

**厚生労働科学研究費補助金**

**化学物質リスク研究事業**

**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**

(H25 - 化学 - 一般 - 003)

**平成 27 年度 総括・分担研究報告書**

**研究代表者 高橋 美和**

**平成 28(2016)年 3 月**



# 目次

## .総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業） 総括研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キス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

.....高橋 美和 p. 3

## .分担研究報告

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

.....高橋 美和 p.27

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・

.....井上 薫 p.43

遅発影響の発現機序検索。特にキスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係 -遅発影響と閾値の関連性-

.....代田 真理子 p.55

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の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ -エストロゲンの新生児期曝露による雌ラットの卵細胞制御遺伝子発現に対する影響-

.....渡辺 元 p.81

新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後（遅発性）の影響 -雌の膣開口、性周期ならびに雌雄の体重変化を中心とした観察と解析-

.....横須賀 誠 p. 93

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ

.....川口 真以子 p. 101

## .研究成果の刊行に関する一覧表

..... p. 109

## .研究成果の刊行物

..... p. 111



# **.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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$  アゴニスト PPT、ER $\beta$  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) $\alpha$  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 $\alpha$ -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  $\mu$ g/kg (短期では 200  $\mu$ 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 $\alpha$  アンタゴニスト, ICI 182,780 [井上]
  - ✓ ER $\alpha$  アゴニスト, PPT [井上]
  - ✓ ER $\beta$  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 $\alpha$  アゴニストである PPT、ER $\beta$  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 $\alpha$  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  $\mu$ 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 $\alpha$ 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 $\alpha$  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
- ✓ 性選好性試験
- ✓ 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 ER $\alpha$ 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 ER $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ 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 $\alpha$  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 $\alpha$  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 $\alpha$ -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) 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 $\alpha$ -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  $\alpha$  in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats. *PLoS One.* 2016 Jan 7;11(1):e0146136

### F-2.学会発表

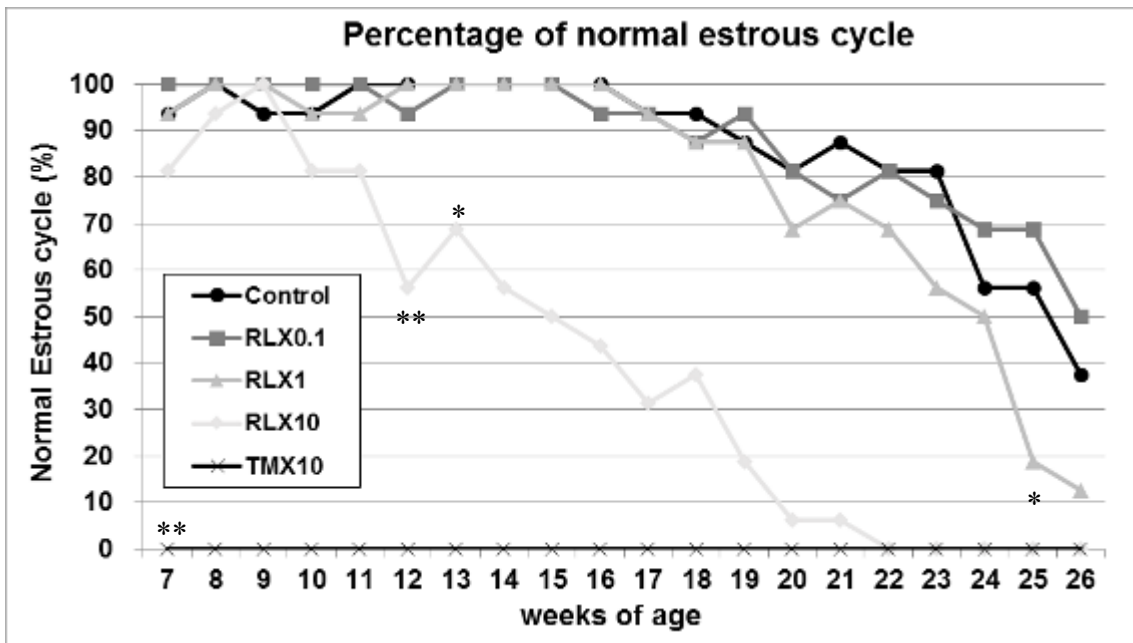
- 1) 高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE) 新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下：第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
- 2) 田中 恵他「新生児期エチニルエストロジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロジェン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、徳島市)
- 3) 代田 眞理子、吉田 緑「幼若動物を用いた毒性評価におい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ロ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ロゲン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 $\alpha$ -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) $\alpha$  及び ER $\beta$  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)

