

201133013A

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
機能へ及ぼす遅発型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 **23** 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 **24(2012)**年 3 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
機能へ及ぼす遅発型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 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 24(2012)年 3 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型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型影響の解析

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・吉田 緑 p.21

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.29

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 眞理子 p.41

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* 系を用いたアプローチ — 新生仔期における化学物曝露が脳の性差と生後神経新生に及ぼす遅発性影響の検討—

・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・横須賀 誠 p.79

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.93

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

.....

p. 101

Ⅳ. 研究成果の刊行物

.....

p. 103

I . 総括研究報告

課題番号 H22-化学-一般-003
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
	川嶋 潤	麻布大学獣医学部
	中村 知裕	麻布大学獣医学部
	小川 祐布子	麻布大学獣医学部
	岡崎 祥子	東京農工大学大学
	野澤 香織	東京農工大学
	平野 顕宏	明治大学農学部農学科 動物環境学研究室

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解明と評価に有用な指標確立を神経発達学、神経内分泌学、生殖生理学、病理学分野から多角的に解析した。平成 23 年度は、共通被験物質 17 α -ethynylestradiol (EE) 20 μ g/kg の新生児期単回皮下投与を共通実験項目とした。この項目を軸に、種々の濃度の EE を生後 0-1 日の新生児ラットあるいはマウスに投与し、遅発影響の機序解明のための初期変化と、指標確立のための長期観察を解析した。研究成果を以下に記す：

- 1) 遅発影響の指標：性周期異常(持続発情)の早期化が最も鋭敏で、続いて雄型乳腺の増加・卵巣等の形態学的変化であったが、それらの発現には 5 および 10 ケ月間を要し、通常の毒性試験では検出できないことが明らかとなった。
- 2) 遅発影響の用量相関性：遅発影響は用量依存性に発現することが明らかとなった。また遅発影響は生体へのエストロゲン作用量(EE0.2~200 μ g/kg)で発現し、エストロゲン受容体

(ER) α を介して発現する可能性が高いことが明らかになった。

3) **遅発影響の神経系への影響**:行動学的解析より高用量 EE 投与では性行動・性選好性に異常が認められたが、EE20 μ g/kg 投与で異常は明らかではなかった。また、高用量および EE20 μ g/kg 投与ともに海馬・嗅球における生後神経新生には影響は認められなかった。

4) **遅発影響の初期変化**: EE20 μ g/kg 以上で性成熟前より下垂体のホルモン産生の異常および EE0.2 μ g/kg 以上で観察された。性成熟前および初回排卵直後では、卵巣・子宮の形態変化、エストロゲン受容体感受性の変化、排卵調節機能の異常が認められた。SDNPOA した。また視索前野性の二型核の部分的雄型化が観察された。これらの結果から、初期から視床下部内分泌調節ニューロン関連遺伝子の一過性低下および卵巣へ影響を来した結果、長期影響として性周期等の異常が発現している可能性が示唆された。

5) **臨界期における遅発影響の感受性**:臨界期では単回皮下投与より反復経口投与の方が鋭敏である可能性が示唆された。

これらの研究結果より、多くの遅発性影響の指標が検出されつつある。性周期異常および雄型乳腺の発現は長期観察を要するものの、遅発影響指標としての感度は高いものであった。また遅発影響発現の機序については、上位中枢の内分泌調節機構が初期より変化しているだけでなく、卵巣・乳腺等エストロゲン関連臓器も新生児期曝露により直接的に影響を受け、遅発影響発現に関与する可能性も考えられた。最終年である平成 24 年度は、さらに神経内分泌調節ニューロンについても解析を進め、遅発影響の機序解明を行う予定である。

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リスク評価に有用な指標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、リスク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 23 年度は上述の目的のうち特に、

- 長期的影響から遅発影響の指標の確立と
- 遅発影響発現の初期変化の検出について取り組んだ。

B. 研究方法(()は主な担当者)

平成 23 年度は、17 α -ethynylestradiol (EE)をさまざまな濃度で生後 0-1 日の新生児ラットあるいはマウスに投与し、遅発影響の機序解明のための短期間観察実験と、指標確立のための長期観察による解析を組み合わせて行った。ラットについては系統

差を観察するためにあえて共通の系統を使用せず、各実験の目的に適した系統(性周期が規則的な Wistar- Imamichi 系、生殖試験に汎用される SD 系、一般毒性試験に汎用される Wistar Hannover 系、性周期が規則的且つ子宮癌好発系の Donryu 系)を用いた。

実験にあたり以下の共通項目を設定した：

- **共通する被験物質の設定** 研究成果の相互解析のため 17α -ethynyl estradiol (EE)の新生児期単回皮下投与を共通実験項目とした。
- **共通する遅発影響誘発量の設定** 分担研究間での横断的解析を促進するため、遅発影響量であることが確認できた $EE20\mu\text{g/kg}$ を遅発影響発現量として各実験に組み入れた。

遅発影響検出のための指標確立を目的とするもの(長期検索ネットワーク)

