

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：遅発影響の発現機序検索。特に視床下部LHサージ制御部位の  
キスペプチンの変化と生殖機能遅発影響について

研究分担者：井上 薫 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
研究協力者：市村亮平 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

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、(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を行った。その結果、(1) ER $\beta$  アゴニストである DPN や ER $\alpha$  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 $\alpha$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) 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。DPN はごく弱いながら ER $\alpha$  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。

### A. 研究目的

化学物質の臨界期曝露による遅発影響は、現行の毒性試験では検出が困難であり、リスク評価上の課題となっている。

先行研究では、生後 0 日の雌性 Wistar Hannover ラットに 0.02 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) を単回皮下投与すると、遅発影響として 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で用量依存性に性周期 (=排卵) 停止の早期化を起こすことを示し (Takahashi et al., 2013)、その機序に視床下部において生殖機能を制御するキスペプチンの関与が推察された。また、エストロゲン受容体 (ER)  $\alpha$  アゴニストである 4,4',4"- (4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol (PPT)、ER $\beta$  アゴニストである 2,3-bis

(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN)を用いた検討から、遅発影響の発現には ER $\alpha$  が主要な役割を持つことは明らかであるが、ER $\beta$  の関与を完全に否定するには至っていない。

本研究では、遅発影響の発現機序として特に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、(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**について検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1. ER $\alpha$ / $\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

所内で維持している Donryu ラットを使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、自然分娩後 24 時間以内に児動物を全て回収・混合した。雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた後、以下の処置を行った。

実験 : 10% DMSO/sesame oil、PPT 10 mg/kg (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9)、DPN 10 mg/kg (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) を 1 回皮下投与 (溶媒対照群、PPT 群、DPN 群)、あるいは PPT 10 mg/kg および DPN 10 mg/kg を各 1 回皮下投与 (PPT+DPN 群)。

実験 : Sesami oil (溶媒対照)、ICI 182,780 (ICI, Sigma, CAS No. 129453-61-8) 500 および 5,000  $\mu$ g/kg を 1 回皮下投与。

雌児動物 (30 ~ 36 匹/群) は生後 21 日で離乳し、体重、膻開口日齢および性周期の観察 (7 週から 23 あるいは 25 週齢まで) を行った。性周期の判定は、週 5 日膻スミアを採取し 4・5 日周期で規則的に発情が回帰する場合を正常性周期、それ以外を異常性周期に分類した。特に発情前期あるいは発情期が 5 日間連続した場合を持続発情とした。実験 では、性周期の観察後全ての動物を解剖し、雌性生殖器官の重量測定および組織学的検索を実施した。

### B-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験 において、10 週齢時に正常性周期を示す動物の中から発情前期の個体を各群 5 匹選抜し、サージピーク時刻である 16:00 における血清黄体形成ホルモン (LH) 濃度測定、視床下部前部および後部における Kiss1 mRNA の発現解析、雌性生殖器官の組織学的検索を行った。

実験 : 生後 0 日齢の雌性 Donryu ラット (各群 30 匹) に sesame oil (対照群)、EE (0.02、0.2、20  $\mu$ g/kg)、PPT (1,000  $\mu$ g/kg)、DPN (1,000  $\mu$ g/kg) を 1 回皮下投与した。正常性周期を示す 10 週齢時に卵巣を摘出し、その翌週に LH サージの誘起を行った。血清 LH 濃度および視床下部前部/後部 (前腹側室周囲核 (AVPV)/弓状核 (ARC) 相当部位) における Kiss1

mRNA の発現を経時的に解析した。加齢性変化と比較するため、20 週齢の雌ラット (性周期を回帰する middle(N)群、性周期が停止している middle(PE)群) についても同様の検索を実施した。

### B-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

先行研究と合わせて、実験 では Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア、東京)、実験 では Donryu ラットを使用した。自然分娩後 24 時間以内に児動物を全て回収・混合し、雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた。

実験 では EE (無影響量; 0.002、0.02  $\mu$ g/kg、遅発影響量; 0.2、20  $\mu$ g/kg、脱雌性化量; 2,000  $\mu$ g/kg) を 1 回皮下投与し、対照群には溶媒である sesame oil を投与した。

