

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

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について、本研究の標準物質として選択した共通物質であるエチニルエストラジオール（EE） $20\mu\text{g/kg}$ 体重を用いて検討した。本年度は、遅発影響がエストロゲン受容体(ER) α 、 β 何れを介して生ずるのかそれぞれのアゴニスト(ER α agonist, PPT; ER β agonists, DPN)を EE と同様の方法で新生児期に投与し、性成熟時期、エストロゲン感受性と性周期の変化について検索した。その結果、性成熟時期、子宮肥大試験による in vivo エストロゲン感受性は PPT/DPN とともに変わらなかったが、性周期の PPT 1000mg/kg 体重群は持続発情の早期に発現し、その時期は EE $20\mu\text{g/kg}$ 体重群と同様であった。これらの結果より、エストロゲン受容体(ER) α を介して遅発影響が生じていること、EE $20\mu\text{g/kg}$ 体重以上の新生児期曝露により、生殖器のエストロゲンに対する感受性が変化している可能性が示唆された。また、基礎検討として卵胞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。Decabromotic acid(DBA)を成熟雌ラットに強制経口投与し、卵胞発育への影響を観察した。その結果、発情期が2日間持続する異常な性周期が認められた。病理組織学的検索により DBA 投与群では卵巣/子宮の形態から判断した性周期と、膣・膣スメアからみた性周期の不一致が認められた。ホルモン測定では、発情前期の EE の低値傾向が示され、卵胞におけるステロイド合成の阻害の可能性が示唆された。この結果より、膣スメアだけでなく、生殖器の詳細な形態観察が、DBA の生殖器毒性検出に重要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发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にし、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、子宮や卵巣などエストロゲン依存性臓器全般に及ぶ可能性がある。そこで本年度は、遅発影響がエストロゲン受容体(ER) α 、 β 何れを介して発現するか検討した。

また毒性学的に不明な点も多い卵巣毒性に対する基礎検討として、昨年に引き続き卵胞の正常発育に対する修飾因子について成熟雌ラットを用いた検討した。

B. 研究方法

B-1. 遅発影響発現とエストロゲン受容体(ER) α 、 β との関連性

本研究の共通物質としてエストロゲンである EE を昨年同様選択し、さらに本年度は、遅発影響を性成熟後比較的短期間で誘発する量として 20 μ g/kg 体重を本研究の共通投与量として選択し、生後 24 時間以内の Crj:Donryu ラットに EE200 および 20 μ g/kg 体重を単回皮下投与した。また、遅発影響がエストロゲン受容体(ER) α 、 β 何れを介して生ずるのかそれぞれのアゴニスト(ER α agonist, PPT; ER β agonists, DPN)を EE と同様の方法で新生児期に投与した。文献より PPT および DPN 投与量は 100 および 1000 μ g/kg 体重の 2 用量を設定した。

これらの動物を 5 ケ月齢まで飼育し、エストロゲン感受性(生後 3 週齢における子宮肥大試験)、性成熟時期(膣開口時期)と性周期の変化(膣スメア観察による)について検索した。子宮肥大試験は、各群 10 匹の 21 日齢の雌ラットに、EE2 μ g/kg 体重および vehicle である sesami oil(各群 5 匹/群)を 3 日間皮下投与し、24 日齢に剖検して in vivo エストロゲン活性を子宮重量として測定した。実験計画を図 1 に示す。

B-2. 成熟ラット卵胞に対する DBA の修飾作用

8~10 週齢の BrlHan:WIST@Jcl(GALAS) 雌ラットに水道水の消毒副生成物として生じるハロ酢酸類の 1 種である decabromotic acid (DBA) を 0 及び 250mg/kg bw/day の用量で 4、8、16、28 日間(性周期 1、2、4 及び 7 サイクルとして)強制経口投与し、膣スメアによる性周期の確認を毎日実施した。投与終了後に剖検し、卵巣の形態学的変化及び血中ホルモン濃度を検索した。

(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. 遅発影響発現とエストロゲン受容体(ER) α 、 β との関連性

EE200 および 20 μ g/kg 体重群では対照群と比較し、体重増加に有意な差は認められなかった。

子宮肥大試験の結果を図 2 に示す。vehicle 群では EE、PPT、DPN いずれについても子宮重量に差は認められなかった。しかし、EE 投与後の子宮重量は EE 投与群で低値経口を認められた。

膣開口日を図 3,4 に示す。平均膣開口日は EE 両群で有意に早く、開口日の体重についても EE 両群ではその他の群と比較し少なかった。

性周期の変化を図 5 に示す。異常性周期である持続発情が EE200 μ g/kg 体重群で 10 週齢より増加し、17 週では全例が持続発情となった。EE20 μ g/kg 体重および PPT1000 μ g/kg 群では 15 週齢より持続発情が出現し試験終了時には約 40%の動物が持続発情を示した。

DPN および PPT100 μ g/kg 群は対照群と同様の値で推移した。

C-2. 成熟ラット卵胞に対する DBA の修飾作用

性周期の異常は投与 4 日後では認められなかったが、投与 8~28 日では不規則な性周期を示した。しかし、性周期が停止する個体はほとんど認められなかった。投与による卵巣の形態への影響は投与 4 日後では認められなかったが、投与 8 及び 16 日後では膣スメア像による性周期と卵巣・子宮の形態像が一致しない個体が認められ、投与 16 日後には黄体化嚢胞が低頻度ながら観察さ

れた。投与 28 日後ではさらに多くの個体で膣スミア像と卵巣・子宮の形態像が一致せず、大型閉鎖卵胞の増加が認められた。ホルモンアッセイでは、投与 28 日後において発情前期の FSH の上昇及び Progesterone、E2 の低下が認められた。以上の結果より、DBA は卵胞の発育に影響を与える可能性が示唆された。

D. 考察

遅発影響発現とエストロゲン受容体(ER) α 、 β との関連性の結果より、

- 1) ER α アゴニストである PPT 投与群のみにもっとも感受性の高い長期指標である性周期の早期異常が観察され、ER β の DPN には認められなかったことから、遅発異常はエストロゲン受容体(ER) α を介して生じている可能性が強く示唆された。
- 2) EE20 μ g/kg 体重以上の新生児期曝露により、生殖器のエストロゲンに対する感受性が変化している可能性が示唆された。
- 3) 遅発影響に対する PPT の感受性は、EE より弱く EE20 μ g/kg と PPT1000 μ g/kg がほぼ同様であると考えられた。

また、成熟ラット卵胞に対する DBA の修飾作用の結果より、DBA は卵胞の発育に影響を与える可能性が示唆された。

E. 結論

これらの基礎検討より、エストロゲン受容体(ER) α を介して遅発影響が生じていること、EE20 μ g/kg 体重以上の新生児期曝露により、生殖器のエストロゲンに対する感受性が変化している可能性が示唆された。

また、DBA は卵胞の発育に影響を与える可能性が示唆され、ホルモンや詳細な形態学的検討を組み合わせることで、ラットの卵胞の修飾因子を検出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.: 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(2):267-78.
- 2) 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(2):372-80.
- 3) Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A.: The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions. *Exp Toxicol Pathol.* 2011 Feb 21.
- 4) 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.

