

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定雌

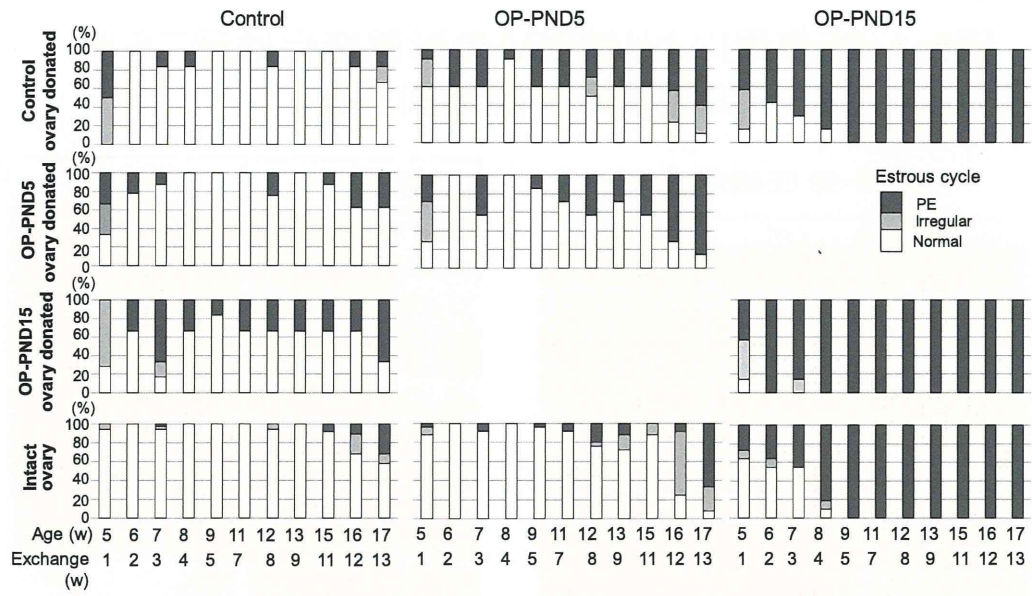


Fig. 6

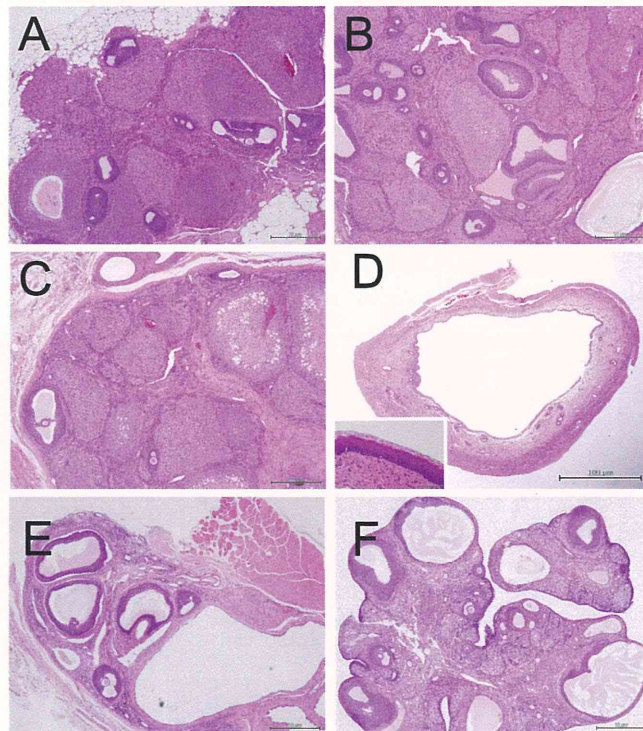


Fig. 7

図8-1: EE作用により雌POAの形態変化は起こらず
CB発現のみが増加する

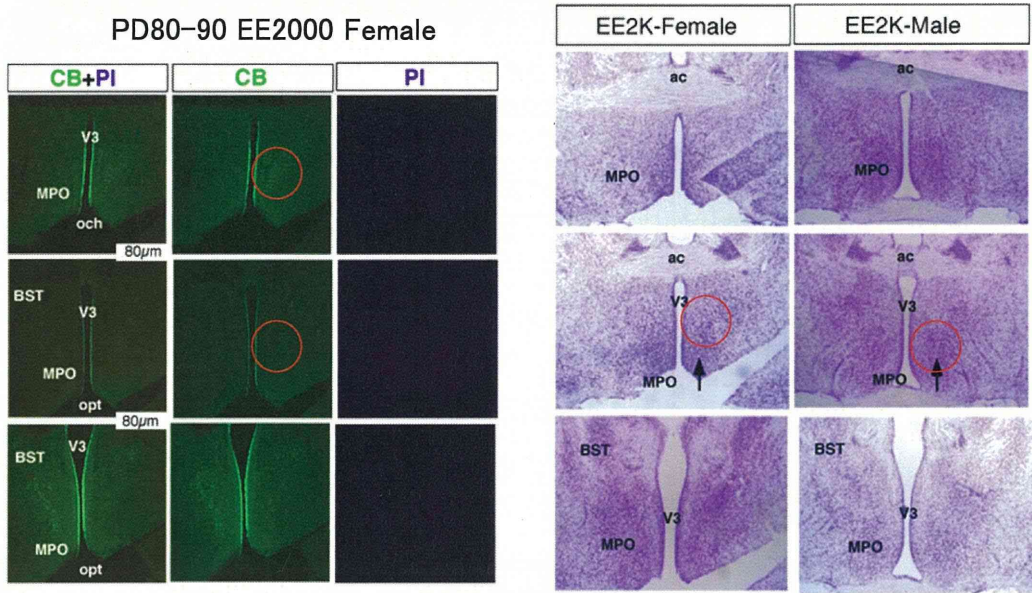
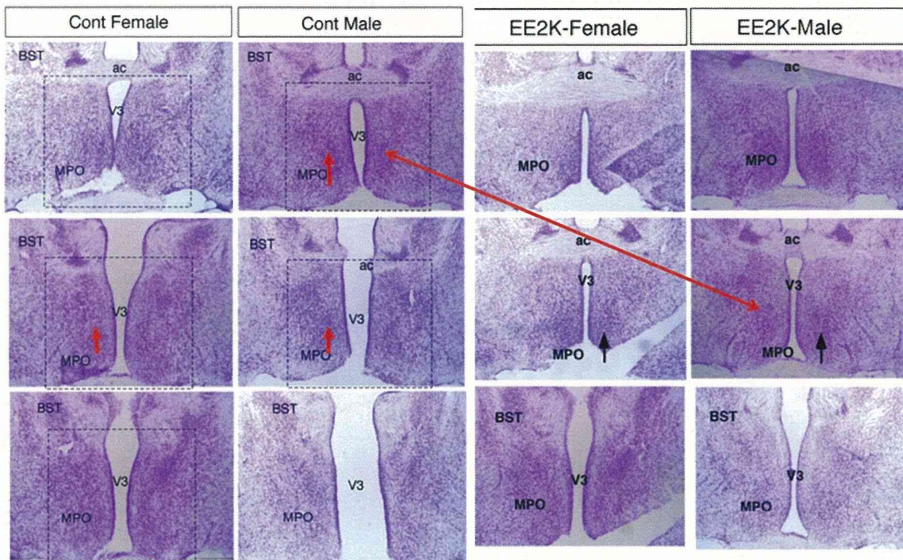


