

. 總括研究報告

課題番号 H25 - 化学 - 一般 - 003
厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
総括研究報告書

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ベ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

研究代表者	吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所病理部 室長
研究分担者	高橋 美和	国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
	代田 真理子	麻布大学獣医学部 准教授
	渡辺 元	東京農工大学農学部 教授
	横須賀 誠	日本獣医生命科学大学獣医学部 准教授
	川口 真以子	明治大学農学部農学科環境学研究室 講師
研究協力者	井上 薫	国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
	市村 亮平	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	森川 朋美	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	束村 博子	名古屋大学農学部
	上野山 賀久	名古屋大学農学部
	代田 欣二	麻布大学獣医学部・生物科学総合研究所
	田中 恵	麻布大学獣医学部
	鈴木 美帆	麻布大学獣医学部
	長谷川 雄太	麻布大学獣医学部
	高川 奈緒	麻布大学獣医学部
	高山 尚大	麻布大学獣医学部
	林 美貴成	麻布大学獣医学部
	永岡 謙太郎	東京農工大学農学部 助教授
	臼田 賢人	東京農工大学農学部
	張 浩林	東京農工大学農学部
	溝口 康	明治大学農学部農学科動物遺伝資源学研究室
	中村 孝博	明治大学農学部生命科学科
	小峰 千亜希	明治大学農学部農学科動物環境学研究室
	志賀 健臣	明治大学農学部農学科動物遺伝資源学研究室

研究要旨

1. 遅発影響発現と部位特異的キスベプチンニューロンの変化について

1) 性周期中枢(視床下部前方)への影響

新生児期に遅発影響量エチニルエストラジオール（EE）曝露雌ラットでは、遅発影響の長期指標である性周期異常に先行して**視床下部前方に存在する性周期制御中枢 AVPV の kiss1 mRNA 発現低下とキスペプチンニューロン数の低下と続く LH サージの低下**が認められ、また AVPV キスペプチンニューロンのエストロゲン(ER) 受容体数も減少した。この AVPV における kiss1 遺伝子発現低下は、性成熟前において感受性が高く、成長とともに軽減し、性成熟後は LH サージ期以外では差は検出されなかった。これらの AVPV の kiss1 mRNA 発現低下や LH サージ低下は雌加齢性変化に類似していた。

2) 卵胞発育中枢(視床下部後方)への影響

発達期から young adult 雌ラットにおいて卵胞発育中枢 ARC の kiss1 mRNA 発現およびキスペプチンニューロン数に変化は認められなかった。しかし卵巣摘出下でパルス状 LH 分泌の amplitude が増加したことから ARC における kindy ニューロンへの影響が示唆された。

3) その他の中枢性影響に関連した変化

- 遅発影響発現量 EE 新生児期単回曝露マウスは、GABA 受容体には変化が認められなかったものの視床前野カルベジン（CB）の変化が認められたことから、CB 等の産生量変化を介して Kisspeptin 動態に影響する可能性が示唆された。
- 遅発影響発現量 EE 新生児期曝露ラットの受動回避学習行動試験において学習成績が低下し、大脳皮質と海馬における ER 発現量が低下したことから、遅発影響は行動へも影響を及ぼす可能性が示唆された。
- 遅発影響は ER を介した変化が主だが、ER も関連する可能性が示唆された。

2. 遅発影響と閾値の関連性

- 曝露量の閾値について、遅発影響発現量 EE 新生児期 5 日間経口曝露ラットにおいて、最高用量の 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で不安定な性周期を示したことから、閾値はこの近傍に存在するものと推測された。
- EE 曝露時期による閾値について視床下部 AVPV と ARC のキスペプチンの変化と、性周期観察を指標に検索したところ、遅発影響は性周期を指標に生後 10 日まで持続し、生後 14 日曝露では観察されないと考えられた。

3. 中枢以外の遅発影響標的部位

- 遅発影響発現量 EE 新生児期曝露ラットを用いた詳細な検討により、性周期異常に先行して性成熟前の幼若期から卵巣の初回排卵数低下や嚢胞状卵胞増加等の形態学的変化、LH 受容体や卵胞アポトーシス関連遺伝子の変化等も認められた。

結論 1：遅発影響は視床下部前方性周期制御中枢キスペプチンニューロン低下が主因。

結論 2：遅発影響は曝露量および曝露時期とともに閾値が存在する。

最終年である平成 27 年度は、これまでの研究成果で得られた確立した遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の懸念化学物質のリスク評価手法について提言する予定である。

・研究目的

生理活性物質が成育の適切な時期に限定して作用する臨界期は、化学物質に対しても著しく感受性が高い。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**であり(Shirota et al., 2012; Takahashi et al., 2013; Yoshida et al., 2011)、早急な機序解明およびリスク評価系の早急な確立が望まれる。

本研究に先立ち平成 22 年から 24 年に実施した「**化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と指標の確立**」(厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 H22 - 化学 - 一般 - 003)では、新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の主要経路はエストロゲン受容体(ER) であるが一般的な毒性指標では捉えにくく、用量依存的に観察される**性周期異常(持続発情)の早期化が最も鋭敏な指標**であること、Young adult 期より視床下部の生殖機能関連神経核や性分化関連神経核、卵巣への影響を示唆する所見が得られたことから、**遅発影響の機序として神経内分泌機能の複数経路の初期からの変調**が有力であることが成果として得られた。

一方繁殖生物学分野の最近のトピックとして、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が挙げられる。本研究の分担研究者である高橋らの研究において、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の可能性が示唆されたが、遅発影響に関連す

る部位特定や遅発影響の明確な発現機序まで解明することはできなかった。

そこで本研究は、**化学物質の臨界期曝露による遅発影響発現の核となる機序に迫り、化学物質評価に資する指標を提言**することを目的とする。特に近年**生殖制御中枢神経核として注目されている部位特異的な視床下部キスペプチンニューロンと遅発影響の関連を明らかにする。**

計画・体制の特徴は、遅発影響発現量(投与物質・量・時期)を共通計画とし班を構成する生殖内分泌学、繁殖毒性学、毒性病理学、神経解剖・行動学の専門家が成果を積極的に公開し潤滑な共同研究体制を進める点で、申請者らの多くが国内外の化学物質リスク評価にも携わり基礎と応用のバランスのよい研究体制である。