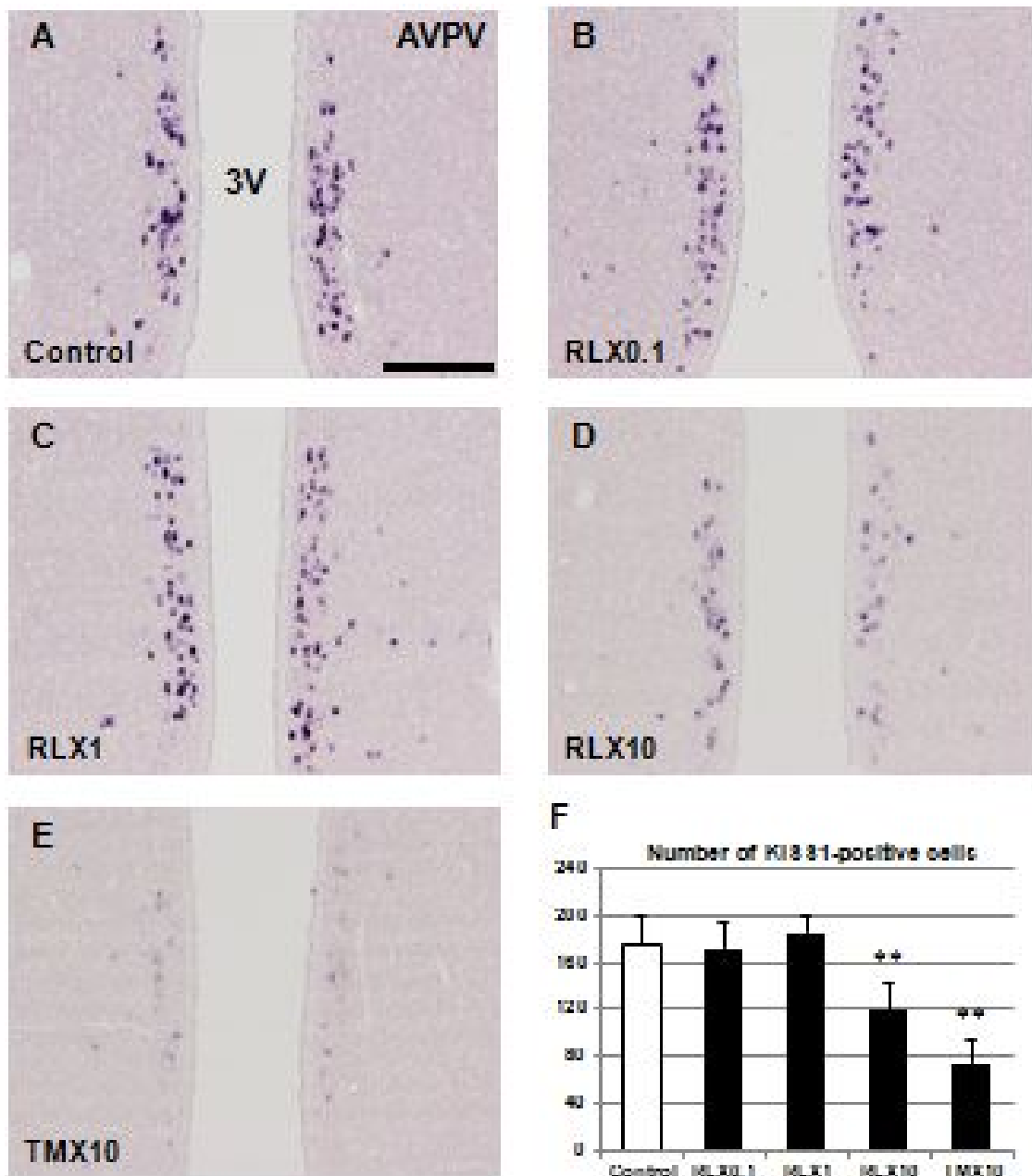
#### **G. 知的財産権の出願・登録状況**

なし

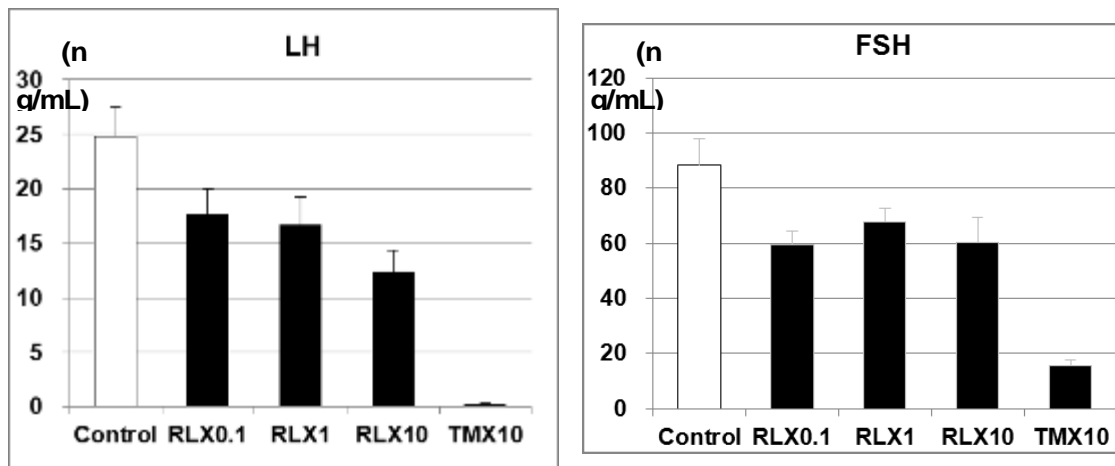




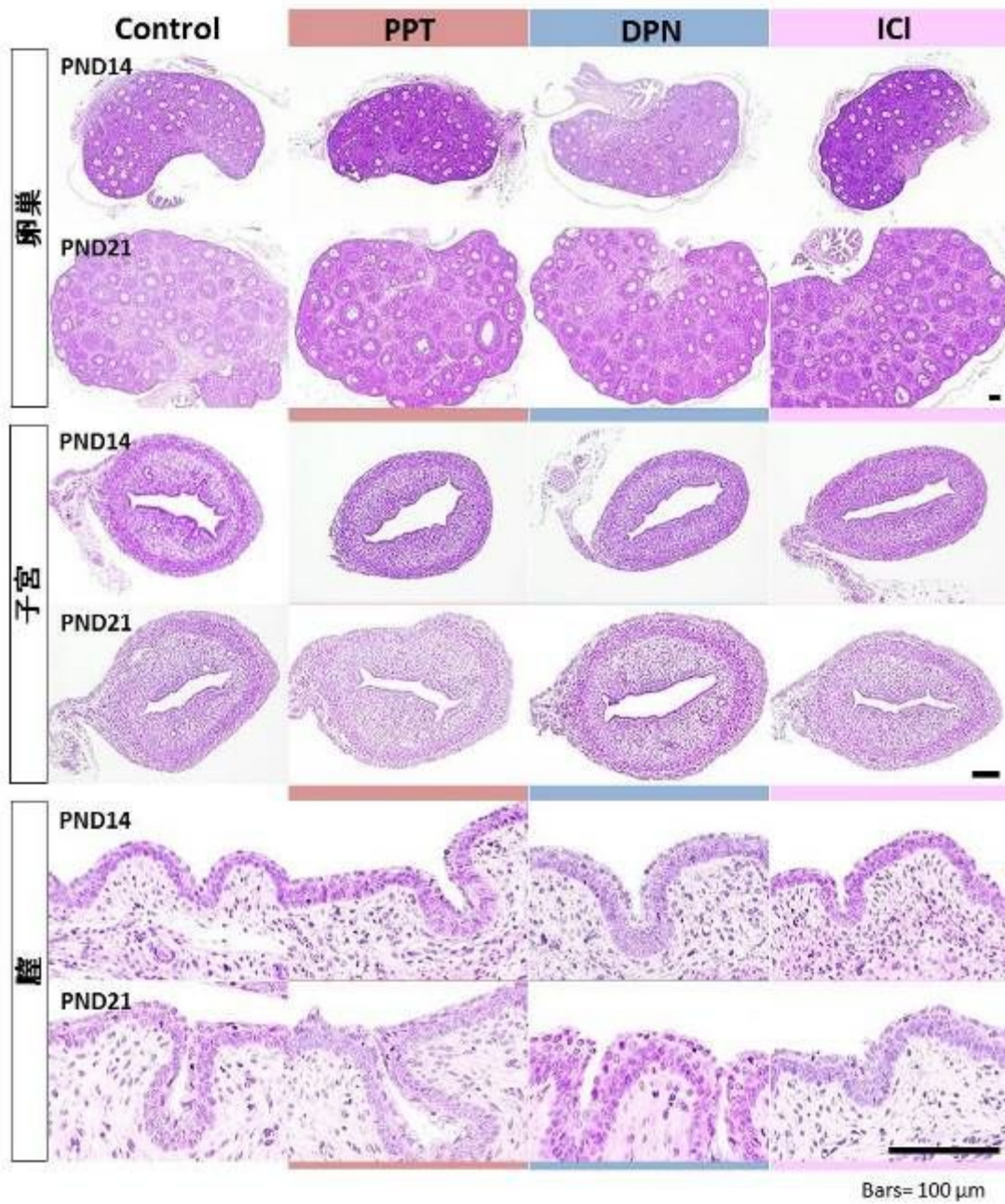
SERM新生児期曝露による正常性周期を示す個体の割合の推移



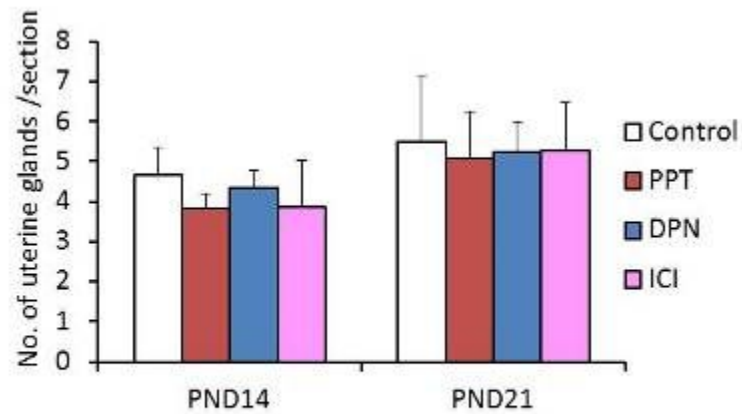
SERM新生児曝露によるAVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiSS1発現細胞の比較 (10週齢時)