実験 では 10%DMSO/sesame oil (溶媒対照群)、PPT 1,000  $\mu$ g/kg (PPT 群)、DPN 10,000  $\mu$ g/kg (DPN 群) および ICI 182,780 500  $\mu$ g/kg (ICI 群) を 1 回皮下投与した。PPT および DPN の投与用量は性周期停止の早期化を起こす用量を選択し、ICI 182,780 は予備検討で実施した子宮肥大試験において、EE による子宮重量増加を完全に抑制する用量を用いた。

各群 5 匹の動物について、生後 9 (または 12)、14、21 日に血清卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度測定、生後 14、21 日に視床下部前部/後部における Kiss1 mRNA 発現解析、雌性生殖器官の組織学的検索を行った。

### B-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

実験 : 子宮のエストロゲン感受性に対する新生児期エストロゲン曝露の影響を検討するため、0 日齢の雌性 Donryu ラット 80 匹に EE 0、20、200、2,000  $\mu$ g/kg (20 匹/群) を 1 回皮下投与した。22 日齢にそれぞれ 3 ~ 5 匹ずつ EE 0、0.002、0.02、0.2  $\mu$ g/kg を 1 回皮下投与し、その 24 時間における子宮重量を測定した (幼若動物を用いた子宮肥大試験)。

実験 : PPT および DPN の in vivo エストロゲン活性を確認するため、Donryu ラットを用いて OVX 成熟動物法 (OECD TG 440) による子宮肥大試験を実施した。

### B-5. 血清ホルモン濃度測定

LH および FSH 濃度は、凍結保存した血清を用いて、National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) から提供されたラジオイムノアッセイキットを使用して測定した (Taya et al., 1983)。

#### B-6. 遺伝子発現解析

凍結視床下部組織から Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を用いて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応後、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。Kiss1: Rn0071\_0914\_ml, KISS1 receptor (Kiss1R): Rn0057\_6940\_ml, FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos): Rn00487426\_g1, estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372\_ml, estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610\_ml。内部標準には GAPDH を用いた。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。

#### B-7. 統計学的解析

体重、臓器重量、血清ホルモン濃度、子宮腺の数、遺伝子発現量、膣開口日齢および子宮内膜細胞丈は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群との間で有意差検定を行った。実験では陽性対照である EE 群を除き、PPT 群、DPN 群を分けて、それぞれ対照群と比較した。正常性周期の割合および病理所見の発生率は Fisher の直接確率法で検定した。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### C. 研究結果

#### C-1. ER $\alpha$ / $\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

実験 : 膣開口日齢に投与による影響は認められなかった。性周期の観察において、PPT 群では 7 週から異常性周期を示す動物が一部に認められ、10 週以降急激に正常性周期の割合が減少し、19 週以降ではほぼ全例が持続発情を示した (図 1A)。PPT+DPN 群においてもほぼ同様の推移を示した。DPN 群では 11 週まで全例が正常性周期であったが、13 週から性周期の延長や持続発情を示す個体が出現し、15 週以降正常性周期の割合は照群に比べて有意に低下した。最終解剖では、PPT 群、DPN 群、PPT+DPN 群では卵巣重量の有意な低下がみられ、組織学的には黄体の減少/欠失、嚢胞状卵胞が観察された (表 1)。子宮では intraluminal hyperplasia や扁平上皮化生が高頻度に認められ、PPT+DPN 群では子宮内膜限局性過形成が増加傾向を示した。

実験 : 膣開口の平均日齢は ICI 群で用量相関性に早まったが (対照群:  $28.0 \pm 0.8$ 、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群:  $27.6 \pm 0.6$ 、5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群:  $27.3 \pm 0.5$ )、観察期間が生後 27~30 日に限られていたため、膣開口に対する影響は再度検討する必要があると考えられた。ICI 5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、生後 13 週以降持続発情を示す個体が増え、19 週以降では対照群と比べて正常性周期の割合が有意に低下した (図 1B)。ICI 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、正常性周期の割合は対照群とほぼ同様の推移を示した。

#### C-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験 : サージピーク時 (16:00) の血清 LH 濃度は、統計学的有意差は検出されなかったが、PPT+DPN 群で低値傾向を示した (図 2A)。PPT 群および PPT+DPN 群において、視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現が有意に低下した (図 2B)。視床下部後部 (図 2B) および Kiss1R mRNA (data not shown) の発現に群間差はみられなかった。