平成 26 年度は 25 年に引き続き、

- 遅発影響と視床下部キスペプチンニューロンの部位特異性
- 遅発影響と閾値の関連性

を明らかにすることを目的に研究に取り組んだ。

B . 研究方法

横断的解析を促進するため、実験にあたり、分担研究者間で以下の項目を予め設定した：

- **共通被験物質の設定**
共通の遅発影響誘発物質として 17-ethynylestradiol (EE)を選択した。先行研究においても EE は共通被験物質であることから先行研究との比較を容易にすることも考慮した。
- **共通する遅発影響誘発量の設定**

分担研究間での横断的解析を促進するため、遅発影響発現量であることが確認できた **EE20 μ g/kg 皮下投与**を可能な限り各実験に組み入れた。先行研究で強制経口投与も遅発影響を発現させ、皮下投与との用量相関性が明らかになったことから強制経口投与も選択可能とした。

● 使用動物種

基本使用動物種はラットとしたが、神経核の解析では一部マウスを用いた。系統差を観察するためにあえて共通の系統を使用せず、各実験の目的に適した系統(性周期が規則的な Wistar-Imamichi 系、生殖試験に汎用される SD 系、一般毒性試に汎用される Wistar Hannover 系、性周期が規則的且つ子宮癌好発系の Donryu 系)を用いた。

平成 26 年度の実験計画を以下に示す[() は主な担当者]

1. 遅発影響とキスベプチンニューロンの部位特異的变化

1) 遅発影響と視床下部の部位特異的キスベプチンの変化(卵巣摘出ラット)(高橋・吉田)

生後 0 日齢の雌性 Donryu ラットに sesame oil (対照群), EE (0.02, 0.2, 20 μ g/kg, 0.2, 20 μ g は遅発影響発現量)を単回皮下投与し、投与群を含め正常性周期を示す 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、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 RT-PCR 法および in-situ-hybridization 法 (ISH)にて経時的に解析した。また AVPV におけるエストロゲン受容体 (ER)と

c-fos の共発現について形態学的に解析した。また閉経期を外挿し性周期停止前後の無処置の 20 週齢ラットを middle age 群として、エストロゲン受容体 agonist PPT (1000 μ g/kg), エストロゲン受容体 agonist DPN (1000 μ g/kg)を新生児期単回曝露した雌ラットと比較した。

2) 視床下部性周期(LH サージ)制御部位のキスベプチンの変化と遅発影響(卵巣非摘出ラット)(渡辺)

出生後 24 時間以内の雌ラットに、EE 20 μ g/kg、200 μ g/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、膈スミ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、AVPV および ARC の Kiss 1 および生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

3) 発達期における視床下部のキスベプチンの変化と遅発影響(高橋)

生後 0 日齢(PND0)の Wistar-Hannover ラットに EE0、0.002、0.02 μ g/kg(いずれも遅発影響非発現量)、0.2、20 μ g/kg(いずれも遅発影響発現量)、2000 μ g/kg(オス化発現量)単回皮下投与し、発達期である生後 14 と 21 日齢における AVPV と ARC の kiss1 遺伝子発現を RT-PCR にて、生殖器系については形態的に検索した。同週齢の雄個体とも比較を行った。ER アゴニスト(PPT)および ER アゴニスト(DPN)の新生児期併合曝露による効果を性周期を指標として検索した。

4) 中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響 (横須賀)

生後 24 時間以内の雌雄マウス(C57BL/6J) に遅発影響発現量 20 μ g/kg および大量 2,000 μ g/kg の EE、対照群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与した。性成熟に達するまで、雌雄の体重の変化、雌については膣開口時期も観察した。生後 75-90 日齢にて内側視束前野(POA)を含む脳切片標本(厚さ 40 μ m の連続した冠状断切片) に Anti-Calbindin D-28k(CB)、GABA-B 受容体への特異的の一次抗体を用いた免疫組織化学染色を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価し、成熟マウスと比較した。

2. 遅発影響とその他の指標に関する検索

1) 卵胞発育と遅発影響との関連性(代田・渡辺)

(1) PDN1-5 の SD ラットに EE0, 0.4 or 2 μ g /kg/day を 5 日間経口投与(0.4 μ g x5、2 μ g x5)し、初回排卵数、性周期、幼若期および成熟期の嚢胞状卵胞数を検索し、成熟期は卵巢 LH 受容体発現およびパルス状 LH 分泌を測定した。

(2) 雌 Wistar-Imamichi ラット(生後 1 日) の EE 単回皮下投与し、卵巢の発達抑制に与えるアポトーシスあるいは増殖関連遺伝子の変化について検討した。

2) 遅発影響と各種神経行動学との関連性(川口)

生後 24 時間以内に高濃度(2,000 および 20,000 μ g/kg) および 20 μ g/kg の EE を投与した 6 週齢および 5 ヶ月齢(10 週齢にて卵巢摘出)の Wistar-Imamichi 雌ラットを用いて、不安行動・学習/社会性行動・摂

食行動に関する各種神経行動試験、性行動・性選好性に関する各種神経行動学的解析を行った。これらの動物について海馬におけるエストロゲン受容体(ER) 発現について検討した。

3. 遅発影響の閾値に関する実験として

1) 新生児期 EE5 日間経口曝露雌ラットにおける遅発影響出現の閾値およびエストロゲン活性(代田)

先行研究の結果を受けて EE を 0.0032~0.08 μ g/kg 体重/日の用量で 1 日齢から 5 日間雌ラットに経口投与して新生児期投与による遅発影響出現における EE の閾値を推定した。また、EE を幼若雌ラットに 3 日間経口投与した子宮肥大試験を実施した。

2) 遅発影響の発現時期の閾値に関する検討(吉田)

ラット(予備検討では Donryu、本試験では Wistar-Hannover を使用)に遅発影響発現量である 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て性周期を観察し、今までの投与時期の生後 0 日比較した。予備検討には Donryu ラットを、40 週齢まで比較した本試験では Wistar- Hannover ラットを用いた。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)厚生労働省の所管する実

施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)、特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成 10 年法律第 114 号)等の主旨に則り、作成された国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定および分担研究者が各々所属する機関に設定された動物委員会の規定等に基づき実施されたものであり、関連法令などを遵守して行われた。

C. 研究結果

1. キスベプチン部位特異的検索

1) 遅発影響と視床下部の部位特異的キスベプチンの変化(卵巣摘出ラット)(高橋・吉田)