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)

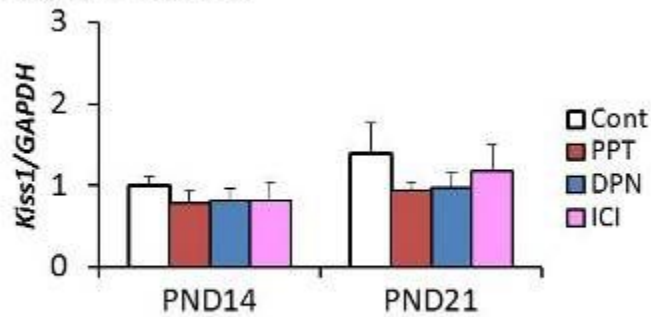


新生児期 PPT、DPN、ICI 曝露ラットの生後 14 日および 21 日における卵巣・子宮・膣の組織像

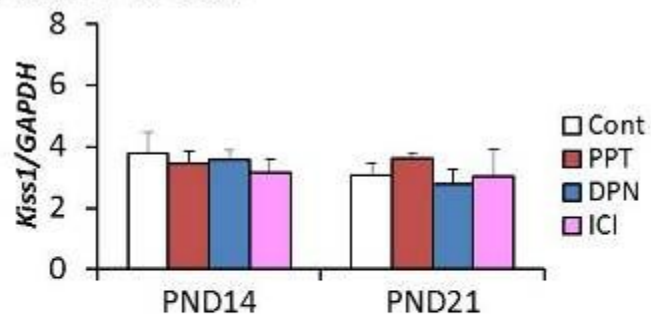


PPT、DPN、ICI 新生児期曝露動物の生後 14 日と 21 日における子宮腺の数

(A) 視床下部前部



(B) 視床下部後部

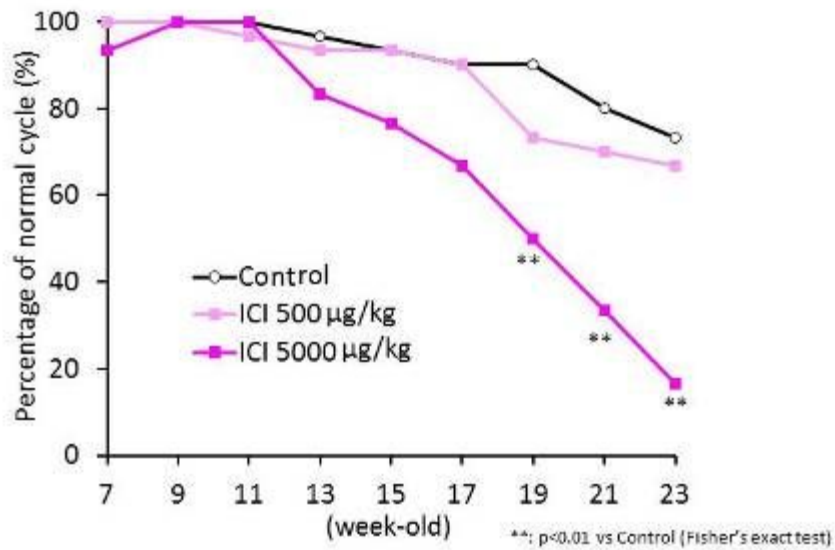


PPT、DPN、ICI 新生児期曝露動物の生後 14 日と 21 日の視床下部前部(A) および後部(B)における Kiss1mRNA 発現

### ICI新生児期曝露ラットにおける膣開口平均日齢と体重

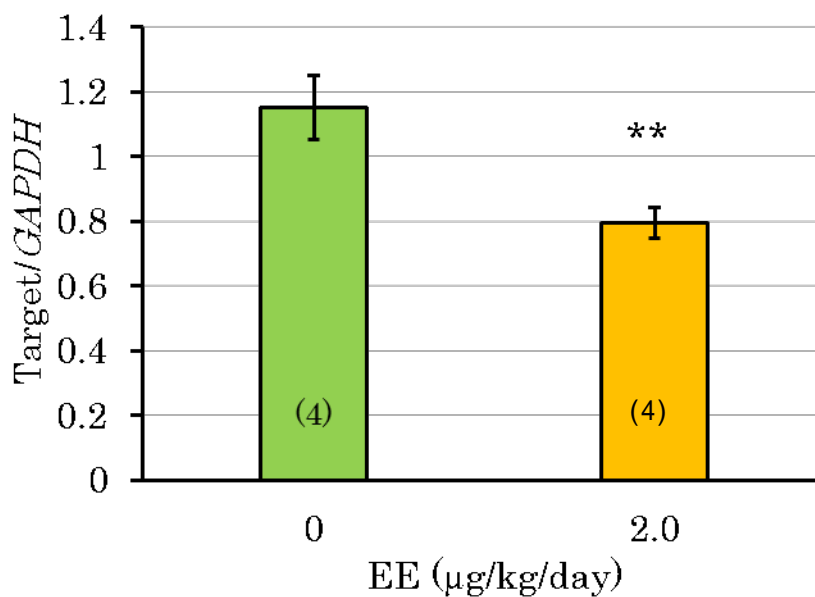
ICI 182,780 (μg/kg)	Postnatal day	Body weight (g)
0	28.0 ± 0.8	91.6 ± 7.4
500	27.6 ± 0.6 *	87.8 ± 5.8 *
5,000	27.3 ± 0.5 **	85.0 ± 6.1 **

