

201236003A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 25(2013)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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 25(2013)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. 25

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. 35

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. 47

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. 75

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. 93

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.105

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... p. 115

### Ⅳ. 研究成果の刊行物

..... p. 117

# 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 主任研究員
	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 主任研究員
	Pramod Dakhal	国立医薬品食品衛生研究所病理部/東京農工大学
	森川朋美	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	代田 欣二	麻布大学生物科学総合研究所 教授
	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
	菅田 恵理世	麻布大学獣医学部
	鈴木 紗綾	麻布大学獣医学部
	隈 瑞穂	麻布大学獣医学部
	立河 紗紀	麻布大学獣医学部
	寺西 瑞希	麻布大学獣医学部
	森 雅史	麻布大学獣医学部
	野澤 香織	東京農工大学農学部
	溝口康	明治大学農学部農学科
	平野顕宏	明治大学農学部農学科
	小峰千亜希	明治大学農学部農学科
	神島愛未	明治大学農学部農学科
	志賀健臣	明治大学農学部農学科

**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。共通被験物質 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) 20  $\mu$ g/kg の新生児期単回皮下投与を遅発影響誘発の共通実験項目とした。本年度は遅発影響の機序解明のための初期変化を中心に解析した。また遅発

影響の子宮発がん修飾作用について精査した。研究成果を以下に記す：

#### 1) 遅発影響の初期変化：

①視床下部への影響 遅発影響誘発量の EE を新生児期曝露後、正常性周期を示す時期の young adult ラットを用いて、視床下部キスペプチンの遺伝子発現を部位別に解析した結果、性周期を制御する LH サージジェネレーターが存在する視床下部前方の kiss1 neuron の mRNA レベルが発情前期のみ低下した。性行動や卵胞発育を制御する視床下部後方の変化は認められなかった。また、卵巣摘出 LH サージ惹起実験結果から、性周期が正常な時期から既に遅発影響はサージ遅延をエストロゲン受容体 $\alpha$ を介して引き起こしている可能性が示唆された。これらの実験結果から遅発影響の最も鋭敏な指標である性周期異常は、視床下部前方にリンクした変化の可能性が高いと考えられた。

②マウス内側視束前野 (POA) への影響 新生児期 EE20 $\mu$ g および EE20,000 $\mu$ g 投与雌雄マウスの POA における Calbindin (CB)の分布パターンを免疫組織化学的に評価した結果、雌の CB 陽性細胞数が増加する一方、雄では減少し雌雄差が不明瞭となった。脳内の内側視束前野のカルシウム結合タンパク質含有細胞の分布機構の雌雄差に影響を及ぼし、性成熟後の雌雄コミュニケーションパターンの異常を誘導する可能性を示唆していた。これらの結果から、視床下部後方の性行動制御部位も遅発影響の標的であると考えられた。

③卵巣への影響 遅発影響誘発量の新生児期 EE の経口投与により、膣開口時期に初回排卵を伴わない個体が観察され、春機発動期において既に卵胞形成への影響が示唆された。また排卵を停止しても対照群と同様に原始卵胞は消費されていると考えられた。遅発影響により異常性周期を示した 20 週齢の血清中性腺刺激ホルモン濃度測定およびエストロゲン標的遺伝子の定量から、エストロゲンフィードバック機構の変調が示唆された。

④内分泌および卵巣への影響 下垂体および卵巣からのホルモン測定結果から、性成熟後では遅発性影響の出現前には生殖関連ホルモンの分泌異常は見られなかった。新生児期 EE 曝露した卵巣では、成熟後において LH 受容体等の mRNA 発現量が増加および EE 添加液中培養下で LH 受容体の顕著な増加が認められた。これらの結果より、遅発性影響が卵巣の LH 受容体等生殖関連遺伝子に直接的影響を及ぼしている可能性が示唆された。

2) 遅発影響の神経系および行動への影響:マウスおよびラットを用いた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  $\mu$ g/kg 投与で異常は明らかではなかった。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。

遅発影響の標的部位として、①より視床下部後方部位、②③より視床下部後方、③④より卵巣が考えられた。

3) 遅発影響と発がんとの関連性：子宮内膜過形成あるいは子宮腺癌の増加傾向が EE2 $\mu$ g/kg 以上で観察された。これらの群では持続発情が増加し、卵巣は顕著に萎縮した。ホルモン測定結果より相対的高エストロゲン状態が示唆された。増加の機序として早期持続発情発現による卵巣萎縮が持続的な相対的高エストロゲン状態を誘導したためと考えられたが、遅発影響による直接的な子宮エストロゲン受容体感受性の変化の可能性も考慮す

べきである。本結果より子宮癌の増加も遅発影響の長期指標と考えられた。

4) 性周期観察の結果より、遅発影響は反復投与により増強すると考えられた。

## 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。平成 22 および 23 年度の成果より、検出には時間がかかるものの多くの遅発影響指標が検出できた。脳の神経新生および神経行動学的な異常は認められなかった。また視床下部・下垂体・性腺軸を介した神経内分泌異常だけでなく、卵巣、子宮、乳腺への直接的な影響も遅発影響として挙げられた。

本年度は特に

- 遅発影響の機序解明のための初期変化
- 遅発影響の子宮発がん修飾作用について取り組んだ。

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  $17\alpha$ -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  $\mu$ g/kg を遅発影響発現

量として各実験に組み入れた。

## B. 研究方法(( )は主な担当者)

### 遅発影響機序解明のため初期変化の検索

#### B-1-1 Young adult における視床下部のキスペプチンの変化(高橋、井上)

遅発影響のメカニズム解析として、遅発影響誘発量の EE20  $\mu$ g/kg を新生児期単回皮下曝露し、正常性周期を示す時期の young adult の Crj:Donryu ラットを用いて、発情前期と発情に視床下部キスペプチンの遺伝子発現を前方と後方の部位に分けて解析した。

