

日間にわたり交配させ、合計 30 腹自然分娩させた。出産が遅れた 3 腹を除き、27 腹を実験に使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、生後 24 時間以内に同じ出産日の児動物を全て回収・混合し、雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた。6~7 腹ずつ 4 群に分け、溶媒である 10%DMSO/sesame oil (対照群)、PPT (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9)10 mg/kg (PPT 群)、DPN (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) 10 mg/kg (DPN 群) を児動物に 1 回皮下投与した。併合投与群では、PPT 10 mg/kg および DPN 10 mg/kg を各 1 回皮下投与 (PPT+DPN 群)した。

生後 21 日に離乳し、PPT 群は 32 匹、その他の群は 36 匹に雌児動物数を調整した。生後 24 日から膣開口の有無を観察し、膣開口を認めた日の体重を測定した。体重測定は生後 13 週までは毎週、その後は隔週に実施した。

10 週齢時に正常性周期を示す動物の中から発情前期の個体を各群 8 匹選抜し、LH サージのピーク時刻である 16:00 に解剖を行った。各群 5 匹については体重測定後、性ホルモン測定のため断頭採血し、血清を凍結保存した。脳、下垂体、乳腺、卵巣、子宮、膣を摘出し、卵巣、子宮重量を測定した。脳から視床下部を切り出し、視交叉を境界として前部 (AVPV に相当) と後部 (ARC に相当) に分け、液体窒素で急速凍結した。その他の臓器は 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、定法に従って HE 染色標本作製した。各群 3 例は脳凍結切片作製用に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。脳以外の臓器は上記と同様に組織学的検索に供した。

7 週齢から 25 週齢まで性周期の観察を行った。性周期の判定は、週 5 日膣スメアを採取し 4 日周期で規則的に発情が回帰する場合を正常性周期、それ以外を異常性周期に分類した。特に発情前期あるいは発情期が 5 日間連続した場合を持続発情とした。PPT 群および PPT+DPN 群では、観察初期

から一部の個体で性周期異常が認められた。正常性周期の個体を選抜して解剖したことにより、異常性周期の割合が人為的に上がるのを是正するため、10 週の時点で異常性周期を示す個体を各 1 例ずつ除外した。

性周期の観察を終了後、26 週齢で発情周期に関係なく全ての動物を解剖した。下垂体、卵巣、子宮、膣、肝臓、副腎を摘出し、卵巣および子宮重量を測定した。臓器は全て 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、HE 染色標本作製した。

### B-3. PPT および DPN の体内濃度分析

雌児動物と同様に、PPT 10 mg/kg あるいは DPN 10 mg/kg を 1 回皮下投与した新生児雄ラットについて、投与後 2、4、24 時間における全身、肝臓および脳における PPT、DPN 濃度を測定した。分析は (財) 日本食品分析センター (東京) に依頼し、LC-MS/MS 法で測定した (定量限界 0.01 ppm)。肝臓および脳は 3 例分の組織を一括して分析に使用した。

### B-4. 統計学的解析

血清性ホルモン濃度、体重、臓器重量、子宮腺の数、遺伝子発現量および膣開口日齢は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、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。正常性周期の割合については 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. EE の新生児期曝露による初期変化の

## 検索

生後7日までに、対照群および2,000 µg/kg群の児動物各1例が死亡した。その後は死亡や異常を示す動物は認められなかった。生後21日までの各群の平均体重はほぼ同様の推移を示した。途中解剖では、一部の群の体重に統計学的有意差が散見されたが、一定の傾向や継続性はなく偶発的变化と考えられた (data not shown)。

対照群の血清FSH濃度は生後12日が最も高く、日齢に従い低下した(図1)。無影響量および遅発性影響量では、生後14日に最も高値を示した。いずれの日齢においても対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。脱雌性化用量では、生後12および14日のFSH濃度は顕著に低く、生後21日では他群よりも有意に高値を示した。血清LH濃度については、群間差は認められなかった。

卵巣、子宮重量の結果を図2に示す。脱雌性化用量では、生後14日における卵巣および子宮重量が対照群に比べて有意に低く、21日においても同様の傾向がみられた。遅発性影響量では、生後14日の卵巣、子宮重量が若干低下していたが、21日では対照群とほぼ同等であった。無影響量では生後14、21日ともに対照群との差はみられなかった。

対照群の卵胞発育は、生後14日では小型胞状卵胞、生後21日では大型胞状卵胞の段階まで進んでおり、無影響量および遅発性影響量においても同様であった。脱雌性化用量では卵胞発育がやや遅延しており、他群に比べ卵胞が小型であった。

生後14日の子宮腺の数は、脱雌性化用量群ではやや増加していたが、いずれの群も有意差は認められなかった(図3)。生後21日では0.002 µg/kg群を除いた群において、子宮腺の数が対照群よりも有意に減少あるいは減少傾向を示した。

生後14および21日における膣粘膜上皮は、3~4層の非角化上皮細胞で構成されていた(図4)。脱雌性化用量群のみで、生後14日に粘膜最上層に好酸性の角化細胞や粘

液含有細胞の出現が観察され、他群とは異なる組織像を示した。

視床下部前部および後部におけるkiss1 mRNA発現レベルを図5に示す。対照群および同日齢の雄における日齢、部位、性別ごとの相対的な発現レベルはin situ hybridization法を用いた過去の報告(Takumi *et al.*, 2011)と概ね一致しており、視床下部前部はAVPV、後部はARCにおけるkiss1発現に相当すると判断した。脱雌性化用量では、視床下部前部におけるkiss1 mRNA発現は、生後14および21日ともに対照群に比べて顕著に低かった。視床下部後部においても、生後14日における発現レベルが対照群に比べて半減しており、雄と類似した発現パターンを示した。無影響量および遅発性影響量では、生後14および21日の視床下部前部のkiss1 mRNA発現は対照群に比べて大きく低下していたが、生後21日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。視床下部後部においては、両日齢とも対照群と差はなかった。

Kiss1 receptorについては、視床下部の部位、日齢に関わらず、mRNA発現量に群間差は認められなかった(図6)。

## C-2. ER $\alpha$ , $\beta$ アゴニストおよびその複合投与による遅発性影響の検索

PPT群では一部の腹で投与直後に食殺が起こり児動物数が減少した。その他の群でも少数例食殺が認められたが、生後5日以降すべての群で死亡や臨床症状の異常は認められなかった。

離乳後の各群の平均体重は、PPT群では生後5週、DPN群では9週にかけて、対照群に比べて有意に高値を示した(図7)。10~17週は群間差のないまま推移し、PPT群では19週から、DPN群およびPPT+DPN群では21週から、対照群に比べて有意に高値を示した。

膣開口日齢は対照群およびPPT+DPN群では生後27.2-27.3日、PPT群およびDPN群では生後27.8-28.2日であった(表1)。

膣開口時の平均体重は対照群および PPT+DPN 群では 78.8 - 80.4g、PPT 群および DPN 群では 88.0 - 88.3g であった。4 群を一括して比較した場合では、対照群に対して PPT 群および DPN 群の膣開口日齢、体重に統計学的有意差がみられたが、同一出産日の 2 群間 (対照群と PPT+DPN 群、PPT 群と DPN 群) では統計学的有意差は認められなかった。

性周期の観察結果を図 8 に示す。対照群では 15 週まで全例が正常性周期を示し、その後徐々に性周期の延長や持続発情を示す個体が増え、正常性周期の割合が低下した。PPT 群では観察を始めた 7 週から異常性周期を示す動物が一部に認められた。10 週以降急激に正常性周期の割合が減少し、19 週以降ではほぼ全例が持続発情を示した。PPT+DPN 群においても、ほぼ同様の推移を示した。DPN 群では 11 週まで全例が正常性周期であったが、13 週から性周期の延長や持続発情を示す個体が出現し、正常性周期の割合は 15 週以降対照群に比べて有意に低下した。

