

制が起きることが報告されており[Nagaraja et al., 2010]、顆粒層細胞で産生されたインヒビンがパラクラインもしくはオートクラインにより作用していることも示唆される。本研究において、EE 投与群の 10 日齢卵巣でインヒビンサブユニットである *inhibin α mRNA* 発現は若干の低下傾向を示しており、これは 10 日齢での early antral ステージ卵胞数の減少を反映したものであると考えられる。ただし、23 日齢卵巣ではインヒビンの各サブユニットの mRNA 発現に対照群と EE 投与群との間で顕著な差はみられず、23 日齢でのインヒビンによる下垂体へのフィードバックに変化はないものと考えられた。

LH は卵巣では主に卵胞を構成する莢膜細胞に発現している受容体と結合し cAMP を介して転写因子である *steroidogenic factor-1 (SF-1)* による遺伝子の転写を促進している。StAR および P450_{scc}、3 β -HSD、P450_{c17}、*aromatase* といったステロイドホルモン合成に関連するタンパク質をコードする遺伝子の upstream には SF-1 が結合するプロモーター領域が存在しており[Morohashi and Omura, 1996; Sandhoff et al., 1998]、これらの mRNA 発現は LH によって促進される。また、LHR をコードする遺伝子の upstream にも SF-1 の結合配列が存在することが報告されている[*Tsai-Morris et al., 1991*]。一方、LH による FSHR mRNA 発現のダウンレギュレーションが報告されており[*Orisaka M et al., 2013*]、本研究において 10 日齢卵巣での FSHR mRNA 発現は 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日群で増加傾向を示した。新生児期 EE 投与雌ラットにおいてこれらの LH により誘導もしくは抑制される mRNA の発現に変化がみられたことから、EE 投与による下垂体からの LH 分泌の低下が起きている可能性が示唆された。下垂体からの LH 分泌は視床下部での *kisspeptin-GnRH* シグナリングにより促進されている。過去の研究において新生児期 EE 投与を受けた幼若雌ラットの AVPV および ARC の両視床下部領域において *kisspeptin* をコードする *Kiss1 mRNA* 発現が低下することが報告されている[*Takumi et al., 2012*]。本研究でみられた LH により誘導される mRNA 発現の低下は、新生児期 EE 投与による視床下部での *Kiss1* および *kisspeptin* の発現低下を介した LH 分泌の低下が関与している可能性が示唆される。今後、新生児期 EE 投与雌ラットの幼若期における LH レベルについての解析および視床下部での *Kiss1* 発現についての更なる検討が必要である。

体重増加推移および開眼日齢といった一般的な発育および身体発達の評価項目について新生児期 EE 投与による影響は認められなかった。また、動物の一般状態についても異常がみられた個体はいなかった。同項目については先行研究においても新生児期 EE 投与による影響はみられておらず[*Shirota et al., 2012*]、新生児期低用量 EE 投与は雌ラットの発育および身体発達には影響を及ぼさないことが示された。

雌ラットにおける新生児期 EE 曝露は幼若期卵巣において LHR 発現低下を介し LH による卵胞発育刺激を減弱させることで卵胞発育を抑制することが示唆された。EE 投与による幼若期卵巣での卵胞発育抑制および LH 感受性の低下は視床下部-下垂体-性腺軸の正常な発達を妨げ、加齢後にみられる視床下部-下垂体-性腺軸における異常が示唆される遅発影響の要因となることが考えられる。

E. 結論

F. 研究発表

1. 論文発表

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* 2013;41(7):1011-5. doi: 10.1177/0192623313476575.

2. 学会発表

- 1) 川嶋 潤、中村 知裕、菅田 恵理世、鈴木 紗綾、小川 祐布子、吉田 緑：新生ラットへのエチニルエストロジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響 第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013 年 6 月)
- 2) 代田 眞理子：ラット周生期エストロゲン活性物質曝露による遅発影響-毒性学的視点での解析 第 106 回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013 年 9 月)

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し

3. その他

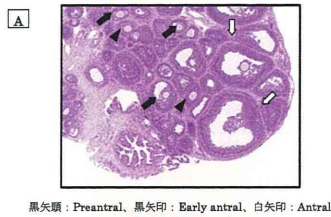
無し

参考文献

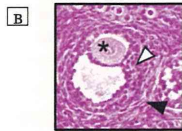
- Aatsinki JT, Pietilä EM, Lakkakorpi JT, Rajaniemi HJ. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. *Molecular Cellular Endocrinology* 84,127-135 (1992)
- Akieda-Asai S, Ohta R, Shirota M, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K. Endocrinological differences between Hatano high- and low-avoidance rats during early two-way avoidance acquisition. *Experimental Animals* 60, 509-516 (2011)
- Ayyanan A, Laribi O, Schuepbach-Mallepell S, Schrick C, Gutierrez M, Tanos T, Lefebvre G, Rougemont J, Yalcin-Ozaysal O, Briskin C. Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Molecular Endocrinology* 25, 1915-1923 (2011)
- Betancourt AM1, Eltoun IA, Desmond RA, Russo J, Lamartiniere CA. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 118, 1614-1619 (2010)
- Burdick HO, Whitney R. Ovulation induced in mice by single injection of follutein or untreated human pregnancy urine. *American Journal of Physiology* 132, 405-410 (1941)
- Bandiera S and Dworschak C. Effects of Testosterone and Estrogen on Hepatic Levels of Cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the Rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296, 286-295 (1992)
- Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ. A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives* 111, 1020-1036 (2003).
- Boutin JM, Jolicœur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53, 69-77 (1988).
- Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicœur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 3, 1455-1461 (1989)
- Byers M1, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol Endocrinol.* 1997 Feb;11(2):172-82.
- Banu SK, Samuel JB, Arosh JA, Burghardt RC, Aruldas MM. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232,180-189 (2008)
- Becú-Villalobos D, González Iglesias A, Díaz-Torga G, Hockl P, Libertun C. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology* 17, 699-715 (1997)
- Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J Agriculture and Food Chemistry* 45,3541-3544 (1997)
- Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54, 138-153 (2000)
- Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *Journal of Nutrition* 132, 658-664 (2002)
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environment and Health Perspectives* 103, 608-612 (1995)
- Chakraborty TR, Gore AC. Aging-Related Changes in Ovarian Hormones, Their Receptors, and Neuroendocrine Function. *Experimental Biology and Medicine* 229, 977-987 (2004)
- Chang L-L, Wun W-S A, Paulus S. Wang PS. In utero and neonate exposure to nonylphenol develops hyperadrenalism and metabolic syndrome later in life. I. First generation rats (F1). *Toxicology* 301, 40-49 (2012)
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary in Vitro and in Vivo. *Endocrinology* 148, 3580-3590 (2007)
- Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG, Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS. Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice. *Biology of Reproduction* 83,114-121 (2010)
- Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology* 34:120-131 (2013)
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceeding of National Academy Science U S A.* 104,10714-10719 (2007)
- Dufau ML, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Buczko E. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53, 283-291 (1995)
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076-1084 (2002)
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews* 30, 624-712 (2009)
- Fernández M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environment and Health Perspectives* 117,757-762 (2009)
- Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90,1492-1498 (1972)
- González-Martínez D, De Mees C, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 149,2333-2340 (2008)
- Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Molecular Endocrinology* 25, 2157-2168 (2011)
- Graham R, Robertson, Geoffrey C, Farrell, Liddle C. Sexually Dimorphic Expression of Rat CYP3A9 and CYP3A18 Genes Is Regulated by Growth Hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 57-60 (1998)
- Greenstein BD. Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors. *Endocrinology* 130, 3184-3190 (1992)
- Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T. Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries. *Biology of Reproduction* 81, 1002-1009 (2009)
- Herath CB, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome NP, Suzuki AK, Taya K. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibitors in the infantile female rat. *Biology of Reproduction* 65,1623-1633 (2001)
- Hirshfield AH. Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29,10-15 (1997)
- Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biology of Reproduction* 81, 1216-1225 (2009)
- Hong H, Branham WS, Dial SL, Moland CL, Fang H, Shen J, Perkins R, Sheehan D, Tong W. Rat α -Fetoprotein binding affinities of a large set of structurally diverse chemicals elucidated the relationships between structures and binding affinities. *Chemical Research of Toxicology* 25, 2553-2566 (2012)
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Developmental Biology* 157, 100-109 (1993)
- Hutter HS, Gibson MJ. Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice. *Biology of Reproduction* 38, 636-638 (1988)
- Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biology of Reproduction* 45, 547-552 (1991)
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda M, AND Hayashi S. Increased Expression of