#### B-1-2 遅発影響とエストロゲン受容体との関連性(吉田、森川、Dakhal)

遅発影響がエストロゲン受容体(ER) $\alpha$ を介していた昨年の結果を確認する目的で、Crj:Donryu ラットに、アゴニスト(ER $\alpha$  agonist, PPT; ER $\beta$  agonists, DPN)を昨年の10倍の高用量である 10,000  $\mu$ g/kg を生後 24 時間以内に単回皮下投与し、性成熟、性周期および Young adult での卵巣・子宮への影響を確認した。

#### B-1-3 Young adult における人工的 LH サージとの関連性(吉田、Dakhal、森川)

遅発影響誘発量の EE および PPT を曝露させた正常性周期を示す young adult の Crf:Donryu ラットに卵巣摘出後エストロゲンおよびプロゲステロン投与により人為的 LH サージを惹起させた。LH サージ惹起後、LH 誘発パターンを同年齢の溶媒対照動物、高用量(EE2000  $\mu$ g/kg)新生児曝露群、性周期がすでに異常となった 6 ヶ月の加齢動物

群および雄と比較した。

#### **B-1-4 新生児期遅発影響 EE 曝露マウス内側視束前野 (POA) における CB 陽性細胞の雌雄差について(横須賀)**

生後 24 時間以内の雌雄マウス

(C57BL/6J) に 20 $\mu$ g/kg (中濃度) および 2,000 $\mu$ g/kg (高濃度) の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下 (室温 22 $^{\circ}$ C から 25 $^{\circ}$ C、湿度 40% から 60%) で飼育管理した。体重の変化を 1 週間おきに測定し、雌については膣開口の時期を観察した。

体重変化および行動学的解析を終了した個体 (90-100 日齢) は、経心臓法にて灌流固定を施し固定脳標本とした。内側視束前野 (POA) を含む脳切片標本 (厚さ 40 $\mu$ m の連続冠状断切片) に対して Anti-Calbindin D-28k を一次抗体として用いた IHC を施して、MPA における CB の分布パターンを評価した。

#### **B-1-5 卵巣への遅発影響について(代田、川島、中村、小川)**

1. 生後 1 日に 2  $\square$ g/kg まで単回皮下投与し性周期を長期観察した。これらの動物の排卵検査および卵巣組織観察を実施した。
2. 生後 1 日から 5 日間 0.4 あるいは 2  $\square$ g/kg を反復経口投与し、性周期観察、ホルモン測定および卵巣エストロゲン標的遺伝子の定量を行った。
3. 生後 1 日に 10 あるいは 20  $\square$ g/kg を単回経口投与し、性周期観察を行い比較した。
4. EE 反復経口投与動物の排卵検査および卵巣組織観察を実施した。形態学的解析を実施した。
5. EE 反復経口投与群で初回排卵について検索した。

#### **B-1-6 内分泌および卵巣への影響(渡辺、長岡、野澤)**

出生後 24 時間以内の雌ラットに、EE 20 $\mu$ g/kg (低濃度群・遅発影響誘発量)、200 $\mu$ g/kg (中濃度群・遅発影響誘発量)、あるいは 2000 $\mu$ g/kg (高濃度群) を単回皮下投与した。性成熟後、発情周期を膣スメアの観察により毎日記録した。90 日齢にて、発情前期 (午前および午後)、発情期、休止期の各発情ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定、卵巣における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。また、EE 曝露による、性成熟以前の卵巣への影響を観察するため、5 日齢の卵巣における生殖関連遺伝子の解析も行った。さらに、EE による卵巣への直接的な影響を確認するため、出生 24 時間以内の雌ラットから摘出した卵巣を、EE 添加培養液中にて培養したのち生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

#### 遅発影響が神経行動学に及ぼす影響

#### **B-2-1 遅発影響と性行動誘引發声および甘味好選性への影響について(横須賀)**

成熟雄マウスが成熟雌マウスに対して示す 100kHz~150kHz の性行動誘引發声 (超音波発声: USV) への影響、甘味好選性への影響といった行動学的解析を加えることで、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの EE 皮下投与が及ぼす脳の性分化へのリスク評価解析を試みた。さらに、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの EE 皮下投与が及ぼす発育状態への影響、膣開口時期への影響も記録した。B1-3 のマウスを用いた。

生後 10 週目 (70 日齢) に達した個体は、超音波記録・解析装置を装着した観察ケー

ジにおいて発情雌と同居させ、USVの発声の有無を観察した。また、生後11週目から4週間にわたって、EE20 $\mu$ g投与雌雄、EE20,000 $\mu$ g投与雌雄、対照群雌雄（計6群）の各ケージに水道水および水道水にサッカリンを2.5%の割合で溶かした給水便を同時に与えて（2ボトル法）甘味好選性試験を行った。

#### **B-2-2 遅発影響とラットを用いた行動神経学的解析(川口、溝口、平野、小峰、神島、志賀)**

、本年度は行動学的解析による遅発型影響とそのメカニズムの解明及び早期指標の確立を目指し、遅発影響量と高濃度(EE2000 $\mu$ /kg)のEEを臨界期に曝露し、各種神経行動学的解析を行った。

#### 遅発影響の長期指標の検索

#### **B-3-1 遅発影響と発がんとの関連性(高橋、井上)**

平成22および23年度に実施したWitar:Hannoverラットを用いた遅発影響の長期指標を検索のうち、本年度は発がんへの作用、とくに子宮発癌への修飾作用を中心として解析した。各濃度のEEを新生児期曝露し、10週齢にて子宮発癌誘発剤であるENNGを子宮腔内に単回投与し、10ヶ月間観察した雌ラットの生殖器・内分泌系器官について病理組織学的解析を行った。またこれらの動物の血液を採取し、FSH、LH、E2、P4、プロラクチン(PRL)およびインヒビン(INH)をラジオイムノアッセイ法により測定し、内分泌学的解析を実施した。

