

図7 遅発影響の曝露量と臨界期の閾値

結論

化学物質の臨界期曝露による雌性生殖器の遅発影響において

1. 排卵制御に関わる視床下部前腹側室周囲核 (AVPV) のキスペプチンニューロンが重要
2. 遅発影響には曝露量および曝露時期ともに閾値が存在
3. 以下のadverse outcome pathway (AOP)を提案

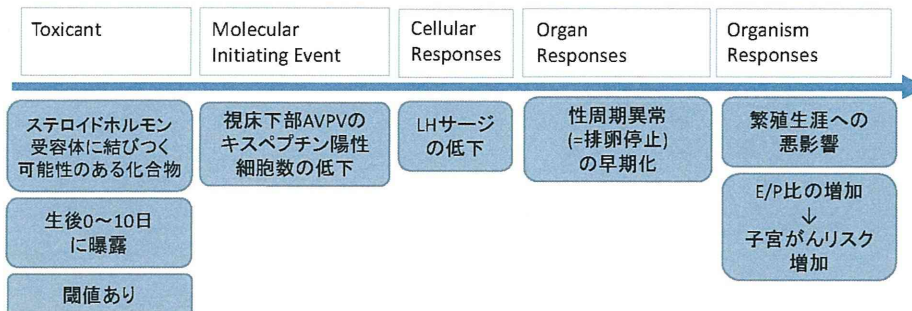


図8 AOP と本研究の結論

遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

(新生児期/臨界期曝露に限定した遅発影響を指す。以下同様)

1. 遅発影響の定義

遅発影響とは化学物質の新生児期/周産期曝露により、性成熟後に顕在化する悪影響

2. 遅発影響の発現機序

エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露が性周期中枢である視床下部前方AVPVのキスペプチン低下を引き起こし、その低下が成熟後のLHサージを低下させる。この性腺軸の変調持続が性周期異常の発現時期の早期化顕在化することが機序と考えられる。

3. 使用可能な既存の毒性試験ガイドラインと改善点

二世代繁殖毒性試験(TG416)のF0世代に、性周期を長期観察用の衛星群を設置することを提言する。

一世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型1世代繁殖毒性試験(TG433)についても、F0世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能

4. 衛星群の検査項目とそのエンドポイント

1) 衛星群の動物数 1群20例以上。ただし衛星群への被験物質の直接投与実施しない。混餌投与の場合は離乳後は実施しない

2) 検査項目とエンドポイント 継続的な性周期観察を必須検査項目とする。性周期観察により対照群と比較し**性周期異常の発現時期早期化を遅発影響発現のエンドポイントとする。**

3) 観察期間

生後6ヶ月

4) 母動物への投与量

用量については母動物にエストロゲン作用を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。

5. 遅発影響検出対象化学物質

遅発影響を確認すべき物質としては、その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、エストロゲン受容体(ER)との結合する物質、すなわちエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質が対象である。その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、エストロゲン受容体(ER)との結合する物質、すなわち**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が対象**である。子宮肥大試験等を利用して生体に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用を確認することは有用と考える。

6. 機序試験における検査項目とエンドポイント

遅発影響発現の引き金は発達期から生じている視床下部前方AVPVキスペプチンの低下あるいはLHサージ低下であり、これらも遅発影響のエンドポイントとなりうる。これらの検索は科学的に遅発影響を証明するために有用である。しかし高度で手技および専門的知識が必要なことからメカニズム試験の実施が必要な場合にこれらを行うことを推奨する。

図9 遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

II. 分担研究者報告

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書 (H25-27 総合研究報告書)

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

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

研究分担者：高橋 美和 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：吉田 緑 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：森川 朋美 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

研究要旨

平成 25-27 年度の 3 年間に新生児期臨界期曝露による遅発影響発現機序に視床下部部位特異的
変化が果たす役割について以下の点を明らかにした、

1. 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、同部位のエストロゲン受容体(ER) α を有するキスペプチンニューロン数の
の減少、LH サージの低下が認められた。卵胞発育中枢(視床下部後方)である ARC には変化
は認められなかった。これらの現象は閉経相当時期の雌ラットの加齢性変化に類似してい
た。
2. ER を介して組織特異的にエストロゲン/抗エストロゲン作用を示す selective estrogen receptor
modulator(SERM)のタモキシフェン(TMx)、ラロキシフェン(RLX)の新生児期曝露ラットでも
EE と同様な視床下部の変化および遅発影響が認められた。子宮肥大試験で TMx、RLX と
も明らかな抗エストロゲン作用を示した。
3. 1.2 の結果より、エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露が性周期中枢である
視床下部前方 AVPV のキスペプチン低下を引き起こし、その低下が成熟後の LH サージを
低下させる。この性腺軸の変調持続が性周期異常の発現時期の早期化顕在化することが遅発
影響の発現機序と考えられた。
4. 遅発影響の感受性時期の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、遅発影響の臨界期は生後 10 日まで持続し生後 14 日曝露で
は明らかでないと考えられた。
5. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の発現機序の adverse outcome pathway (AOP)
は、新生児期エストロゲン/抗エストロゲン作用物質曝露→molecular initiating event は視床下
部サージ中枢キスペプチンニューロン抑制→key event は正常性周期より認められる LH サ
ージ低下→AO は性周期異常の早期発現、繁殖生涯への悪影響とした。また既存の毒性試験ガ
イドラインでは検出できない可能性の高い遅発影響であるが、既存の OECD 繁殖毒性試験
テストガイドラインに性周期長期観察用の試験群を追加設置等の改善を行うことにより検
出可能であると結論した。

A. 研究目的

化学物質臨界期曝による遅発影響は成熟後
に至って生殖機能障害が顕在化し、その機序
も不明なため化学物質リスク評価上の重大な
懸念である。キスペプチンニューロンは近年

発見された神経ペプチドであるが、エストロ
ゲン受容体(ER) α を有すること、エストロゲ
ンポジティブフィードバック機構により性周
期制御中枢である視床下部前方に位置する前
腹側室周囲核(APVA)およびネガティブフィ

ードバック機構による卵胞発育制御中枢である弓状核(ARC)に存在するという部位特異的分布から、このキスペプチンニューロンがこれらの制御機能の中心的役割を果たしていることが解明されつつある。遅発影響についても視床下部の変化が有意であると推測され、平成22年から24年に実施した本研究課題関連研究において、高橋らは、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プチン低下を見出したが、部位特異性については特定できなかった。そこで本研究は、遅発影響による部位特異性の明確化は、遅発影響の機序解明と指標の科学的根拠に極めて重要であるという認識のもと、遅発影響の部位特異的变化に焦点を絞って研究を行っている。また化学物質のリスク評価上、遅発影響と閾値(投与量および投与時期)の存在の明確化も重要である。

