

.総括研究報告

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

研究代表者	高橋 美和	国立医薬品食品衛生研究所病理部主任研究員
研究分担者	井上 薫	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	市村 亮平	国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
	森川 朋美	国立医薬品食品衛生研究所病理部
	吉田 緑	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
	上家 潤一	麻布大学獣医学部
	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
	田中 啓陽	麻布大学獣医学部
	古澤 理沙	麻布大学獣医学部
	吉河 佑莉	麻布大学獣医学部
	白田 賢人	東京農工大学農学部
	張 浩林	東京農工大学農学部
	服部 達哉	明治大学 研究・知財戦略機構

研究要旨

1. EE およびエストロゲン受容体(ER)結合物質による遅発影響とキスペプチン部位特異性と の関連性の検討

H26年度における本研究で、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であること、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ことが明らかとなった。最終年度である H27 年度は、遅発影響と視床下部内キスペプチンニューロンの部位特異的な変化との関連性をさらに明らかにするため、曝露初期からの視床下部の各変化を検索した。また卵巣等の変化や EE 以外のエストロゲン受容体(ER)に結合する物質について遅発影響が起きうるのか検討した。

Selective estrogen receptor modulator (SERM)であるタモキシフェン(TMx)およびラロキシフェン(RLX)をラット新生児期単回曝露した結果、性周期異常の発現が早期化、Young adult 期の視床下部性周期中枢(前方)のキスペプチン発現低下等 EE と同様の結果が得られたことから SERM は EE 同様の機序でキスペプチンニューロンの低下を介して遅発影響が誘発することが明らかとなった。EE についてもキスペプチンニューロン低下を確認した [高橋・渡辺]。

ER α アンタゴニスト ICI 182,781 (ICI) 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のラット新生児単回皮下投与により性周期異常の発現早期化が観察されことから、ER α アンタゴニストの遅発影響誘発が明らかとなった。ICI、新生児期曝露により遅発影響誘発が知られている ER α アゴニスト PPT、ER β アゴニスト DPN を用いて新生児期曝露ラットの発達期における視床下部前部/後部における Kiss1 mRNA 発現を解析したが、EE 投与と同様のキスペプチン低下は認められず、ER 結合物質による相違が存在する可能性が示唆された。子宮肥大試験により高用量の DPN はエストロゲン作用を示した [井上]。

遅発影響量の EE を新生児期経口投与ラットでは投与後短期間より視床下部 Kiss1 遺伝子の明瞭な発現低下が認められた。新生児期ラット視床下部で Kiss1 は LH パルスを起動する視床下部弓状核(後方)の Kndy ニューロンにのみ発現していることから、EE 新生児期曝露はまず Kndy ニューロンの Kiss1 低下を介して GnRH 分泌制御を変化させ、その後の視床下部下垂体性腺軸の正常な発達を妨げた結果、遅発影響をもたらす可能性が示唆された [代田]。

キスペプチン以外にも初期より変化が認められた。新生児期 EE 曝露したラット卵巢では生後直後より卵巢のアポトーシスが抑制された。遅発影響量の新生児期 EE 曝露マウスにおいても内側視床前野(POA)の CalbindinD-28k(CB)陽性細胞の雌雄差パターン変化が授乳期や雌の発達にも影響を及ぼしていることが明らかとなった [渡辺・横須賀]。

遅発影響量の EE 生後 4 週間経口投与は成熟後の性行動を抑制した。In vivo でのエストロゲン作用はないものの難燃剤 triphenyl phosphate (TPhP)の高用量曝露でも同様の変化が認められた [川口]。

2. これまでの研究成果で得られた遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の発現機序を示した Adverse outcome pathway(AOP)を構築した。本研究成果を基に、既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)にどのような検査項目等を追加すれば遅発影響懸念化学物質を検出可能か改善点について提案した [高橋]。

A . 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。エストロゲン作用物質の臨界期曝による**遅発影響は成熟後に至って性周期異常の発現時期の早期化、生殖機能障害やさらに子宮癌のリスク増加等、成熟後に不可逆性の悪影響が顕在化し**

(Takahashi et al., 2013)、既存の毒性試験法で検出が難しいことから、新生児期曝露による遅発影響検出に対する対策が必要である。

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) α 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、卵巢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。

本研究の過去 2 年間の遅発影響発現機序研究では、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であること、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ことが明らかとなった。

最終年度である H27 年度は、遅発影響と視床下部内キスペプチンニューロンの部位特異的な変化との関連性をさらに明らかにするため、曝露初期からの視床下部の各変化を中心に検索した。また卵巢等の変化や EE 以外の ER に結合する物質について遅発影響が起きうるのか検討した。

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 α -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 EE 20 μ g/kg (短期では 200 μ g/kg も考慮) 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、皮下投与との同等の影響を及ぼす用量相関性が明らかになったことから、強制経口投与での実験を実施した。
- **EE 以外の遅発影響検討物質とその目的**
H27 年度は遅発影響の機序解析の応用性を確認するためエストロゲン受容体(ER)と結合する物質も検討した。
本年度検討した化合物と担当を以下に記載する。
 - ✓ ER α アンタゴニスト, ICI 182,780 [井上]
 - ✓ ER α アゴニスト, PPT [井上]
 - ✓ ER β アゴニスト, DPN [井上]
 - ✓ Selective estrogen receptor modulator (SERM), タモキシフェン(TMx) [高橋]
 - ✓ SERM, ラロキシフェン(RLX) [高橋]
 - ✓ 難燃剤, triphenyl phosphate (TPhP) [川口] (これらの物質の詳細について分担研究報告書を参照のこと)
- **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、性周期が規則的且つ子宮癌好発系の Donryu 系)を用いた。

平成 27 年度の実験計画を以下に示す([] 主な担当者)

1. EE および ER 結合物質を用いた遅発影響発現機序に関する検討

1) SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索 [高橋]

エストロゲン作用物質の新生児期曝露は、視床下部の生殖機能中枢変調を介して性周期早期異常や子宮がんリスク等雌性生殖器機能へ遅発性の悪影響を及ぼすことから、本年度は動物種・組織により異なるエストロゲン/抗エストロゲン作用を示す selective estrogen receptor modulator (SERM) TMX 10 mg/kg bw、RLX0.1, 1 あるいは 10 mg/kg bw を生後 24 時間以内(PND0)の Donryu 新生児雌ラットに単回皮下投与し、新生児期曝露による遅発影響誘発の有無とその機序を解析し、過去に実施した EE での新生児期曝露実験結果と比較した。投与量は新生児期曝露により影響がであると報告されている量を選択した。

2) 遅発影響の発現に関わる ER の役割を明確化するための検索 [井上]

1. 卵巣摘出雌 Donryu ラットを用いて、ER α アゴニストである PPT、ER β アゴニストである DPN の子宮肥大試験を実施した。
2. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに PPT、DPN および ER α アンタゴニストである ICI 182,780 (ICI) を 1 回皮下投与し、発達期の視床下部前部/後部における Kiss1 mRNA 発現解析、血清 FSH 濃度測定、雌性生殖器の組織学的検索を行った。
3. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに ICI 0、500、5,000 μ g/kg を 1 回皮下投与し、生後 23 週まで性周期の観察を行った。

3) 遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義の解明および EE 投与直後の視床下部における ER α および Kiss1 遺伝子に関する検索 [代田]

新生児期に遅発影響をもたらす最小用量の EE 反復経口投与を受けた動物の生殖能力および胎児の発生を検討した。また性周期回帰停止に先立ち、視床下部/下垂体/性腺軸の異常が示唆されたことから、遅発影響出現のメカニズムを知るために、EE 投与直後の視床下部における ER α を起点とする性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)制御に関わる遺伝子の発現解析を行った。

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

過去の研究では、雌ラットの出生後 24 時間以内に EE を投与すると生殖機能の早期停止と性成熟後の原始卵胞の減少が認められたことから、本年度はさらに新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子を探るためにマイクロアレイ解析を行った。

Wistar-Imamichi 雌ラット、EE 200 µg/kg (遅発影響量)、2000 µg/kg を出生後 24 時間以内に頸部皮下に投与した。200 µg/kg を投与したラットの卵巣を PND1、PND3、PND7、PND14、PND21 に採取した。2000 µg/kg を投与したラットの卵巣は PND8 に組織学的解析のために採取した。また EE 投与による短期的影響を解析するために、PND1 に卵巣を採取し、-80 で保存し、マイクロアレイ解析を行った(各群 n=5)。卵巣についてアポトーシス検出のための TUNEL 染色も実施した。さらに無処置の卵巣を PND0 に採取し、器官培養下で種々の EE 濃度に曝露した。

