

.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ベプチンニューロンの部位特異的な変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 眞理子 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	鈴木 美帆	麻布大学獣医学部
森川 朋美	国立医薬品食品衛生研究所病理部	長谷川 雄太	麻布大学獣医学部
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所病理部	田中 啓陽	麻布大学獣医学部
束村 博子	名古屋大学農学部	古澤 理沙	麻布大学獣医学部
上野山 賀久	名古屋大学農学部	吉河 佑莉	麻布大学獣医学部
代田 欣二	麻布大学獣医学部	臼田 賢人	東京農工大学農学部
上家 潤一	麻布大学獣医学部	張 浩林	東京農工大学農学部
川島 潤	麻布大学獣医学部	服部 達哉	明治大学研究・知財戦略機構
田中 恵	麻布大学獣医学部	堀井 康行	明治大学農学部
森 雅史	麻布大学獣医学部	中村 孝博	明治大学農学部
高川 奈帆	麻布大学獣医学部	溝口 康	明治大学農学部
高山 尚大	麻布大学獣医学部	小峰 千亜希	明治大学農学部
林 美貴成	麻布大学獣医学部	志賀 健臣	明治大学農学部

研究要旨

本研究期間にエストロゲン類の新生児期曝露により誘発される生殖内分泌機能の遅発影響の発現機序には視床下部キスベプチンニューロンの部位特異的な変化が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。また遅発影響の発現には投与用量と投与時期ともに閾値が存在していることが明らかとなった。研究成果の主な内容を以下に記載する。

1. エストロゲンおよび抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露ラットでは、発達期から持続する性周期中枢である視床下部前方 AVPV のみでキスベプチン低下、性周期を回帰する Young adult 時期の LH サージ時の LH 低下が認められ、その後性周期異常の発現時期早期化が観察された。すなわち遅発影響の発現機序は、曝露後速やかに生ずる **性周期中枢である視床下部前方 AVPV のキスベプチン低下が重要な引き金**であり、この低下が性成熟後 LH サージ低下という性腺軸の持続的変動を誘導した結果、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。
2. **卵胞発育中枢である視床下部後方 ARC のキスベプチンの役割は AVPV とは異なり持続的な低下は認められなかった**。さらなる検討が必要であるが、AVPV が未発達時期の曝露直後に視床下部キスベプチン低下や卵巣の卵胞発育関連遺伝子の変化が観察されたことから、ARC が曝露直後に視床下部・下垂体・性腺軸の正常を曝露直後に妨げていることが遅発影響に関連している

可能性も示唆された。

3. 遅発影響の無影響量は経口投与で 0.016 μ g/kg/day x 5days であった。先行研究成果での単回皮下投与 0.02 μ g/kg/day とほぼ同様である。また投与時期による遅発影響の閾値は約 10 日齢であった。したがって先行研究と併せ、**遅発影響の投与量と投与時期には閾値が存在する**ことが明らかとなった。

4. エストロゲン類の新生児期曝露の遅発影響は内側視索前野(POA)の Calbindin D-28k (CB)陽性細胞の雌雄差や行動神経内分泌系などその他の中枢系へも及んでいると考えられた。また卵巣へは投与直後からの直接影響も考えられた。

5. 遅発影響の発現機序を示す adverse outcome pathway (AOP)を構築した。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は、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

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露により性周期異常の早期化、生殖機能障害や子宮癌リスク増加等、成熟後に不可逆性の悪影響が顕在化する遅発影響が知られている。しかし発現機序が不明で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、分担研究者らは平成 22 年から 24 年に「**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)を行い、エストロゲン類新生児期曝露により用量依存性の遅発影響が存在し、一般的な毒性試験の指標では捉えにくいこと、**性周期異常(持続発情)の発現時期早期化が最も鋭敏な長期指標**であることを明らかにした(図 1)。感受性の高いエストロゲン検出系とされている子宮肥大作用量とほぼ同用量の比較的低いエストロゲン量の投与でも遅発影響を引き起こされることもこの研究によって明らかとなった。しかし遅発影響の時系列的な発生机序の解析やその初期変化の同定に至らず、生殖行動学的影響や遅発影響の閾値の検討にも不明な点が残った。

近年の神経内分泌研究のトピックスとしてキスペプチンニューロンの発見が挙げられる。哺乳類全般に存在する同ニューロンにはエストロゲン受容体(ER)があり、視床下部前方の

性周期中枢 anteroventral periventricular nucleus (AVPV) および後方の卵胞発育中枢 arcuate nucleus (ARC) において中心的役割を果たしていることが明らかとなった(図 2)。大量の臨界期エストロゲン曝露で同ニューロンの低下が報告されているが、遅発影響との関連性は報告されていない。

本研究は過去 3 年間の遅発影響研究を踏まえ、生殖内分泌機能とくに視床下部前方の性周期中枢 AVPV と後方の卵胞発育中枢 ARC のキスペプチンニューロンが遅発影響により部位特異的な変化を示すのか、またその変化が時系列的にどのように遅発影響へと結びつくのか明らかにすることを主目的とした。その他の目的として、AVPV、ARC 以外の中枢系や卵巣等への直接影響、遅発影響の閾値の存在についても研究を行った。本研究では遅発影響誘発物質がエストロゲン作用物質のみか ER を介するその他の化合物でも起きるのか検討した。

化学物質のリスク評価行政に資するため、研究成果を総合解析して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)にどのような検査項目やエンドポイントを追加すれば遅発影響が検出可能となるのか提案することも目的とした。

B. 研究方法

研究結果を横断的に解析できるよう、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

先行研究と同様に 17 α -ethynylestradiol (EE)

を共通の遅発影響誘発物質とした。

- **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促進のため、遅発影響発現量の EE 20 µg/kg (短期では 200 µg/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の同等性も確認されたことが、強制経口投与も同様に扱った。