平成25-27年度の本研究の目的は以下の点である。

1. 雌において化学物質の臨界期曝露による遅発影響が視床下部キスペプチンニューロンのいずれの制御部位に依存するのか部位特異性と両者の関連性を明らかに、遅発影響中枢なのか化学物質の生殖機能の遅発影響の核となる機序を解明する。
2. 遅発影響がエストロゲン作用物質のみで誘発されるのか、ERに結合する抗エストロゲン作用物質でも遅発影響は起きうるのか検証する。
3. 遅発影響の閾値とくに検査時期による閾値を明らかにし化学物質リスク評価に資することを旨とする。
4. 本研究を化学物質のリスク評価行政に遅滞なく活かすため、エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の発現機序について adverse outcome pathway (AOP)の構築し、さらに遅発影響を検出するための既存のOECDテストガイドライン改善点について提言する。

B. 研究方法

1. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす発現機序 (Figure 1)

雌 Donryu ラットに合成エストロゲンであ

り本研究の共通検索物質であるエチニルエストラジオール (EE)を生後1日齢に遅発影響発現量の0.2 (EE0.2)、20 µg/kgbw (EE20)、遅発影響非発現量 EE 0.02 µg/kg bw (EE0.02)を単回皮下投与した。またこれらの遅発影響による変化とヒトの閉経期に相当する性周期が維持する middle aged rat (Middle(N))と、性周期がすでに回帰せず持続発情を示す雌ラット (Middle (PE))と比較した。これらのラットは単回投与後、膣開口の性成熟をチェックし、その後は実験期間を通じて性周期を持続的に観察した。対照群を含む各群の一部の動物については、正常性周期を回帰する young adult (10週齢)において卵巣を摘出後、エチニルベンゾエート(EB)3日間皮下投与、プロゲステロン1回皮下投与により人工的 LH サージを誘発し、血中 LH および FSH 値をラジオイムノアッセイ法にて測定した。またこの LH サージ前後の視床下部キスペプチンの変化を検索するため午前11時から午後7時まで経時的に AVPV を含む視床下部前方と、ARC を含む視床下部後方における Kiss1 mRNA 遺伝子および関連遺伝子の変化を RT-PCR 法により解析し、さらに AVPV および ARC における Kiss1 遺伝子発現細胞数を in situ hybridization 法 (ISH)にて、Kiss1 遺伝子と ER α 、c-fos 遺伝子共発現数を ISH と免疫組織化学的手法を用いて測定した。Middle age 群については、22週齢の動物を用いて同様の測定を実施した。EE 曝露した残りの動物については22週齢まで性周期観察を行い、生殖器系について病理組織学的検査を実施した。

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

生後24時間以内(PND0)の Donryu 新生児雌ラットに TMX 10 mg/kg bw (TMX)、RLX 0.1、1あるいは10 mg/kg bw (RXL0.1,RLX1,RLX10)を単回皮下投与し、対照群には溶媒のセサミオイルを投与した。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 (Pinilla et al., 2001; Pinilla et al., 2002)。投与物質以外は実験1と同様の解析を実施した。

また実験2で用いた TMX、RLX のエストロゲン・抗エストロゲン作用を確認するため、7週齢無処置卵巣摘出 Donryu ラットを用いて

実験 2 と同用量の TMX、RLX を 3 日間連続皮下投与(抗エストロゲン作用観察群は EE1 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ を併用投与)した。子宮への作用は子宮重量および子宮内膜の形態学的検索を、視床下部への作用は前方および後方のキスペプチン等を検索した。陽性対照には ICH182,780 $500 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ を用いた。

3. 遅発影響の感受期の検索

遅発影響を誘発するエストロゲン曝露に対して、生後どの時期まで感受期を有するか検討するため、生後 1 日以内 (PND0)、5 日齢 (PND5)、10 日齢 (PND10)および 14 日齢 (PND14) に EE20 $\mu\text{g}/\text{kg bw}$ を雌 Wistar Hannover ラットに単回皮下投与した。正常性周期回帰している young adult 時期 (10 週齢) に各群一部の動物の視床下部前方と後方のキスペプチンニューロンの変動と LH サージを上述の実験 1 と同じ方法で検討した。また残りの動物について継続的に 40 週齢まで性周期を観察し。

4. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP 構築と既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への提言

AOP 構築の資料として以下の 3 文献を基本の文献と用いた。

1. OECD. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. In Series on Testing and Assessment, No. 184, Nol. ENV/JM/MONO(2013)6 p.45, Organisation for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate Paris, France. (OECD, 2013)
2. Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway (AOP) development I: strategies and principles. Toxicol Sci. 2014 142(2):312-20 (Villeneuve et al., 2014a)
3. Villeneuve DL, Crump D, Garcia-Reyero N, Hecker M, Hutchinson TH, LaLone CA, Landesmann B, Lettieri T, Munn S, Nepelska M, Ottinger MA, Vergauwen L, Whelan M. Adverse outcome pathway development II: best practices. Toxicol Sci. 2014

142(2):321-30. (Villeneuve et al., 2014b)

化学物質の新生児期曝露により生ずる可能性のある遅発影響を検出するため試験系を組み込む OECD の既存のテストガイドライン (TG)として、

1. 1 世代繁殖毒性試験(TG415)
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741501e.pdf?expires=1456416463&id=id&accname=guest&checksum=4FCF49B246E619F1FCE5795467329900>
2. 2 世代繁殖毒性試験(TG 416)
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741601e.pdf?expires=1456416267&id=id&accname=guest&checksum=57F1529FEA951B10093E199E1576F814>
3. 拡張型一世代繁殖毒性試験(TG433)
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9712211e.pdf?expires=1456417694&id=id&accname=guest&checksum=C53E6908857407A1761BF7181B396B64>

についていずれか適切か検討し、どのような検査項目と検出のためのエンドポイント等を組み込むべきか検討した。

(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. 結果

1. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす発現機序

対照群では LH サージ(排卵前日の発情前期に起きる)が 16:00 をピークに認められた。EE0.2 以上の群ではサージのピークが用量依存性の低下が認められ、EE20 群では有意であった。EE0.02 群では対照群と同様であった。Middle (N)では EE20 群より低下しており、Middle (PE)ではサージピークは認められなかった(Figure 2)。

前述の LH 測定と同時期に視床下部の AVPV を含む前方および ARC を含む後方について解析した。AVPV の Kiss1 mRNA は対照群において、LH サージ日の 11 時から増加し、16:00 でピークを示した。このような増加は卵巣摘出動物では認められなかった。この Kiss1 mRNA 発現増加は 14:00 およびピーク時の 16:00 とともに EE20 群で低下した(Figure 3)。この結果は Middle (N)群と同様であった(Figure 3)。しかし ARC を含む後方ではこのような Kiss1 mRNA の変化は認められなかった(Figure 4)。Kiss1 関連遺伝子である Kiss1R、ER α ・ β および c-fos の RT-PCR による遺伝子発現について AVPV および ARC とともに変化は認められなかった。

ISH により AVPV における Kiss1 mRNA 陽性細胞(同遺伝子を発現するキスペプチンニューロン)の数が、EE20 および Middle (N)群で有意に低下し、さらに ER α との二重染色の結果では、Kiss1 mRNA 陽性細胞における ER α 陽性細胞数が EE20 および Middle (N)群で有意に減少した(Figure 5)。c-fos 陽性細胞については Middle (PE)群のみで Kiss1 mRNA 陽性細胞における発現率増加が観察された。ARC において AVPV で観察されたいずれの変化も認められなかった(Figure 6)。

