

201236003B

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 22 年度~平成 24 年度

総合研究報告書

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 22～平成 24 年度

総合研究報告書

研究代表者 吉田 緑

平成 25(2013)年 3 月

目次

相互研究報告

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.27

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. 85

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. 115

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.133

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

..... p. 145

Ⅳ. 研究成果の刊行物

..... p. 147

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）
総合研究報告書

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)
代田真理子(麻布大学獣医学部教授)
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)
森川朋美(国立医薬品食品衛生研究所病理部)
Pramod Dakhil
(国立医薬品食品衛生研究所病理部/東京農工大学農学部)
代田欣二(麻布大学生獣医学科教授)
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)
岡崎祥子(東京農工大学大学)
野澤香織(東京農工大学大学)
安達博紀(日本獣医生命科学大学獣医学部)

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を明らかにし、リスク評価に有用な指標確立を目的とした。17 α -ethynylestradiol (EE)20 μ g/kg を生後 1 日以内のラットあるいはマウスへの単回皮下投与を遅発影響発現量の共通項目として各実験に組み入れた。3 年間の研究期間のうち、平成 22 から 23 年度前半は遅発影響の長期影響指標と用量相関性を、平成 23 年度後半と 24 年度は機序解明のための初期変化を視床下部・下垂体・性腺軸の変化および遅発影響と発がん性を解析した。得られた主な成果は、

1) **長期観察による遅発影響指標**：性周期異常(持続発情)の早期化が最も鋭敏な指標で、雄型乳腺の増加・卵巣の萎縮、子宮の前がん病変の増加等多くの有用な長期影響指標が検出

された。その発現には 5 ヶ月以上を要し現行の毒性試験では検出不可能なことが確認された。

2) **遅発影響の用量相関性と受容体との関連性**：遅発影響は用量依存性に発現し、各指標とも影響が認められない閾値が存在した。その影響はエストロゲン受容体(ER) α を介しており、生体へのエストロゲン活性を有する量であった。

3) **遅発影響の行動・神経新生への影響**：遅発影響量投与では性行動・性選好性や海馬等の生後神経新生に影響はないが、脳の性分化関連神経核への影響を示唆する新たな所見が得られた。

4) **遅発影響の初期変化**：遅発影響量投与した young adult 動物では、発情前期に視床下部前方のキスペプチン遺伝子発現の低下、LH サージ時刻の遅延など視床下部前方のサージ制御部位に関する異常が、視索前野神経核のオス型化、初回排卵異常等の視床下部後方のパルス制御部位に関する異常を認められた。また卵巣の遺伝子変化等卵巣への直接影響も示唆された。

5) **臨界期における遅発影響の感受性**：遅発影響発現は単回皮下投与より反復経口投与で増強し、経口投与でも皮下同様に遅発影響が発現した。

本研究結果より多くの指標が検出されたが、**性周期早期異常が最も感度の高い指標**と結論した。初期変化として、性周期に関わる視床下部前方の LH サージ制御部位だけでなく卵胞発育等に係る後方のパルス制御部位についても、正常性周期回帰中にすでに遅発異常の引き金が引かれたことを示唆する興味深い結果が得られた。確定には至らなかったものの**遅発影響の機序として神経内分泌機能の複数経路の初期からの変調が有力**であり、その変調が性成熟以降に性周期早期異常として顕在化する可能性が高い。しかし、現行の生殖発生毒性試験の観察期間や検査項目では遅発影響は検出できないことから、エストロゲン活性の確認や遅発影響懸念物質については観察期間の延長等の追加検査項目が遅発影響の有無の判定には必要であると結論した。

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通常の繁殖毒性試験では検出できないことから、早急な機序解明およびリスク評価系の確立が望まれる(図 1)。

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。

具体的な研究目的を以下に示す(図 2)：

- **長期観察による遅発影響指標**
 - **遅発影響の用量相関性と受容体との関連性**
 - **遅発影響の行動・神経新生への影響**
 - **遅発影響の初期変化**
 - **臨界期における遅発影響の感受性**
- また本研究の特徴として、実験にあたり以下の共通項目を設定して実施した：
- **共通する被験物質の設定** 研究成果

