

図11 卵巣におけるLH受容体の遺伝子発現

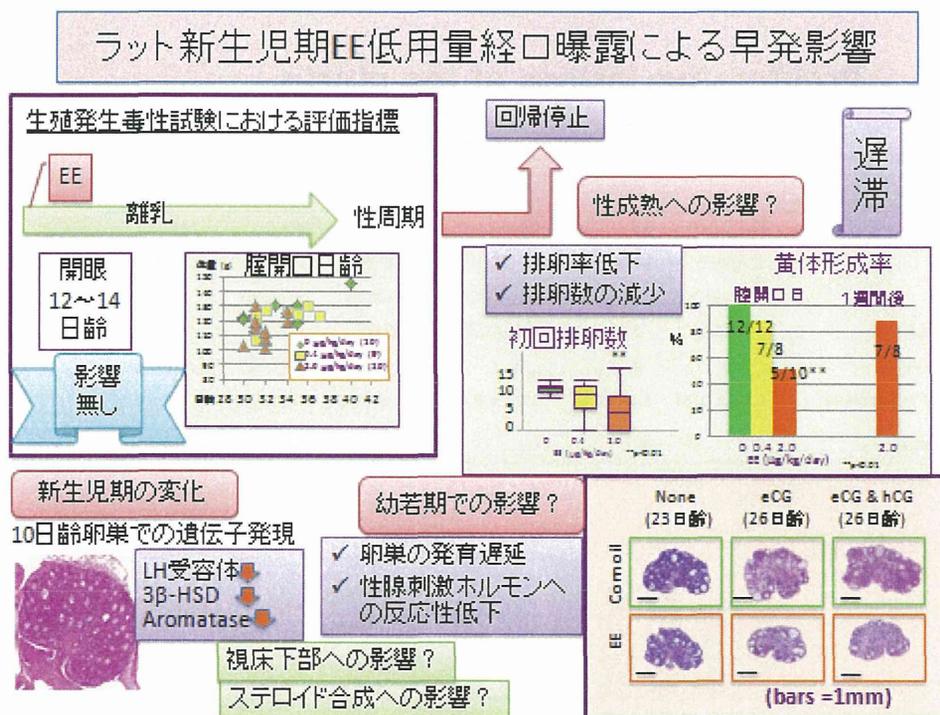


図12 卵巣におけるLH受容体の遺伝子発現

Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)

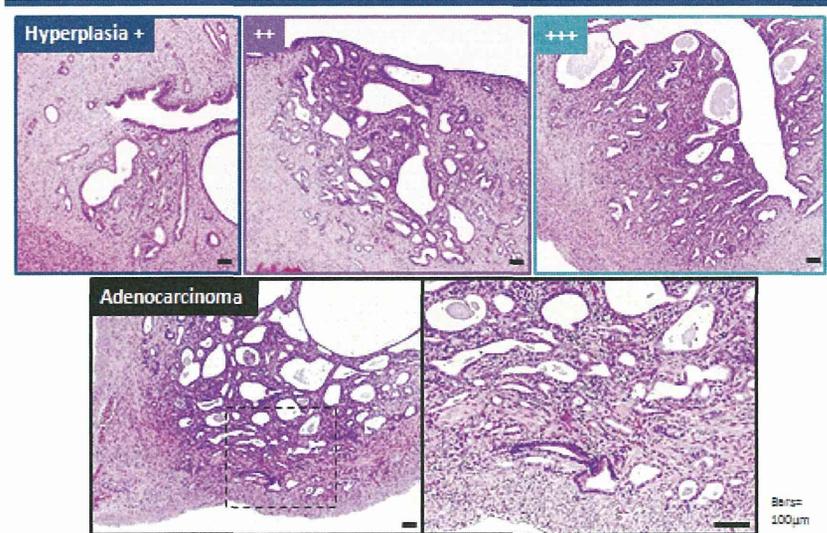


図 13 子宮の過形成秒本と子宮内膜腺癌

Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)

EE (µg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined	24	24	24	24	24	24
Hyperplasia	13 (54%)	20 (83%)	16 (67%)	19 (79%)	17 (71%)	20 (83%)
Slight (+)	7 (29%)	15 (63%)	6 (25%)	10 (42%)	6 (25%)	7 (29%)
Moderate (++)	6 (25%)	5 (21%)	10 (42%)	5 (21%)	7 (29%)	9 (38%)
Severe (+++)	0	0	0	4 (17%)	4 (17%)	4 (17%)
Multiplicity of hyperplasia*	1.08 ± 0.28	1.05 ± 0.22	1.25 ± 0.45	1.21 ± 0.42	1.24 ± 0.44	1.35 ± 0.59
Adenocarcinoma	0	0	0	0	3 (13%)	2 (8%)

* The average number of proliferating lesions per rat bearing these lesions.