1. 臨界期曝露による遅発性影響が生殖器系および乳腺にもたらす変化と指標の確立および遅発影響発現の用量相関性、エストロゲン受容体との関連性(高橋・代田・渡辺・吉田)

1-1. 出生後 24 時間以内の新生児雌ラットに EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 $\mu\text{g/kg}$ を 1 回皮下投与した。臍開口および 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。10 か月齢まで性周期を観察後、生存動物を全て解剖し、乳腺・生殖内分泌臓器の形態および子宮発がん性を検索した(高橋)(子宮発がん性は現在解析中、ホ

ルモン測定を実施予定)。また生後 24 時間以内に $EE200\mu\text{g/kg}$ 単回皮下投与したラットを用いて 1,2,4,24 時間後における体内濃度を LC-MS/MS 法で測定した。

1-2. 出生後 1 日齢の雌 SD ラットに異なる用量の EE を、単回皮下投与 ($0.08\sim 2.0\mu\text{g/kg}$) し、性周期、卵巣を初めとする雌生殖器について 9 ケ月齢まで観察した(代田)。

1-3. 出生後 1 日以内の雌 Donryu ラットに EE0, 20, 200 $\mu\text{g/kg}$ と estrogen receptor (ER) α と β アゴニスト 1000 $\mu\text{g/kg}$ をそれぞれ単回皮下投与し、性周期異常として遅発影響が確認できる 4 ケ月齢まで飼育し生殖器を形態学的に検索した(吉田、4 ケ月齢の病理組織学的検査は解析中。ホルモン測定を実施予定)。

1-4. 出生後 1 日以内の雌 Wistar-Imamichi ラットに $EE20\sim 2000\mu\text{g/kg}$ をそれぞれ単回皮下投与し 9 ケ月齢まで観察した。

2. 臨界期曝露による遅発性影響の投与経路による感受性差について(代田)

生後 1 日齢の SD ラットの皮下に種々の用量で投与 ($0.08\sim 2.0\mu\text{g/kg/日}$) し、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単回皮下投与と比較した。

3. 臨界期曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発影響の検討 (横須賀)

生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J) に高濃度 ($20,000\mu\text{g/kg}$) および $20\mu\text{g/kg}$ の EE を投与し、性成熟前の 4 週齢と 6 ケ月齢時に、海馬歯状回における新生細胞を BrdU 抗体、新生神経細胞の発

現数を Dublicortin(DCX)抗体それぞれを用いて免疫組織化学的に検索した。また、海馬と同様に成体神経新生が認められる脳室周囲下帯 (SVZ) への影響を、生後発生した神経細胞の行き先である嗅球の大きさ (大脳-嗅球比率 OBBR) を指標として評価した。一方、脳の性分化への影響は内側視束前野 (MPA) を Calbindin D-28k 抗体で染色して判定した。

4. 臨界期曝露による遅発影響検出のための神経行動学的アプローチ(川口)

生後 24 時間以内に高濃度 (2,000 および 20,000 μ g/kg) および 20 μ g/kg の EE を投与した 6 週齢および 5 ヶ月齢(10 週齢にて卵巣摘出)の Wistar-Imamichi 雌ラットを用いて、不安行動・学習/社会性行動・摂食行動に関する各種神経行動試験、性行動・性選好性に関する各種神経行動学的解析を行った。脳および血液は、分担研究者により解析予定である。

遅発影響機序解明のため初期変化の検索を目的とするもの(初期変化検索ネットワーク)

5. 臨界期曝露による遅発型影響が雌ラットの春機発動初期の高次中枢を含む生殖内分泌機能に与える影響(渡辺)

出生後 1 日以内の雌 Wistar-Imamichi ラットに EE0, 0.2, 2.0, 20, 200, 2000 μ g/kg を皮下に 1 回投与し、10、15、20 日齢に生殖器の形態および下垂体および血清のホルモンを解析した。また高用量の EE を生後 1 日以内に単回皮下投与し、膣開口時期および性成熟後の雌の発情周期を調べた。

6. 臨界期曝露による遅発影響が神経内分泌調節機構の遺伝子にもたらす経時的変化

と病理形態学的アプローチ(高橋)

上述の実験 1-1 は初期変化検索のため、生後 14, 21 日, 34 日および 10 週齢(性周期を発情期に揃えた)で一部の動物を途中解剖し、雌性生殖器の組織学的検索、視床下部全体における神経内分泌ニューロン関連遺伝子発現を検索し、血清性ホルモン濃度を測定した。

7. 臨界期曝露による遅発影響のエストロゲン感受性(吉田)

上術の実験 1-3 について、各群ともに 3 週齢にて子宮肥大試験にてエストロゲンに対する感受性を検索した。また膣開口時期を検索した(受容体の免疫組織化学的検索およびホルモン測定は解析中)。

(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

1. 臨界期曝露による遅発性影響が生殖器系および乳腺にもたらす変化と指標の確立および遅発影響の用量相関性について(高橋・代田・吉田)

