

## 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）  
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 $\mu$ g/kg 体重を用いて検討した。遅発影響がエストロゲン受容体(ER) $\alpha$ 、 $\beta$  何れを介して生ずるのかそれぞれのアゴニスト(ERagonist, PPT; ER $\beta$ 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、PPT1000  $\mu$ g/kg 以上の投与は性成熟には影響しないものの、早期性周期異常(持続発情早期化)を誘発した。PPT1000、10,000  $\mu$ g/kg と EE20、200 $\mu$ g/kg はそれぞれ同程度の遅発影響誘発量と考えられた。DPN では全て対照群と差異がなかったことから、性周期異常をはじめとする遅発影響はエストロゲン受容体(ER) $\alpha$  を介して遅発影響が生じていると考えられた。この ER $\alpha$  による遅発影響にも閾値が存在した。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 ラットに卵巣摘出後人為的 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遅延した。性周期が異常な動物では LH サージは惹起されなかった。この結果から、遅発影響は性周期が正常な時期からサージ時期の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。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。

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。

3年間の研究期間の目的として、

- 遅発影響がエストロゲン受容体(ER)  $\alpha$ 、 $\beta$  何れを介して生ずるのかそれぞれのアゴニスト(ER  $\alpha$  agonist, PPT; ER  $\beta$  agonists, DPN)をEEと同様の方法で新生児期に投与して性成熟時期、エストロゲン感受性と性周期の変化について比較した。
  - 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、遅発影響の初期変化の検索の一環として遅発影響とLHサージの関連性について検討した。

## B. 研究方法

### B-1. 遅発影響発現とエストロゲン受容体(ER) $\alpha$ 、 $\beta$ との関連性

遅発影響誘発の共通量として、EE20  $\mu$  g/kg 体重を選択し、生後24時間以内のCrj:Donryuラットに単回皮下投与した。また同様にEE200  $\mu$  g/kg 体重、エストロゲン受容体(ER)  $\alpha$ 、 $\beta$  それぞれのアゴニスト(ER  $\alpha$  agonist, PPT; ER  $\beta$  agonists, DPN)を100、1000および10,000  $\mu$  g/kg 体重の3用量設定した。これらの動物を5ヶ月齢まで飼育し、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  $\mu$  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日齢に剖検して子宮重量を測定in vivoエストロゲン活性を比較した。

### B-2 遅発影響とLHサージの関連性についての検討

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。遅発影響量であるEE20  $\mu$  g/kg およびPPT 1000  $\mu$  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  $\mu$  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) $\alpha$ 、 $\beta$ との関連性

PPT/DPN 100、1000  $\mu$  g/kg 投与と、10,000  $\mu$  g/kg 投与は2回の試験に分けて実施した。性周期観察において、PPT1000  $\mu$  g/kg 群はEE20  $\mu$  g/kg 群と、PPT10,000  $\mu$  g/kg 群はEE200  $\mu$  g/kg 群とほぼ同様の持続発情早期化を示した(図1,2)。一方、DPN群の性周期では、高用量投与群まで対照群とほぼ同様に推移した。

膣開口時期において、PPT/DPNともに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。

幼若動物を用いた子宮肥大試験において、PPT、DPN、EE投与群いずれもvesicleおよびEE投与による子宮重量に、有意な差異は認められなかった(図3)。

また10週齢の発情前期および発情期の子宮および卵巣の重量および形態に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4)。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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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) $\alpha$ 、 $\beta$ との関連性の結果より、

PPT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、EEをはじめとするエストロゲン類新生児期曝露による性周期の早期化という遅発影響は、ER $\alpha$ 受容体を介した変化であると考えられた。PPT100  $\mu$ g/kg群では性周期に影響は認められなかったことから、受容体を介した性周期への影響に閾値があると考えられた。

##### 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 $\alpha$ 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時まででは1時間ごとの検索が必要であると考えられた。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。

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) $\alpha$ 、 $\beta$ 高用量投与の実験より、遅発影響はER $\alpha$ を介した変化であり、 $\beta$ は関与しないことが確認できた。このER $\alpha$ を介した変化は閾値のある変化であった。また遅発影響と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可能性が高い。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 10) 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
- 11) 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
- 12) 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.
- 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

- 20) 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)

- 21) 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)
- 22) 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)
- 23) 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)
- 24) 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)
- 25) 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 子宮肥大試験