(観察期間 生後27~30日)

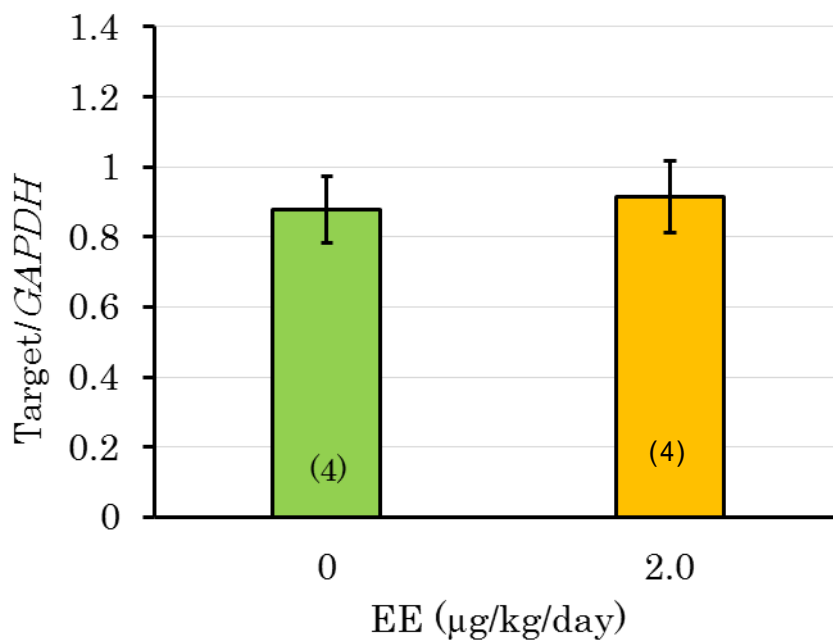


ICI 新生児期曝露ラットの正常性周期を示す動物の割合

(A) 視床下部



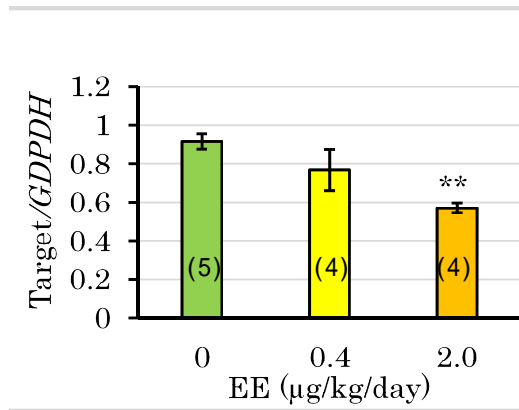
(B) 上部領域



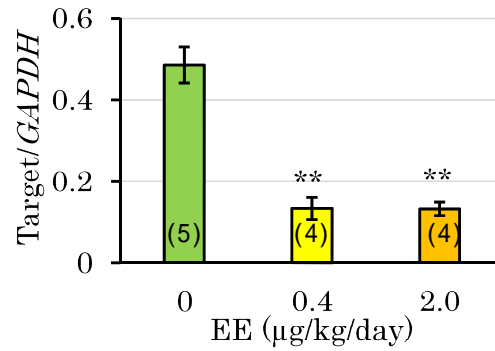
1日齢から5日間0または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの最終投与後24時間における視床下部(A)あるいはその上部領域(B)におけるER mRNAのGAPDH mRNAに対する相対発現量(平均±S.E.M)

(N) \*\*対照群との間に有意差あり(P<0.01)

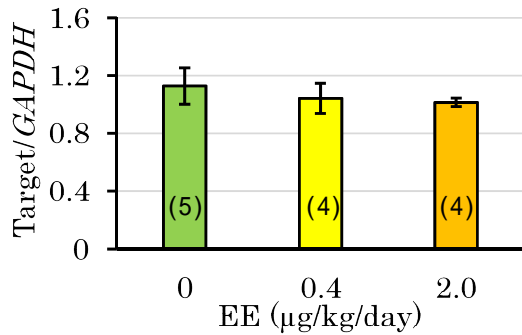
(A) *ER* mRNA



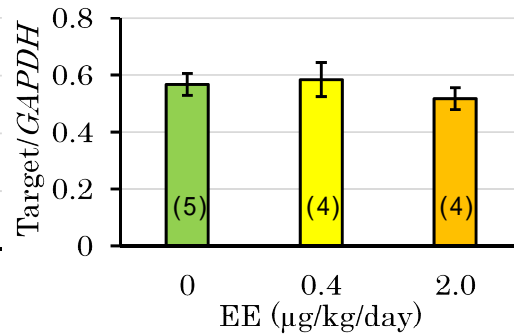
(B) *Kiss1* mRNA



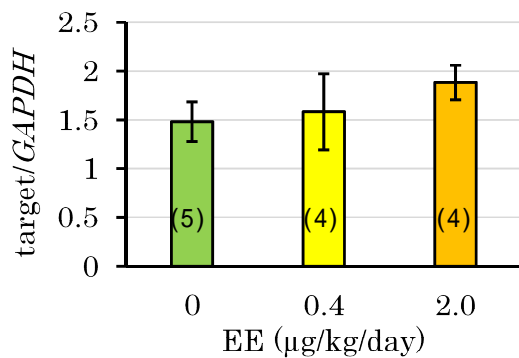
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Tac2* mRNA