実験 1-1

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、性周期の異常に特徴的な変化が認められた。すなわち、持発情を主とする性周期異常の早期化が明らかな用量依存性を伴って発現した。性周期の異常は EE200 μ g/kg では 10 週齢より発現し、EE0.2 μ g/kg まで用量依存性にその発現が対照群より早期化した。EE0.2 μ g/kg では 5 ヶ月齢である 22

週齢で異常が発現した。また昨年と同様、性周期影響量はエストロゲン活性を有する量であることが確認された。

加齢ラットに好発する下垂体腫瘍の発生は投与により増加しなかったが、10 か月齢では EE0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で乳腺腺房細胞が好酸性に肥大し、雄の乳腺に類似する変化が観察された。

実験 1-2

膈開口を指標とした性成熟の時期あるいは身体的発達は、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、性周期の異常が若齢より観察され、その発現時期は用量増加に伴い促進した。性周期以外の指標の異常として下垂体および肝臓重量の増加ならびに乳腺の過形成が用量依存性に認められた。

実験 1-3

EE 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ は他系統ラットと同様、用量相関性を持つ性周期の早期異常が 15 および 13 週齢にそれぞれ発現した。ER α アゴニストは EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ と同時期に性周期早期異常を示した。 β アゴニストの性周期は対照群と同様であった。

実験 1-4

EE20~200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与は性周期の異常が性成熟後発現した。

2. 臨界期曝露による遅発性影響の投与経路による感受性差について(代田)

新生児期反復経口投与は単回皮下投与(EE0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$)と比べて性周期異常皮下より低用量の EE0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}\times 5$ 回から現れた。また 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ では乳腺における乳汁の貯留亢進も認められた。

3. 臨界期曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発影響の検討(横須賀)

生後 24 時間以内 EE 曝露による海馬歯状回における BrdU 陽性細胞(細胞新生)、DCX 陽性細胞(生体新生ニューロン)、銀染色陽性細胞(プログラム神経細胞死)の分布および発現数に顕著な影響は認められなかった。さらに、OBRR に対する影響も認められなかった。一方、11 月 28 日現在計測途中であるが、MPA における CB 陽性細胞の分布パターンは、EE 投与群の雌雄における雌雄差が不鮮明化するという、新生仔期 EE 投与による影響と思われる所見が得られつつある。

4. 臨界期曝露による遅発影響検出のための神経行動学的アプローチ(川口)

高用量 EE および遅発影響誘発量 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の EE を新生児期曝露した結果、高用量では不安指標のオープンフィールド、明暗行動が低下し、性行動・性選択性も顕著に減少した。低用量(EE20 $\mu\text{g}/\text{kg}$)では Border 新入オープンフィールドのみ減少したが用量相関性は認められなかった。また不安指標である高架十字試験で不安の増加し、受動回避学習の低下が認められたが、用量相関性は認められなかった。社会性認知、摂餌量、新奇物体認知性について、投与との関連性は明らかにならなかった。

遅発影響機序解明のため初期変化の検索するもの(初期変化検索ネットワーク)

5. 臨界期曝露による遅発型影響が雌ラットの春機発動初期の高次中枢を含む生殖内分泌機能に与える影響(渡辺)

生後 24 時間以内に EE20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上投与した雌ラットでは、哺乳中においてすでに卵胞および子宮内膜の形態学的発育不全、卵巣中インヒビン量低下の機能的発育不全

が認められた。

6. 臨界期曝露による遅発影響が神経内分泌調節機構の遺伝子にもたらす初期変化(高橋)

生後 34 日および 10 週における血清 FSH, LH, E2, P4 濃度に群間差は認められなかった。

視床下部全体における遺伝子発現解析では、生後 14 日において Kiss-1 mRNA の発現が EE 全投与全群で対照群と比較して有意に低下していたが、生後 21 日、34 日および 10 週では有意な変動は認められなかった。Kiss-1 receptor, ER α , ER β , GnRH, Cyp19a1 の発現はいずれの時点においても投与による変動は認められなかった。子宮では、EE20 μ g/kg 投与により、離乳前の子宮で子宮腺減少が、10 週齢において被覆および内膜の ER 発現の異常が認められた。

新生児に単回皮下投与した EE の全身、農、肝臓中濃度は 4 時間後が最も高く、24 時間に検出限界以下(0.002ppm)となった。

7. 臨界期曝露による遅発影響のエストロゲン感受性(吉田)

生後 24 時間以内に EE20 および 200 μ g/kg 皮下投与した動物では、子宮肥大試験による子宮絶対および相対重量が対照群より低下傾向を示した。またこれらの群では膣開口日の早期化および膣開口時体重の低値が認められた。

D. 考察

投与後 24 時間の EE 血中濃度結果より、EE は脳を含む全身へ移行することが確認できた。また、遅発影響は ER α 受容体を經由して誘発される可能性が高いと示唆された。