遅発影響量の EE 新生児期単回曝露ラットにおいて、性周期が正常に回帰している状態でも性周期異常に先駆けて、遅発影響発現量で性周期を制御する LH サージの低下が認められた。また EE20 µg 群では LH サージ前では視床下部前方の AVPV における KiSS1 mRNA 発現の有意な低下が認められた。ARC では KiSS1 mRNA 発現の変化は認められなかった。ISH 法により LH サージ時の AVPV を検索した結果、KiSS1 mRNA 発現細胞の有意な低下が認められた。KiSS1 ISH と ER 抗体による二重染色の結果、キスベプチンニューロ

ンにおける ER 共発現率の低下が認められた。これらの結果は性周期を回帰する Middle age 群の結果と類似していた。

2) 視床下部性周期(LH サージ)制御部位のキスベプチンの変化と遅発影響(卵巣非摘出ラット)(渡辺)

遅発影響発現量の EE (20 µg/kg、200 µg/kg) の単回皮下投与ラットでは、発情前期午後 5 時(PE17)にみられた LH サージレベルが EE の投与量に応じて減少していた。また PE17 において、AVPV では ER α 、ER β 、Kiss1、SDN-POA では ER α 、ER β の mRNA 発現量の低下が確認された。

3) 発達期における視床下部のキスベプチンの変化と遅発影響(高橋)

新生児期 EE 曝露ラットの性成熟前における Kiss1 遺伝子の発現について解析を行った結果、視床下部 AVPV における Kiss1 遺伝子は遅発性影響を起こす用量よりもさらに低い用量から発現低下を示すことが明らかとなった。ER α アゴニスト(PPT)および ER β アゴニスト(DPN)の新生児期併合曝露では、PPT 単独群と同程度の性周期異常を示し、併合投与による効果は認められなかった。

4) 中枢神経における関連神経核・生殖行動への影響(横須賀)

遅発影響量 EE の新生児マウス単回曝露により、内側視束前野(MPOA)の GABA 受容体 mRNA 発現量に影響はないものの、カルピンジン(CB)免疫陽性細胞分布パターンの変化および CB mRNA 発現量の変化が認められた。

2. 遅発影響とその他の指標に関する検

索

1) 卵胞発育と遅発影響との関連性(代田・渡辺)

(1) 新生児期 EE 反復経口 $2\mu\text{g}$ $\times 5$ 投与群で、幼若期の卵胞発育抑制及び春機発動遅延、性周期早期回帰停止とともに、パルス状 LH 分泌の軽度な抑制が認められたが、性成熟後に性周期を回帰停止させる $0.4\mu\text{g}$ $\times 5$ 投与群では/kg/day でパルス状 LH 分泌への影響はみられなかった。新生児期に EE を 0.08 あるいは $0.4\mu\text{g}$ $\times 5$ 投与ラットの卵巣では成熟後の嚢胞状卵胞が増加し、LH 受容体遺伝子の発現が増加した。

(2) 遅発影響発現量 EE 新生児期単回皮下投与ラットでは、卵巣でアポトーシスを促進する因子である HrK が低下し、培養したラット卵巣への EE 曝露することにより、アポトーシス促進因子 HrK と Puma が低下した。

2) 遅発影響と各種神経行動学との関連性(川口)

遅発影響量 EE 新生時期曝露雌ラットを成熟後に神経行動学的変化について検討した結果、性行動では用量依存的に高濃度で強く抑制される一方、受動回避学習行動試験においては低濃度で学習成績が低下することを明らかとした。また、大脳皮質と海馬におけるエストロゲン受容体発現量が EE 曝露により低下する結果が得られた。

3. 遅発影響の閾値

1) 新生児期 $0.08\mu\text{g}$ $\times 5$ 回 EE 反復経口投与は、対照群より若齢で性周期の回帰を停止させることはなかったが、嚢胞状卵胞の形成が有意に増加した。

- 2) 子宮肥大試験において幼若雌ラットに $0.08\mu\text{g}$ の EE を 3 日間反復経口投与しても子宮重量を増加させなかった。
- 3) 26-27 週齢まで性周期を観察した結果、新生児期 $0.016\mu\text{g}$ $\times 5$ 回 EE 以下の用量では若齢での性周期回帰停止および嚢胞状卵胞の形成増加は認められなかった。
- 4) PND0、5 および 10 で EE $20\mu\text{g}$ 単回曝露ラットにおける異常性周期早期週齢は、それぞれ 17、19 および 20 週齢であった。PND14 曝露群では 31 ~ 36 週齢で異常性周期を示す個体が増加傾向を示したものの有意差は認められず、40 週齢では対照群と同様の値を示した。

D. 考察

遅発影響によるキスペプチン部位特異的検索を目的とした新生児期に EE 曝露した成熟期ラットを用いた実験、発達期のラットを用いた実験、マウスを用いた中枢神経における関連神経核の変化に関する実験結果より(図 1-7)、

正常性周期を示す成熟後の新生児期 EE 曝露ラットでは、視床下部前方に存在する性周期制御中枢 AVPV の kiss1 mRNA 発現低下と LH サージの低下が認められた。また同時に AVPV におけるキスペプチンニューロンのエストロゲン受容体数が減少していた。これらの結果は、遅発影響の長期指標である性周期異常に先行して AVPV におけるキスペプチンの低下が生じ、これが引き金となって性周期異常を早期化させると考えられた。この AVPV に

おける kiss1 遺伝子発現低下は、遅発影響を発現しない量から認められた。しかし成長とともに低下は軽減し、性成熟後は LH サージ期以外では差は認められなくなった。この結果は、kiss1 遺伝子発現は発達期で EE に対して高い感受性を示すと考えられ、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。遅発影響発現量で LH パルス分泌低下傾向が認められたことから更なる検討が必要であるが、LH サージ時において視床下部後方に存在する卵胞発育中枢 ARC の kiss1 mRNA 発現に変化は認められなかったことから、遅発影響の首座は AVPV に存在すると考えられた。

遅発影響量 EE の新生仔マウス単回曝露では、脳内 GABA 受容体 mRNA 発現量には影響しないが、内側視束前野 (MPOA) のカルビンジン (CB) の変化が認められたことから、遅発影響では CB 等の産生量変化を介して Kisspeptin 動態に影響する可能性が示唆された。