の相互解析のため 17 α -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 μ 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([]は主な分担担当者、()は動物系統等)

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]

出生後 24 時間以内の新生児雌ラット (GALAS、Crj:Donryu、SD、Wistar-Imamichi) に共通量を含む種々の用量の EE(範囲 0.02~2000 μ g/kg)を単回皮下投与し、最長 10 か月齢まで飼育し、エストロゲン依存性臓器の変化やホルモン動態、子宮がんへの修飾作用等を病理学および内分泌学的に検索した。種々の濃度の ER α および β agonist を同様に動物に処置して遅発影響とエストロゲン受容体との関連性を検索した。実験開始時に生後 24 時間以内に EE200 μ g/kg 単回皮下投与ラットの 1,2,4,24 時間後の各部位の体内 EE 濃度を測定した。

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 ラットの皮下に反復経口投与あるいは強制経口投与を行い上記 1. と同様に比較を行った。

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 0 日の雌雄 C57BL/6J マウスに高濃度と共通量 EE を投与し、性成熟前と 6 ヶ月齢時に海馬歯状回、脳室周囲下帯 (SVZ)、嗅球の新生細胞について検索した。同マウスを用いて脳内側視索前野 (MPA) における性分化状態を検索した。また同様に投与した 3 ヶ月齢雌雄マウスについても同様に検索した。

4. 臨界期曝露による遅発影響検出のための神経新生・行動内分泌学的アプローチ[川口、横須賀]

生後 0 日に高濃度および共通量 EE を投与した 6 および 5 ヶ月齢(10 週齢にて卵巣摘出)Wistar-Imamichi 雌ラットあるいは C57BL/6J マウスにを用いて各種神経行動試験を行った。変化が認められた場合は再現性を確認した。

5. 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)[渡辺、高橋、代田、横須賀、吉田]

出生後 0 日の雌ラット(GALAS、SD、Crj:Donryu、Wistar-Imamichi)に共通量を含む種々の濃度の EE(0.2~2000 μ g/kg)を単回皮下投与後(SD ラットでは反復経口投与を含む)、young adult まで飼育し、下垂体・卵巣・血清ホルモン測定、視床下部キスペチン関連遺伝子の変化、初回排卵(SD のみ)、性成熟、生殖器の形態変化を解析した。

生後 14 日で視床下部全域の young adult で視床下部前方および後方それぞれのキスペチン関連遺伝子の変化を検索した(GALAS)。

EE 共通量と遅発影響量 PPT を新生児期投与した正常性周期を回帰するラットの卵巣を摘出し、EE 共通量および LH サージパターンを卵巣摘出ラットで検索した (Crj:Donryu)。

10、100 $\mu\text{g/ml}$ EE で卵巣を培養しエストロゲン関連および LH 関連遺伝子を解析した (Wistar-Imamichi)。

(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。遅発影響量の共用量設定および同一試験での材料の共有化等、動物数の軽減に努めた。動物実験は国に指針に準拠し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]

- 動態として、新生児単回皮下投与した EE の全身、脳、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。
- 各系統ラットの共通の結果として、0.2~200 $\mu\text{g/kg}$ の EE 群では性成熟期(膈開口時期)やその後の性周期の回帰は対照群と同様であった。しかし用量依存性を示す性周期の早期異常(持続発情を主とする)が認められ、0.2 $\mu\text{g/kg}$ の EE 群における統計学的に有意な性周期早期異常の発現時期は 22 週齢であった (GALAS)。EE0.080 $\mu\text{g/kg}$ 単回皮下

投与、0.40 $\mu\text{g/kg}$ 5 日間連続経口投与でも同様の性周期早期異常が認められた (SD)。EE0.020 $\mu\text{g/kg}$ 投与の性周期は対照群と同様であった (GALAS)。