1. 臨界期曝露による遅発性影響が生殖器系および乳腺にもたらす変化と指標の確立および遅発影響の用量相関性について、長期観察を含む複数の動物実験の結果より

1) 遅発影響の指標として、性周期異常(持続発情)の早期化が最も鋭敏で、続いて形態学的な雄型乳腺増加であった。卵巣等にも形態学的変化異常をきたすことが明らかとなった。性周期異常は鋭敏ではあるものの、その発現には 5 および 10 ケ月間を要し、通常の毒性試験では検出できないことから、遅発影響は化学物質のリスク評価上重要な問題であると考えられた。

2) 遅発影響の用量相関性として、遅発影響は EE0.2~200 μ g/kg のエストロゲン作用量において用量依存性に発現した。エストロゲン作用量と遅発影響との関連性は、今後明らかにすべき重要な課題であると考えられた。

3) 成熟後の行動学的影響:高用量 EE 投与では性行動・性選好性を含め異常が認められたが、EE20 μ g/kg 投与での異常は明らかではなかった。EE20 μ g/kg では不安行動および受動回避学習で異常が認められたが、用量相関性がなかったことから、次年度確認を含めた実験を行う。その他の神経行動学習に対する影響は観察されなかった。

4) 生後神経新生への影響については、高用量および EE20 μ g/kg 投与は、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、脳の性分化への影響が示唆された。これらの結果は神経行動学の解析結果に一致する可能性が高く、さらに横断的な神経学的な解析を実施する予定である。

2. 遅発影響機序解明のため、初期変化の検索を目的とした各種実験より

5) 遅発影響の初期変化として、性成熟前より、EE200 μ g/kg で下垂体のホルモン産生の変化や、一過性ではあるものの EE0.2 μ g/kg 以上でキスペプチン関連遺伝子の低下が観察されたことは、視床下部神経内分泌調節関連の遺伝子およびタンパクの変化が、初期より発現している可能性を示唆するものである。また遅発影響量で性的二型核に変化が認められことは、新生児期 EE 曝露がサージジェネレーターだけでなく、パルスジェネレーターにも影響している可能性を示唆している。今後は、ゴナドトロピン放出因子の上位にあり、ER に感受性のあるキスペプチンニューロンの遺伝およびタンパクの変化について両ジェネレーターともに解析を進める予定である。

6) 今回の研究では、遅発影響の当初の標的として予想していた神経内分泌系だけでなく、エストロゲン依存性の各臓器へも遅発影響の直接作用を示唆する結果が得られた。すなわち雄型乳腺組織の発現、性成熟前からの卵巣の異常、子宮腺および ER 感受性の変化等である。次年度は、これらの変化の機序について、さらに検討を進める予定である。

また本研究では、新生児期曝露の投与経路による遅発影響の感受性差について、興味ある知見が得られた。すなわち、臨界期における遅発影響の感受性：臨界期では単回皮下投与より反復経口投与の方が鋭敏である可能性が示唆された。

E. 結論

本年度の研究結果より、さらに多くの遅

発性影響の指標が検出された。性周期異常および雄型乳腺の発現は長期観察を要するものの、遅発影響指標としての感度は高いものであった。また遅発影響発現の機序については、上位中枢の内分泌機構が初期より変化しているだけでなく、卵巣、乳腺等エストロゲン関連臓器も新生児期曝露により直接的に影響を受け、遅発影響発現に関与している可能性も考えられた。一方で生後の神経新生や神経行動に遅発影響は認められなかった。

平成 24 年度は、さらに機序解明に向けて初期変化と指標についての解析を進めることにより、機序解明を行う予定である。

F. 研究発表

F-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) 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.
- 3) 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. *ToxicolPathol.*, 2011, 39 (5): 823-834.
- 4) Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A.: Differential

stimulation pathways of progesterone secretion from newly formed corpora lutea in rats treated with ethylene glycol monomethyl ether, sulphiride, or atrazine. *Toxicol Sci.* 2011 121:267-78.

- 5) 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.*, 85(9), 1109-1120, 2011.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Taketa Y, Inomata A, Hosokawa S, Sonoda J, Hayakawa K, Nakano K, Momozawa Y, Yamate J, Yoshida M, Aoki T, Tsukidate K.: Histopathological characteristics of luteal hypertrophy induced by ethylene glycol monomethyl ether with a comparison to normal luteal morphology in rats. *Toxicol Pathol.* 2011 39:372-80. 2010.

