

201035024A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖
機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と指標の
確立に関する研究

(H22－化学－一般－003)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 23(2011)年 5 月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖
機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と指標の
確立に関する研究

(H22－化学－一般－003)

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 23(2011)年 5 月

目次

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と指標の確立
に関する研究

..... 吉田 緑 p. 1

II. 分担研究報告

化学物質の臨界期曝露が子宮など生殖器系に及ぼす発がんを含む遅発性影響の解析 —卵
巣の形態と機能を修飾する因子の基礎検討—

..... 吉田 緑 p. 9

化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響の関連遺伝子の変
化と病理形態学的アプローチ

..... 高橋 美和 p. 19

化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響に関する解析

..... 代田 真理子 p. 35

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による視床下部・下垂体・性腺軸の高次系に対する
遅発型影響に対する比較内分泌学的アプローチ —出生直後のエチニールエストロジェン
投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機能に与える影響—

..... 渡辺 元 p. 57

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経系への遅発性影響に対する *in vivo* および
in vitro 系を用いたアプローチ —新生仔期における化学物曝露が生後神経新生と感覚系へ
及ぼす遅発性影響の検討—

..... 横須賀 誠 p. 75

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行
動学的アプローチ

..... 川口 真以子 p. 85

III. 研究成果に刊行に関する一覧表

..... p. 109

IV. 研究成果の刊行物

..... p. 111

I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と
指標の確立

研究代表者	吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長
研究分担者	高橋 美和	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 研究員
	代田 眞理子	麻布大学獣医学部 准教授
	渡辺 元	東京農工大学農学部 教授
	横須賀 誠	日本獣医生命科学大学獣医学部 准教授
	川口 真以子	武蔵野大学薬学部 講師
研究協力者	井上 薫	国立医薬品食品衛生研究所 病理部 研究員
	代田 欣二	麻布大学生物科学総合研究所 教授
	萩原 喜久美	麻生大学環境科学部
	岡崎祥子	東京農工大学大学

研究要旨

本研究は、化学物質の臨界期曝露による遅発型影響の機序の解明と、評価に有用な指標確立を目的として、神経発達学、神経内分泌学、生殖生理学、病理学分野から多角的に遅発性影響の解析を進めている。本研究では、 17α -ethynylestradiol (EE)を共通のエストロゲン様物質として検索し、遅発影響の機序や初期変化と、検出の指標を相互が協力して解明することを目指した。初年度である H22 年度は、生体に軽度な活性を示す低濃度から高濃度の EE を生後 0-1 日の新生児ラットあるいはマウスに単回皮下投与を行い、遅発影響の機序解明および早期指標確立のための短期間観察実験と、指標の検出のための長期的影響を多角的に検討するとともに、卵巣への修飾因子について基礎検討を行った。その結果、新生児期曝露により脳を含む全身が EE に曝露されていること、生体にエストロゲン活性を示す EE 濃度における遅発影響の誘発が確認された。また、機序解明に関連し、EE 新生児期暴露ラットでは形態学的な異常が明らかでない性成熟前にすでに内分泌学的変化が生じている可能性が示されことから、遅発影響との相関性を今後検討する。新生児 EE 曝露は海馬における生後神経新生には影響しないと考えられたが、成熟後の神経行動毒性において生体にエストロゲン活性を有する EE 投与は、学習能力を低下させる可能性が示唆されたことからさらなる検討が必要である。性周期の異常の早期発現は、感度のよい遅発性影響指標であることが確認できた。また乳腺やその他の臓器においても遅発性の影響指標となる可能性が示唆された。本年度の研究結果より、遅発性影響は新生児の脳を含む全身に分布した EE が、生体にエストロゲン活性を示すレベルにおいて脳やその他の生殖器関連臓器に作用して誘発され、その影響の指標として性周期異常が最も確実性の高いと推察された。次年度以降、さらに遅発影響の発現機序と長期影響指標の関連性について解析を進める予定である。

A. 研究目的

生理活性物質が成育の適切な時期に限定して作用する臨界期は、化学物質に対しても著しく感受性が高い。成熟後に繁殖障害

や発がん促進等が顕在化する遅発型影響は臨界期曝露の中でも発現機序が不明であり、早急な機序解明およびリスク評価系の確立が望まれる。

本研究では、機能と形態の両面から臨界期曝露による遅発型影響の機序を解明し、評価に有用な指標の確立を目的として実施した。

本研究の特徴と独創性は、同一の化学物質について個体を用いた長期・短期の *in vivo* 実験を行い、相互が協力して、リクス評価法が確立していない遅発型影響の指標とメカニズムを検出し総合的に解明することである。このような効率的な解析結果は、化学物質による繁殖毒性試験評価に直ちに役立つものであり、化学物質のヒト健康影響評価行政に資すると考えられる。

平成 22・23 年度は遅発影響発現の初期変化の検出と長期的影響との関連性の解明に取り組んだ。

I-1. 化学物質の臨界期曝露が子宮など生殖器系に及ぼす発がんを含む遅発性影響の解析 — 卵巣の形態と機能を修飾する因子の基礎検討 — (吉田)

臨界期におけるエストロゲン曝露が生殖器にもたらす遅発性影響、特に、遅発影響が不明な卵巣について検索するため、基礎検討として卵巣および黄体の正常発育およびその修飾因子について成熟ラットを用いた検討した。

I-2. 化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響の関連遺伝子の変化と病理形態学的アプローチ (高橋)

そこで本研究では、臨界期曝露が神経および生殖機能にもたらす遅発性影響の指標とその発現機序を検討するため、雌性新生児ラットに 17 α -ethynylestradiol (EE) を 1 回皮下投与し、長期飼育後の雌性生殖器への影響を検索した。また、遅発性影響の機序解明と評価に有用な指標確立を目指し、投与早期における雌性生殖器の病理組織学的観察と、視床下部における遺伝子発現解析を行った。