- **EE 以外の遅発影響検討物質とその目的**

エストロゲン作用物質以外にも ER を介する化学物質は多く存在することからこれらの物質についても遅発影響発現の有無とその機序解析を進めた。検索した化合物は、ER α アнтаゴニスト ICI 182,780(ICI)、ER α アゴニスト PPT、ER β アゴニスト DPN、Selective estrogen receptor modulator (SERM) タモキシフェン(TMx)、SERM ラロキシフェン(RLX)、難燃剤 triphenyl phosphate (TPhP) である(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。

1. 実験と方法

実験計画を以下に示す([] 主な担当者)

1. EE あるいはエストロゲン受容体(ER)を介した遅発影響発現機序に関する検討

1) 遅発影響発現機序に視床下部キスペプチンの部位特異的变化が果たす役割 - 特に視床下部前方の性周期中枢との関連性について - [高橋]

(1) 新生児期に遅発影響量を含む EE を生後 24 時間以内の雌 Donryu ラットに単回皮下投与し、遅発影響の長期指標である性周期異常の発現時期を長期に観察し、また曝露後、性周期が正常に回帰する Young adult 時期に人工的な LH サージを誘発し、サージ時の血中 LH レベルの測定、AVPV を含む視床下部前方と ARC を含む後方の Kiss1 mRNA やエストロゲン(ER) α 受容体等 Kiss 1 関連遺伝子を検索し

た。さらに In situ hybridization 法(ISH)により AVPV/ARC の Kiss 1 陽性細胞数を免疫組織化学染色(IHC)により ER 陽性細胞数を測定した。また加齢性変化と比較するために性周期を回帰する Middle age(Middle N)と性周期の停止した Middle age (Middle PE)と同様の比較を行った。

(2) 遅発影響が ER を介したその他の物質で誘発される可能性を検索するため、selective estrogen receptor modulator (SERM)の新生児期曝露が遅発影響を誘発するか検索した。Tamoxifen(TMx) 10mg/kg bw、Raloxifene (RLX)0.1, 1 あるいは 10 mg/kg bw を生後 24 時間以内(PND0)の Crj: Donryu 新生児雌ラットに単回皮下投与し、(1) と同様の検査項目について検討した。

(3) 遅発影響の感受性時期の閾値について、遅発影響量の EE 20µg/gk を生後 0 日齢、5 日齢、10 日齢、14 日齢に単回皮下投与し、Young adult における AVPV および ARC のキスペプチンの変化と性周期の長期観察により比較した。

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) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響の検討として、生後 0 日の雌性 Donryu ラットにエストロゲンアンタゴニスト ICI 0、500、5,000 µg/kg、ER α アゴニスト PPT、ER β アゴニスト DPN をそれぞれ 1 回皮下投与し、生後 23 週まで性周期の観察を行った。

(2) 遅発影響の初期変化検索として遅発影響量を含む EE を新生児期に単回皮下投与し 14 および 21 日齢の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) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化の検討として、生後 0 日の雌性 Donryu ラットに PPT、DPN および ICI を 1 回皮下投与し、(2)と同様の検索を行った。

(4) 遅発影響と子宮肥大試験の関連について検討として、卵巣摘出雌 Donryu ラットを用いて、PPT、DPN の子宮肥大試験を実施した。

3) キスペプチンパルス制御部位と遅発影響

の関係および遅発影響と閾値の関連性に関する研究 [代田]

合成エストロゲン EE をモデル化合物として SD ラットに新生児期曝露した。脳の性分化臨界期におけるエストロゲン活性物質曝露により生じる遅発影響について閾値となる用量を 27~28 週齢まで探索し、さらに遅発影響の最小影響量等の閾値検出における評価手法の有効性を検討した。また最小影響量を投与した SD 雌ラットを 10 週齢で雄と交配して帝王切開し、胎児への影響について検索した。

遅発影響と視床下部の部位特異性に関する研究として、視床下部におけるキスペプチン (KP) パルス発生部位である弓状核 (ARC) を中心に、KP をコードする Kiss1 発現と遅発影響との関係を、EE 新生児期曝露した SD 系ラットを用いて投与直後の新生児期から生後 10 および 23 日齢まで視床下部、卵巣、関連のホルモンや遺伝子など関連する項目について多岐にわたり検索した。

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]

平成 25 年から 27 年の 3 年間において遅発影響の発現機序検索、特に遅発影響をもたらす視床下部の制御部位と卵細胞制御遺伝子発現に対する影響について解析した。出生後 24 時間以内の雌 Wistar-Imamichi ラットに EE を単回皮下投与するモデルを使用した。

(1) 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と、脳における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

(2) 新生子期 EE 曝露の卵巣にお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。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。卵巣におけるアポトーシスを TUNEL 染色で比較した。また卵巣の卵胞数を解析した。EE の卵巣に対する直接作用を確認するため、生後 0 日の Wistar-Imamichi ラットから卵巣を採取して培養し、アポトーシス関連因子の遺伝子発現を解析した。さらに、Hrk をノックダウンした卵巣に EE を添加し TUNEL 染色をして鏡検した。

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]

エストロゲン様化学物質の発育期曝露が脳に及ぼす遅発型影響のそのリスクについて客観的評価基準の確立を目標に、出生 24 時間以内のマウスへの EE 投与モデルを用いて、その発育や性成熟後の脳の性差、さらには、行動学的パラメーターに及ぼす影響の評価を行った。生後 24 時間以内の雌雄マウ (C57BL/6J) に 0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ および 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の EE、対象群として EE の溶媒であるゴマ油を投与し、体重測定、膣開口、性周期の観察に加えて、超音波の記録解析装置による USV の記録解析も行った。解析を終了した個体は、(1) 免疫組織化学解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本を準備した。内側視床前野 (POA) を含む脳切片標本 (厚さ 40 μm の連続した冠状断切片) に対して Neu-N、Calbindin D-28k (以下 CB)、GABA-B 受容体への一次抗体を用いた免疫組織化学を施して 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た。また、(2) RT-PCR によって CB および GABA-B 受容体の視床・視床下部における遺伝子発現量を相対比較した。