F-2.学会発表

- 1) Mariko Shiorta, Jun Kawashima, Tomohiro Nakamura, Yuko Ogawa, Kinji Shiota: 51th Annual Meeting Society of Toxicology (Poster presentation) Effects of neonatal exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on the puberty of female rats. March 2012 (San Francisco, USA)
- 2) 高橋美和, 松尾沙織里, 井上薫, 田村圭, 入江かをる, 小川久美子, 吉田緑: Ptch1 ヘテロノックアウトマウスを用

いた髄芽腫早期誘発モデルの確立: 第28回日本毒性病理学会 (2012.2)

- 3) 林 清吾、井上 薫、高橋 美和、武田 賢和、松尾 沙織里、渡辺 元、田谷 一善、鈴木 浩悦、西川 秋佳、吉田 緑: Dibromoacetic acid 投与によるラット卵巣への影響(第28回日本毒性病理学会総会および学術集会, 2012.2. 東京)
- 4) 松尾沙織里、高橋美和、井上薫、入江かをる、田村圭、小川久美子、吉田緑 Ptch ヘテロノックアウトマウスにおける髄芽腫の初期変化及び小脳発達に関する検索(第28回日本毒性病理学会総会および学術集会, 2012.2. 東京)
- 5) Yasuyuki Horii, Itsumi Ozawa, Ryo Ohta, Gen Watanabe, Kazuyoshi Taya, Toshiyuki Himi, and Maiko Kawaguchi The characteristics of Hatano high- and low-avoidance rats as a model for developmental disorder 8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (2011年6月2日、名古屋)
- 6) 堀井康行、小澤愛、丹羽鈴夏、橋倉千聖、平野顕宏、太田亮、渡辺元、田谷一善、氷見敏行、川口真以子 雄性 Hatano 高回避系および低回避系ラットの不安・学習能力と養母交換が及ぼす影響 第38回日本神経内分泌学会 (2011年11月25-26日、東京)
- 7) 岡崎祥子、渡辺元、永岡謙太郎、田谷一善: 出生直後のエチニル・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 第16回日本生殖内分泌学会学術集会 平成23年11月 東京都千代田区平河町 2-7-5
- 8) Mariko Shiorta, Jun Kawashima, Tomohiro Nakamura, Yuko Ogawa, Akane Hara, Ayaka Kobayashi, Kinji Shiota, Midori Yoshida: World Congress on Reproductive Biology (Poster presentation) Delayed effects of low-dose Ethynylestradiol Treatment on Neonatal Female Rats.

- October 2011 (Canines, Australia)
- 9) 高橋美和, 井上薫, 林清吾, 松尾沙織里, 森川朋美, 入江かをる, 小川久美子, 吉田緑: 17 α -ethynylestradiol (EE) の新生児期単回曝露による性周期への影響: (第 38 回日本トキシコロジー学会, 2011. 7. 横浜)(同学術年会 優秀発表賞授与)
- 10) 代田 眞理子, 川嶋 潤, 中村 知裕, 小川 祐布子, 小林 綾佳, 原 茜, 吉田 緑: 第 36 回日本トキシコロジー学会 (口頭発表) 雌ラット新生児期におけるエチニルエストラジオール(EE)曝露の長期的影響 2011 年 7 月 (横浜)
- 11) Midori YOSHIDA, Seigo HAYASHI, Yoshikazu TAKETA, Kaoru INOUE, Miwa TAKAHASHI, Saori MATSUO, Gen WATANABE, and Yoshikazu TAYA : Inhibitory Effects of PPAR gamma on Follicle Rupture at Ovulation in Rats : (30th Annual Meeting of Society of Toxicologic Pathology, 2011. 6. Denver USA)
- 12) 川口真以子, 諸星佳織, 渡辺元, 堀井康行, 田谷一善, 森田昌敏, 今井秀樹, 加藤進昌, 氷見敏行: Maternal isobutyl-paraben induce obesity in female rats 第 87 回日本生理学会 (2011 年 5 月 20 日、盛岡)
- 13) 丹羽鈴夏, 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 橋倉千聖, 布目唯, 市川千穂, 小澤愛, 堀井康行, 渡辺元, 田谷一善, 氷見敏行: Hatano 高回避(HAA)系および低回避(LAA)系雄ラットの不安・社会性行動 第 131 回日本薬学会 (2011 年 3 月、静岡、東日本大震災により大会中止)
- 14) 橋倉千聖, 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 丹羽鈴夏, 遠藤萌, 篠原理美, 外川哲也, 嶋田努, 油田正樹, 氷見敏行:
- Hatano 高回避系 (HAA) および低回避系 (LAA) 雌ラットの一般・不安行動 第 131 回日本薬学会 (2011 年 3 月、静岡、東日本大震災により大会中止)
- 15) 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 丹羽鈴夏, 橋倉千聖, 堀井康行, 渡辺元, 田谷一善, 氷見敏行 Social interaction and anxiety-related behaviors in intact Hatano High- and Low-Avoidance rats 第 151 回日本獣医学会学術集会 (2011 年 3 月、東京、東日本大震災により大会中止)