図8-2: EEによるCB細胞群の変化は脳の形態的変化
を反映した変化ではない



2. パルス制御部位に関連する実験

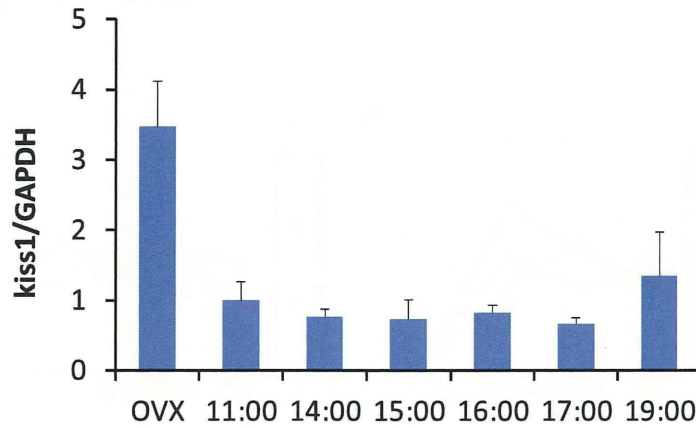


図9. 視床下部後部における対照群のKiss1 mRNA発現

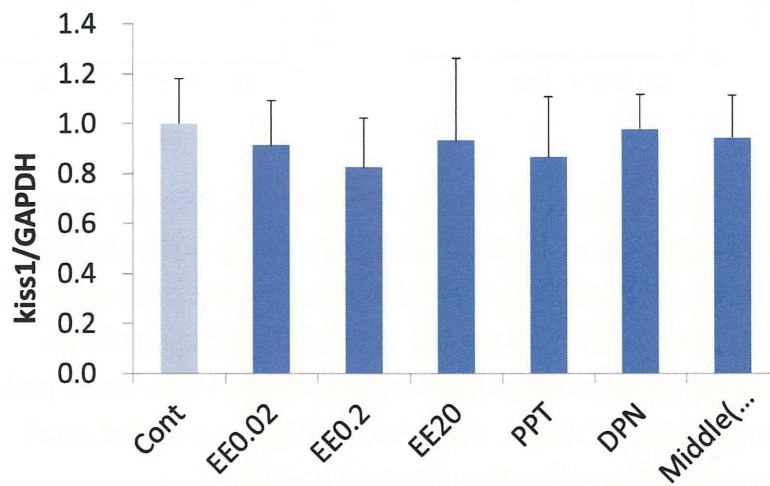


図10. 視床下部後部におけるKiss1 mRNA発現 (16:00)

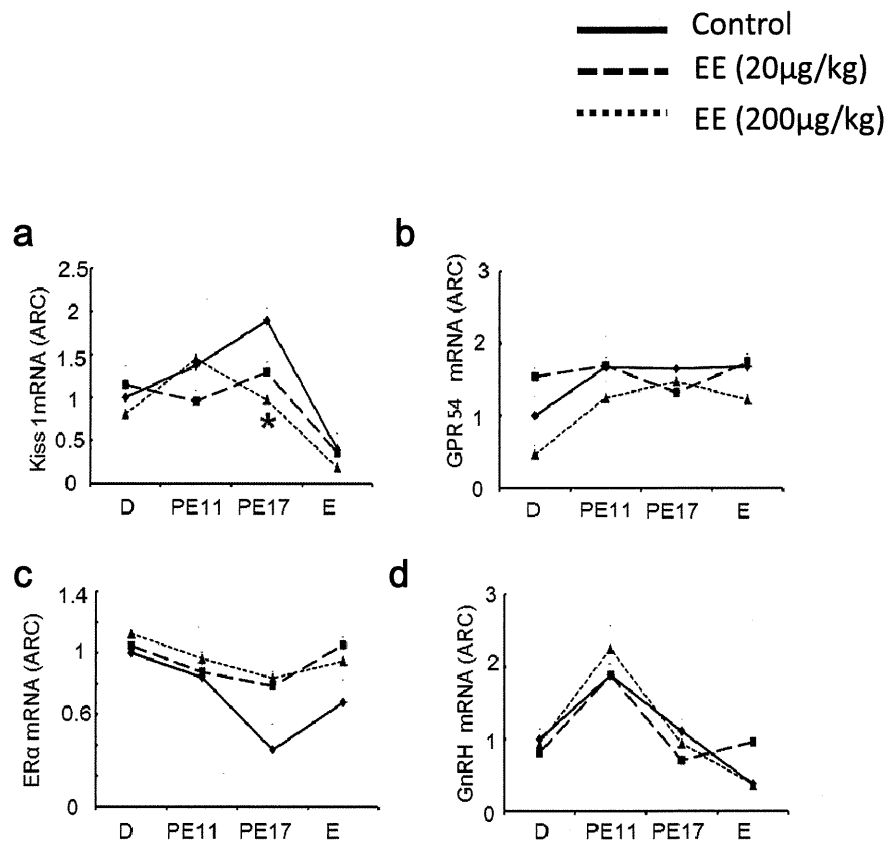


Figure.11 Changes in *kiss1* (a), *GPR54* (b), *ERα* (c) and *GnRH* (d) mRNA expression in ARC. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μg/kg and 200 μg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ($p < 0.05$).

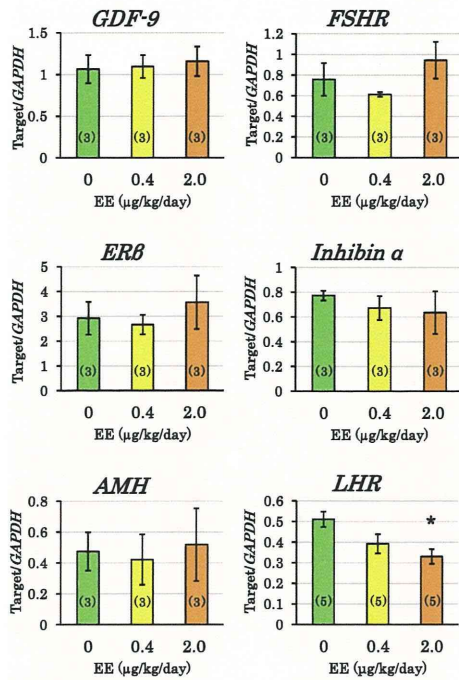


図 12-1. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 10 日齢卵巣での mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*は対照群と比較し 5% の水準で有意差があることを示す。

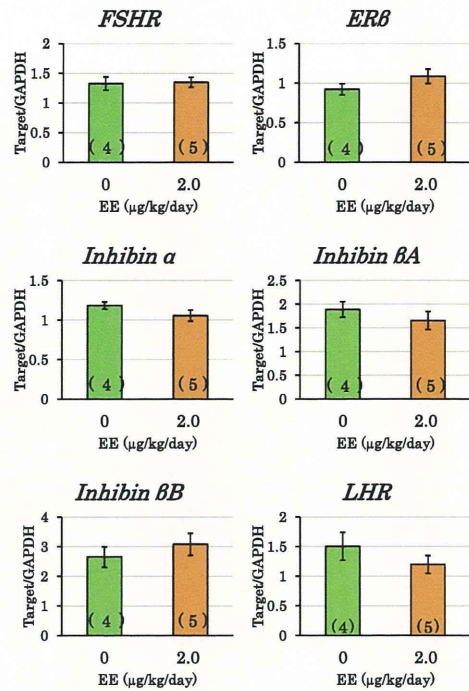


図 12-2. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 23 日齢卵巣での mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を示す。