I-3. 化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響に関する解析(代田)

化学物質の臨界期曝露が、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響を解析

し、その指標を探索するために、エストロゲン活性を有するモデル化学物質 EE を用いて実験モデルを構築し、曝露量と卵巣を含む生体機能の変化との関係を検討した。

I-4. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による視床下部・下垂体・性腺軸の高次系に対する遅発型影響に対する比較内分泌学的アプローチ — 出生直後のエチニールエストロジェン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機能に与える影響 — (渡辺)

出生直後の EE 投与が雌ラットの春季発動初期の生殖内分泌機能に与える影響について検討した。

I-5. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経系への遅発性影響に対する *in vivo* および *in vitro* 系を用いたアプローチ — 新生仔期における化学物質曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発性影響の検討 — (横須賀)

EE の新生児期曝露が、脳神経および生殖機能に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクとその機序解明の指標を確立することを目的として、生後 24 時間以内の新生仔ラットおよびマウスへの EE 投与モデルを用いて、成熟後の神経新生に及ぼす影響の評価に着手した。平成 22 年度は、マウス新生仔期における EE 曝露が海馬歯状回における神経新生に及ぼす影響を検討した。

I-6. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ(川口)

臨界期に EE およびエストロゲン様物質 (EDs) を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とした。

B. 研究方法

I-1. 卵巣の形態と機能に影響を修飾する因子の基礎検討 (吉田)

正常ラット各性周期の新および旧黄体をマイクロダイセクション法で切り抜き、ステ

ロイド合成酵素等について遺伝子発現やタンパクについて検索した。次に卵胞への修飾作用として PPAR のうち、PPAR α/γ であるフタル酸エステル(DEHP)、アジピン酸エステル(DEHA)および PPAR α であるクロフィプレート(CF)のラットに経口投与した。

I-2. 化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響の関連遺伝子の変化と病理形態学的アプローチ(高橋)

妊娠 Wistar Hannover ラット 70 匹を 6 群に分け、出産後 24 時間以内の新生児に EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回皮下投与した。雌児動物について陰開口および 7 週齢より 10 か月齢まで性周期の観察し、生後 9 週には子宮発がんを誘発するため全例に N-ethyl-N'-nitroso-N-nitrosoguanidine (ENNG) を子宮内投与した。生後 14, 21 日, 34 日および 10 週では性周期を発情期に揃えて一部の動物を途中解剖した。また、EE 各用量の in vivo エストロゲン活性の有無を子宮肥大試験により確認した。

I-3. 化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響に関する解析(代田)

新生雌ラットの視床下部性分化の臨界期に、異なる用量の EE を、単回皮下投与(0.08~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)、あるいは 5 日間反復経口投与(0.4~2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日)した。単回皮下投与では 35 週齢前後の時期まで、また、反復経口投与では 23 週齢前後の時期まで性周期を観察し、主として発情期に剖検した。

I-4. 出生直後のエチニールエストロゲン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機能に与える影響(渡辺)

実験 1 出生後 24 時間以内の雌 Wistar Imamichi ラットにごま油に溶解した EE を 0(ごま油), 0.2, 2.0, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下に 1 回投与した。出生後 10 日, 15 日, 20 日に解剖し、生殖器の病理学的検索、下垂体および血清のホルモンアッセイを行った。

実験 2 : 出生後 24 時間以内の EE の単回投与が、陰の開口時期および性成熟後の雌の

発情周期を調べるために、溶媒(ごま油)投与対照群、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の 3 群を設けた。陰開口後毎日膣スミアを観察し、発情周期を判定した。

微量ホルモン測定法 : 10 日齢から 20 日齢の雌ラットの抹消血液中黄体型性ホルモン(LH)を測定するために、試験管(Micro tube for micro sedimentation, SARSTEDT, Nümbrecht, Germany)を用いて、微量測定が可能なラジオイムノアッセイ法を設定した。

I-5. 新生仔期における化学物曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発型影響の検討(横須賀)

生後 24 時間以内の雌雄マウス(C57BL/6J)に高濃度の EE (20,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) あるいは対象群としてゴマ油を投与し、一般的な飼育環境下で 179 日齢まで飼育管理し、180 日齢に BrdU を腹腔内に投与、その 24 時間後に灌流固定して脳標本とした。海馬を含んだ脳切片標本に Anti-Doublecortin, Anti-BrdU を用いた免疫組織化学染色を施し、新生仔期に EE の投与を受けたことによる海馬歯状回における新生細胞と発生後 2 週間以内の新生ニューロンの分布パターンとその数を計測した。また、内分泌攪乱化学物質としての EE 作用が脳の性分化に及ぼすリスクを評価するために、内側視床前野(MPA)における Anti-Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布パターンを観察した。

I-6. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ(川口)

本年度は行動学的解析により遅発型影響を明らかにする典型例を確立することを目指し、EDs のひとつである isobutyl-paraben の発達期を通じた曝露と不安行動促進、学習・社会性行動低下および摂食行動促進について検討した。また、本研究における共通化学物質である EE の臨界期曝露についても同様に検討した。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとど

めるよう配慮した。動物実験は、主任および分担研究者がそれぞれ所属する施設の動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

C. 研究結果

I-1. 卵巣の形態と機能に影響を修飾する因子の基礎検討 (吉田)

正常黄体では、は新規形成後の1性周期に各種ステロイド合成酵素に関する各種遺伝子および蛋白の発現が劇的に変化した。PPRAsであるDEHPとDEHAは卵胞発育および排卵時の破裂を抑制したが、CFは卵巣に影響を及ぼさなかった。