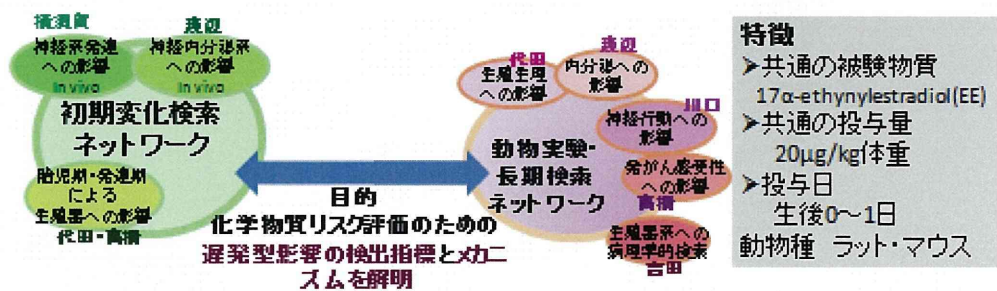
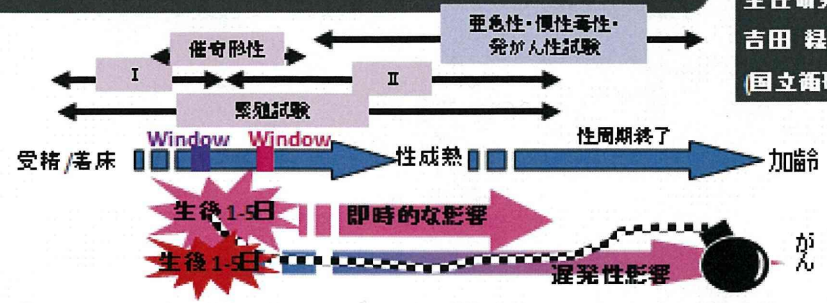
G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

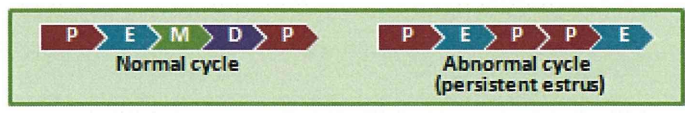
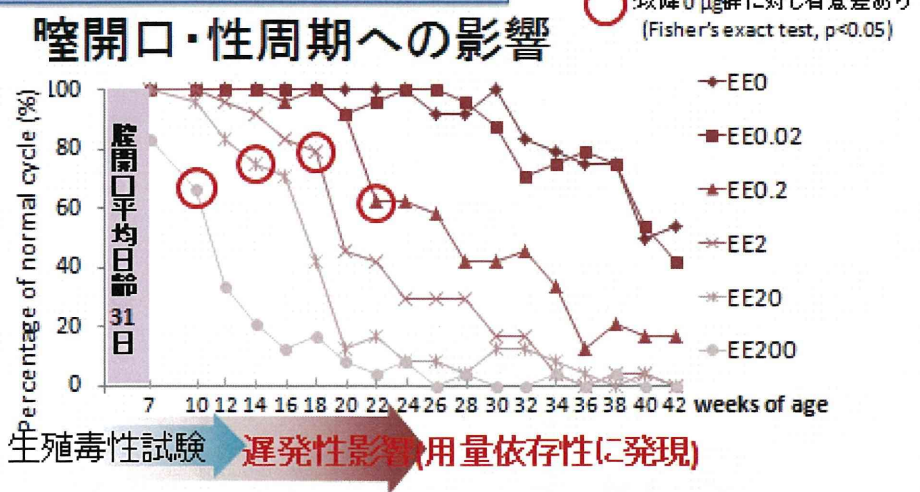
課題番号 H22-北字-一般-003
 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)研究
**化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす
 遅発型影響の機序解明と指標の確立に関する研究**



主任研究者
吉田 経
 (国立循研・病理)

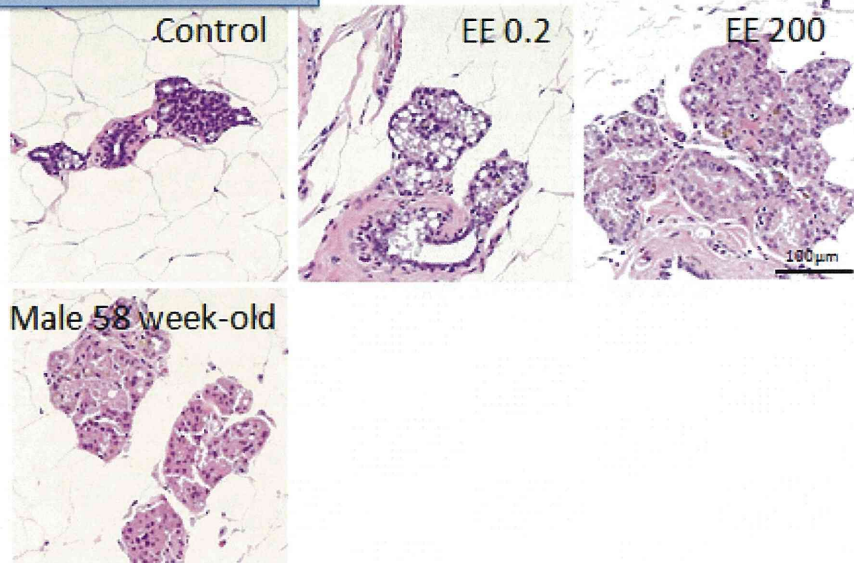


長期観察による指標 1



長期観察による
指標 2

— 乳腺・生殖器形態異常 —
乳腺腺房の男性化(10ヶ月齢)