5) マウスを用いたエストロゲン様作用をもつ化学物質の発育期脳への作用が及ぼす遅発影響に関する研究 [横須賀]

出生 24 時間以内の新生仔マウスへの EE 投与モデルを用いて、エストロゲン様作用をもつ化学物質の発育期脳への作用が及ぼす遅発型リスクとその評価基準確立を目的に研究を行ってきたが、これまでの研究結果より成体の海馬歯状回における成体細胞新生の頻度に影響しないこと、内側視束前野 (POA) の Calbindin D-28k (以下 CB) 免疫陽性細胞の分布パターンがもつ雌雄差が不鮮明になることなどの新所見を得てきた。今年度は、投与する EE 濃度をこれまでの 20 µg/kg (中濃度) および 2,000 µg/kg (高濃度) の他に、さらに 0.2 µg/kg (低濃度) 投与群を加えて、低濃度曝露リスクの可能性についても検討した。そして、EE 曝露を受けたマウス個体の体重変化、膣開口、性周期パターンへの影響も合わせて測定して、出生 24 時間以内の EE 単回投与が及ぼす CB の雌雄差に変化を誘導する EE 作用が、発育期や成熟後の生理機能や体重変化とも連動しているのかについて合わせた評価を試みた。さらに、今年度は CB に加えてエストロゲン受容体遺伝子の発現量の評価を

RT-PCR によって試みた。

方法として、生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J) に 0.2 µg/kg (低濃度)、20 µg/kg (中濃度) および 2,000 µg/kg (高濃度) の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与して一般飼育環境下(室温 22 から 25 、湿度 40% から 60%) で飼育した。生涯に渡っての体重変化、膣開口、膣スミア観察による性周期の確認を行った。その後、(1) 免疫組織化学染色による CB 陽性細胞の解析を行うための経心臓法による灌流固定、(2) RT-PCR による CB とエストロゲン受容体の視床下部・視床における遺伝子発現量の比較を試みた。

6) 新生児期から発達期の EE および Triphenyl phosphate (TPhP) 連続曝露が雌ラットの発達と成長後の社会性行動発現への影響について [川口]

周生期にエストロゲン様作用をもつ化学物質 (EDs) のうち EE および Triphenyl phosphate (TPhP) を連続曝露し、雌ラットの発達と成長後の社会性行動発現への影響を明らかにすることを目的とした。

生後 24 時間以内の Wistar-Imamichi 系雌ラットに対して、TPhP (25 mg/kg (X-LTP 群) あるいは 250 mg/kg (X-HTP 群) として)、EE は 15 µg/kg (X-EE 群) あるいは EE を 28 日間連続で経口投与した。検査項目として、

- ✓ 体重等発育に関する指標
- ✓ 性嗜好性試験
- ✓ 雄ラットとの性行動試験
- ✓ 雌ラットとの性行動試験
- ✓ 成熟期臓器重量測定

また、0 週齢 Wistar-Imamichi 系雌ラットを用いて母子分離誘発啼鳴反応の性差についても検索した。

2. Adverse outcome pathway(AOP)の構築と遅発影響検出のための既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への改善点の提言 [高橋]

これまでの研究成果で得られた遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の発現機序を示した Adverse outcome pathway (AOP) を構築し、遅発影響懸念化学物質を検出するための既存の毒性試験テス

トガイドライン(TG)への改善点を提言した。既存 TG は国際基準である OECD の 1 世代繁殖毒性試験(TG514)、2 世代繁殖毒性試験(TG416)、拡張型 1 世代繁殖毒性試験(TG445)を用いて、検査項目、投与量、観察期間、動物数、判定方法等、どのような点を改善すべきか検討した。

(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. EE および ER 結合物質を用いた遅発影響発現機序に関する検討

1) SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索 [高橋]

RLX10 mg/kg bw 群 (RLX10)で 12 週齢より持続発情を主とする性周期異常が増加し、TMX 群では 7 週齢より解剖時まで全個体が持続発情のみを示し、解剖時に黄体は観察されなかった。新生児期曝露ラットにおける視床下部キスペプチン関連遺伝子の変化を 10 週齢時に RT-PCR および ISH により検索したところ、anteroventral periventricular nucleus (AVPV)を含む視床下部前方の Kiss1

遺伝子発現の低下が RLX10 および TMX で低下し、TMX では arcuate nucleus (ARC)を含む視床下部後部も明らかに低下した。また LH サージ時の LH 値が RLX10 および TMX10 で有意に低下、FSH は TMX 群のみで低下した。TMX におけるこれらの低下は顕著であった。

また RLX 群には子宮へのエストロゲン作用はなく TMX10 は非常に弱いエストロゲン作用を示した。RLX 全群、TMX とともに子宮に対して強い抗エストロゲン作用を示した。しかし RLX および TMX を卵巣摘出動物に投与しても視床下部の Kiss1 発現量は増加しなかった。

2) 遅発影響の発現に関わる ER の役割を明確化するための検索 [井上]

1. PPT は低用量から in vivo エストロゲン活性を示し、DPN も高用量では陽性結果となった。

2. PPT、DPN、ICI 新生児期曝露ラットでは、生後 14 および 21 日における Kiss1 mRNA の発現や FSH に影響せず、生殖器の発達に群間差はみられなかった。

3. ICI 5,000 µg/kg 群では生後 13 週以降、持続発情を示す個体が増え、19 週以降では正常性周期の割合が対照群に比べて有意に低くなった。

3) 遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義の解明および EE 投与直後の視床下部における ERα および Kiss1 遺伝子に関する検索 [代田]

遅発影響の最小影響量 (0.08 µg/kg/day) の EE は生殖能力評価では影響は認められなかった。また、投与直後の新生雌ラット視床下部では、性周期の早期回帰停止を招く EE 投与を行った動物にのみ Kiss1 遺伝子の明瞭な発現低下が認められた。GPR54 および ERα の遺伝子発現についてはいずれの処置においても影響は認められなかった。

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

マイクロアレイ解析の結果、遅発影響量の新生児 EE 曝露した卵巣では、アポトーシス促進因子のひとつである Hrk の mRNA が生後第 1 日で減少していた。また、免疫組織化学的染色により、Hrk タンパク質が生後

1日の卵巣の卵細胞に検出された。卵巣のTUNEL染色では生後1日の卵巣で、対照群がEE処置群より強い染色性を示した。さらに、卵巣の卵胞数を解析ではEE投与群では生後8日の原始卵胞数が減少していた。

卵巣をEEとともに培養した結果、Hrk遺伝子発現が減少し、Hrkをノックダウンした卵巣ではTUNELで染色された卵細胞が減少した。

5) マウスを用いたエストロゲン様作用をもつ化学物質の発育期脳への作用が及ぼす遅発影響に関する研究 [横須賀]

生後24時間以内マウスへのEE単回曝露は発育途上において次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。

1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早める。それは0.2 µg/kg群でも認められ濃度依存性に早期化した。

2) 雌では生後2週目から3週目の間に高濃度EE投与群では一時的な体重増加の遅延が観察された。しかし、この遅延は離乳日までには解消された。成熟期におけるEE投与の影響は認められなかった。

3) 雌では5週齢以降、EE単回曝露群における体重増加傾向が示された。

4) 雌では、対照群では認められない性周期の乱れが8週齢ですでに認められた。

5) エストロゲン受容体遺伝子発現量は現在解析中である。

6) 新生児期から発達期のEEおよびTriphenyl phosphate (TPhP) 連続曝露が雌ラットの発達成長後の社会性行動発現への影響について [川口]

EE新生児期曝露ラットでは周産期連続曝露によって卵巣の発達を抑制し、成熟後の性行動中の雌特異的な社会性行動を抑制していた。またTPhPについても、その曝露濃度依存的に成熟後の性行動をEEと同様に抑制する作用を持つことが示された。