2. 学会発表

- 16) 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)
- 17) 林 清吾、井上 薫、高橋 美和、武田 賢

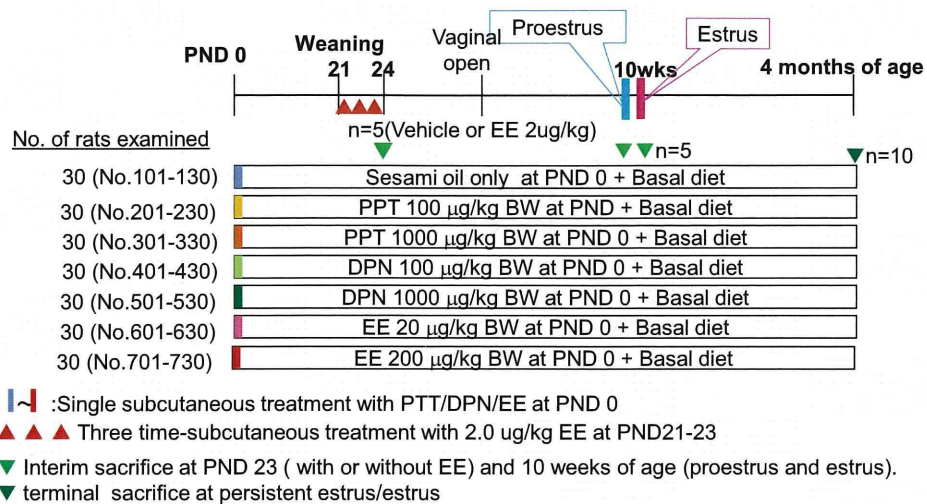
和、松尾 沙織里、渡辺 元、田谷 一善、
鈴木 浩悦、西川 秋佳、吉田 緑:

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)

- 18) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし



Chemicals:

PPT (Estrogen receptor alpha agonist), 4, 4', 4'' - (4-prophyl-[¹H] -pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenil ;

DPN(Estrogen receptor beta agonist), diarylpropinilrile ; EE, 17 alpha-estradiol

Experimental design

図1 実験計画

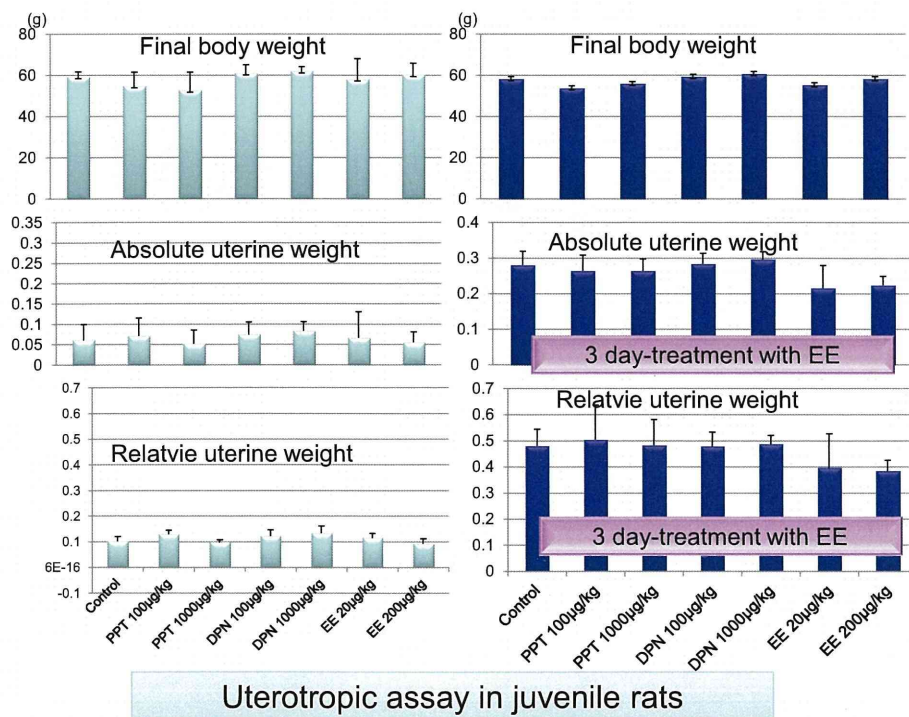


図2 in vivoエストロゲン活性(子宮肥大試験)