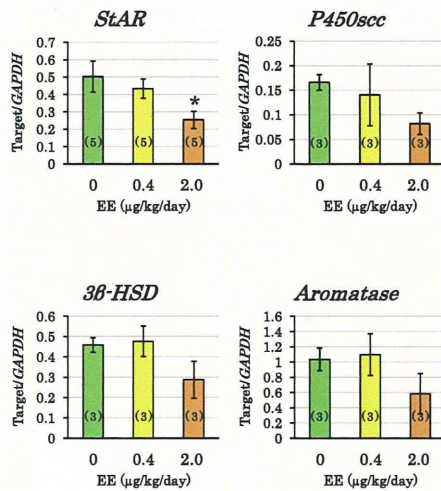


図 12-3. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 10 日齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*は対照群と比較し 5% の水準で有意差があることを示す。

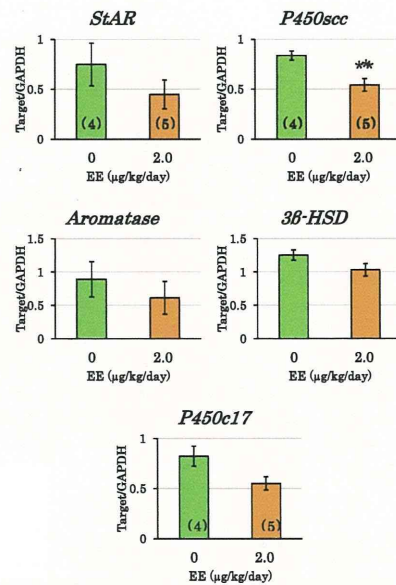


図 12-4. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 23 日齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA 発現 値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*および**はそれぞれ対照群と比較し有意差があることを示す。

実験1における無処置雌の受動回避学習
は20 ug/kg low EEで低下した。

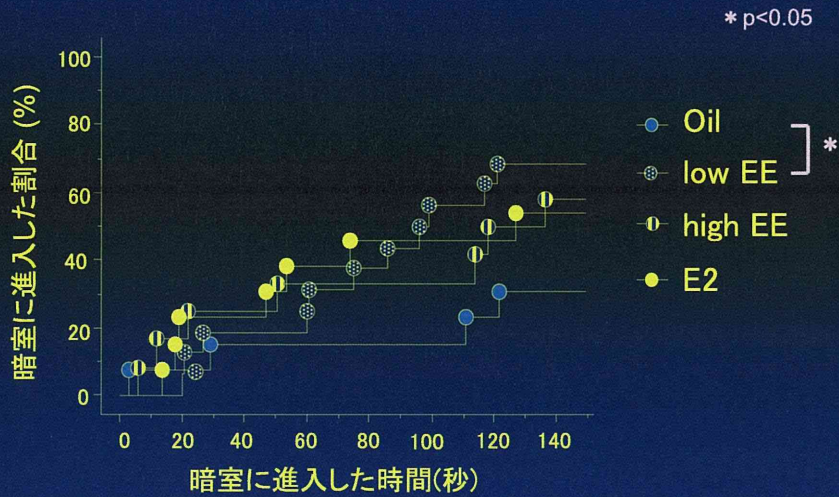


Figure 13-1

20

実験3における皮質ERα発現量は、EB
非投与の20 ug/kg low EE、2 mg/kg
high EE、E2で低下した。

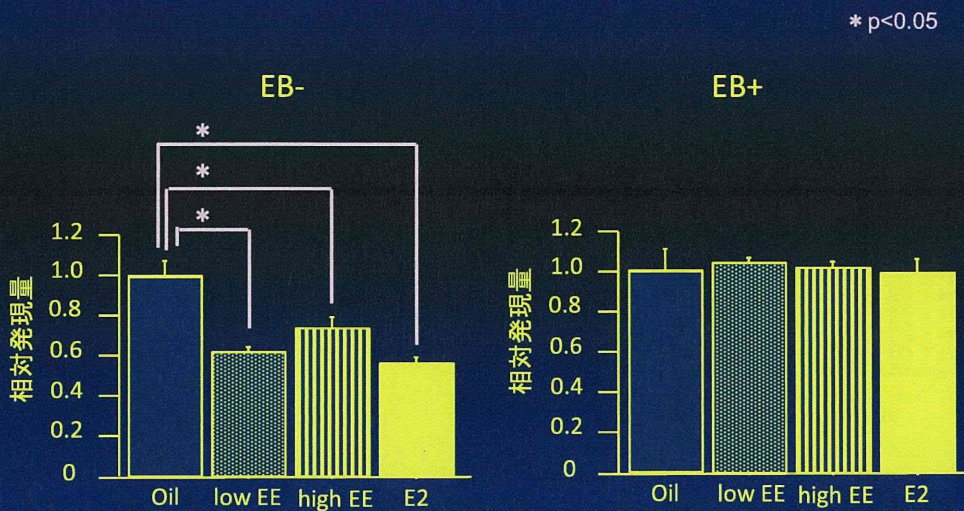


Figure 13-2

37

3. 遅発影響の閾値に関する実験として

遅発影響発現量の閾値と *in vivo* エストロゲン活性(幼若動物を用いた子宮肥大作用)

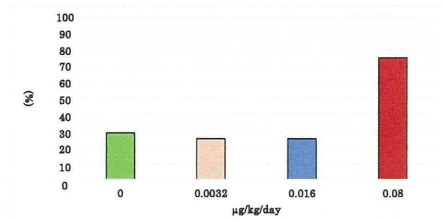


図 14. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラット卵巣における嚢胞状卵胎保有率
嚢胞状卵胎が観察された動物/全動物×100 で示した。

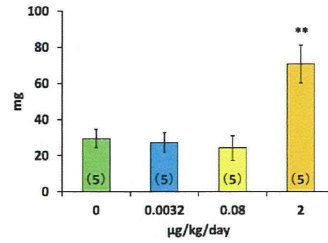


図.15-1 幼若雌ラットを用いたエチニルエストラジオールの子宮肥大試験における子宮重量
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群の動物数を、**は対照群と比較し有意差 (P<0.01) があることを示す。

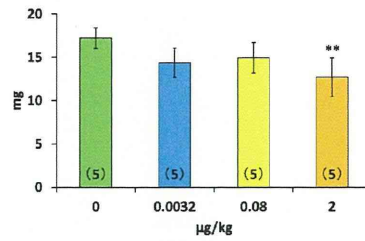


図.15-2 幼若雌ラットを用いたエチニルエストラジオールの子宮肥大試験における卵巣重量
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群の動物数を、**は対照群と比較し有意差 (P<0.01) があることを示す。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討

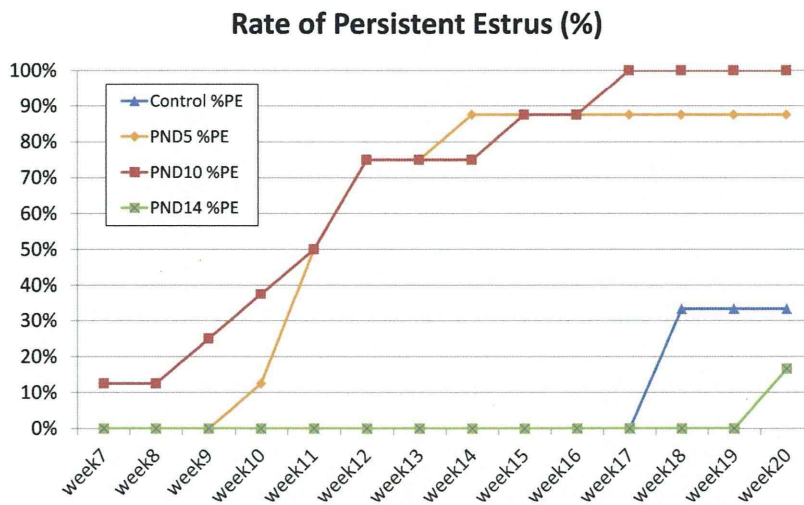


FIG. 16 遅発影響の感受期の検討

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による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