実験 : EE 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群を除いて、LH サージピークが低下する傾向がみられ、対照群がピークに達した 16:00 では、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群および middle-age 群において有意な低値が認め

られた (図 3AB)。PPT および DPN 群においても、対照群に比べサージピークが低下する傾向がみられた (図 3B)。14:00 の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現量は、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群および middle-age 群で有意に低下しており (図 3C)、16:00 においても、統計学的有意差はないものの同様の傾向がみられた (図 3D)。視床下部後部では Kiss1 mRNA の発現に群間差は認められなかった。また、サージピーク時 (16:00) の視床下部前部および後部における Kiss1R、c-fos、ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現には有意な変動は認められなかった (data not shown)。

### C-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

実験 : 脱雌性化量群では、他群とは異なる FSH 分泌パターンを示し (図 4A)、生後 14 日における卵巣および子宮重量が対照群に比べて有意に低く、21 日においても同様の傾向がみられた (data not shown)。遅発影響量では、生後 14 日の卵巣、子宮重量が若干低下していたが、21 日では対照群とほぼ同等であった。卵巣/子宮/膣の組織学的検索において、脱雌性化量群では卵胞発育の遅延や膣粘膜上皮の角化細胞出現などが観察された (図 4B)。また、生後 21 日において 0.002  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群を除いた群で、子宮腺の数が対照群よりも有意に減少あるいは減少傾向を示した (図 4C)。

脱雌性化量の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現は、生後 14 および 21 日ともに対照群に比べて著しく低かった (図 4D)。視床下部後部においても、生後 14 日における発現量が対照群に比べて半減しており、雄と類似した発現パターンを示した。無影響量および遅発影響量では、生後 14 および 21 日の視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、生後 21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。視床下部後部においては、両日齢とも対照群と差はなかった。Kiss1R については、視床下部の部位、日齢に関わらず、mRNA 発現量に群間差は認められなかった (data not shown)。

実験 : PPT および DPN 群では生後 14 日において、卵巣の相対重量の有意な低値がみられたが、血清 FSH 濃度 (図 5A)、卵巣/子宮

/膣の組織像、子宮腺の数 (図 5B) に投与による影響はみられなかった。

視床下部前部では、PPT 群で Kiss1 mRNA 発現レベルがやや低い傾向がみられたものの、生後 14 および 21 日ともに、対照群との間に統計学的有意差はなかった (図 5C)。視床下部後部における Kiss1 mRNA 発現および Kiss1R の発現についても群間差は認められなかった (data not shown)。

### C-4 . 遅発影響と子宮肥大試験の関連

実験 : EE 2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では子宮重量が顕著に低下しており、子宮の発達異常が疑われた。遅発影響量である EE 20、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、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を認めなかった (図 6)。

実験 : 陽性対照 (EE) 群の子宮重量は溶媒対照群に比べて顕著に増加し、子宮内膜上皮細胞丈の増加も明らかであった。PPT 群の子宮重量は、wet weight では 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から、blotted weight では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から有意な増加を示した (図 7A)。同様に、子宮内膜上皮細胞丈も用量依存性に増加し、1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  において統計学的有意差が認められた (図 7B)。DPN 群では、PPT 群に比べて増加の程度は小さいが、10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められた。

## D . 考察

### D-1. ER $\alpha/\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

PPT より作用は弱いものの、DPN 群においても性周期停止の早期化が認められた。PPT+DPN 群における性周期の停止の発現時期および頻度は、PPT 群とほぼ同等であり、DPN を併合投与したことによる加算、相乗効果は明らかではなかった。DPN は ER $\beta$  選択的アゴニストとして使用されているが (Meyers et al., 2001)、ER $\alpha$  への作用が全く無いとは限らない。実験 においてもごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示され、DPN の新生児期曝露による性周期停止の早期化に、DPN の ER $\alpha$  アゴニスト作用が関与した可能性を否定することはできなかった。最終解剖で認められた生殖器の組織学的変化は、先行研究 (Takahashi et al., 2013) と同様に性周期停止の