長期観察による指標(性成熟後) 神経への影響

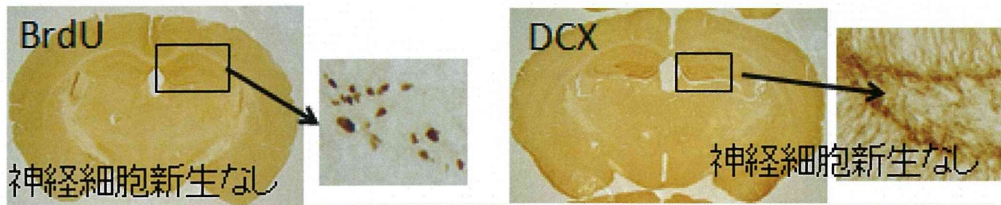
遅発影響なし?

新生児期EE暴露と神経行動

試験	処置・週齢	20 ug/kg EE	2 mg/kg EE
オープンフィールド	無処置・6	不安↓	不安↓↓
社会性認知	無処置・7		
明暗行動	無処置・8		
受動回避学習	無処置・8	学習↓	
新奇物体認知	OVX・12	?	?
性選好性・性行動	OVX+EB+P・13~15	遅発影響誘発量	↓↓
高架十字	OVX・15~16	不安↑	即時型雄化誘発量



海馬(高次脳機能に關与) 齒状回における成体神経新生への影響

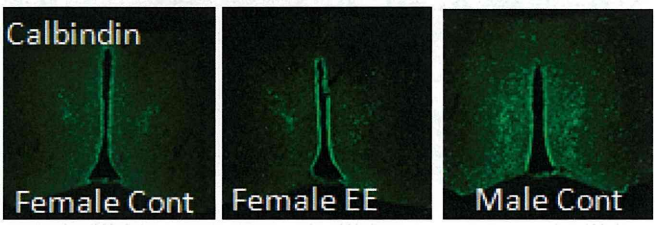


いずれも遅発影響なし (EE 20ug/kg群)



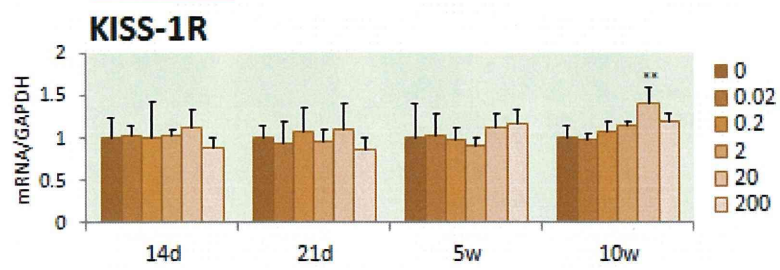
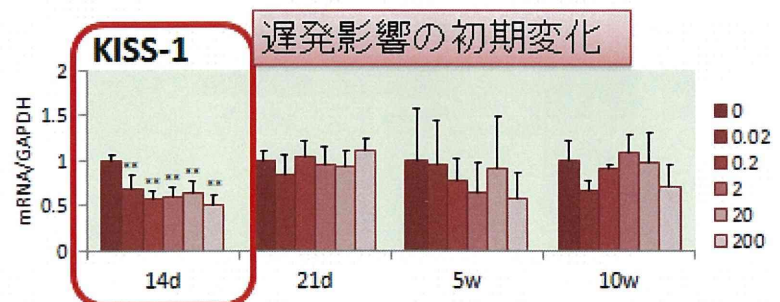
嗅球(感覚機能に關与)の成体神経新生
海馬における神経新生の補助的な指標
影響なし

内側視束前野 (SDN-POA) (生殖機能に關与)