- 0.02 $\mu\text{g/kg}$ 以上 EE 単回皮下投与は幼若および成熟後動物ともに子宮肥大試験でエストロゲン活性を示した (GALAS, Crj:Donryu)。
- 1000 $\mu\text{g/kg}$ 以上の $\text{ER}\alpha$ アゴニストは、EE20 $\mu\text{g/kg}$ と同様の性周期早期異常を示したが、 β アゴニストでは 10,000 $\mu\text{g/kg}$ まで投与しても異常は認められなかった (Donryu)。
- 性周期以外の長期指標として EE0.2 $\mu\text{g/kg}$ 以上では 10 ヶ月齢において一部の乳腺に雄型乳腺組織が観察された (GALAS,SD)。
- 下垂体および肝臓重量の増加ならびに乳汁分泌を伴う乳腺の過形成が用量依存性に認められた (SD)。
- 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 $\mu\text{g/kg}$ 以上で、腺癌の発生が EE20 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ 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。EE2 $\mu\text{g/kg}$ 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(Crj:Donryu)。

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 μ g/kg)と比べて性周期異常皮下より低用量のEE0.08 μ g/kgx5回から現れた。また0.4 μ g/kgでは乳腺における乳汁の貯留亢進も認められた(SD)。
- EE反復経口投与動物の排卵検査および卵巢組織観察から排卵周期の停止が示唆されたが、原始卵胞数に差は認められなかった(SD)。

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]

- EE曝露マウスでは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・発現数、嗅球の大きさにも影響は認められなかった。
- マウス視索前野におけるカルビンジン(カルシウム結合蛋白質, CB)陽性細胞の分布パターンで雌の大型化、雄の小型化が観察され、雌雄差が不鮮明であった。

4. 臨界期曝露による遅発影響検出のための神経新生・行動内分泌学的アプローチ[川口、横須賀]

マウスラットともに高用量EE投与群のみで性行動・性選好性が抑制された。共通量EE投与群のみで新奇物体への探索行動お

よび受動回避学習能力が低下したが、再現性は認められなかった。

5. 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)

- Kiss-1 mRNA発現の有意な低下が、生後14日では0.02 μ g/kg以上のEE全投与群の視床下部全体で、10週齢の発情前期では共通量以上のEE投与で視床下部前方で認められた(GALAS, Crj:Donryu)。生後14日の視床下部全体ではKiss-1 receptor, ER α , ER β , GnRH, Cyp19a1遺伝子の発現に変化は認められなかった(GALAS)。
- 共通量EE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 α 発現の異常が認められた。細胞増殖には変化は看取られなかった。生後14日で血清FSHが低下した以外、10週を含め血清FSH, LH, E2, P4濃度に群間差は認められなかった(GALAS)。
- 共通量EE投与群では、離乳前において、下垂体中LH増加、卵巢中インヒビン量低下、卵胞および子宮内膜上皮の菲薄化が認められた。またEEと培養した摘出卵巢ではLH受容体遺伝子の増加が認められた(Wistar-Imamichi)。
- 遅発影響発現量の反復投与により血清中性腺刺激ホルモン濃度の低下およびエストロゲン標的遺伝子に変化が認められた(SD)。
- 遅発影響発現量の反復投与により膈開口時期に影響は認められなかった

が、初回排卵に至る卵胞発育の異常等、春機発動の遅延が明らかになった(SD)。

- 卵巣摘出ラットによる LH サージパターンの遅延が共通量 EE 投与で認められた。ER α アゴニストも同様の傾向を示した。加齢ラットおよび性周期異常動物では LH は低値で推移した(Crj:Donryu)。

D. 考察

投与後 24 時間の EE 血中濃度結果より、EE は脳を含む全身へ速やかに移行することが確認できた。

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

- 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あった。また雄型乳腺、萎縮卵巣等形態学的変化も長期指標となると考えられた。
- 性周期異常の発現には 5 ヶ月間以上を要し、生殖発生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。
- 遅発影響に明らかな用量相関性が認められた。遅発影響は単回皮下投与の場合 EE0.2 μ g/kg 以上の生体へのエストロゲン作用量で、ER α 受容体を介して発現すると考えられた。この結果は、エストロゲン様作用を示す化学物質の生体でのエストロゲン作用量は、遅発影響発現量である可能性を強く示唆している。
- 遅発影響は、経口投与においても皮下