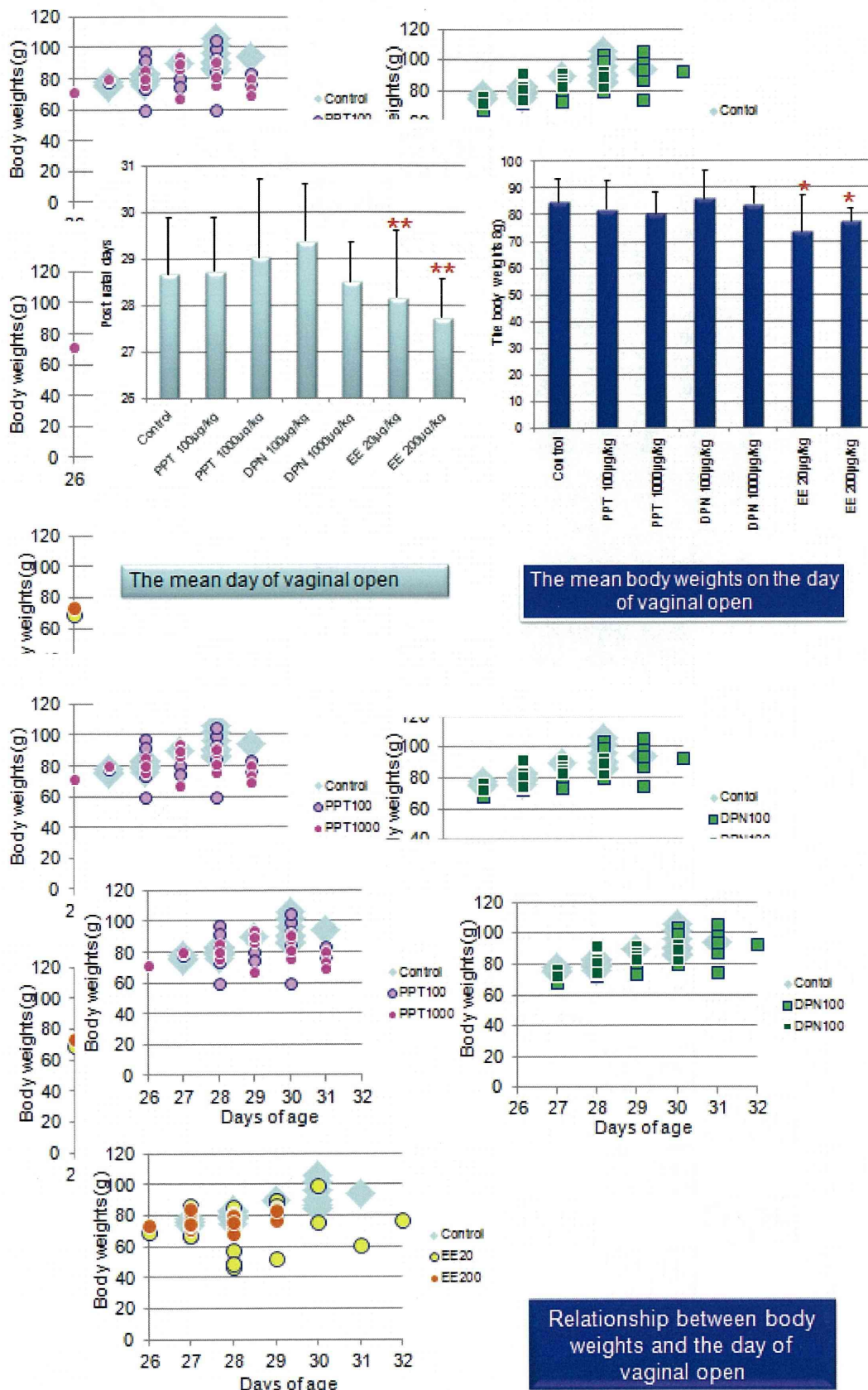


図4 膣開口日の体重

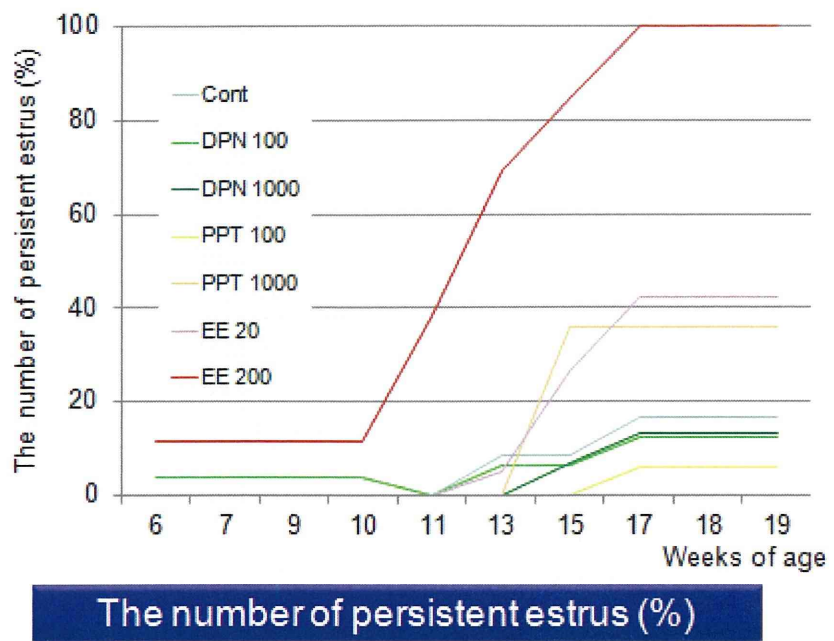


図5 持続発情の発生頻度

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。前年度に観察された性周期変調の機序を明らかにするために、視床下部の遺伝子発現解析、性ホルモン濃度測定、多卵性卵胞や子宮における ER α の発現について検索した。また、長期影響の評価として最終解剖群の下垂体、乳腺の組織学的検索を実施した。性成熟後の血清性ホルモン濃度に群間差はなく、卵巢組織にも投与による変化が認められなかったことから、性周期変調の原因として視床下部の排卵中枢の異常が推察された。視床下部全体において、生後 14 日に Kiss-1 mRNA の発現が EE 投与全群で有意に低下し、Kiss-1 遺伝子産物であるキスペプチンが遅発性影響の原因因子の一つである可能性が示唆された。EE の新生児期曝露は遅発性影響として下垂体、乳腺の増殖性病変の発生に影響しないが、子宮や乳腺に直接影響し分化異常を生じることが示された。

A. 研究目的

脳の性分化の臨界期は、ラットの場合、出生前後 5 日頃といわれており、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⁸⁾。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、その発現機序についても不明の点が多く残されている。

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機序解明と評価に必要な指標の確立を目指し、新生児期に 17 α -ethynylestradiol (EE)に曝露された雌ラットについて、長期飼育後の雌性生殖器への影響を検索した。前年度は、新生児期における EE 0~200 μ g/kg の単回曝露は性成熟には大きく影響しないが、0.2 μ g/kg 以上で遅発性影響として性周期の変調を来すことを示した。今年度はその機序

を明らかにするため、視床下部の遺伝子発現解析、性ホルモン濃度測定、多卵性卵胞や子宮における ER α の発現について検索した。また、長期影響の評価として最終解剖群の下垂体、乳腺の組織学的検索を実施した。

B. 研究方法

B-1. 動物実験

妊娠 14 日齢の Wistar Hannover GALAS ラット（日本クレア、東京）70 匹を 6 群に分け、出産後 24 時間以内の新生児に sesame oil に溶解した 17 α -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA, CAS No. 57-63-6) 0 (コントロール)、0.02, 0.2, 2, 20, 200 μ g/kg を 1 回皮下投与した。

子宮発がんを誘発するため、生後 9 週に *N*-ethyl-*N'*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine (ENNG, Nacalai Tesque, 京都) 20mg/kg を全匹子宮内投与した。実験期間中は定期的に体重を測

定し、臨床症状の観察を行った。

生後 14, 21 日, 34 日および 10 週に各群 5 匹の動物を途中解剖した。10 週では膣スメア検査により生後 68 日以降に発情期を迎えた日に解剖を行った。各群 4 匹については断頭採血後、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、乳腺、卵巣、子宮、膣を摘出した。脳から視床下部のみを切り出し、液体窒素で急速凍結した。また、右卵巣、右子宮角も凍結し、 -80°C で保存した。各群 1 匹についてはエーテル麻酔下で径心臓的にヘパリン加生理食塩水を灌流後、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を灌流した。摘出した脳を 4%PFA で、 4°C 、一晚固定し、30% スクロース PBS に置換後、OTC コンパウンド (サクラファインテック、東京) で包埋した。

最終解剖においても、性周期を回帰している動物については 10 カ月齢以降に発情期を迎えた日に解剖を行った。各群 22 匹については断頭採血後、脳、下垂体、甲状腺、胸腺、肝臓、副腎、乳腺、卵巣、子宮、膣を摘出した。各群 8 匹は視床下部および右卵巣を凍結保存した。また、各群 2 匹は途中解剖と同様に脳の灌流固定を行なった。

脳および凍結保存組織を除き、摘出した臓器は 10% リン酸緩衝ホルマリンで固定した。定法に従ってパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し鏡検した。