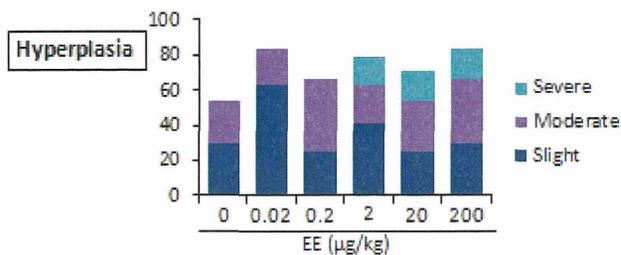


図 14 子宮の過形成秒本と子宮内膜腺癌

Histopathology of the ovary (10 month-old)

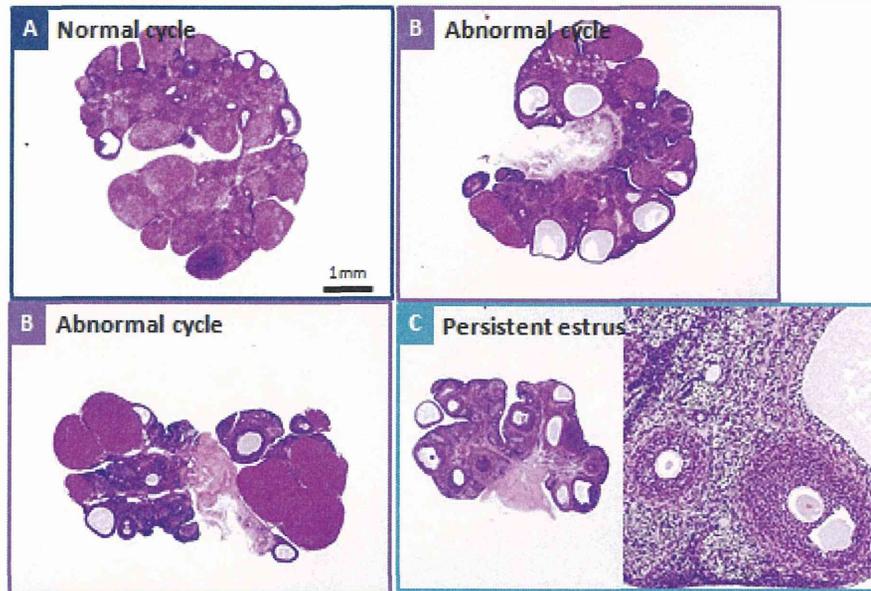
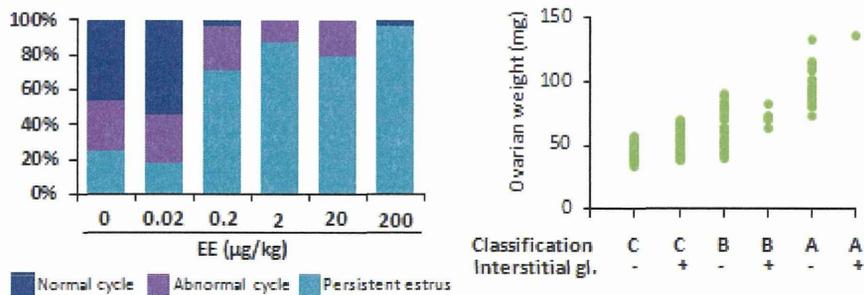


図 15 10ヶ月の意の卵巢の組織像

Histopathology of the ovary (10 month-old)



	EE (µg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		24	22	24	24	24	24
Increase of interstitial gl.		7 (29%)	3 (14%)	12 (50%)	8 (33%)	12 (50%)	15 (63%)*
Follicular cyst		9 (38%)	7 (32%)	19 (79%)**	24 (100%)**	23 (96%)**	23 (96%)**
Luteal cyst		7 (29%)	7 (32%)	4 (17%)	1 (4%)*	3 (13%)	0**
Ovaritis		0	0	0	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)

図 16 卵巢の病理組織学的所見

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

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
研究協力者：森川朋美 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：Pramod Dakhil 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
東京農工大学獣医生理学教室

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。平成 24 年度は以下の 2 点を中心に研究を行った。まず遅発影響がエストロゲン受容体(ER) α を介していた昨年の結果を確認する目的で、それぞれのアゴニスト(ER α agonist, PPT; ER β agonists, DPN)を昨年の 10 倍の高用量投与し確認した。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 α を介していることが確認できた。また感受性の高い遅発影響指標である性周期早期異常を起こす標的として視床下部のサージ制御部位の異常の可能性が考えられたため、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 ラットに人為的 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動物、EE 大量曝露によりオス化動物および 6 ヶ月の加齢ラットと比較した。その結果、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。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 α 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。

A. 研究目的

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。しかし遅発型影響発現に時

間がかかることから、既存の繁殖毒性試験の観察期間では検出されないこともあり、機序解明を含む遅発影響に関する研究は遅れている。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し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。

平成 23 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 PPT1000mg/kg 体重群は持続発情の早期に発現し、その時期は EE20 μ g/kg 体重群と同様であった。これらの結果より、遅発影響はエストロゲン受容体(ER) β ではなく α を介した影響であると考えられた。しかし、文献では、ER β アゴニスト投与でも遅発影響の特徴である性周期異常の早期化が報告されていることから、今年度はさらに高用量を投与して確認を行った。

性周期早期異常は、遅発影響も最も衛的な指標であること平成 22 および 23 年度の研究で明らかとなった。この性周期を制御は、エストロゲンのポジティブフィードバック制御機構による LH サージが必須である。本年度は、遅発影響の LH サージに対する影響についての検討を開始した。また、性周期停止に至る性周期異常は加齢でも認められていることから、加齢と性周期の観点からも検索した。