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

RLX 0.1 および 1 では対照群とほぼ同様約 4 ヶ月齢以降持続発情を主とする性周期異常が増加した一方、RLX10 では持続発情を主とする性周期異常の発現が早期化し、12 週齢では対照群に比し有意であった(Figure 7)。TMX 群ではその傾向はさらに顕著で、性周期観察

開始直後の 7 週齢で全個体が持続発情を示し正常性周期は観察期間を通じて認められなかった。TMX の卵巣では黄体は殆ど観察されなかった。

新生児期曝露ラットにおける AVPV を含む視床下部前部および ARC を含む後部におけるキスペプチン関連遺伝子(Kiss1、Kiss1R、GnRH mRNA)、ISH による Kiss1 陽性細胞数測定した結果、視床下部前部の Kiss1 が TMX と RLX10 のみで低下し TMX では有意であった。視床下部後部では TMX のみ明らかに低下していた。そのほかの遺伝子の変動は観察されなかった(Figure 8)。ISH 染色でも AVPV の Kiss1 陽性細胞数が RLX10 および TMX10 で有意に低下していた(Figure 9)。ARC では TMX 投与のみで有意に低下した。LH サージ時の LH 値についても RLX10 および TMX のみで有意に低下、FSH は TMX 群のみで低下した(Figure 10)。TMX におけるこれらの低下はいずれも顕著であった。

RLX および TMX の子宮および視床下部に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用については、RLX 群には子宮に対するエストロゲン作用はなく、TMX10 のエストロゲン作用は非常に弱かった。RLX 全群および TMX とともに子宮に対する強い抗エストロゲン作用が認められた(Figure 11)。またこれらの投与量の RLX および TMX は、人工的 LH サージ誘発するために投与する EE で観察されるような視床下部前部および後部の Kiss1 mRNA を増加させなかった(Figure 11)。

3. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索

性周期観察(Figure 12)では、PND0 の EE 曝露群では 17 週齢以降対照群に比し有意な早期異常性周期が認められ、この結果は今までの同系統ラットの成績と同様であった。PND5 および PND10 の EE 曝露群では PND0 より遅れ、19 週齢から 20 週齢でほぼ同時に有意な早期異常性周期を示した。PND14 の EE 曝露群では 25 週齢から 34 週齢まで対照群より異常性周期を示す動物が多い傾向が観察されたが、有意差はなく、実験を終了した 40 週齢における異常性周期発現率は対照群と同様であった。

性周期異常発現前の Young adult10 週齢で実

施した人工的 LH サージ誘発および視床下部 Kiss1 遺伝子解析結果では、16:00 の LH レベルは PND0、5、10 いずれにおいても有意に低下していたが PND14 群では変化は認められなかった(Figure 13)。AVPV を含む前部の Kiss1 mRNA も LH サージと同様 PND0、5、10 の EE 曝露群で発現が低下しており、PND0 から PND10 にかけてその低下は緩やかとなり、PND14 では変化は認められなかった(Figure 14)。ISH 法による解析でも RTPCR の結果と同様、Kiss1 mRNA を示す細胞数の用量依存性の低下が認められた ARC の変化あるいはその他の遺伝子変化は認められなかった。

4. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP 構築と既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への提言

エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響に関する文献および本研究結果を基に、AOP の各構成となる候補を以下に列記した。

1. 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

- 1) 性周期を司る視床下部のサージ中枢 AVPV におけるキスペプチン陽性細胞数低下
- 2) 卵胞発育を司る視床下部パルス中枢 ARC におけるキスペプチン陽性細胞数低下

2. 遅発影響において必須の変化(Key Event, KE)の候補

- 1) 成熟後の LH サージ時における LH レベルの低下
- 2) 成熟後の LH サージ時における FSH レベルの低下

3. 遅発影響 Adverse outcome (AO)の候補

- 1) 性周期の早期異常(主として持続発情の持続)の発現。ただし成熟後初期に性周期異常のものは脱雌化であるので除外した。

既存の毒性試験 TG への提言については考察にまとめて記載した。

D. 考察

1. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響が LH サージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす発現機序

血中 LH サージの結果より、遅発影響発現量新生児期曝露雌ラットでは、性周期異常に先駆けて、遅発生殖器量量では性周期を制御す

る LH サージの低下が認められた。視床下部 AVPV および ARC における Kiss1 遺伝子発現および関連遺伝子発現の部位特異性の解析結果より、遅発影響発現量新生児期曝露雌ラットでは、性周期異常に先駆けて AVPV における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、ARC では Kiss1 発現の変化は認められなかった。ISH 解析の結果より、RT-PCR では脳に捉えられなかったが、遅発影響発現量曝露群ではキスペプチンニューロンにおける ER α 発現率が低下しており、AVPV では Kiss1 mRNA だけでなく、ER α の発現にも変化があることが示された。RT-PCR 結果との差については、脳内には多くの ER α が存在するため、AVPV における変化を見いだせなかったと推察される。これらの結果から得られた遅発影響のメカニズム予想図を Figure 15 示す。

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

SERM 新生児期ばく露により生じた遅発影響は、TMX および RLX が新生児期の視床下部の ER あるいはその下流に対してエストロゲンと同様の作用により遅発影響を誘発している可能性が高いと考えられた。

しかし成熟後ではこれらの物質の視床下部に対してエストロゲン様作用を示さないことから新生児と成熟後は視床下部の ER あるいはその下流における感受性は異なっていることが示唆された。

また今回の研究結果で遅発影響は、子宮肥大試験で陽性となる物質だけでなく、抗エストロゲン物質でも誘発されたこと、新生児期と成熟後で、あるいは組織間で ER 感受性が異なっていたことから、遅発影響誘発物質の確定に子宮肥大試験が必ずしも高感受性でない可能性が導き出された。しかし、まず成熟動物を用いた子宮肥大試験の応用は、ER に結合する物質のスクリーニング法として有用であると考えられる。

3. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索の解析

PND0、5、10 の EE 曝露群では PND0 より性周期異常発現時期が遅れて認められた。また性周期異常発現前の Young adult 時期にすでに LH サージ低下、AVPV の Kiss1 mRNA 発現、陽性細胞数の低下も認められたが、曝露時期

が遅くなるにつれ、低下は緩やかとなる用量依存性の変化を示した。今回の実験の結果より遅発影響の曝露時期の閾値は生後 10 日までは明らかに続いているが、徐々に感受性が弱くなっていくと考えられた。生後 14 日曝露では明らかな影響は今回の指標からは認められなかったが性周期異常の早期化傾向も示唆され、上述のように臨界期が徐々に減衰すると考えられることから、遅発影響の臨界時期は 14 日に近いところまで存在する可能性もある。

4. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP 構築と TG 改善への提言

視床下部前方に位置する AVPV における Kiss1 陽性細胞(キスペプチンニューロンと考えられる)は血中のエストロゲン濃度変化を、エストロゲン受容体を介して感知し、LH サージを制御しているニューロンである。