I-2. 化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響の関連遺伝子の変化と病理形態学的アプローチ (高橋)

膣開口の平均日齢および途中解剖における卵巣・子宮重量に群間差はみられなかったが、性成熟以降に0.2 µg/kg以上で用量依存性に性周期の変調が認められた。子宮肥大試験では0.02 µg/kgからエストロゲン活性を有することが確認された。

I-3. 化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響に関する解析(代田)

膣開口を指標とした性成熟の時期あるいは身体的発達、媒体のコーン油を投与した対照群と同様であったが、EE投与群では、通常は加齢動物で認められる性周期の変化が若齢で認められ、その発現時期は、用量増加に伴い促進された。影響は、性周期以外の指標にも認められ、肝臓および下垂体重量の増加ならびに乳腺の過形成が用量に依存して増加した。また、反復経口投与は単回皮下投与と比べて生体影響が顕著に現れることを認め、本実験モデルにおける用量と影響の発現時期、ならびに影響発現までの過程について確認した。

I-4. 出生直後のエチニールエストロジェン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機能に与える影響(渡辺)

実験1

EE投与により子宮および卵巣相対重量が低下し、20日齢で顕著であった。卵巣には

形態学異常も認められた。EE投与により下垂体前葉中LHの増加、末梢血液中と卵巣中のインヒピン低値を示した。

実験2

、EE200 µg/kg以上の投与群で膣開口が明らかに早期化した。持続性の発情休止像がEE2000 µg/kg投与群で増加した。約8ヶ月の観察期間中発情周期に異常は認められなかったが、EE2000 µg/kg投与群で約6ヶ月後には発情期像を示す動物の割合が他の2群に比べ増加した。

I-5. 新生仔期における化学物質曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発型影響の検討(横須賀)

生後24時間以内における高濃度EE曝露による、海馬歯状回における生後の新生ニューロンの発生に顕著な影響は認められなかった。また、MPAにおけるAnti-Calbindin D-28kの分布パターンにも顕著な影響は認められなかった。

I-6. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ(川口)

[1] IBP曝露実験

発達期を通じたIBP曝露は、オスラットの高架十字試験における不安行動を促進し、受動回避学習試験の成績を低下させ、メスの社会性認知を低下させる一方、活動量及び空間学習には影響を与えなかった。また、卵巣除去あるいは性周期が停止したメスラットの摂食行動と体重増加を促進した。

[2] EE曝露実験

臨界期の2 µg/kg EE曝露は、メスラットの受動回避学習試験の成績を低下させる一方、一般・不安行動および体重には影響を与えなかった。また、8 mg/kg EE曝露では、メスラットの学習能力の低下傾向はあるものの、有意な影響は認められなかった。

D. 考察

I-1. 卵巣の形態と機能に影響を修飾する因子の基礎検討 (吉田)

正常黄体の検索より、ラットの黄体では新

規形成後の1性周期にステロイド合成酵素発現が劇的に変化し、発情期から休止期にかけての1時期のみ機能化することが確認できた。また卵胞発育の修飾因子の検索結果は、PPAR γ が卵胞発育を修飾する可能性を示唆していた。

I-2. 化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響の関連遺伝子の変化と病理形態学的アプローチ(高橋)

臨界期における17 α -ethynylestradiol (EE)曝露が神経および雌性生殖機能にもたらす遅発性影響を検討した。以上より、新生児期におけるEE 0~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単回曝露は性成熟に大きく影響しないが、性成熟以降に遅発性影響として性周期の変調を来し、その作用はin vivoにおいてエストロゲン活性を示す0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で用量依存性に発現することが明らかとなった。

I-3. 化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響に関する解析(代田)

これらの結果は、遅発型影響が現れるまでの間に生体内に生じる変化の検索、ならびに卵巣および卵巣機能に関わる諸器官に及ぼす影響の解析など、バイオマーカー探索ならびにメカニズム解析の研究基盤になるものと考えられる。

I-4. 出生直後のエチニールエストロジェン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機能に与える影響(渡辺)

EE200 および2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では卵巣の卵胞発育を抑制し、卵巣ホルモン分泌の減少によってネガティブフィードバックが低下し、性腺刺激ホルモンの分泌は促進されることが示唆された。

I-5. 新生仔期における化学物曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発性影響の検討(横須賀)

本年度の結果は、臨界期における高濃度EE曝露が海馬の生後神経新生ならびにMPAにおけるalbindon D-28の雌雄差に関して、少なくとも形態的に評価できる表現型として影響を及ぼさないことを示している。平

成23年度は、亜急性作用(EE投与後7日以内)ならびに離乳期直後における評価を併せて行い、EEの新生児期曝露が、脳神経および生殖機能に及ぼす遅発型(遅発型)リスクの可能性とその推移についての考察を加える計画である。

I-6. 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ(川口)

本年度の結果より、発達期全体のIBP曝露が不安行動促進、学習・社会性行動低下および摂食行動促進を示すこと、臨界期の低濃度EE曝露は学習能力を低下させ、高濃度EE曝露は学習・不安行動に影響を及ぼさないことを明らかとなった。

E. 結論

本年度の研究結果より、遅発性影響は新生児の脳を含む全身に分布したEEが、生体にエストロゲン活性を示すレベルにおいて脳やその他の生殖器関連臓器に作用して誘発され、その影響の指標として性周期異常が最も確実性の高いと推察された。基礎検討より、ラットの黄体や卵胞の成長や退行には、種々の酵素や因子が複雑に関連しているが、基本的な構造を理解し、ホルモンや詳細な形態学的検討を組み合わせることで、修飾因子による影響の機序を推察可能であると考えられた。

次年度以降、さらに遅発影響の発現機序と長期影響指標の関連性について解析を進める予定である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

G-1. 論文発表

- 1) Kawaguchi, M., Morohoshi, K., Imai H., Morita, M., Kato, N., and Himi, T. Maternal exposure to isobutyl-paraben impairs social recognition in adult female rats. *Exp. Anim.*, 2010, 59(5), 631-5.
- 2) Takahashi M, Yoshida M, Inoue K, Morikawa T, Nishikawa A.: Age-related

susceptibility to induction of osteochondral and vascular lesions by semicarbazide hydrochloride in rats. *Toxicol Pathol.*, 38:598-605, 2010.