B. 研究方法

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。本年度は遅発影響の長期指標の一つである発がんへの作用、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 を新生児期曝露した 10 ヶ月齢の雌ラットについて生殖器・内分泌器官の病理組織学的解析およびホルモン測定により内分泌学的解析を実施した。その結果、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 EE0.2 μ g/kg 以上で、腺癌の発生が EE20 μ 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 μ g/kg 以上群で明らかな、02 μ g/kg では軽度なプロゲステロン値の低下が観察され、個体として相対的高エストロゲン状態であることが示唆された。

EE0.2 μ 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いた。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。また本年度は遅発影響のメカニズム解析として、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。その結果、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。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。

B-1-1 遅発影響発現とエストロゲン受容体(ER) α 、 β との関連性

昨年の研究成果より、遅発影響誘発量である EE20 μ g/kg は、PPT1000 μ g/kg と同様のエストロゲン活性を示し、遅発影響を惹起できたことから、本年度はさらにこの 10 倍量の PPT および DPN を生後 24 時間以内

に単回皮下投与し、高用量においても DPN が遅発影響を惹起しないことを検索した。観察期間は昨年と同様 5 ヶ月齢まで性周期を継続的に観察した。また、性成熟、21 日齢の幼若動物を用いた子宮肥大試験(EE 2 μ g/kg を 3 日間投与)により、新生児期 PPT および DPN 新生児期曝露による子宮のエストロゲン感受性についても検索した。また正常性周期を示す動物の発情前期および発情期の子宮および卵巣重量を測定した。実験計画を図 1 に示す。

B-2 遅発影響と LH サージの関連性についての検討

また遅発影響の LH サージに対する影響についての予備検討を開始した。遅発衛器量誘発量である EE20 μ g/kg および PPT 1000 μ g/kg を新生児期単回皮下投与した動物で、11 から 13 週齢に正常性周期が確認された動物の卵巣を摘出 1 週間後に、ethnylbenzoate (EB)を午前 9 時に 3 日間投与し、3 日目の午前 11 時には Progesterone (P4) を投与し、人工的な LH サージを惹起させた。午前 11 時、午後 3、5 および 7 時に 5 から 6 匹の動物を解剖して血中 LH 値を測定した。また、大量曝露により性成熟前より性周期停止誘発させる量である EE2000 μ g/kg 新生児期曝露動物、および加齢動物として 6 ヶ月齢の無処置に同様に処置を行い比較した。

(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

性周期観察において、高用量 PPT 群では 12 週齢より持続発情を主とする異常性周期を示す動物が増加し始め、その後経時的に

増加し、観察期間終了時の 21 週齢では大部分の動物が異常性周期を示した。一方、高用量 DPN 群の性周期は対照群とほぼ同様に推移し、その頻度に有意な差は認められなかった(図 2)。

膣開口時期において、いずれの投与群も対照群と同様であり、開口時の体重にも影響は認められなかった(表 1,2)。

幼若動物を用いた子宮肥大試験により、高用量 PPT、DPN 新生児期曝露動物における子宮のエストロゲン活性は、無処置群の子宮重量は対照群と差が認められなかったが、EE 投与群では子宮重量の有意な低下が認められた。DPN 群は対照群と同様であった(表 3)。また正常性周期を示す 10 週齢の発情前期および発情期の子宮および卵巣重量には投与による影響は認められなかった。

C-2. 遅発影響と LH サージの関連性についての検討

各群の LH サージ値を示す(図 3)。対照群では、午後 3 時に顕著に高い LH 値を示し、その後 19 時まで減少した。一方、PPT20 μ g/kg 群では、対照群より 2 時間あとの午後 5 時に最も高い値を示し、値としては対照群と同様であった。PPT 群の推移は EE20 μ g/kg 群と同様であったが、ピークの LH 値は低かった。性周期が異常の EE2000 μ g/kg 群および 6 ヶ月齢動物ではいずれも低いベースラインで推移し、変化は認められなかった。

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、

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ことから、PPT10,000 μ g/kg も遅発影響量であることが確認できた。H22,23 年度の研究結果と総合的に考察し、EE200 μ g/kg と同程度の遅発影響誘発量であると推察される。しかし、子宮肥大試験により、EE200 μ g/kg 群では検出されなかったエストロゲ

ン感受性の低下が認められたため、子宮に対する影響は PPT10,000 μ g/kg のほうが強い可能性も示唆された。DPN については、10,000 μ g/kg まで投与しても投与に関連した変化がいずれの項目にも認められなかったことから、遅発影響は ER α を介していることが確認できた。

遅発影響と LH サージの関連性についての検討

人為的 LH サージを惹起により、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いることが明らかとなった。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。PPT で同様にパターンを示したことから、おそらく ER α を介していることと推察されたが、今回の 2 時間ごとの検索では、新の LH サージ時期を逸している可能性があり、午後 3 時から 5 時までは 1 時間ごとの検索が必要であると考えられた。本年度明らかになった LH サージ発現パターンは、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、視床下部に焦点を絞った研究を含む詳細な検討が必要と考えられる。

E. 結論

遅発影響発現とエストロゲン受容体 (ER) α 、 β 高用量投与の実験より、遅発影響は ER α を介した変化であり、 β は関与しないことが確認できた。遅発影響と LH サージの関連性についての検討より、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いることが明らかとなった。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、さらに視床下部に焦点を絞った研究が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 9) 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
- 10) 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
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.