本研究結果では、エストロゲンだけでなく SERM や抗エストロゲン作用物質等 ER に結合する物質の新生児期曝露が遅発影響を誘発していることから、MIE を誘発する化学物質を ER に結合するエストロゲン/抗エストロゲン作用物質とすることが適切であると考えた。

MIE としては性周期中枢である視床下部 AVPV におけるキスペプチンニューロンのキスペプチンの低下とした。候補に挙げた変化のうち、視床下部 ARC は成熟後では遅発影響量では影響が観察されないことから KE から外した。しかし新生児期の投与直後の AVPV は未発達であり、EE 曝露直後に ARC のキスペプチン低下が認められたことから、さらなる研究が必要な点であると考えられた。

KE として、性周期が正常時にすでに発現する LH サージ時の LH 低下は、異常性周期の発現に先駆けて生ずる事象であることから遅発影響の KE として挙げた。

FSH の低下を伴う LH の顕著な低下はすでに性周期が回帰していない状態を示すことから遅発影響の KE として適切ではないと考えられた。

性周期異常の発現時期の早期化は正常動物でも加齢に伴い生ずる加齢性の変化である。しかしこの異常が早期に発現することは個体の繁殖性を短縮すること、また後述するように子宮癌のリスクを上昇させることから、性

周期異常の発現時期早期化は動物だけでなく哺乳類にとって悪影響であると考えられる。また本研究では、種々の系統ラットの新生児期 EE 曝露で認められていることから遅発影響を示す最も確実に感受性の高い KE であると考えられた(Takahashi et al., 2013; Shirota et al., 2013; Usuda et al., 2013)。またこの性周期異常の発現時期の早期化は、新生児期 EE 曝露量との明確な用量相関性があり、生殖寿命の短縮に直結することから、遅発影響の AO として挙げるのが適切と考えられた。

性周期異常の発現時期の早期化に伴い生ずる間接的な影響として、早期に排卵が停止するためエストロゲンに対しプロゲステロンがより低下するという相対的高エストロゲン状態をもたらした結果、子宮がんの増加は生体にとって有害な遅発影響であるが、比較的高用量で生ずることから遅発影響の AO としては必須の項目ではないと考えられた。

遅発影響の AOP に至る流れ図として、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) が考えられた。研究成果を盛り込んだ概念図を **Figure 16** に示した。

既存の毒性試験 TG への提言

本研究の結果、遅発影響検出のために既存の繁殖毒性試験 TG に対する以下のような改善を提言する。

3つの繁殖毒性試験 TG 内容を比較した結果、最も汎用されている二世繁殖毒性試験(TG416)を用い、**F0 世代に性周期を長期観察用の衛星群を設置することを提言**する。遅発影響検出群の F0 世代へは離乳後は被験物質を投与せず、対照群と同様の基礎飼料で飼育する。母動物への投与が強制経口であれば次世代への曝露は経胎盤あるいは授乳を介することが明瞭である。混餌飼料の場合は、児動物が自ら餌を摂取する 10 日齢でも遅発影響が検出されていることから、混餌投与で遅発影響が検出された場合は、経胎盤・経授乳に加え直接ばく露の可能性を考えるべきである。

1 群あたりの匹数として、対照群であつても性周期異常が加齢とともに発現するので統

計学的有意差を出すためには一定の動物数が必要なことを鑑み、最低限1群20例以上を推奨したい。また一世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型1世代繁殖毒性試験(TG433)についても、2世代繁殖毒性試験と同様、F0世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能であると提言する。

遅発影響検出用の衛星群での検査項目とエンドポイントについては、遅発影響指標として最も感受性が高く確実なエンドポイントは性周期異常の発現時期早期化である。持続的な性周期観察を必須の検査項目とし、同項目を性周期異常の発現時期早期化エンドポイントとすることを提言する。性周期観察は一般的に周知されている検査であり性周期異常の検出も簡便であり、且つ確実に性周期異常を検出できることから最適な指標である。

衛星群の観察期間については、エストロゲン作用が弱い物質の場合は性周期異常の発現時期早期化の時期が遅れ、5~6ヶ月齢でようやく対照群と有意差が認められることから(Takahashi et al., 2013)、観察期間は生後6ヶ月までが必要であると考えられた。生後6ヶ月齢までの性周期観察によって性周期異常の早期発現等の変化が認められない場合は「遅発影響なし」と判断する。

遅発影響発現の引き金は発達期から生じている視床下部前方 AVPV キスペプチンの低下あるいは LH サージ低下であり、これらも遅発影響のエンドポイントとなりうる。これらの検索は科学的に遅発影響を証明するために有用である。しかし高度で手技および専門的知識が必要なことからメカニズム試験の実施が必要な場合にこれらを行うことを推奨する。

遅発影響を確認すべき対象物質としては、その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、エストロゲン受容体(ER)との結合する物質、すなわちエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質が対象である。子宮肥大試験等を利用して生体に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用を確認することは有用と考える。

用量についてはエストロゲン作用を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

望ましいと提言する。

衛星群のその他の検査項目は、主群での一般的な検査に準じて試験計画者が考えるべきである。ただし性周期には体重の顕著な低下が影響するので経時的な体重および摂餌量の測定は必要な項目であると考えられる。

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。本提言は **Table 1** として本報告書末に記載した。今後の化学物質リスク評価に本研究結果が活用されることを強く期待する。

E. 結論

エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露による遅発影響の発現機序には性周期中枢である視床下部前方 AVPV のキスペプチン低下が初期の引き金である。引き続いて性成熟後 LH サージが低下し、この性腺軸の持続的変調が遅発影響の長期エンドポイントの性周期異常の発現早期化として顕在化することが明らかとなった。この遅発影響の発生の臨界期は生後10日であった。この影響は曝露時期が遅くなるほど遅発影響の発現は遷延した。研究結果をもとに遅発影響の AOP を構築した。また、遅発影響検出のための既存毒性試験 TG への改善案についても提言した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- ① Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of pyperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(6):891-902.
- 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 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.
- ④ 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

- ⑤ 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- Ethynylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.
- ⑥ 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.
- ⑦ Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.* **60**, 33-38, 2016.