- Mullerian-Inhibiting Substance Correlates with Inhibition of Follicular Growth in the Developing Ovary of Rats Treated with E2 Benzoate. *Endocrinology* 143, 304–312 (2002)
- Ikeda Y, Tanaka H, and Esaki M. Effects of Gestational Diethylstilbestrol Treatment on Male and Female Gonads during Early Embryonic Development. *Endocrinology* 149:3970-3979 (2008)
- Jager W, Correia MA, Bornheim LM, Mahnke A, WALTER G, Hanstein WG, XUE L, and Benet LZ. Ethynylestradiol-mediated induction of hepatic CYP3A9 in Female rats: implication for cyclosporine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 1505–1511 (1999)
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, and Pepling M. Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival. *Biology of Reproduction* 74, 161–168 (2006)
- Jaroenporn S, Horii Y, Asai S, Wang KM, Nagaoka K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K. Endocrine mechanisms responsible for different follicular development during the estrous cycle in Hatano high- and low-avoidance rats. *Journal of Reproduction and Development* 57, 690-699 (2012)
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1. *Environmental Health Perspectives* 109,785–794 (2001)
- Kelly PA, Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Shirota M, Edery M, Dusanter-Fourt I, Djiane J. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biology of Reproduction* 40, 27-32 (1989)
- Kenny HA, Woodruff TK. Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 147, 51-60 (2006)
- Kezele P, Skinner MK. Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Endocrinology* 144, 3329–3337 (2003)
- Kimura F, Funabashi T. Two subgroups of gonadotropin releasing hormone neurons control gonadotropin secretion in rats. *News of Physiological Sciences* 13,225-231 (1998)
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* 148:1968-1976 (2007)
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263 (1998)
- Lei L, Shiyong J, Kelly EM, Woodruff TK. The Interactions Between the Stimulatory Effect of Follicle-Stimulating Hormone and the Inhibitory Effect of Estrogen on Mouse Primordial Folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 82, 13–22 (2010)
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S. Consequences of Fetal Irradiation on Follicle Histogenesis and Early Follicle Development in Rat Ovaries. *Biology of Reproduction* 75, 749–759 (2006)
- Melinda E, Wilson R, Handa J. Ontogeny of Gene Expression in the Gonadotroph of the Developing Female Rat. *Biology of Reproduction* 56, 563-568 (1997)
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews* 88, 91-124 (2008)
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 64, 293-298 (2001)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 46,1080-1085 (1992)
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biology of Reproduction* 53,1198-207 (1995)
- Moral R, Santucci-Pereira J, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Russo J. In utero exposure to butyl benzyl phthalate induces modifications in the morphology and the gene expression profile of the mammary gland: an experimental study in rats. *Environmental Health* 10, 5 (2011)
- Morohashi KI, Omura T. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB Journal* 10, 1569-1577 (1996)
- Murakami T, Sato A, Inatani M, Sakurai H, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Effect of neonatal exposure of 17beta-estradiol and tamoxifen on hepatic CYP3A activity at developmental periods in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19, 96-102 (2004)
- Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fertility* 113, 27-33 (1998)
- Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K, Ikeda MA. Exposure of neonatal rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *Journal of Medical and Dental Sciences* 50, 35-40 (2003)
- Nagaraja AK, Middlebrook BS, Rajanahally S, Myers M, Li Q, Matzuk MM, Pangas SA. Defective gonadotropin-dependent ovarian folliculogenesis and granulosa cell gene expression in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* 151, 4994-5006 (2010)
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* 150, 2359-2567(2009)
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81, 1535-1565 (2001)
- Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K. Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats. *Experimental Animals* 58, 471-479 (2009)
- Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federal Proceedings* 39, 2365-2371 (1980)
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environment and Health Perspectives* 104, 298–305 (1996)
- Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, Tsang BK, Kotsuji F, Yoshida Y. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 154, 2870-2880 (2013)
- Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research* 54, 175-180 (1998)
- Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 17, 555-557 (1968)
- Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* 151, 722-730 (2010)
- Pinilla L, Castellano JM, Romero M, Tena-Sempere M, Gaytán F, Aguilar E. Delayed puberty in spontaneously hypertensive rats involves a primary ovarian failure independent of the hypothalamic KiSS-1/GPR54/GnRH system. *Endocrinology* 150, 2889-2897 (2009)
- Ramirez MC, Luque GM, Ornstein AM, Becu-Villalobos D. Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice. *Journal of Endocrinology* 207, 301-308 (2010)
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after wxposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biology of Reproduction* 77, 734–742 (2007)
- Richards JS. Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* 97, 1174-1184 (1975)
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environment and Health Perspectives* 109, 675-680 (2001)
- Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicological Sciences* 114, 133-148 (2010)
- Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH, McLean MP. Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology*. 1998 139:4820-4831.
- Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 410-414 (2009)
- Sakurada Y, Sawai M, Inoue K, Shirota M, Shirota K. Comparison of aryl hydrocarbon receptor gene expression in laser dissected granulosa cell layers of immature rat ovaries. *Journal of Veterinary Medical*

- Science 73, 923-926 (2011)
- Schindler R, Nilsson E, Skinner MK. Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF. *PLoS ONE* 5, e12979 (2010)
- Schwarz JM, McCarthy MM. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. *Hormones and Behavior* 54, 662-668 (2008)
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* 349,1614-1627 (2003)
- Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, 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 Science* 37, 681-690 (2012)
- Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K. Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125, 85-94 (2003)
- Shirota M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shirota K, Kelly PA. Detection of in situ localization of long form prolactin receptor messenger RNA in lactating rats by biotin-labeled riboprobe. *Endocrine Journal* 42, 69-76 (1995)
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicœur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 4, 1136-1143 (1990)
- Sokka T, Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *Journal of Endocrinology* 127, 297-303 (1990)
- Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology* 130, 1738-1740 (1992)
- Sokka TA, Huhtaniemi IT. Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction* 52, 1404-1409 (1995)
- Sokka TA, Hämäläinen TM, Kaipia A, Warren DW, Huhtaniemi IT. Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biology of Reproduction* 55, 663-670 (1996)
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Molecular Cellular Endocrinology* 272, 22-37 (2007)
- Takumi K, Iijima N, Iwata K, Higo S, Ozawa H. The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of Kiss1 mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development. *Journal of Physiological Sciences* 62, 453-460 (2012)
- Tena-Sempere M. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *International Journal of Andrology* 33, 360-368 (2010)
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 19 (2006)
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15, 795-803 (2009)
- Toran-Allerand CD. Gonadal hormones and brain development: implications for the genesis of sexual differentiation. *Annual New York Academy of Sciences* 435, 101-111 (1984)
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie XZ, Dufau ML. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1355-11359 (1991)
- Umekita Y, Souda M, Hatanaka K, Hamada T, Yoshioka T, Kawaguchi H, animoto A. Gene expression profile of terminal end buds in rat mammary glands exposed to diethylstilbestrol in neonatal period. *Toxicology Letter* 205, 15-25 (2011)
- Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *Journal of Endocrinology* 191, 549-558 (2006)
- Vannier B, Raynaud JP. Long-term effects of prenatal oestrogen treatment on genital morphology and reproductive function in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility* 59, 43-49 (1980)
- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiaz VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Developmental exposure to Bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149, 5848-5860 (2008)
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141, 3814-3820 (2000)
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131,1-9 (2006)
- Wang C and Roy SK. Development of Primordial Follicles in the Hamster: Role of Estradiol-17 β . *Endocrinology* 148, 1707-1716 (2007)
- Watanabe C, Kuwagata M, Yoshimura S, Azegami J, Kojima K, Ono H, Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Congenital Anomalies (Kyoto)* 43, 177-179 (2003)
- Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, Michelmann HW. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. *Biology of Reproduction* 63, 320-327 (2000)
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 93-115 (2003)
- Yasuno K, Sakashita H, Araki S, Kobayashi R, Sakurada Y, Shirota M, Kamiie J, Shirota K. Cutaneous hybrid cyst in a Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicologic Pathology* 25, 175-178 (2012)
- Yeh J, Kim B. Increasing blunting of inhibin responses to dynamic ovarian challenge is associated with reproductive aging in the rat. *Reproductive Sciences* 14, 10-19 (2007)
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 184, 122-137 (1997)
- Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* 39, 823-834 (2011)
- Yoshida M, Watanabe G, Shirota M, Maekawa A, Taya K. Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in donryu rats. *Journal of Reproduction and Development* 51, 707-714 (2005)
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* 15, 172-183 (2001)
- Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL. Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. *Fitoterapia* 81, 998-1002 (2010)
- 田谷一善、渡辺元、笹本修司. 125I 標識ホルモンを用いたプロジェステロン、エストラジオール 17 β のラジオイムノアッセイについて. *家畜繁殖雑誌* 1985 年 31 巻 4 号 186-197 頁