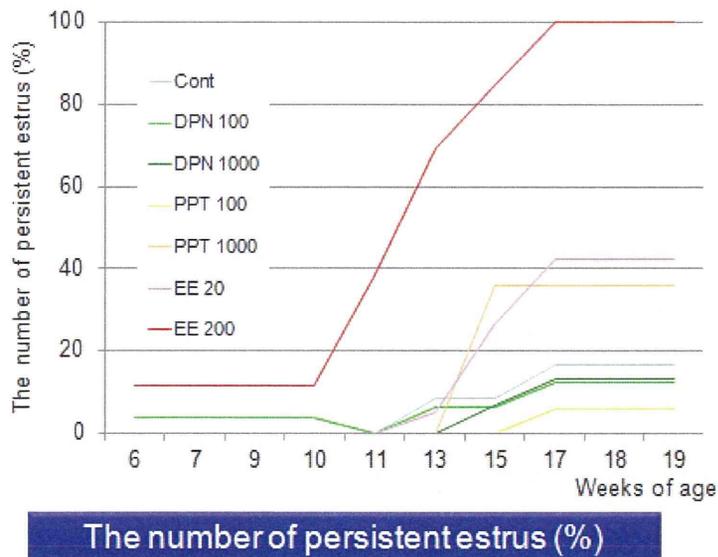
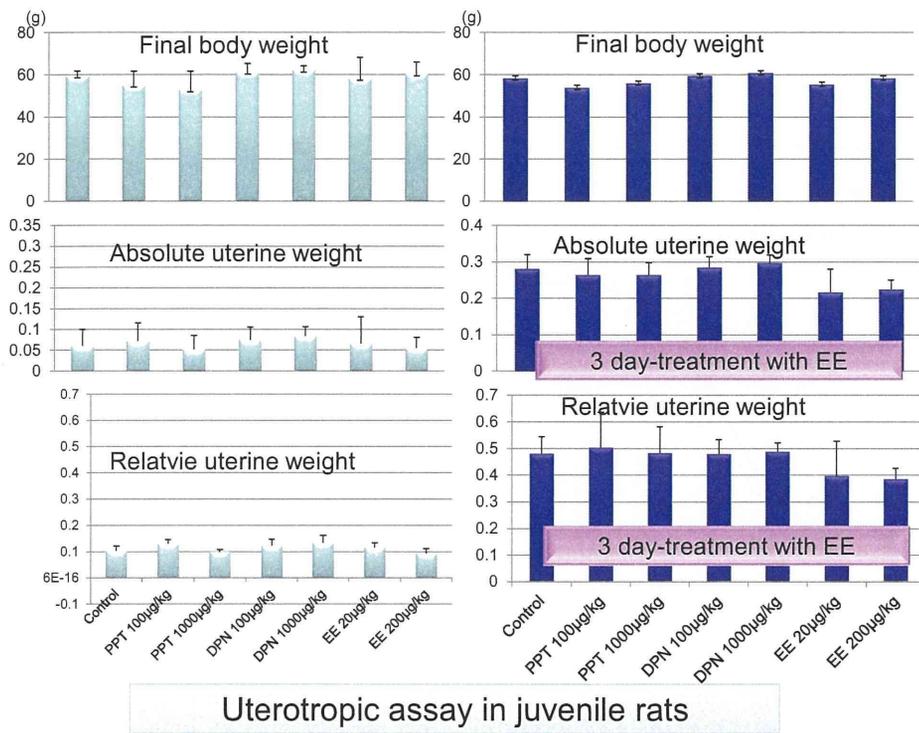


図2 異常性周期(持続発情)の発生頻度(%)  
PPT、DPNともに100および1000 µ/kg投与

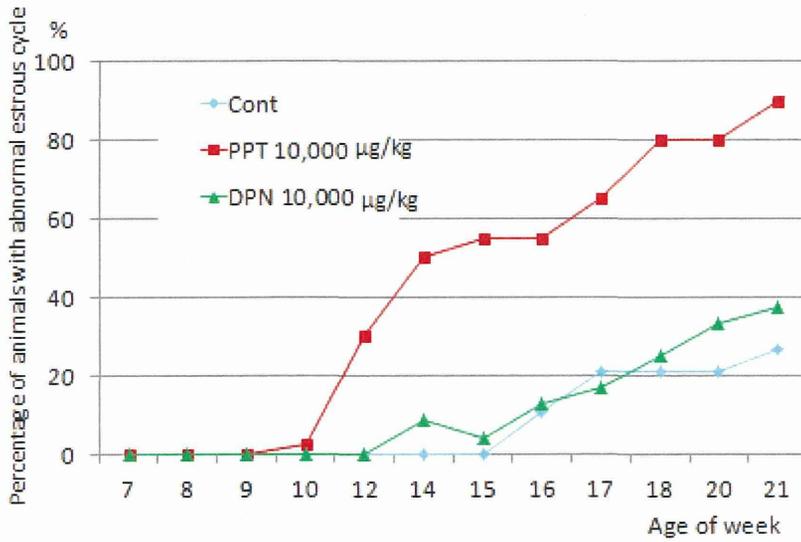


図3 青洲異常を示す動物の頻度の推移(%)

PPT、DPNともに10,000 µg/kg投与

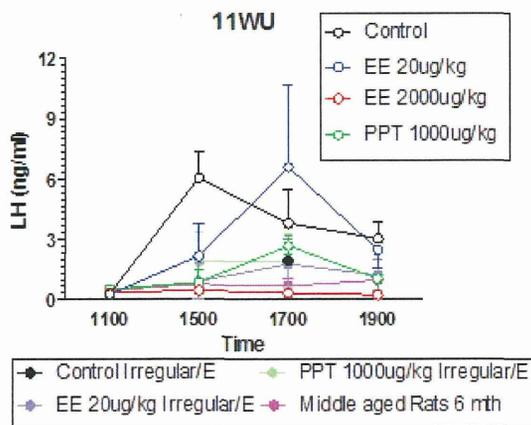


図41 LHサージ惹起によるLHレベルの推移

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

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 $\alpha$ -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。実験に先立ち、新生児単回投与の EE は脳を含む全身に速やかに分布し排泄されることを確認した。