#### **(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**

#### 遅発影響機序解明のため初期変化の検索

#### **C-1-1 Young adultにおける視床下部のキスペプチンの変化(高橋、井上)**

遅発影響量投与群では、性周期制御センターであるLHサージジェネレーターが存在する視床下部前方においてkiss1 neuronのmRNAレベルが発情前期のみ低下した。性行動や卵胞発育を制御する視床下部後方では発情前期および発情期ともに変化は認められなかった(図2,3)。

#### **C-1-2 遅発影響とエストロゲン受容体との関連性(吉田、森川、Dakhal)**

その結果、PPT高用量群では性成熟時期への影響しないものの、より早期に性周期異常が発現したが、DPN高用量投与は対照群と同様であった。これらの結果から、遅発影響はER $\alpha$ を介していることが確認できた。

#### **C-1-3 Young adultにおける人工的LHサージとの関連性(吉田、Dakhal、森川)**

遅発影響量EEおよびPPT曝露されたラットは性周期が正常であっても、LHサージ時刻が同週齢動物より約2時間遅延した。性周期が異常な動物にはLHレベルは低いままであり、LHサージを惹起することはできなかった(図1)。

#### **C-1-4 新生児期遅発影響EE曝露マウス内側視床前野(POA)におけるCB陽性細胞の雌雄差について(横須賀)**

MPAにおけるCB陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE投与により

雌の CB 陽性細胞数が増加する一方、雄では CB 陽性細胞数が減少することが明らかとなった(図 4-9)。

### C-1-5 卵巣への遅発影響について(代田、川島、中村、小川)(図 11-12)

EE を異なる方法で投与し、投与動物の性成熟、性周期の経時的変化、ならびに卵巣の機能および形態を検索した結果、

1. 生後 1 日に 2 □g/kg まで単回皮下投与しても 16 週齢まで対照群と同様の性周期を回帰した。20 週齢から連続発情を主体とする異常が 0.4 □g/kg 以上の投与群で増加し、週齢の進行に伴いその頻度が増加した。32 週齢では 0.08 □g/kg 投与群の動物にも連続発情が認められ、性周期異常出現までの期間と EE の用量との間に負の相関性が認められた。
2. 生後 1 日から 5 日間 0.4 あるいは 2 □g/kg を反復経口投与すると、2 □g/kg 投与群では 8 週齢から、0.4 μg/kg 投与群では 12 週齢から連続発情が認められ、20 週齢には全例が異常性周期を示し、若齢での出現ではあるが単回皮下投与と同様の用量相関性が認められた。血清中性腺刺激ホルモン濃度測定およびエストロジェン標的遺伝子の定量に投与による影響が認められた。
3. 生後 1 日に 10 あるいは 20 μg/kg を単回経口投与すると、8 週齢から異常性周期が認められたが、その頻度は反復投与と比較して低かった。
4. EE 反復経口投与動物の排卵検査および卵巣組織観察から排卵周期の停止が示唆されたが、用量間で原始卵胞数に差は認められなかった。10 日齢の卵巣でも原始卵胞数に差は認められなかった。
5. 膣開口時期に投与の影響は認められな

かったが、初回排卵を伴わない例が EE 反復経口投与群で増加した。

### C-1-6 内分泌および卵巣への影響(渡辺、長岡、野澤)

対照群では、すべての個体で正常発情周期を示したが、EE 投与群では、濃度依存的に正常発情周期を示す個体の割合が低下した。対照群、低濃度群の正常発情周期を示す個体では、発情前期の午前におけるエストラジオールおよびテストステロン濃度の上昇、黄体形成ホルモン (LH) と卵胞刺激ホルモンのサージ、発情前期午後から発情期にかけてのインヒビンの低下が観察された。一方、異常発情周期を示す個体では、このようなホルモン変動は見られなかった。90 日齢の卵巣においては、EE 投与量に応じていくつかの発情ステージにおいて、LH 受容体、インヒビン α・βA・βB、エストロジェン受容体 α の mRNA 発現量が増加し、5 日齢の卵巣でも、EE 高濃度投与群で LH 受容体 mRNA の発現量が増加した。さらに、EE 添加液中で培養を行った卵巣では、EE 投与群における LH 受容体の増加が顕著であった(図 10)。

### 遅発影響が神経行動学に及ぼす影響

#### C-2-1 遅発影響と性行動誘引發声および甘味好選性への影響について(横須賀)

生後 24 時間以内における EE 単回暴露は、対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。体重の変化に関しては、顕著な影響は認められなかった。しかしながら、雄においては EE 高濃度群(2,000μg)において、離乳期(生後 21 日)から春機発動期(生後 42 日)の間の体重が、他の比べて低い傾向

が認められた。一方、雌においては EE 中濃度群 (20 $\mu$ g) において、春機発動直前 (生後 35 日) 以降の体重が他の群に比べて高い傾向を示した。発情雌との接触による USV 発声は、雄においては EE 高濃度群

(2,000 $\mu$ g) において全個体で USV の発声が認められず、EE 中濃度群 (20 $\mu$ g) では USV 発声個体の割合が対照群に比較して半数以下に減少した。一方、雌においては、対照群および EE 中濃度群では 10% 以下の低い確立でしか発声しないが、EE 高濃度群では 45% の個体から USV 発声を記録した。EE 投与による甘味 (2.5% サッカリン) 好選性への影響は雌雄とも観察されなかった。