黒矢頭：Preantral、黒矢印：Early antral、白矢印：Antral



*：卵母細胞、白矢印：顆粒層細胞、黒矢印：莖膜細胞

図1. 幼若ラットの卵巣にみられる各発達段階の卵胞 (A) および卵胞の構成細胞 (B)

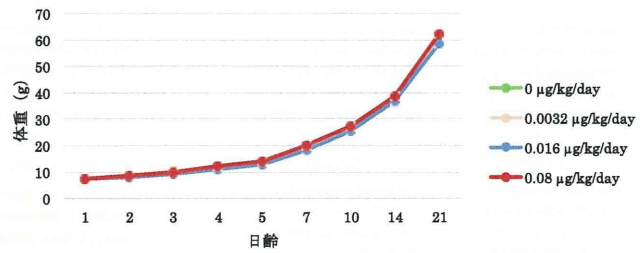


図2. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける離乳までの体重推移

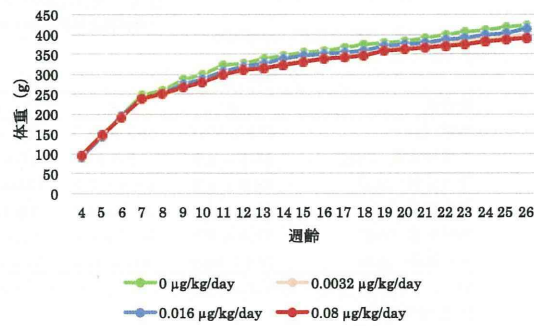


図3. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける離乳後の体重推移

EE 用量 (μg/kg/day)	0	0.0032	0.016	0.08
動物数	7	8	8	8
開眼日齢 (日)	13.1 ± 0.3	13.5 ± 0.3	13.3 ± 0.3	13.3 ± 0.3
開眼日の体重 (g)	34.0 ± 1.8	34.9 ± 2.6	35.2 ± 1.4	35.4 ± 1.8

表1. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける開眼日齢と体重

各値は平均±標準誤差で示した。

EE 用量 (μg/kg/day)	0	0.0032	0.016	0.08
動物数	7	8	8	8
膈開口日齢 (日)	34.3 ± 0.7	33.6 ± 0.8	34.0 ± 0.6	33.4 ± 0.4
膈開口日の体重 (g)	149 ± 4.8	140 ± 5.0	142 ± 4.0	140 ± 3.2

表2. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける膈開口日齢と体重

各値は平均±標準誤差で示した。

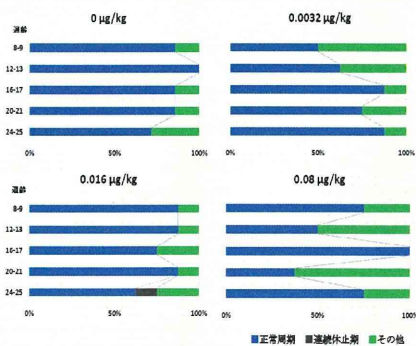


図 4. 新生児期エチルエストラジオール投与ラットにおける性周期パターンの割合
4-5 日間隔で発情を回帰したものを「正常周期」、連続した D が全く見られなかったものを「連続発情」、いずれにも該当しないものを「その他」とした。

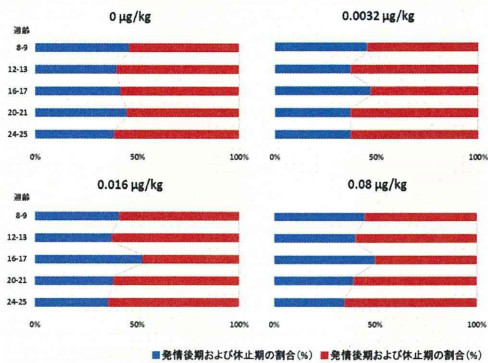


図 5. 新生児期エチルエストラジオール投与ラットにおける発情前期／発情期と発情後期／休止期の割合

動物数	3	4	4	4
体重 (g)	429 ± 17.7	404 ± 11.7	416 ± 21.1	379 ± 19.4
下垂体重量 (mg)	22.9 ± 4.5	18 ± 1.8	17.8 ± 1.4	18.7 ± 0.8
卵巣重量 (mg)	69.8 ± 4.0	84.3 ± 7.1	106 ± 7.0 *	83.7 ± 9.6
肝臓重量 (g)	12.8 ± 1.4	11.5 ± 0.7	12.3 ± 1.2	11.5 ± 0.8
副腎重量 (mg)	78.5 ± 9.1	70.7 ± 2.9	65.7 ± 4.6	74.1 ± 4.9
子宮重量 (mg)	789 ± 69.2	464 ± 130	705 ± 42.3	678 ± 59.2

表 3. 新生児期エチルエストラジオール投与ラットの 27-28 週齢における器官重量
各値は平均±標準誤差で示した。

*はそれぞれ対照群と比較し有意差 (P < 0.05) があることを示す。

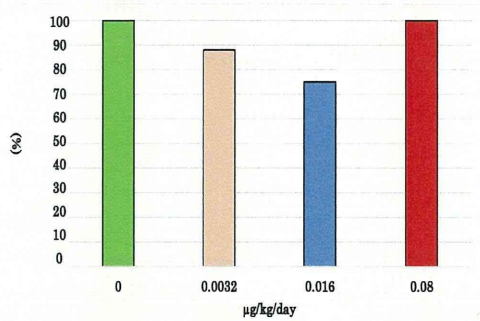


図 6. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット卵巣における黄体保有率
黄体が観察された動物/全動物×100 で示した。

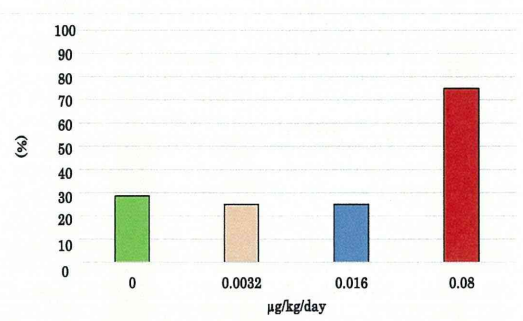


図 7. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット卵巣における囊胞状卵胞保有率
囊胞状卵胞が観察された動物/全動物×100 で示した。