2. Adverse outcome pathway(AOP)の構築と遅発影響検出のための既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への改善点の提言 [高橋]

新生児期EE曝露による遅発影響による基本の遺伝子変化 (MIE, Molecular Initiating

Event)の候補としてAVPVあるいはARCにおけるキスペプチン陽性細胞数低下、遅発影響において必須の変化 (Key Event, KE)の候補として成熟後のLHサージ時におけるLHあるいはFSHレベルの低下、遅発影響 Adverse outcome (AO)の候補として性周期異常(主として持続発情)の発現時期の早期化の発現それぞれを挙げて検討した。遅発影響検出のための既存のTGへの改善点については考察に併せて記載した。

D. 考察

まず分担者ごとの考察として、

1) SERM 新生児期曝露による遅発影響誘発の可能性とその機序検索 [高橋]

TMXおよびRLX高用量のラット新生児期単回曝露は、エストロゲン同様、視床下部キスペプチンニューロンを変調させ神経内分泌機能の異常を介して遅発影響を誘発することが明らかとなった。同量比較ではTMXでは性周期制御中枢の視床下部前方のAVPVだけではなく、卵胞発育中枢の視床下部後方のARCにも影響が認められたこと、無排卵状態が持続していたことから、今回のTMX投与量では遅発影響量よりやや高く脱雌化を起こしていた可能性が示唆された。

2) 遅発影響の発現に関わるERの役割を明確化するための検索 [井上]

1. 以前の研究結果で今回のPPTおよびDPN投与量では性周期異常発現の早期化の誘発量すなわち遅発影響発現量であることが得られている。既知の結果と本年度実施結果を照合すると、これらの物質の子宮肥大試験は遅発影響の発現と相関しないと考えられた。またDPN高用量曝露でのエストロゲン作用が遅発影響に関連している可能性も否定できないと考えられた。

2. PPT、DPN、ICI新生児期曝露ラットの生後14および21日の視床下部Kiss1 mRNAに変化が認められなかったことから、発達期におけるKiss1 mRNAの発現低下機構は成熟後と異なり、性周期停止と直結しないことが示唆された。今後の検討が必要である。

3. ICI 5,000 µg/kgのラット新生児1回皮下投与で遅発影響のkey eventである性周期異

常の発現時期の早期化が観察されたことから、ER α アンタゴニストである ICI の新生児期曝露は遅発影響を起こすことが確認された。

3) 遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義の解明および EE 投与直後の視床下部における ER α および kiss1 遺伝子に関する検索 [代田]

新生児ラット視床下部の Kiss1 は LH パルスを起動する視床下部弓状核 (ARC) の Kndy ニューロンにのみ発現していることが報告されている。したがって本年度の結果で遅発影響 EE の経口投与後直後の新生児ラットの視床下部においてすでに Kiss 遺伝子の発現が低下していたことは、新生児ラットに投与された EE はまず Kndy ニューロンの Kiss1 遺伝子発現を低下させ、GnRH 分泌制御を変化させることで、その後の視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の正常な発達を妨げ、遅発影響をもたらすことを示唆していた。すなわち ARC の変化が遅発影響における視床下部のキスペプチン低下の初期変化である可能性が示唆された。

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

新生児期 EE 曝露短期間の卵巣での変化および曝露直後に卵巣を摘出し EE 添加にて培養した結果を総合すると、新生子期の EE 曝露は、卵細胞のアポトーシスを抑制し卵胞形成へ直接影響することが明らかとなった。アポトーシス関連遺伝子である Hrk 遺伝子の発現が新生子期の卵細胞抑制の引き金である可能性が示唆された。本研究は内分泌かく乱化学物質の卵巣における直接作用する経路が存在する可能性を示唆していた。

5) マウスを用いたエストロゲン様作用をもつ化学物質の発育期脳への作用が及ぼす遅発影響に関する研究 [横須賀]

マウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における EE の単回曝露による影響として、(1) 雌の膣開口時期の早期化、(2) 授乳期の雌に一時的な発育遅延を誘導、(3) 8 週目には対照群には認められない性周期の異常が誘導されるなどであった。昨年度までに得られた EE 投与がもたらす影響、すな

わち、POA における CB 陽性細胞の雌雄差の誘導は、形態学的変化の他に雌発育や性周期にも影響を及ぼしていることが判明した。

EE の新生仔期曝露は雌に大きな影響を及ぼす。雌では、授乳期に一時的な発育遅延を及ぼし、引き続いて膣の早期開口、性周期の早期異常を誘発する。これは、脳の機能的な雌雄差とも関連しており、成熟後の雌雄コミュニケーションにも影響を誘導しているものと予想される。脳の生殖機能は発育期の GABA 系の発達の他に、エストロゲン受容体とも関連することが期には一過性の発育遅延を及ぼし、その後も視床下部の CB システムの変更などを通じて、生涯に渡って生殖機能の機能的な乱れを誘導することが示された。

6) 新生児期から発達期の EE および Triphenyl phosphate (TPhP) 連続曝露が雌ラットの発達成長後の社会性行動発現への影響について [川口]

本年度の結果は EE の新生児期曝露は卵巣の発達を抑制し、成熟後の性行動中の雌特異的な社会行動を抑制することが明らかとなった。さらに、これまで in vivo 条件下でのエストロゲン様作用が不明であった TPhP も EE と同様、成熟後の性行動を EE と同様の抑制作用を示したを併せて考察すると、内分泌かく乱化学物質の臨界期曝露による行動神経内分泌学的変異を示すものと考えられ、化学物質の遅発型影響の機序解明へ必要な知見を示している。また、早期指標を目指した母子分離誘発蹄鳴反応試験において抗不安薬の投与により性差が検出されることを示した。

また各分担研究者の考察を総合し、以下のような考察を行った。

EE および ER 結合物質による遅発影響については、代表的な SERM である RLX、TMX および ER α アンタゴニスト ICI 新生児期曝露によって、EE と同様な遅発影響による性周期異常の発現時期早期化が観察される新たな知見が得られた。以前の研究成果で PPT および DPN (高用量のみ)での遅発影響誘発が得られていることを併せると、新生児期

曝露による遅発影響はエストロゲン様作用物質だけでなく抗エストロゲン作用物質等 ER α に結合する物質も遅発影響を誘発することを明確に示している。新生児期曝露では遅発影響を誘発する SERM も成熟期投与では視床下部に影響しないことは、新生児期と成熟期の視床下部の ER に対する感受性は異なっている可能性を示唆するものである。したがってエストロゲン/抗エストロゲン作用物質ともに遅発影響についての対象物質とすべきと考えられた。

また遅発影響とキスペプチン部位特異性の初期変化として、本年度 EE を新生児期経口投与直後のラットで視床下部 Kiss1 遺伝子の明瞭な発現低下が認められたことは、同時期はキスペプチンが視床下部弓状核(後方)の Kndy ニューロンにのみ発現している時期であることから、遅発影響の初期変化として Kndy ニューロンの Kiss1 低下が関与している新たな知見が得られた。しかし一方で DPN、PPT、ICI 新生児期曝露ラットの発育期視床下部の結果より ER 結合物質による相違が存在する可能性が示唆された。EE 新生児期曝露によるキスペプチンは発達期初期に感受性が高いことも H26 年度の研究結果で得られている。また今回 EE 新生児曝露直後より卵巣へのアポトーシス抑制という直接作用の可能性も示されたことから、発育初期に Key event の検索とそれらの関連性についてはさらなる検討が必要である。

キスペプチン以外の変化として卵巣については前述したが、その他にも遅発影響量の新生児期 EE 曝露マウスにおいても内側視床前野(POA)の CalbindinD-28k(CB)陽性細胞の雌雄差パターン変化が授乳期や雌の発達にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。また遅発影響量の EE の生後 4 週間経口投与は成熟後の性行動を抑制したが離乳後までの長い期間投与であることから、単回で起きる可能性についてはさらなる検討が必要であると考えられた。

これまでの研究成果で得られた遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の Adverse outcome pathway(AOP)を構築した。エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露 視床下部サージ中枢視床下部

キスペプチン陽性細胞数低下(MIE) LH サージ低下(KE) 性周期異常の発現時期の早期化(AO)[比較的高用量では 繁殖生涯への悪影響(AO)/子宮癌リスク増加(AO)]

遅発影響検出のための既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)の改善点については、

- 1) 性周期観察による性周期異常をエンドポイントとすること
- 2) 観察期間は生後 6 ヶ月までが必要である
- 3) 最も汎用されている二世代繁殖毒性試験(TG416)を用いることがよいが、そのほかの繁殖試験でも応用可と考える
- 4) F0 世代に性周期を長期観察用の衛星群を設置すること
- 5) 1 群あたりの匹数として、20 例以上を推奨
- 6) 遅発影響を確認すべき物質は、エストロゲン受容体(ER)と結合するエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質
- 7) 用量についてはエストロゲン作用を Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015) に示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが望ましい。