### **C-2-2 遅発影響とラットを用いた行動神経学的解析(川口、溝口、平野、小峰、神島、志賀)**

各種行動解析を実施した結果、雌ラットへの EE 曝露は、性選好性では用量依存的に、性行動では高濃度である 2 mg/kg でのみ減弱を引き起こすことを示した。また、不安・学習行動では、生後 24 時間以内の 20  $\mu$ g/kg EE 曝露により成熟後のエストロゲン感受性が変化する可能性を示したが、再現性は得られなかった。早期指標の確立を目指して、母子分離誘発啼鳴反応の生後 24 時間以内 E2 曝露の影響を検討したが、投与による変化は認められなかった。エストロゲン受容体  $\alpha$  発現量解析においても、部位特異的な発現変化が認められた。また、活動量へは本研究の曝露条件では影響は認められなかった。

### **遅発影響の長期指標の検索**

**C-3-1 遅発影響と発がんとの関連性 (高橋、井上)(図 1316)**

10 ヶ月齢の動物の病理組織学的検索の結果、子宮内膜腺癌の前癌病変である内膜過形成の増加傾向が EE2 $\mu$ g/kg 以上で、腺癌の発生が EE20 $\mu$ g/kg 以上で観察された。これらの群では、顕著な卵巣萎縮を伴う持続発情を示す個体が増加し、のう胞化した閉鎖卵胞も多く認められた。ホルモン測定では、EE2 $\mu$ g/kg 以上群で明らかなプロゲステロン値の低下が観察された。その他のホルモン値については対照群と同様あるいは生物学的意義のない変化を示した。

## **D. 考察**

### **遅発影響機序解明のため初期変化の検索**

#### **D-1-1 Young adult における視床下部のキスペプチンの変化(高橋、井上)**

キスペプチンは、視床下部・下垂体・性腺軸制御に重要な役割を果たすことが近年明らかとなりつつある神経ニューロンである。これらの結果は、性周期の視床下部制御部位の変調が、性周期が正常な時期に発現していること示唆する重要な結果であり遅発影響の標的として期待される。遅発影響の解明のためには、視床下部のキスペプチンの部位別変化に焦点を当てた今後の検討が必要であると考えられた。

#### **D-1-2 遅発影響とエストロゲン受容体との関連性(吉田、森川、Dakhal)**

長期間の性周期観察、性成熟等の結果より、遅発影響は ER $\alpha$  を介していることが確認できた。

#### **D-1-3 Young adult における人工的 LH サージとの関連性(吉田、Dakhal、森川)**

LH サージ惹起実験の結果から、遅発影響は性周期が正常な時期からサージ時期異常と

して発現しており、おそらく  $ER\alpha$  を介していることと推察された。また、遅発影響の最も鋭敏な指標である性周期異常は卵巣ではなく、視床下部前方の LH サージ制御部位にリンクしている可能性が高いと考えられた。本年度明らかになった発現パターンは、遅発影響メカニズムに重要であると考えられることから、LH サージ惹起と遅発影響の関連性について、さらに詳細な検討が必要と考えられる。

#### **D-1-4 新生児期遅発影響 EE 曝露マウス内側視束前野 (POA) における CB 陽性細胞の雌雄差について(横須賀)**

POA における CB 陽性細胞の分化に関して、雌では増加を誘導し雄では現象を誘導することで、結果的に雌雄差が不明瞭になるリスクがある。これらの結果は、EE の新生仔期曝露が脳に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクとして、それがわずか1回の曝露経験であったとしても高濃度の曝露を受けた場合、脳内の内側視束前野のカルシウム結合タンパク質含有細胞の分布機構の雌雄差に影響を及ぼし、性成熟後の雌雄コミュニケーションパターンの異常を誘導する可能性があることを示唆している。

#### **D-1-5 卵巣への遅発影響について(代田、川島、中村、小川)**

1. 生後1日に  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  まで単回皮下投与の結果より、性周期異常出現までの期間と EE の用量との間に負の相関性が認められた。これらの動物の排卵検査および卵巣組織観察から、EE 投与動物では無排卵性周期を回帰している例のあることが示唆された。

2. 生後1日から5日間  $0.4$  あるいは  $2 \mu\text{g}/\text{kg}$  を反復経口投与の結果より、若齢での出現ではあるが単回皮下投与と同様の用量

相関性が認められた。血清中性腺刺激ホルモン濃度測定およびエストロゲン標的遺伝子の定量から、これらの動物ではエストロゲンフィードバック機構に変調のあることが示唆された。

3. 生後1日に  $10$  あるいは  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$  を単回経口投与の結果、反復投与より影響が減弱して認められた。

4. EE 反復経口投与動物の排卵検査および卵巣組織観察から排卵周期の停止が示唆された。が、用量間で原始卵胞数に差は認められなかった。排卵を停止しても対照群と同様に原始卵胞は消費されているものと考えられた。

5. EE 反復経口投与群で増加し、春機発動の遅延が明らかになった。

#### **D-1-6 内分泌および卵巣への影響(渡辺、長岡、野澤)**

EE 投与により、遅発性影響の出現前には中枢の関与する生殖関連ホルモンの分泌異常は見られず、卵巣において、いくつかの生殖関連遺伝子の発現量変化が見られることがわかった。特に LH 受容体は、EE の直接的影響により発現量の増加が引き起こされることから、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

#### **遅発影響が神経行動学に及ぼす影響**

#### **D-2-1 遅発影響と性行動誘引發声および甘味好選性への影響について(横須賀)**

マウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における高濃度 EE 曝露による性分化に対する晩発型 (遅発型) リスクについて、24 年度の研究結果は次のような評価となった。生後 24 時間以内における新生仔マウス (C57BL/6J) への EE 単回投与は、(1)雌の

膣開口時期を早める。(2)生後発達に顕著な影響は認められないが、雄では投与されるEE濃度が高いと一時的な発育遅延を誘発する可能性がある。一方、雌では中濃度EEの曝露は体重増加を誘発する可能性がある。性成熟後の雌雄表現型への影響として、(3)雄のUSV発声を抑制する一方、雌のUSV発声を促進している可能性がある。