B-2. 視床下部の遺伝子発現解析

視床下部・下垂体・性腺軸の制御に関与すると考えられる遺伝子について、生後 14, 21, 34 日および 10 週齢の視床下部における mRNA 発現を検討した。凍結組織より Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) により抽出した total RNA $2\mu\text{g}$ を用いて、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応を行い、ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene

Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914_ml, KISS1 receptor (Kiss1r): Rn00576940_ml, gonadotropin-releasing hormone 1 (GnRH1): Rn00562754_ml, estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372_ml, estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610_ml, cytochrome P450, family 19, subfamily a (Aromatase): Rn00567222_ml。内部標準には、発達段階の視床下部において変動が少ないと報告されている GAPDH を使用した⁷⁾。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。

B-3. 性ホルモン濃度の測定

凍結保存した血清を用いて、ラジオイムノアッセイ (RIA) 法により測定した。LH および follicle-stimulating hormone (FSH) の測定には National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) から提供された RIA キットを用いた⁵⁾。P4 および estradiol- 17β (E2) はエーテルによる抽出後、田谷らの方法に従って測定した⁶⁾。今年度は、生後 14, 21 日における LH および FSH と、生後 34 日 10 週における LH, FSH, E2 および P4 について測定を行った。

B-4. ER α の免疫染色

途中解剖群の子宮 (各群 4 例) のホルマリン固定材料を用いて、ER α 抗体 (sc-7207, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) による免疫染色を行った。抗原抗体反応前の抗原賦活化処置としてマイクロウェーブ処理を 98°C 、10 分行い、二次抗体にはヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (ニチレイ、東京) を使用した。発色は DAB を用いた。子宮内膜上皮、子宮腺上皮および間質細胞における ER α の発現態度について観察した。

B-5. 統計学的解析

遺伝子発現解析および性ホルモン濃度の測定結果は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較検は Dunnett の方法で 0 µg/kg 群との間で有意差検定を行った。病理組織学的変化については発生頻度を Fisher の直接確率法で検定した。

(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. 多卵性卵胞の発生頻度

生後 14 日～10 週の卵巣における多卵性卵胞について観察した結果、コントロールを含む全ての群で少数みられ、EE 投与による影響は認められなかった (図 1)。

C-2. 視床下部の遺伝子発現解析

生後 14 日において Kiss-1 mRNA の発現が EE 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 の発現は一部で統計学的に有意な変動がみられたが、いずれの時点においても投与に起因する変動は認められなかった (図 2)。

C-3. 血清中の性ホルモン濃度

生後 14 および 21 日における FSH, LH 濃度を図 3 に示す。生後 14 日において、2 µg/kg 以上で FSH 濃度が低い傾向がみられたが、LH 濃度に群間差は認められなかった。生後 21 日では、EE 投与群において FSH 濃度が高い傾向がみられたが、FSH, LH とともにばらつきが大きく 0 µg 群に比べ有意差は認められなかった。

生後 34 日および 10 週では、FSH, LH, E2,

P4 濃度に群間差は認められなかった (図 4, 5)。

C-4. 発達期の子宮における ER α 発現

ER α 免疫染色による染色態度は、生後 14, 21 および 34 日では群間差は明らかではなかった。10 週では、コントロール群では内膜上皮および間質細胞が陽性を示すのに対し、200 µg/kg 群では内膜上皮、間質ともに大部分の細胞が陰性であった (図 6)。

C-5. 下垂体・乳腺における長期影響

10 か月齢では下垂体前葉における過形成、腺腫、腺がんの発生率に群間差は認められなかった (表 1)。多くの個体において乳汁分泌亢進が観察されたが、その程度に群間差はみられなかった。20µg/kg のみで atypical hyperplasia の発生頻度が有意に増加した (表 2)。0.2 µg/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 (図 7)。

D. 考察

前年度は、新生児期における EE 0～200 µg/kg の単回曝露は性成熟には大きく影響しないが、0.2 µg/kg 以上で遅発性影響として性周期の変調を来すことを示した。性周期の変調を示す動物は持続発情を示し、排卵停止状態にある。今年度は遅発性影響として排卵停止を起こす機序および性周期変調の長期影響について検索を進めた。

生後 14 日～10 週の卵巣において、多卵性卵胞は全ての群で少数観察された。マウスでは、新生児期の DES 投与で多卵性卵胞の増加が報告されているが²⁾、本検索では多卵性卵胞の発生頻度に EE 投与による影響を認めず、偶発的な所見と考えられた。

視床下部の遺伝子発現解析では、Kiss-1 のみが変動を示し、生後 14 日において EE 投与全群で対照群と比較して有意に低下していた。新生児期のエストロゲン様物質曝露で視床下部における Kiss-1 mRNA の発現が低下することが報告されており³⁾、本検

索で認められた変化も EE 曝露により引き起こされた可能性が考えられる。Kiss-1 遺伝子産物であるキスペプチンは、生殖機能制御を司る神経ペプチドであり、EE による遅発性影響の原因因子の一つになり得ることが示唆された。一方、キスペプチンの発現は視床下部の中でも弓状核 (ARC) と前腹側室周囲核 (AVPV) に限局しており、エストロゲンによってそれぞれ反対の制御を受ける¹⁾。また、発達過程や性周期によっても発現量が変動することが報告されている⁴⁾。今回は ARC および AVPV をまとめて解析したため、それぞれの部位による発現変動は明らかではない。生後 14 日における発現低下の意義や排卵制御の異常をより明確にするため、今後は排卵中枢と考えられている AVPV に特異的な遺伝子発現解析が必要と考えられた。

性ホルモン濃度の測定では、生後 14 日において 2 µg/kg 以上で FSH 濃度が低い傾向がみられた。キスペプチンは GnRH を介して FSH, LH 分泌を促進することから、Kiss-1 mRNA 発現低下との関連性が推察されるが、変化がみられた用量は一致していなかった。FSH 濃度の変動はインヒビンや卵胞発育とも密接に関わっているため、インヒビン濃度の測定や卵胞の精査を加えて考察する必要があると考えられる。

生後 34 日および 10 週では、血清性ホルモン濃度に投与による影響は認められなかった。前年度の観察で膈開口の時期に群間差はなく、同時期の卵巢組織にも投与による変化が認められなかったことから、新生児期の EE 曝露は卵巢の成熟や機能には大きく影響しないものと考えられた。したがって、排卵停止を起こす原因には卵巢機能よりも視床下部の排卵中枢の異常が大きく関与していることが推察された。

EE の新生児期曝露は遅発性影響として下垂体の増殖性病変の発生に影響しなかった。乳腺では、20µg/kg のみで atypical hyperplasia の発生頻度が有意に増加したが、増殖性病変の発生頻度に用量依存性はみら

れなかった。一方、0.2 µg/kg 以上で認められた腺房の雄化は⁹⁾、DES の新生児期曝露でも同様の報告がある。子宮においても 200 µg/kg 群で ERα 発現低下が観察され、新生児期における EE 曝露が子宮や乳腺に直接影響を及ぼし分化異常を生じることが示された。

E. 結論

EE の新生時期単回曝露により遅発性に性周期の変調を生じる原因として、卵巢の発育や機能よりも、視床下部の排卵中枢の異常が重要であることが示唆され、その原因因子の候補としてキスペプチンが挙げられた。性周期の変調は下垂体および乳腺の増殖性病変の発生に影響しないが、EE の新生児期曝露が乳腺や子宮に直接影響し分化異常を生じることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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., 39(5), 823-834, 2011.