遅発影響の長期影響の評価として、雌ラットに 0.02~200  $\mu$ g/kg まで種々の濃度の EE を生後 24 時間以内に単回皮下投与して 10 ヶ月齢まで長期観察し、病理学および内分泌学的変化について詳細に検討した。その結果、最も確実に感度の高い遅発影響の長期指標として、性周期変調の早期化が 0.2  $\mu$ g/kg 群以上で用量依存性に発現した。0.2  $\mu$ g/kg 群での性周期変調の発現には約 5 ヶ月間を要した。その他の長期指標として子宮内膜過形成あるいは腺癌の増加が 2  $\mu$ g/kg 群以上で増加した。同群では卵巣萎縮、プロゲステロン値の低下が認められた。子宮増殖性病変増加は、早期持続発情発現に関連した卵巣萎縮が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も考慮すべきと考えられた。雄型乳腺組織が長期指標として観察されたが、下垂体、乳腺腫瘍への影響は検出されなかった。これらの長期指標は用量依存性を示し、in vivo エストロゲン活性誘発量より高い量で認められた。

Young adult までに観察される初期変化として、視床下部のキスペプチンニューロン遺伝子発現低下(14 日齢は視床下部全体、10 週齢では前方のみ)、性ホルモン低下、子宮被覆上皮における ER $\alpha$  の発現低下が検出された。性成熟後の血清性ホルモン濃度に群間差はなく、卵巣組織にも投与による変化が認められなかった。

性周期変調の原因として性成熟前あるいは正常性周期を回帰中にすでに視床下部の排卵中枢の異常が生じていること推察された。視床下部における 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。子宮のエストロゲン受容体の発現に変化が認められことから EE 新生児期曝露により、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<sup>8)</sup>。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 $\alpha$ -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、H22 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. 生殖器・内分泌臓器および子宮発がんへの長期影響

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 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA, CAS No. 57-63-6) 0 (コントロール), 0.02, 0.2, 2, 20, 200  $\mu$ 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<sup>5)</sup>。P4 および estradiol-17 $\beta$  (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<sup>6)</sup>。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  $\mu$ 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  $\mu$ g/kg、性周期が初期より異常で停止)、性周期異常を示す EE200  $\mu$ 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 $\mu$ 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<sup>1)</sup>。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. EE の体内濃度分析

(財) 日本食品分析センター (大阪) に分析を依頼し、雄性新生児ラットを用いて EE 200 µg/kg 1 回皮下投与後 1, 2, 4, 24 時間における体内濃度を測定した (LC-MS/MS 法, 検出限界: 0.002 ppm)。

**Text Table EE level in the neonatal rats received 200 µg/kg subcutaneously.**

Organ		Time after EE injection (hours)	
		1	2
Whole body	(ppm)	0.096	0.095
Brain <sup>a</sup>	(ppm)	0.029	0.042
Liver <sup>a</sup>	(ppm)	0.093	0.099

a) Organs from 3 animals were pooled.

- under the detection limit (0.002 ppm)

### B-4. 子宮肥大試験

遅発性影響の検索に用いた EE 各用量の in vivo エストロゲン活性を確認するため、新生児期曝露実験で使用した母動物を用いて子宮肥大試験を行った。離乳 1 か月後、膣スメアを観察して性周期が正常に回帰している動物に卵巣摘出術を施した。14 日後、性周期が回帰していないことを確認し、43 匹を試験に供した。動物を 6 群に分け、sesami oil に溶解した EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 µg/kg を 1 回皮下投与し、約 24 時間後に深麻酔下で放血致死させた。子宮は膣とともに摘出し、脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight), 次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度、

重量を測定した (blotted weight)。

in vivo エストロゲン活性をさらに明確にするため、未成熟雌ラットを用いた子宮肥大試験を実施した。21 日齢の雌性 Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア) 60 匹を 6 群に分け、EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 µg/kg を皮下投与した。投与回数は新生児期曝露実験と同じ 1 回と、標準的な子宮肥大試験プロトコールとされている 3 回に設定した。最終投与の約 24 時間後に、卵巣摘出ラットと同様の方法で子宮重量の測定を行った。

### 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定は 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. 遅発影響による性周期および生殖器・内分泌臓器への長期指標

#### C-1-1 性成熟・性周期

膣開口の平均日齢はコントロール群、投与群ともに 31 日であった。性周期は、0 µg/kg 群では 26 週まで全例 4~5 日周期で規則的な発情周期を示し、その後不規則な性周期を示す個体が出現し始め、次第に増加した。一方、200 µg/kg 群では 10 週齢、20 µg/kg 群では 14 週、2 µg/kg 群では 18 週、0.2 µg/kg 群では 22 週より、0 µg/kg 群に比べ異常性周期を示す動物が有意に増加した。