#### **D-2-2 遅発影響とラットを用いた行動神経学的解析(川口、溝口、平野、小峰、神島、志賀)**

ラットを用いた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。また、不安・学習行動における遅発影響量でのエストロゲン感受性の変化は再現性がないことから投与の影響ではない可能性も高い。さらに検討する必要があると考えられた。早期指標の確立を目指した母子分離誘発啼鳴反応試験では影響は認められなかった。

#### **遅発影響の長期指標の検索**

##### **D-3-1 遅発影響と発がんとの関連性 (高橋、井上)**

今回の検索結果よりEE2 $\mu$ g/kg以上での子宮増殖性病変の増加は、子宮癌の発生も遅発影響の長期指標の一つであることを示しており、その発生には閾値が認められた。平成22,23年度の成果報告書に記載したように、EE2 $\mu$ g/kg以上の投与では遅発影響誘発量であり、性周期の早期異常(主として持続発情)が増加することを報告した。またホルモン測定結果より、EE.2 $\mu$ g/kg以上の投与群では相対的高エストロゲン状態であることが示唆された。子宮癌増加の機序としては、早期持続発情発現による卵巣萎縮

が、間接的に持続的な相対的高エストロゲン状態を誘導したことが考えられたが、遅発影響による直接的な子宮エストロゲン受容体感受性の変化の可能性も考慮すべきと考えられた。

#### **E. 結論**

新生児期遅発影響量曝露した正常性周期を回帰するラットにおいて、視床下部前方のキスペプチン遺伝子の低下、LHサージ遅延から、遅発影響の標的としてサージ制御部位である視床下部後方部位が示唆された。また、マウス内側視束前野(POA)Calbindin(CB)分布のオス型化、ラットの春機発動期における卵胞形成への影響、卵巣のエストロゲンフィードバック機構の変調の結果から、遅発影響の標的として視床下部後方のパルス制御部位も示唆された。ホルモン測定および卵巣遺伝子の変化から、遅発影響は卵巣へも直接影響する可能性が示唆された。

マウスおよびラットの行動試験結果より神経系および行動へ明らかな遅発影響の発現は認められなかった。

遅発影響量曝露で子宮発がんが増加したことから、子宮癌の増加も遅発影響の長期指標と考えられた。増加の機序として早期持続発情発現により相対的高エストロゲン状態を誘導したためと考えられたが、遅発影響による直接的な子宮エストロゲン受容体感受性の変化の可能性も考慮すべきである。また、性周期観察の結果より、遅発影響は反復投与により増強すると考えられた。

#### **F. 研究発表**

##### **1. 論文発表**

- 1) Takahashi M, Matsuo S, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Yoshida M. Development of an early induction model of medulloblastoma in Ptch1 heterozygous mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Sci.* 103(12):2051-5. 2012
  - 2) Yoshida M, Katsuda S, Maekawa A. Involvements of Estrogen Receptor, Proliferating Cell Nuclear Antigen and p53 in Endometrial Adenocarcinoma Development in Donryu Rats. *J Toxicol Pathol.* 25(4):241-7. 2012
  - 3) Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Yamate J, Yoshida M. Differential Morphological Effects in Rat Corpora Lutea among Ethylene Glycol Toxicol Pathol. In press. 2012.
  - 4) 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.* 2012 64(7-8):775-82.
  - 5) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1(+/-) mice. *Exp Toxicol Pathol.* In press. 2013.
  - 6) Y. Horii, M. Kawaguchi (corresponding), R. Ohta, A. Hirano, G. Watanabe, N. Kato, T. Himi, and K. Taya. Male hatano high-avoidance rats show high avoidance and high anxiety-like behaviors as compared with male low-avoidance rats. *Exp. Anim.*, 2012 Sep;61(5): 517-524
  - 7) Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37: 681-689 (2012)
  - 8) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Shirota K. Vascular Hamartoma in the Uterus of a Female Sprague-Dawley Rat with an Episode of Vaginal Bleeding. *Toxicologic Pathology* (in press)
2. 学会発表
- 1) Midori Yoshida<sup>1</sup>, Miwa Takahashi<sup>1</sup>, Tomomi Morikawa<sup>1</sup>, Kaoru Inoue<sup>1</sup>, Saori Matsuo<sup>1</sup>, Kazuyoshi Taya<sup>2</sup>, Gen Watanabe<sup>2</sup>. Involvement of Estrogen Receptor Alpha in Delayed Effects of Neonatal Exposure to Estrogens in Rats. 第31回米国毒性病理学会 (2012.6) (米国ボストン市マサセッツ州)
  - 2) Matsuo, S., Takahashi, M., Inoue, K., Irie, K., Tamura, K., Ogawa, K., Yoshida, M. Effects of postnatal exposure to cyclopamine on medulloblastoma and cerebellar development in Ptch1 heterozygous mice 第31回米国毒性病理学会 (2012.6) (米国ボストン市マサセッツ州)
  - 3) 吉田緑, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 松尾沙織里, 田谷一善\*, 渡辺元\*. 新生児期エストロゲン類曝露で誘発される神経内分泌系および生殖器系への遅発影響にエストロゲンレセプターが果たす役割. 第105回日本繁殖生物学会大会 (2012.9) (茨城県つくば市)
  - 4) 高橋美和, 井上薫, 松尾沙織里, 森川朋美, 吉田緑. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) の新生児期単回曝露による視床下部 Kiss1 遺伝子発現の変化. 第105回日本繁殖生物学会大会 (2012.9) (茨城県つくば市)
  - 5) 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, 西川秋佳, 吉田緑. Ptch1 ヘテロノックアウトマウスにおけるソニックヘッジホッグ阻害剤 Cyclopamine の生後曝露による髄芽腫発生抑制作用. 第29回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2013.1) (茨城県つくば市)
  - 6) 隈部志野\*, 佐藤順子\*, 友成由紀\*, 橋本知水\*, 高橋美和, 吉田緑, 土居卓也\*, 涌生ゆみ\*, 土谷稔\*. ラット Endometrial stromal sarcoma の多様性. 第29回日本毒性病理学会総会および学