遅発影響の閾値に関する実験結果より(図 9-11)、

性周期を指標に検索した EE 曝露時期による遅発影響の影響については、生後 10 日齢まで明らかに持続すると考えられた。生後 14 日齢曝露で一時性周期異常が増加傾向を示したが、有意ではなかったことから、生後 14 日齢曝露では新生児期曝露と同様の遅発影響は誘発されないと考えられた。

遅発影響とその他の指標に関する検索結

果より(図 13-15)、

遅発影響発現量 EE 新生児期曝露ラットを用いた詳細な検討により、性周期異常に先行して性成熟前の幼若期から卵巣の初回排卵数低下や嚢胞状卵胞増加等の形態学的変化、LH 受容体や卵胞アポトーシス関連遺伝子の変化等も認められたことから、遅発影響発現量の EE は、卵巣の始原生殖細胞のアポトーシスを抑制し正常な卵胞形成が行えず、卵胞発育が抑制している可能性が示唆された。

遅発影響量 EE 新生児期曝露ラットの受動回避学習行動試験において学習成績が低下し、大脳皮質と海馬におけるエストロゲン受容体発現量が低下したことから、遅発影響は行動へも影響を及ぼす可能性が示唆された。

E . 結論

1. 遅発影響は、中枢のみならず生殖器系へも異常をもたらすが、もっとも鋭敏な指標である早期性周期異常は、視床下部前方性周期制御中枢キスペプチンニューロン低下が主因と考えられた(図 8 参照)。
2. 遅発影響の曝露時期の閾値は生後 14 日ごろと考えられた(図 12 参照)。最終年である平成 27 年度は、遅発影響が視床下部 AVPV を首座とすることの確認および ARC の関連性を精査する。また遅発影響が POA 等その他の中枢へも影響している可能性が示唆されたことから、最終年においては遅発影響の機序について視床下部・下垂体・性腺軸制御系だけでなく

関連神経核その関連性も含めた総合的解析を試みる。またこれまで確立した指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の懸念化学物質のリスク評価手法について提言する予定である。

F . 研究発表

F-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. 2014
- 2) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptch1 Heterozygous Mice. *Toxicol Pathol.* 2014. 42(8):1174-87
- 3) Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *J Vet Med Sci.* 2014, 76:1105-10.
- 4) Nozawa K, Nagaoka K, Zhang H, Usuda K, Okazaki S, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reprod Toxicol.* 2014, 46:77-84.
- 5) Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, Haworth R, Herbert R, Heuser A, Long G, Mirsky M, Regan K, Van Esch E, Westwood FR, Vidal J, Yoshida M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014; 27(3-4 Suppl):1S-107S.
- 6) Kamata S, Yamamoto J, Kamijo K, Ochiai T, Morita T, Yoshitomi Y, Hagiya Y, Kubota M, Ohkubo R, Kawaguchi M, Himi T, Kasahara T, and Ishii I: Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014;58(6):1309-21.
- 7) Ichimura R, Takahashia 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. *Reproductive Toxicol.* 2015. Online first

(投稿中)

- 1) Taketa Y, Inoue K, Takahashi T, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Midori Yoshida. Inhibitory Effects of Sulpiride but not Ethylene Glycol Monomethyl Ether on Endometrial Carcinogenicity in Donryu Rats. *Journal of Applied Toxicology.* Minor revised

- 2) Yoshida M, Suzuki S, Tahahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G. Predominant role of the hypothalamus, not the ovary in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. Reproductive Toxicology. Minor revised.

(投稿準備中)

- 1)
2) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Sugata E, Suzuki S, Ogawa Y, Kamiie J, Shirota K, Watanabe G, Nagaoka K, Taya K, Yoshida M. Dose-Dependent Acceleration in the Delayed Effects of Neonatal Oral Exposure to Low-Dose 17 α -Ethinylestradiol (EE) on Female Reproductive Functions in the Rat. Preparation for submitted.

F-2.学会発表

- 1) 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: EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1mRNA 発現に及ぼす影響. 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2014.1)
- 2) Yoshida M, Ichimura R, Inoue K, Watanabe G*, Takahashi M: Disruption in the hypothalamus neonatally exposed to p-tert octylphenol is essential for induction of early occurrence of persistent estrus, a feature of delayed effect in rats. 53rd Annual Meeting of

- the Society of Toxicology (2014.3)
- 3) 市村亮平 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)
- 4) 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シンポジウムリプロダクティブヘルスからみた遅発影響 - 遅発影響検出のための実践的指標の探索(2014.7)
- 5) 代田 眞理子、川嶋 潤、森 雅史、立河 紗紀、菅田 恵理世 第 41 回日本毒性学会学術年会 シンポジウムリプロダクティブヘルスからみた遅発影響 - 遅発影響検出のための実践的指標の探索 (2014 年 7 月 4 日、神戸市)
- 6) Shirota M, Kawashima J, Shirota K, Uenoyama Y, Nakamura S, Ikegami K, Maeda K, Tsukamura H. Gonadotropin-Independent Follicle Development in the Kiss1-/- Female Rats. 3rd World Congress on Reproductive Biology (2014/08/04)
- 7) 横須賀誠 新生仔マウスの内分泌攪乱物質投与がおよぼすカルシウム結合蛋白質含有細胞の性的 2 型への影響 第 157 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 P331 2014
- 8) 田中 恵、川嶋 潤、高川 奈帆、高山尚大、林 美貴成、森 雅史、立河 紗紀、代田 眞理子 エチニルエストラジオールの新生児期経口曝露による遅発影響. 第 28 回生殖発生毒性東

京セミナー（2015年3月）

- 9) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 臼田賢人, 渡辺 元、吉田 緑：
Ethinylestradiol の新生時期曝露による遅発影響の感受性期の検索．第31回日本毒性病理学会総会および学術集会（2015.1）
- 10) 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-ethinylestradiol in rats. (54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3))

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遅発影響の部位特異性に関する研究結果

Results(LHサージ)