(E) *Oprk1* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

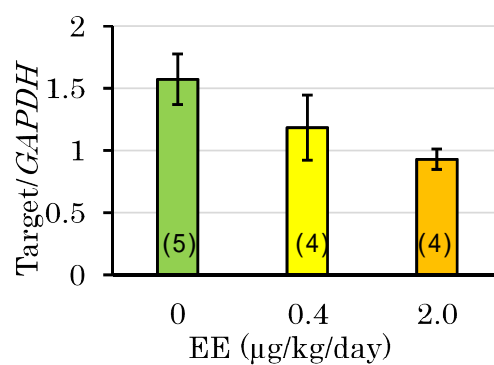
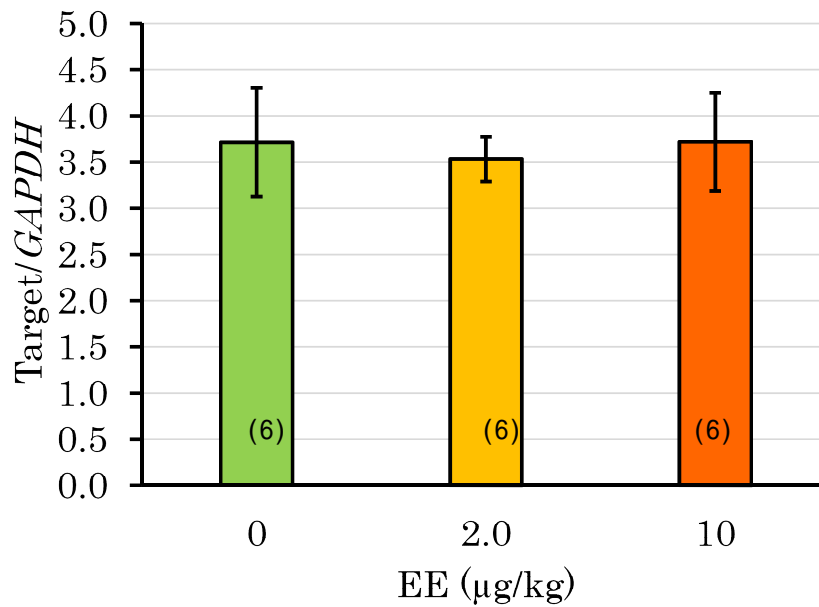


図4. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における mRNA(*ERα* (A)、*Kiss1* (B)、プロダイノルフィン(*Pdyn*) (C)、オピオイド受容体(*Oprk1*)、ニューロキニンBをコードする *Tac3* (E)ならびにその受容体をコードする *Tacr3* (F))の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M.) . (N) \*\*対照群との間に有意差あり (P<0.01)