6) 新生児期から発達期の EE 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]

本研究は臨界期にエストロゲン様物質を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とした。Wistar-Imamichi ラットにエストロゲン物質である EE を生後 24 時間以内に 20 および 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与し、成熟後、卵巣摘出雌動物を用いて行動神経内分泌系への遅発影響を縄張り行動試験、受動回避学習試験等にて検索した。また成熟後卵巣摘出した動物、生後 14 日齢の雌ラット脳の ER α 、 β のタンパク発現量を測定した。各種神経行動学的解析を行った。また同系統ラットを用いて EE 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢から 28 日間経口曝露した雌動物 (卵巣摘出後) を用いて性選択性試験、性行動試験を実施した。

2. Adverse outcome pathway(AOP)を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、遅発影響の発現機序を示した 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 およびエストロゲン受容体(ER)を介した遅発影響発現機序に関する検討

1) 遅発影響発現機序に視床下部キスペプチンの部位特異的变化が果たす役割 - 特に視床下部前方の性周期中枢との関連性について - [高橋]

(1)の結果、性周期異常の発現に先行して性

周期が正常に回帰する Young adult においてすでに、LH サージの低下、その時期の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、ISH/IHC 二重染色により AVPV の ER α を有するキスペプチンニューロン数の減少も認められた。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。これらの現象は性周期を回帰する Middle aged 雌ラットと同様であった。

(2)の結果より、TMX、RLX 10 mg/kg 群(RLX10)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。しかし TMX、RLX 全群は子宮肥大試験で明らかな抗エストロゲン作用を示し、同用量を正常雌ラットに投与しても EE とは異なり LH や AVPV の Kiss1 遺伝子を増加させなかった。

(3)の結果より、遅発影響の感受性時期の閾値について生後 10 日まで性周期異常発現時期が早期化したが、発現時期は 0 日齢に比べ用量相関性に遅延した。AVPV のキスペプチンおよび血中 LH レベルも同様の傾向を示した。生後 14 日曝露では明らかな変化は認められなかった。

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) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響、(2) 新生児期エストロゲン曝露が LH サージにおよぼす影響、(3) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化、(4) 遅発影響と子宮肥大試験の関連について検討した結果、(1) ER β アゴニストである DPN や ER α アンタゴニストである ICI の新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響を生じる化学物質は ER α アゴニストに限らない可能性が示唆された。

(2) 新生児期に EE あるいは PPT の曝露を受けたラットでは、性周期異常の発現に先行して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出され、遅発影響の発現には排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが重要な役割を持つことが示された。(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認

められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。

(4) 遅発影響量の EE (20、200 µg/kg) の新生児期曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。DPN はごく弱いながら ERα 作用を有することが示された。子宮肥大試験と遅発影響の発現が一致しない場合もあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

3) キスベプチンパルス制御部位と遅発影響の関係および遅発影響と閾値の関連性に関する研究 [代田]

(1) 遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒学的意義の解明

遅発影響の最小影響量等の閾値検討の結果、1 日齢から EE の 5 日間反復経口投与による遅発影響の最小影響量は卵巣の嚢胞状卵胞保有率を増加させる 0.08 µg/kg/day (無影響量 0.016µg/kg/day) であり、子宮肥大試験では陰性の用量であった。また交配実験により妊娠末期母体重の増加抑制および胎児の発育促進以外に胎児等への影響は認められなかった。

(2) 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

視床下部の部位特異性に関する実験では、遅発影響をその後発現しない量の EE でも新生児期 ARC の Kiss1 mRNA を低下させ、性周期回帰停止を促進する用量ではプラトーに達していることが明らかになった。視床下部 ERα mRNA も低下したが性周期早期回帰停止との明確な関係はなかった。生後 10 および 23 日齢では最も発育の進んだ段階の卵胞数が減少し、LH 受容体の発現低下ならびにその下流のステロイドホルモン合成系遺伝子の発現低下が認められたが、血中 E2 濃度に反映されていなかった。性周期回帰停止前では、これらの遺伝子発現に増加傾向が認められた一方、KP ニューロンは卵巣ホルモンによるフィードバックの減弱を示唆していた。

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]

EE 投与群では対照群に比べて EE 投与量に応じたサージピーク値の低下がみられた。脳においては、LH サージに關与する前腹側脳室周囲核(AVPV/POA)のキスベプチンの mRNA 発現量が EE 投与群で投与量に応じて低下していた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンおよび下垂体での LH mRNA 発現は対照群と EE 投与群で違いはみられなかった。

また卵巣への影響に関する研究では、まず EE 新生児曝露群の卵巣では、生後第 1 日においてアポトーシス促進因子のひとつである Hrk の mRNA の減少および TUNEL 染色性の低下が認められた。また EE 投与群では生後 8 日の原始卵胞数が減少していた。また EE 添加による卵巣の培養では Hrk 遺伝子発現が減少し、Hrk をノックダウンした卵巣での TUNEL 染色陽性の卵細胞が減少した。