早期化に付随する二次的变化と考えられた。

ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI の新生児期曝露は遅発影響として性周期停止の早期化を起こすことが確認された。これは Pinilla らの報告と一致する (Pinilla et al., 2002)。ICI は ER $\alpha$  のアンタゴニストだが、特定の条件下ではアゴニスト作用を示すとの報告もある (Robertson et al., 2001; Alfinito et al., 2008)。新生児ラットの視床下部では、ICI がアゴニストとして働いた可能性も考えられるが、詳細な機序についてはさらに検討が必要である。

## D-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験 において、新生児期に EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の曝露を受けた雌ラットでは、加齢ラットと同様に、LH サージピークの低下および視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められ、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た。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、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。

高用量の PPT、DPN を用いた検討では (実験 )、LH サージの低下傾向 (PPT+DPN 群)、発情前期の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現低下 (PPT 群および PPT+ DPN 群) が認められ、EE の場合と同様に排卵誘起機能が減弱していることが推測された。DPN 10 mg/kg や EE 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  においても遅発影響として性周期停止の早期化が認められているが、LH サージおよび Kiss1 mRNA 発現への影響は乏しかった。これらの群では性周期停止が起こる時期が比較的遅く、視床下部の変化が顕在化するのには性周期停止が起こる 2~3 週前に限られるのではないかと推測される。

## D-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

実験 において、視床下部前部では最も低い用量から Kiss1 mRNA の発現低下がみられ、AVPV の Kiss1 発現ニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。視床下部後部における Kiss1 mRNA 発現は、無影響量および遅発影響量では変化がみられず、

ARC は AVPV より影響を受けにくいことが示唆された。

脱雌性化量では、視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現が低いまま維持され、視床下部後部においても生後 14 日の Kiss1 mRNA 発現が雄と同レベルに低下していた。これに伴い FSH 分泌抑制、卵胞および子宮腺の発達抑制、膈上皮の組織学的変化が生じていると考えられ、20~2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の間に脱雌性化の閾値が存在すると推測された。

無影響量および遅発影響量群においても、生後 14 および 21 日の視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられ、脱雌性化に至らない用量では、Kiss1 mRNA の発現低下は発達期における一時的な変化であると推測された。

PPT、DPN、ICI の新生児期曝露 (実験 ) では、生後 14 および 21 日の Kiss1 mRNA レベルに群間差は認められなかった。EE では無影響量でも Kiss1 mRNA の発現低下が認められたこと、性周期の早期停止を起こす用量の PPT、DPN では Kiss1 mRNA 発現に影響がなかったことから、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性成熟後の性周期停止と直接リンクせず、遅発影響の早期指標には適さないと考えられた。EE では先行研究においても生後 14 日における Kiss1 mRNA の発現低下が認められており (Takahashi et al., 2014)、発達期キスペプチンニューロンに対する作用は遅発影響を起こす物質の中でも異なることが示唆された。

## D-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

新生児期にエストロゲン曝露を受けたマウス・ラットでは、子宮のエストロゲン反応性や ER $\alpha$  発現が変化すると報告があるが (Newbold et al., 2004; Takahashi et al., 2014)、今回の実験条件では、遅発影響量の EE (20, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の新生児期曝露は、性成熟前の子宮エストロゲン反応性に明らかな影響をおよぼさないことが示された。

実験 において、DPN 群では程度は小さいものの、10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められ、in vivo エストロゲン活性を有することが

示された。したがって高用量の DPN はごく弱いながら ER $\alpha$  作用を示すと考えられた。

EE、PPT、DPN および ICI の性周期への影響と照合すると、DPN や ICI のように子宮肥大試験が弱陽性あるいは陰性であっても EE や PPT と同様に性周期停止の早期化を起こすこともあり、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。

## E. 結論

(1) ER $\beta$  アゴニストである DPN や ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI 182,780 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 $\alpha$  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  $\mu$ g/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 ER $\alpha$  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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.
- 2) 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<sup>+/-</sup> mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.

- 3) 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 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, 39, 775-784, 2014.
- 4) 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 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, 93, 32, 2015.
- 5) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Reprod. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.

### 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 kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響**: 第 30 回日本毒性病理学会 (2014.1)
- 2) 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)
- 3) 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: **Ethinyl 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, 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)
- 5) 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: **Ethinyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検索**: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 6) 高橋美和, 市村亮平, 井上薫, 森川朋美, 渡辺元, 吉田緑: **17 $\alpha$ -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)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology*, **149**, 5219-5226, 2008.
- 2) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure- activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 3) Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol.*, **18**, 399-406, 2004.
- 4) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG440): Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, 2007.
- 5) Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol.*, **172**, 441-448, 2002.
- 6) Robertson JA, Zhang Y, Ing NH. ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **77**, 281-287, 2001.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, **69**, 265-270, 1983.