その多くは持続発情を示し用量依存性に漸増した。0.02 µg/kg 群は 0 µg/kg 群とほぼ同様の推移を示した。

### C-1-2 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。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。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。

### C-1-3 子宮癌・卵巣・下垂体および卵巣ホルモン

10 ヶ月齢の子宮で観察された増殖性病変の頻度および個体あたりの病変数 (multiplicity) は、EE0.2 µg/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、EE0.2 µg/kg 以上の投与群では増加傾向が認められた。また、EE20 µg/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、膣として、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。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、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。卵巣萎縮の重篤化は卵巣重量の減少とも比例していた。投与との関連性について、EE0.2 µg/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。

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

ロラクチンについては、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 µg/kg 以上で有意な減少が認められた。

## C-2. 短期影響検索による遅発影響のメカニズム解析

### C-2-1 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, ERα, ERβ, 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。

視床下部前方部位では、発情前期の Kiss-1 mRNA の発現が EE20, 200 µg/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 µg/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。

### C2-2. 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 ともにばらつきが大きく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。

### C-2-3. 発達期の子宮における ERα 発現

ERα 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-3. EE の体内濃度分析

EE 200 µg/kg 1 回皮下投与後における全身、脳、肝臓における EE 体内濃度は、いずれも 4 時間後に最も高く、24 時間後では検出限界あるいはそれ以下のレベルであった。

### C-3. 子宮肥大試験

解剖時の体重に群間差は認められなかった。EE 投与後の子宮相対重量は、wet weight では 2 µg/kg 以上、blotted weight では 0.02 µg/kg 以上でコントロールに対し有意な高値を示した。未成熟雌ラットを用いた試験においても、解剖時の体重に群間差は認められなかった。EE1 回投与後の子宮相対重量は wet weight, blotted weight とともに 0.02 µg/kg 以上でコントロールに対し有意な高値を示した。EE3 回投与後の子宮相対重量は wet weight では 0.2, 2, 20 µg/kg で、blotted weight では 0.02 µg/kg 以上で有意に増加した。

## D. 考察

臨界期における 17 $\alpha$ -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。実験に先立ち、新生児単回投与の EE は脳を含む全身に速やかに分布し排泄されることを確認した。遅発影響の長期影響の評価として、雌ラットに 0.02~200µg/kg まで種々の濃度の EE を生後 24 時間以内に単回皮下投与して 10 ヶ月齢まで長期観察し、病理学および内分泌学的変化について詳細に検討した。その結果、最も確実に感度の高い遅発影響の長期指標として、性周期変調の早期化が 0.2µg/kg 群以上で用量依存性に発現した。0.2µg/kg 群での性周期変調の発現には約 5 ヶ月間を要した。その他の長期指標として子宮内膜過形成あるいは腺癌の増加が 2µg/kg 群以上で増加した。同群では卵巣萎縮、プロゲステロン値の低下が認められた。子

宮増殖性病変増加は、早期持続発情発現に関連した卵巣萎縮が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も考慮すべきと考えられた。雄型乳腺組織が長期指標として観察されたが、下垂体、乳腺腫瘍への影響は検出されなかった。これらの長期指標は用量依存性を示し、in vivo エストロゲン活性誘発量より高い量で認められた。

Young adult までに観察される初期変化として、視床下部のキスペプチンニューロン遺伝子発現低下(14 日齢は視床下部全体、10 週齢では前方のみ)、性ホルモン低下、子宮被覆上皮における ER $\alpha$  の発現低下が検出された。性成熟後の血清性ホルモン濃度に群間差はなく、卵巣組織にも投与による変化が認められなかった。

性周期変調の原因として性成熟前あるいは正常性周期を回帰中にすでに視床下部の排卵中枢の異常が生じていること推察された。視床下部における 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。子宮のエストロゲン受容体の発現に変化が認められことから EE 新生児期曝露により、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。

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

- 1) 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.
- 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) 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
- 4) 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
- 5) 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.
- 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.