2. 学会発表

- 19) Midori Yoshida¹, Miwa Takahashi¹, Tomomi Morikawa¹, Kaoru Inoue¹, Saori Matsuo¹, Kazuyoshi Taya², Gen Watanabe². 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)
- 20) 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)

- 21) 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)
- 22) 高橋美和, 井上薫, 松尾沙織里, 森川朋美, 吉田緑. 17α -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)
- 23) 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)
- 24) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1 実験計画

Figure 1

Experimental design of additional study for confirmation of delayed effects of neonatal exposure to high-dose ER α and β dual agonists on the female reproductive tracts in Donryu rats

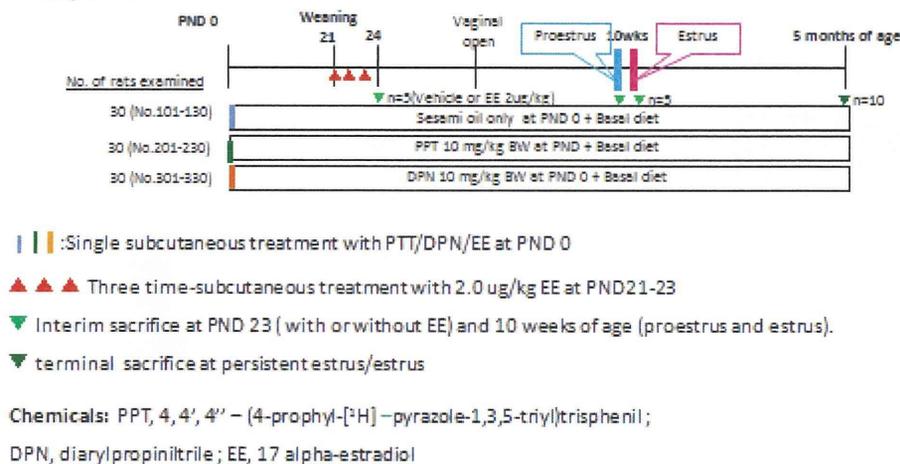


図2 異常性周期を示す動物の頻度の推移

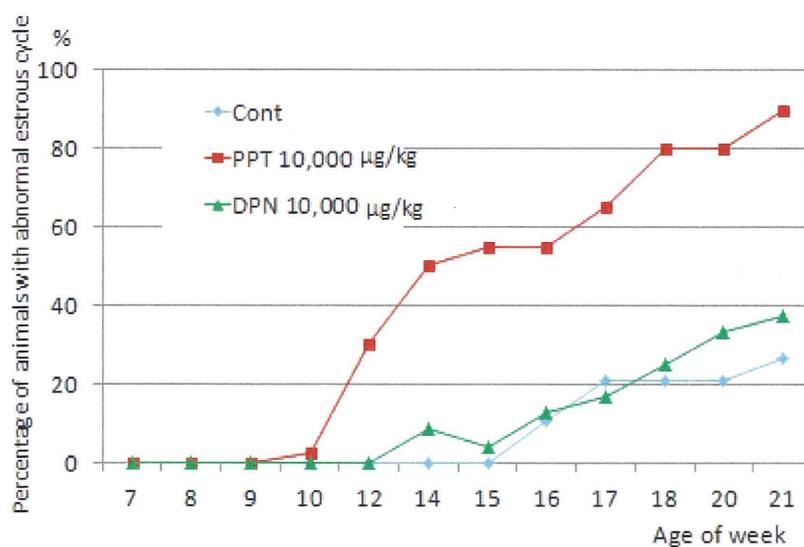
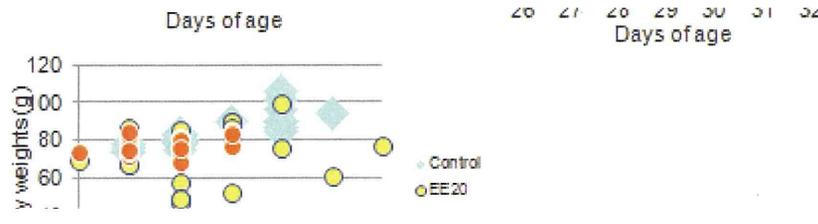


Fig. 2 The incidence (%) of animals exhibiting abnormal cyclicity by vaginal cytology



Body weights (g)
120
100
80
60
40
20
0
26

表1 平均臍開口日と平均体重

		臍開口日	臍開口日の平均体重
Control	mean	28.4	79.7
	SD	1.2	6.4
PPT 10mg/kg	mean	28.7	82.0
	SD	1.0	7.6
DPN 10mg/kg	mean	28.7	86.4
	SD	1.1	9.8

ontrol
PN100
PN100

表2 臍開口日の分布と平均体重

Dose		PND 26	PND 27	PND 28	PND 29	PND 30	PND 31	Total animals
Control	No. of animals	0	8	11	7	3	2	31
	BW(g)		79.4	77.2	83.1	82.3	78.4	79.7
PPT 10mg/kg	No. of animals	0	5	8	14	5	1	33
	BW(g)		74.2	78.7	84.0	86.6	97.0	82.0
DPN 10mg/kg	No. of animals	0	7	7	13	9		36
	BW(g)		77.3	77.0	88.3	97.8		86.4