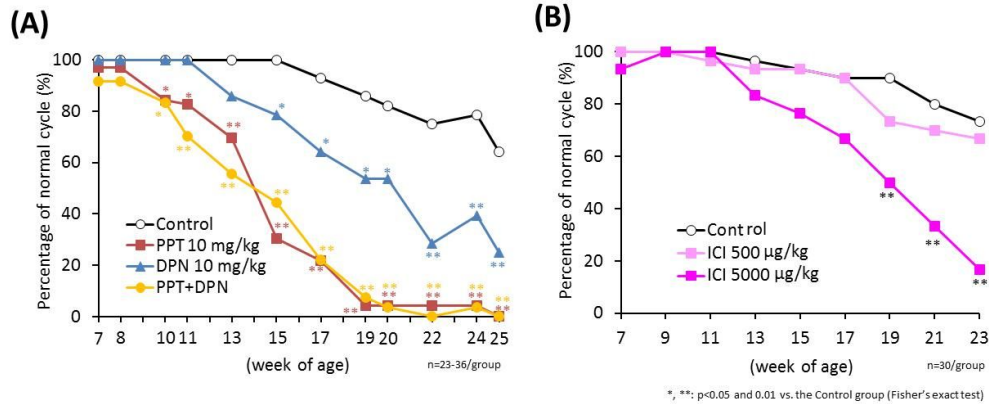


図1. PPTおよびDPN (A)、ICI 182,780 (B) 新生児曝露ラットにおける正常性周期の割合の推移

表1. PPTおよびDPN新生児期曝露ラットの26週齢における卵巣・子宮重量と組織所見

Organs	Findings	Group	Control	PPT	DPN	PPT+DPN
	No. of animals examined		28	23	28	27
Ovary	Absolute weight (mg)		71.4 ± 18.6 <sup>a</sup>	43.5 ± 9.9 <sup>**</sup>	54.1 ± 16.1 <sup>*</sup>	40.2 ± 6.9 <sup>**</sup>
	Relative weight (mg%)		24.2 ± 6.9	13.4 ± 3.5 <sup>**</sup>	17.0 ± 6.1 <sup>*</sup>	12.2 ± 2.4 <sup>**</sup>
	Loss or marked decrease of CL		5 (17.9%)	22 (95.7%) <sup>###</sup>	15 (53.6%) <sup>#</sup>	26 (96.3%) <sup>##</sup>
	Follicular cyst		7 (25.0%)	23 (100%) <sup>##</sup>	26 (92.9%) <sup>##</sup>	27 (100%) <sup>##</sup>
Uterus	Absolute weight (g)		0.79 ± 0.33	0.72 ± 0.06	0.83 ± 0.23	0.79 ± 0.10
	Relative weight (g%)		0.26 ± 0.12	0.22 ± 0.03	0.26 ± 0.07	0.24 ± 0.03
	Focal hyperplasia		0 (0%)	2 (8.7%)	1 (3.6%)	4 (14.8%)
	Intraluminal hyperplasia		4 (14.3%)	21 (91.3%) <sup>##</sup>	13 (46.4%) <sup>#</sup>	22 (81.5%) <sup>##</sup>
	Squamous cell metaplasia		3 (10.7%)	22 (95.7%) <sup>##</sup>	13 (46.4%) <sup>##</sup>	22 (81.5%) <sup>##</sup>

a: mean ± SD  
 CL: corpus luteum  
 \*, \*\*, p < 0.05 and 0.01 vs. the control group (Dunnett's test)  
 #, ##, p < 0.05 and 0.01 vs. the control group (Fisher's exact test)