2. 学会発表

- 1) 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 : 17α-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)
- 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K.: Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev.*, 53, 367-378, 2007.
- 2) Iguchi T, Fukazawa Y, Uesugi Y, Takasugi N.: Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod.*, 43, 478-484, 1990.
- 3) Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M.: Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*, 150, 2359-2367, 2009.
- 4) Takumi K, Iijima N, Ozawa H.: Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci.*, 43, 138-145, 2011.
- 5) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, 69, 265-270, 1983.
- 6) Taya K, Watanabe G, Sasamoto S.: Radioimmunoassay for progesterone, testosterone, and estradiol-17 β using ¹²⁵I-iodohistamine radioligands. *Jpn J Anim Reprod.*, 31, 186-197, 1985.
- 7) Walker DM, Juenger TE, Gore AC.: Developmental profiles of neuroendocrine gene expression in the preoptic area of male rats. *Endocrinology*, 150, 2308-2316, 2009.
- 8) Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A.: Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicol Pathol.*, 39, 823-834, 2011.
- 9) Yoshikawa T, Kawaguchi H, Umekita Y, Souda M, Gejima K, Kawashima H, Nagata R, Yoshida H.: Effects of neonatally administered low-dose diethylstilbestrol on the induction of mammary carcinomas and dysplasias induced by 7,12-dimethylbenz [a] anthracene in female rats. *In Vivo*, 22, 207-213, 2008.

多卵性卵胞

多卵性卵胞の発生例数

Period	EE (μg/kg)	0	0	0.2	2	20	200
14d	n=5 / group	1	2	0	1	0	0
21d	n=5 / group	0	0	1	0	1 ^a	1
34d	n=5 / group	0	1	1	1	1	0
10wk	n=5 / group	0	0	0	0	1	0 ^b
Total	n=20 / group	1	3	2	2	3	1 ^c