表3 幼若動物を用いた子宮肥大試験によるPPTとDPN高用量新生児期曝露によるエストロゲン感受性

Intact	BW		Absolute weight (g)		ive weight (g/gBW)	
Control	616 ± 3.6		0.080 ± 0.014		0.13 ± 0.02	
PPT 10mg/kg	60.9 ± 3.9		0.073 ± 0.011		0.12 ± 0.01	
DPN 10mg/kg	62.9 ± 4.9		0.078 ± 0.010		0.12 ± 0.02	
Treated 0.2 μg/kg EE						
Control	61 ± 5.4		0.319 ± 0.060		0.521 ± 0.076	
PPT 10mg/kg	58.7 ± 3.7		0.231 ± 0.015 *		0.394 ± 0.021 *	
DPN 10mg/kg	63.9 ± 5.5		0.295 ± 0.021		0.466 ± 0.061	

*, Significantly different from control, at 5%

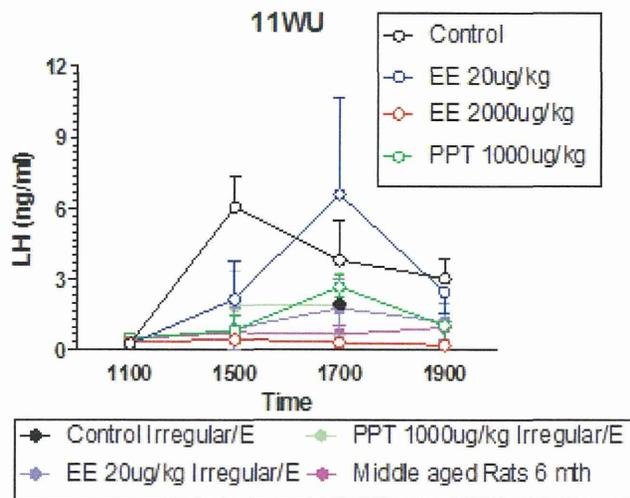


Fig. 3-1 Change of serum LH levels in young adult rats neonatally exposed to EE or PPT and middle aged ones.

図 3-1 LH サージ惹起による LH レベルの推移

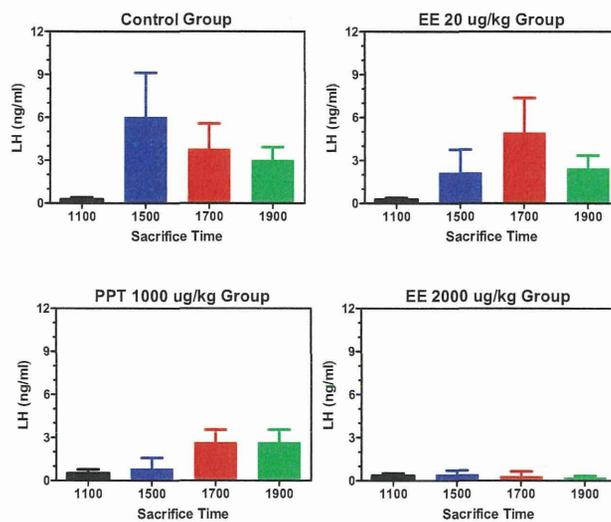


Fig. 3-2 Change of serum LH levels in young adult rats neonatally exposed to EE or PPT and middle aged ones.

図 3-2 LH サージ惹起による LH レベルの推移(群ごと)

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。本年度は遅発影響の長期指標の一つである発がんへの作用、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 を新生児期曝露した 10 ヶ月齢の雌ラットについて生殖器・内分泌系器官の病理組織学的解析およびホルモン測定により内分泌学的解析を実施した。その結果、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 EE 2 μ g/kg 以上で、腺癌の発生が EE 20 μ 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、EE 2 μ 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、個体として相対的高エストロゲン状態であることが示唆された。EE 2 μ g/kg 以上での子宮増殖性病変の増加より、子宮癌の発生も遅発影響の長期指標の一つであると考えられた。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。また本年度は遅発影響のメカニズム解析として、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。その結果、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。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。

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。前年度の研究成果では、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、卵巣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た。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。今年度は、平成 22 および 23 年度と継続解析を行ってきた遅発影響の長期指標の一つである子宮発がんへの修飾作用を形態および内部内分泌の両面から解析した。また、遅発影響の機序として視床下部における性周期の制御の異常が平成 22 年および 23 年度の研究から示唆されたため、正常性周期を示す young adult 時期から遅発影響によるキスペプチン変化が視床下部のいずれの部位で生じているのか検討を開始した。

B. 研究方法

B-1. 子宮発がんへの修飾作用および生殖器・内分泌臓器への長期影響

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。

最終解剖までに経時的に動物を検査し、平成 22 および 23 年度に報告した。最終解剖において、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。

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。

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-17 β (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-2. Young adult ラットにおける部位別の視床下部の遺伝子発現解析