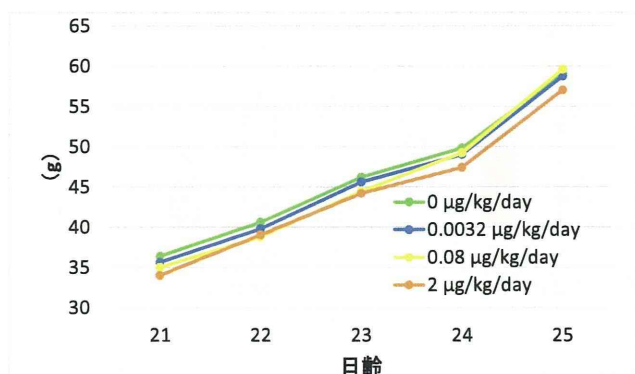


図.8 幼若雌ラットを用いたエチニルエストラジオールの子宮肥大試験における体重推移
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群の動物数を示す。

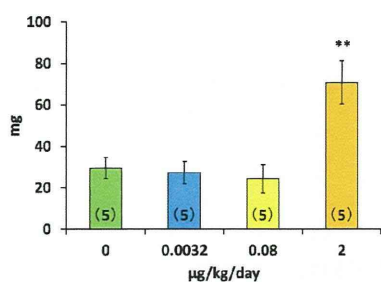


図.9 幼若雌ラットを用いたエチニルエストラジオールの子宮肥大試験における子宮重量
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群の動物数を、**は対照群と比較し有意差 (P < 0.01) があることを示す。

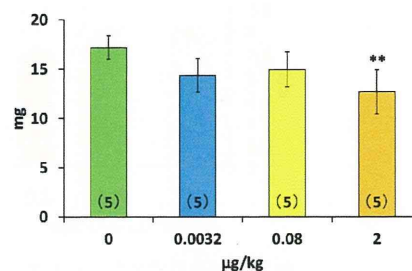
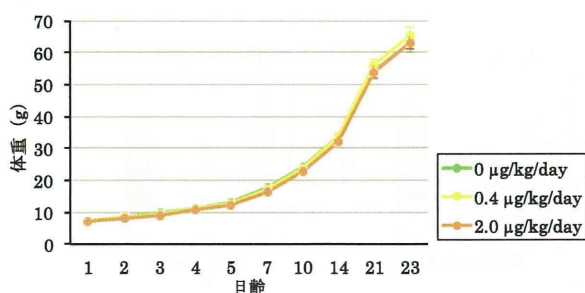


図.10 幼若雌ラットを用いたエチニルエストラジオールの子宮肥大試験における卵巣重量
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群の動物数を、**は対照群と比較し有意差 (P < 0.01) があることを示す。



1-5 日齢 : 0 μg/kg/day(N=23), 0.4 μg/kg/day(N=24), 2.0 μg/kg/day(N=24)

14-23 日齢 : 0 μg/kg/day(N=9), 0.4 μg/kg/day(N=10), 2.0 μg/kg/day(N=11)

図 11. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける体重推移

EE	N	開眼日齢 (平均±標準誤差)
0 μg/kg/day	9	13.56 ± 0.53
0.4 μg/kg/day	10	13.5 ± 0.85
2.0 μg/kg/day	11	13.36 ± 0.67

表 4. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける開眼日齢

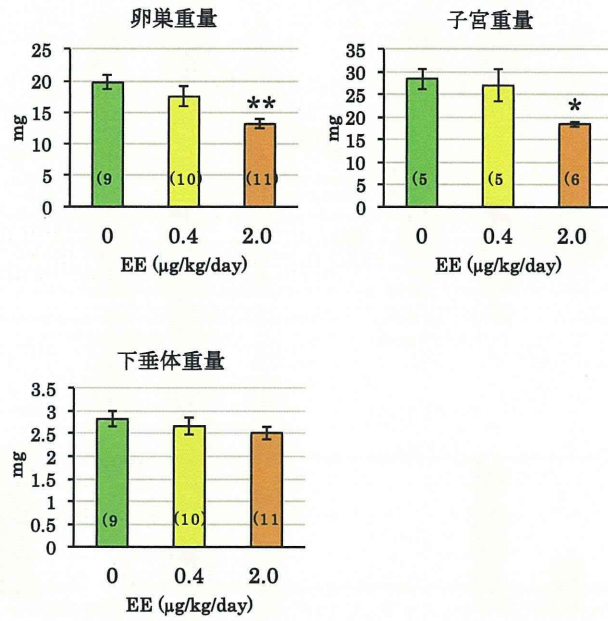


図 12. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットにおける 23 日齢剖検時の器官重量

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、*および**はそれぞれ対照群と比較し有意差 (P<0.05 および P<0.01) があることを示す。

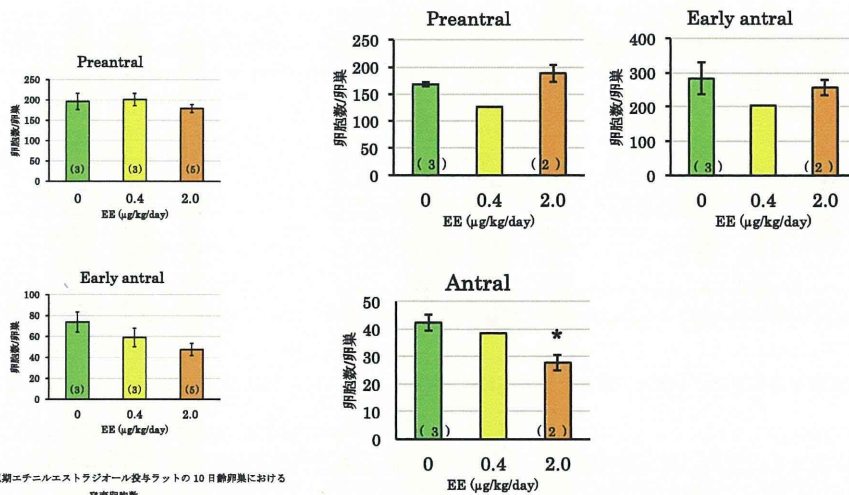


図 13. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットの 10 日齢卵巣における 発育卵胞数

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 14. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラットの 23 日齢卵巣における 発育卵胞数

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、*および**はそれぞれ対照群と比較し有意差 (5%および 1%) があることを示す。

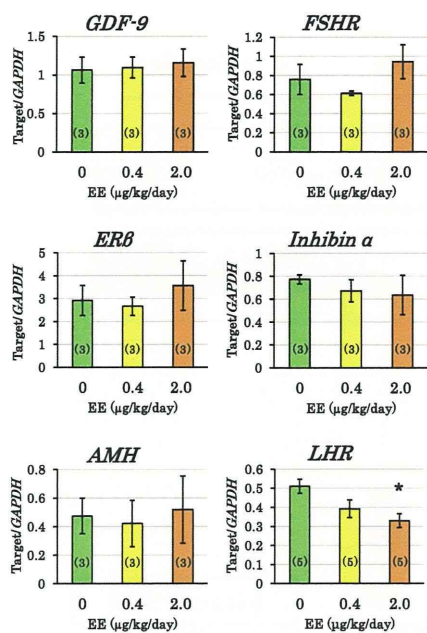


図 15. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 10 日齢卵巣での mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*は対照

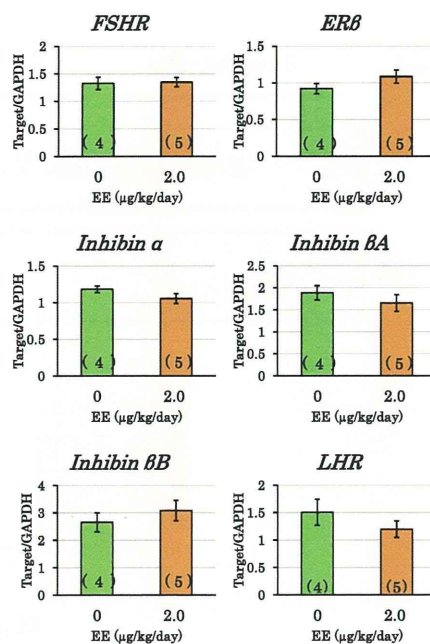


図 16. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 23 日齢卵巣での mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を示す。