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 単回曝露は発育期でも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腔開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、雌では EE 投与において一時的な体重増加の停滞期が認められた。しかしこの体重増加の停滞は離乳時には解消された。3) 発情雌に対する USV 発声は、雌対照群では認められ無いのに対し EE 投与群では USV 発声を認める雌が存在した。4) POA での CB 細胞の分布パターンを観察したところ、EE 投与による CB 陽性細胞数の変化は、脳の構造的な変化を反映したものでは無いことが明らかとなった。5) RT-PCR によって雌では EE 濃度依存的に脳内 CB 遺伝子の上昇が誘導されていることが明らかとなった。しかし、GABA-B 受容体遺伝子への有意な影響は確認されなかった。

6) 新生児期から発達期の EE および Triphenyl phosphate (TPhP) 連続曝露が雄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]

雌ラットへの生後 24 時間以内の EE 曝露は、縄張り行動試験においては高濃度の 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露量で影響を及ぼすこと、受動回避学習試験では、エストロゲン存在下でのみ遅発影響誘発量である 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露により学習成績が低下する一方、高濃度 EE 曝露では影響を及ぼさないことが示された。

成熟雌の海馬において EE 曝露により ER α 発現はエストロゲン存在下でのみ低下する一方、ER β 発現はエストロゲン非存在下でのみ低下し、大脳皮質では EE 曝露によりエストロゲン非存在下でのみ ER α 発現が低下した。幼若期の海馬では EE 曝露による ER α ・ER β 発現が低下した。

28 日間の 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 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性行動を抑制することを明らかにした。

2. Adverse outcome pathway(AOP)を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持続)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

1) 遅発影響発現機序に視床下部キスペプチンの部位特異的な変化が果たす役割 - 特に視床下部前方の性周期中枢との関連性について - [高橋]

(1)(2)の結果より、EE 新生児期曝露による遅発影響には視床下部のキスペプチンが重要であり、その部位特異的な変化が遅発影響に密接に関連していることが明らかとなった。すなわち、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

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。これらの変化は閉経相当時期のラット加齢性変化に類似していた。

SERM 新生児期曝露の結果が EE と同様であったことから、成熟後の動物とは異なり SERM 新生児期曝露は視床下部にエストロゲン作用として働いていると考えられた。

また遅発影響の発現時期については、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、発現時期に閾値が存在することも明らかとなった。

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査 [井上]

化学物質の臨界期曝露による雌性生殖器の遅発影響について、その発現機序における受容体の役割を明確すること、遅発影響のリスク評価に有用な早期指標を確立することを目指し研究を行った結果、

ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響については、ER β アゴニストや ER α アンタゴニストの新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響は ER α アゴニストに限らないと考えられた。

EE 新生児期曝露ラットで発達期から AVPV 相当部の視床下部キスペプチンの低下が認められたが、(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。

遅発影響量の EE (20、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の新生児期曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかったが DPN はごく弱いながら ER α 作用を有することが示された。子宮肥大試験と遅発影響の発現が一致しない場合もあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

3) キスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係および遅発影響と閾値の関連性に関する研究 [代田]

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 遺伝子に関して検索した結果、遅発影響発現量の閾値に関する一連の実験結果より、現行の評価法が遅発影響評価に必ずしも有効ではないことが示唆された。

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。したがって遅発影響の視床下部部位特異性、とくに後方の卵胞発育中枢に関する一連の実験結果から、遅発影響を含む EE 新生児期経口投与後直後のラットの視床下部で、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 EE 新生児曝露は ARC の Kiss1 発現を低下させ、性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を変化させて卵胞発育を抑制し、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]

胎子期および新生子期に受けた内分泌かく乱物質による影響は、不可逆的であり一生影響が残るものがある。先行研究より、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。

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

また EE 新生児期曝露による卵巣への影響に関する一連の実験結果より、EE が新生子の卵巣に直接作用して卵細胞の Hrk の発現抑制を介しアポトーシスを抑制し、原始卵胞の形成を障害したものと考えられた。

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]

本研究の 3 年間では CB 含有細胞の性的 2 型の不鮮明化の基盤を明らかにする検討に加え、全生涯を通じた発育への影響、成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声(以下 USV)への影響なども評価して、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼすリスク評価を検討した。また生殖機能制御の中心システムである性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の神経活動を制御するキスペプチンへの影響を検討するため、近年、キスペプチン分泌の重要な制御システムであることが示されている GABA-B 受容体の遺伝子発現への検討も試みた。

その結果、出生当日のマウスへの EE 曝露は、雌の腔開口早期化、授乳期の雌に一時的な発育遅延誘導、早期の性周期異常誘導、雌で 5 週齢以降の体重増加、通常は USV 発声しない成体雌での発情雌に対して USV 発声、POA の形態的变化を伴わない雌の CB 細胞数増加/雄の CB 細胞数減少、雌での CB 遺伝子数の濃度依存的な増加が認められた。しかし GABA-B 受容体遺伝子に対して明瞭な影響は観察されなかった。このように、EE のマウス新生仔への単回曝露は、特に雌に対して大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。その神経基盤の一つとして、雌脳における CB 含有神経細胞の「雄性化」が関与していることが示された。哺乳類の脳の基本形は雌である。脳の性分化の臨界期にある雌脳が生理条件以上のエストロゲン作用に曝露されると、それが単回(あるいは短時間)の曝露であっても、発育の一時的遅延、さらには生涯にわたっての生理機能異常が誘導されることが本研究で明らかとなった。

6) 新生児期から発達期の EE 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

て [川口]

3年間の研究結果より、受動回避学習試験において、EEの遅発影響誘発量曝露による学習能力の低下がエストロゲン存在下で表れ、作用機序として海馬のER α 発現量と関連する可能性が示された。また、ER発現へのエストロゲン様物質曝露の影響は、部位、時期およびサブタイプ特異的であることが改めて示された。

生後28日間のEE連続経口投与は、生後24時間以内の皮下投与と比べると低い濃度でも脳の正常な性分化に影響を与え、成熟後の雌特異的な性行動を抑制する可能性が示された。