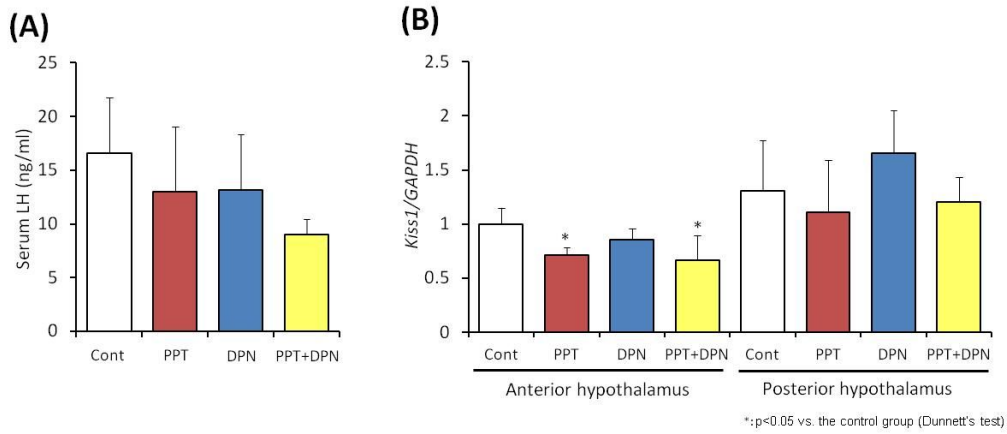


図2. PPTおよびDPNの新生児曝露を受けたラットの発情前期(16:00)における血清LH濃度(A)、視床下部Kiss1 mRNA発現(B)

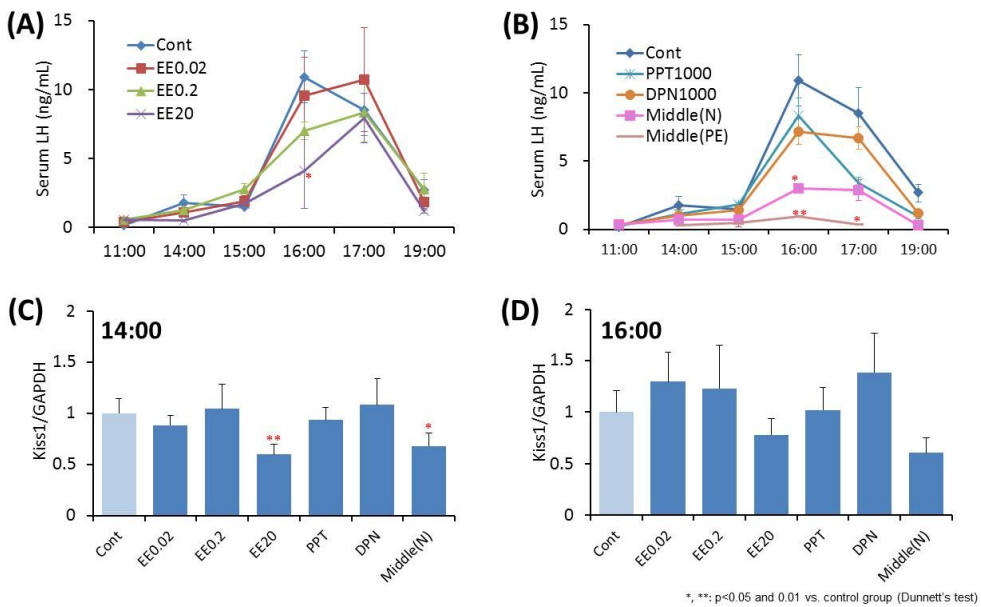


図3. 新生児期エストロゲン曝露ラットおよび加齢ラットにおけるLHサージ(A, B)と14:00(C)および16:00(D)の視床下部前部におけるKiss1 mRNA発現