とほぼ同量で影響が認められること、反復投与ではより低い用量から発現すると考えられる。ヒトにおける化学物質曝露は臨界期間持続すると予想されるため、投与経路、臨界期における投与時期については更なる検討が必要である。

- 共通量の EE 投与では性行動・性選好性に異常が認められなかったが、不安行動および受動回避学習に影響が示唆され、指標となる行動により至適濃度が異なることが示された。
 - 共通量の EE 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。しかし young adult マウスで脳の性分化部位の形態変化は、行動等へは影響しないが、視床下部で初期から変化が生じていることを示唆する所見と考えられた。
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
- 生後 14 および young adult における遅発影響量 EE 投与での視床下部、特に視床下部前方キスペプチン遺伝子低下や下垂体 LH の低下は、EE 新生児曝露によりエストロゲンの positive feedback 機構である性周期を司る視床下部サージセンターで初期から変化が起きていることを示唆しており、遅発影響の機序として極めて重要な所見と考えられた。生後 14 日の FSH 低下もこの関連している可能性がある。
 - 初回排卵時の卵胞発育異常、下垂体の LH の変化、視床下部性的二型核の雄型化は、エストロゲンの negative feedback

機構である視床下部後方に位置するパルス制御部位が早期から変化したことを示している。

すなわち今回の研究結果より、遅発影響は、視床下部の前方のサージおよび後方のパルスセンター双方に影響を及ぼした可能性が示唆された。ER を有するキスペプチンニューロンはサージおよびパルスセンター双方の上位に位置し、ER を介して GnRH ニューロンを制御すると考えられている。またキスペプチンは、哺乳類だけでなく鳥類や両生類でも共通の機能と報告されている。したがって、キスペプチンは遅発影響の機序として重要な因子であると考えられ、さらなる検索が必要と考えられた。

E. 結論

本研究結果より多くの指標が検出されたが、性周期早期異常は最も感度の高い指標と結論した。初期変化として、性周期に関わる視床下部の LH サージ制御部位だけでなく卵胞発育等パルス制御部位も早期より変化することを示唆する興味深い結果が得られた。確定には至らなかったものの遅発影響の機序として初期からの神経内分泌機能の複数経路の変調が有力であり、その変調が性成熟以降に性周期早期異常として顕在化する可能性が高いと考えられる。しかし、現行の生殖発生毒性試験の観察期間や検査項目では遅発影響は検出できないことから、エストロゲン活性の確認や懸念物質における観察期間の延長等の追加検査項目が遅発影響の有無の判定には必要であると結論した。