性周期異常に先駆けて、性周期を制御するLHサージの低下が認められた

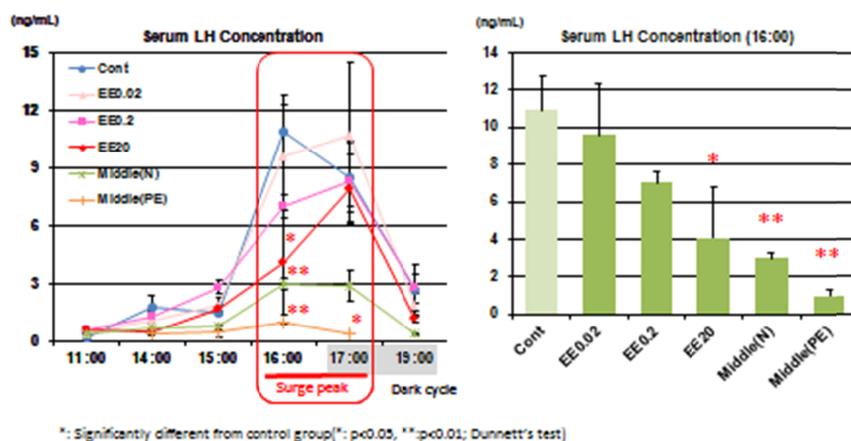


図 1 EE 新生時期曝露動物では、性周期異常に先駆けて 10 週齢で LH サージが低下した

Results(KiSS1 mRNA発現/AVPV)

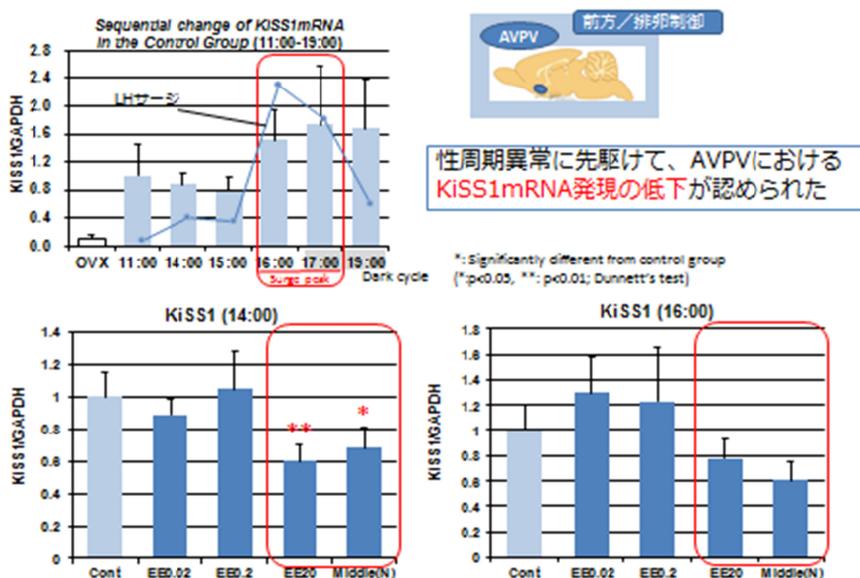


図 2 正常性周期回帰時期においても EE 新生時期曝露により視床下部 AVPV の KiSS1mRNA が低下した(10 週齢)

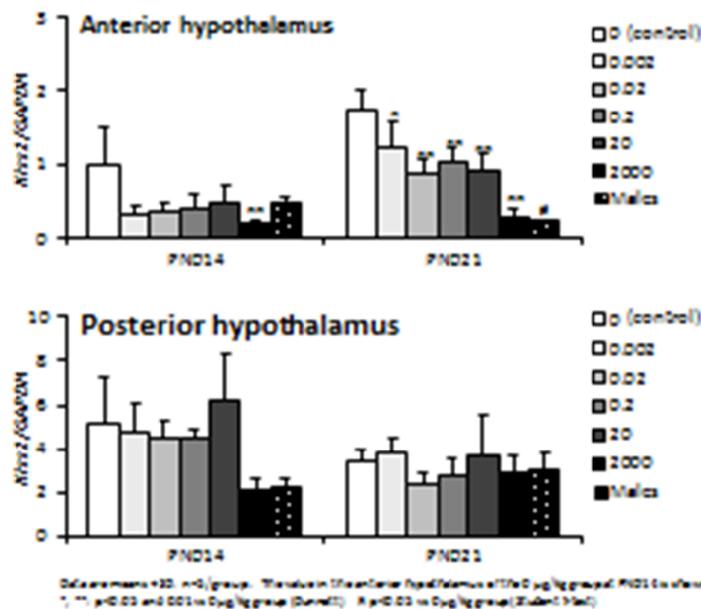


図3. 視床下部前部および後部におけるkiss1 mRNA発現

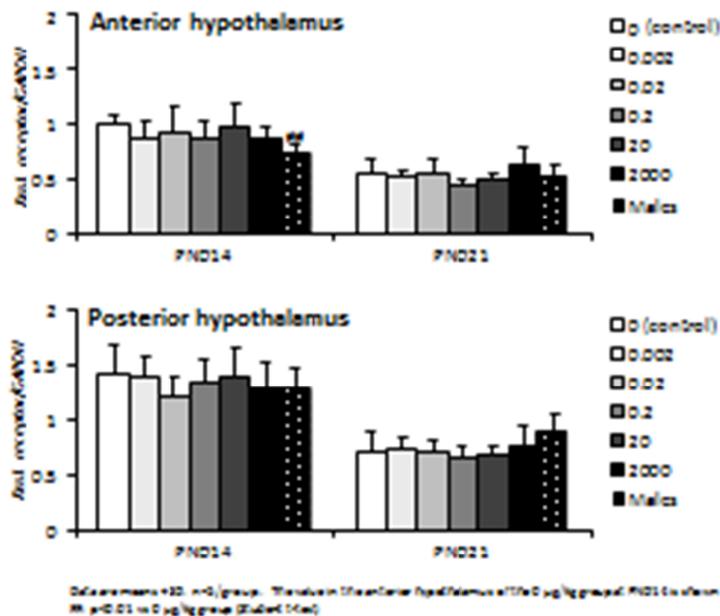
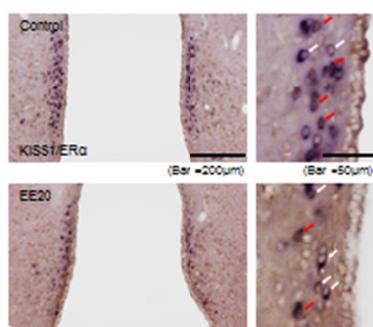