## 2. 学会発表

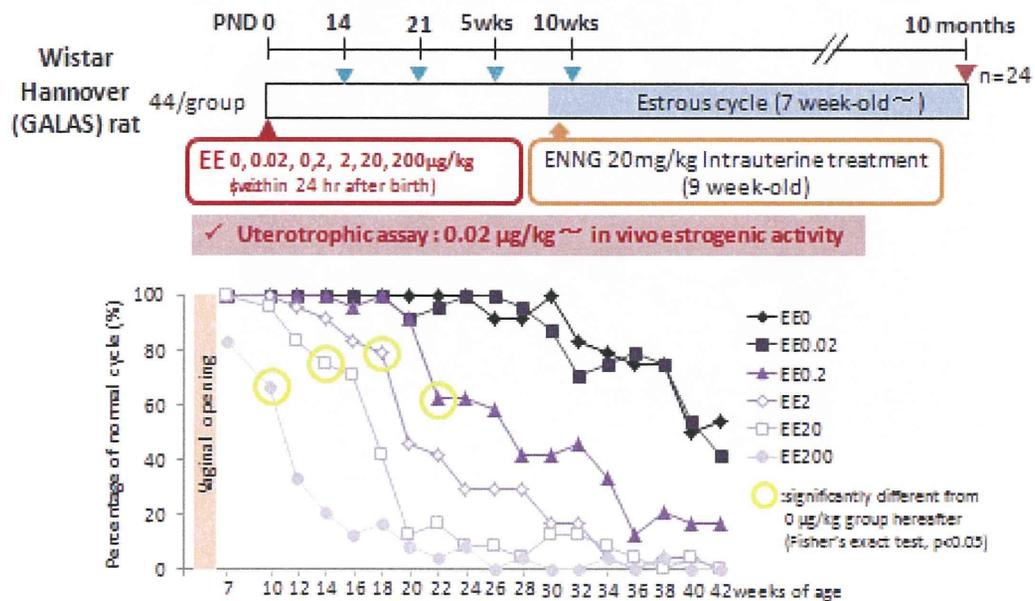
- 1) Midori Yoshida<sup>1</sup>, Miwa Takahashi<sup>1</sup>, Tomomi Morikawa<sup>1</sup>, Kaoru Inoue<sup>1</sup>, Saori Matsuo<sup>1</sup>, Kazuyoshi Taya<sup>2</sup>, Gen Watanabe<sup>2</sup>. Involvement of Estrogen Receptor Alpha in Delayed Effects of Neonatal Exposure to Estrogens in Rats. 第 31 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)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 長期観察による遅発影響の指標

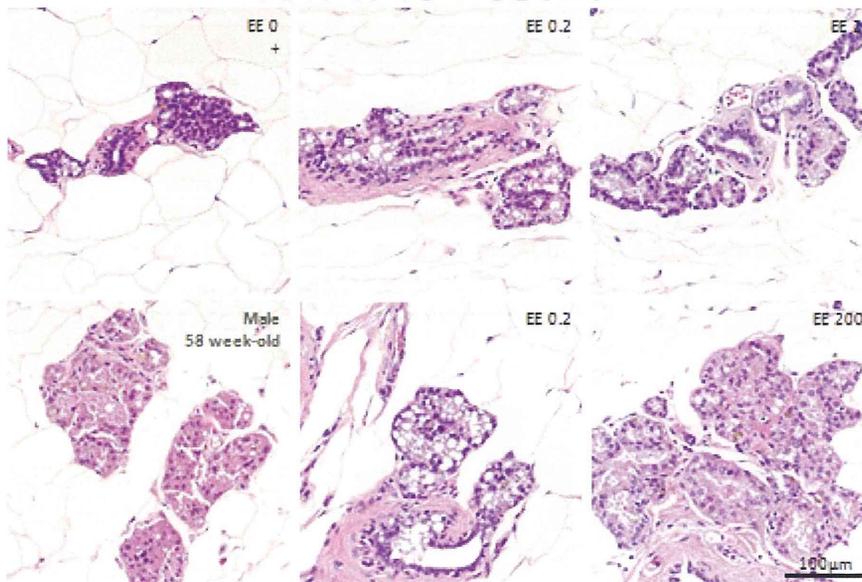
### Examination of delayed effects of neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) on the female reproductive tracts in Wistar Hannover rats



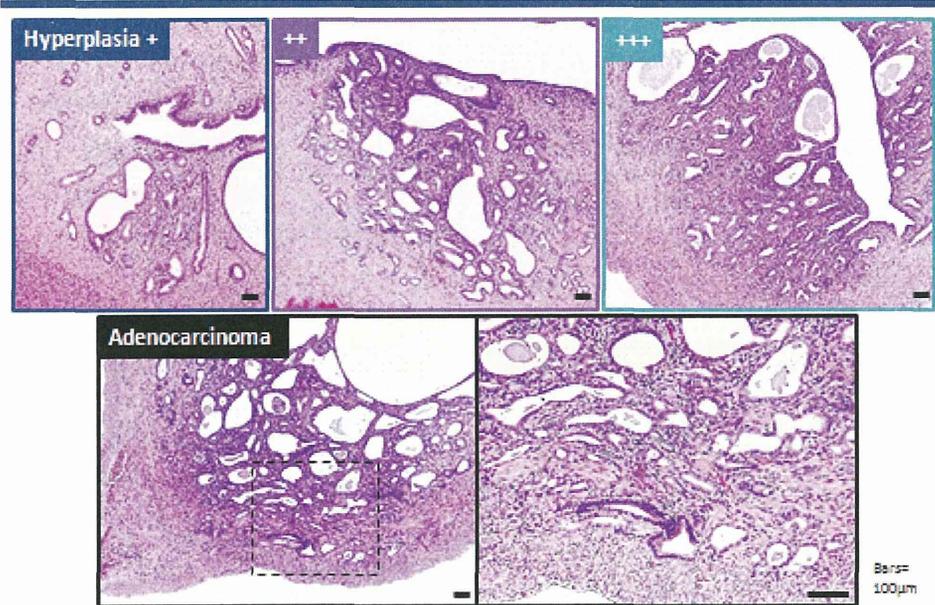
Sequential changes in incidence of normal estrous cyclicity in GALAS rats neonatally exposed to EE.