- 術集会 (2013.1) (茨城県つくば市)
- 7) 中村 知裕, 川嶋 潤, 小川 祐布子, 代田 欣二, 吉田 緑, 代田 眞理子: 新生児期エチニルエストラジオール曝露がラットの原始卵胞数推移に及ぼす影響 第39回日本毒性学会学術年会 (2012年7月)
  - 8) 川嶋 潤, 中村 知裕, 川嶋 潤, 小川 祐布子, 代田 欣二, 渡辺 元, 永岡謙太郎, 田谷 一善, 代田 眞理子: エチニルエストラジオール新生児期曝露による雌ラットの内分泌系への遅発影響 第39回日本毒性学会学術年会 (2012年7月)
  - 9) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Sugata E, Suzuki S, Ogawa Y, Shirota K. Effects of Neonatal oral exposure to ethinylestradiol on the puberty of female rats. Society for the Study of Reproduction 2012 Meeting (2012年8月)
  - 10) 野澤香織, 永岡謙太郎, 吉田緑, 田谷一善, 渡辺元 雌ラットの脳性分化臨界期におけるエストロゲン投与が成熟後の生殖機能に及ぼす遅発性影響: 第154回日本獣医学会(2012, 9)
  - 11) Yokosuka.M., Adachi H., Nakada T., Saito TR.and Yoshida M. Neonatal exposure to 17 alfa-ethinylestradiol alters the calbindin-immunoreactive cell aggregates in the preoptic area of the mice. Neuroscience 2012 41th Annual Meeting Society for Neuroscience, NewOrleans, 2012年10月15日
  - 12) 1) 千本隆志, 小林由紀, 近藤保彦, 川口真以子 出生直後の ethynyl estradiol 曝露がラットの学習行動に及ぼす影響
  - 13) 第17回日本行動内分泌研究会 (2012年8月31日、京都)
  - 14) 小峰千亜希, 近藤保彦, 植村英恵, 千本隆志, 川口真以子 出生直後の雌ラット ethynyl estradiol 曝露が成熟後の性行動に及ぼす影響 第105回日本繁殖生物学会大会 (2012年9月6-7日、茨城)
  - 15) 小田島夢花, 宮田能, 中島春香, 近藤保彦, 吉田緑, 川口真以子 生後24時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が成熟後の性選好性に与える影響 第15回環境ホルモン学会研究発表会 (2012年12月18-19日、東京)
  - 16) 朝川比登美, 千本隆志, 神島愛美, 小林由紀, 吉田緑, 川口真以子 生後24時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が成熟後の探索行動に与える影響 第15回環境ホルモン学会研究発表会 (2012年12月18-19日、東京)
  - 17) 志賀健臣, 溝口康, 川口真以子 生後24時間以内の雌ラットへの Ethynyl estradiol 曝露が成熟後のエストロゲン受容体 $\alpha$ 発現に及ぼす影響 第15回環境ホルモン学会研究発表会 (2012年12月18-19日、東京)
  - 18) Kamishima M, Kobayashi Y, Senbon T, Komine C, Uemura H, Yoshida M, Kondo Y, Kawaguchi M EFFECTS OF NEONATAL SINGLE INJECTION OF ETHINYL ESTRADIOL ON FEEDING, LEARNING AND SEXUAL BEHAVIORS IN ADULT FEMALE RATS. The 17th FAVA Congress (2013年1月5-6日、Taipei, Taiwan)
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

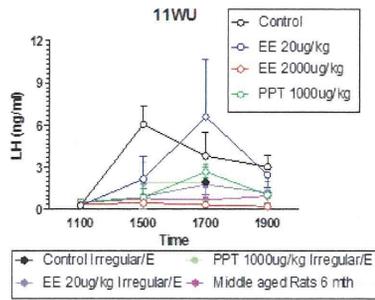
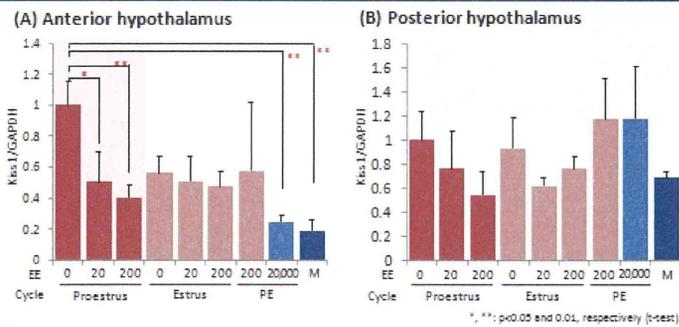


Fig. 3-1 Change of serum LH levels in young adult rats neonatally exposed to EE or PPT and middle aged ones.

図 1 卵巣摘出ラットにおける LH サージ惹起後の血中 LH レベルの推移

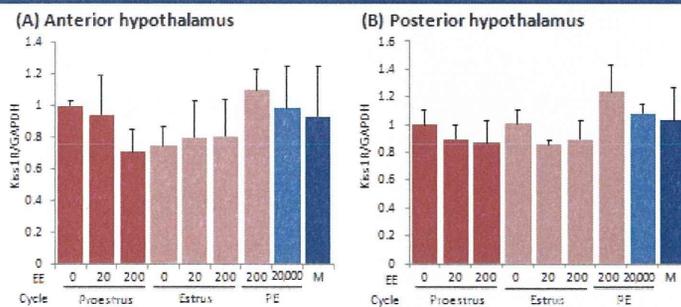
### Kiss1 expression in the anterior (A) and posterior (B) hypothalamus



- Anterior hypothalamus (AVPV) (A)  
At proestrus, Kiss1 expression of the EE 20 and 200  $\mu$ g groups was significantly decreased and almost half of 0  $\mu$ g group at proestrus. The levels in the EE 20,000  $\mu$ g group and male rats were less than one-third of that in the 0  $\mu$ g group. At estrus, the level of Kiss1 did not differ among EE 0, 20 and 200  $\mu$ g groups.
- Posterior hypothalamus (ARC) (B)  
At EE 20 and 200  $\mu$ g, the level of Kiss1 showed decreasing tendency at proestrus, however there were no statistical differences among the groups.

