現増加する遺伝子を定量PCRで確認し、データベースの作成を行っている。また、エストロゲンの濃度依存的に変動する遺伝子、濃度依存的でない遺伝子もある。さらに、エストロゲン類似作用をする遺伝子によって発現変動する遺伝子、誕生日、生後5日、成体など、成熟に伴って発現変動する遺伝子数が増加することなどを明らかにしている。

出生直後のマウスにDESを投与すると、尿道と膣が融合する尿道下裂がおこる。このための臨界期とDESの臨界濃度を決定した。出生直後の雌マウスへのDES投与により誘起された、エストロゲン非依存的に増殖する膣で特異的に発現している遺伝子を、ダイファレンシャルディスプレイにより検出し、塩基配列を決定するとともに、組織での発現をin situ hybridizationにより調べた。Neuropsinと呼ばれるセリンプロテアーゼの1種であり、エストロゲン依存的に膣の上皮細胞で発現することを明らかにした。さらに、新規のCタイプレクチンも、卵巢非依存的に増殖する膣上皮細胞に発現すること、その塩基配列、細胞の角質化との関連を明らかにしている。卵巢費依存的に細胞増殖を続ける膣では上皮成長因子関連のリガンドが恒久的に発現しており、それらの受容体となるerbB関連の遺伝子の発現の発現も起こること、リン酸化も認められることも明らかにしている。

⑤発生中の魚類および両生類へのエストロゲン類似物質の影響

海産メダカのマミチヨグ受精卵を、エストロゲンを含む海水中で発生させると、頭部や脊椎の形態異常とともに、性分化も雌へとシフトすることを明らかにした。さらに、マ

ミトコグのER α をクローニングし、ER α タンパクへのアルキルフェノール類の結合は、ヒトER α への結合よりもはるかに高いことから、ER α への化学物質の結合に種差があることも明らかにした。

カダヤシは、フロリダの河川で、アンドロゲン類似物質の影響を受けている可能性が指摘されている。カダヤシの稚魚をもちいてアンドロゲンの影響をgonopodiumの形態形成で判定する方法を作成している。さらに、カダヤシのER、アンドロゲン受容体(AR)、DMRT1などの遺伝子をクローニングしている。

イギリスではコイ科のローチがエストロゲン類似物質の影響を受けて、精巣卵を発達させている例が知られている。イギリスのブルーネル大学との共同研究により、ローチからER、AR、DMRT1などの遺伝子をクローニングしている。現在部分断片の塩基配列を得ており、full lengthの配列を決定する予定である。

アフリカツメガエルの受精卵をノニルフェノールやBPA、エストロゲンを含む水の中で発生させ、それに伴って発現変動する遺伝子を、マイクロアレイ法により整理している。また、南アフリカに生息するアフリカツメガエルの野外調査モステレンボッシュ大学の教授と計画している。トロピカーリスはアフリカツメガエルよりも世代交代が早く、2倍体でもあることから、研究には有利であると考えられる。トロピカーリスのcDNAライブラリーを作成し、ステロイド受容体のクローニングを開始した。ツチガエルを用いて、全雌を作成し、アンドロゲン曝露により性転換をおこさせ、それに伴う発現変動遺伝子を、ディファレンシャルディスプレイ法により解析している。

⑥組み換え酵母を用いたエストロゲン活性の検討

ヒトER α を導入した組み換え酵母を用いて各種化学物質のエストロゲン活性の確認と、動物飼料中に含まれるエストロゲン活性を確認している。とくに、ウサギなどの餌では、植物由来のエストロゲン活性が高い。また、マウスおよびラットの餌でも、種類によってエストロゲン活性が極めて異なること、また、同じ餌でもアルファルファの栽培の季節によってエストロゲン活性が変動することが明らかとなっている。

⑦アメリカワニのステロイドホルモン受容体のクローニング

内分泌かく乱の代表例ともなっている、フロリダ州アポプカ湖のアメリカワニの生殖異常のメカニズムを解明するための道具として、ER、AR、STAR遺伝子、アロマターゼ遺伝子などをクローニングしている。これらは、フロリダ大学のジレット教授およびカナダのビクトリア大学のヘンルビン助教授との共同研究である。

以上のように、イギリス、アメリカ、南アフリカおよびカナダの研究者との共同研究に発展している。

3. 研究実施体制

ホルモン応答遺伝子解析グループI

①研究分担グループ長：井口 泰泉（岡崎国立共同研究機構、教授）

②研究項目：DNAマイクロアレイを用いたマウスにおけるホルモン応答遺伝子の解析を行

い、胎仔・新生仔における影響を解析する。内分泌かく乱物質の遺伝子発現におよぼす影響を解析する。

ホルモン応答遺伝子解析グループII

①研究分担グループ長：森 千里（千葉大学、教授）、太田 康彦（鳥取大学、教授）、有菌 幸司（熊本県立大学、教授）

②研究項目：ホルモンおよび内分泌かく乱物質の組織分化、特に生殖系への作用、また胎児への影響を検討。雄マウス生殖器官からのホルモン応答遺伝子の解析。内分泌かく乱物質の胎盤透過性を解析し遺伝子工学的手法を用いてホルモン応答遺伝子の探索。胎盤形成能に及ぼす内分泌かく乱物質の影響を、ラットを用いて脱落膜腫形成の変化を指標として解析し、雌性生殖器官への内分泌かく乱物質作用を解析。センチウを用いた内分泌かく乱物質影響を評価する系の確立。

神経系解析グループ

①研究分担グループ長：阿相 皓晃（東京都老人総合研究所、研究室長）

②研究項目：内分泌かく乱物質（特にビスフェノールA）が神経系の初期発生に与える影響、グリア細胞の発生・分化とその機能異常発生の機構解明を胎児マウスの神経前駆細胞およびグリア前駆細胞を用いて解析。