3年間の各分担研究結果の総合考察

主な成果として

1. エストロゲンおよび抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露ラットでは、発達期から持続する性周期中枢である視床下部前方AVPVのみでキスペプチン低下、性周期を回帰するYoung adult時期のLHサージ時のLH低下が認められ、その後性周期異常の発現時期早期化が観察された。すなわち遅発影響の発現機序は、曝露後速やかに生ずる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重要な引き金であり、この低下が性成熟後LHサージ低下という性腺軸の持続的変動を誘導した結果、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(図3, 4)。

2. 初期変化としてEE曝露ラットでは性成熟前のAVPV相当部位のKiss1遺伝子低下し初期変化の可能性があるがPPTやICHでは認められなかったことからさらなる研究が必要である。卵胞発育中枢である視床下部後方ARCのキスペプチンの役割はAVPVとは異なり持続的な低下は認められなかった。さらなる検討が必要であるが、AVPVが未発達時期の曝露直後に視床下部キスペプチン低下や卵巣の卵胞発育関連遺伝子の変化が観察されたことから、ARCが曝露直後に視床下部・下垂体・性腺軸の正常を曝露直後に妨げていることが遅発影響に関連している可能性も示唆された(図5)。

3. エストロゲン類の新生児期曝露の遅発影響は内側視索前野(POA)のCalbindin D-28k

(CB)陽性細胞の雌雄差や行動神経内分泌系などその他の中枢系へも及んでいると考えられた。また卵巣へは投与直後からの直接影響も考えられた(図6)。

4. 遅発影響の無影響量は経口投与で0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 5\text{days}$ であった。先行研究成果での単回皮下投与0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とほぼ同様である。また投与時期による遅発影響の閾値は約10日齢であった。したがって先行研究と併せ、遅発影響の投与量と投与時期には閾値が存在することが明らかとなった(図7)。

2. Adverse outcome pathway(AOP)を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、遅発影響の発現機序を示した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)(図8)

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、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(図9)。

E . 結論

1. エストロゲン類あるいは ER を介した新生児期曝露により誘発される遅発影響の発現機序に、視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的な変化が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。
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生じ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. 遅発影響の発現および臨界期には閾値が存在する。
5. 遅発影響の発現機序を示した Adverse outcome pathway(AOP)が構築可能で、既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)の改善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) 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. *Reprod. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.
- 2) 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
- 3) 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.
- 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 51:145-56.
- 5) 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.
- 6) Shiota 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)
- 7) 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
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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
- 11) Kaori Nozawa, Kentaro Nagaoka, Haolin Zhang, Kento Usuda, Sachiko Okazaki, Kazuyoshi Taya, Midori Yoshida, Gen Watanabe, Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats, *Reprod Toxicology*, 46, 77-84, 2014.
- 12) 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. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76, 1105-1110, 2014.
- 13) Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(6):891-902.
- 14) 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.

- 15) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1^{+/-} mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.
- 16) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Shirota K. Vascular Hamartoma in the Uterus of a Female Sprague-Dawley Rat with an Episode of Vaginal Bleeding. *Toxicologic Pathology* 41, 1011-1015, 2013.

F-2.学会発表

- 1) 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)
- 2) 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察**:第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 3) 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)
- 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 17 α -ethynylestradiol in rats. (54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3))
- 5) 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 kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響**:第 30 回日本毒性病理学会 (2014.1)
- 6) 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)
- 7) 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ベ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)
- 8) 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)
- 9) 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))
- 10) 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ゲン受容体 (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、高松市)
- 11) 代田 真理子, 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)
- 12) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新周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)
- 13) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the Kiss1^{-/-} female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)
- 14) 代田 真理子「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」(第 41 回日本毒性学会シンポジウム、2014 年 7 月、神戸市)
- 15) 代田 真理子「ラット周生期エストロゲン活性物質曝露による遅発影響—毒性学的視点での解析」(第 106 回日本繁殖生物学会大会シンポジウム、2013 年 9 月、府中市)
- 16) 川嶋 潤他「新生ラットへのエチニルエストラジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響」(第 40 回日本毒性学会、2013 年 6 月、千葉市)
- 17) 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ゲン受容体 (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)
- 18) 代田 真理子, 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)
- 19) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新周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)
- 20) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the Kiss1^{-/-} female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)
- 21) 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ロゲンの雌ラットへの新生期曝露による血中ホルモンおよび生殖関連遺伝子発現の変化(第28回日本下垂体研究会学術集会2013年8月7-9日、花巻、岩手)
- 22) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl 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)
- 23) シンポジウム「生殖・発生・行動と化学物質」、新生仔マウスへの化学物質曝露が及ぼす性分化と生後神経新生への影響。第106回日本繁殖生物学会大会(府中、東京)2013
- 24) 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)
- 25) 磯部安奈、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)
- 26) 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ethynyl 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)
- 27) 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 ethynyl 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)
- 28) 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)
- 29) 中山愛里、服部達哉、宍戸浩孝、磯部安奈、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)
- 30) 中山愛里、服部達哉、大河原利、田辺郁也、磯部安奈、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)
- 31) 千本隆志、神島愛未、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 ethynyl estradiol 曝露が学習行動に及ぼす影響 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 32) 植村英恵、神島愛未、堀井康行、渡辺元、田谷一善、滝上英孝、鈴木剛、近藤保彦、川口真以子 幼若期及び成熟期の TDCIPP 及び flutamide 慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、血中ホルモン濃度に及ぼす影響 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 33) 高橋光佑、堀井康行、佐藤祐司、(川口真以子) 高架十字試験の構造変化に伴うラットの不安様行動の変化 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 34) Horii, Y., Takahashi, K., Sato, Y., Nakajima, S., Sato, K., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M. Relationship between elevated plus maze arm structure and anxiety-like behavior in rats: the presence or absence of open arm ledges vs opaqueness of closed arm structure walls. 第37回日本神経科学大会(2014年9月11日-13日、横浜)
- 35) 小峰千亜希、近藤保彦、吉田緑、川口真以子 生後24時間以内の ethynyl estradiol 曝露が雌ラットの縄張り行動と社会性行動へ及ぼす影響 第20回日本行動神経内分泌研究会(2014年9月3日-5日、秩父)
- 36) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the the expression levels of ER α in adult female rats. 5th International NeuroMalaysia Symposium(2014年9月28日、Malaysia)
- 37) Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Yuji SATO, Sato, K., Nakajima, S., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M. Cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats altered emotional reactivity of male offspring. Neuroscience 2014(2014年11月15日-19日、Washington DC, U.S.A.)
- 38) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Komine, C., Goto, Y., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the learning performance and the expression levels of ER α in adult female rats. Neuroscience 2014(2014年11月15日-19日、Washington DC, U.S.A.)
- 39) Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo,