F. 研究発表

1. 論文発表

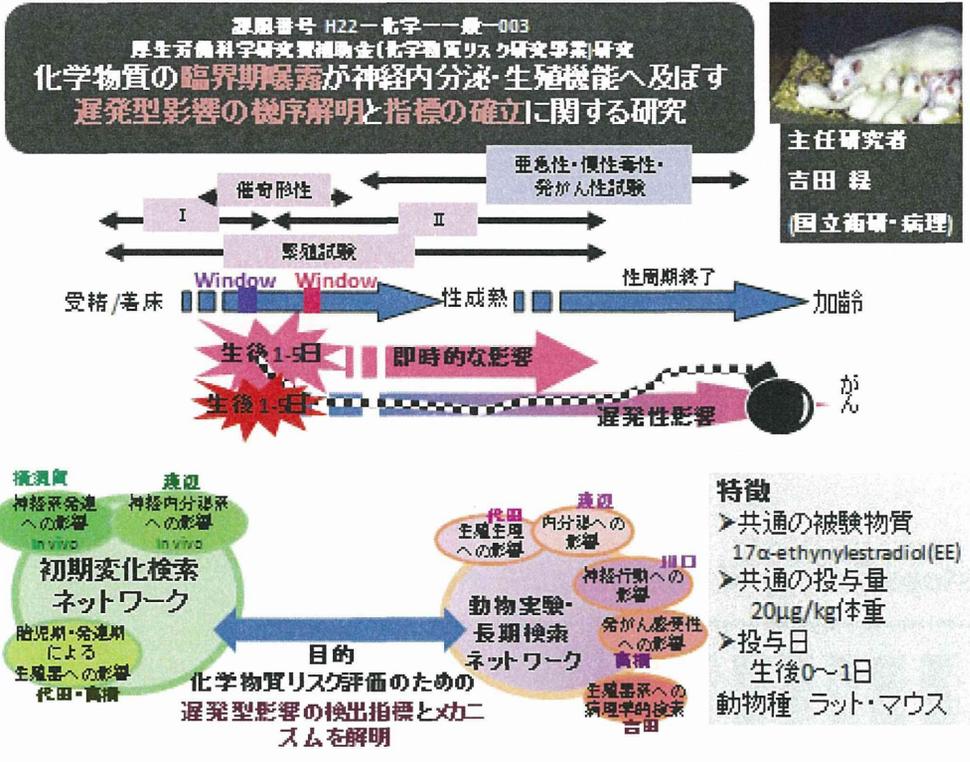
- 1) Takahashi M, Matsuo S, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Yoshida M. Development of an early induction model of medulloblastoma in Ptch1 heterozygous mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea. *Cancer Sci.* 103(12):2051-5. 2012
- 2) Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37: 681-689 2012
- 3) 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
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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

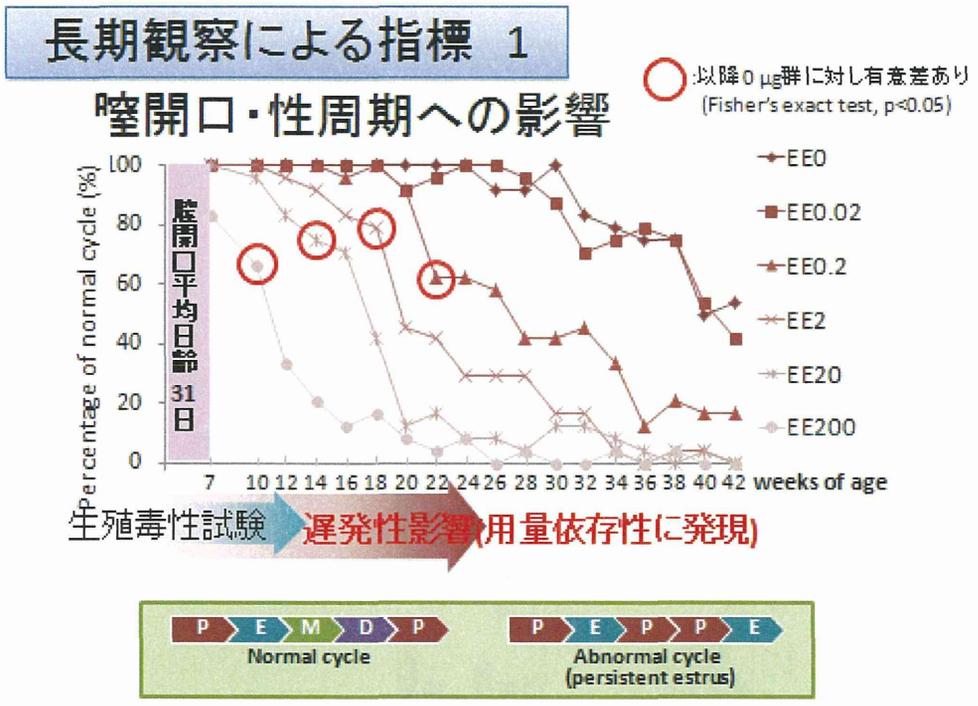
- 8) Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37: 681-689 (2012)
 - 9) Shirota M, Kawashima J, Nakamura 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 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)
 - 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 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)
 - 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 ethynylestradiol on the puberty of female rats. *Society for the Study of Reproduction 2012 Meeting* (2012年8月)
 - 10) 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栄職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 (2011.11)
 - 11) 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ジェ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)