a: 1個体に2個、b: n=4, c: n=19

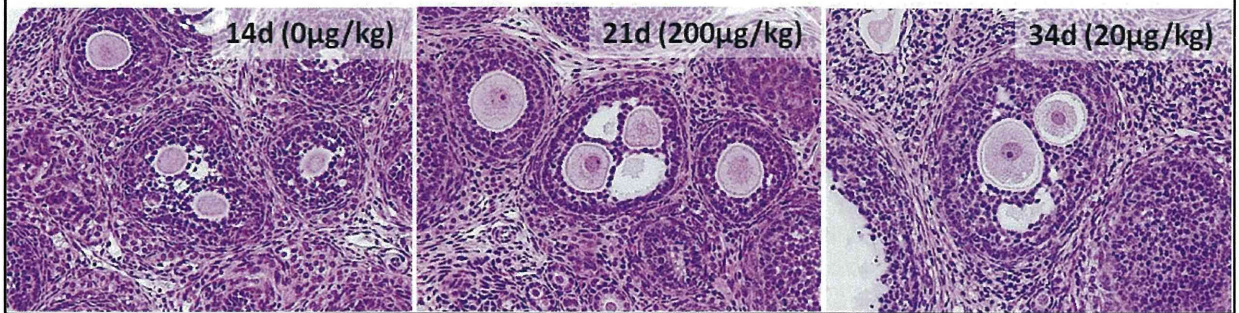


図1. 多卵生卵胞の発生数と組織写真

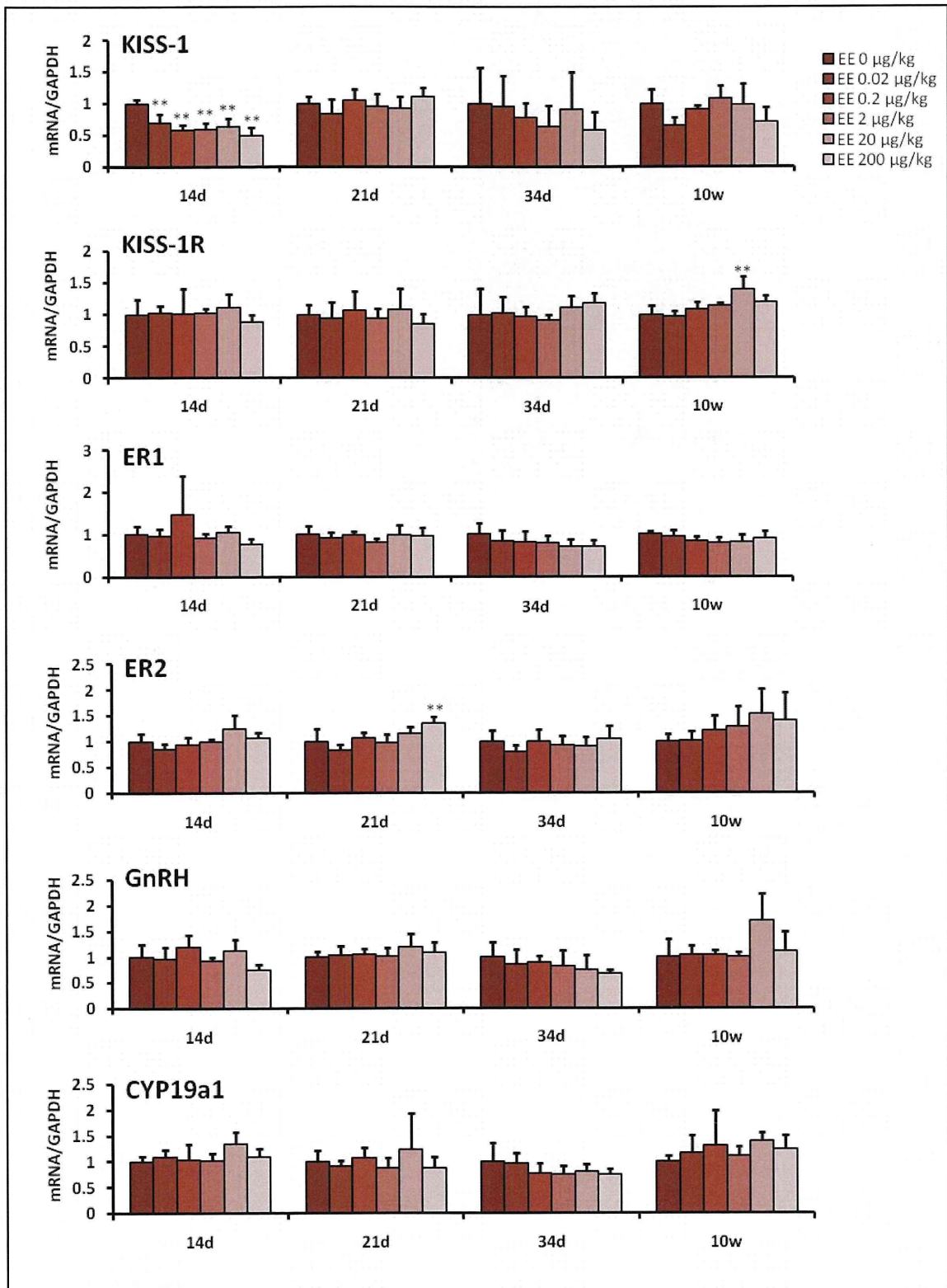


図2. 視床下部におけるKiss-1関連遺伝子のmRNA発現

血清性ホルモン濃度 -14d, 21d-

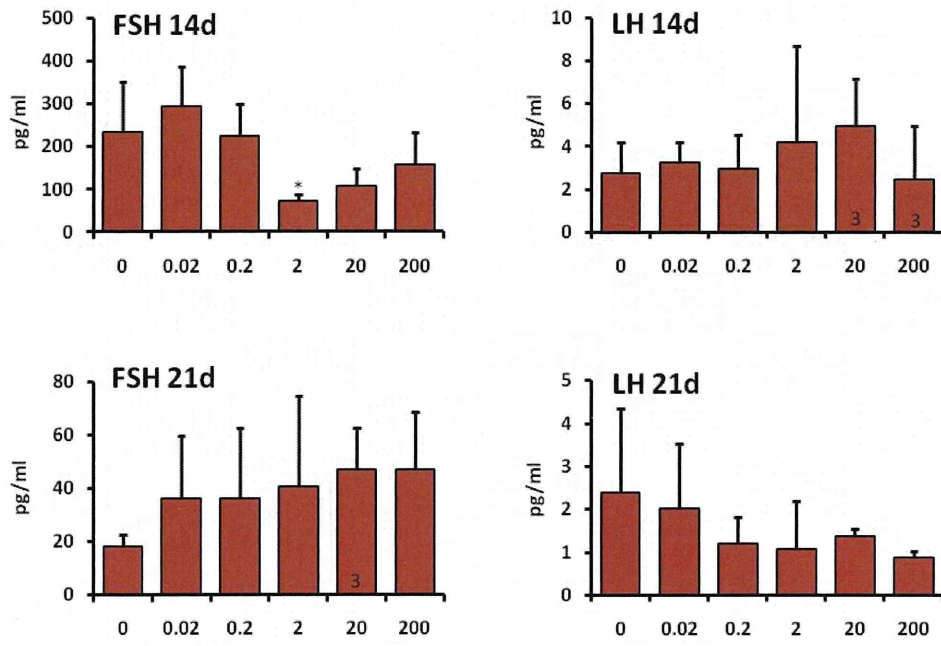


図3. 生後14および21日における血清FSH、LH濃度

血清性ホルモン濃度 -34d-

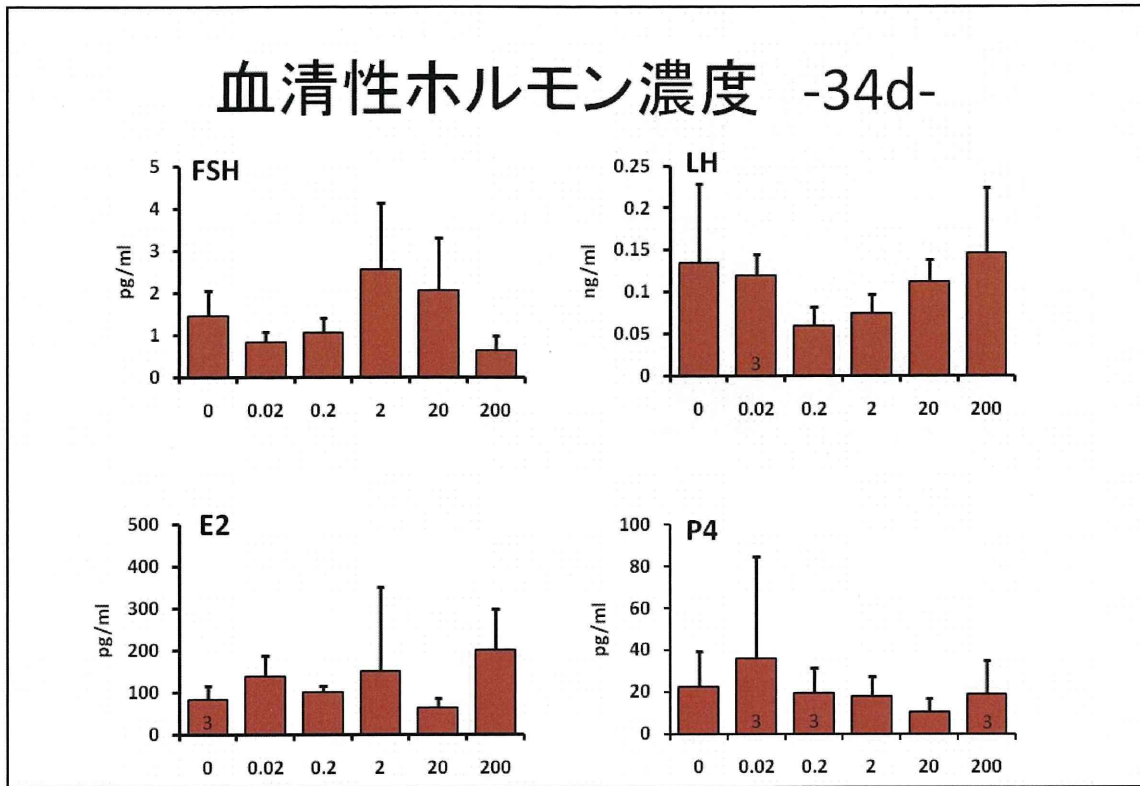


図4. 生後34における血清性ホルモン濃度

血清性ホルモン濃度 -10w-

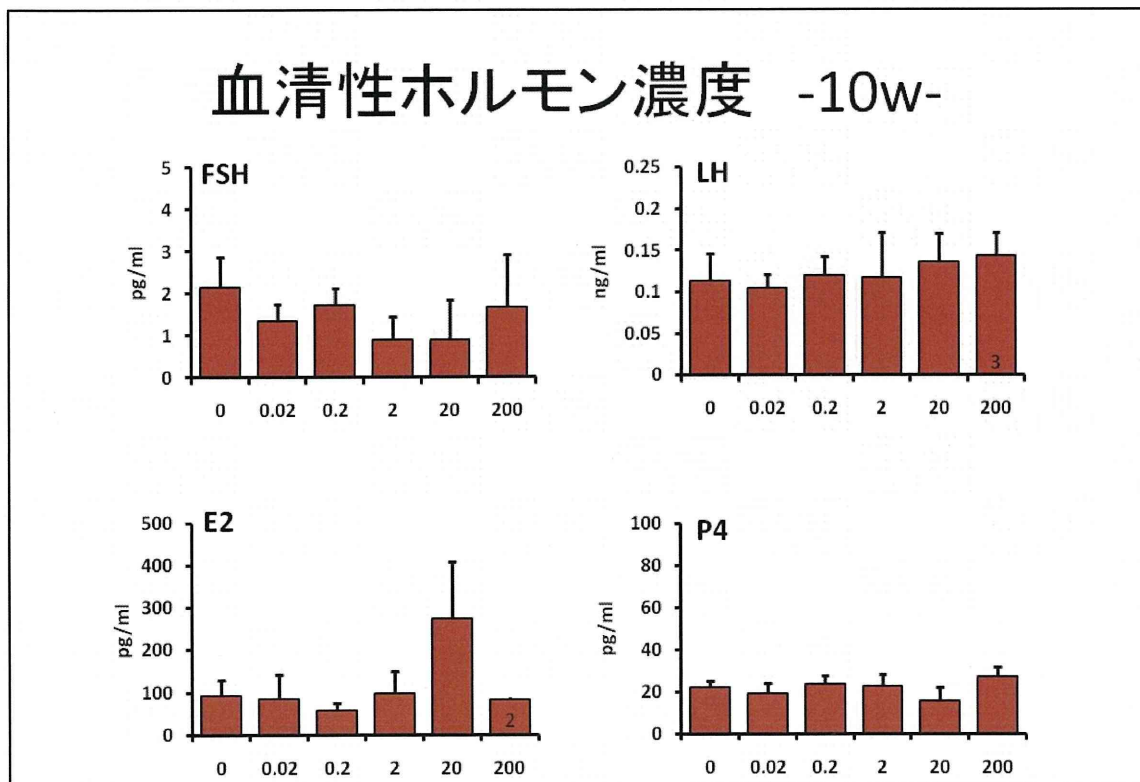


図5. 10週における血清性ホルモン濃度

子宮におけるER α の発現

免疫染色による染色態度

Period	14d		21d		34d		10w		
	EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	200	0	200	0	200	0	200
内膜上皮		—	—	—~+		±		+	—
子宮腺上皮		++		++		++		±	—
間質		+		+		++		+	±

—: 陰性, ±: 弱陽性, +: 陽性, ++: 強陽性

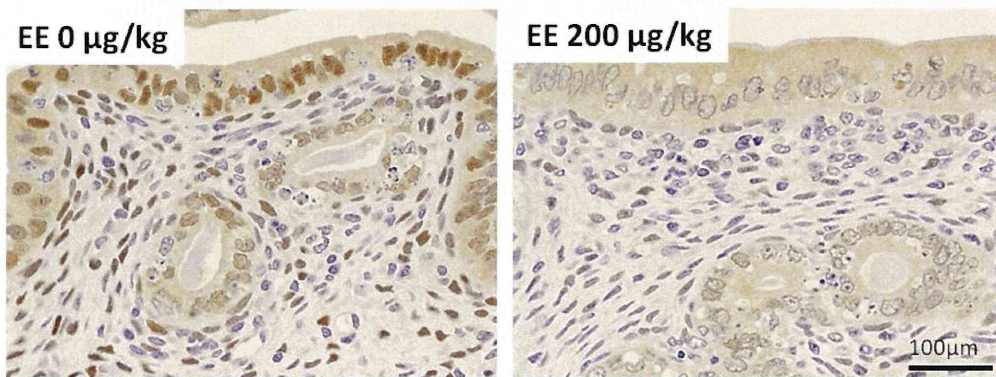


図6. 子宮におけるER α の発現

表1. 10カ月齢における下垂体前葉の増殖性病変

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined	23	22	23	24	24	24