異常性周期の用量依存性の早期発現

## 乳腺腺房の男性化



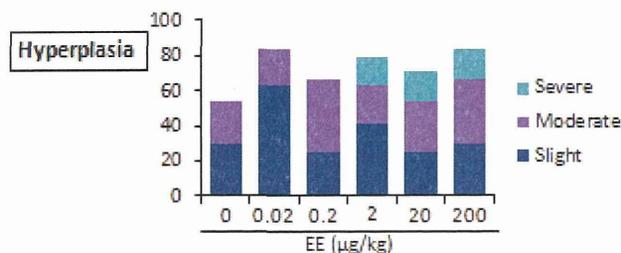
## Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)



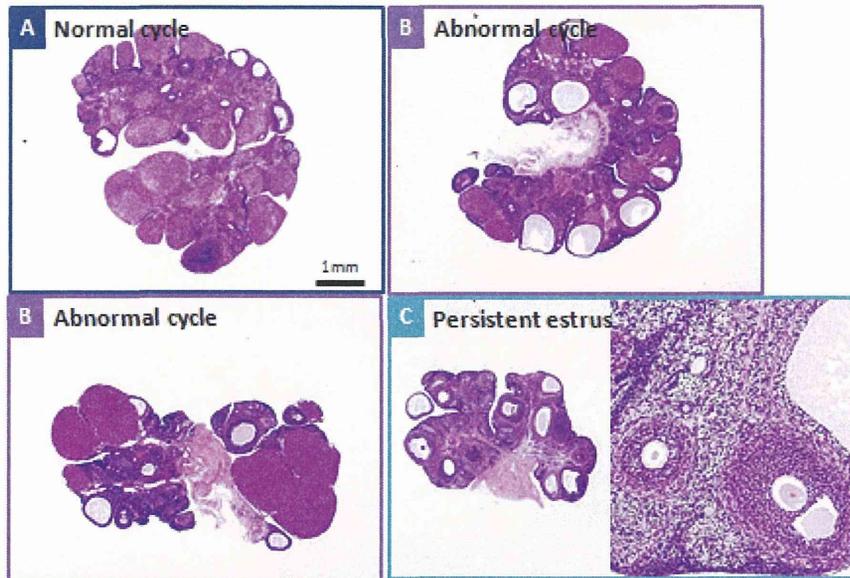
## Proliferative lesions of the uterus (10 month-old)

	EE (μg/kg)	0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		24	24	24	24	24	24
<b>Hyperplasia</b>		<b>13 (54%)</b>	<b>20 (83%)</b>	<b>16 (67%)</b>	<b>19 (79%)</b>	<b>17 (71%)</b>	<b>20 (83%)</b>
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
<b>Adenocarcinoma</b>		<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>3 (13%)</b>	<b>2 (8%)</b>

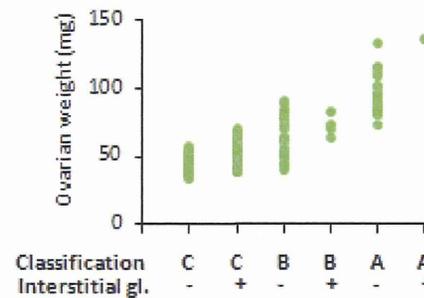
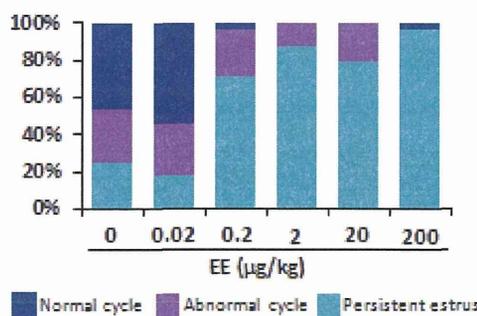
\* The average number of proliferating lesions per rat bearing these lesions.



## Histopathology of the ovary (10 month-old)

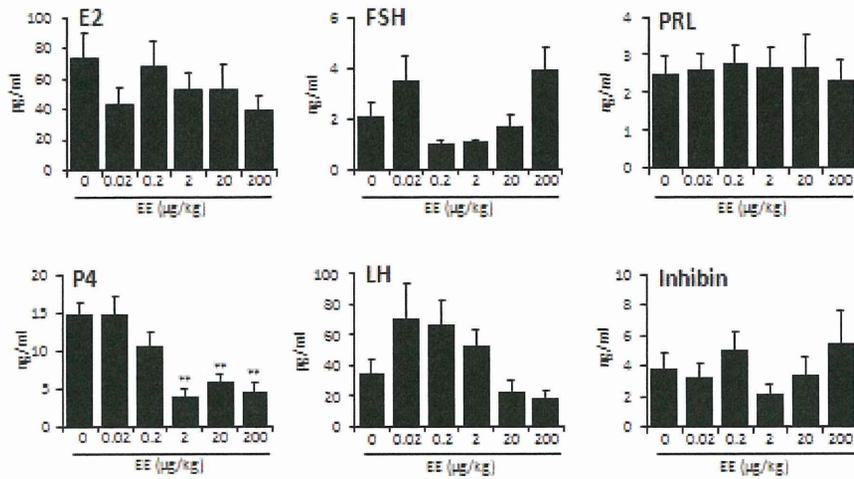


## Histopathology of the ovary (10 month-old)



	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%)