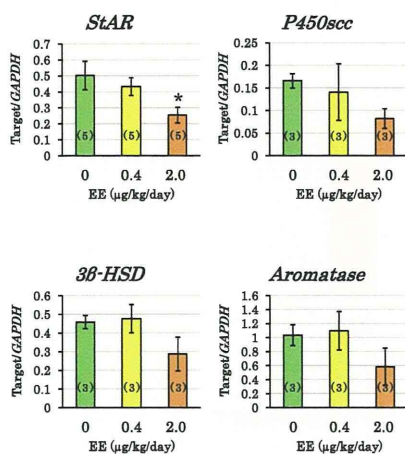


図 17. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 10 日齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA 発現
各値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*は対照群と比較し 5%の水準で有意差があることを示す。

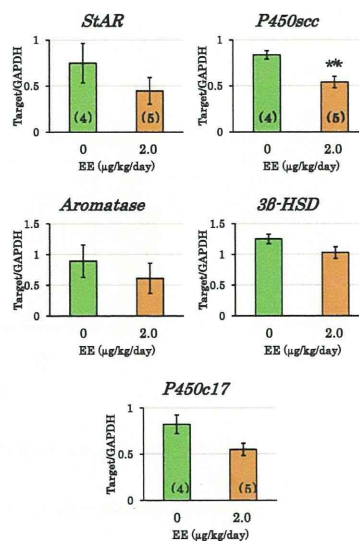


図 18. 新生児期エチルエストラジオール投与ラット 23 日齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA 発現 値は平均±標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を、*および**はそれぞれ対照群と比較し有意差

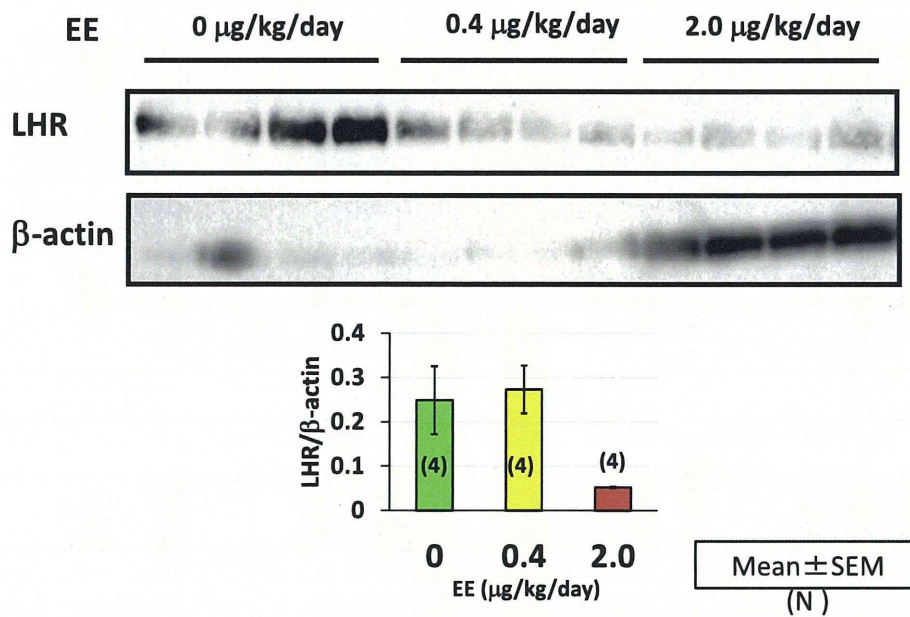


図19. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラット23日齢におけるLH受容体タンパクの発現

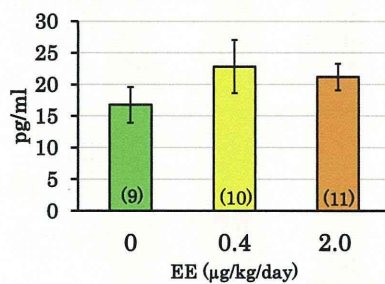


図20. 新生児期エチニルエストラジオール投与ラット23日齢における血清中 E_2 レベル
各値は平均 \pm 標準誤差で示した。カラム内の()は各群のサンプル数を示す。

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変化が果たす役割と閾値に関する研究

分担研究課題： 遅発影響の発現機序検索。特に遅発影響をもたらす視床下部の制御部位の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ
-エストロジェンの新生期曝露による雌ラットの生殖機能制御遺伝子発現に対する遅発性影響-

研究分担者： 渡辺 元 東京農工大学大学院農学研究大学院動物生命科学部門教授
研究協力者： 永岡 謙太郎 東京農工大学大学院農学研究大学院動物生命科学部門助教
白田賢人 東京農工大学 獣医生理学教室
張浩林 東京農工大学 獣医生理学教室

研究要旨

本研究は、エストロジェン様作用をもつ化学物質の新生期曝露により起こる遅発性影響の機序を解明することを目的として行った。モデル物質としてエチニル・エストロジェン (EE) を用い、EE の新生期曝露が性成熟後に雌ラットの生殖機能に及ぼす影響について解析を行った。

出生後 24 時間以内の雌ラットに、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与した。性成熟後からサンプル採取までの間、膣スメアを観察することにより発情周期を記録した。90 日齢において、発情前期（午前および午後）、発情期、休止期の各発情周期ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定、脳における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

90 日齢まで、対照群では全ての個体で正常発情周期を示したが、EE 投与群では 32 例中 2 個体(EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で 1 個体、EE 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で 1 個体)で異常発情周期を示す個体がみられた。対照群、EE 投与群ともに発情周期午後における黄体形成ホルモン (LH) のサージが観察されたが、EE 投与群では対照群に比べて EE 投与量に応じたサージピーク値の低下がみられた。90 日齢の脳については、LH サージに関与するとされる前腹側脳室周囲核および視索前野 (AVPV/POA) のキスペプチンの mRNA 発現量が EE 投与群で投与量に応じて低下していた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) ニューロンおよび下垂体での LH mRNA 発現は対照群と EE 投与群で違いはみられなかった。

EE の新生期曝露により、発情周期の乱れといった遅発性影響がみられる以前より、LH サージの低下および LH サージの誘起に関連するキスペプチンの遺伝子発現量の低下が確認された。このことから、曝露後に脳内に移行した EE がキスペプチンの発現に直接関与する事で、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

約 20 年前の 2001 年に World Wildlife Federation (WWF) が内分泌攪乱物質 (EDCs) に関する最初の会合を開いた [1]。EDCs には合成あるいは天然の様々な化学物質が含まれ、その多くはエストロゲン作用を示す [1]。哺乳動物においてエストロゲンは胎子の発生過程において様々な器官の発達に影響を及ぼすことから、EDCs が胎子期あるいは新生子期の感受期に曝露されることによって生殖に関与する内分泌及び神経系に障害が生じる [4]。

齧歯類では胎子期末期から新生子期初期にかけて脳の性分化が起きることが知られている [5]。雄では精巣から分泌されるアンドロゲンが血液脳関門を通過し、神経細胞が発現する芳香化酵素によってエストラジオールへと変換される [6]。このエストラジオールが雄脳の正常な性分化には必要不可欠である。メスでは発育途上の卵巣からエストラジオールが分泌されるが、 α -fetoprotein と結合するため血液脳関門をほとんど通過できない [7]。 α -fetoprotein と結合しない合成エストロゲン製剤は出生前後に曝露されれば雌の脳性分化に影響すると予想される。

近年、キスペプチンが視床下部・下垂体・性腺軸において春機発動および発情周期の促進的調節を行っている重要な神経ペプチドであることが報告されている [8]。キスペプチンは視床下部において主に anteroventral periventricular nucleus (AVPV) と arcuate nucleus (ARC) において発現していることが報告されている [9]。AVPV のキスペプチンニューロンの数は雌雄差が顕著であり、雌の方が雄より多いが、ARC においては雌雄差が無い [10]。雌マウスにおいて AVPV のキスペプチンニューロンの数は出生後に増加し、春機発動期には成熟動物と同等になる [11]。キスペプチンニューロンはエストロゲンレセプター α (ER α) を発現しているため、キスペプチンニューロンの増加は卵巣からのエストラジオールによ