分担研究課題：

化学物質の臨界期曝露による視床下部キスペプチンの変化と遅発影響の閾値の関連性

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

研究要旨

本研究は、化学物質特にエストロゲン作用物質の臨界期曝露による遅発影響が、視床下部あるいは生殖器いずれかが核となって生じているのか明らかにし、さらに遅発影響の時期および投与量の閾値の存在についても検討を行う事を目的して行った。今年度は、エストロゲン作用を有する *tert*-octylphenol (OP) を、遅発影響誘発量あるいは典型的なオス化誘発量を新生児期を含む臨界期のラットに曝露し、性成熟前にそれらの動物の卵巣を交換して性周期を観察することにより、視床下部、卵巣のいずれが遅発影響やオス化の惹起に優位であるのか検索した。その結果、遅発影響および典型的オス化投与量ともに性周期の異常は、移植された側に依存していて惹起されたことから、視床下部の制御機構が遅発影響およびオス化惹起に必須であることが明らかとなった。さらに遅発影響の発現時期の閾値に関する研究の予備検討として、生後 5 日齢から 14 日齢まで様々な臨界期にエストロゲン様物質を曝露して性周期を観察したところ、遅発影響の発生時期の閾値は生後 10 日齢と 14 日齢との間に存在する可能性が示唆された。遅発影響の閾値については、キスペプチンニューロンの解析を含め、詳細な検討を次年度に行う予定である。

A. 研究目的

化学物質臨界期曝による遅発影響は成熟後に至って生殖機能障害が顕在化し、その機序も不明なため化学物質リスク評価上の重大な懸念である。視床下部のキスペプチンニューロンの制御機能は部位特異的である。吉田、高橋らの今までの研究において、遅発影響誘発量のエストロゲン新生児期曝露によるキスペチン低下を見出したが遅発影響に関連する部位は特定できなかった。遅発影響による部位特異性の明確化は、その機序解明と指標の科学的根拠に極めて重要である。また化学物質のリスク評価上、遅発影響と閾値(投与量および投与時期)の存在の明確化も重要である。本研究は、化学物質の臨界期曝露による遅発影響が視床

下部キスペプチンニューロンのいずれの制御部位に依存するのか部位特異性を明らかにし、遅発影響中枢なのか化学物質の生殖機能の遅発影響の核となる機序を解明するため、明らかにする。また遅発影響の閾値を明らかにし化学物質リスク評価に資することを目指す。

B. 研究方法

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定および繁殖能への影響 (Fig. 2-1)
雌 Donryu ラットにエストロゲン様物質である *tert*-Ochtylphenol(OP) を、既報の遅発影響誘発量として (Katsuda et al., 2002)、100mg/kg 体重の OP を生後 1~5 日齢まで隔日に計 3 回(OP-PND 5)皮下投与、既知の

オス化誘発量として、100mg/kg 体重の OP を生後 1~15 日齢まで隔日に計 8 回 (OP-PND 15)皮下投与した。生後 28 日齢に对照群、OP-PND 5 群、OP-PND15 群間より麻酔下で摘出した卵巣を、ただちに同じ群および異なる群の動物の背部皮下に移植する卵巣交換を行い、その後の性周期を 17 週齢まで、群間および卵巣交換しない動物と比較した。背部に埋植した卵巣、レシピエントの内分泌および生殖系について病理組織学的検索した。また、卵巣交換しなかった動物について、排卵数をチェックし、OP-PND5 動物は成熟後に对照群雄と交配して、遅発影響と繁殖能について検索した。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討

Donryu ラットに遅発衛器量誘発量である EE20 μ g/kg を生後 5 日齢、10 日齢あるいは 14 日齢に単回皮下投与し 22 週齢まで性周期を観察した(図 2-5)。

(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および B-1 の動物実験を実施した財団法人佐々木研究所の審査・承認を経て実施した。

C. 研究結果

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定および繁殖能への影響 (Fig. 2-2~4)

卵巣交換後の性周期を Fig. 2-2 に示す。对照群および OP-PND5 の卵巣レシピエント对照群ラットでは、交換後数週間で正常性周期を示し、その後も正常性周期が持続した。しかし、OP-PND15 卵巣レシピエント对照群ラットでは、交換後性周期へと回復時期が遅く、回復後も不規則性周期や持続発情を示す個体が観察期間を通じて認められた。最終解剖時に埋植した卵巣の病理組織学検査結果を Fig. 2-3 に示す。对照群に埋植したいずれの群の卵巣にも黄体が認め

られ、そのうち正常性周期を解剖時まで示した個体では、卵巣の所見と膈および子宮が同一の性周期を示した。

对照群および OP-PND5 群と卵巣交換した OP-PND5 レシピエント動物では、交換後の性周期回復は对照群と同様であったが、持続発情を主とする異常性周期を示す動物が、交換後 5 週から对照群と比較し有意に増加した。この異常性周期の早期発現パターンは、卵巣交換をしていない OP-PND5 と同様であった。計画殺時の病理組織学的検査では、卵巣に古い黄体が認められる個体が多かった。

对照群および OP-PND15 の卵巣を埋植したレシピエント OP-PND15 群では、正常性周期を示す個体がわずかに認められたが、急激に持続発情を示す個体が増加し、交換後 4 週ではほとんど、5 週では全例のレシピエントが持続発情を示した。このパターンは、卵巣交換を実施しなかった OP-PND15 群と同様であった。病理組織学的に卵巣にはほとんど黄体は認められず、cystic な閉鎖卵胞とわずかな卵胞が認められた。

排卵数を Table 2-1 に示す。对照群および正常性周期を示す OP-PND5 群の排卵数には差がなかったが、異常性周期の OP-PND5 と OP-PND15 群(検査時期に既に全例持続発情を示した)では、卵管内に卵は認められなかった。

繁殖能を Fig. 2-4 に示す。对照群と正常性周期を示す OP-PND5 群の間で、繁殖能を示す指標(黄体数、着床数、出世児数、性比、妊娠期間、出生時体重等)に差は認められなかった。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討 (Fig. 2-6)

PDN 5 および PND 10 投与群では、それぞれ 10 週齢および 9 週齢から異常性周期が発現し、その後 11 週齢で 50%、13~14 週齢で約 90%とほとんどが異常性周期となった。一方、PND14 投与動物の性周期は、最終計

画殺までほぼ対照群と同様の推移を示した。

D. 考察

卵巣交換による遅発影響制御部位の特定および繁殖能への影響

今回の実験では、OPに代表される新生時期エストロゲン作用物質曝露による性周期異常は、視床下部あるいは卵巣いずれが標的であるのか解析する目的で卵巣交換により検索したところ、性周期異常は明らかにレシピエントに依存していた。各群ともレシピエントの性周期は無処置の卵巣を有するそれぞれの群の性周期に類似していた。また今回の投与量はオス化誘発量と遅発影響誘発量であったことから、遅発影響による性周期異常も視床下部前方が標的であると考えられた。オス化誘発量の高濃度エストロゲン作用物質を曝露した卵巣を埋植された対照群のみ、異常性周期の増加が認められたことは、新生時期曝露の性周期異常は視床下部が優位であるものの、卵巣へ影響していることを示唆するものと考えられた。