- 12) Yokosuka.M., Adachi H., Nakada T., Saito TR.and Yoshida M. Neonatal exposure to 17 alfa-ethynylestradiol 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
- 13) 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
- 14) 第17回日本行動内分泌研究会 (2012年8月31日、京都)
- 15) 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)
- 16) 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)
- 17) 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)
- 18) 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 α 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)
- 19) 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



本研究の概念図

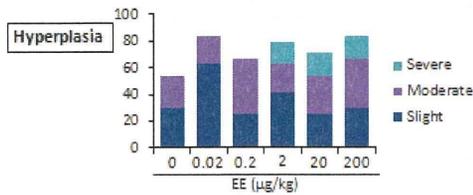


長期指標 1 用量依存性を示す早期性周期異常

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%)

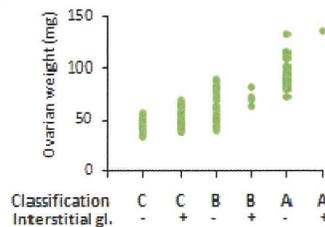
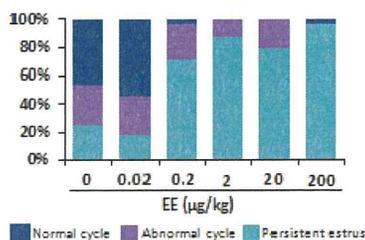
* The average number of proliferating lesions per rat bearing these lesions.



長期指標

子宮増殖性病変の増加
(EE 2 μg/kg<)

Histopathology of the ovary (10 month-old)



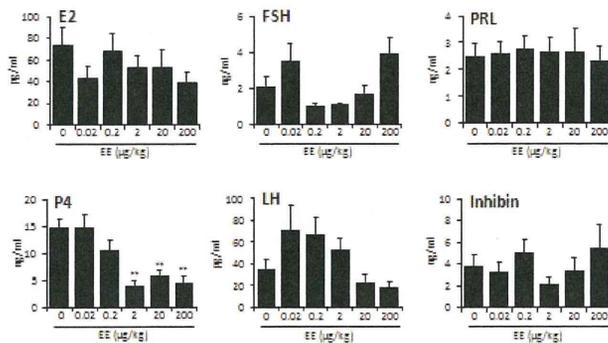
長期指標

卵巣の萎縮

(EE 2 μg/kg<)

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%)

Sex-related hormones (10 month-old)



Mean ± SE

長期指標

相対的抗エストロゲン(プロゲステロン低下による)

(EE 2 μg/kg<)

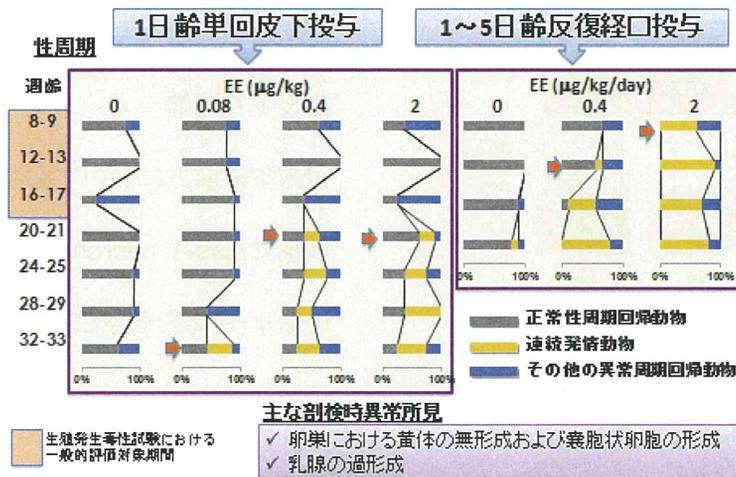
Summary of results (long term effects)