途中解剖 (生後 10 週) では、体重、卵巣および子宮重量に群間差は認められなかった (図 9)。最終解剖 (生後 26 週) では PPT 群、DPN 群および PPT+DPN 群において、体重の有意な増加、卵巣重量の有意な低下が認められた (図 10)。子宮重量に群間差はみられなかった。

### C-3. PPT および DPN の体内濃度分析

単回皮下投与後の PPT 濃度は、全身、脳および肝臓のいずれも 2~4 時間後に高くなり、24 時間後には大きく低下して脳では定量限界以下となっていた (表 2)。全身における DPN 濃度は、PPT と同様に 2~4 時間後に高く、24 時間後には低下していた。一方、脳および肝臓では 2 時間後に最も高く、4 時間後には半分以下に低下し、24 時間後には定量限界あるいはそれ以下のレベルに下降していた。全体として PPT 濃度より DPN 濃度が低い傾向がみられた。

## D. 考察

### D-1. EE の新生児期曝露による初期変化の検索

今回の検索において、EE の新生児期曝露がキスペプチンニューロンの発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。ラットの AVPV では生後 10 日頃から、ARC では生後 0 日から kiss1 mRNA の発現が認められている (Takumi et al., 2011; Cao and Patisaul, 2011)。視床下部前部では、最も低い用量から kiss1 mRNA の発現低下がみられ、AVPV の kiss1 発現ニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。一方、視床下部後部における kiss1 mRNA 発現は、無影響量および遅発性影響量では変化がみられず、AVPV より影響を受けにくいことが示唆された。

脱雌性化量では、生後 14 および 21 日における視床下部前部の kiss1 mRNA 発現が低いまま維持され、視床下部後部においても生後 14 日に kiss1 mRNA 発現が雄と同レベルに低下していた。遺伝子発現パターンが他群とは明確に区別されており、20~2,000 µg/kg の間に脱雌性化の閾値が存在すると推測された。FSH 分泌抑制、卵巣および子宮腺の発達抑制、膣上皮の組織学的変化は視床下部の脱雌性化に伴う変化と考えられた。

無影響量および遅発性影響量群においても、生後 14 および 21 日の視床下部前部の kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。先行研究では、EE の新生児期曝露を受けたラットにおいて、5 週齢あるいは 10 週齢発情期の kiss1 mRNA 発現レベルは対照群と EE 投与群で同等であった (Takahashi et al., 2014)。したがって、無影響量および遅発性影響量で認められた kiss1 mRNA の発現低下は発達期における一時的な変化で、性成熟に向かって対照群との差が縮まっていくものと推測される。

20 $\mu$ g/kg 群では卵巣、子宮重量に若干影響がみられたが、無影響量および遅発性影響量では kiss1 mRNA 発現、FSH 濃度、雌性生殖器の発育に差はみられず、これらのパラメーターは成熟後に現れる性周期の早期停止の予測には直結しないことが示された。遅発性影響では性周期の停止に先行して、発情前期の AVPV における kiss1 mRNA の発現および LH サージの低下が認められ、排卵誘起機能の減弱が示唆されている (Ichimura et al., 2015)。成熟後のキスペプチンニューロンの機能低下に発達期の kiss1 mRNA 発現低下が影響していることが推測されるが、無影響量でも kiss1 mRNA 発の現低下が認められたことから、成熟後に影響が顕在化するには kiss1 以外の因子も関与している可能性が考えられた。

## D-2. ER $\alpha$ , $\beta$ アゴニストおよびその複合投与による遅発性影響の検索

DPN 群では、PPT より作用は弱いものの、対照群に比べて性周期停止の早期化が認められた。性周期の早期停止に ER $\alpha$  が関与することはこれまでの研究成果から明らかであるが、ER $\beta$  の関与については様々な可能性について慎重に考察する必要があると考えられる。

DPN は ER $\alpha$  より ER $\beta$  に対して約 70 倍の結合親和性、約 170 倍の転写活性を示し (Meyers et al., 2001)、ER $\beta$  選択的アゴニストとして使用されているが、ER $\alpha$  への作用が全くないわけではない。本検索では DPN の用量が非常に高く設定されていたため (10 mg/kg)、 $\beta$  アゴニスト作用だけでなく、ごく弱いながらも  $\alpha$  アゴニスト作用が現れ、性周期停止の早期化が起きた可能性も否定できない。この点を明らかにするため、高用量 DPN の子宮肥大試験を計画している。

ラットの AVPV では、ER $\alpha$  と比べると発現量が低いものの出生時から ER $\beta$  mRNA 発現が認められており、性差があるとの報告もある (Orikasa et al., 2002; Cao and Patisaul, 2011)。DPN 新生児期曝露による性周期異常

の報告もあり (Bateman and Patisaul, 2008)、遅発性影響の発現には ER $\alpha$  だけでなく ER $\beta$  も関与することが推測される。しかし、今回の検索では PPT+DPN 群における性周期の停止の発現時期および頻度は、PPT 群とほぼ同等であり、DPN を併合投与したことによる加算、相乗効果は明らかではなかった。その原因の一つとして、PPT の用量が挙げられ、PPT の用量が高すぎて DPN 併合投与による効果が隠れてしまった可能性があることから、低用量についても検討が必要と考えられる。また、性周期以外のパラメーターに併合投与の影響がないかどうか、途中解剖の動物について解析を進める予定である。

PPT 群および DPN 群では、膻開口日齢および 9 週齢までの体重に対照群と有意差が認められたが、同じ出産日の 2 群間で差がなかったことから、投与による影響ではないと判断した。雌ラットにおいて、エストロゲンは摂餌や運動など体重に関わる行動に影響を及ぼし、卵巣摘出により体重が増加することが報告されている (Butera, 2010)。19 週以降に認められた体重増加は、性周期の停止により卵巣由来のエストロゲンが低下した影響であると推察された。

## D-3. PPT および DPN の体内濃度分析

EE と同様に、新生児ラットに投与された PPT、DPN は 24 時間以内に大部分が代謝され、脳への曝露は生後 0~1 日の数時間以内に限定されることが示された。脳における最高濃度は、EE 200  $\mu$ g/kg 投与の場合では 0.059 ppm であったの対し (Takahashi et al., 2013)、PPT 10 mg/kg 投与では 0.35 ppm であった。EE に比べ PPT の投与量は 50 倍高いが、脳内濃度は 6 倍に留まっており、脳内への分布量が EE に比べて少ないことが性周期への影響が弱い原因の一つと考えられた。

## E. 結論

EE の新生児期曝露がキスペプチンニュー

一ロンの発達に影響を及ぼすことが明らかとなり、ARC に比べ AVPV は非常に高い感受性を持つことが示された。

PPT より作用は弱いものの、DPN 群においても性周期停止の早期化が認められた。一方で、今回の検索では性周期に対する PPT、DPN 併合投与の影響は見いだされず、遅発性影響の発現における ER $\beta$  の関与について結論を出すにはさらに検討する必要があると考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.