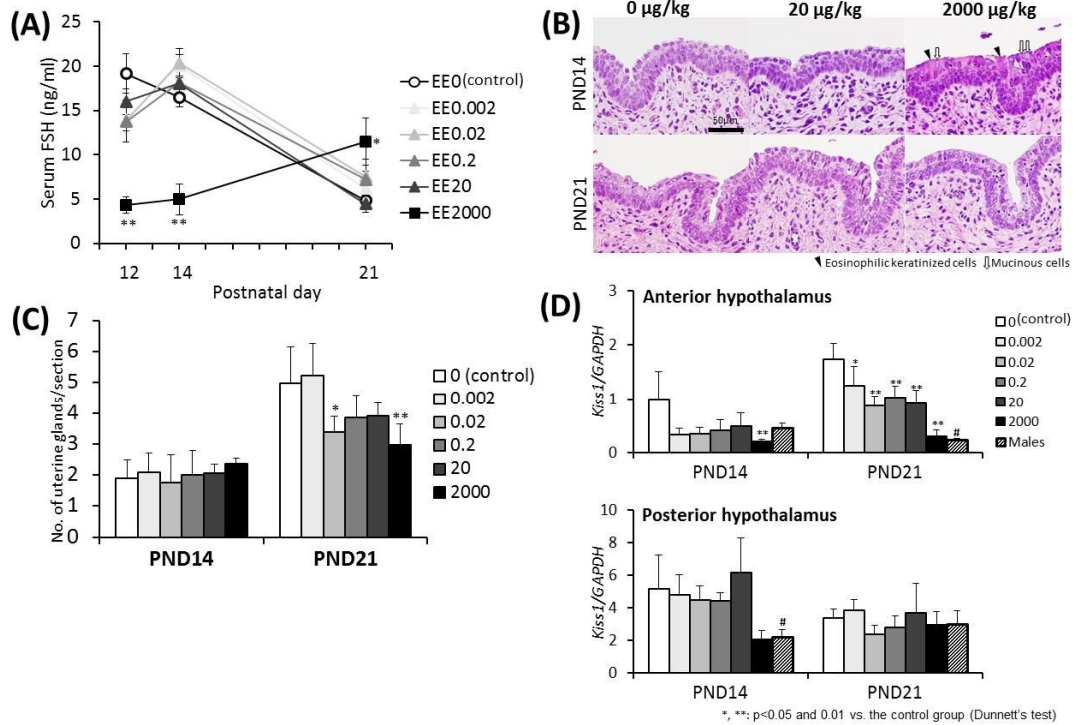


図4. EE新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度 (A)、膣の組織像 (B)、子宮腺の数 (C)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現 (D)

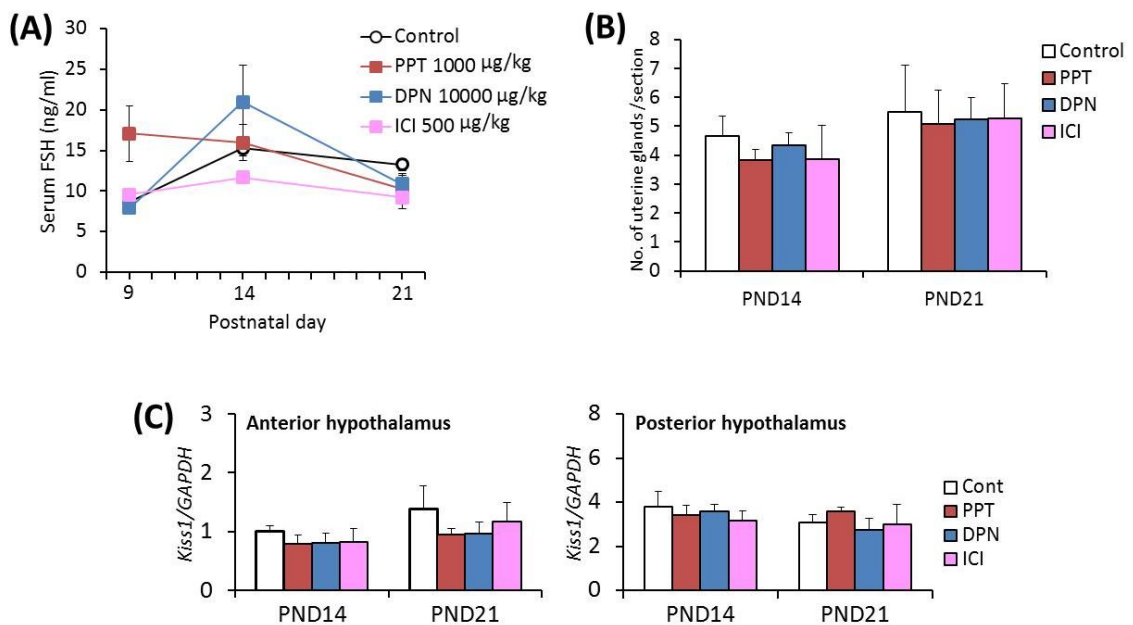


図5. PPT、DPN、ICI新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度 (A)、子宮腺の数 (B)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現 (C)