(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

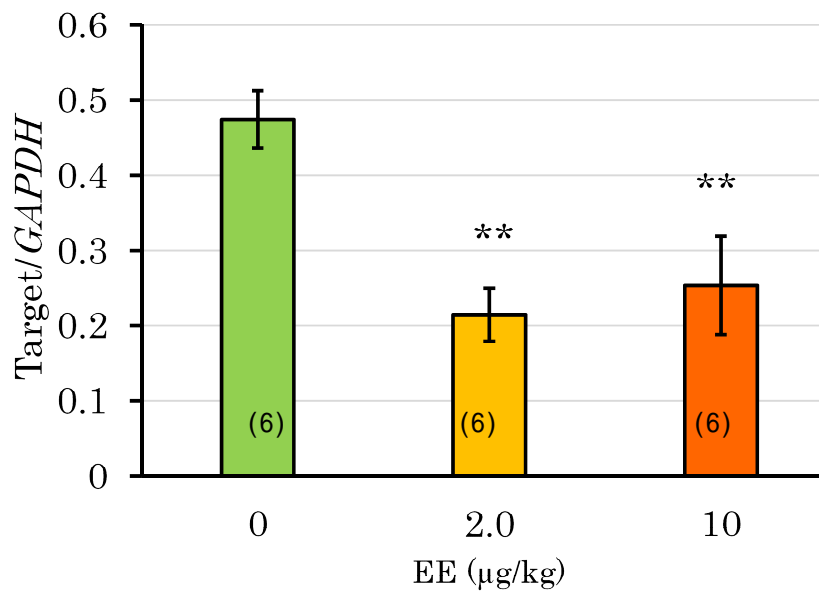
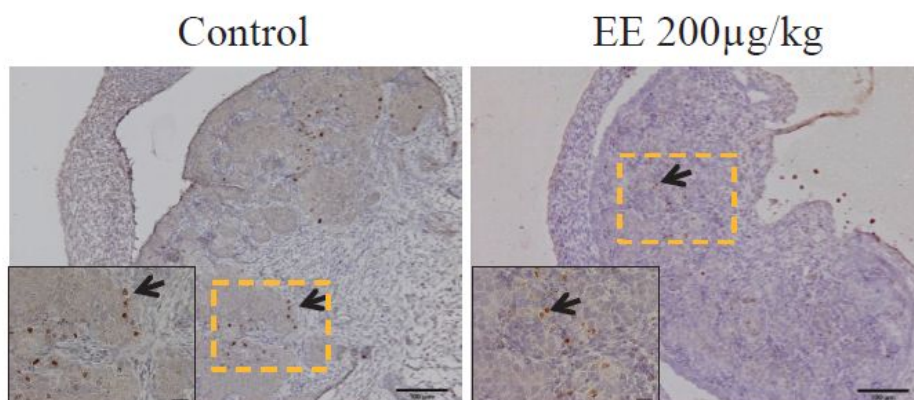
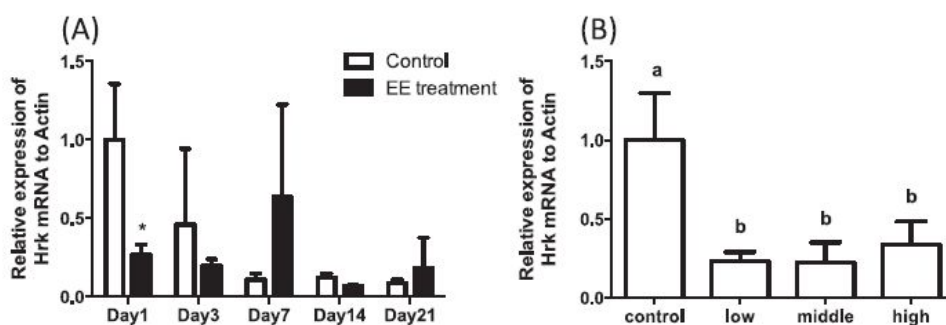


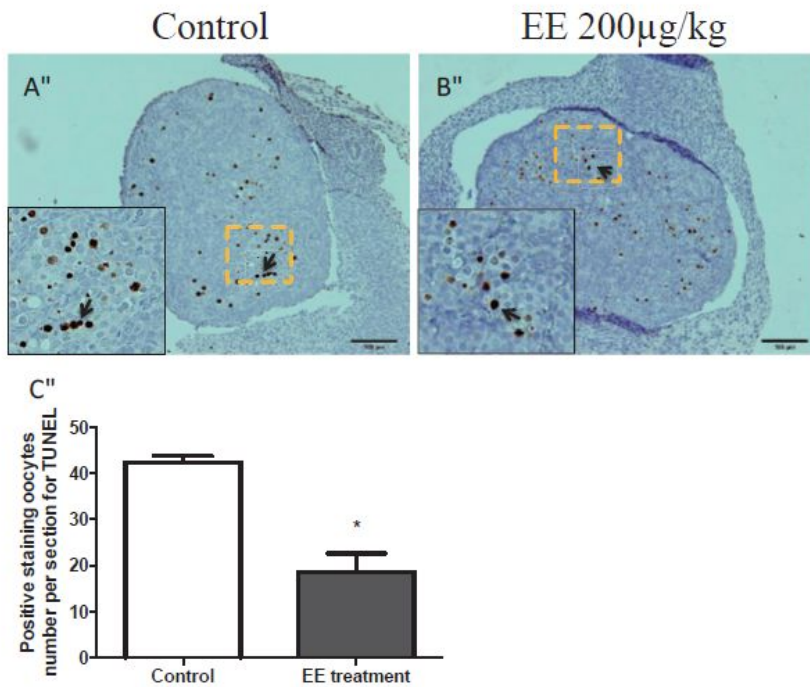
図7. 1日齢に0、2または10 μg/kgのエチニルエストラジオール(EE)を単回経口投与した雌ラット視床下部の投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M.)  
(N) \*\*対照群との間に有意差あり ( $P < 0.01$ )



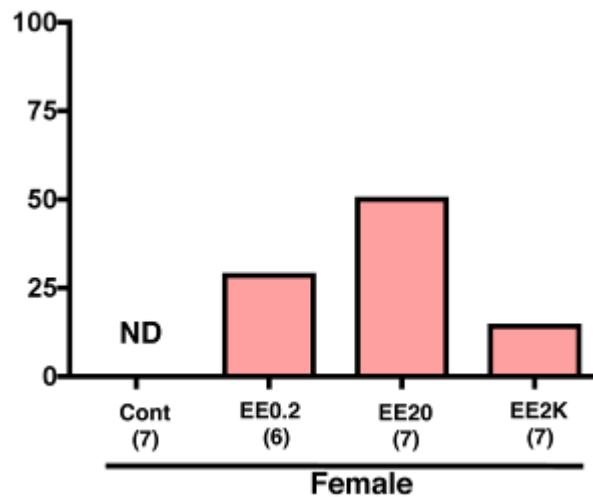
生後1日の対照群およびE E処置群 (200 $\mu$ g / k g) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。