このような追加の衛星群を設けることで遅発影響は検出可能であると考えられる。

E. 結論

1. 遅発影響は ER を介するエストロゲン作用物質だけでなく抗エストロゲン作用物質でも誘発される。
2. さらなる検討が必要であるが遅発影響の新生児期曝露初期からすでに視床下部や卵巣等で変化が起きていると考えられる。
3. 遅発影響では視床下部以外の脳および性行動等の変化をもたらす。

4. 遅発影響の発現機序を示した Adverse outcome pathway(AOP)を構築し、既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)を改善することにより遅発影響は検出可能であると結論した。

F . 研究発表

F-1 . 論文発表

- 1) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha-Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.
- 2) Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. *Reprod Toxicol.* **57**, 21-28, 2015.
- 3) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17alpha-ethinylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.*, **60**, 33-38, 2016.
- 4) Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethinylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)
- 5) Horii Y, Kawaguchi M. Higher detection sensitivity of anxiolytic effects of diazepam by ledge-free open arm with opaque walled closed arm elevated plus maze in male rats. *Behav Brain Res.* 2015 Nov 1;294:131-40
- 6) Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Effects of sulpiride and ethylene glycol monomethyl ether on endometrial carcinogenicity in Donryu rats. *J Appl Toxicol.* Online .Jul 14 2015.
- 7) Shiga T, Nakamura TJ, Komine C, Goto Y, Mizoguchi Y, Yoshida M, Kondo Y, Kawaguchi M. A Single Neonatal Injection of Ethinyl Estradiol Impairs Passive Avoidance Learning and Reduces Expression of Estrogen Receptor α in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats. *PLoS One.* 2016 Jan 7;11(1):e0146136

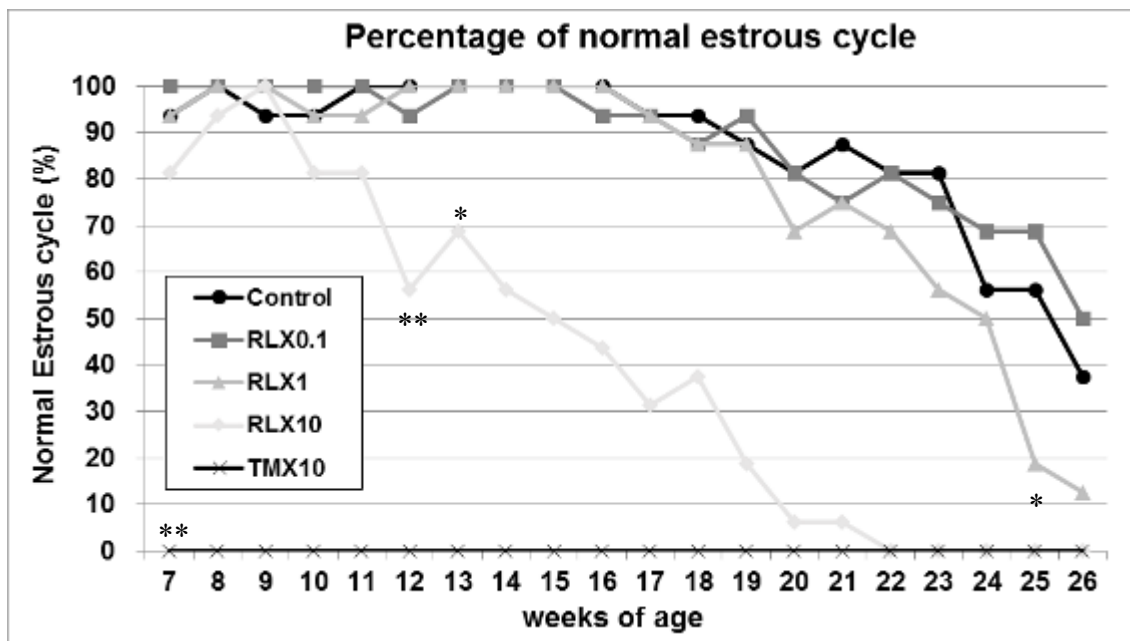
F-2.学会発表

- 1) 高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 α -ethinylestradiol (EE) 新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下：第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
- 2) 田中 恵他「新生児期エチニルエストラジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロジェン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、徳島市)
- 3) 代田 眞理子、吉田 緑「幼若動物を用いた毒性評価において認識すべき発達期の繁殖生物学の特徴」(第 42 回日本毒性学会シンポジウム、2015 年 6 月、金沢市)
- 4) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新生児期エチニルエストラジオール経口曝露量と子宮肥大試験の検出感度」(第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月、金沢市)
- 5) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the Kiss1-/- female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)
- 6) 白田賢人、野澤香織、永岡謙太郎、吉田緑、田谷一善、渡辺元エチニルエストラジオールの雌ラットへの新生児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学術集会 2013 年 8 月 7-9 日、花巻、岩手)
- 7) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats. The 107th SRD annual meeting (第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 20-24 日、帯広)
- 8) 田邊郁也、小峰千亜希、吉田緑、川口真以子 生後 24 時間以内の雌ラットへの ethinyl estradiol 曝露が受動回避学習に及ぼす影響 第 62 回日本実験動物学会総会 (2015 年 5 月 28 日~30 日、京都)
- 9) 立川直之、志賀健臣、中村孝博、小峰千亜希、堀井康之、渡辺元、田谷一善、溝口康、吉田緑、川口真以子 雌ラットへの生後 24 時間以内 ethinyl estradiol 曝露が大脳皮質と海馬の estrogen receptor(ER) α 及び ER β 発現に及ぼす影響 第 62 回日本実験動物学会総会 (2015 年 5 月 28 日~30 日、京都)
- 10) Nakajima S, Horii Y, Ohta R, Takahashi K, Sato Y, Sato K, Shiraishi Y, Kawaguchi M Altered emotional reactivity of offspring induced by cross-fostering between Hatano high and low