- Y., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on partner preference, territorial and sexual behavior Neuroscience 2014(2014年11月15日～19日、Washington DC、U.S.A.)
- 40) 神島愛未、鈴木剛、滝上英孝、堀井康行、渡辺元、田谷一善、近藤保彦、川口真以子 幼若期の tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) と flutamide (FI) の慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、生殖器重量および血中 testosterone 濃度に及ぼす影響 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 41) 小峰千亜希、吉田緑、近藤保彦、川口真以子 生後24時間以内の ethynyl estradiol 曝露が雌ラットの性選好性、縄張り行動、性行動へ及ぼす影響 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 42) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G Neonatal exposure to 17 α -ethynyl 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)
- 43) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Harigaya, T., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of antiandrogen on sexual behavior, organ weight and hormone levels of male rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 44) Shiga, T., Kawaguchi, M., Harigaya, T., Mizoguchi, Y. Ethynyl estradiol exposure within 24 hours of birth affects Estrogen receptor α expression levels in adult female rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 45) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on feeding, learning and sexual behavior. 第36回日本神経科学大会(2013年6月22日、京都)
- 46) 川口真以子、小峰千亜希、神島愛未、近藤保彦 Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on sexual behavior. 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム(2013年9月12日～14日、東京)
- 47) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on feeding, learning and sexual behavior in female rat. 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 48) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Antiandrogen during juvenile induce hypoplasia of penis and suppression of sexual behavior of male rats. 4th International NeuroMalaysia Symposium(2013年9月28日、Malaysia)
- 49) Shiga, T., Nakamura, T. J., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol influences the expression levels of estrogen receptor α in the adult brain of female rats. Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 50) Komine, C., Kamishima, M., Odashima, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.(Kawaguchi, M.) Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on partner preference and sexual behavior in female rats. Neuroscience 2013(2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 51) Shiga, T., Nakamura, T. J., Chiaki, K., Kamishima, M., Goto, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Mizoguchi, Y., Kawaguchi, M. Exposure to ethynyl estradiol within 24 hours of birth decreases the expression levels of ER α in adult female rats. 第16回日本内分泌攪乱化学物質学会(2013年12月12日～13日、東京)