て調節されていると考えられている。実際キスペプチンニューロンの ER α の発現を減少させると春機発動が抑制されるし、正常な発情周期の発現が傷害される [12]。

キスペプチンは G タンパク共役型受容体 GPR54 [8]。この受容体は視索前野 POA と弓状核 ARC の GnRH ニューロンに発現している。キスペプチンは POA の受容体に結合し、GnRH サージを惹起することによって下垂体からの LH サージを誘起する [14]。一方 ARC の受容体に結合したキスペプチンは GnRH のパルス状分泌を調節し、下垂体からの LH パルスを調節する [13,15]。EDCs がこれらのキスペプチンニューロンを介して生殖機能異常を起こしていることが報告されている [16,17]。しかしながら EDCs がどのようにしてキスペプチンニューロンに影響を与えるかについては不明な点が残されている。

本研究では Ethinyl Estradiol (EE) を EDCs のモデル化学物質として用いて研究した。過去の実験において、EE (20 μ g/kg) の出生 24 時間以内 (PND1) 投与により生後 171-190 日齢に発情周期の乱れが認められた (Nozawa et al)。新生子期における EE 曝露がキスペプチンニューロンに与える影響について、正常に発情周期を示す生後 90 日齢において、生殖ホルモン分泌と AVPV/POA および ARC と下垂体における遺伝子発現の変化について研究した。その結果、EE 曝露によって LH サージのピーク値の低下や AVPV/POA におけるキスペプチン遺伝子発現の現象が認められた。

B. 研究方法

2.1 実験動物

成熟雌 Wistar-Imamichi ラットを 14 時間明 10 時間暗の明暗条件、温度 25 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 % の条件で飼育した。餌 (MR-Breeder, Nosan Corporation, Yokohama, Japan) および水は自由に摂取させた。

2.2 実験方法

Fig.1 に実験の概略を示した。新生子を1腹あたり雌6雄3, 計9頭に調整した。雌には出生24時間以内に首背部より次の処置を施した。1) 溶媒として用いたゴマ油皮下投与(対照群)、2) EE 20 µg/kg 皮下投与群、3) EE 200 µg/kg 皮下投与群。各処置群とも16頭を用いた。臍開口を確認し、開口後は毎日臍スミアを採取して、90日齢まで発情周期を確認した。各処置群を90日齢付近でさらに休止期2日目11時(D)、発情前期11時(PE11)、17時(PE17)、発情期11時(E)の各時刻に4頭ずつ安楽殺し、血液を採取した。血液を3000 rpm、15 min、4 °Cで遠心分離して、血清を-20 °Cでホルモン濃度の測定まで保存した。脳から速やかにAVPV/POA、ARCと下垂体を採取して、液体窒素で急速凍結し、mRNA抽出まで-80 °Cで保存した。AVPV/POAとARCを脳の横断面でパンチセット(inner diameter of 1.0mm; Stoeling Corporation., IL, USA [20])を用いて、脳地図(Paxinos and Watson atlas [21])に基づき採取した。

2.3 ホルモン測定

血清中黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH) およびプロラクチン(PRL)をradioimmune assay (RIA) kit (NIH, Bethesda, MD)を用いて測定した。ヨード化ホルモンとして rat LH-I-7, rat FSH-I-7, rat PRL-I-6をそれぞれ用いた。第1抗体としてはそれぞれ anti-rat LH-S-10, anti-rat FSH-S-11, PRL-S-9を用いた。測定結果はそれぞれ NIDDK rat LH-RP-3, FSH-RP-2, PRL-RP3として表示した。アッセイ内およびアッセイ間変動はそれぞれ LH:2.7%と

22.08%、FSH:7.1%と22.75%、PRL:2.46%と22.20%であった。

血清中のインヒビン ir-inhibin を抗ウシインヒビンウサギ血清(TNDH-1)と 125I-labeled 32-kDa bovine inhibin を用いた RIA 法で測定した。結果は 32-kDa bovine inhibin として表示した。アッセイ内およびアッセイ間変動は 4.77%と 10.30%であった。

血清中エストラジオール (E2) とテストステロン (T) を 125I で標識したホルモンを用いた二抗体法 RIA 法で測定した。エストラジオールの抗体 (GDN #244) とテストステロンの抗体(GDN #250) は Dr. G.D. Niswender (Animal Reproduction and Biotechnology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA)から供与された。アッセイ内およびアッセイ間変動はそれぞれ E2: 5.47% と 18.40%、T: 2.89%と 21.28%であった。

2.4 定量的 real-time PCR

各サンプルの Total RNA を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)によって抽出した。相補的 DNA (cDNA) は PrimeScript reverse transcriptase (TaKaRa bio, Shiga, Japan)を用いて定法により作成した。Oligonucleotide primer は Primer3 software を用いてデザインした Table 1。PCR 反応は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio)を用いて行い、目的の mRNA 発現量は GAPDH mRNA あるいは β -Actin mRNA を基準に $2^{-\Delta\Delta CT}$ で定量した。

2.5 統計解析

結果は各3回の測定結果を基に平均±標

準誤差で表示した。まず one-way analysis of variance で解析後 multiple range tests (Graph Pad Prism5)で有意差検定を行った。p < 0.05 をもって有意差有りとした。

(倫理面への配慮)

東京農工大学動物実験指針に基づき実験を行った。

C. 研究結果

3.1 生殖指標に対する新生子期 EE 曝露の影響

Fig.2a に体重の変化を示した。EE 投与群の発育には対照群との差が見られなかった。性成熟の指標である膣開口日を Fig. 2b に示した。膣開口日についても EE 投与による変化が見られなかった。Fig.2c に 90 日齢における正常発情周期を示す動物の%を示した。少なくとも 4 日間どう用の膣スメア像を示した場合に異常発情周期とした。90 日齢では全ての群において発情周期に差が見られなかった。

3.2 90 日齢における性ホルモン分泌動態に対する新生子期 EE 投与の影響

Fig.3 に血清中 LH、FSH、inhibin、prolactin、estradiol、testosterone の変化を示した。LH サージは全ての群で PE17 に認められたが、ピーク値は EE 投与群で投与量に応じて減少した。他のホルモン濃度については対照群と EE 投与群の間に差が認められなかった。

3.3 90 日齢における視床下部の遺伝子発現に対する EE 投与の影響

EE 投与によって視床下部の遺伝子発現

にどのような変化が生じるのかを明らかにするために、AVPV/POA と ARC において kisspeptin (kiss1)、GPR54、ER α 、GnRH precursor (GNRH1)の mRNA を real-time PCR で解析した。AVPV/POA において kiss1 mRNA は PE17 に EE 投与群で用量に依存して減少した(Fig. 4a)。GPR54、ER α 、GNRH1 mRNA の発現には変化が認められなかった(Fig. 4b-d)。ARC において ER α mRNA が EE 投与群において対照群に比べ PE17 に増加していた(Fig. 5c)。kiss1、GPR54 および GNRH1 mRNA については変化が認められなかった (Fig. 5a,b,d)。

3.4 90 日齢における下垂体の遺伝子発現に対する EE 投与の影響

下垂体における LH β subunit (LH β)と FSH β subunit (FSH β)、プロラクチン (PRL)、GnRH 受容体 (GNRHR) の mRNA を real-time PCR で解析した(Fig.6)。LH β mRNA は D11 時 PE17 時に 200 μ g/kg の EE 投与群で対照群に比べ有意に減少した(Fig. 6a)。その他の mRNA については変化が認められなかった (Fig. 6b-d)。

D. 考察

近年 EDCs による周生期曝露が脳の発達に影響し、視床下部・下垂体・性腺軸の調節系を変化させることが性成熟後に生殖機能に異常を発現する原因ではないかとする報告が蓄積されている。本研究はその原因の 1 つと考えられる変化を明らかにした。新生子期の EE 曝露によって生後 90 日齢で正常に発情周期を回帰する雌ラットにおいても LH サージのピークの低下が生じてい