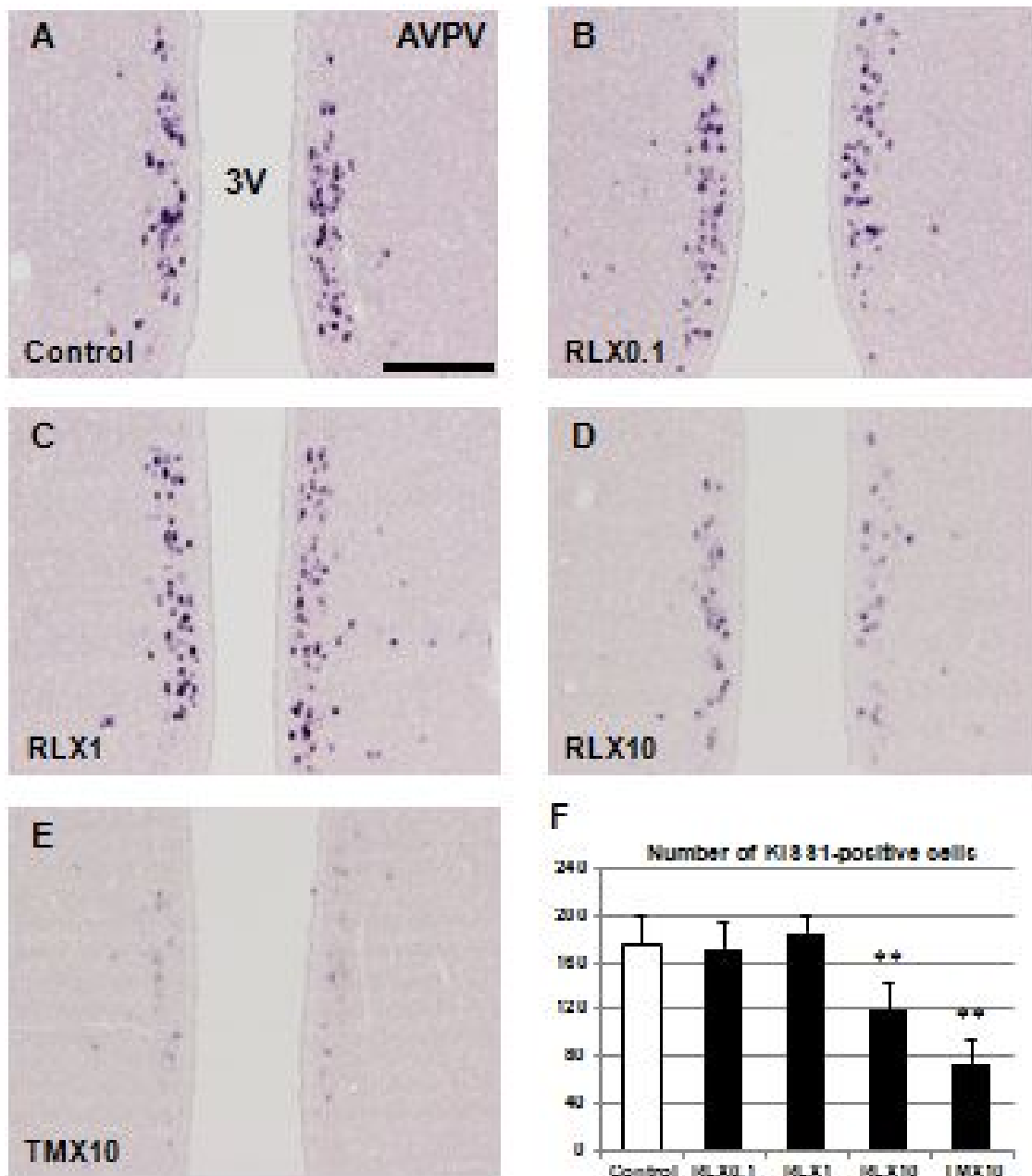
- active avoidance rats, and its relationship with maternal care 第 38 回日本神経科学大会 (2015 年 7 月 28 日～31 日、神戸)
- 11) 中山愛里、服部達哉、大河原利、田辺郁也、磯部安菜、宍戸浩孝、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子 幼若期雌ラットへの ethynyl estradiol と triphenyl phosphate の 28 日間曝露が成熟後の性行動に及ぼす影響 第 42 回日本神経内分泌学会・第 23 回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会 (2015 年 9 月 17 日～19 日、宮城)
 - 12) 中山愛里、服部達哉、宍戸浩孝、磯部安菜、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子 幼若期雌ラットへの ethynyl estradiol (EE) と triphenyl phosphate (TPhP) の 28 日間曝露が成熟後の臓器重量、情動行動、性選好性、性行動に及ぼす影響 環境ホルモン学会第 18 回研究発表会 (2015 年 12 月 10～11 日、栃木)
 - 13) 磯部安菜、川口真以子 仔ラットの母子分離誘発啼鳴反応の発声回数に対する抗不安薬ジアゼパムの抑制作用には性差がある 第 89 回日本薬理学会年会 (2016 年 3 月 9 日～11 日、神奈川)