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

遅発影響の問題点

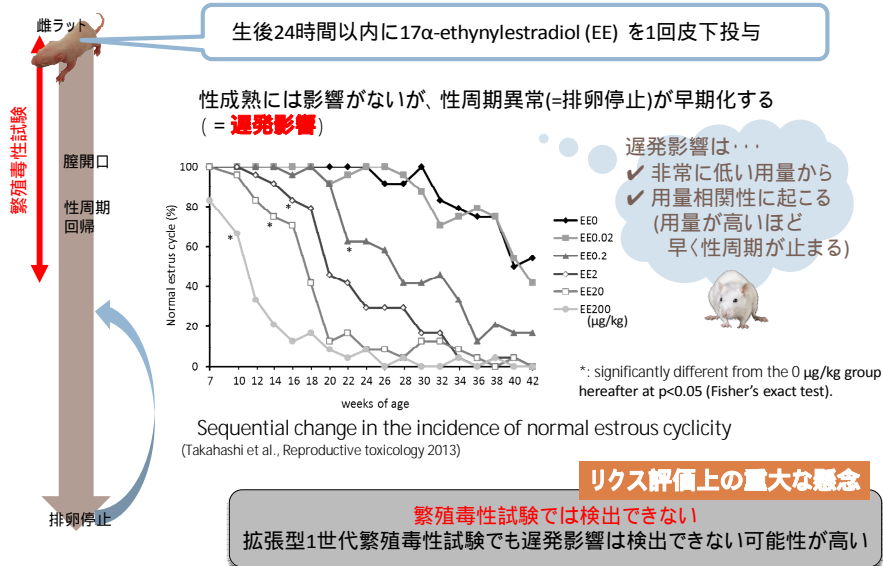


図1 遅発影響の問題点

キスペプチンニューロンの部位特異性

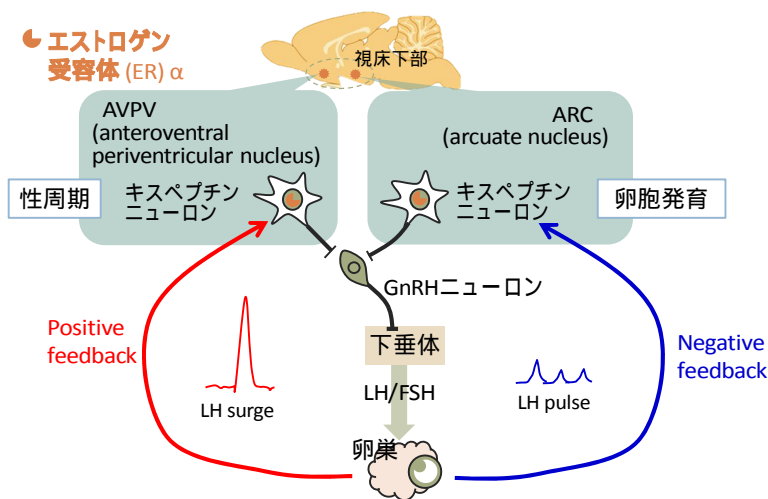


図2 視床下部キスペプチンニューロンの部位特異性

遅発影響の発現のメカニズム

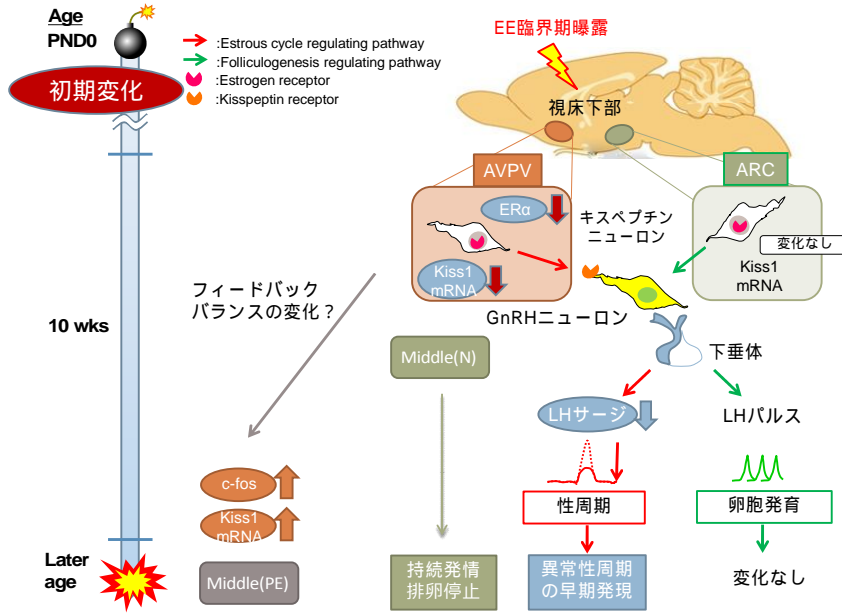


図3 遅発影響の発現メカニズム概念図

遅発影響のAOP

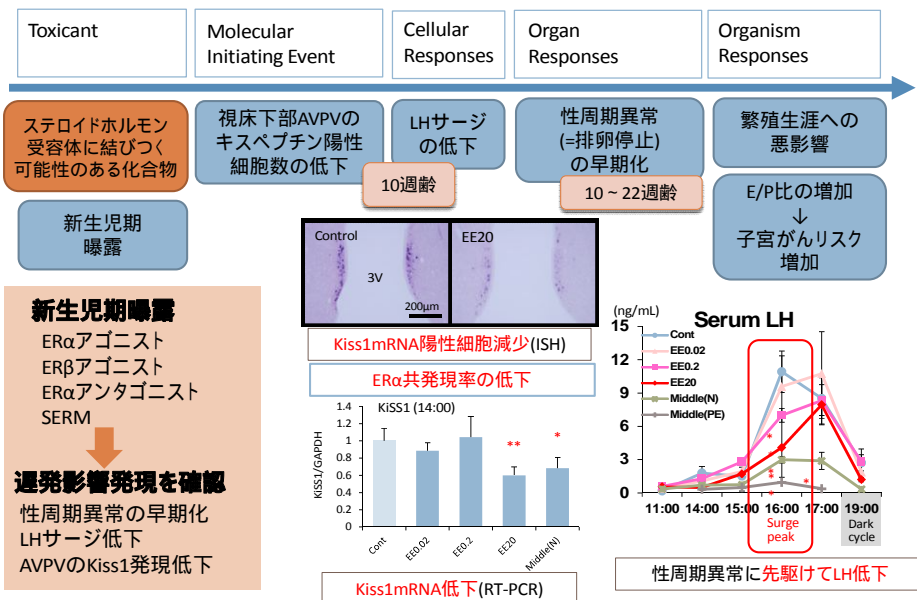


図4 遅発影響の Adverse Outcome Pathway (AOP)に関連する各因子

遅発影響の初期変化の検索

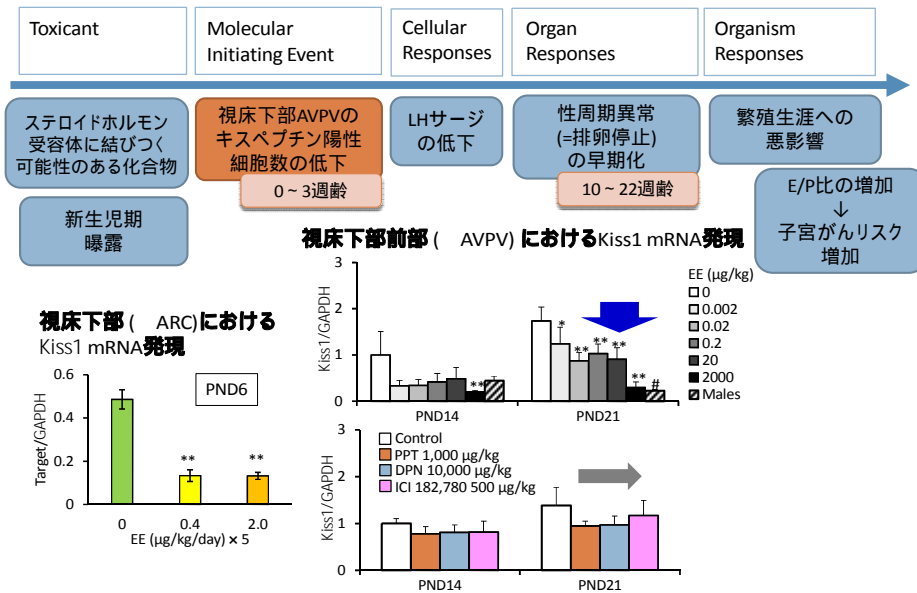


図5 遅発影響の初期変化のまとめ