遅発影響誘発量の EE 新生児期曝露投与したラットの視床下部について、部位によるキスペプチンの変化の検索を開始した。遅発影響発現量である EE 20, および 200 μ g/kg を生後 24 時間以内に単回皮下投与した 10 週齢の Crj;Donryu ラットについて、正常性周期を示すラットを選抜した。発情前期および発情期の午前中に安楽死させ脳を摘出した。視床下部を視交叉にて前方と後方に分割し mRNA 発現を検索した。この発現を、溶媒対照群および数例ではあるが、新生児期 EE 大量曝露群 (20,000 μ g/kg、性周期が初期より異常で停止)、性周期異常を示す EE200 μ g/kg 群および雄ラットの視床下部と比較した。

凍結組織より Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) により抽出した total RNA 2 μ 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) を使用して今年度 Kiss1 遺伝子 について 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 KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914_ml を使用した。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¹⁾。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 Young adult までの子宮における細胞増殖活性

B-1 で使用した動物のうち、生後 14 日齢から 10 週齢で得られた子宮について、被覆上皮、腺上皮および間質に分けて細胞増殖活性(PCNA 抗体)を検索した。

B-4. 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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. 子宮発がんへの修飾作用および生殖器・内分泌臓器への長期影響

10 ヶ月齢の子宮で観察された増殖性病変を図 1 に示し、その頻度および個体あたりの病変数(multiplicity)を図表 1 に示した。EE 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群では、子宮の内膜過形成の程度の増加傾向が認められ、multiplicity においても、EE2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群では

増加傾向が認められた。また、EE20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群では子宮内膜腺癌が低頻度ながら観察された。その他子宮、膣に観察された変化を図表 2、3 に記載した。子宮内膜ポリープあるいは子宮腺筋症について投与に関連した変化は認められなかったが、EE0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で子宮角部の内膜扁平上皮化生が増加した。発癌剤投与に起因する変化として血管系腫瘍が対照群を含む各群に低頻度ながら散見された。

子宮癌の発生は卵巣の変化と関連が深いことから、卵巣についても詳細に検討し、10 ヶ月齢の卵巣の形態像と重量および性周期および投与との関連性を解析した。正常性周期を示す個体と比較し、性周期異常を示す個体の卵巣は萎縮し、黄体数の減少が観察されたが(図 2)、持続発情を示す個体ではさらにその傾向が顕著であった(図 2、図表 4)。卵巣萎縮の重篤化は卵巣重量の減少とも比例していた(図表 4)。投与との関連性について、EE0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の投与群で、持続発情を示す卵巣の用量依存性の有意な増加と、のう胞化を示す卵巣の有意な増加が認められた(図表 4)。

卵巣からのステロイドホルモンおよびインヒビン、下垂体からの FSH、LH およびプロラクチン測定結果を図 3 に示した。プロゲステロンを除き投与に関連した意義ある変動は認められなかった。プロゲステロンについては、EE2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上で有意な減少が認められた。

C-2. 視床下部の遺伝子発現解析

視床下部前方部位では、発情前期の Kiss-1 mRNA の発現が EE20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ともに有意な低下を示した(図 4)。これらの群の発情期および異常性周期を示す EE200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群は値に有意な差は認められなかった。EE 大量投与群と雄の値は顕著に低下していた。視床下部後方部位では、発情前期、発情および比較対象としたいずれの群においても投与に関連した有意な変動は認められなかった(図 4)。

C-3 Young adult までの子宮における細胞増殖活性

いずれの時期の部位においても細胞増殖活性は対照群であり、投与による影響は認められなかった(図 5,6)。

D. 考察

子宮発がんへの修飾作用および生殖器・内分泌臓器への長期影響遅発影響を詳細に検討した結果、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 μ g/kg 以上で、子宮内膜腺癌の発生が EE20 μ 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の個体が増加し、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 μ 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、相対的高エストロゲン状態が示唆された。同群以上で子宮内膜の扁平上皮化生の増加も高エストロゲン状態を反映している可能性がある。EE2 μ g/kg 以上での子宮増殖性病変の増加は、子宮腺癌の発生も遅発影響の長期指標の一つとなりうることを示していた。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。相対的高エストロゲン状態の持続はラットだけでなくヒトにおいても子宮癌の高リスク因子として広く知られている。また、昨年度の成果として、遅発影響の指標として子宮のエストロゲン受容体の発現が変化することを報告した。新生児期エストロゲン曝露による子宮エストロゲン受容体の変化についての多くの報告がある。したがって、遅発影響による子宮増殖性病変増加に、子宮における直接的なエストロゲン受容体感受性の変化が関与している可能性も否定できず考慮すべきと考えられた。

子宮内膜腺癌以外の生殖器系については特に遅発影響との関連ある変化は認められなかった。血管系腫瘍の増加は、子宮癌のイニシエーターとして EENG を子宮腔内投

与したラットで同様の腫瘍が認められることから、ENNG 投与による影響であると考えられた。

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 ラットを用いた視床下部キスペプチンの遺伝子発現では、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。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。平成 23 年度の生後 14 日齢の視床下部においても Kiss-1 mRNA の発現が低下することが観察された。予備検討段階ではあるものの、EE 高用量曝露ではこのような変化は認められなかったことから、高用量曝露により視床下部前方のサージ制御部位が破壊され、雄型の視床下部となっている可能性が示唆された。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。