### 2. 学会発表

- 1) 高橋美和：遅発性影響のメカニズムに迫る-神経内分泌側面から-：第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 2) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod DHAKAL, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元：Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常：第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 3) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑：ヒト肝細胞キメラマウス(PXB マウス)における卵胞発育不全：第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 4) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 白田賢人, 渡辺元, 吉田緑：Ethynyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検索：第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

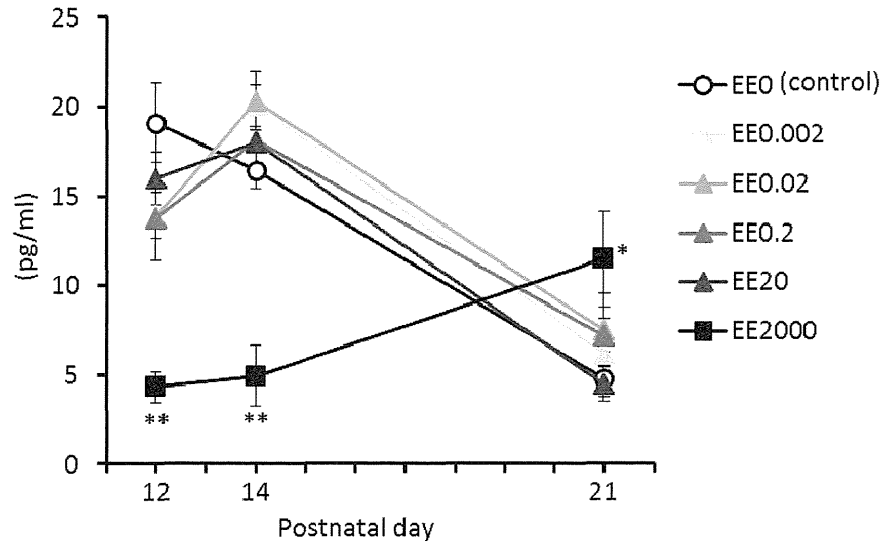
なし

## 参考文献

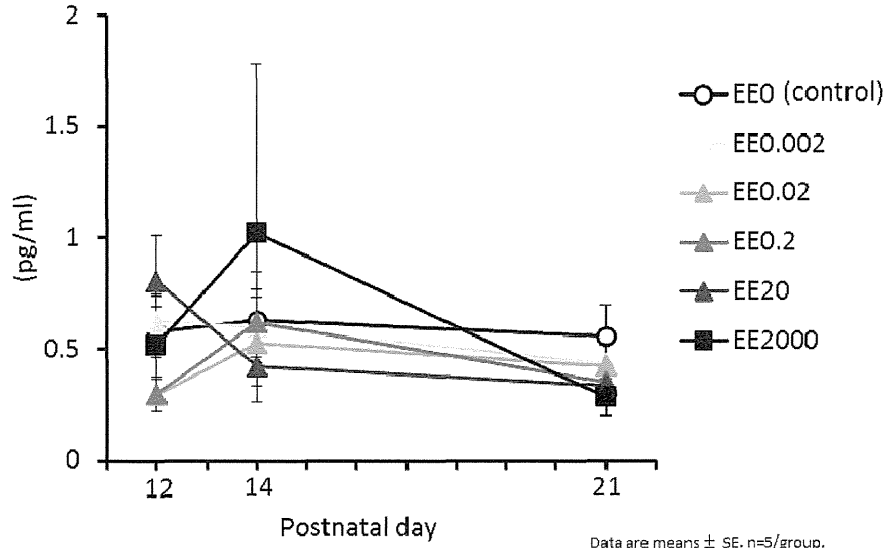
- 1) Bateman HL, Patisaul HB. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*, **29**, 988-997, 2008.
- 2) Butera PC. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav.*, **99**, 175-180, 2010.
- 3) Cao J, Patisaul HB. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol.*, **519**, 2954-2977, 2011.
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reprod Toxicol.*, 2015 in press.
- 5) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 6) Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 3306-3311, 2002.
- 7) Patchev AV, Götz F, Rohde W. Differential

- role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.*, **18**, 1568-1570, 2004.
- 8) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.
- 9) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.
- 10) Takumi K, Iijima N, Ozawa H. Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci.*, **43**, 138-145, 2011.
- 11) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, **69**, 265-270, 1983.

### (A) FSH



### (B) LH



Data are means  $\pm$  SE. n=5/group.  
\*, \*\*: p<0.05 and 0.01 vs 0  $\mu$ g/kg group (Dunnett)