また遅発影響量新生児期曝露されても、性周期が正常な間は排卵を始め、繁殖能への影響を示唆する所見は得られなかった。

遅発影響の発現時期の閾値に関する予備検討

予備検討の結果、生後10日齢までの生後EE曝露による性周期異常誘発が同様であり、生後14日齢では性周期異常が認められなかったことから、性周期を指標とした遅発影響の発現時期には生後10日齢と14日齢曝露の間で閾値が存在することが明らかとなった。しかし、今回は例数も少なく、その他の遅発影響の指標については検索していないことから、平成26年度は、今回の結果を基に、実験規模を拡大して遅発影響発現時期に閾値をキスペプチンニューロンの変化も含めて検索する予定である。

E. 結論

遅発影響誘発量あるいは典型的なオス化を誘発するエストロゲン作用物質を臨界期のラットに曝露し、性成熟前にそれらの動物の卵巣を交換して性周期を観察することにより、視床下部、卵巣のいずれが遅発影響やオス化の惹起に優位であるのか検索したところ、遅発影響および典型的オス化ともに性周期の異常は、移植された側に依存して惹起されたことから、視床下部の制御機構が遅発影響およびオス化惹起に必須であることが明らかとなった。

遅発影響の発現時期の閾値に関する研究の予備検討として、生後5日齢から14日齢まで様々な臨界期にエストロゲン様物質を曝露して性周期を観察したところ、遅発影響の発現時期の閾値は生後10日齢と14日齢との間に存在する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Tamura K, Takahashi M, Yoshida M. Adaptive Parotid Gland Hypertrophy Induced by Dietary Treatment of GSE in Rats. Toxicol Pathol. 2013 In press.
- 2) Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of pyperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. J Toxicol Sci. 2013;38(6):891-902.
- 3) Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi M, Morita T, Ono A. Basic principles for setting acute reference dose, ARfD in Japan. Shokuhin Eiseigaku Zasshi. 2013;54(4):331-4. Japanese.
- 4) Inoue K, Morikawa T, Takahashi M, Yoshida M, Ogawa K. A 13-week subchronic toxicity study of grape skin extract in F344 rats. J Toxicol Sci. 2013;38(4):559-70.
- 5) Tamura K, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Kodama Y, Ozawa S, Nishikawa A, Yoshida M. Dose-response involvement of

constitutive androstane receptor in mouse liver hypertrophy induced by triazole fungicides.

Toxicol Lett. 2013 Jul 31;221(1):47-56. doi: 10.1016/j.toxlet.2013.05.011.

6) Yoshida M, Suzuki D, Matsumoto K, Shirota M, Inoue K, Takahashi M, Morita T, Ono A. Simulation of acute reference dose (ARfD) settings for pesticides in Japan. J Toxicol Sci. 2013;38(2):205-14.

7) Sakamoto Y, Inoue K, Takahashi M, Taketa Y, Kodama Y, Nemoto K, Degawa M, Gamou T, Ozawa S, Nishikawa A, Yoshida M. Different pathways of constitutive androstane receptor-mediated liver hypertrophy and hepatocarcinogenesis in mice treated with piperonyl butoxide or decabromodiphenyl ether. Toxicol Pathol. 2013;41(8):1078-92. doi: 10.1177/0192623313482055.

2. 学会発表

16) 吉田緑 INHAND フォローアップ:生殖器雌性生殖器に関する INAHD トピックスと問題点について (第30回日本毒性病理学会学術集会 (2014年1月30~31日 徳島))

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

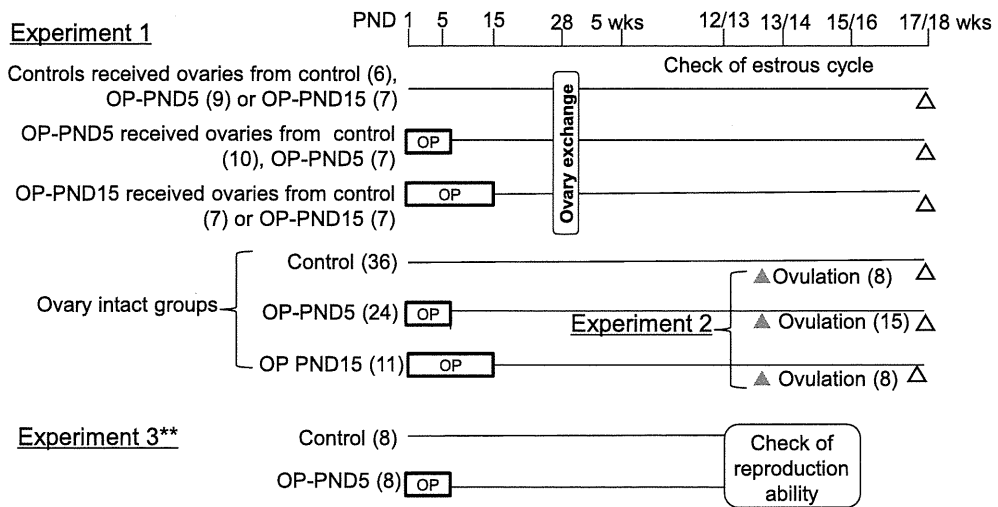


Fig. 2-1

PND, Post natal day; wks, Weeks of age, OP-PND5, Subcutaneous treatment with t-tert octylphenol (OP) on PND1,3 and 5; OP-PND15, Subcutaneous treatment with OP on PND1,3,5,7,9,11 and 15; Parenthesis, number of rats examined; △, Necropsy; **The rats examined in Exp.3 were obtained from the rats with intact ovary in Exp.1.