- 3) Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A (2011). The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions. *Exp Toxicol Pathol.* In press.
- 4) Takahashi M, Inoue K, Koyama N, Yoshida M, Irie K, Morikawa T, Shibutani M, Honma M, Nishikawa A.: Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. *Arch Toxicol.*, 2011, in press.
- 5) Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A.: Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency on female rats. *Toxicol Pathol.*, 2011, in press

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

II. 分担研究者報告

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

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の
機序解明と指標の確立に関する研究

分担研究課題：

化学物質の臨界期曝露が子宮など生殖器系に及ぼす発がんを含む遅発性影響の解析 一卵
巣の形態と機能を修飾する因子の基礎検討一

研究分担者：吉田 緑 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

研究要旨

臨界期におけるエストロゲン曝露が生殖器にもたらす遅発性影響、特に、遅発影響が不明な卵巣について検索するため、基礎検討として卵胞および黄体の正常発育およびその修飾因子について成熟ラットを用いた検討した。まず、正常ラット各性周期の新および旧黄体をマイクロダイセクション法で切り抜き、ステロイド合成酵素等について遺伝子発現やタンパクについて検索した。その結果、ラットの黄体では新規形成後の1性周期にステロイド合成酵素発現が劇的に変化し、発情期から休止期にかけての1時期のみ機能化することが確認できた。次に卵胞への修飾作用としてPPARのうち、PPAR α/γ であるフタル酸エステル(DEHP)、アジピン酸エステル(DEHA)およびPPAR α であるクロフィブレート(CF)のラット経口投与により、DEHPとDEHAは卵胞発育および排卵時の破裂を抑制したが、CFは卵巣に影響を及ぼさなかった。この結果はPPAR β が卵胞発育を修飾する可能性を示唆していた。これらの基礎検討より、ラットの黄体や卵胞の成長や退行には、種々の酵素や因子が複雑に関連しているが、基本的な構造を理解し、ホルモンや詳細な形態学的検討を組み合わせることで、修飾因子による影響の機序を推察可能であると考えられた。

A. 研究目的

高度な情報ネットワークを発育分化に必要とする生体では、生理活性物質が臨界期と呼ばれる成育の適切な時期に限定して作用し正常発達が遂げられる。臨界期は外因性の化学物質に対しても高い感受性を有し不可逆的障害をもたらす。さらに重大な懸念は、条件によりこの不可逆的障害が、成熟後の繁殖機能低下や発がん感受性増加など、遅発型影響として発現する点である。DES daughterの不幸な事例は、障害発現時期と臨界期の乖離、即ち遅発型影響を示しており、その事実は実験的にも再現された。しかし、その後の遅発型影響の研究は遅れている。一因として、遅発型影響の複雑さから、短期間の実験や限られた分野の研究

では十分な解析ができない点が挙げられる。本研究では、臨界期におけるエストロゲン曝露が生殖器にもたらす遅発性影響の機序を明らかし、有用な指標を検索することが目的である。遅発影響は視床下部・下垂体・性腺軸だけでなく、子宮や卵巣など生殖器全般に及ぶ可能性がある。そこで遅発影響が未だ不明な卵巣について検索するため、基礎検討として卵胞および黄体の正常発育およびその修飾因子について成熟ラットを用いた検討した。

今回基礎検討は、卵胞発育に修飾作用が報告されている peroxisome proliferating activator receptor(PPAR) α あるいは α/γ 作用を有する化学物質の成熟雌ラット卵巣への影響と、正常成熟ラット黄体のステロイ

ド代謝酵素の変動をそれぞれ検索した。

B. 研究方法

B-1. 成熟ラットにおける黄体の特徴

各性周期(発情前期、発情期、発情後期、休止期)のSDラットから卵巣を採取した。片側から凍結切片を回収しレーザーマイクロダイセクション報によって新黄体および旧黄体を回収し、real-time PCR報を用いてステロイド合成酵素であるP450scc、3beta-HSD および20alphaHSDのmRNA発現を解析した。

B-2. 成熟ラット卵胞にPPARの修飾作用

7週齢のDonryuラットにDEHP 3000 mg/kg bw/day、DEHA 2000mg/kg bw/dayを強制経口投与、CF 2500ppmは混餌にて約2および4週間投与し、卵巣の形態学的変化および卵巣関連ホルモンを検索した(図1)。対照群は各性周期を示す時期に、投与群は発情前期および発情期の膣スメア像を示す時期に解剖した。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

C. 研究結果

C-1. 成熟ラットにおける黄体の特徴

マイクロダイセクション法を用いた

real-time PCRの結果、新黄体では旧黄体と比較して発情期、発情後期、休止期において20alpha HSD mRNAの発現量が低下し、発情後期においてはP450sccと3beta HSDのmRNA発現量が上昇した。また、新黄体の各性周期における各酵素の発現量は、P450scc mRNAが発情後期ならびに休止期において、3beta HSD mRNAが休止期において上昇し、20alpha HSD mRNAが発情前期以外で低下した。一方旧黄体では20alpha HSD mRNA発現が休止期に上昇した。免疫

組織化学的に3beta HSDと3beta HSDとともに各性周期の全ての黄体で陽性反応を示し、特に世代の若い黄体ほど染色性が強い傾向がみられた。剖検時の血中プロゲステロン濃度は発情後期において上昇した。