EE (μg/kg)	Onset of abnormal cycle	Ovary		Uterus			Hormone		Mammary g.
		Weight	Histology	Hyperplasia (Severe)	Adeno carcinoma	Squamous metaplasia	E2 P	E:P ratio	Virilization
0	32wk~						-		
0.02	32wk~						-		
0.2	22wk~	↓					-		+
2	18wk~	↓↓	Loss of CL	+		+	- ↓ ↑		+
20	14wk~	↓↓	Follicular cyst	+	+	+	- ↓ ↑		+
200	10wk~	↓↓		+	+	+	- ↓ ↑		+

長期指標

10ヶ月例までの長期観察により検出された長期指標一覧

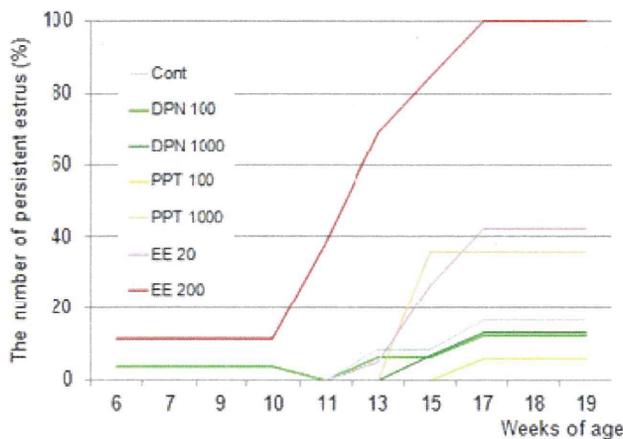
ラット新生児期EE低用量曝露による早期性周期異常



長期指標

早期性周期異常

生後1日齢皮下投与と強
制経口投与の比較



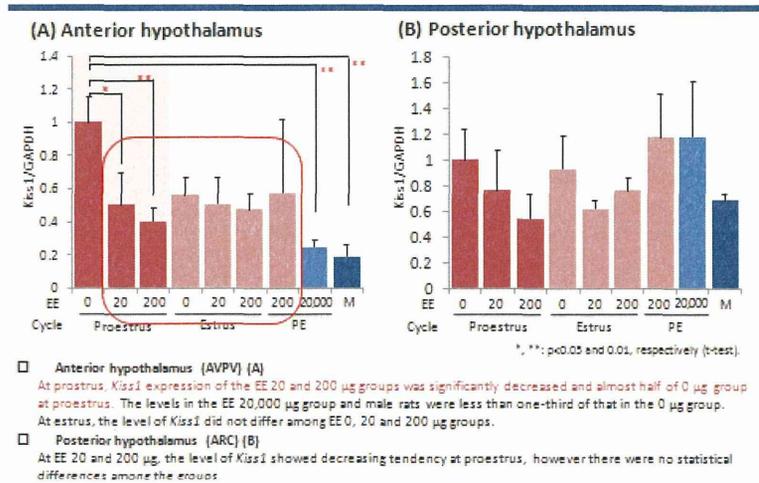
長期観察による性周期早期と
エストロゲン受容体との関連
性

エストロゲン受容体α経由で
性周期異常が生じている

The number of persistent estrus (%)

短期指標

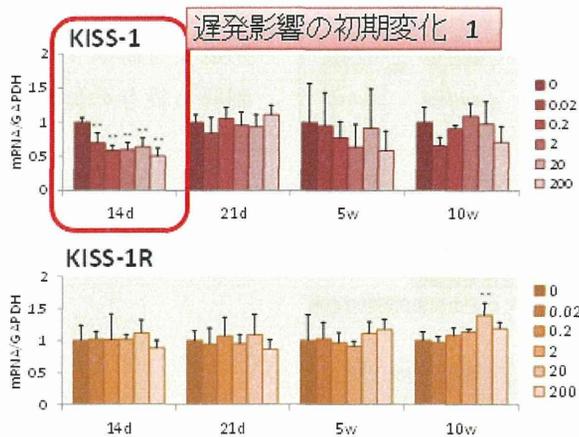
Kiss1 expression in the anterior (A) and posterior (B) hypothalamus