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 -ethynylestradiol (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 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)
- ③ 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)
- ④ 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)
- ⑤ 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：Ethynylestradiol 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)
- ⑥ 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 rats. (54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3)

- ⑦ 吉田緑 INHAND フォローアップ:生殖器雌性生殖器に関する INAHD トピックスと問題点について (第 30 回日本毒性病理学会学術集会 (2014 年 1 月 30~31 日 徳島)

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

Materials & methods

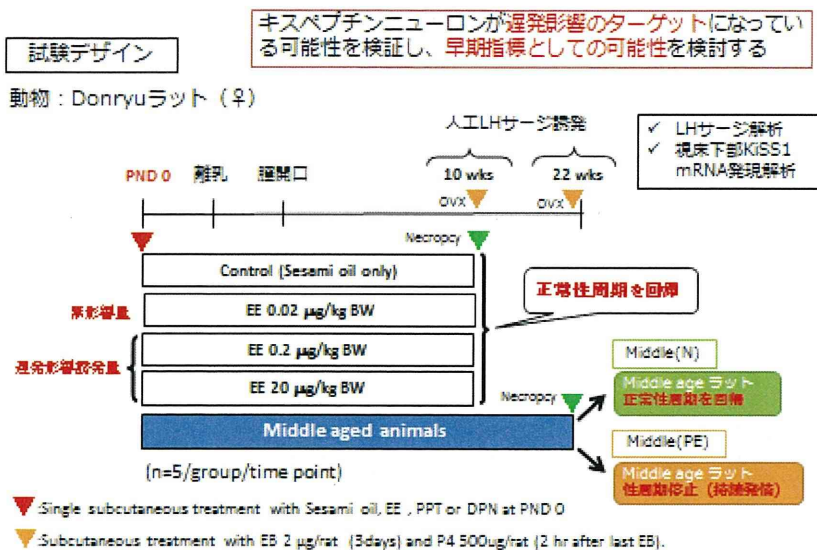


Figure 1 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がLHサージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす影響の解析の実験デザイン

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

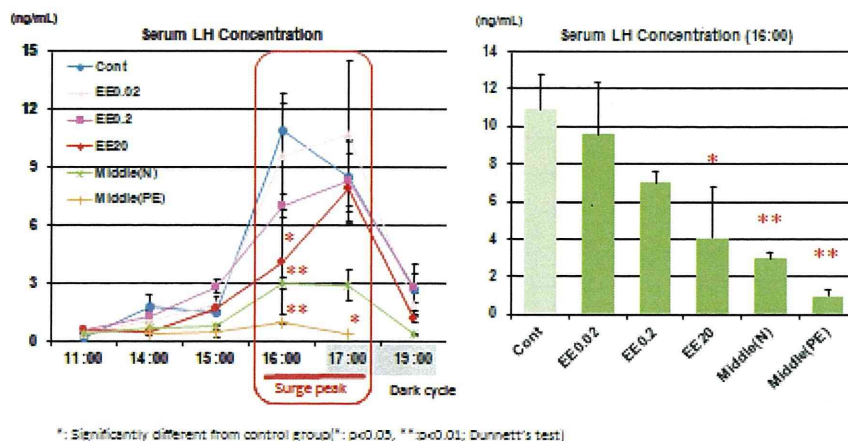


Figure 2 LHサージ時前後の血中LH濃度(左)と、LHサージ時(1600)における各群のLHレベル(右)。EE0.2、EE20群では用量依存的なLHサージ低下が認められ、性周期を回帰するMiddle age 群(MiddleN)では低いもののLHサージがあり、回帰しないMiddle age (Middle PE)群ではサージは認められなかった。

Results(KiSS1 mRNA発現/AVPV)

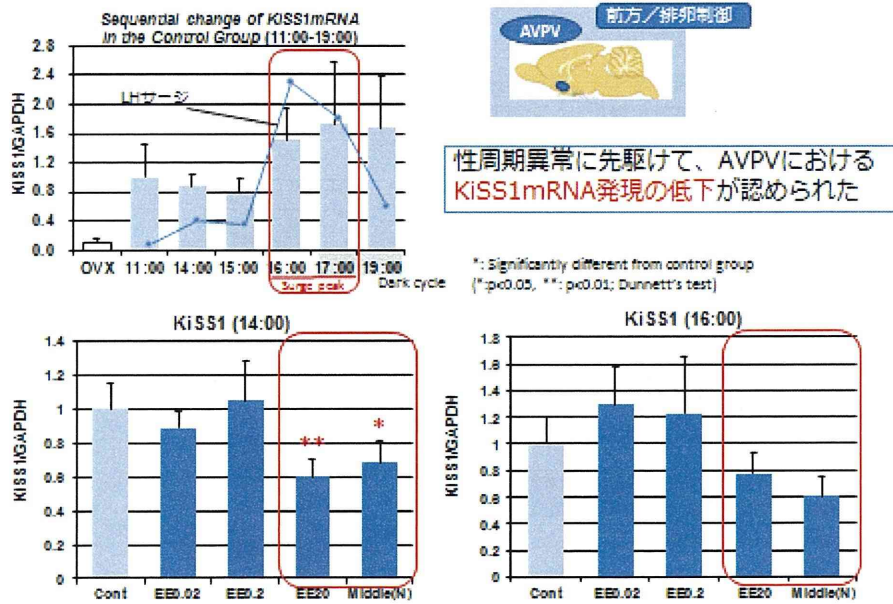


Figure 3 視床下部後方(AVPVを含む)におけるKiss1遺伝子発現(RTPCR)。EE20およびMiddle N群で14:00よりKiss1レベルで明らかに低下した。

Results(KiSS1 mRNA発現/ARC)

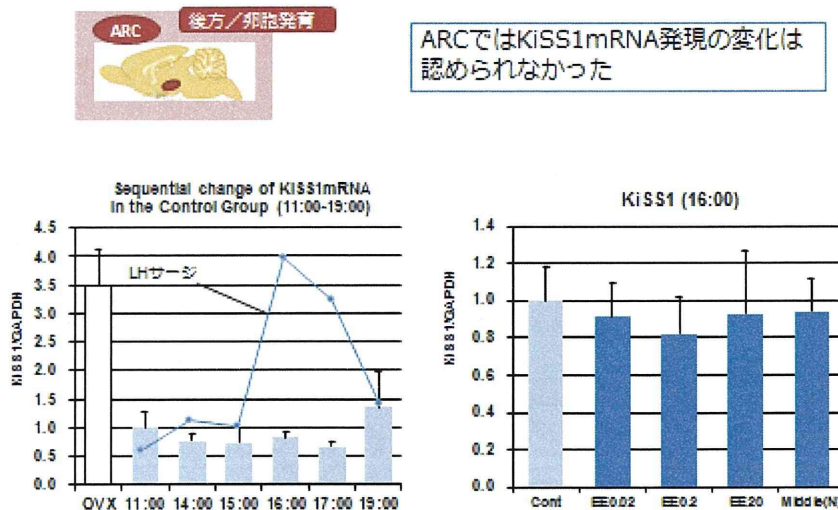


Figure 4 視床下部後方(ARCを含む)におけるKiss1遺伝子発現。ARCではいずれの時期においてもKiss1遺伝子の変化は認められなかった。

Results(KiSS1 in situ hybridization/AVPV)