C-2. 成熟ラット卵胞にPPARの修飾作用

DEHPおよびDEHA群の性周期は、投与開始約1週間後より異常が観察されたが、CF群では規則正しい性周期であった(図2)。また2週間投与後のDEHP群で卵巣重量の有意な低下が観察された(図3)。投与による形態への影響は、DEHPとDEHA群のみで観察された。これらの投与群の卵巣では、形態学的に大型閉鎖卵胞の増加、グループ卵胞数の減少、非破裂大型卵胞の黄体化、黄体化のう胞が、低頻度ではあるが観察され、対照群にはこれらの変化は認められなかった(図4-75、表1)。投与期間による増悪化は認められなかった。ホルモン測定では、発情前期のE2値がDEHPおよびDEHA群で低下した(図8)。

D. 考察

成熟ラットにおける黄体の特徴の検討の結果より、ラットの黄体は新規形成の1性周期にステロイド合成酵素発現が劇的に変化し、発情期から休止期にかけての一時期のみで機能化することが示唆された。また、成熟ラット卵胞にPPARの修飾作用の結果より、PPAR剤は、大型卵胞の発育および排卵時の卵胞破裂に影響することが確認された。卵胞発育にはE2の低下が、破裂への阻害にはプロスタグランジンが関与していると考えられた。CF群で影響が認められなかったことから、検索した化学物質の卵胞への影響はPPAR γ による作用と推察した。

E. 結論

これらの基礎検討より、ラットの黄体や卵胞の成長や退行には、種々の酵素や因子が複雑に関連しているが、基本的な構造を理解し、ホルモンや詳細な形態学的検討を組み合わせることで、修飾因子による影響の

機序を推察可能であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A (2011). The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions. *Exp Toxicol Pathol*. In press.

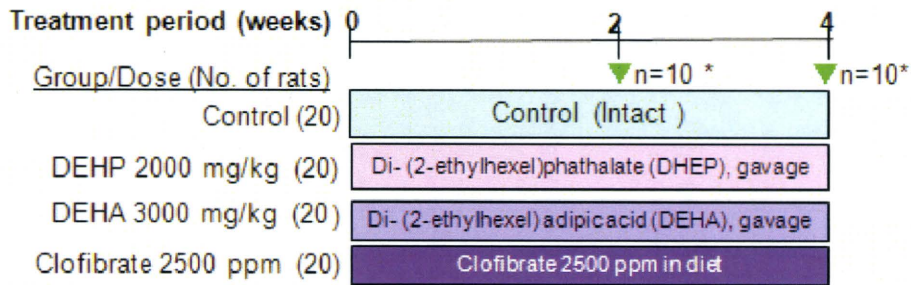
2. 学会発表

吉田緑、武田賢和、林清吾、井上薫、高橋美和、松尾沙織里、渡辺元、田谷一善、西川秋佳. 異なるペルオキシゾーム増殖剤による卵胞への毒性影響の比較。第27回日本毒性病理学会(大阪)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Experimental design



*Sacrifice, 5 rats at proestrus and 5 rats at estrus during 9:00-11:00AM.

Animals: 7 week-old Crj:Donryu rats, female

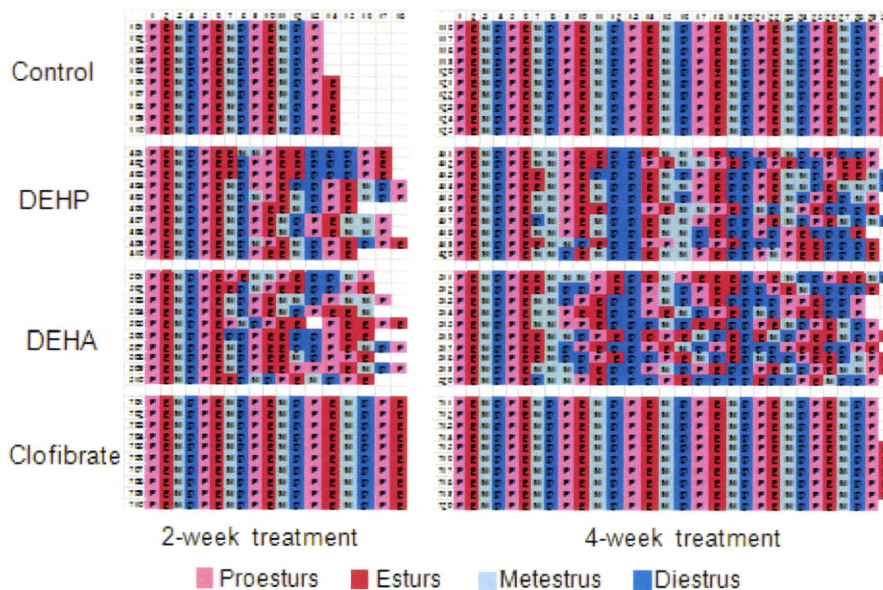
EXAMINATION in life: Body weight (once per week), Estrous cyclicity, Daily clinical observation

EXAMINATION:

Organ weights

Hormone assays (17 β -estradiol (E2), progesterone (P4), FSH, LH, PRL, inhibin),
Histopathology

図1 実験計画



Estrous cycle (Changes of Vaginal smear)