図1. 生後12、14、21日における血清FSH(A) およびLH(B) 濃度

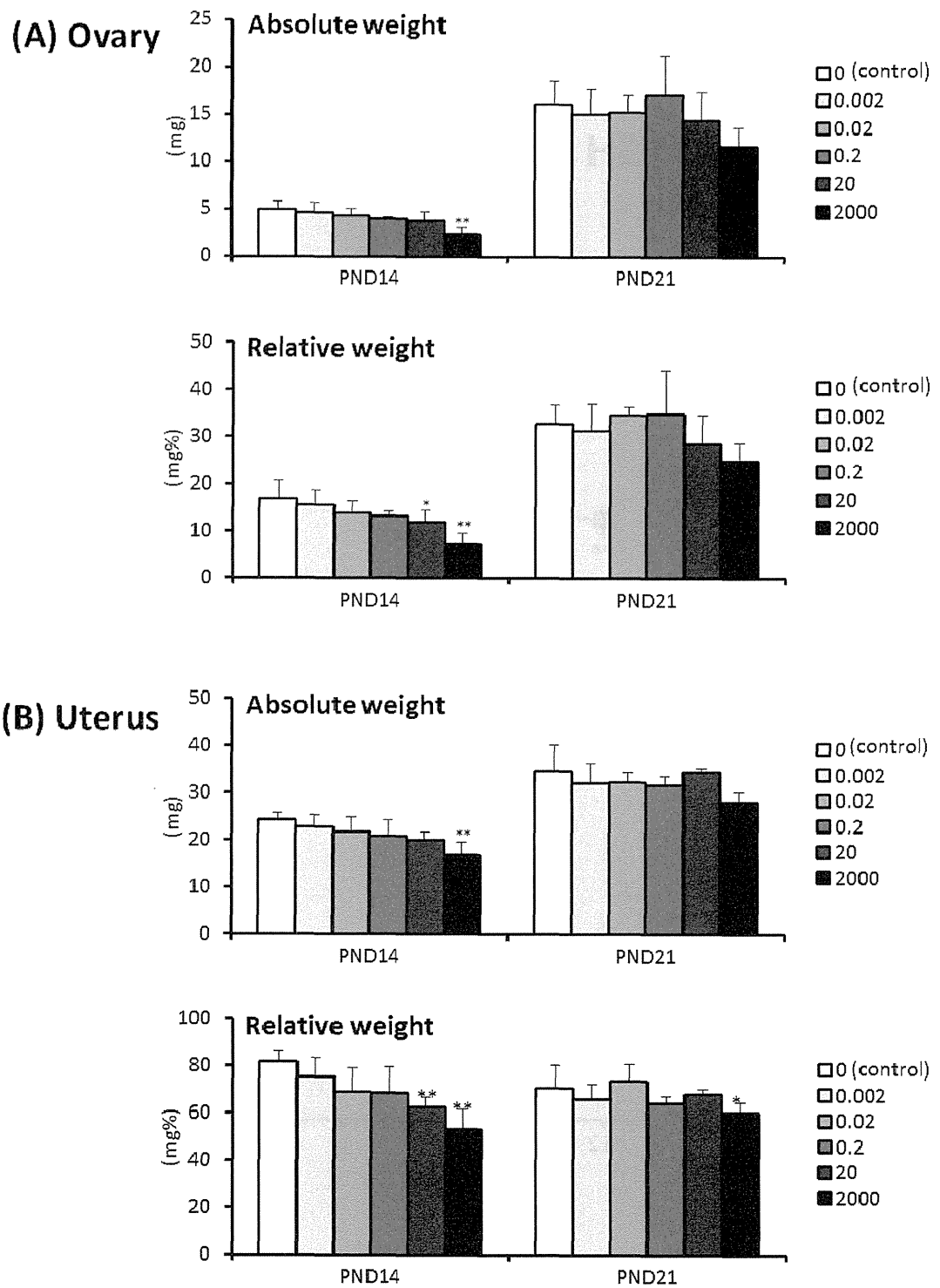


図2. 生後14、21日における卵巣(A)、子宮(B)重量



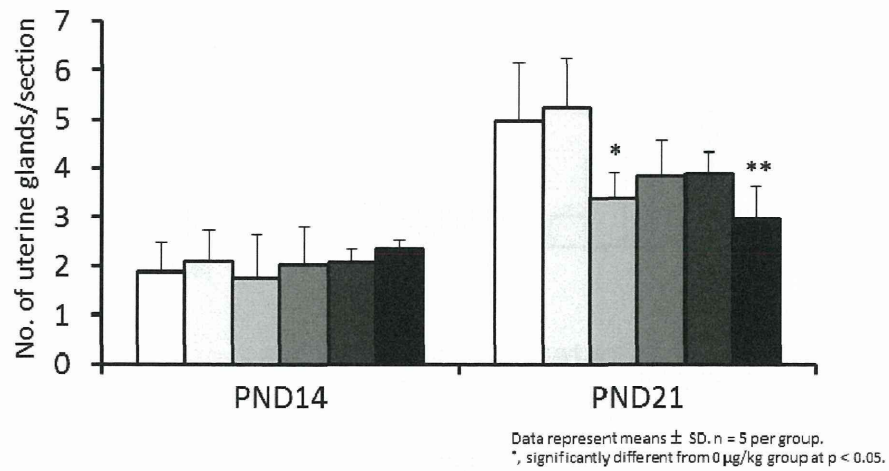


図3. 生後14および21日における子宮腺の数

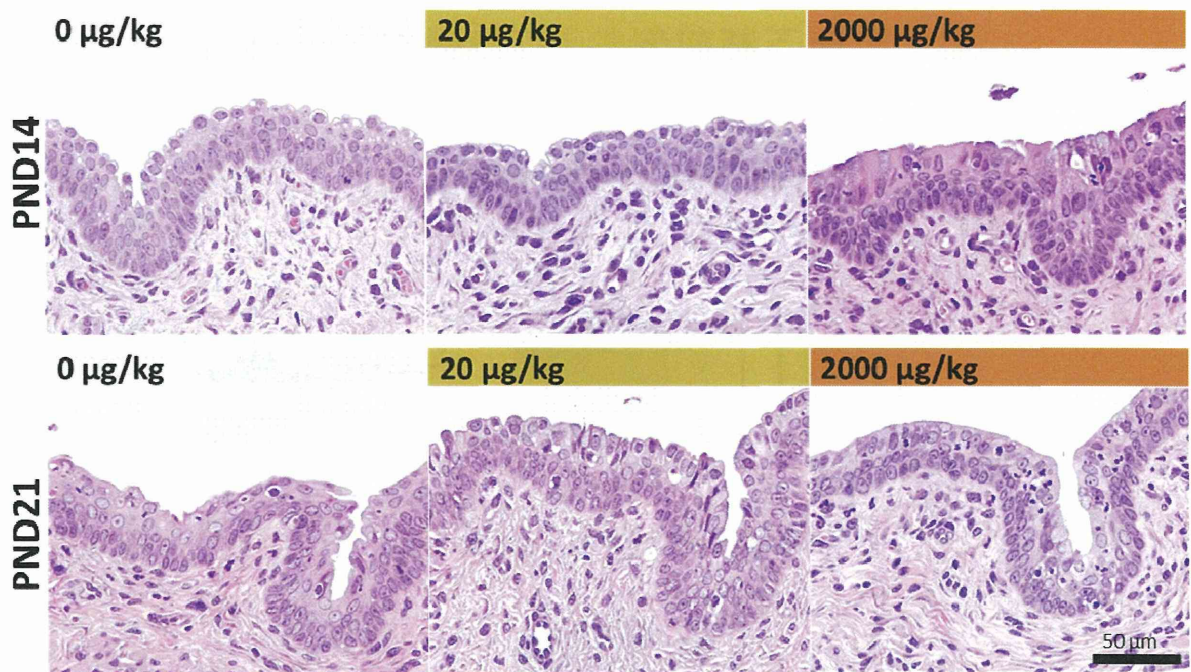


図4. 生後14および21日における膾上皮の組織像

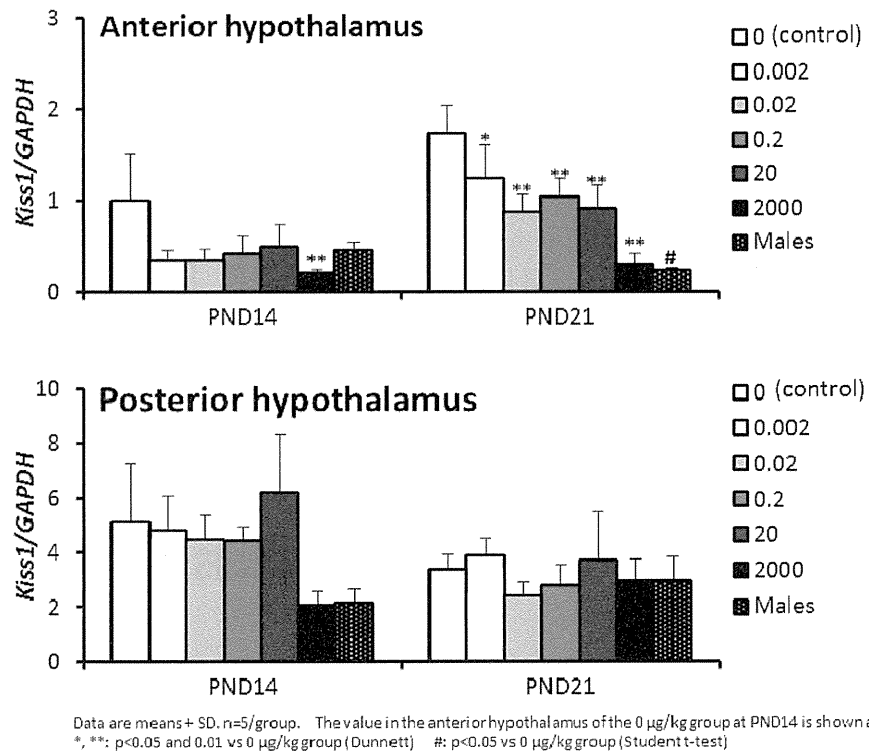


図5. 視床下部前部および後部におけるkiss1 mRNA発現

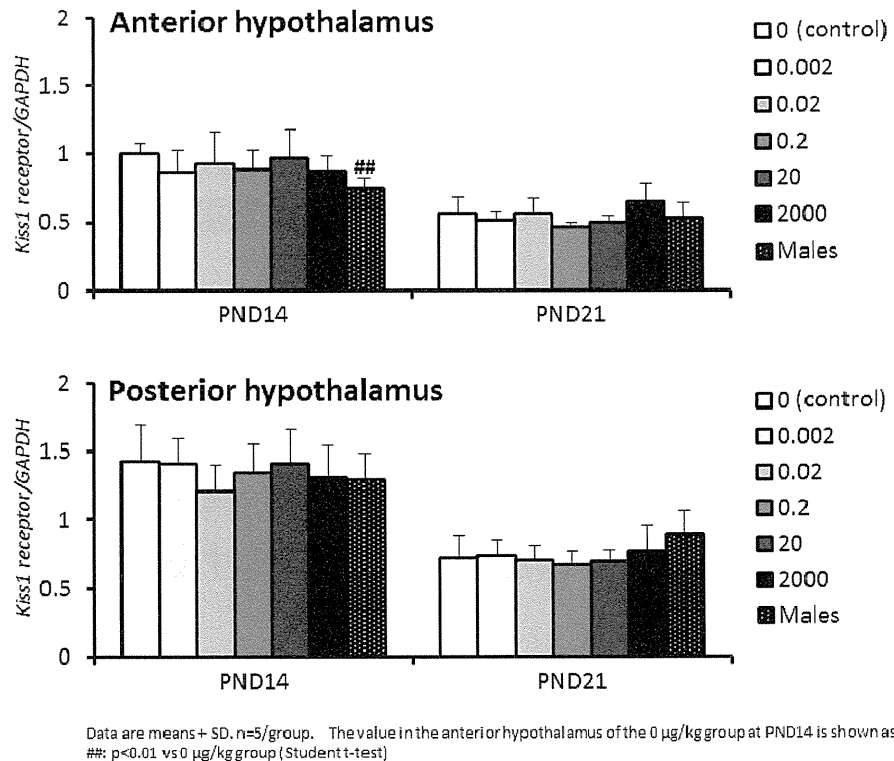


図6. 視床下部前部および後部におけるkiss1 receptor mRNA発現

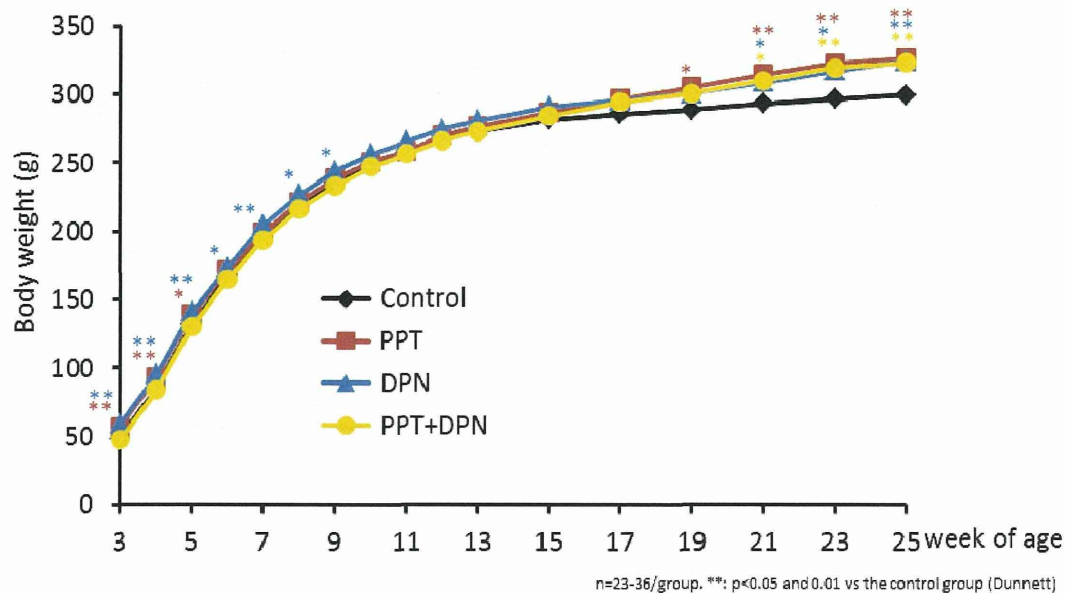
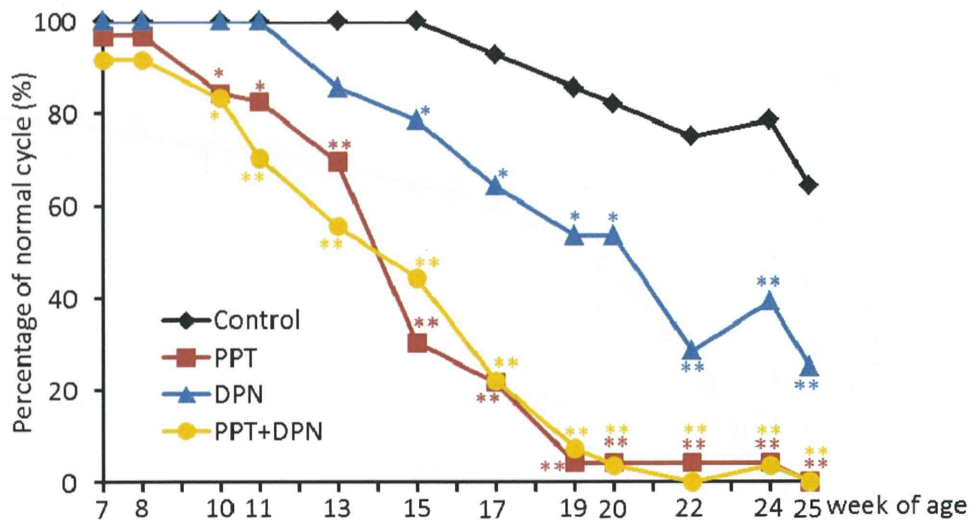


図7. 離乳後の体重推移

表1. PPTおよびDPN新生児期曝露を受けたラットの膾開口平均日齢および体重

Group	No. of animals (litter)	Delivery	Postnatal day	BW (g)
Control	36 (14)	Day 2	27.2 ± 0.7	80.4 ± 7.3
PPT	32 (13)	Day 1	28.2 ± 1.3**	88.3 ± 7.1**
DPN	36 (13)	Day 1	27.8 ± 0.8*	88.0 ± 5.5**
PPT+DPN	36 (14)	Day 2	27.3 ± 1.1	78.8 ± 8.3

\*, \*\*: p<0.05 and 0.01 vs the control group (Dunnett)



n=23-36/group

\*, \*\*: significantly different from the control group at  $p < 0.05$  and  $0.01$ , respectively (Fisher's exact test).