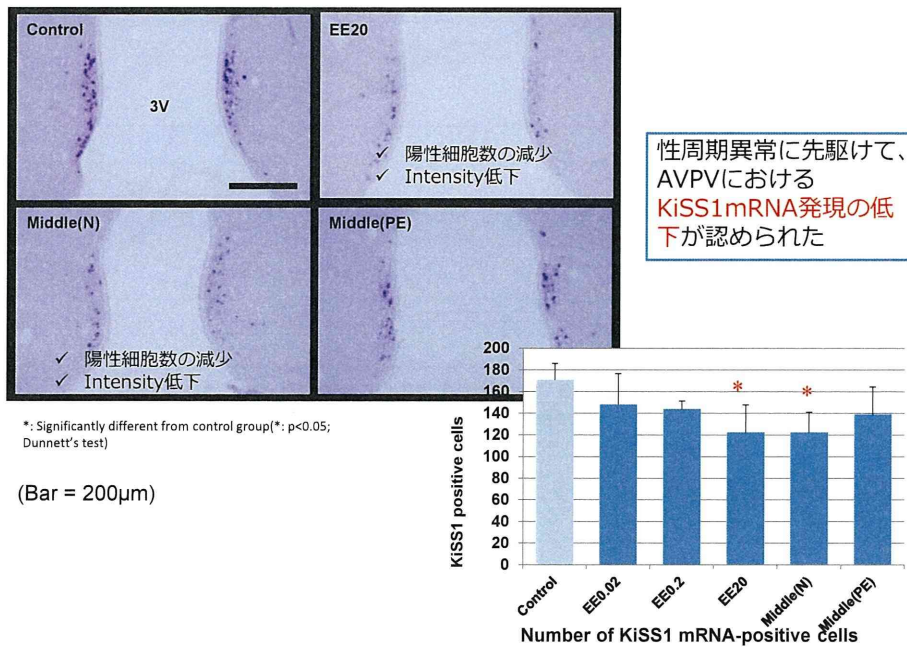


Figure 5 視床下部AVPVにおけるKiss1陽性細胞数の変化

Results(KiSS1/ERα二重染色)

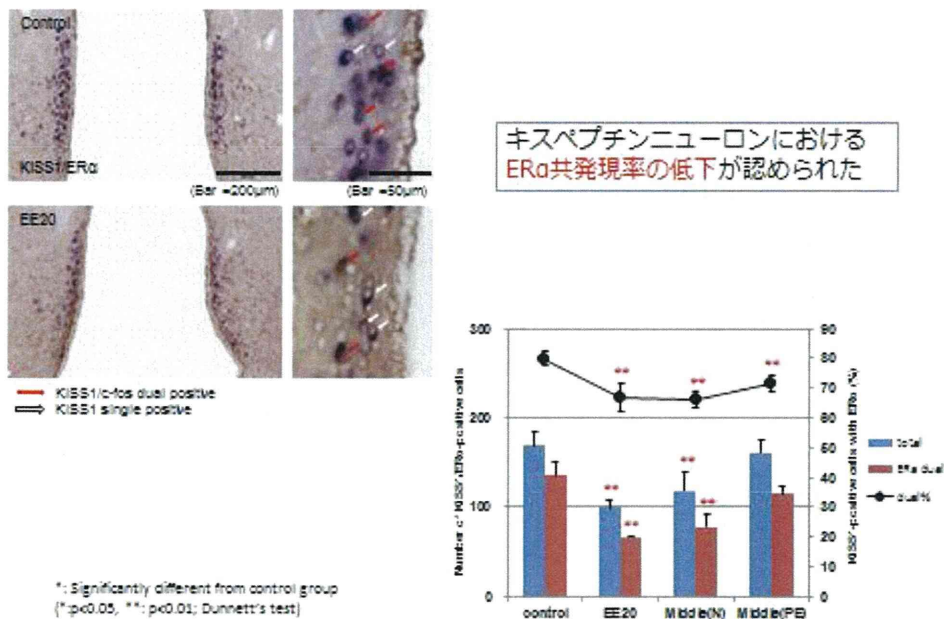


Figure 6 視床下部 AVPV における Kiss1 陽性細胞数と ERα の共発現率

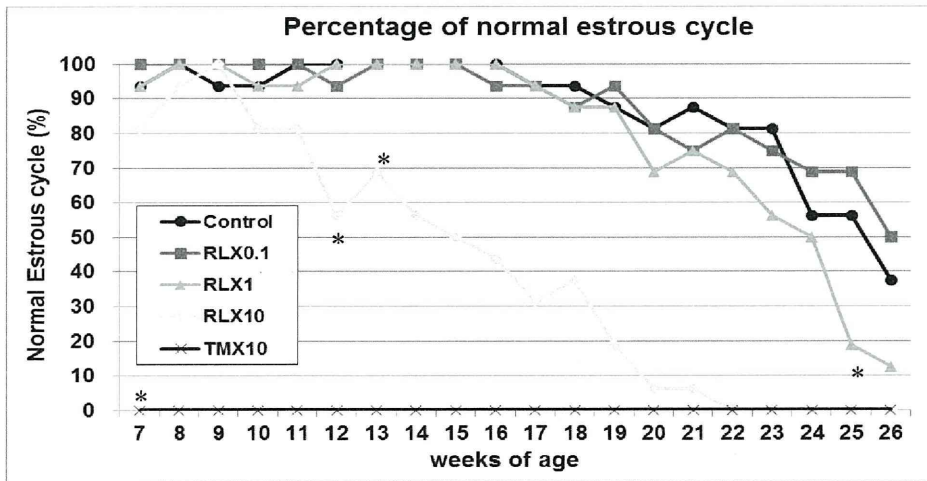


Figure 7 SERMを新生児曝露したラットの正常性周期を示す個体の割合の推移

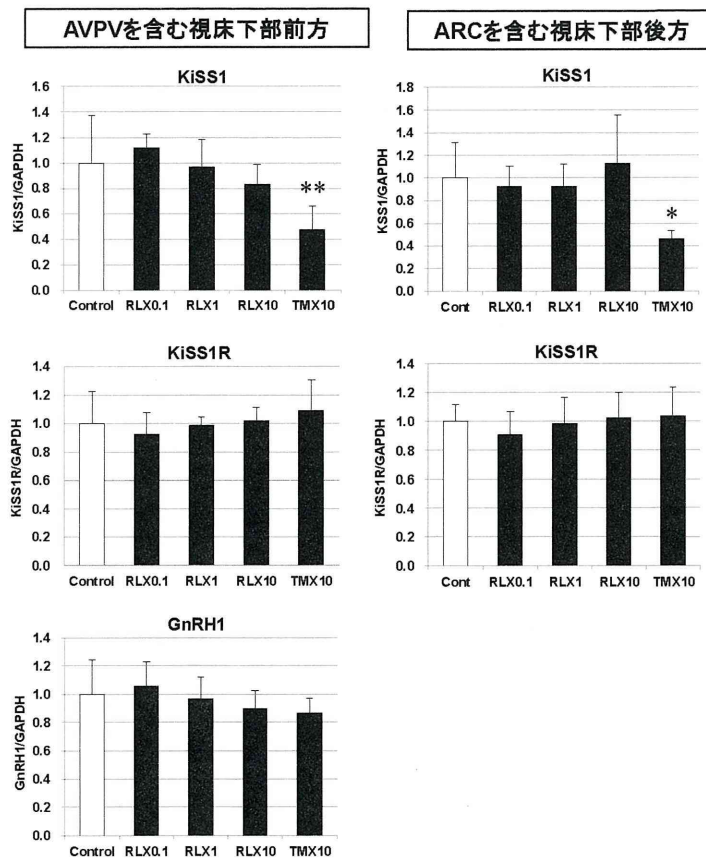


Figure 8 SERM新生児曝露ラットのAVPVを含む視床下部前方およびARCを含む視床下部後方におけるKiss1, Kiss1RおよびGnRH (AVPVのみ)mRNAの発現