図4. 視床下部前部および後部におけるkiss1 receptor mRNA発現

図3,4 EE 新生時期曝露ラットでは性成熟前にすでに AVPV における Kiss1mRNA が低下していた。また遅発影響発現量より低い用量から低下していたが、低下の程度は発達とともに緩徐となった(14 日齢および 21 日齢)

Results(KISS1/ER α 二重染色)



→ KISS1/c-fos dual positive
→ KISS1 single positive

†: Significantly different from control group
 (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; Dunnett's test)

キスペプチンニューロンにおける
ER α 共発現率の低下が認められた

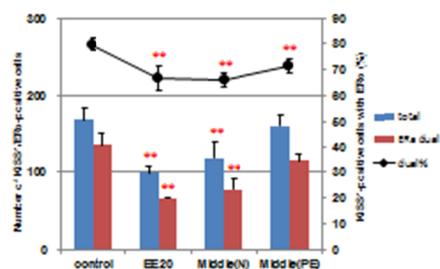
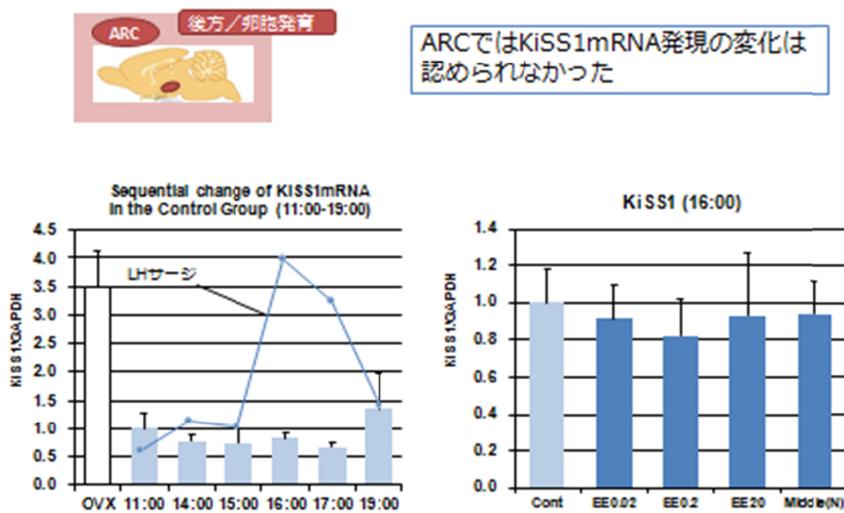


図5 EE新生児期曝露ラットでは、10週齢においてLHサージ低下と同様、性周期異常に先駆けて視床下部AVPVではキスペプチンニューロンが減少していただけでなく、ER陽性細胞共発現率も減少した。

Results(KiSS1 mRNA発現/ARC)



新生児期エストロゲン曝露によりARCのKiSS1遺伝子の変化は認められなかった。

図6

EE
($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

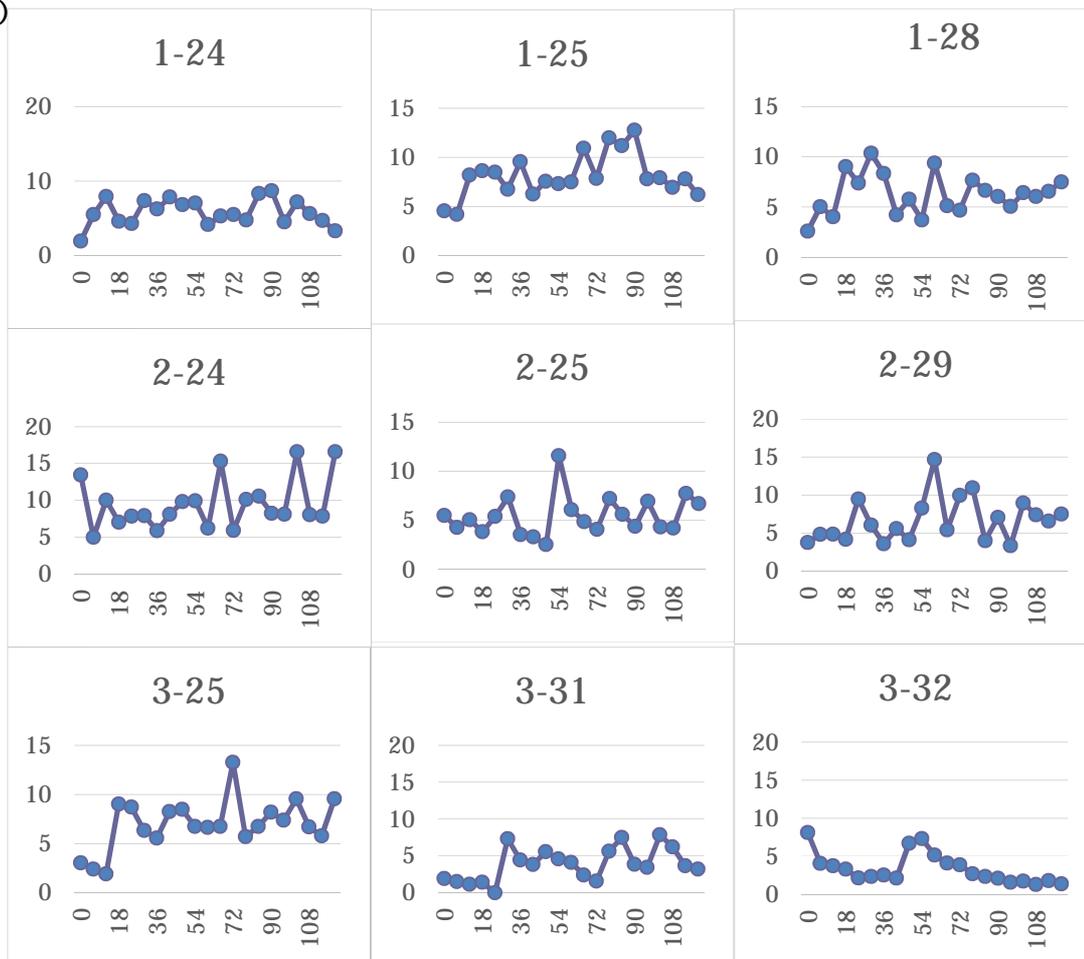


図7 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの14週齢におけるパルス状LH。投与群における増幅が認められた(ラット14週齢)

。

Discussion (想定される遅発影響の発現のメカニズム)