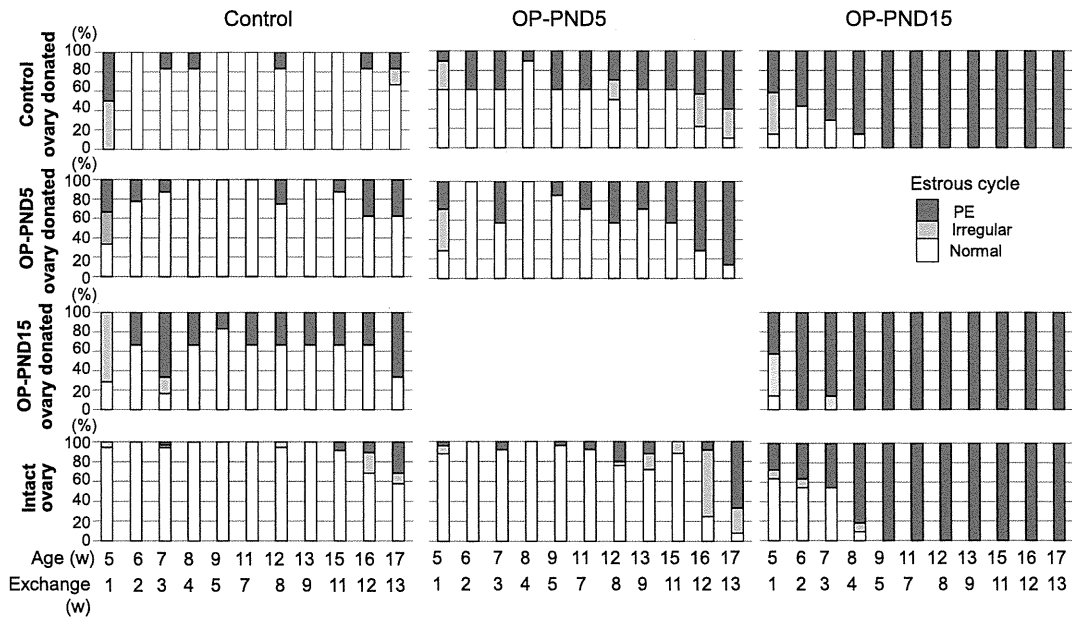


Fig. 2-2

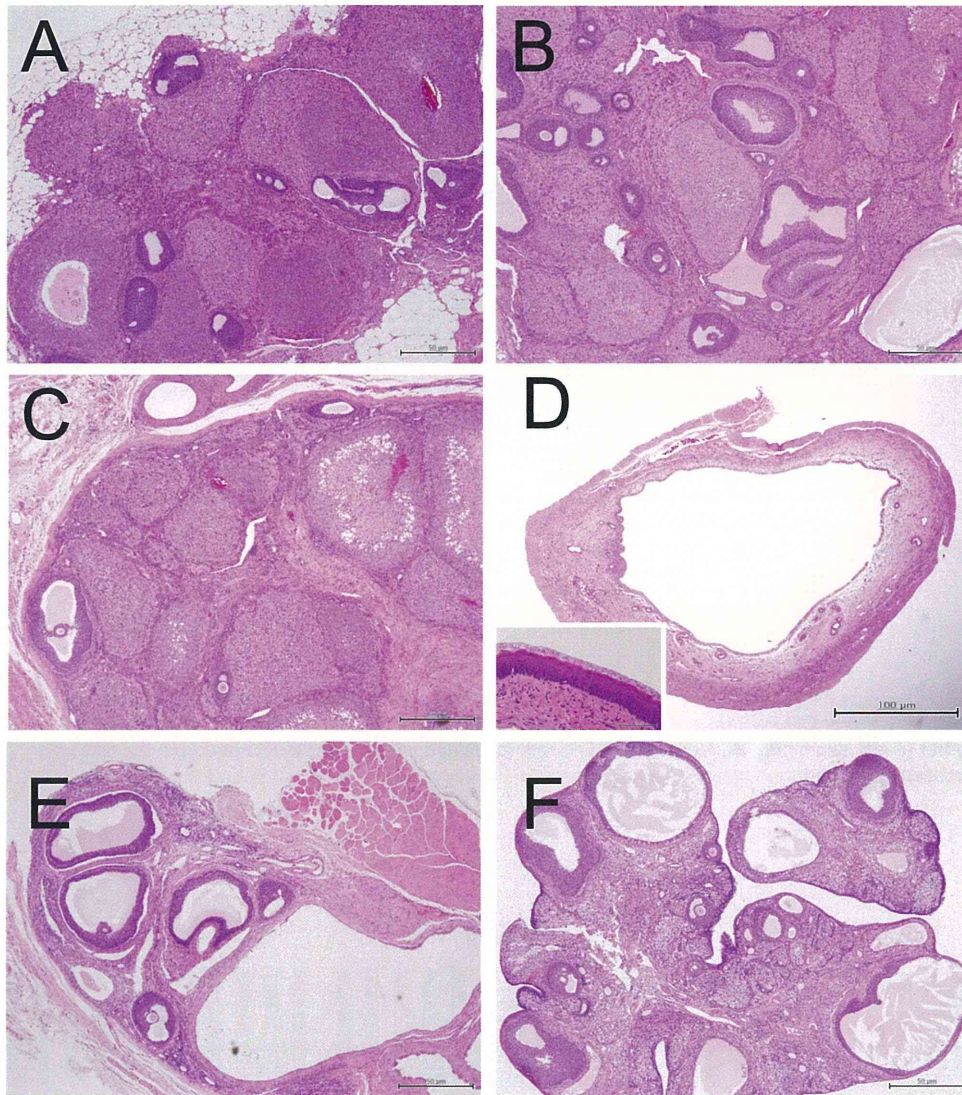


Fig. 2-3

A, B, C, Eは皮下に埋植された卵巢。

A.対処群レシピエントに埋植されたOP-PND5群の卵巢

B.OP-PND5群に埋植された対照群の卵巢

C.対照群に埋植されたOP-PND5群の卵巢。同個体では子宮は拡張(D)、膣(D挿入部)は粘液層を含む角化扁平上皮となり、卵巢・膣・子宮ともに発情前期の形態である。膣スメア像も発情前期を示したことから、同個体は発情前期状態にあると考えられた。

E. OP-PNE15群レシピエントに埋植された対照群卵巢。黄体は認められず、のう胞状の閉鎖卵胞および卵胞が認められる。

F. 卵巢無処置のOP-PND15群の卵巢。Eと同様の形態である。

Table 2-1 The number of oocytes at ovulation and ovary weights in Exp. 2

Group	Estrous cycle	No. of oocytes	Body weight (g)	Ovary weight (mg)
Control	Normal (8)	12.3±3.1	317.8±18.2	120±22.4
OP-PND5	Normal (8)	11.0±2.1	301.6±20.5	108±24.8
	PE (7)	0	319.1±10.2	75±18.2 *
OP-PND15	PE (8)	0	315.5±13.1	64±11.6 *

PE, persistent estrus;

* Significantly different value from the control group at $p > 0.01$

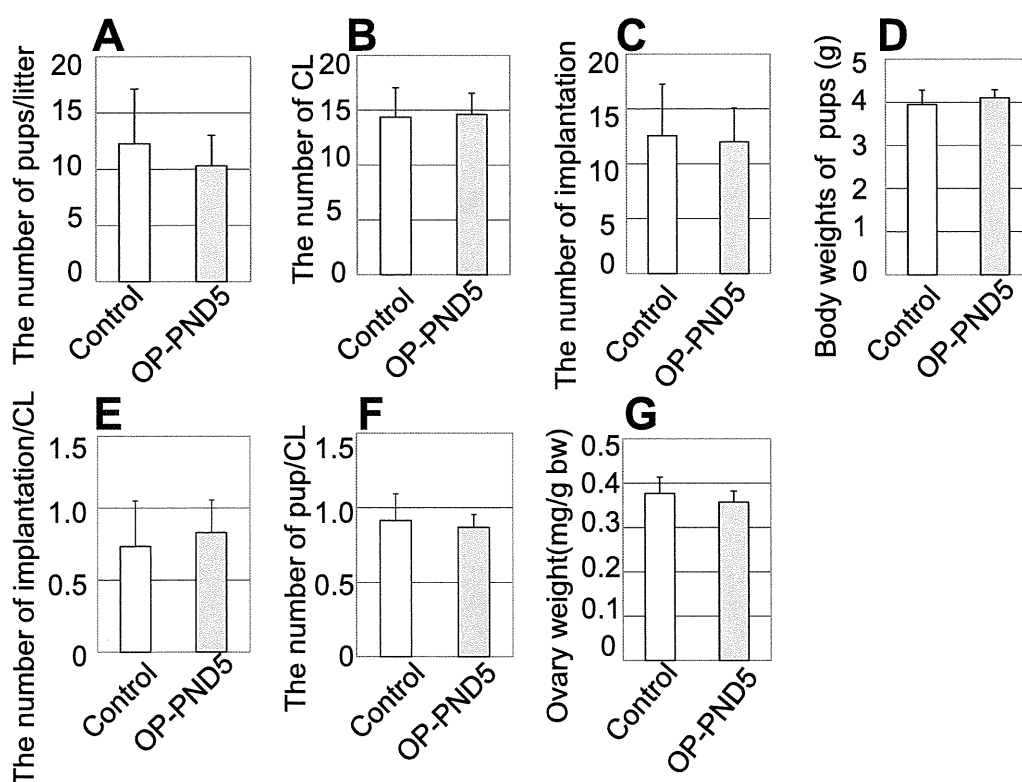


Fig. 2-4

遅発影響の感受期の検討(予備試験) 実験計画

ANIMAL SPECIES: Rat STRAIN: Donryu/ Crj SEX: Female

AGE OF START: Postnatal day 0-14 (Offspring)