図 2 性周期の変化

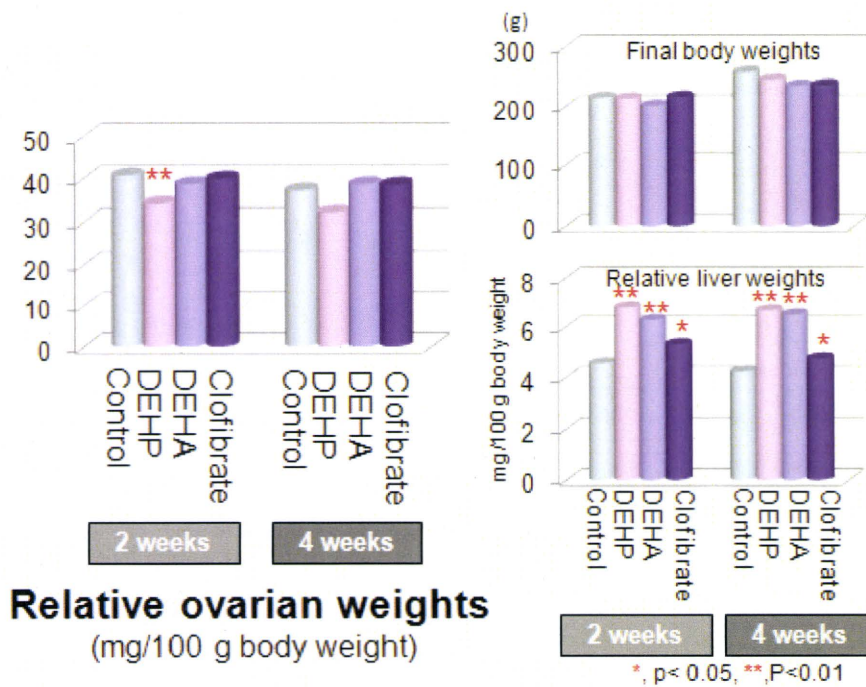


図3 臓器重量

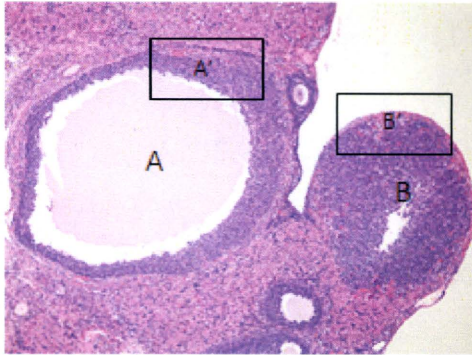
Summary of histopathology

	Treatment period							
	2 weeks				4 weeks			
	Cont	DEHP	DEHA	Clofibrate	Cont	DEHP	DEHA	Clofibrate
No. of rats examined	10	10	10	10	15	10	10	10
Ovary								
Unruptured follicle with luteinized granulosa cell	0	1	2	0	0	0	0	0
Cyst, luteinized	0	2	1	0	0	1	0	0
Cyst, corpus luteum	1	1	0	0	0	0	0	0
Increase of atretic follicle	0	0	2	0	0	1	1	0
Follicular cyst	0	0	0	0	0	1	3	0
Decrease in old CL	0	3	1	0	0	1	0	0
Vacuolation of stroma	0	10	10	0	0	10	10	0
Vagina								
Not synchronized with ovary	0	0	0	0	0	4	3	0
Liver								
Hepatocellular hypertrophy, diffuse	0	10	10	10	0	10	10	10

Pink, Changes related to disturbance of rupture at ovulation

Purple, Changes related to inhibition of follicle growth or ovulation

表1 卵巣の病理組織学的所見



At estrus

Unruptured follicle
DEHP 3000 mg/kg by gavage
for 2 weeks

→, Angiogenesis

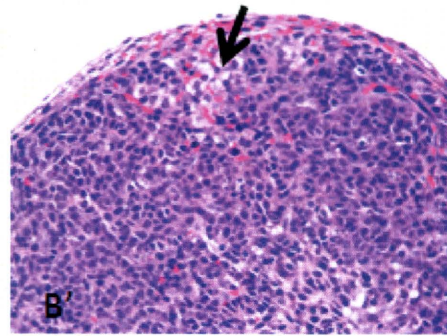
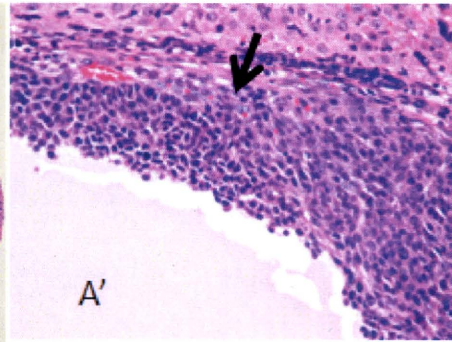
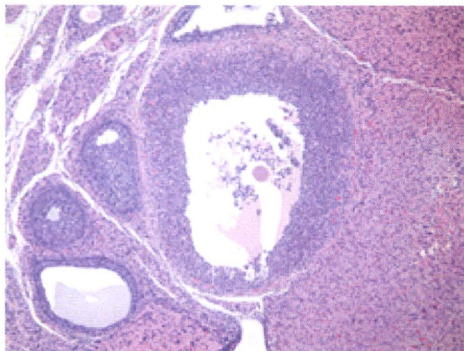


図4 発情期に観察された非破裂卵胞



At estrus

Unruptured follicle
DEHA 2000 mg/kg by gavage
for 2 weeks

→, Angiogenesis

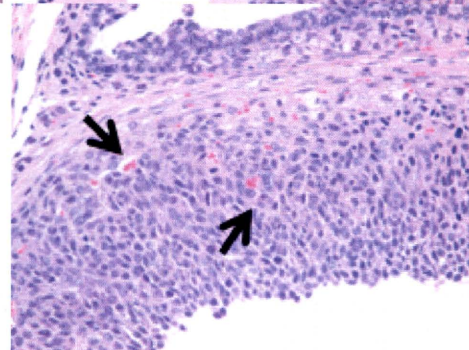
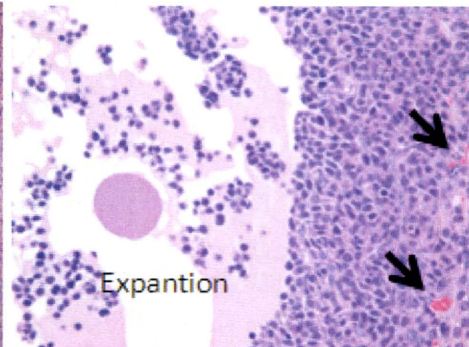