新生児期曝露で認められたその他の影響

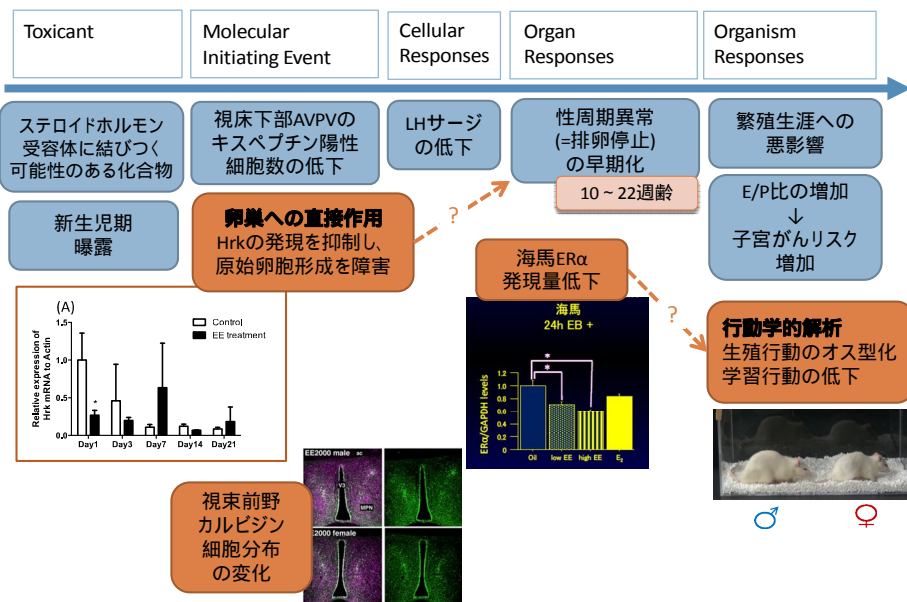


図6 新生児期曝露で認められたその他の影響のまとめ

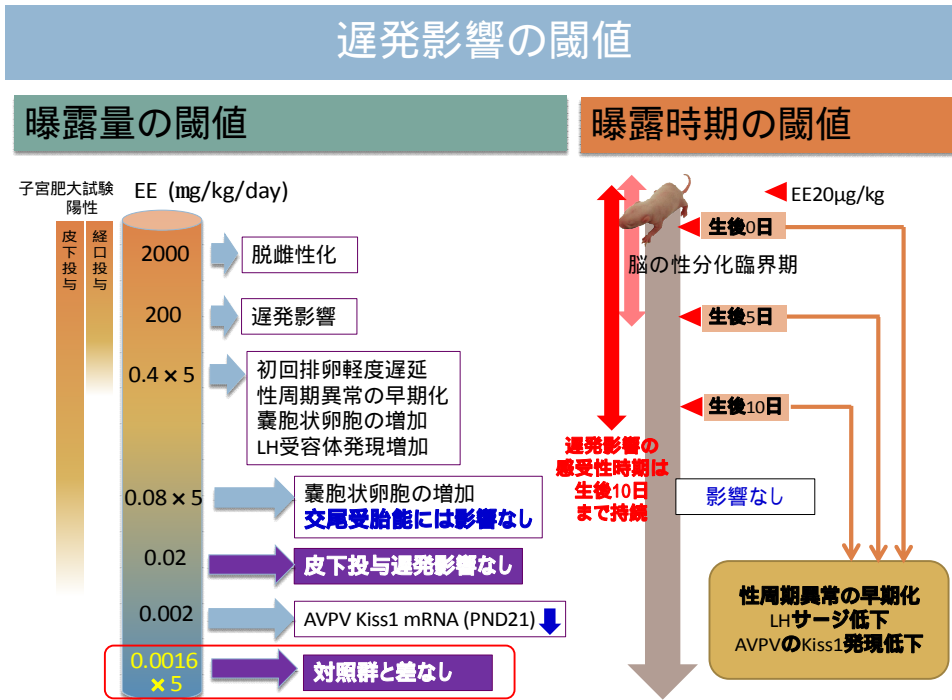


図7 遅発影響の曝露量と臨界期の閾値

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旗側室周囲核 (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

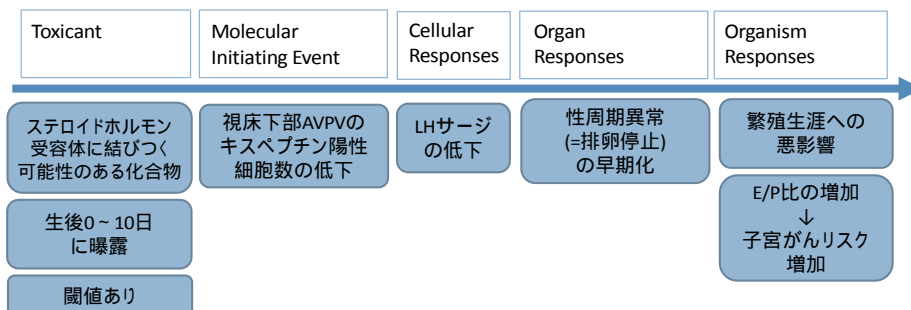


図8 AOPと本研究の結論

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)、あるいは拡張型一世代繁殖毒性試験(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