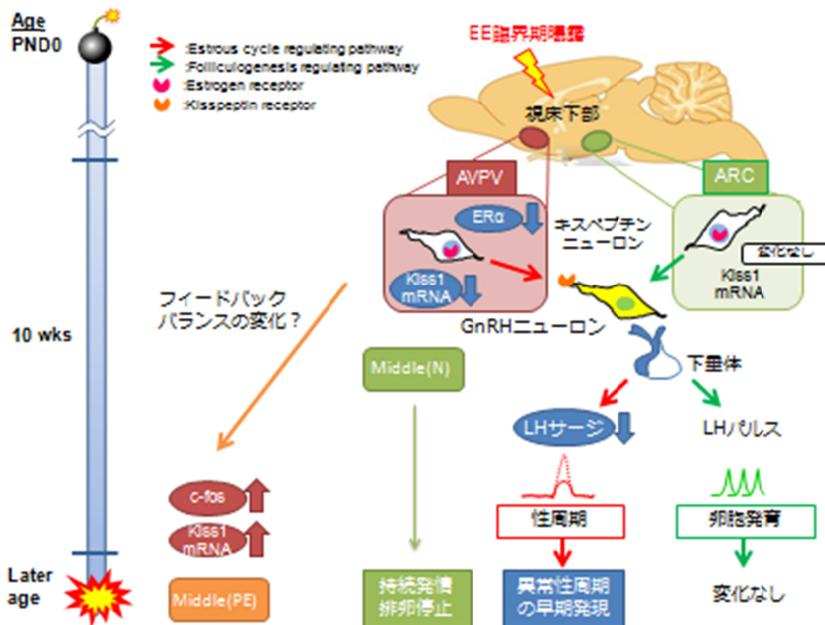


図 8 新

生児期エストロゲン曝露による遅発影響がメカニズム予想図

遅発影響の閾値に関する研究結果

Results (性周期)

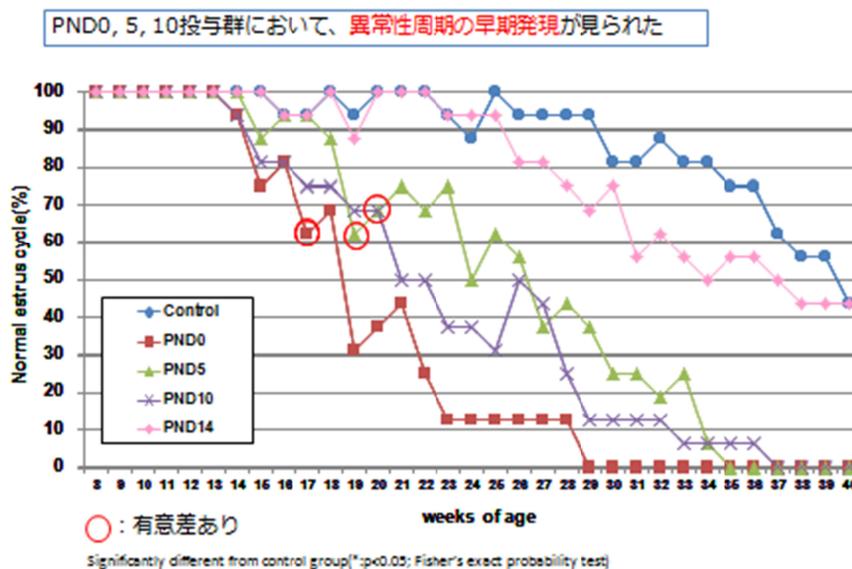


図9 同じ用量の新生児期曝であっても曝露時期によって性周期異常の発現時期が異なってきた。14日齢投与群では早期発現傾向はあったものの最終的に対照群と有意な差は認められなかった。

Results (LH/FSH濃度)

PND0, 5, 10投与群において、ピーク時(16:00)におけるLHサーージの低下が見られた

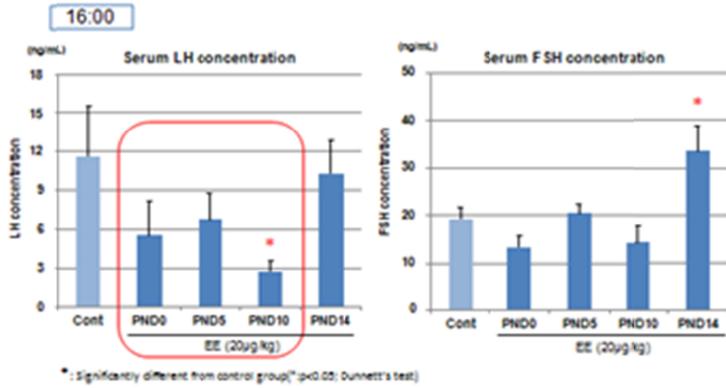


図10 投与時期が10日齢までLHサーージ低下は認められた。

Results (KiSS1 in situ hybridization/AVPV)

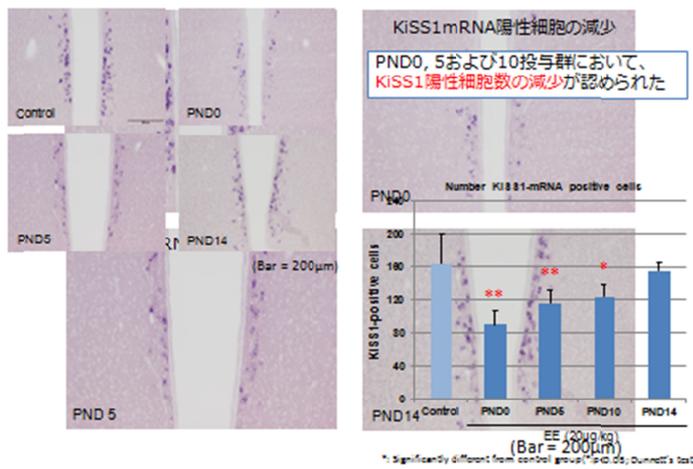


図11 投与時期10日齢まで視床下部PVPVのキスペチンニューロンは低下したが、投与時期とともに低下率は軽減した。

Discussion (遅発影響の感受期)