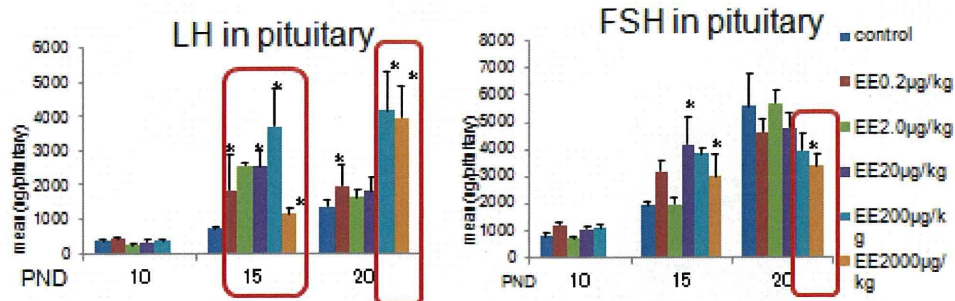
初期変化 1

視床下部 遺伝子解析



初期変化 2

下垂体中ホルモン含有量

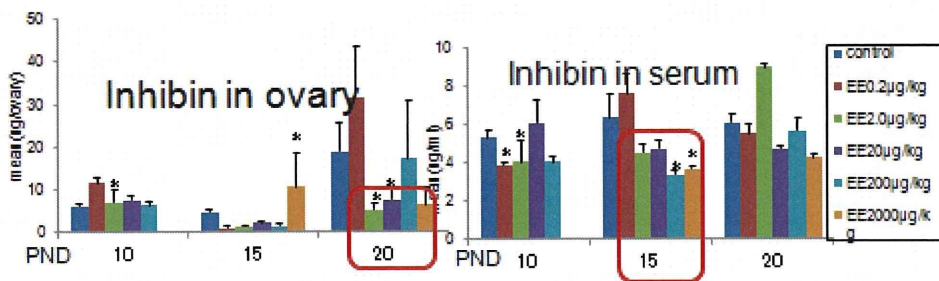
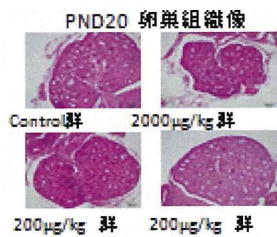
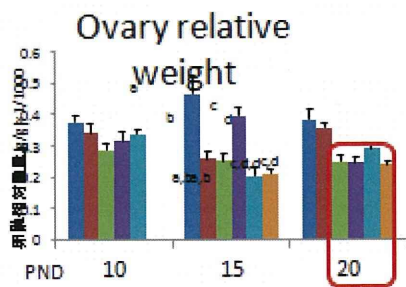


⇒ LH含有量の上昇(PND15~)
⇒ ネガティブフィードバックの減少

⇒ FSH含有量の低下(PND20)
⇒ 視床下部の雄性化

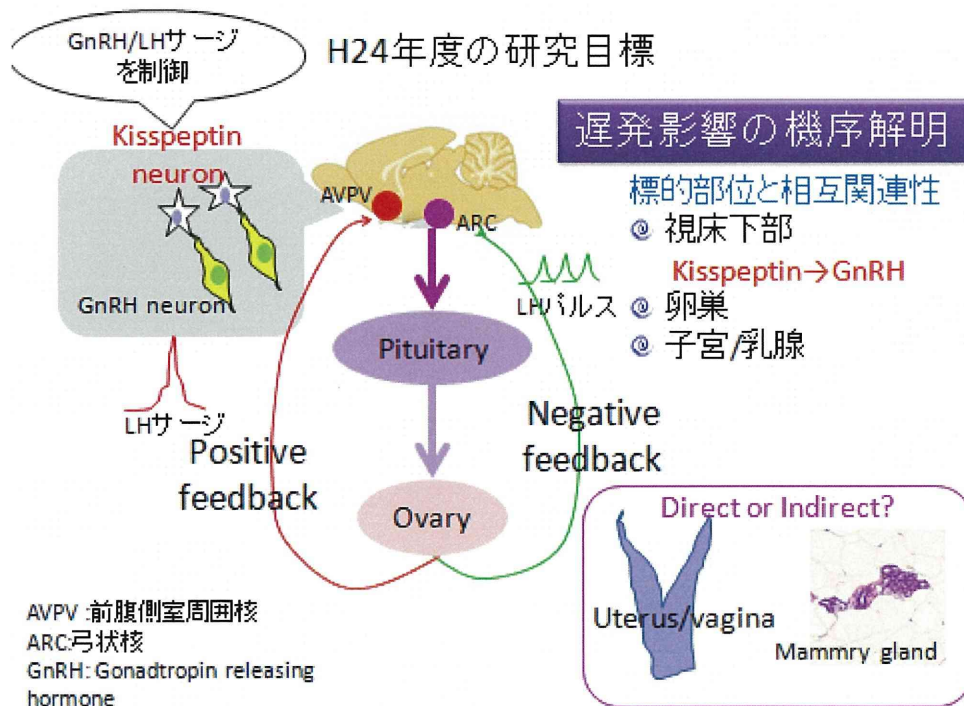
初期指標 3

卵巢⇒形態・機能的な卵胞発育不全



平成22および23年成果概要(長期指標と初期変化)

指標	EE(ug/kg)	発現時期	標的/発生機序
長期指標			
性周期早期異常	0.2~	22w	視床下部GnRH?
乳腺雄化	0.2~	10M	乳腺direct?
子宮ER発現異常	20~	10M	子宮エストロゲン受容体 direct?
乳汁分泌亢進	0.4x5(oral)	8M	乳腺プロラクチンdirect?
初期変化			
視床下部遺伝子変化	0.2~	PND14	視床下部GnRH?
Gonadotropin異常	2~	PND15?	視床下部GnRH?
卵巣形態・インヒビリン変化	2~	PND20	視床下部・卵巣direct?
子宮腺数減少	20~	3w	視床下部GnRH/子宮direct?
エストロゲン活性	0.02~	3w/adult	



II. 分担研究者報告