図8. 正常性周期を示す動物の割合

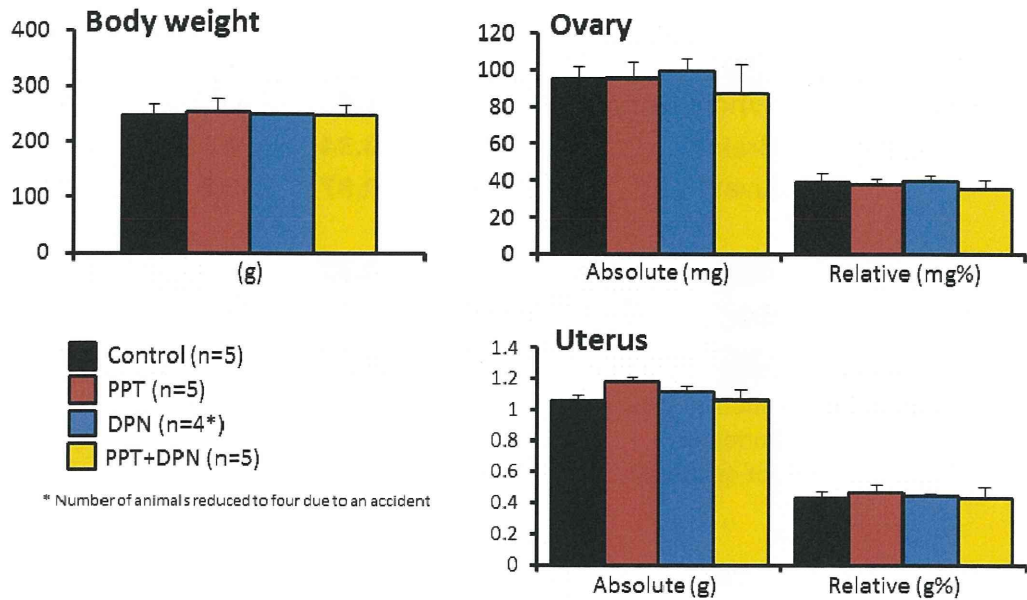


図9. 途中解剖 (10週齢)における体重および臓器重量

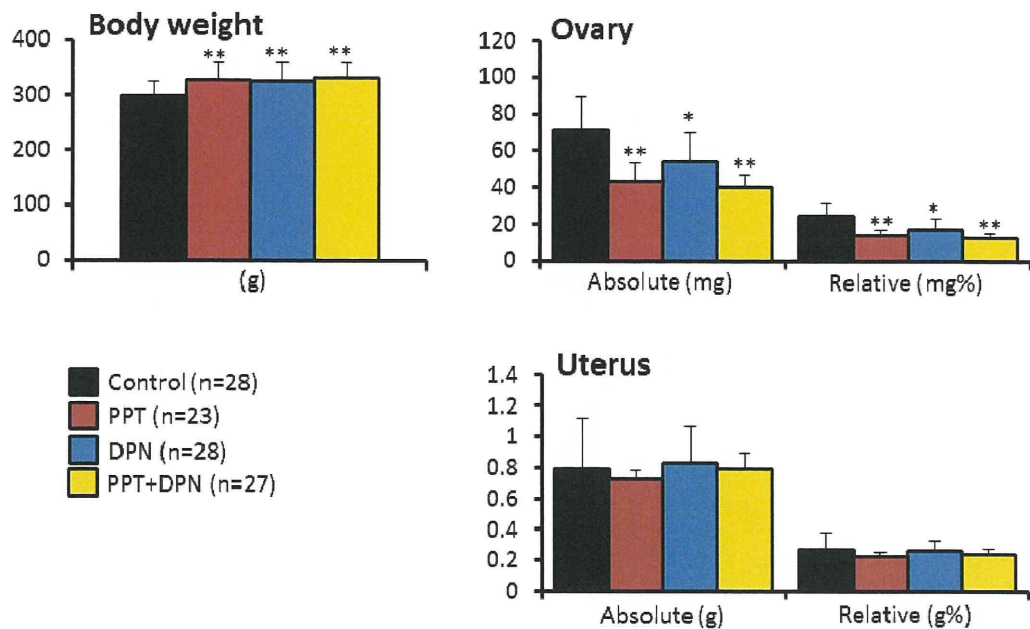


図10. 最終解剖 (26週齢)における体重および臓器重量

表2. 単回皮下投与後の全身、肝臓、脳におけるPPT、DPN濃度

Treatment	Organ		Time point (hours)		
			2	4	24
PPT 10 mg/kg	Whole body	(ppm)	<b>1.6</b>	<b>1.9</b>	0.6
	Brain*	(ppm)	<b>0.34</b>	<b>0.35</b>	-
	Liver*	(ppm)	<b>0.87</b>	<b>0.9</b>	0.01
DPN 10 mg/kg	Whole body	(ppm)	<b>0.73</b>	<b>0.84</b>	0.06
	Brain*	(ppm)	<b>0.19</b>	0.05	-
	Liver*	(ppm)	<b>0.95</b>	0.45	0.01

\* Organs from 3 animals were pooled.

Bold: peak concentration

- below the limit of quantitation (0.01 ppm)

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：キスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係—遅発影響と閾値の関連性

研究分担者：	代田	真理子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	束村	博子	名古屋大学農学部
研究協力者：	上野山	賀久	名古屋大学農学部
研究協力者：	代田	欣二	麻布大学獣医学部
研究協力者：	田中	恵	麻布大学獣医学部
研究協力者：	鈴木	美帆	麻布大学獣医学部
研究協力者：	長谷川	雄太	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高川	奈緒	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高山	尚大	麻布大学獣医学部
研究協力者：	林	美貴成	麻布大学獣医学部

研究要旨

これまでの研究において、モデル化合物とした合成エストロゲンの  $17\alpha$ -ethinylestradiol (EE)を、ラットにおける脳の性分化臨界期であり、原始卵胞形成期である新生期に反復経口投与すると、雌動物に生殖内分泌機能の異常を反映すると考えられる種々の遅発影響が認められ、遅発影響出現までの期間と用量との間に負の相関性が認められることを明らかにした。遅発影響の中でも、子宮肥大試験の検出感度より低い用量でも増加する囊胞状卵胞は、遅発影響の閾値を導く新たな指標になり得るが、囊胞状卵胞は性周期を停止させない用量の EE でも増加することから、性周期停止のメカニズム解明に直接繋がる変化であると考えられる。そこで今年度は、これまでと同様の時期に異なる用量の EE を雌ラット反復経口投与し、性周期回帰停止前の時期に剖検して囊胞状卵胞の保有と視床下部／下垂体／性腺軸の機能との関係を調べた。

その結果、性周期回帰停止前の時期でも囊胞状卵胞の保有率は用量に依存して増加し、保有率が高い用量の卵巣では LH 受容体の発現が増加し、卵胞発育亢進を示唆する遺伝子発現変化が認められた。しかし、子宮重量は低下し、卵巣での変化が血中エストロゲン ( $E_2$ ) レベルに反映されていないことが示唆された。さらに  $E_2$  のフィードバック部位である視床下部弓状核(ARC)および前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子の発現はフィードバックの減弱を示唆する変化を示し、ARC の *kndy* ニューロンの活動が起点となって発生するパルス状 LH 分泌は、卵巣摘出条件下では Amplitude が有意に増加した。これらのことから、性周期回帰停止に先立ち囊胞状卵胞が増加する時期は視床下部／下垂体／性腺軸における情報交換に異常が生じていることが示唆された。



## A. 研究目的

主要な器官の形成が終わった胎児期から新生児期までは、ヒトにおいても動物においても高次機能が分化発達する重要な時期といえる。

我々は、エストロゲン活性評価の陽性対照物質である EE をモデル化学物質に選定し、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる新生雌ラットに、EE を投与すると、性成熟後の性周期回帰停止を始めとする様々な遅発影響が認められることを報告してきた。特に、基底レベル以下のエストロゲンに相当すると考えられる血中 EE 濃度でも、性成熟後に性周期の回帰が停止し、卵巣に嚢胞状卵胞が形成されること、ならびに嚢胞状卵胞形成の最小用量は、子宮肥大試験の検出感度を下回ることを確認した。このような遅発影響は、視床下部/下垂体/性腺軸の変化に起因した生殖内分泌機能の変化を反映しているものと考えられる。

これまでの研究において、EE の用量が高いと、初回排卵が遅滞し、幼若期の卵胞発育が抑制されていることを報告した。一方 EE の用量が低いと、正常な春機発動を経て正常な性周期をある程度の期間回帰した後には停止するようになり、さらに低い用量では性周期回帰停止が対照群より早まる事はないが、性周期を回帰していても卵巣に嚢胞状卵胞が形成されることを認めた。このように、用量と投与後の経過時間によって遅発影響の出現に向かって展開される生殖内分泌学的変化は異なっていることから、視床下部/下垂体/性腺軸も用量と経過時間によって変化しているものと考えられる。そこで本研究では、視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌を上位から直接制御する視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的変化が遅発影響出現に果たす役割と閾値を明らかにすることを目的として、今年度は性周期回帰停止前の時期における嚢胞状卵胞の保有状況と視床下部/下垂体/性腺軸の機能との関係を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質の調製

投与に用いた EE (Sigma-Aldrich、純度 98%

以上) は、エタノール (和光純薬) に溶解して 100 mg/mL の濃度に調整し、これをストックソリューションとして 4°C で遮光保存した。投与検体はストックソリューションをコーン油 (和光純薬) で段階希釈し、1 回の投与液量が 10 mL/kg になるように濃度を調製した。調製検体は遮光室温保存して調製後 1 週間以内に使用した。