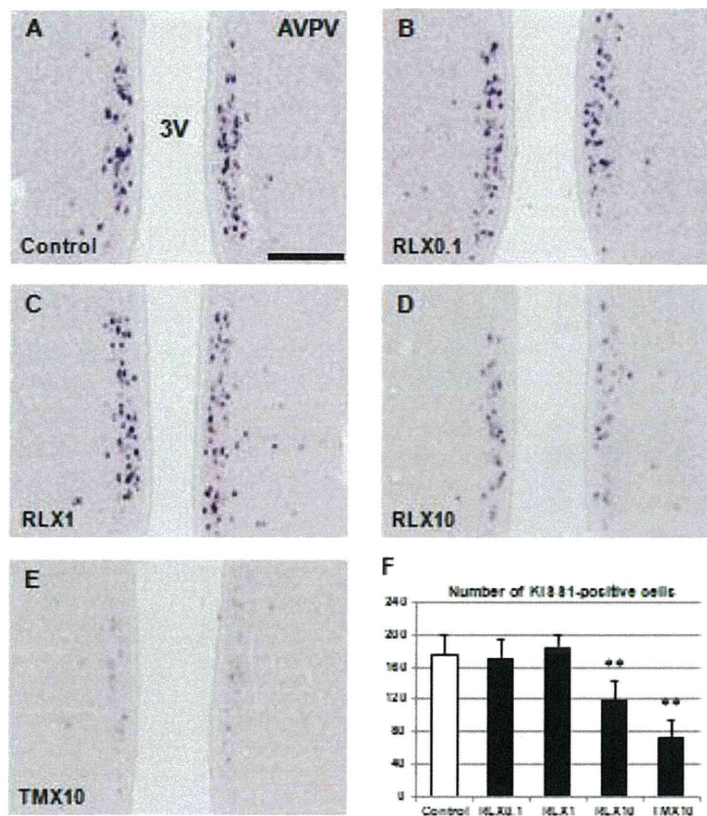


Figure 9 AVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較

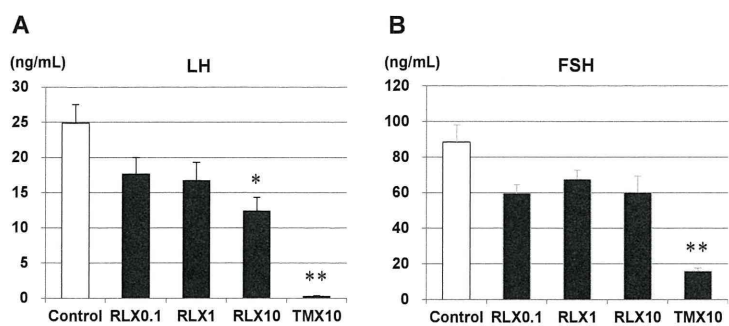


Figure 10 誘発LHサージ時の血中LHおよびFSH値

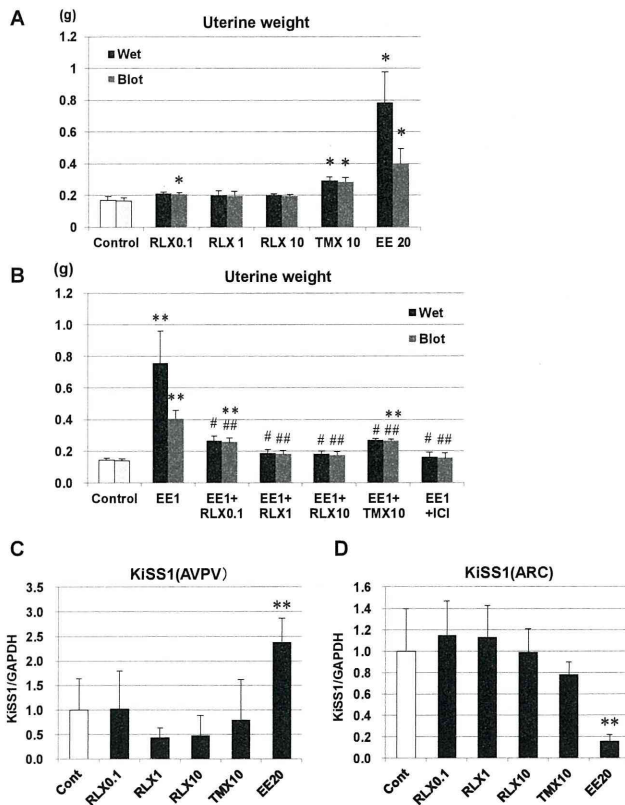


Figure 11 成熟ラットの子宮に対するTMXとRLXのエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部に対するエストロゲン作用

Results (性周期)

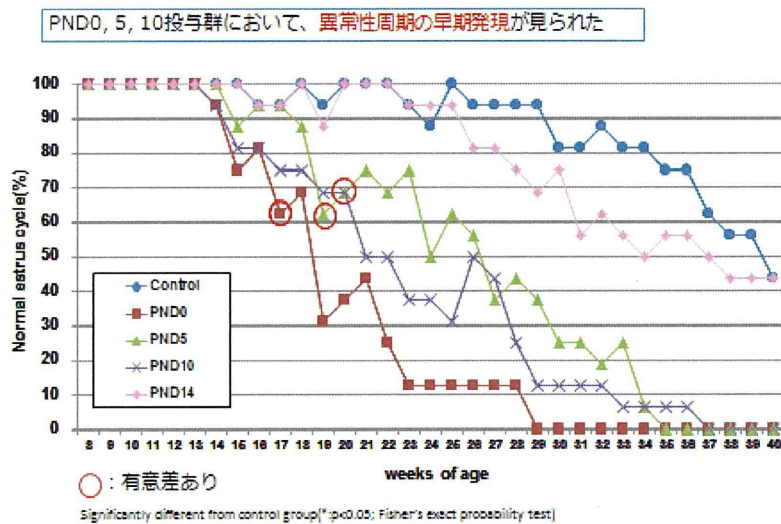


Figure 12 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索における性周期観察

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サージの低下が見られた

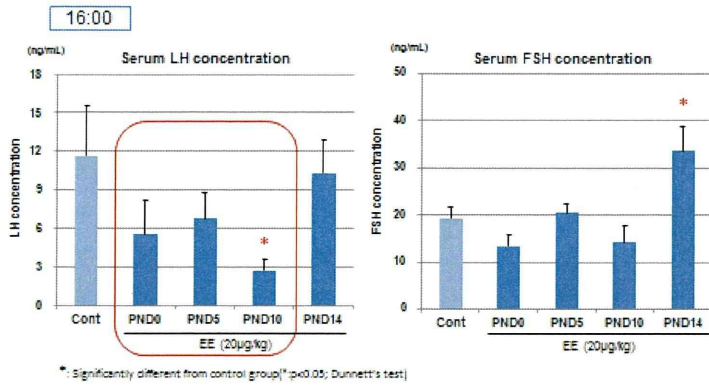


Figure 13 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるLHサージ

Results (KiSS1 mRNA発現/AVPV, ARC)