図 2 視床下部前方の発情前期(左)、発情期(右)のキスペプチンニューロン遺伝子の発現

### Kiss1 receptor expression in the anterior (A) and posterior (B) hypothalamus



- Basically, differences related to EE exposure were not found in the levels of Kiss1 receptor, although the level of 200  $\mu$ g group in the anterior hypothalamus was decreased at proestrus.

図 3 視床下部後方の発情前期(左)および発情期(右)のキスペプチンニューロンの発現

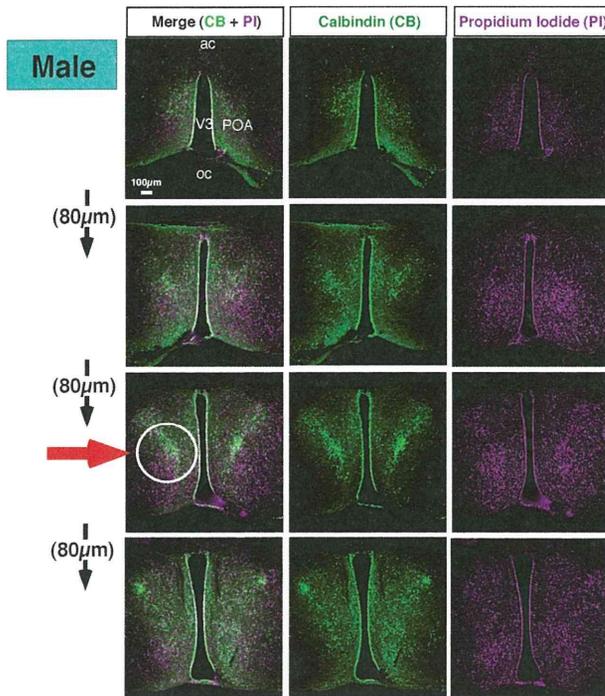


図 4 : 対照群雄 (90 日齢) の内側視索前野 (POA) における、Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布。

POA の中心部を含む 80µm 間隔の連続切片。雄では POA の中心領域 (赤の矢印) に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が観察される。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

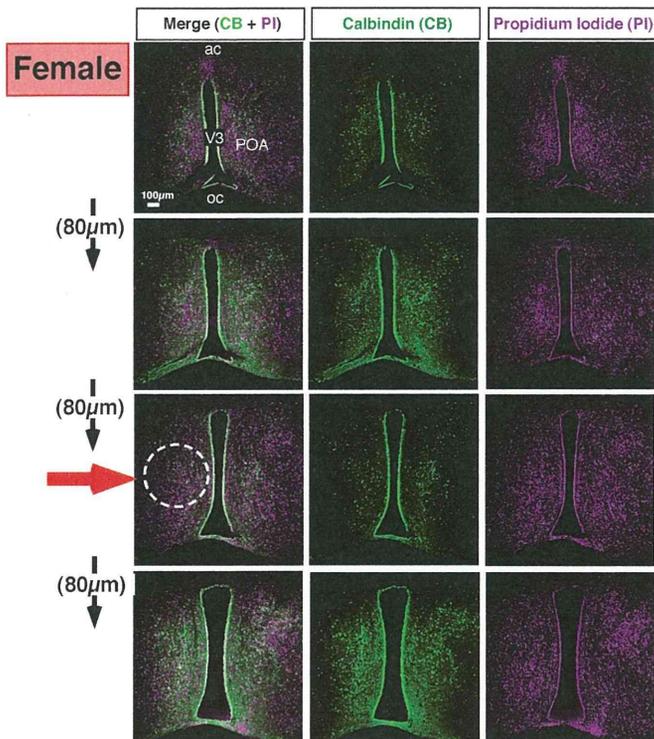


図 5 : 対照群雌 (90 日齢) の内側視索前野 (POA) における、Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布。

POA の中心部を含む 80µm 間隔の連続切片。雌では雄のように POA の中心領域 (赤の矢印) においても CB 免疫陽性細胞の大きな塊は観察されない。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

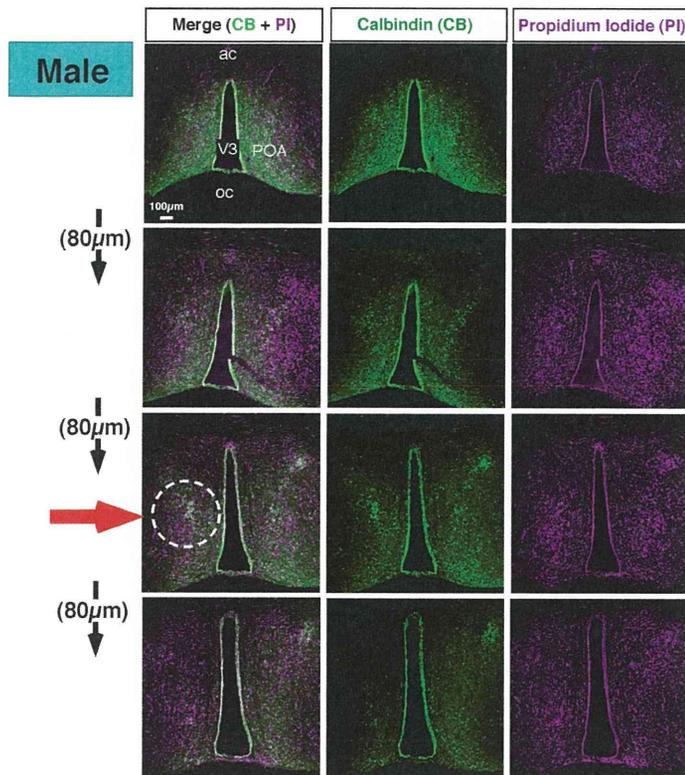


図 7 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された 90 日齢雄の POA における CB 陽性細胞の分布。