短期指標

生後14日齢の視床下部(部位別せず)におけるKissp1n neuron遺伝子低下

視床下部 遺伝子解析



短期指標

生後10週齢
視床下部前方において発情前期にKiss-1 neuron遺伝子の低下(遅発影響量EE投与)

Summary of results (PND14-10wk)

EE (µg/kg)	In vivo estrogenic activity	Uterus			Hormone	Gene expression in the hypothalamus	Vaginal opening	Onset of abnormal cycle
		Development of the uterine gl.	ERα	PCNA				
0	-	-	-	-	-	-	31.1	32wk~
0.02	+	-	-	-	-	14d	31.6	32wk~
0.2	+	10wk	-	-	PND14	KISS-1 ↓	31.4	22wk~
2	+	↓	-	-	FSH ↓	KISS-1R, ER1, ER2, GnRH, CYP19a1	31.3	18wk~
20	+	PND21 ↓	↓↓	-	FSH ↓	No change	31.1	14wk~
200	+	PND21 ↓	↓↓	-	FSH ↓	No change	31.3	10wk~

短期指標のまとめ

- 性成熟前のFSH低下
- 10週齢までの子宮の被覆上皮におけるエストロゲン受容体発現の低下

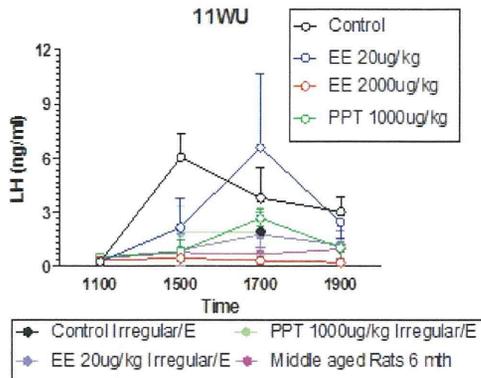


Fig. 3-1 Change of serum LH levels in young adult rats neonatally exposed to EE or PPT and middle aged ones.

短期指標

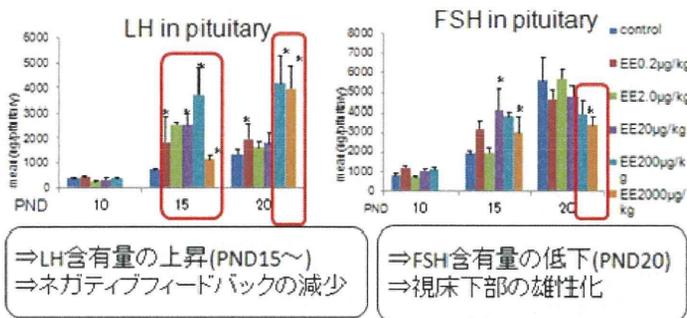
13 週齢において卵巣摘出後 LH サージ惹起

遅発影響量 EE では

対照群より LH のピークが遅延。値は低いもののエストロゲン α 受容体アゴニストも同質変化を示した

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

短期指標

下垂体の LH および FSH

量

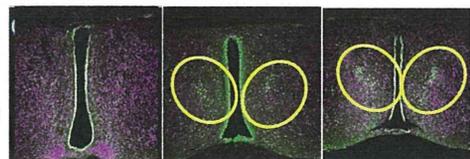
海馬 (高次脳機能に関与) 歯状回における成体神経新生への影響



いずれも遅発影響なし (EE 20ug/kg 群)



内側視床前野 (SDN-POA) (生殖機能に関与)



短期指標

マウスの海馬神経新生には影響なし。

視床前野におけるガルベインゲン陽性神経核のオス型化 (下 蛍光染色 右から対照群雌、遅発影響量投与雌、対照群雄、○囲んだ部分)