PND0, 5, 10投与群において、AVPVにおけるKiSS1mRNA発現の低下が見られた

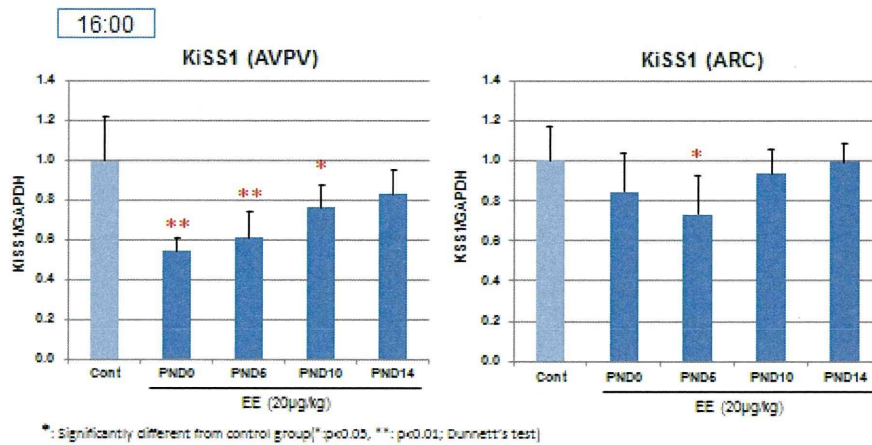


Figure 14 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるAVPVのKiSS1mRNA発現

Discussion (想定される遅発影響の発現のメカニズム)

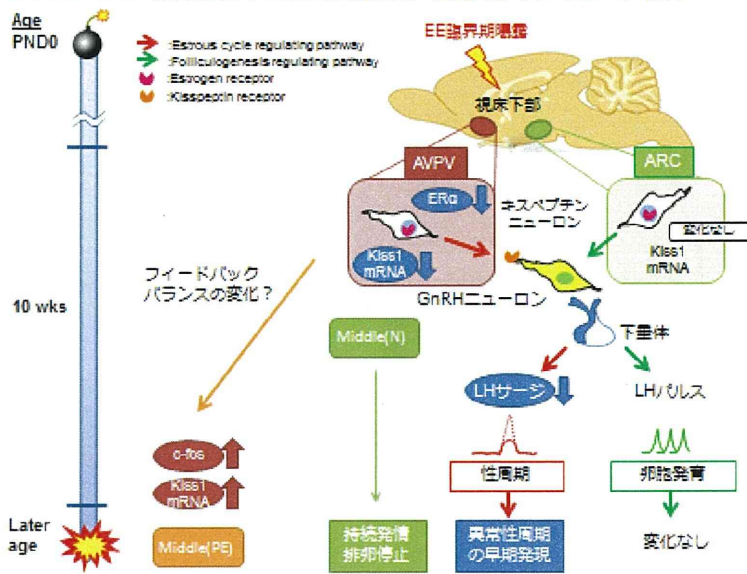


Figure 15 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がメカニズム予想図

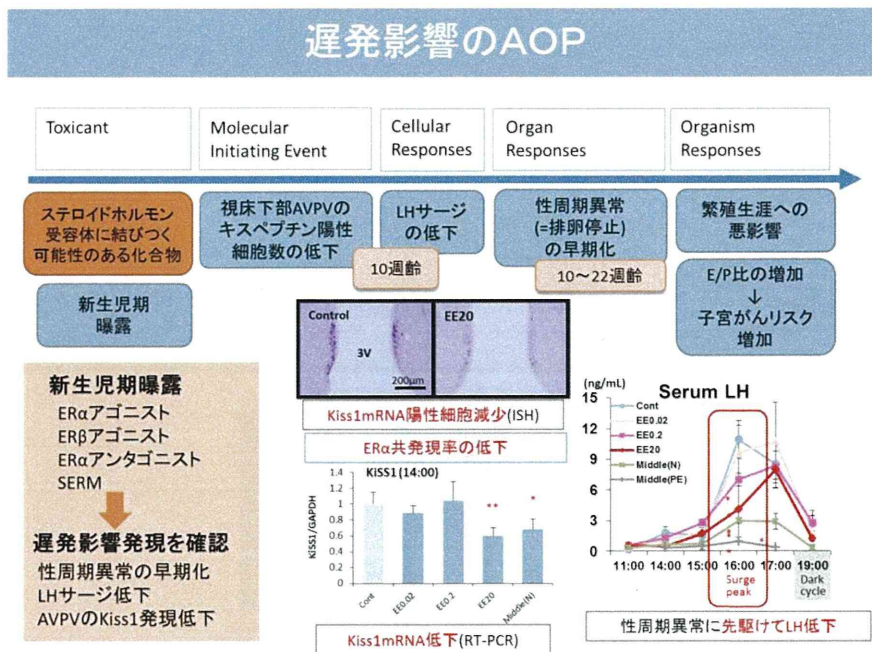


Figure 16. 遅発影響のAOP

遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

(新生児期/臨界期曝露に限定した遅発影響を指す。以下同様)

1. 遅発影響の定義

遅発影響とは化学物質の新生児期/周産期曝露により、性成熟後に顕在化する悪影響

2. 遅発影響の発現機序

エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露が性周期中枢である視床下部前方AVPVのキスペプチン低下を引き起こし、その低下が成熟後のLHサージを低下させる。この性腺軸の変調持続が性周期異常の発現時期の早期化顕在化することが機序と考えられる。

3. 使用可能な既存の毒性試験ガイドラインと改善点

二世代繁殖毒性試験(TG416)のF0世代に、性周期を長期観察用の衛星群を設置することを提言する。
一世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型1世代繁殖毒性試験(TG433)についても、F0世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能

4. 衛星群の検査項目とそのエンドポイント

1) 衛星群の動物数 1群20例以上。ただし衛星群への被験物質の直接投与実施しない。混餌投与の場合は離乳後は実施しない
2) 検査項目とエンドポイント 継続的な性周期観察を必須検査項目とする。性周期観察により対照群と比較し性周期異常の発現時期早期化を遅発影響発現のエンドポイントとする。

3) 観察期間

生後6ヶ月

4) 母動物への投与量

用量については母動物にエストロゲン作用を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。

5. 遅発影響検出対象化学物質

遅発影響を確認すべき物質としては、その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、エストロゲン受容体(ER)との結合する物質、すなわちエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質が対象である。その物質の作用機序あるいは既知の毒性プロファイルより、エストロゲン受容体(ER)との結合する物質、すなわちエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質が対象である。子宮肥大試験等を利用して生体に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用を確認することは有用と考える。

6. 機序試験における検査項目とエンドポイント

遅発影響発現の引き金は発達期から生じている視床下部前方AVPVキスペプチンの低下あるいはLHサージ低下であり、これらも遅発影響のエンドポイントとなりうる。これらの検索は科学的に遅発影響を証明するために有用である。しかし高度で手技および専門的知識が必要なことからメカニズム試験の実施が必要な場合にこれらを行うことを推奨する。

Table 1 遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言