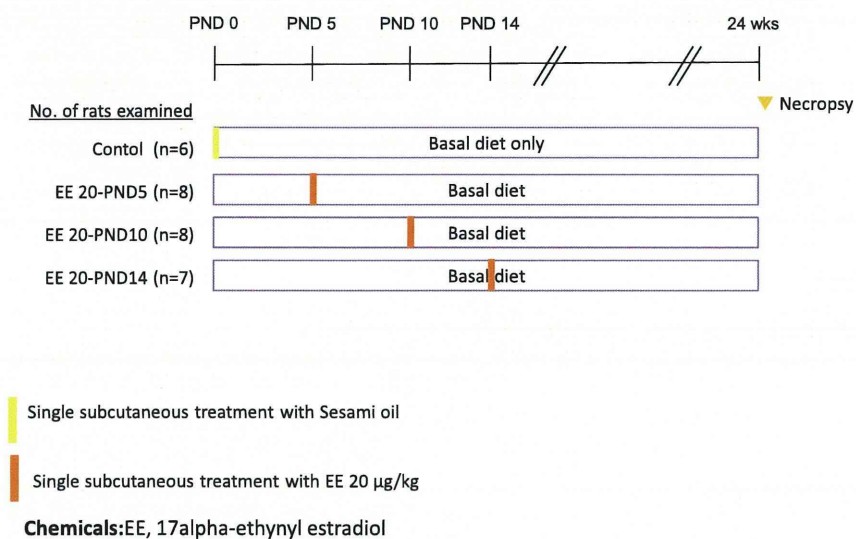


Fig. 2-5

遅発影響の感受期の検討

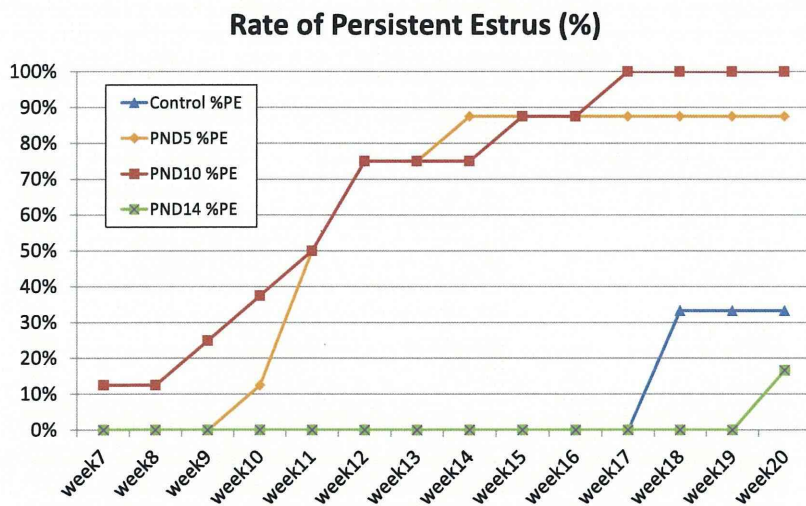


Fig. 2-6

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による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

研究分担研究課題：遅発影響の発現機序検索。特に視床下部LHサージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響について

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
市村亮平	所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

研究要旨

1. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響について加齢性変化との比較を行った。生後 0 日齢の雌性 Donryu ラットに sesami oil (対照群), EE (0.02, 0.2, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), PPT (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$), DPN (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を 1 回皮下投与し、正常性周期を示す 10 週齢で卵巣摘出後 LH サージの誘起を行った。血清 LH 濃度および視床下部前部あるいは後部 (AVPV あるいは ARC 相当部位) における kiss1 mRNA の発現を経時的に解析した。加齢性変化と比較するため、20 週齢の雌ラット (middle-age 群) についても同様の検索を実施した。EE 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群を除いて、LH サージピークが低下する傾向がみられ、対照群がピークに達した 16:00 では、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および middle-age 群において有意な低値が認められた。視床下部前部では、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および middle-age 群で kiss1 mRNA の発現低下がみられたが、後部では群間差は認められなかった。以上の結果から、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、正常に性周期を回帰している個体においても、加齢ラットと類似して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出された。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが新生児期 EE 曝露の標的の一つであることが示唆された。

2. 新生児期にエストロゲンに曝露されたラットを用いて子宮肥大試験を実施し、子宮のエストロゲン感受性への影響について検討した。生後 0 日齢の雌性 Donryu ラットに EE 0, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回皮下投与し、22 日齢で子宮肥大試験に供した。EE 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では子宮重量が顕著に低下しており、子宮の発達異常が生じていると考えられた。遅発性影響量である EE 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。

A. 研究目的

脳の性分化の臨界期にホルモン作用を有する物質の曝露を受けた場合、その影響がすぐ現れず、性成熟以降に繁殖機能低下や発がん感受性増加などが発現することがある (Yoshida et al., 2011)。しかし、このような遅発性影響は現行の毒性試験では検出が

困難であり機序も不明であるため、リスク評価上大きな問題となっている。

これまでの研究で、新生児期にエストロゲン曝露を受けたラットでは、通常加齢ラットで認められる性周期異常 (=排卵停止) が用量依存性に早期化し、その二次的影響として子宮発がんリスクを増加させること

を示した (Takahashi et al., 2013)。排卵停止の早期化を起こす原因として、視床下部において生殖機能を制御するキスペプチンの関与が推察されたが、排卵制御中枢である前腹側周囲核 (AVPV) 特異的なキスペプチンの発現変化や排卵の直接的な引き金となる LH サージとの関連については明らかになっていない。

そこで、本研究では新生児期エストロゲン曝露によって成熟後に生じる排卵停止と AVPV におけるキスペプチンニューロンおよび LH サージとの関連について検索する。今年度は、卵巣摘出ラットを用い、新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響について、加齢性変化との比較を行った。

また、新生児期に 17 α -ethynylestradiol (EE) 曝露を受けたラットにおいて、10 週齢の子宮内膜上皮におけるエストロゲン受容体 (ER) α の発現が用量依存性に低下していることを見出している。そこで、EE に曝露されたラットを用いて子宮肥大試験を実施し、子宮のエストロゲン感受性について検討した。

B. 研究方法

B-1. 新生児期エストロゲン曝露および加齢が LH サージに及ぼす影響

実験には当研究所内で継代・維持している Donryu ラットを用いた。生後 24 時間以内の雌性ラット (各群 30 匹) に sesame oil のみ (対照群) あるいは sesame oil に溶解した EE を 1 回皮下投与した。遅発性影響である性周期異常の早期化を起こす用量として 0.2 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、性周期異常の早期化を起こさない用量として 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を設定した。また、EE と同じく性周期異常の早期化を起こすことが確認されている PPT (ER α アゴニスト, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、性周期に影響を及ぼさない DPN (ER β アゴニスト, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 群を設けた。