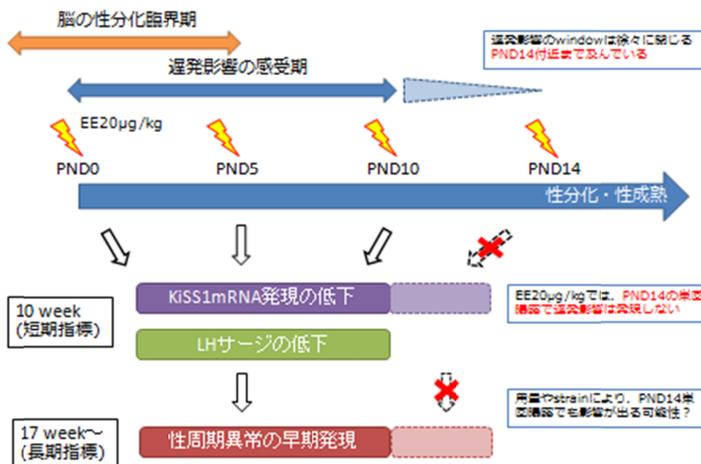


図12 EE曝露時期による感受性

遅発影響量で発現したその他の中枢性の変化

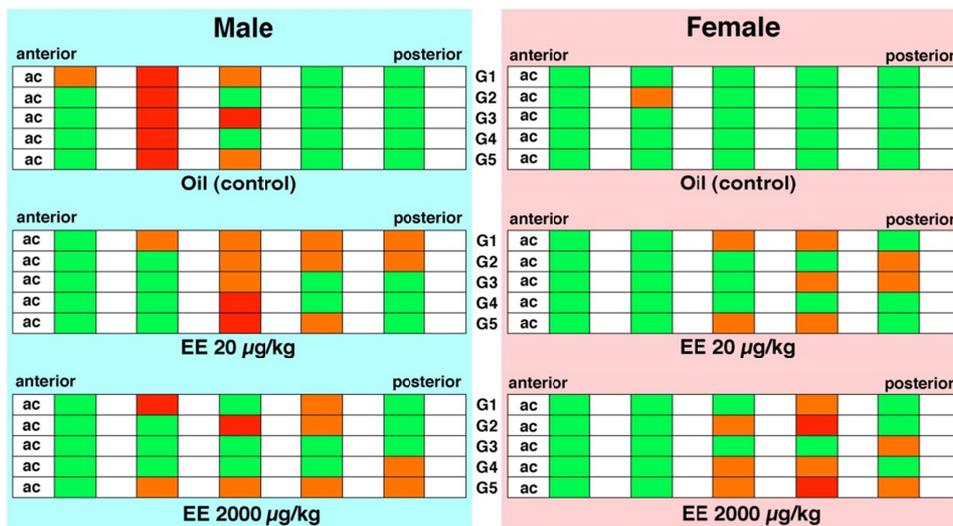


図 13 : 生後 24 時間 EE 単回投与がもたらす内側視察前野の calbindin 免疫陽性細胞塊ピークの後方シフトの解析結果

EE 投与により、雄では CB 陽性細胞の塊のピークが濃度依存性に弱まることがわかる。一方の雌では、不明確であった CB の塊が MPOA の後方に出現することがわかる。赤色は CB 陽性細胞の塊のピークを含む切片、橙色は CB 陽性細胞の塊を含む切片を示す。

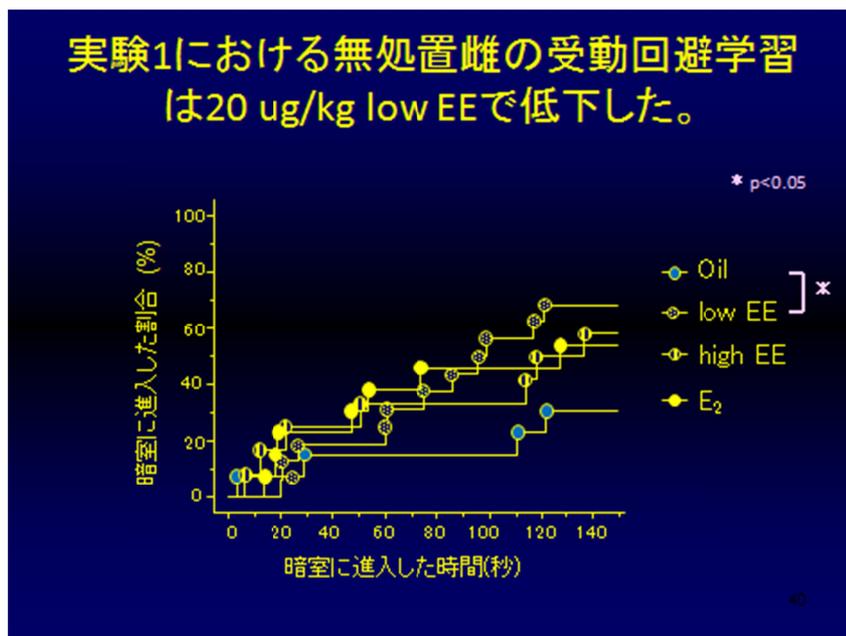


図14 新生児期EE20 µg/kg投与ラットの受動回避学習試験結果より、遅発影響量のEE新生児期曝露により学習が低下する可能性がある

卵巣への直接影響

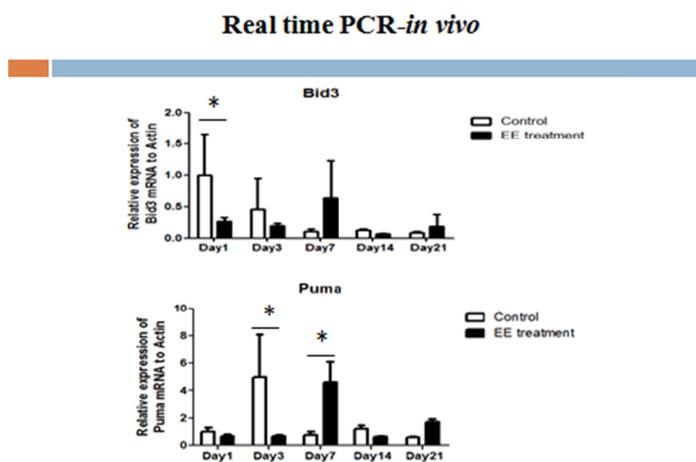


図15 生後直後から卵巣のアポトーシス関連遺伝子の抑制、TUNEL陽性細胞の増、多卵胞増加(右)がEE新生児期曝露ラットで認められた。