G. 知的財産権の出願・登録状況

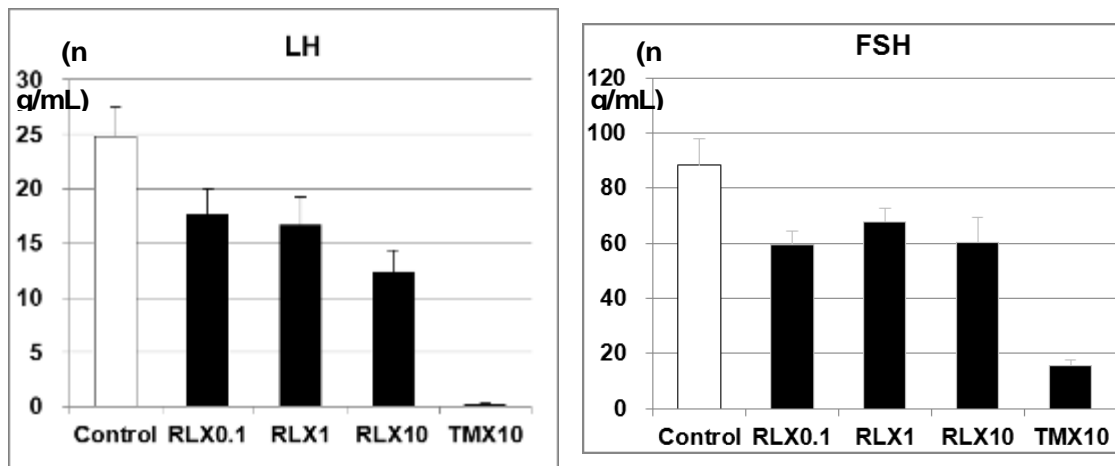
なし



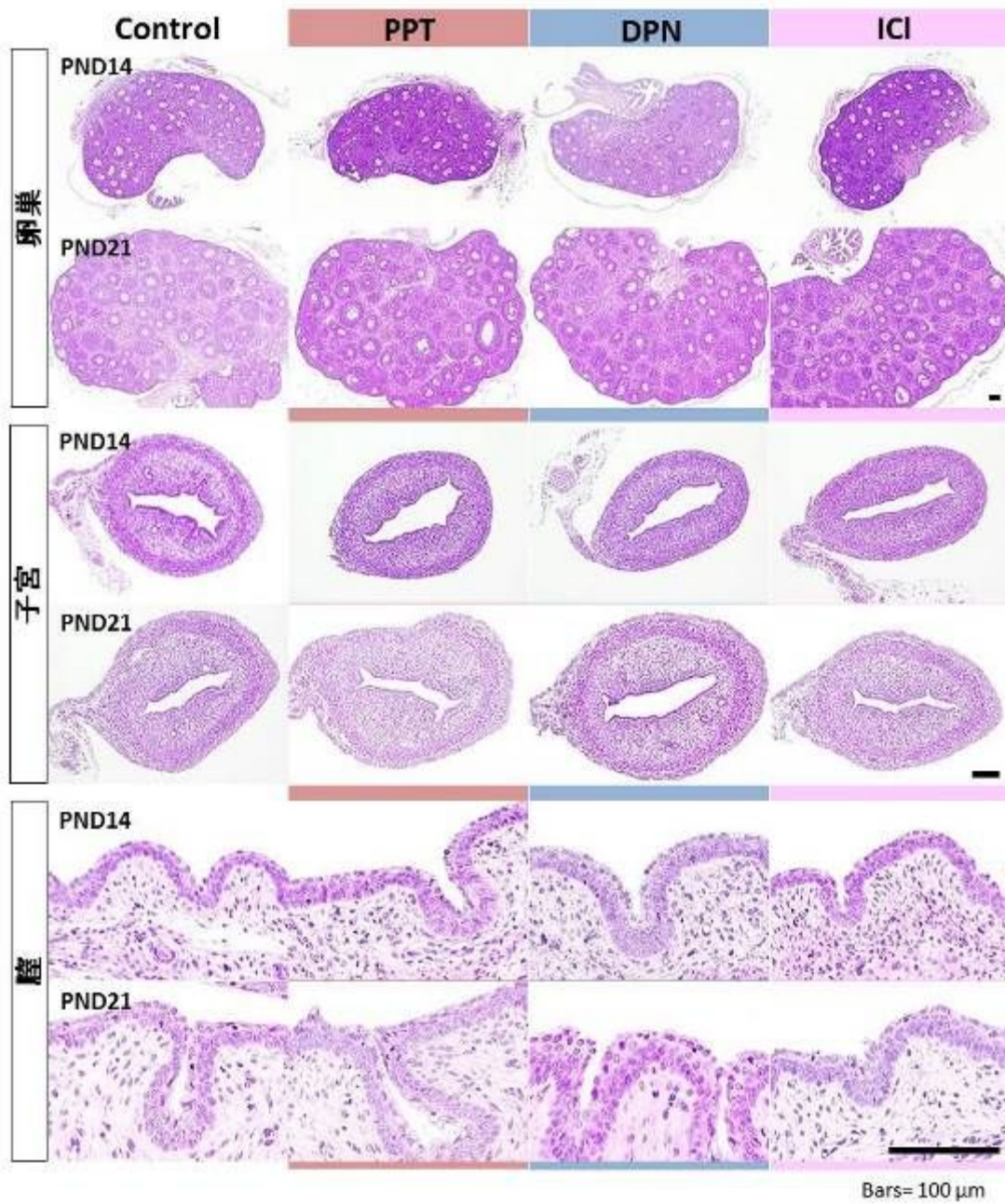
SERM新生児期曝露による正常性周期を示す個体の割合の推移



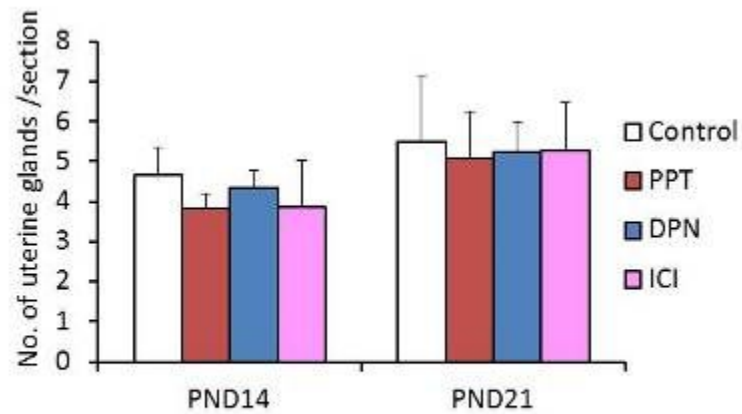
SERM新生児曝露によるAVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiSS1発現細胞の比較 (10週齢時)



SERM新生児期曝露ラットの誘発LHサージ時の血中LHおよびFSH値(10週齢)

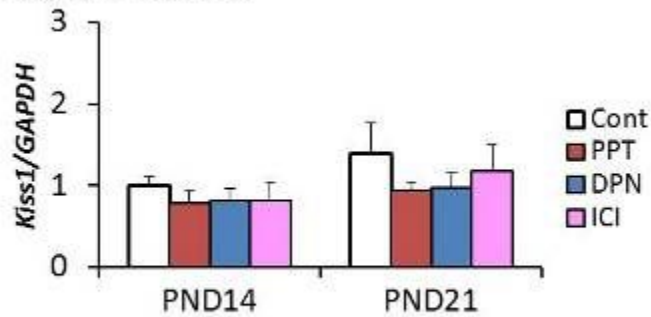


新生児期 PPT、DPN、ICI 曝露ラットの生後 14 日および 21 日における卵巣・子宮・膣の組織像

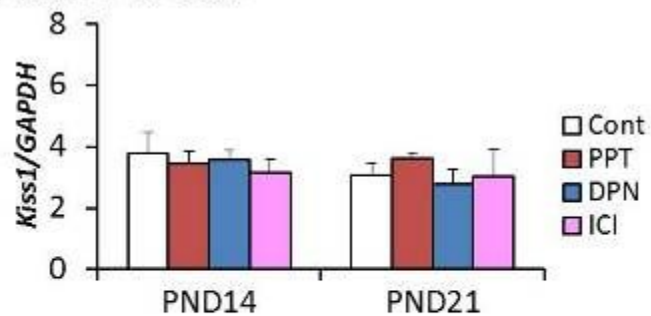


PPT、DPN、ICI 新生児期曝露動物の生後 14 日と 21 日における子宮腺の数

(A) 視床下部前部



(B) 視床下部後部

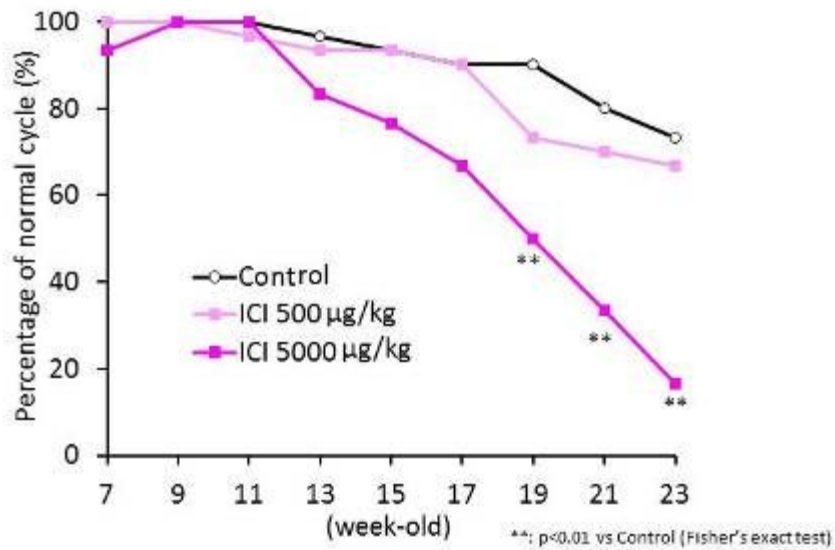


PPT、DPN、ICI 新生児期曝露動物の生後 14 日と 21 日の視床下部前部(A) および後部(B)における Kiss1mRNA 発現

ICI新生児期曝露ラットにおける膣開口平均日齢と体重

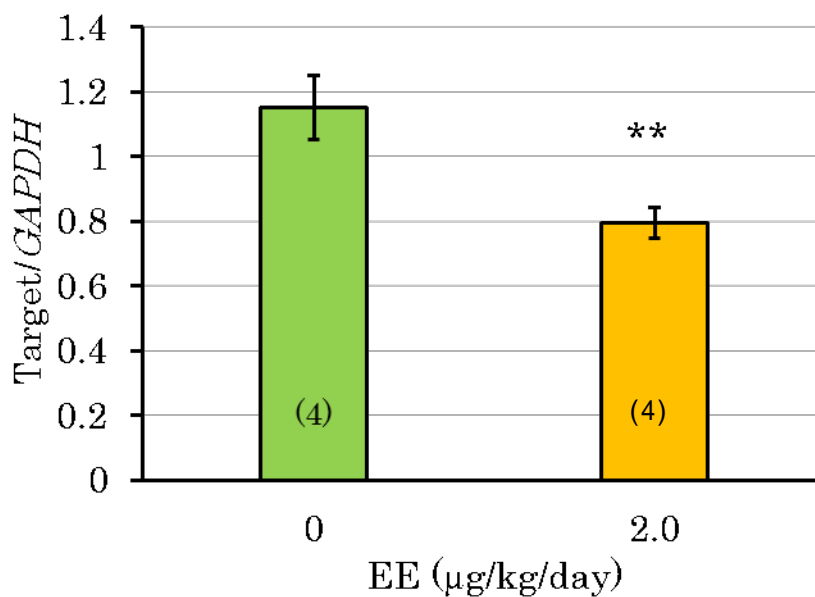
ICI 182,780 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Postnatal day	Body weight (g)
0	28.0 ± 0.8	91.6 ± 7.4
500	$27.6 \pm 0.6^*$	$87.8 \pm 5.8^*$
5,000	$27.3 \pm 0.5^{**}$	$85.0 \pm 6.1^{**}$

(観察期間 生後27~30日)