EE 投与により、雄では明確であった CB の塊 (図 5 の赤矢印の指すところを参照) の領域が縮小している (赤矢印)。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

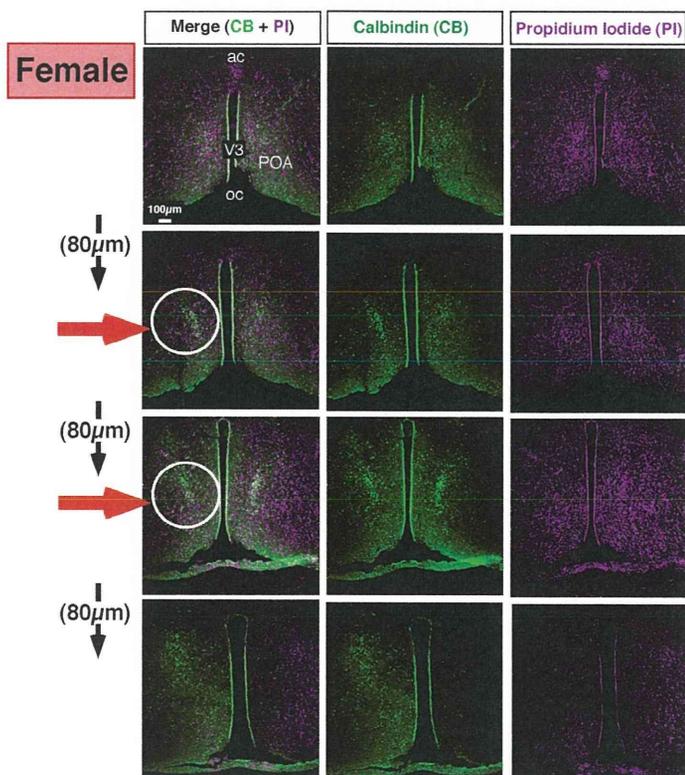


図 8 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された 90 日齢雌の POA における CB 陽性細胞の分布。

EE 投与により、雌では不明確であった CB の塊 (図 5 の赤矢印の指すところを参照) の領域が雄のように拡大していることがわかる (赤矢印)。緑は Alexa 488 による CB 陽性反応。Propidium Iodide (PI : 紫色) 染色によって組織構造を示している。

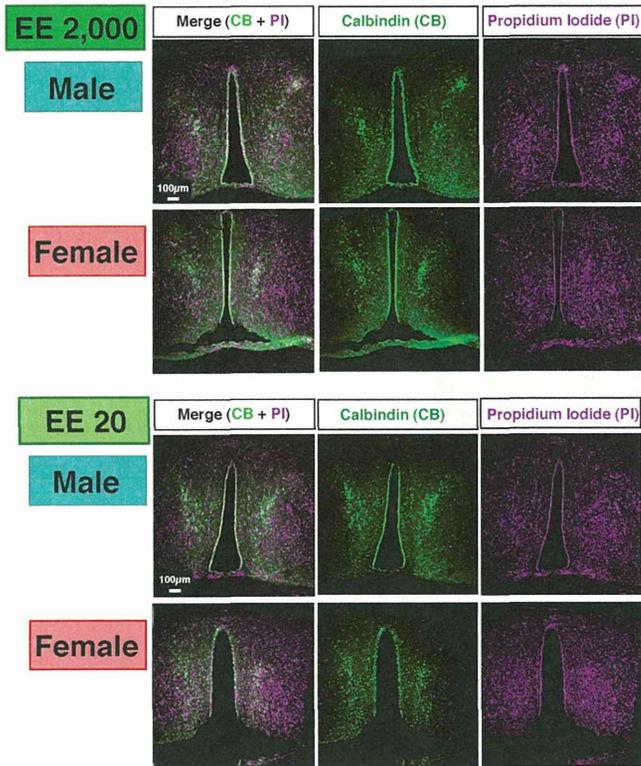


図9：生後24時間以内に Ethynylestradiol を 2,000µg/kg あるいは 20µg/kg を単回皮下投与された90日齢雌雄のPOA中心部におけるCB陽性細胞の分布。雄におけるCBの減少と雌におけるCBの増加は、EE20群に比べてEE2000群の方が顕著であることがわかる示された。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI：紫色) 染色によって組織構造を示している。

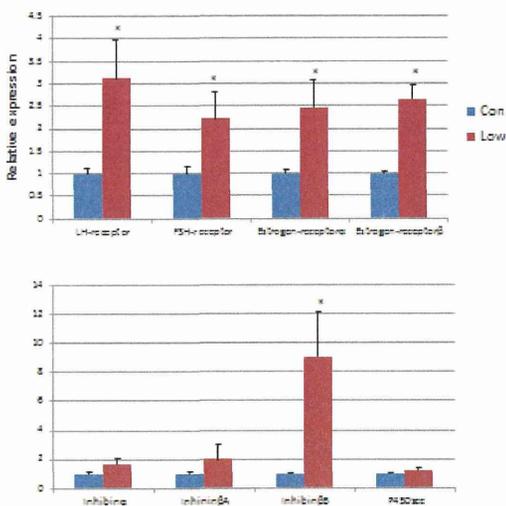


図10 卵巣におけるLH受容体の遺伝子発現