## Sex-related hormones (10 month-old)



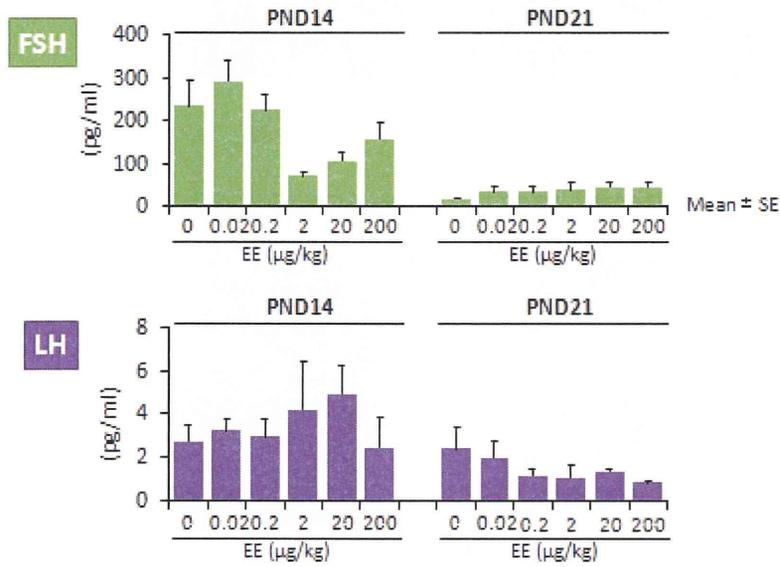
Mean ± SE

## Summary of results (long term effects)

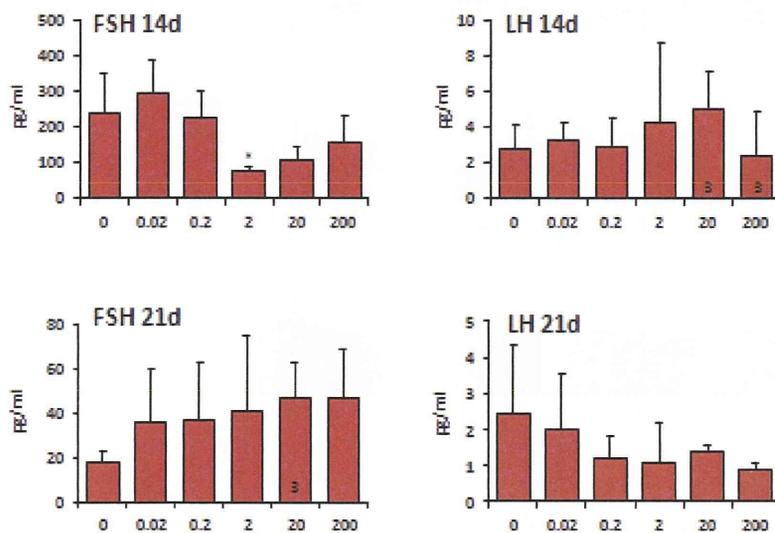
EE (µg/kg)	Onset of abnormal cycle	Ovary		Uterus			Hormone		Mammary gl.	
		Weight	Histology	Hyperplasia (Severe)	Adeno carcinoma	Squamous metaplasia	E2	P	E:P ratio	Virilization
0	32wk~						-			
0.02	32wk~						-			
0.2	22wk~	↓	Loss of CL				-		+	
2	18wk~	↓↓		+			-	↓	↑	+
20	14wk~	↓↓	Follicular cyst	+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