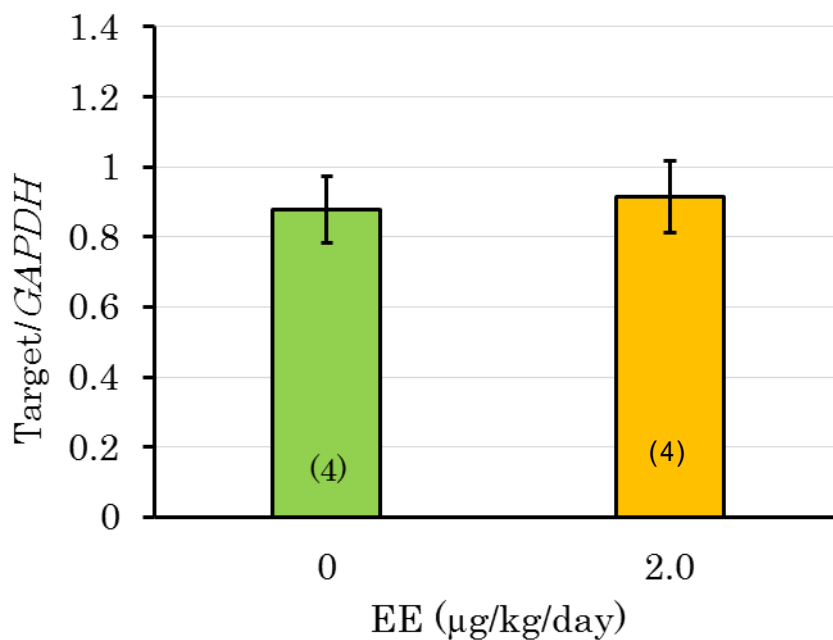


ICI 新生児期曝露ラットの正常性周期を示す動物の割合

(A) 視床下部



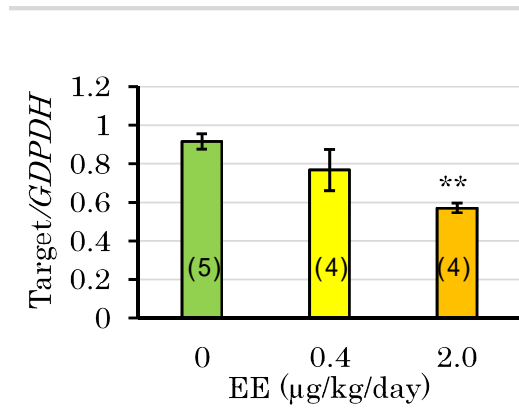
(B) 上部領域



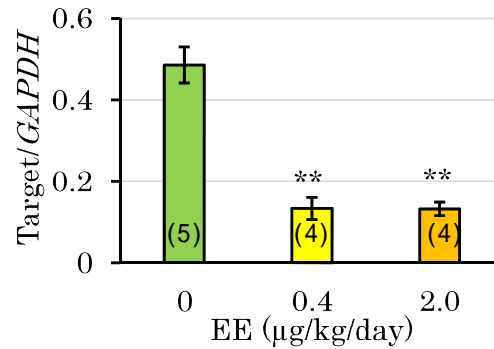
1日齢から5日間0または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの最終投与後24時間における視床下部(A)あるいはその上部領域(B)におけるER mRNAのGAPDH mRNAに対する相対発現量(平均±S.E.M)

(N) **対照群との間に有意差あり(P<0.01)

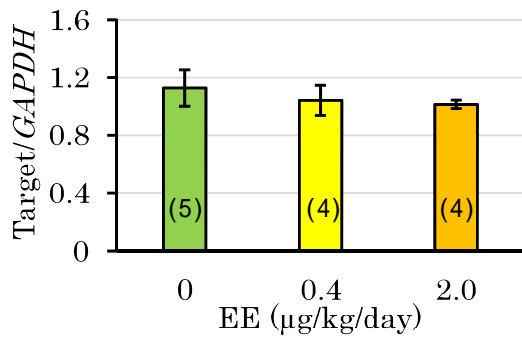
(A) *ER* mRNA



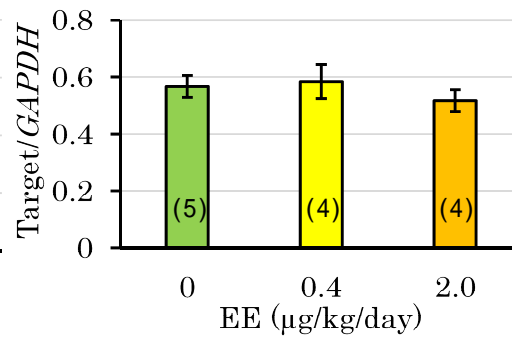
(B) *Kiss1* mRNA



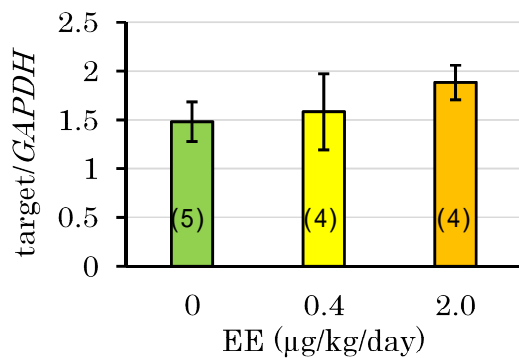
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Tac2* mRNA



(E) *Oprk1* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

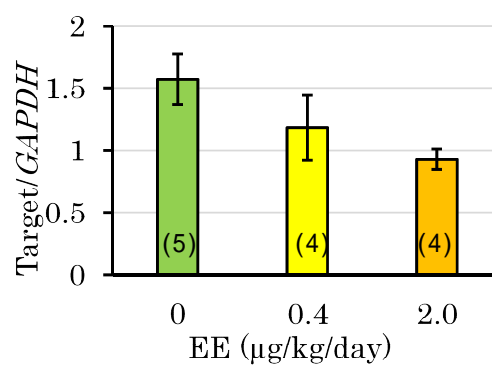
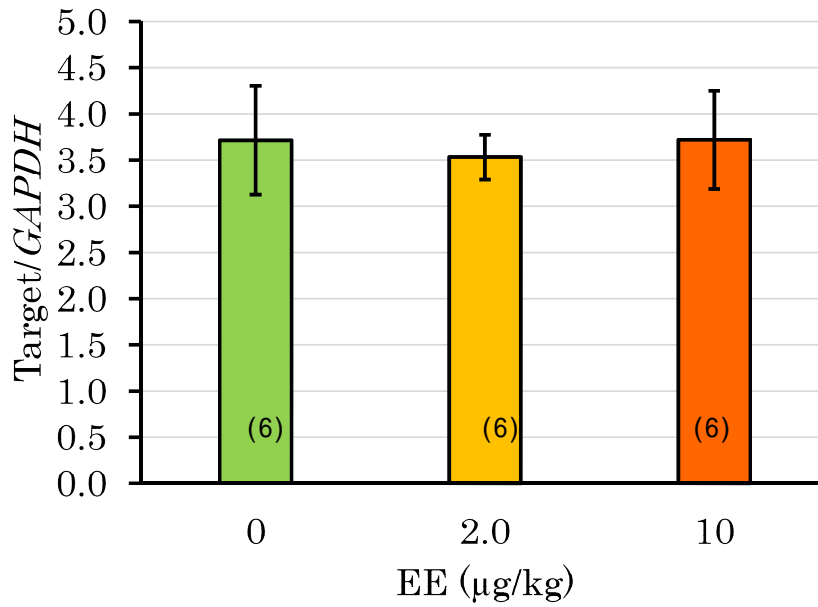


図4. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における mRNA(*ERα* (A)、*Kiss1* (B)、プロダイノルフィン(*Pdyn*) (C)、オピオイド受容体(*Oprk1*)、ニューロキニンBをコードする *Tac3* (E)ならびにその受容体をコードする *Tacr3* (F))の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M.) . (N) **対照群との間に有意差あり (P<0.01)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