図5 発情期における非破裂卵胞

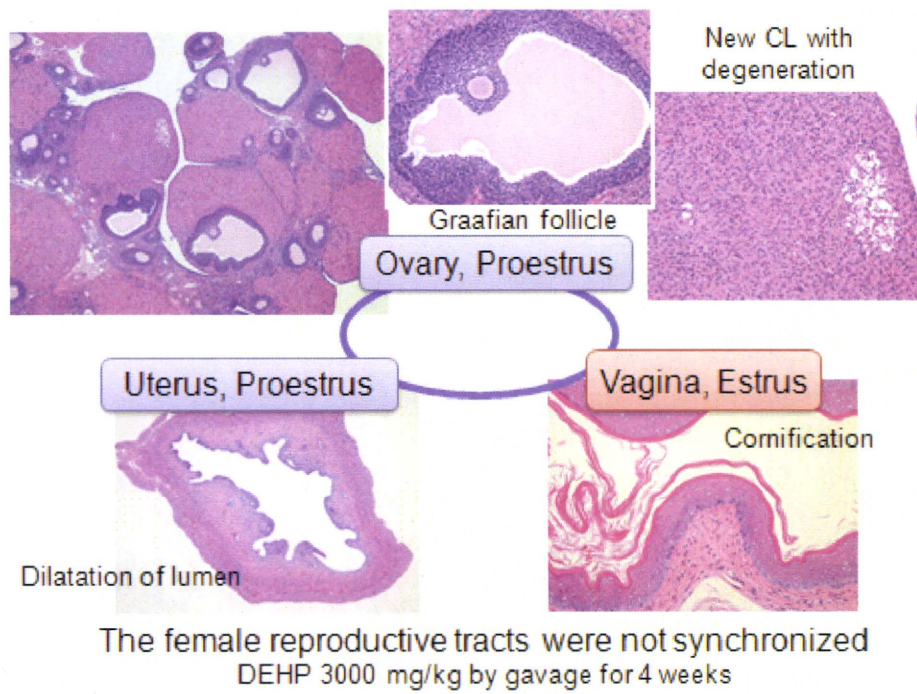


図6 同期化していない生殖器

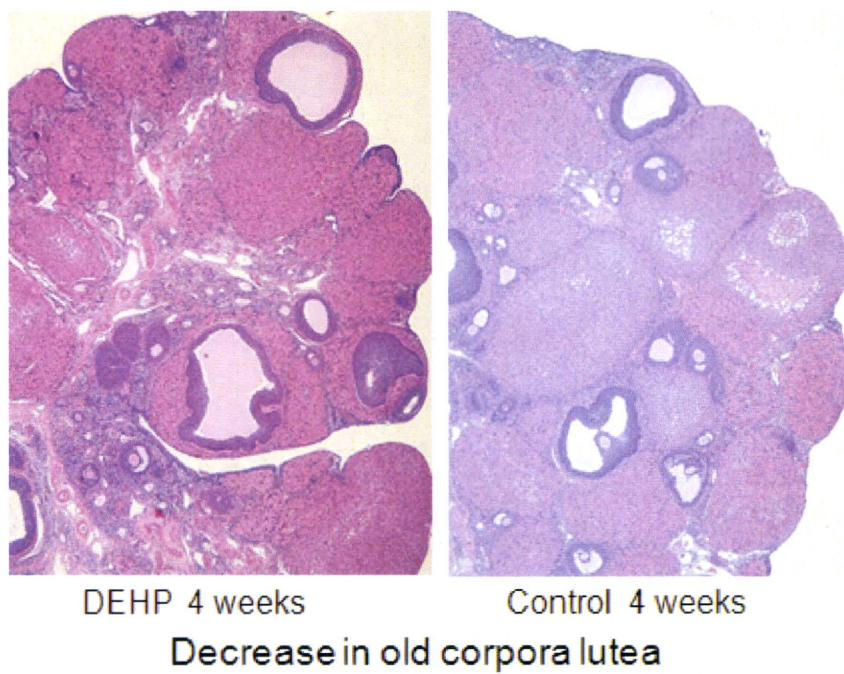


図7 発情前期。黄体数の減少。とくに新黄体の欠如

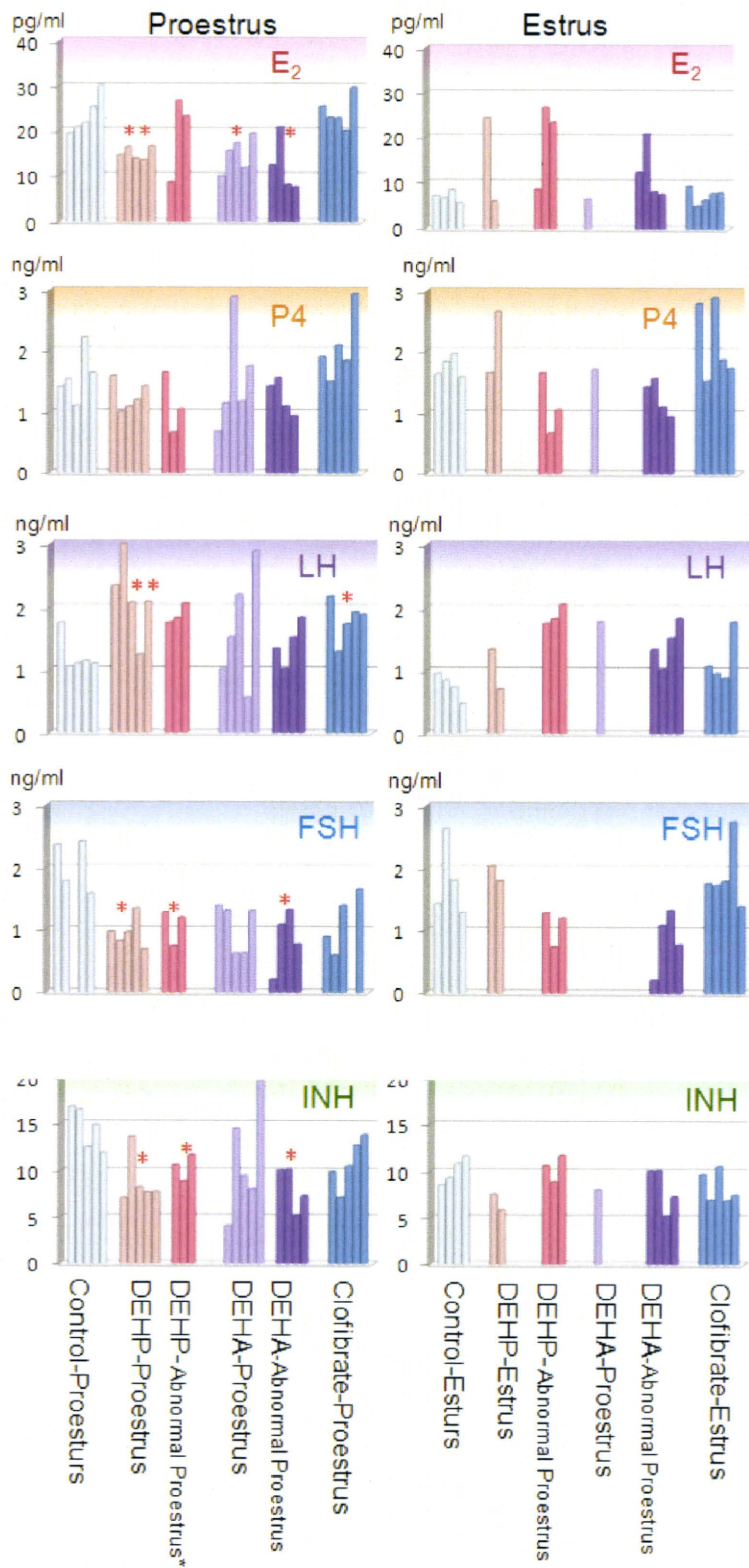


図8 4週間投与後の血中ホルモン値

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

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の
機序解明と指標の確立に関する研究

分担研究課題： 化学物質の臨界期曝露が神経機能および生殖機能にもたらす遅発型影響
の関連遺伝子の変化と病理形態学的アプローチ

研究分担者：高橋美和 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：井上 薫 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

研究要旨

臨界期における 17 α -ethynylestradiol (EE) 曝露が神経および雌性生殖機能にもたらす遅発性影響を検討した。妊娠 Wistar Hannover ラット 70 匹を 6 群に分け、出産後 24 時間以内の新生児に EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回皮下投与した。雌児動物について膣開口および 7 週齢より 10 か月齢まで性周期の観察し、生後 9 週には子宮発がんを誘発するため全例に *N*-ethyl-*N'*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine (ENNG) を子宮内投与した。生後 14, 21 日, 34 日および 10 週では性周期を発情期に揃えて一部の動物を途中解剖した。また、EE 各用量の *in vivo* エストロゲン活性の有無を子宮肥大試験により確認した。膣開口の平均日齢および途中解剖における卵巣・子宮重量に群間差はみられなかったが、性成熟以降に 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で用量依存性に性周期の変調が認められた。