## 短期指標

### FSH, LH (PND14, 21)



### 血清性ホルモン濃度 -14d, 21d-

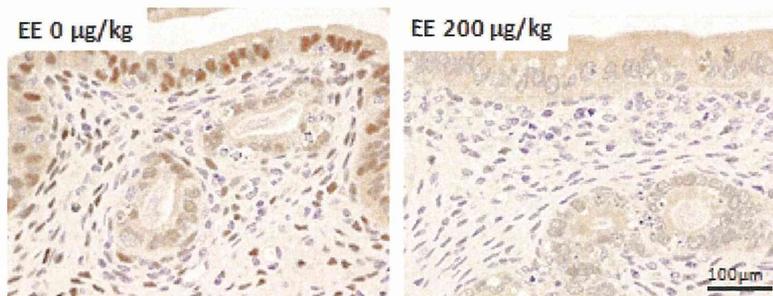


## 子宮におけるER $\alpha$ の発現

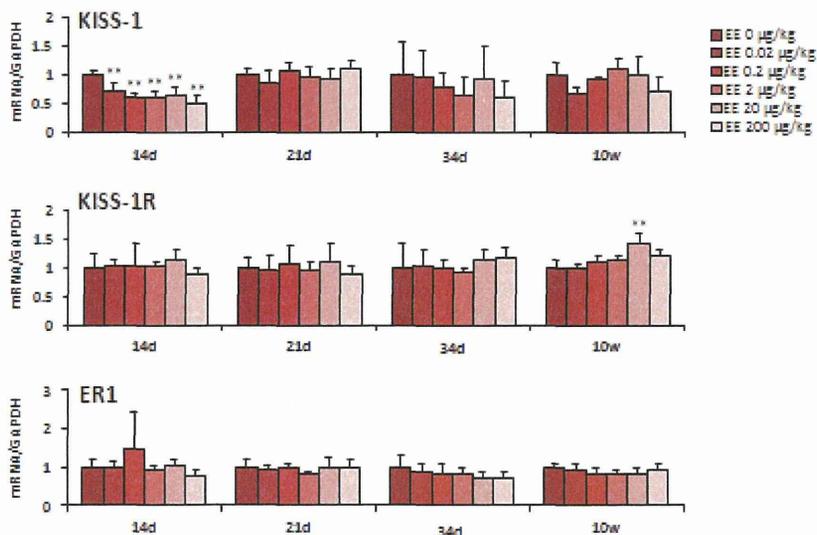
免疫染色による染色態度

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		+		+		++		+	±

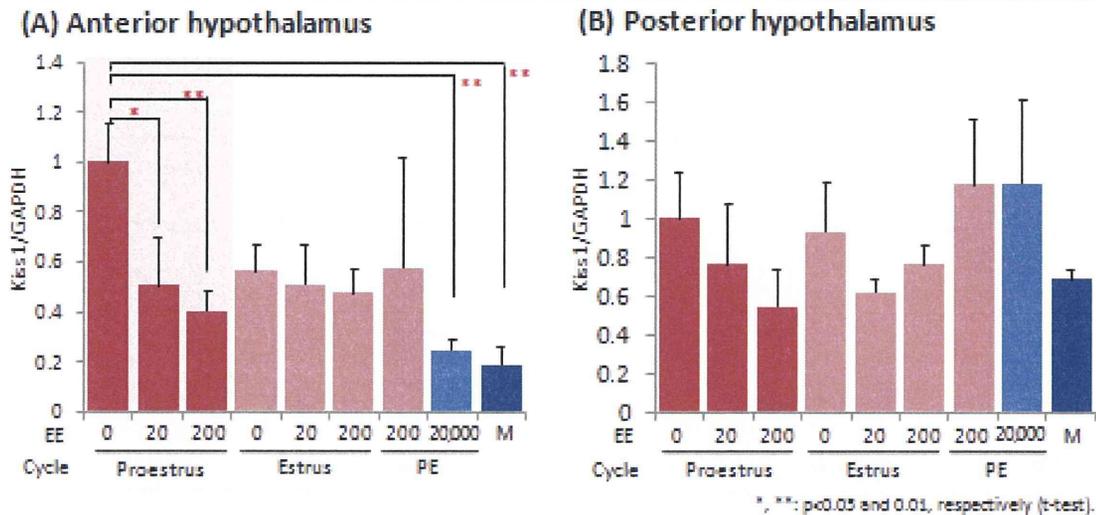
—: 陰性, ±: 弱陽性, +: 陽性, ++: 強陽性



## 視床下部 遺伝子解析

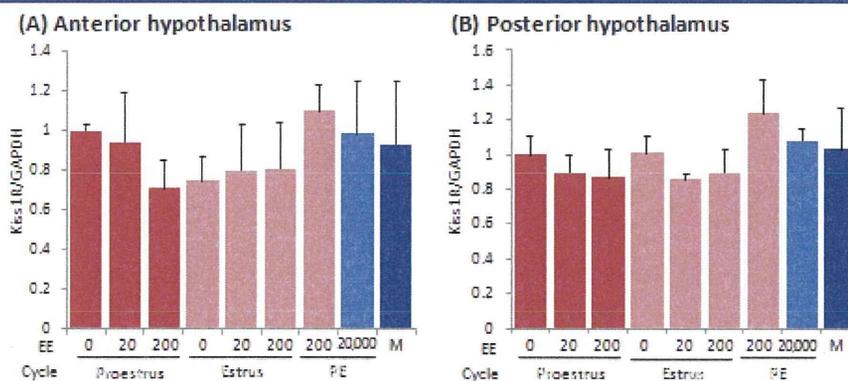


## Kiss1 expression in the anterior (A) and posterior (B) hypothalamus



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

## 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  $\mu\text{g}$  group in the anterior hypothalamus was decreased at proestrus.