ることが明らかとなった。これらの動物は90日齢で既にAVPV/POAにおけるkisspeptin mRNAの発現量が減少しており、180日齢では発情周期の乱れを示した。雄ラットではLHサージが無く、AVPV/POAにおけるkisspeptinの発現も雌に比べ少ない[10,23]。EE曝露群では周生期におけるAVPV/POAの部分的雄性化が起きており、その結果90日齢におけるkisspeptinの発現低下とLHサージの減少が起きたのではないかと推定された。90日齢に見られたこのような変化が180日齢における発情周期の乱れの原因になるかどうかはさらに解析が必要である。

本研究においてEE (20 and 200 µg/kg)の投与は出生24時間以内に皮下投与であるにもかかわらず、kiss1 mRNAのAVPV/POAにおける発現の変化は90日齢で認められた。EE (5-50 µg/kg/day)を母親に妊娠7日から生後22日まで経口投与しても、50日齢においてAVPV/POAにおけるkiss1 mRNAの発現に影響がないことが報告されている[15]。母体へのEE投与によって胎子あるいは乳幼子にEEがどの程度到達しているかは明らかではないが、低用量EEの長期曝露はkiss1遺伝子に変化をもたらすには不十分であった。EEは母体では代謝あるいは排泄され、胎盤あるいは乳腺からは子への移行が少ないのではないかと推定される。EE投与の経路や時間に対する配慮が重要である。

エストロジェンがキスペプチンニューロンにおけるkiss1 mRNAの発現を調節していることはよく知られている[8]。エストロジェン受容体(ER)にはER α とER β 2の種類がある[24]。ER α mRNAは子宮、乳腺、

精巣、下垂体、肝、腎に豊富にあり、ER β mRNAは卵巣と前立腺に多く発現している[25]。キスペプチンニューロンはER α を豊富に発現しており、雌で雄より多く発現している[26-28]。卵巣摘出したER α ノックアウトマウスではキスペプチンニューロンのkiss1 mRNAの発現はエストロジェン投与によって刺激されない[29]。このようにER α はkiss1の発現に重要である[30]。

AVPV/POAとARCにおけるER α の発現は対照群とEE投与群で差が認められなかった。さらに、EEによって血中エストロジェン濃度は変化しなかった。併せて考えるとAVPV/POAにおけるkiss1 mRNAの減少はEE投与によってエストロジェン受容体の下流の抑制が起きた結果であると推定された。

LHサージはkiss1 mRNAの減少と併せて認められた。本研究ではAVPV/POAとARCはGnRHニューロンを含んでおり、GnRHとGPR54のmRNA発現量に有意差が認められなかった。GnRHニューロンがEE投与によって影響を受けていないと推察された。AVPV/POAから分泌されたGnRHが下垂体前葉のゴナドトロフを刺激してLHのサージ状放出を起こすのに対し、ARCからのGnRHパルスはタンパク合成系を動かしLHの基礎分泌を調節している。LHサージの減少はAVPV/POAにおけるkiss1 mRNA発現の減少を意味しているとかんがえられる。

中期の加齢ラットに見られた連続発情はLHサージの低下を伴っており、AVPVにおいてkiss1 mRNAとc-fosを共発現する細胞の減少を示した。しかしながらkiss1 mRNA発現量とキスペプチンニューロンの数に関して、若い正常発情周期を回帰す

る雌ラットとの差が認められなかった[31-34]。これらの報告から、新生子期 EE 投与によってキスペプチンニューロンの数が抑制されたのではないかと推察された。近年ダイノルフィンが雌ラットにおける春機発動の引き金となっているとの報告があった。ダイノルフィンはキスペプチンニューロンで発現している。κ-opioid receptor (KOR)は、ダイノルフィンレセプターでもあり、雌ラットで春機発動を惹起していると考えられている[35]。キスペプチンニューロンの機能を明らかにするためには、kiss1 の調節機序の解明だけでなく、併せて他の神経ペプチドの解析が不可欠である。

E. 結論

EE の新生期曝露により、発情周期の乱れといった遅発性影響がみられる以前より、LH サージの低下および LH サージの誘起に関連するキスペプチンの遺伝子発現量の低下が確認された。このことから、曝露後に脳内に移行した EE がキスペプチンの発現に直接関与する事で、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

参考文献

1. Andrew K. Hotchkiss, Cynthia V. Rider, Chad R. Blystone, Vickie S. Wilson, Phillip C. Hartig, Gerald T. Ankley, Paul M. Foster, Clark L. Gray, and L. Earl Gray. Fifteen Years after "Wingspread"-Environmental Endocrine Disruptors and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicological Science* 2008; 105: 235-259.
2. Mohd Yusoff Nurulnadia, Jiro Koyama, Seiichi Uno, Asami Kito, Emiko Kokushi, Eugene Tan Bacolod, Kazuki Ito, Yasutaka Chuman. Accumulation of endocrine disrupting chemicals (EDCs) in the polychaete *Paraprionospio* sp. From the Yodo River mouth, Osaka Bay, Japan. *Environ Monit Assess* 2013; DOI 10.1007/s10661-013-3466-y.
3. Michael E. Baker, Doris E. Vidal-Dorsch, Cataldo Ribecco, L. James Sprague, Mila Angert, Narimene Lekmine, et al. Molecular Analysis of Endocrine Disruption in Hornyhead Turbot at Wastewater Outfalls Southern California Using a Second Generation Multi-Species Microarray. *Genomic Analysis of Endocrine Disruption 2013; Volume 8: Issue 9*.
4. Ryo Ohta, Hideo Ohmukai, Hideki Marumo, Tomoko Shindo, Tomoko Nagata, Hiroshi Ono. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reproductive Toxicology* 2012; 34: 323-330.
5. Janice M. Juraska, Cheryl L. Sisk, Lydia L. DonCarlos. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Hormones and Behavior* 2013; 64: 203-210.
6. Andrea C. Gore. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2008; 29: 358-374.
7. Christelle De Mees, Jean-Francois Laes, Julie Bakker, Johan Smits, Benoit Hennuy, Pascale Van Vooren et al. Alpha-Fetoprotein Controls Female Fertility and Prenatal

- Development of the Gonadotropin-Releasing Hormone Pathway through an Antiestrogenic action. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 2012-2018.
8. Alexander S. Kauffman, Michelle L. Gottsch, Juan Roa, Alisa C. Byquist, Angelena Crown, Don K. Clifton. Sexual Differentiation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Rat. *Endocrinology* 2006; 148(4): 1774-1783.
 9. Leonor Pinilla, Enrique Aguilar, Carlos Dieguez, Robert P. Millar, and Tana Sepere. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Kisspeptins and Reproduction* 2012; 92: 1235-1316.
 10. Heather L. Bateman, Heather B. Patisaul. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with increased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *NeuroToxicology* 2008; 29: 988-997.
 10. Heather L. Bateman, Heather B. Patisaul. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with increased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *NeuroToxicology* 2008; 29: 988-997.
 11. Jenny Clarkson, Allan E. Herbison. Postnatal Development of Kisspeptin Neurons in Mouse Hypothalamus; Sexual Dimorphism and Projections to Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Endocrinology* 2006; 147 (12): 5817-5825.
 12. Christan Mayer, Maricedes Acosta-Martinez, Sharon L. Dubois, Andrew Wolfe, Sally Radovick, Ulrich Boehm, Jon E. Levine. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons. *Neuroscience* 2010; vol. 107: no.52 22693-22698.
 13. Xiao-Feng Li, James S. Kinsey-Jones, Yewson Cheng, Alice M. I. Knox, Yuanshao Lin, Nikoletta A. Petrou, et al. Kisspeptin signalling in the Hypothalamic Arcuate Nucleus Regulates GnRH Pulse Generator Frequency in the Rat. *Kiss and GnRH Pulse Generator* 2009; Volume 4: Issue 12.
 14. D.Garcia-Galliano, L. Pinilla and M. Tena-Sempere. Sex steroids and the Control of the Kiss1 System: Developmental Roles and Major Regulatory Actions. *Journal of Neuroendocrinology* 2011; 24: 22-33.
 15. Kei-chiro Maeda, Satoshi Ohkura, Yoshihisa Uenoyama, Yoshihiro Wakabayashi, Yoshitake Oka, Hiroko Tsukamura, Hiroaki Okamura. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Research* 2010; 1364: 103-115.
 16. Agnete Overgaard, Klaus Holst, Karen R. Mandrup, Julie Boberg, Sofie Christiansen, Pernille R. Jacobsen. *NeuroToxicology* 2013; 37: 154-162.
 17. Sarah M. Dickerson, Stephanie L. Cunningham, Heather B. Patisaul, Michael J. Woller, Andrea C. Gore. Endocrine Disruption of Brain Sexual Differentiation by Developmental PCB Exposure. *Endocrinology* 2011; 152 (2): 581-594