両生類発生・生殖解析グループ

①研究分担グループ長：井口 泰泉（岡崎国立共同研究機構、教授）

②研究項目：アフリカツメガエルを用いホルモンや内分泌かく乱物質の初期発生における影響についてDNAマイクロアレイを用い遺伝子レベルで解析する。アマガエルの水分吸収に及ぼす影響も解析する。

水棲動物生殖グループ

①研究分担グループ長：堀口 敏宏（国立環境研究所、主任研究員）、鑓迫 典久（国立環境研究所、研究員）

②研究項目：内分泌かく乱物質が水棲生物の生殖へ及ぼす影響を明らかにし、その機構を解明することを目的として、イボニシとミジンコについて解析。ステロイドホルモンである性ホルモンの有無の検討を行う。またミジンコについては、性分化における化学物質の影響について解析。

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文（原著論文）発表

- 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.
- 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.

- 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- β expression. *Toxicol. Sci.* 66: 62-68, 2002.
- 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 α and not of estrogen receptor β in the female rat reproductive tract. *J. Mol. Endocrinol.*, 28: 87-97, 2002.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Iguchi, T., M. Sumi and S. Tanabe: Endocrine disruptor issues in Japan. *Congen. Anorm.*, 42: 106-119, 2002.
- Iguchi, T.: Endocrine disruptors and sexual differentiation. *Clin. Pediatr. Endocrinol.*, 11 (Suppl. 18): 51-58, 2002.
- 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.
- 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.

- 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.
- 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.
- Katsu, Y., E. Takasu, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Iguchi, T. and H. Watanabe: Developmental effects of hormonally active agents on animals: from daphnia to humans. *Environ. Sci.*, 10 Suppl. 1: 43-60, 2003.
- Watanabe, H. and T. Iguchi: Evaluation of endocrine disruptors based on gene expression using a micorarray. *Environ. Sci.*, 10 Suppl. 1: 61-67, 2003.
- Adachi, T., Y. Matsuno, A. Sugimura, K. Takano, K.-B. Koh, K. Sakurai, T. Shibayama, T. Iguchi, C. Mori and M. Komiyama: ADAM1. 7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Mol. Reprod. Devel.*, 64: 414-421, 2003.
- Ya-Gai Yang, Naoji Toyota, Toyofusa Tobe, Yoshiharu Matsuno, Kaiya Takano, Kyu-Bom Koh, Masatoshi Komiyama and Chisato Mori: Immunohistochemical Changes of Androgen Receptor and Estrogen Receptors α and β in the Gubernaculum of Cryptorchid Rats During Testicular Descent. *Acta Histochemica Cytochemica*, 2002.

- Toyofusa Tobe, Naoji Toyota, Yoshiharu Matsuno, Masatoshi Komiyama, Tetsuya Adachi, Haruo Ito and Chisato Mori: Embryonic Myosin Heavy Chain and Troponin T Isoforms Remain in Cremaster Muscle of Adult Cryptorchid Rats Induced with Flutamide. *Archives of Histology and Crytology*, 2002.
- Yoshiharu Matsuno, Masatoshi Komiyama, Toyofusa Tobe, Naoji Toyota, Chisato Mori: Thickening of the cremaster muscle associated with testicular undescend induced by prenatal flutamide-treatment in the rat. *Asian Journal of Andrology*, 2002.
- Tetsuya Adachi, Yoshiharu Matsuno, Atsushi Sugimura, Kaiya Takano, Kyu-bom Koh, Kenichi Sakurai, Takako Shibayama, Taisen Iguchi, Chisato Mori, Masatoshi Komiyama, : ADAM7 (a disintegrin and metalloprotease 7) mRNA is suppressed in mouse epididymis by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Molecular Reproduction and Development*, 2002.
- Kenichi Sakurai(1), Emiko Todaka(1), Yoshifumi Suzuki(2) and Chisato Mori, : An experimental model using guinea pigs to reduce accumulated dioxins in the body. *Congenital Anomalies* 2002, 42, 323-326
- K. Ura, 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
- T. Matsuno, 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*. *Sens. Materi.*, 14 : 395-406, 2002.
- 石橋弘志、鑓迫典久、有菌幸司 : メダカを利用したモニタリング. *エンバイオ* 2002.
- 石橋弘志、鑓迫典久、有菌幸司 : 水環境におけるエストロゲン作用評価手法としてのビデロゲニン. *環境技術* 2002.
- Sugiyama, I., Tanaka, K., Akita, M., Yoshida, K., Kawase, T., and Asou, H. (2002) Ultrastructural analysis of the paranodal junction of myelinated fibers in 31-month-old-rat. *J. Neurosci. Res.*, 70:309-317.
- Sugawa, M., Sakurai, Y., Ishikawa-Ieda, Y., Suzuki, H., and Asou, H. (2002) Effects of erythropoietin(Epo) on glial cell development; Oligodendrocyte maturation and astrocyte proliferation. *Neurosci. Res.* 44: 391-404.
- Nakahara, J., Seiwa, C., Shibuya, A., Aiso, S., and Asou, H. (2003) Expression of Fc receptor for IgM in oligodendrocytes and myelin of mouse CNS. *Neurosci. Lett.*, 337:73-76.
- Tatarazako, N., Oda, S., Morita, M., Sonobe, H., Watanabe, H., Iguchi, T. Insecticides for juvenile hormone agonists exert the influence on the occurrence of the male daphnid. *Proc. Jpn. Soc. Comp. Endocrinol.* 17, p87

(2002)

○ Tatarazako, N. et al. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male Daphnia. Chemosphere (received 2003.1.1).

(2) 特許出願

なし