Hyperplasia	6 (26%)	2 (9%)	6 (26%)	9 (38%)	9 (38%)	8 (33%)
Adenoma	1 (4%)	0	0	1 (4%)	1 (4%)	0
Carcinoma	0	1 (5%)	0	1 (4%)	1 (4%)	0

乳腺腺房の男性化

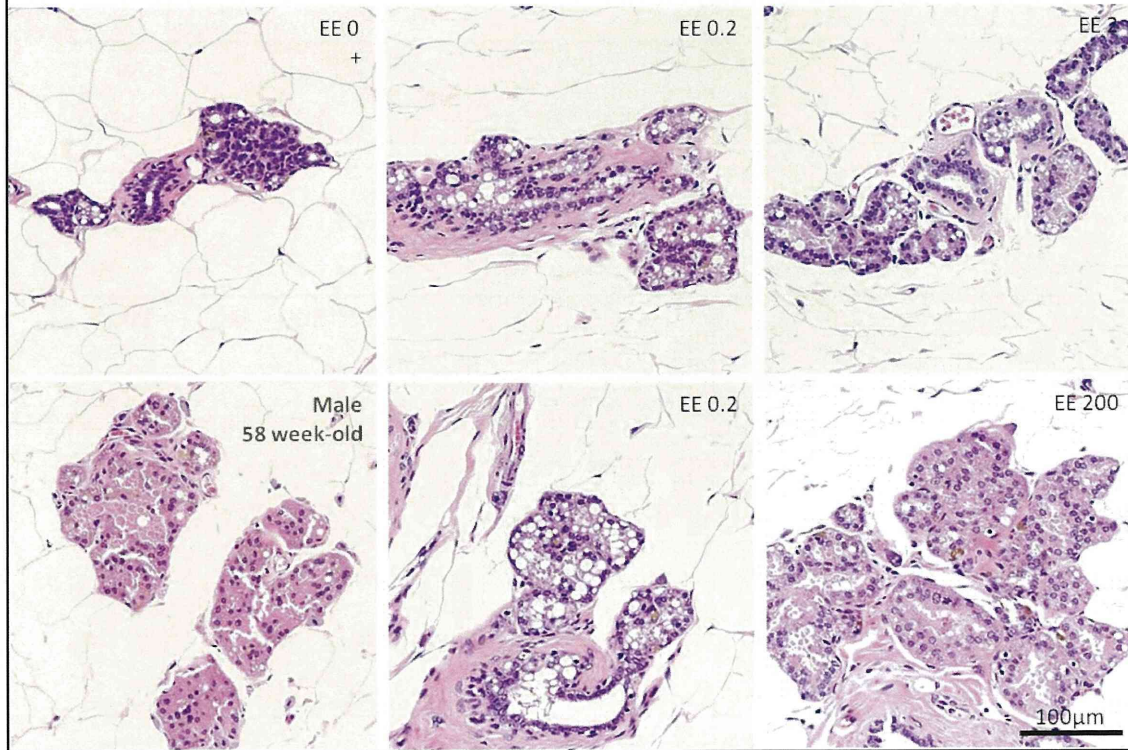


図7. 10カ月齢で認められた乳腺腺房の組織学的変化

表2. 10カ月齢における乳腺の組織所見

	EE (µg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		24	24	24	24	24	24
Increased milk secretion		15 (63%)	18 (75%)	18 (75%)	13 (54%)	17 (71%)	18 (75%)
Grade	(+)	11	16	10	7	7	8
	(++)	2	1	8	6	6	9
	(+++)	2	1	0	0	4	1
Atypical hyperplasia		3 (13%)	2 (8%)	3 (13%)	2 (8%)	11 (46%)*	7 (29%)
Lobular hyperplasia		0	0	2 (8%)	2 (8%)	3 (13%)	2 (8%)
Ductal hyperplasia		0	0	0	0	1 (4%)	0
Adenoma		0	0	0	0	1 (4%)	1 (4%)
Fibroadenoma		0	0	0	0	1 (4%)	0
Oxyphilic cells/virilization		0	0	6 (25%)*	5 (21%)*	8 (33%)**	13 (54%)**