E. 結論

本年の結果より子宮癌の発生も遅発影響の長期指標の一つである可能性が考えられ、機序として早期持続発情発現に関連した卵巣萎縮による相対的高エストロゲン状態が考えられたが、子宮エストロゲン受容体の感受性変化も考慮すべきと考えられた。新生児期遅発影響量 EE 曝露で、性周期制御センターである視床下部前方の kiss1 neuron の mRNA レベルが発情前期のみ低下したことから、遅発影響の機序として視床下部の変化の重要性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 14) 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
 - 15) 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
 - 16) 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.
 - 17) 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.
- ### 2. 学会発表
- 25) Midori Yoshida¹, Miwa Takahashi¹, Tomomi Morikawa¹, Kaoru Inoue¹, Saori Matsuo¹, Kazuyoshi Taya², Gen Watanabe². 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)

- 26) 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)
- 27) 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)
- 28) 高橋美和, 井上薫, 松尾沙織里, 森川朋美, 吉田緑. 17 α -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)
- 29) 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)
- 30) 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)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)

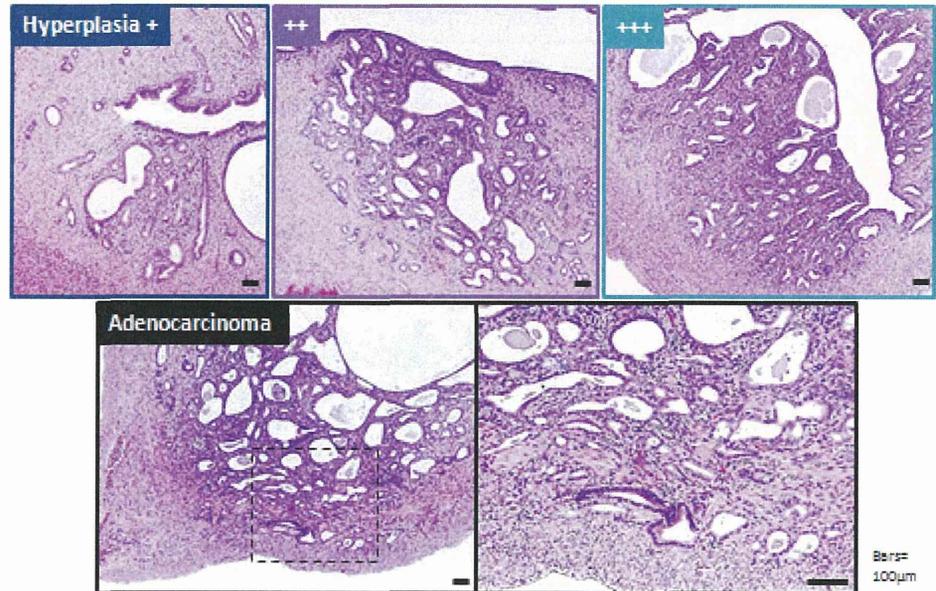
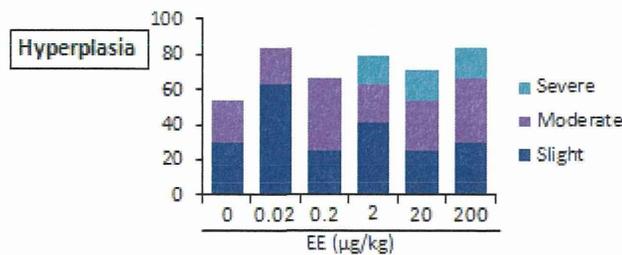


図1 子宮の増殖性変化

Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)

EE (µg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined	24	24	24	24	24	24
Hyperplasia	13 (54%)	20 (83%)	16 (67%)	19 (79%)	17 (71%)	20 (83%)
Slight (+)	7 (29%)	15 (63%)	6 (25%)	10 (42%)	6 (25%)	7 (29%)
Moderate (++)	6 (25%)	5 (21%)	10 (42%)	5 (21%)	7 (29%)	9 (38%)
Severe (+++)	0	0	0	4 (17%)	4 (17%)	4 (17%)
Multiplicity of hyperplasia*	1.08 ± 0.28	1.05 ± 0.22	1.25 ± 0.45	1.21 ± 0.42	1.24 ± 0.44	1.35 ± 0.59
Adenocarcinoma	0	0	0	0	3 (13%)	2 (8%)

* The average number of proliferating lesions per rat bearing these lesions.



図表1 子宮における増殖性病変(上)と過形成と腺癌の発生状況(下)

Histopathological findings observed in the uterus (1)

EE (μg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined	24	24	24	24	24	24
Intraluminal hyperplasia	10 (42%)	13 (54%)	12 (50%)	9 (38%)	10 (42%)	16 (67%)
Cystic endometrial hyperplasia	8 (33%)	11 (46%)	14 (58%)	22 (92%)**	19 (79%)**	16 (67%)*
Adenomyosis	5 (21%)	11 (46%)	4 (17%)	3 (13%)	1 (4%)	0*
Squamous metaplasia	1 (4%)	0	9 (38%)*	11 (46%)**	12 (50%)**	7 (29%)*
Disappearance of lumina	0	0	0	0	0	1 (4%)

Findings	0	0.02	0.2	2	20	200
Intraluminal hyperplasia	10 (42%)	13 (54%)	12 (50%)	9 (38%)	10 (42%)	16 (67%)
Adenomyosis	5 (21%)	11 (46%)	4 (17%)	3 (13%)	1 (4%)	0*
Squamous metaplasia	1 (4%)	0	9 (38%)*	11 (46%)**	12 (50%)**	7 (29%)*