膣スメアにより正常に性周期が回帰していることを確認した後、10 週齢で卵巣を摘

出し、13 週齢で EB および P4 投与により LH サージを誘起した。11:00, 14:00, 15:00, 16:00, 17:00, 19:00 にそれぞれ各群 5 例ずつ断頭採血し、脳視床下部を視交叉より前側 (AVPV に相当) と後側 (弓状核 (ARC) に相当) に分け、凍結保存した。加齢性変化と比較するため、20 週齢の雌ラット (middle-age 群) を性周期を回帰している個体 (middle(N)) と停止している個体 (middle(PE)) に分け、卵巣摘出を施して LH サージの誘起を行い、上記と同様に経時的な採血および視床下部の採材を行った。

血清 LH, FSH 濃度は、凍結保存したサンプルを用いて National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) から提供されたキットを使用したラジオイムノアッセイ (RIA) 法により定量した (Taya et al., 1983)。

視床下部組織から Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を用いて抽出した total RNA 1 μg を用いて、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応を行い、ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914_ml, KiSS1 receptor (Kiss1R): Rn00576940_ml, FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos): Rn00487426_g1, estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372_ml, estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610_ml。内部標準には GAPDH を用いた。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。群間の比較を行う場合は対照群の値を 1 として、対照群の経時的な変化を示す場合は 11:00 の値を 1 として、相対的な発現量を算出した。

B-2. エストロゲン曝露ラットを用いた子宮肥

大試験

生後 24 時間以内の雌性 Donryu ラット各 20 匹に sesame oil に溶解した EE 0, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回皮下投与した。生後 21 日で離乳後、22 日齢で生存動物をそれぞれ 3~5 匹ずつ 4 グループに分け、EE 0, 0.002, 0.02, 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 回皮下投与 24 時間後の子宮重量を測定した (子宮肥大試験)。

B-3. 統計学的解析

血清性ホルモン濃度、遺伝子発現量、体重および子宮重量は各群の分散を 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 の方法で対照群との間で有意差検定を行った。

(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. 新生児期エストロゲン曝露および加齢が LH サージに及ぼす影響

対照群におけるサーージ誘起後の血清 LH 濃度は、15:00 以降急激に上昇して 16:00 にピークに達し、19:00 には基底レベルに戻った (図 1)。EE 0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では対照群と類似した推移を示したが、EE 0.2 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群ではサーージピークが低下していた。これらの群では 17:00 に最も高い濃度となり、ピークに達する時間が対照群よりも遅延する傾向が認められた。PPT および DPN 群においても、対照群に比べサーージピークが低下する傾向がみられた (図 2)。Middle-age 群のうち性周期を回帰している個体では 16:00 をピークとした LH 濃度の上昇がみられたが、その程度は対照群に比べ著しく低かった。性周期が停止した個体ではい

ずれの時点においても LH 濃度の上昇は認められなかった。

各群の 16:00 における LH 濃度を比較すると、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および middle-age 群では対照群に比べて有意な低値を示した (図 3)。

FSH 濃度の推移には、投与や加齢による影響は認められなかった (図 4, 5)。

対照群の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現は、LH サージに先行して 11:00 から上昇し、19:00 にかけて高いレベルを維持していた (図 6)。14:00 の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現量は、対照群に比べて EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群および middle-age 群で有意に低値を示した (図 7)。16:00 においても、統計学的有意差はないものの同様の傾向がみられた。16:00 の視床下部前部における Kiss1R, c-fos, ER α , ER β の発現に有意な変動は認められなかった (図 8)。

対照群の視床下部後部における Kiss1 mRNA の発現は、11:00 から 17:00 にかけて低いレベルで推移した (図 9)。16:00 の視床下部後部における各群の kiss1 mRNA レベルに群間差はみられなかった (図 10)。また、同時刻の Kiss1R, c-fos, ER α , ER β の発現についても投与や加齢の影響は認められなかった (図 11)。

C-2. エストロゲン曝露ラットを用いた子宮肥大試験

解剖時の体重は新生児期に EE 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与を受けた群で有意に低値を示した (図 12)。0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では子宮肥大試験において、EE 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で子宮相対重量の有意な増加が認められた (図 13)。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、0.002 および 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で子宮相対重量の増加がみられた。200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では子宮相対重量の増加傾向はみられたが、統計学的有意差は認められなかった。2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、子宮重量が他群の約半分程度に低下しており、子宮肥大試験では 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で子宮相対重量の有意な増加が認められた。

D. 考察

D-1. 新生児期エストロゲン曝露および加齢が LH サージに及ぼす影響

対照群では EB および P4 投与により 16:00 をピークとした急激な LH 濃度の上昇が観察され、AVPV を含む視床下部前部では LH 濃度の変化に先行して Kiss1 mRNA の発現上昇がみられた。したがって、過去の報告と同じく、AVPV のキスペプチンニューロンがエストロゲンのポジティブフィードバックを受け、GnRH を介して LH の分泌を促進したものと考えられた (Adachi et al., 2007)。一方、ARC を含む視床下部後部では、エストロゲンのネガティブフィードバックによる Kiss1 mRNA の発現低下が認められた。

ラットでは、加齢とともに LH サージが遅延、減弱することが知られており、その原因の一つに AVPV におけるキスペプチンの発現低下が挙げられている (Lederman et al., 2010)。今回の検索においても、middle-age 群では、性周期を回帰している個体でも LH サージピークの著しい低下が認められた。また、視床下部前部における kiss1 mRNA の発現は、サージピーク前である 14:00 およびピークと同時刻である 16:00 において対照群よりも低値を示した。

EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では 14 週齢頃から性周期異常が増加することが報告されている (Takahashi et al., 2013)。今回、10 週齢で正常に性周期を回帰している動物を用いて LH サージを誘起した結果、対照群と比較してサージピークの低下およびピーク時刻の遅延傾向が認められた。また、加齢ラットと同様に視床下部前部のみで kiss1 mRNA の発現が低下していた。このことから、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では性周期異常が発現する前に、AVPV の LH サージ制御機構に加齢ラットと類似した変化が生じていることが示された。

同様に、性周期異常の早期化を生じる EE 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群において、LH サージピークの低下および遅延傾向が認められた。PPT および DPN 群においても、対照群に比べピーク

レベルの低下傾向がみられたが、統計学的な有意差はなく、視床下部前部における kiss1 mRNA の発現に対照群との差は認められなかった。これらの群で認められた LH の低下と性周期異常の早期化との関連は、キスペプチン以外の因子も含めて今後検討を加える必要がある。

Kiss1R, c-fos, ER α , ER β については、サージピーク時における発現に差は認められず、本検索では性周期異常との関連はみられなかった。

D-2. エストロゲン曝露ラットを用いた子宮肥大試験

本研究では、新生児期 EE 曝露群において体重の低値が認められた。しかし、これまで当研究所において Wistar Hannover GALAS ラットおよび Donryu ラットを用いて新生児期 EE 曝露を行った実験では体重への影響は観察されておらず、動物数が限られたことによる偶発的変化と考えられた。

以前に、新生児期に EE 曝露を受けたラットにおいて、成熟後発情期の子宮内膜上皮における ER α の発現が用量依存性に低下していることを示した。マウスにおいても新生児期にエストロゲン様物質の曝露を受けると、エストロゲンに対する子宮の反応性が変わるとの報告がある (Newbold et al., 2004)。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、子宮肥大試験において EE 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で子宮重量が有意に増加していたが、用量依存性がないことから偶発的変化と考えられた。したがって、同群は 0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群と同様のエストロゲン感受性を有していると判断した。EE 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では子宮重量の増加傾向がみられたが、統計学的有意差は認められなかった。同群では n 数が限られていることを考慮すると、エストロゲン感受性が低下したと結論づけるには至らなかった。したがって、遅発性影響を発現する新生児期 EE 20, 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。