子宮肥大試験では 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ からエストロゲン活性を有することが確認された。以上より、新生児期における EE 0~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の単回曝露は性成熟に大きく影響しないが、性成熟以降に遅発性影響として性周期の変調を来し、その作用は *in vivo* においてエストロゲン活性を示す 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で用量依存性に発現することが明らかとなった。

A. 研究目的

胎児期・発達期には化学物質だけでなく内因性物質に対して非常に高い感受性を示す臨界期が存在する。脳の性分化の臨界期は、ラットの場合、出生前後 5 日頃といわれているが、この時期にホルモン作用を有する物質の曝露を受けると、条件により成熟後の繁殖機能低下や発がん感受性増加など遅発性影響を発現することがある (Yoshida et al., Toxicol. Pathol., in press)。ヒトにおいても、流産防止の目的で使用された合成エストロゲン diethylstilbestrol (DES) を胎児期に曝露された女性において、思春期以降に膣がんの発生等の遅発性影響が現れた事例がある。

しかし、このような影響は従来型の繁殖毒性試験では検出することが困難であり、

臨界期曝露が生体にもたらす長期的影響を適切に評価できる試験系が求められている。また、遅発性影響の発現機序についても解明されていない部分が多く、得られた結果の毒性学的意義や毒性学的指標の確立が急務となっている。

そこで本研究では、臨界期曝露が神経および生殖機能にもたらす遅発性影響の指標とその発現機序を検討するため、雌性新生児ラットに 17 α -ethynylestradiol (EE) を 1 回皮下投与し、長期飼育後の雌性生殖器への影響を検索した。また、遅発性影響の機序解明と評価に有用な指標確立を目指し、投与早期における雌性生殖器の病理組織学的観察と、視床下部における遺伝子発現解析を行った。