### 2. 使用動物および飼育条件

日本チャールスリバー株式会社 (横浜) より購入した Sprague-Dawley 系妊娠雌ラット (CrI:CD(SD)) から自然分娩により得た雌新生児を実験に用いた。妊娠 21 日から妊娠雌ラットの出産観察を行い、出産完了日を 0 日齢とした。1 日齢で新生児雌ラットの外表を観察し異常が認められない動物のみを選抜後、各母動物に 1 腹当たり 8 匹哺育となるよう振り分けた。雌動物が 8 匹に満たない場合は雄動物を加え計 8 匹とした。その後、雌ラットは四肢へ墨汁 (開明、埼玉) による入れ墨を行い個体の識別を行った。

これらの動物は麻布大学附置生物科学総合研究所の動物飼育施設内にて温度 16-25°C および相対湿度 45-65% に設定し、明期 12 時間 (8-20 時) 暗期 12 時間の照明条件下で、木製チップ (床敷ソフト、三協ラボサービス、東京) を敷いたケージ (クリーン 200-PC、日本クレア、東京) 内で、固形飼料 (CE-2、日本クレア、東京) および水道水を自由摂取させて飼育した。本研究における全ての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

新生児期投与動物は、出生翌日の 1 日齢に、各腹の雌出生児を各群に振り分け、墨汁 (開明墨汁、開明、さいたま市) を四肢皮下に少量注入して個体を識別した。その際、哺育状態による影響を均等化するために、各腹に全ての投与群の出生児を配し、雄出生児を加えて同腹生児数を 8 匹あるいは 10 匹に揃えた。子宮肥大試験に用いた動物は、



離乳後に群分けを行った。

新生児への投与は、Watanabe らの報告を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用い、投与日に測定した体重を基に 10 mL/kg を経口投与した。対照群には媒体としたコーン油（和光純薬）を同様に投与した。子宮肥大試験では、金属ゾンデを装着した注射筒を用いて強制経口投与を行った。投与容量は 10 mL/kg とし、対照群には媒体としたコーン油（和光純薬）を投与した。

### 3. 投与方法及び投与量

1 日齢から 5 日間、Watanabe らの報告を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用い、EE を反復経口投与した。

EE の用量は、先行研究に基づき設定した。すなわち、実験 1 では春機発動後に性周期を回帰した後、連続発情となる 0.4 µg/kg/日および性周期の回帰停止は認められないが、嚢胞状卵胞が増加する 0.08 µg/kg/日を設定した。実験 2 では、初回排卵に影響が認められる 2 µg/kg/日および 0.4 µg/kg/日を設定した。いずれの実験も対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

### 4. 観察方法

#### (1) 実験 1

投与前後に一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 12-13 週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

##### (ア) 体重

投与日および、7、10 日齢ならびに 14 日齢からは 1 週間毎に個別体重を測定し、剖検日にも体重を測定した。

##### (イ) 開眼の観察

12 日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた日を開眼日として体重を測定した。

##### (ウ) 膣開口の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

##### (エ) 性周期の観察

8 週齢から 2 週間および 12 週齢から剖検まで、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期は、8 週齢からの観察期間中に 4-5 日で発情を回帰したものを正常周期に、それ以外を「その他」に分類した。なお、連続した発情休止期が全く観察されない連続発情、および発情休止期が 14 日以上継続する無発情は認められなかった。また、8 週齢からの観察期間中に認められた発情期と発情前期の日数の合計を集計した。

##### (オ) 剖検

12 週齢からの性周期観察において、原則として発情期と判断された動物を剖検に供した。

動物は、ペントバルビタールナトリウム溶液（ソムノペンチル、共立製薬、東京）深麻酔下で卵巣および卵管を摘出した後に、4 %パラホルムアルデヒド（4 %PFA）による灌流固定を行い、脳は *in situ* hybridization による *Kiss1* 遺伝子およびエストロゲン $\alpha$ 受容体 (*ER $\alpha$* ) 遺伝子の発現解析に供した。子宮、下垂体および卵巣は重量を測定し、右側の卵巣は遺伝子定量解析およびタンパク質解析のために液体窒素を用いた急速冷凍を行い、-80°C で保存した。左側の卵巣は組織学的観察に供するために Bouin 液で固定した。

##### (カ) 卵巣の組織観察

Bouin 固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 µm の厚さで薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定は Acuña [Acuña,2009] に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莖膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

##### (キ) Total RNA の抽出

凍結卵巣は細胞破碎装置用チューブ（トミー精工、東京）に、TRIzol 試薬（Life

Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) および細胞破碎装置用ビーズ (ステンレスφ3.2、トミー精工、東京) とともに入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R (トミー精工、東京) を用いてホモジナイズした。破碎後、ホモジネートから total RNA を抽出精製し、100 µg/mL の total RNA 溶液となるように depc 処理水 (DEPC treated Water、遺伝子工学研究用、ニッポンジーン、東京) に溶解し、-80 °C で保存した。

#### (ク) Real-time RT-PCR

逆転写に先立ち、total RNA 溶液を deoxyribonuclease I (Amplification Grade、Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) で処理しゲノム DNA を除去した。逆転写のプライマーにはランダムプライマーを用い、Taqman® Reverse Transcription Reagents (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用い、TaqMan プローブ法による real-time PCR を行った。

定量解析の対象には、卵胞発育関連因子をコードする遺伝子、ならびにステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子を選択した。卵胞発育関連因子をコードする遺伝子としては、莢膜細胞に発現する LH 受容体 (LHR)、発育卵胞の卵母細胞に発現する GDF-9、顆粒層細胞に発現する FSH 受容体 (FSHR)、エストロゲン受容体β (ERβ)、インヒビンの各サブユニット (Inhibin α、βA、βB) を選択した。またステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子としては、莢膜細胞でのミトコンドリアへのコレステロールの運送に関わる steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、ミトコンドリアでコレステロールからプレグネノロンの生成を行う側鎖切断酵素 cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)、さらに細胞質でプレグネノロンからプロゲステロンを経てテストス

テロンを生成する間に作用する酵素である 3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) および P450c17、ならびに顆粒層細胞に発現しテストステロンを基質として E<sub>2</sub> を生成する aromatase をコードする各 mRNA を定量した。また内在性コントロールとして glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を定量し、GAPDH mRNA 発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

Real-time PCR に用いた各遺伝子のプライマーおよびプローブの塩基配列は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より得た配列情報を基にプライマー設計ソフトウェア (Primer Express、Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて設計されたものを使用した。GAPDH 遺伝子は Pre-Developed Taqman® Assay Reagents Control Kits (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて測定した。LHR については、選択的スプライシングによる機能的および非機能的な発現 (Tsai-Morris *et al.*, 1991; Aatsinki *et al.*, 1992; Sokka *et al.*, 1992) が報告されている。本研究では、リガンドへの感受性を持ち合わせた機能的な LHR mRNA 発現のみを対象としていることから、機能的 LHR mRNA に特異的な細胞膜貫通部位をコードする exon11 に特異的なプライマーおよびプローブを設計した (Dufau *et al.*, 1995)。用いたプライマーおよびプローブの塩基配列を表 1 に示す。

#### (ケ) LH 受容体タンパクの定量解析

凍結した卵巣に RIPA バッファー (0.1% SDS、1% Trion X-100/Tris-HCl pH 8.0) を加え、ビーズ式細胞破碎装置によりホモジナイズし、遠心分離してタンパク溶液を得た。各サンプルは DC Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA) によりタンパク質濃度を測定し、各サンプルとも 10 µg のタンパク質を Western Blotting に用いた。陽性コントロールとして精巣からタンパク質を抽出し、同様に用いた。