図表2 子宮で観察された病理組織学的変化(子宮内膜過形成および内膜腺癌を除く)(上)と、その組織像(下)

Histopathological findings observed in the uterus (2)

EE (μg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined	24	24	24	24	24	24
Stromal polyp	8 (33%)	12 (50%)	5 (21%)	5 (21%)	10 (42%)	9 (38%)
Focal hyperplasia of fibroblast	0	1 (4%)	1 (4%)	0	0	0
Fibroma	0	0	1 (4%)	1 (4%)	0	2 (8%)
Granular cell tumor	0	1 (4%)	0	0	0	0
Squamous cell hyperplasia (cervix)	4 (17%)	4 (17%)	2 (8%)	4 (17%)	5 (21%)	2 (8%)
Hemangioma	1 (4%)	0	0	0	2 (8%)	3 (13%)
Hemangiosarcoma	0	0	1 (4%)	2 (8%)	1 (4%)	0

Findings	0	0.02	0.2	2	20	200
Stromal polyp	8 (33%)	12 (50%)	5 (21%)	5 (21%)	10 (42%)	9 (38%)
Squamous cell hyperplasia (cervix)	4 (17%)	4 (17%)	2 (8%)	4 (17%)	5 (21%)	2 (8%)

図表3 子宮に観察された腫瘍性病変(内膜腺癌を除く)(上)と、持続発情を示す膣組織像とその膣スメア像(下)

Histopathology of the ovary (10 month-old)

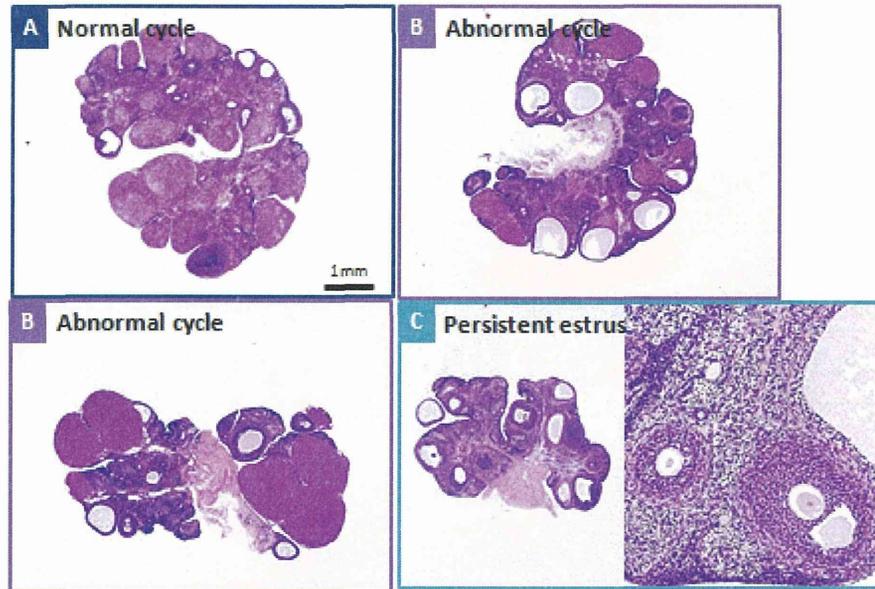
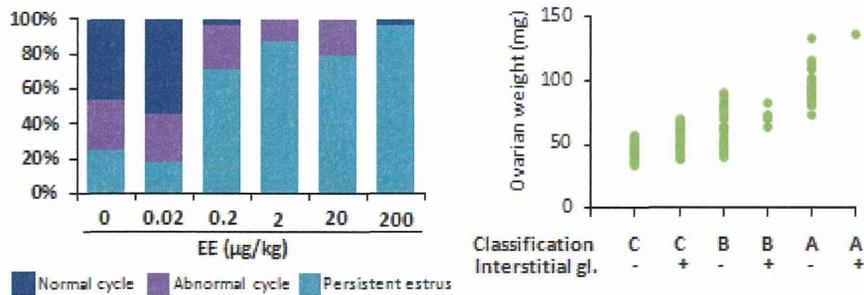


図2 10ヶ月齢ラットの卵巣の組織像

Histopathology of the ovary (10 month-old)



	EE (µg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		24	22	24	24	24	24
Increase of interstitial gl.		7 (29%)	3 (14%)	12 (50%)	8 (33%)	12 (50%)	15 (63%)*
Follicular cyst		9 (38%)	7 (32%)	19 (79%)**	24 (100%)**	23 (96%)**	23 (96%)**
Luteal cyst		7 (29%)	7 (32%)	4 (17%)	1 (4%)*	3 (13%)	0**
Ovaritis		0	0	0	1 (4%)	1 (4%)	2 (8%)

図表
0ヶ

10ヶ月齢の卵巣形態分類(正常性周期、異常性周期および持続発情)(上左)、卵巣重量と卵巣形態分類(正常性周期、異常性周期および持続発情)(上右)および卵巣の組織学的変化 (A, 正常性周期期; B, 異常性周期; C, 持続発情)

4 1
月 齢