18. Karen Riiber Mandrup, Pernille Rosenskjold Jacobson, Louise Krag Isling, Marta Axelstad, Karin Dresig, Niels Hadrup et al. Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female wister rats. *Reproductive Toxicology* 2013;42 :180-191.
19. Kaori Nozawa, Kentaro Nagaoka, Haolin zhang, Kento Usuda, Sachiko Okazaki, Kazuyoshi Taya, Gen Watanabe. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affect ovarian gene expression and causes reproductive dysfunction in female rats. *Reproductive Toxicology* in press.
20. Yasuyuki Horii, Sandun L. Dalpatadu, Tomoko Soga, Ryo Ohta, Gen Watanabe, Kazuyoshi Taya, Ishwar S. Parhar. Estrogenic regulation of kiss1 mRNA variants in Hatano rats. *General and Comparative Endocrinology* 2013; 181: 246-253.
21. G. Paxinos, C. Watson. *The Rat Brain Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition*, Academic Press, 2007.
22. David Rodbard. *Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immnoradiometric Assays*. *Clinical Chemistry* 1974; Vol. 20 No. 10: 1255-1270.
23. Yinyang Bai, Fei chang, Rong Zhou, Peng-Peng Jin, Hirokazu Matsumoto, Masahiro Sokabe, Ling Chen. Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge systems in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Neuroendocrinology* 2011; 152 (4): 1562-1571
24. Stefan O Mueller and Kenneth S Korach. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Current Opinion in Pharmacology* 2001; 1: 613-619
25. John F. Couse Kenneth S. Korach. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Review* 1999; 20 (3): 358-417.
26. Michael N. Lehman, Christina M. Merkley, Lique M. Coolen, Robert L. Goodman. Anatomy f the kisspeptin neural network in mammals. *Brainsearch* 2010; 1364: 90-102.
27. Hiroaki Okamura, Takashi Yamamura, Yoshihiro Wakabayashi. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. *Animal Science Journal* 2013; 84:369-381.
28. Jinyan Cao, Heather B. Patisaul. Sexually Dimorphic Expression of Hypothalamic Estrogen Receptors α and β and Kiss1 in Neonatal Male and Female Rats. *The Journal of Comparative Neurology* 2011; 519: 2954-2977.
29. Jeremy T. Smith, Matthew J. Cunningham, Emilie F. Rissman, Donald K Clifton, Robert A. Steiner. Regulation of Kiss1 Gene Expression in the Brain of the Female Mouse. *Endocrinology* 2005; 146 (9): 3686-3692.
30. Jenny Clarkson, Wah Chin Boon, Evan R. Simpson, Allan E. Herbison. Postnatal Development of an Estradiol-Kisspeptin Positive Feedback Mechanism Implicated in Puberty Onset. *Endocrinology* 2009; 150 (7): 3214-3220.

31. Misawa Niki Ishii, Kiyoshi Matsumoto, Hisanori Matsui, Nobuyuki Seki, Hirokazu Matsumoto, Kaori Ishikawa, Fumio Chatani, Gen Watanabe, Kazuyoshi Taya. Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-related disappearance of LH surge in middle-age female rats. *General and Comparative Endocrinology* 2013; 193: 121-29.
32. Jing Zhang, Lumeng Yang, Nan Lin, Xiaodong Pan, Yuanguai Zhu, Xiaochun Chen. Aging-related changes in the RP3V kisspeptin neurons predate the reduced activation of GnRH neurons during the early reproductive decline in female mice. *Neurobiology of Aging* 2013; xxx: 1-14.
33. Dennis W. Matt, Meredith P. Gilson, Timothy E. Sales, Richard J. Krieg, Marie C. Kerbeshian, Johannes D. Veldhuis, William S. Evans. Characterization of Attenuated Proestrous Luteinizing Hormone Surges in Middle-Aged Rats by Deconvolution Analysis. *Biology of Reproduction* 1998; 59: 1477-1482.
34. Jodi L. Downs, Phyllis M. Wise. The role of the brain in female reproductive aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2009; 299: 32-38.
35. Tatsuo Nakahara, Yoshihisa Uenoyama, Akira Iwase, Shinya Oishi, Sho Nakamura, Shiori Miinabe, et al. Chronic Peripheral Administration of Kappa-Opioid Receptor Antagonist Advances Puberty Onset Associated with Acceleration of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion in Female Rats. *Journal of Reproduction and Development* 2013; Vol. 59: No. 5.
- F. 研究発表
1. 論文
- 1) **Kaori Nozawa; Kentaro Nagaoka; Zhang Haolin; Kento Usuda; Sachiko Okazaki; Kazuyoshi Taya; Midori Yoshida; Gen Watanabe Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupt reproductive cycles in female rats. *Reprod Toxicol*. 2014 In Press.**
- 2) Li YS, Piao YG, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K, Li CM. Preventive effect of tert-butylhydroquinone on scrotal heat-induced damage in mouse testes. *Genet Mol Res*. 2013 Nov 11;12(4):5433-41. doi:10.4238/2013.November.11.5.
- 3) Zhou J, Zhang H, Li J, Sheng X, Zong S, Luo Y, Nagaoka K, Weng Q, Watanabe G, Taya K. Molecular cloning and expression profile of a Halloween gene encoding Cyp307A1 from the seabuckthorn carpenterworm, *Holcocerus hippophaecolus*. *J Insect Sci*. 2013;13:56. doi: 10.1673/031.013.5601.
- 4) Nagaoka K, Zhang H, Watanabe G, Taya K. Epithelial cell differentiation regulated by MicroRNA-200a in mammary glands. *PLoS One*. 2013 Jun 4;8(6):e65127. doi:
- 5) Li Y, Huang Y, Piao Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K, Li C. Protective effects of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 on whole body heat stress-induced oxidative damage in the mouse testis. *Reprod Biol Endocrinol*. 2013 Mar 21;11:23. doi: 10.1186/1477-7827-11-23.
- 6) Li C, Li X, Suzuki AK, Zhang Y, Fujitani Y, Nagaoka K, Watanabe G, Taya K. Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on pregnancy in rats. *J Reprod Dev*. 2013;59(2):145-50. Epub 2012 Dec

- 20.
- 7) Zhang H, Nagaoka K, Imakawa K, Nambo Y, Watanabe G, Taya K, Weng Q. Expression of inhibin/activin subunits in the equine uteri during the early pregnancy. *Reprod Domest Anim.* 2013 Jun;48(3):423-8. doi: 10.1111/rda.12091. Epub 2012 Oct 9.
- 8) Nakasato M, Kohsaka H, Mizutani T, Watanabe G, Taya K, Nagaoka K. Pregnancy-associated plasma protein (PAPP)-A expressed in the mammary gland controls epithelial cell proliferation and differentiation. *Endocrine.* 2013 Apr;43(2):387-93. doi: 10.1007/s12020-012-9766-0. Epub 2012 Aug 17.

2. 学会発表

白田賢人、野沢香織、永岡謙太郎、吉田 緑、田谷一善、渡辺 元 エチニルエストロゲンの雌ラットへの新生期曝露による血中ホルモンおよび生殖関連遺伝子発現の変化 第28回日本下垂体研究会(2013年8月 岩手)

G 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
無し