各サンプルは、ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL、アトー、東京) にアプライし、ミニスラブ電気泳動装置 (AE-6530P、アトー、東京) を用いて 20 mA で 80 分間電気泳動した後、セミドライ式ブロットイング装置 (WSE-4020、アトー、東京) を用いて 152 mA で 30 分間通電し、PVDF メンブレン (WSE-4051、アトー、東京) にブロットイングした。ブロットイング終了後、メンブレンを洗浄、ブロッキング (0.3 % スキムミルク / PBS-T) 後、洗浄して抗 LH 受容体抗体 (sc-25828、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA) および抗  $\beta$ -actin 抗体 (#4967、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) とインキュベートした。これを Dako EnVision System-HRP Labelled Polymer (Dako、Glostrup、Denmark) および蛍光基質 (Luminata Forte Western HRP Substrate、Millipore、Billerica、MA、USA) で可視化し、Image Quant LAS 4000 (GE ヘルスケア ジャパン、東京) により撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト Image J によりシグナル強度を測定した。これを同時に測定した  $\beta$ -actin のシグナル強度で補正し、相対発現量を算出した。

#### (コ) Double-label in situ hybridization (ISH)

還流固定した脳は、Brain Blocker を用い、AVPV と ARC が含まれる部位を切り出し、パラフィンブロックとした。これをラット脳アトラス (Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6<sup>th</sup> ed., Elsevier) を参照ながら、AVPV は Bregma 0.12 mm から -0.48 mm の領域を、ARC は Bregma -1.80 mm から -3.24 mm の領域を、20  $\mu$ m ごとに 10  $\mu$ m 厚で薄切して、各サンプル 3 枚の切片を *Kiss1* 及び *ER $\alpha$*  の *in situ* hybridization に供した。

*In situ* hybridization は、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) 用に設計されたプローブを用いて行った。その際、pretreatment による煮沸処理は 20 分間および protease 処理は 40  $^{\circ}$ C で 15 分間行い、ハイブリダイゼーションは 40  $^{\circ}$ C で 150 分間の条件で行った。*Kiss1* の *in situ* hybridization における陰性対照には、我々が維持している *kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織を用いた。

ISH 後のスライドは光学顕微鏡下で鏡検し、発現陽性細胞数を求めた。

#### (2) 実験 2

実験 1 と同様の日齢に体重を測定し、一般状態、開眼および膣開口の観察を行った。10 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で卵巣を摘出し、その後 1 週間にわたり膣垢像を観察して卵巣の残存がない事を確認した。卵巣は固定保存して形態観察に供した。14 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で右側頸静脈にカニューレを装着し、翌日、装着したカニューレから 6 分間隔で 100  $\mu$ L ずつ 2 時間にわたり血液を採取し血清を分離した。得られた血清は、測定まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

#### (サ) 黄体化ホルモン (LH) のラジオイムノアッセイ

血清中の LH 濃度測定は東京農工大学農学部渡辺 元博士 (研究協力者) の協力を得て、米国 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット LH の RIA キットを用いて二抗体法により測定した (第一抗体 anti-rat LH S-10、第二抗体抗ウサギ  $\gamma$  グロブリンヤギ血清 #42-99318)。標識抗原は rat LH-I-5 をクロラミン T 法により <sup>125</sup>I で標識して使用し、標準物質には rat LH-RP-1 を用いた。測定値は、研究協力者である名古屋大学農学部東村博子博士および上野山賀久博士の下でパルス解析を行い、パルス頻度、大きさ、ピークレベルおよび基底レベルを算出した。

#### 5. 統計解析

統計解析ソフト JMP9 (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。すなわち、性周期の型は  $\chi^2$  二乗検定を行った。また、二群間の解析は、F 検定を行い、分散の一様性を確認して Student の t-検定を実施した。その他は、まず、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnnett の多重比較検定を用いて、対照群と各投与群との間で有意差検定を行った。有意水準は 5% とした。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究結果

### 1. 発育および身体的発達

実験1および2ともに投与期間中も含めてEE投与群と対照群との間に有意差は認められず、開眼あるいは膺開口の日齢にも投与の影響は認められなかった(データは示さず)。

### 2. 性周期の回帰状況(実験1)

図1に示すように、実験1では8-9週齢で連続発情を示す動物はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、不規則な性周期を回帰する例がEEの用量に依存して増加し、0.4 µg/kg体重/日群では4-5日で発情を回帰する正常な性周期を示す例はなかった。

### 3. 剖検所見および器官重量(実験1)

表2に示すように、0.08 µg/kg体重/日群では対照群との間に有意差を認める器官はなかったが、0.4 µg/kg体重/日群では卵巣および子宮重量が有意な低値を示し、下垂体重量が有意な高値を示した。

### 4. 卵巣の組織学的所見

囊胞状卵胞を有する卵巣の代表的組織像を図2に、また、その保有率を図3に示す。図3Aに示すように、13週齢に卵巣を採取した実験1では、対照群の卵巣に囊胞状卵胞は認められなかったが、EE投与群では用量に依存して保有率が増加し、0.4 µg/kg体重/日群では75%の動物に囊胞状卵胞が観察された。一方、10週齢に卵巣を採取した実験2では、囊胞状卵胞は対照群あるいは0.4 µg/kg体重/日群では4例あるいは3例中1例に確認されたのに対し、2 µg/kg体重/日群では5例全例に観察された(図3B)。

### 5. 卵巣における遺伝子発現およびLHR発現

図4に示すように、0.4 µg/kg体重/日群では発育卵胞の卵母細胞に発現する GDF-9

(図4A)も、顆粒層細胞に発現する FSH 受容体(図4B)およびインヒビリン(図4D-F)、ならびに発育卵胞の莢膜およびグラーフ卵胞の顆粒層細胞に発現する LHR (図4G)のいずれも対照群と比べて発現が増加し、LHRについてはタンパク質レベルでも増加の傾向が認められた(図5)。0.08 µg/kg体重/日群では、これらの遺伝子の発現に有意差は認められなかったが、LHR 遺伝子については増加傾向が認められた。

ステロイドホルモン合成にかかわる因子としては、0.08 µg/kg体重/日群ではコレステロールの動員からプロゲステロン合成の間に働く 3β-HSD および StAR の発現が有意に増加し、0.4 µg/kg体重/日群ではプロゲステロン合成からエストロゲン合成にかかわる 3β-HSD、P450c17 および aromatase の発現が有意に増加した(図6A-5E)。

### 6. 視床下部における *kiss1* および ERα 発現

図7には ARC における *kiss1* mRNA および ERα mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示し、図8には AVPV における *kiss1* mRNA および ERα mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示す。

対照群および EE 投与群において、赤色顆粒で可視化される ERα と青色顆粒で可視化される *kiss1* の発現細胞数を数えたところ、ARC では *Kiss1* 発現細胞数が増加し(図7A)、AVPV では *Kiss1* 単独あるいは *Kiss1/ERα* 共発現細胞数が共に減少していた(図8A)。

陰性対照とした *kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織では、AVPV および ARC のいずれの部位においても、ERα のシグナルである赤色顆粒は認められたが、*kiss1* のシグナルである青色顆粒は認められなかった(図7B および 8B)。子宮では子宮腺に ERα のシグナルである赤色顆粒が局在していた(図8C)。

### 7. EE曝露動物におけるパルス状LH分泌

図9にはパルス状 LH 分泌各パラメーター血清中 LH 濃度の個別変動を示し、表3にはパルス解析結果を示す。

各パラメーターのうち、0.4 µg/kg体重/日群の Amplitude が対照群と比べて有意な