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

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

研究分担者： 代田 眞理子 麻布大学獣医学部
研究協力者： 代田 欣二 麻布大学獣医学部・生物科学総合研究所
研究協力者： 川嶋 潤 麻布大学獣医学部
研究協力者： 中村 知裕 麻布大学獣医学部
研究協力者： 小川 祐布子 麻布大学獣医学部

研究要旨

初年度の研究において、新生雌ラットの脳の性分化における臨界期に、モデル化学物質として選択した17 α -ethinylestradiol (EE)を、単回皮下投与 (0.08~2.0 μ g/kg 体重) あるいは5日間反復経口投与 (0.4~2.0 μ g/kg 体重/日) すると、腔開口時期に影響は認められないが、加齢に伴い連続発情を主体とする性周期の異常が増加し、乳腺の過形成および乳汁様液の貯留を伴う管腔の拡張が認められ、遅発型影響のあることが示された。今年度は、これらの動物から採取した試料を解析してこれらの病態を検討するとともに、遅発型影響の起点を探索するために、腔開口までの視床下部/下垂体/性腺軸の発達を検討した。

その結果、性周期の異常は排卵周期の停止を伴う一方、排卵周期が停止しても、卵母細胞を貯蔵する原始卵胞は対照群と同様に消費されていることが明らかになった。また、反復経口投与動物で子宮におけるエストロゲン受容体シグナル伝達系の活性低下、乳腺におけるプロラクチン受容体シグナル伝達系の活性化、血清中 FSH 濃度の上昇が認められ、肝臓では CYP3A9 遺伝子発現量が用量に依存して低下し、遅発型影響の背景に内分泌系および代謝系の変調が認められた。

初回排卵を検索した結果、EE 反復投与群では初回排卵が腔開口から遅延して起こり、排卵数も減少することが明らかになった。また、春機発動前の時期の卵巣重量は低く、性腺刺激ホルモンを投与しても排卵が誘起されず、排卵可能な卵胞数も減少していることが示唆され、臨界期における EE 曝露が卵巣の発育を直接あるいは性腺刺激ホルモン分泌を介して間接的に遅滞させることが示唆された。これら視床下部/下垂体/性腺軸に生じた初期変化が起点となり、遅発型影響へと進展することが考えられた。

A. 研究目的

胎児期／新生児期に形成される原始卵胞は、生殖細胞の貯蔵庫として生殖寿命終焉まで卵巣に保持される。原始卵胞数の障害は生殖機能に不可逆的な影響を及ぼすが、原始卵胞形成の臨界期における化学物質曝露の影響は遅発型影響も含めて知見が乏しい。また、原始卵胞から発育を開始した卵胞はステロイドホルモンおよびペプチドホルモンを分泌して内分泌系のホメオスタシスに与ることにより女性の健康維持に寄与しているといえる。本研究では、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす臨界期曝露の遅発型影響を解析するために組織、細胞、分子の変化から卵巣における遅延型影響を明らかにしていこうとするものであり、これにより、バイオマーカーを捉え、リスク評価に資する科学的根拠を蓄積していこうとするものである。今年度は、初年度において、新生雌ラットの脳の性分化における臨界期に、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) した動物において認められた、加齢に伴う連続発情を主体とする性周期の異常の増加、ならびに乳腺の過形成および乳汁様液の貯留を伴う管腔の拡張といった遅発型影響の病態を明らかにするために、形態解析あるいは遺伝子発現解析を行うとともに、遅発型影響の起点の探索を目的として、膈開口までの視床下部／下垂体／性腺軸の発達を検討した。

B. 研究方法

1. 遅発型影響の病態解析

1) 試料の採取

平成 22 年度研究において、Sprague Dawley 系 [Cr1:CD(SD)] 雌ラットを同系統の成熟雄ラットと交配させて妊娠動物とし、自然分娩させて得られた雌産児の 1 日齢に、EE を 0.08、0.4 あるいは 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回皮下投与し、32～33 週齢における最終剖検で得られた卵巣、乳腺、肝臓、子宮

および血清を解析に用いた (実験 1)。また、同様にして得られた雌産児の 1～5 日齢に、EE を 0.4 あるいは 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 反復経口投与し、10 日齢に一部を剖検して得られた卵巣、ならびに 22～23 週齢における最終剖検で得られた乳腺、肝臓、子宮および血清を解析に用いた (実験 2)。

2) 卵巣の形態学的評価

実験 1 および実験 2 ともに、最終剖検で得られた卵巣の全例をブアン固定し、常法に従ってパラフィン包埋し、6 μm の連続切片として、全ての切片を観察して黄体および嚢胞状卵胞の有無を観察した。

3) 原始卵胞数の計測

実験 2 において 10 日齢で得られた片側卵巣をブアン固定し、常法に従ってパラフィン包埋し、6 μm の連続切片とした。最終剖検で得られた卵巣の連続切片とともに、約 30 μm の間隔で切片を選び、そこに数えられる原始卵胞数を数えた。

4) 遺伝子発現解析

実験 1 および実験 2 の最終解剖で得られた肝臓および子宮の凍結組織片を細胞破砕装置用チューブ (トミー精工) に入れ Trizol 試薬 (インビトロジェン株式会社)、細胞破砕装置用ビーズ (トミー精工) を加え冷却型ビーズ式細胞破砕装置 MS-100R (株式会社トミー精工) でホモジナイズを行った。ホモジネートは 500 μL を別のチューブに移し、クロロホルム (和光純薬、特級) を 100 μL 加え攪拌し室温で 2-3 分放置後、5 $^{\circ}\text{C}$ 、12000g の条件で 15 分間遠心し水層とフェノール・クロロホルム層に分離した。RNA が含まれる水層を別のチューブに移し、イソプロピルアルコール (和光純薬、分子生物学用) 250 μL を加え攪拌し室温で 10 分放置後 5 $^{\circ}\text{C}$ 、12000g で 10 分間遠心して RNA を沈殿させペレットを得た。チューブから上清を除き、ペレットに濃度 75% に希釈したエタノール (和光純薬、分子生物学用) 1 mL を加え 4 $^{\circ}\text{C}$ 、7500g で 5 分間遠心しペレットを洗浄した。エタノールを除き、ペレットは 10 分間の風乾