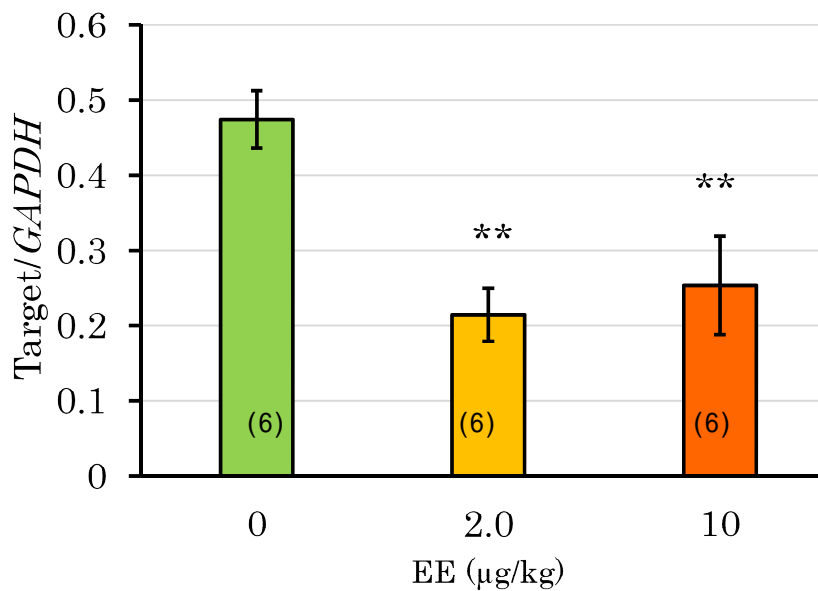
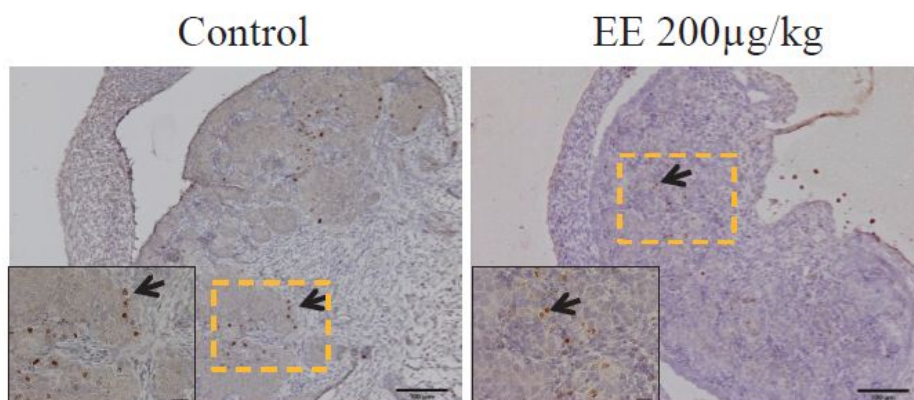
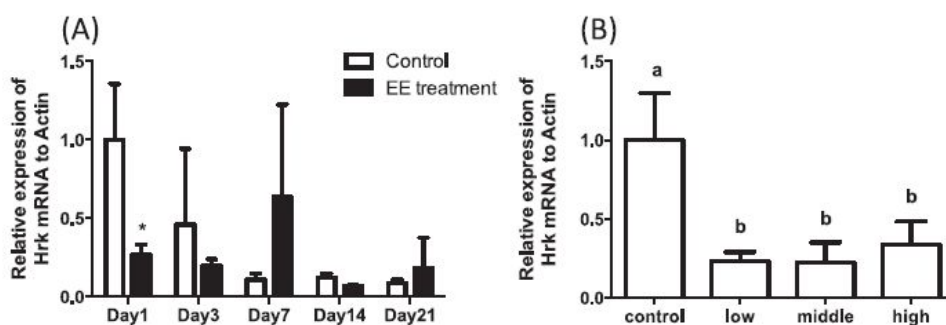


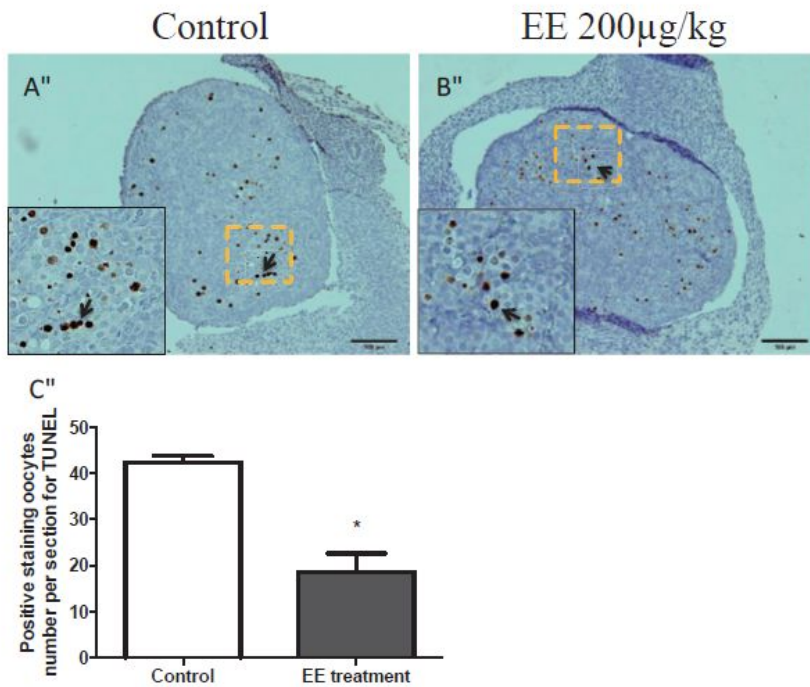
図7. 1日齢に0、2または10 μg/kgのエチニルエストラジオール(EE)を単回経口投与した雌ラット視床下部の投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M) (N) **対照群との間に有意差あり ($P < 0.01$)



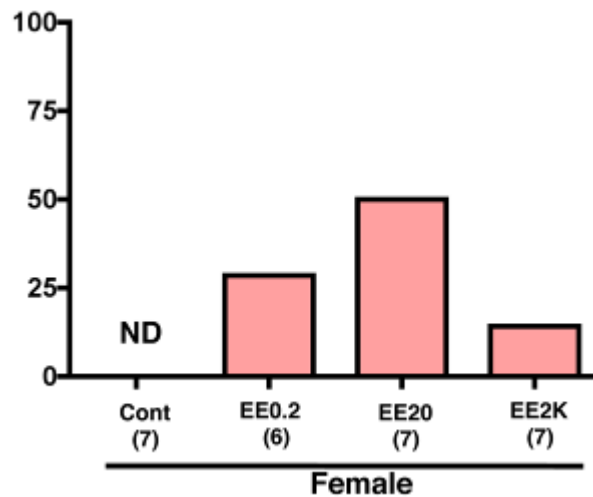
生後1日の対照群およびE E処置群 (200µg / k g) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。



E E処置群および対照群の in vivo 卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量(A)とE E添加 (low: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/ml)、あるいは非添加で新生子卵巣を培養したときの *Hrk* 遺伝子発現量 (B)。*は有意差有り (P<0.05)。



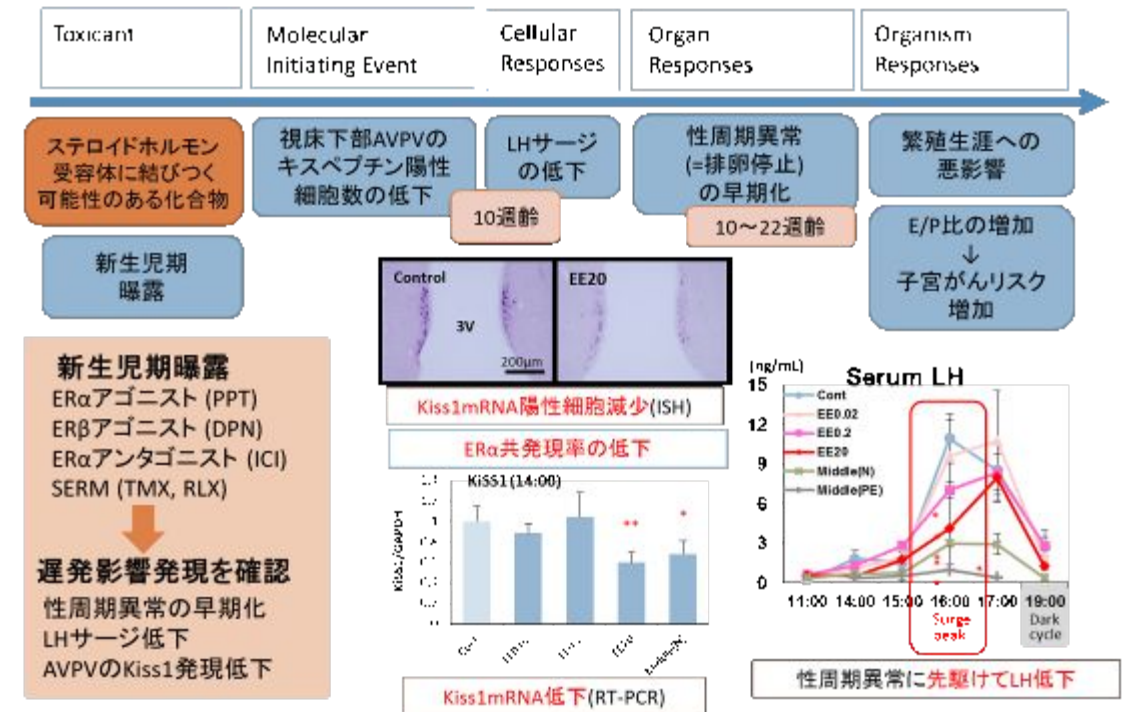
生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。*は有意差有り(P<0.05)。



発情雌との接触におけるEE処置雌マウスのUSV発声

超音波測定装置(Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H. Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany)を用いて、発情雌との接触時における高周波数帯発声(100~150kHzの帯域。以下、USV)の測定。対照群雌(Cont)ではUSVは認められないが、EE投与群では14%~43%の確率でUSVが認められた。

遅発影響のAOP



遅発影響のAOP