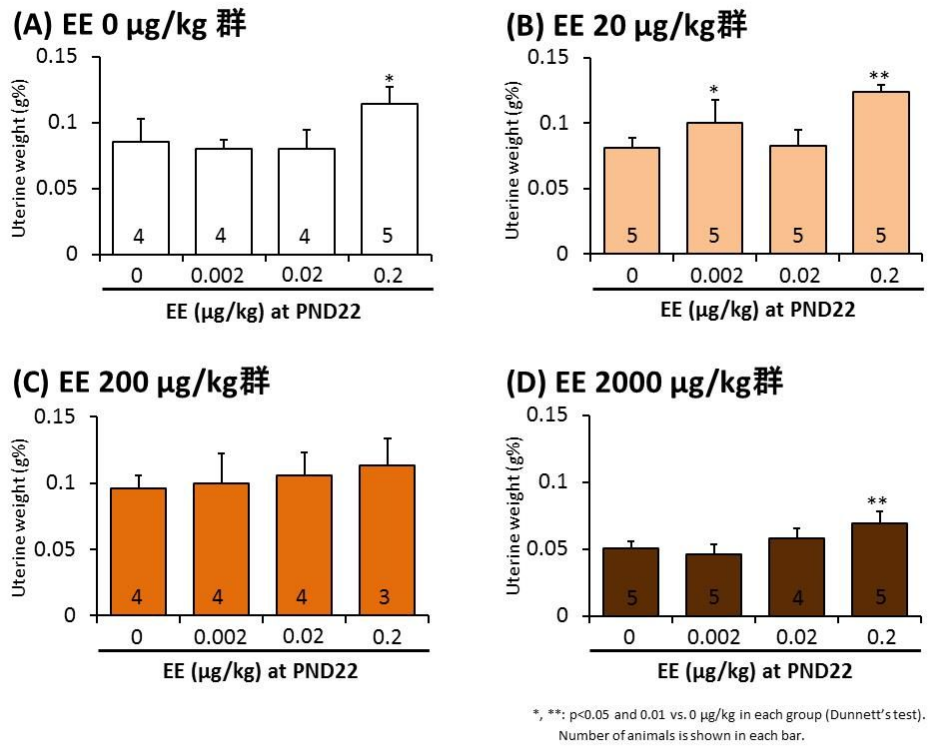


図6. EEの新生児期曝露を受けたラットによる子宮肥大試験

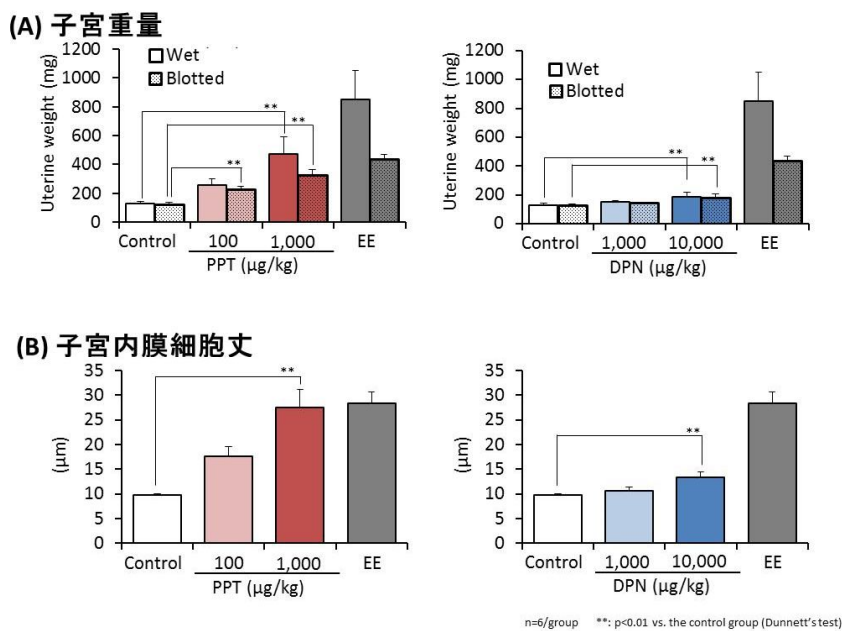


図7. PPTおよびDPNの子宮肥大試験における子宮重量 (A) および子宮内膜細胞丈 (B)