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)。



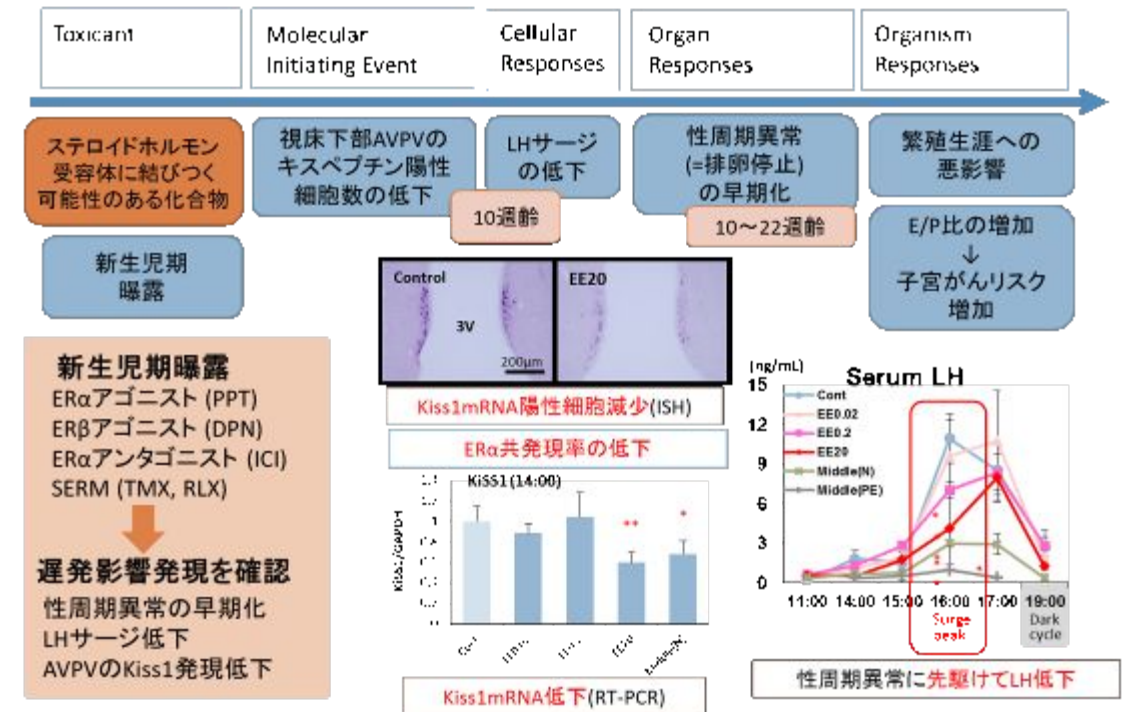
生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。\*は有意差有り(P<0.05)。



### 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

## **・ 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

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：市村亮平 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
吉田 緑 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

### 研究要旨

最終年度である今年度は以下の2点について解析を行った。

1. 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。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)の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た。その結果、ラット子宮に抗エストロゲン作用を示すタモキシフェン(TMx)およびラロキシフェン(RLX)それぞれ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 のほうが視床下部への影響は強かった。
2. 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)の構築を進めた。本研究の成果より、遅発影響の AOP は、視床下部サージ中枢キスペプチンニューロン抑制を molecular initiating event として、正常性周期より認められる LH サージ低下を key event に、AO には繁殖生涯への悪影響として性周期異常の早期発現を提案予定することが妥当であると結論した。本研究班の成果を踏まえ、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化学物質の新生児期ばく露に起因する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した。

### 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。

先行研究において、生後0日の雌性 Wistar Hannover ラットに 0.02 ~ 200 µg/kg の 17α-ethynylestradiol (EE) を単回皮下投与すると、性成熟後に遅発影響として 0.2 µg/kg 以上で性周期（排卵）の早期停止を起こすことを (Takahashi et al., 2013)、これらの新生児期曝露を受けたラットでは、性周期の早期異常発現に先立ち排卵制御中枢である視床下部前腹側周囲核 (AVPV) におけるキスペプチンニューロンの機能低下が生じていること (Usuda et al., 2014; Ichimura et al., 2015a)、および遅発影

響を起こす臨界期が脳性分化の高感受性期と考えられてきた生後0から5日ではなく生後10日曝露でも遅発影響が引き起こされることを報告した (Ichimura et al., 2015b)。AVPV のキスペプチンニューロンではエストロゲン受容体(ER)の発現低下が同時に認められたため ER の変調が同ニューロンの変化の引き金である可能性が示唆された。

そこで本年度はエストロゲン作用が遅発影響誘発に必須であるのか、抗エストロゲン物質も遅発影響を誘発可能なのか明らかにするため、selective estrogen receptor modulator (SERM)であるタモキシフェン(TMx)とラロキシフェン(RLX)をこれまでの研究と同様のプロトコルを用いてラット新生児に単回曝

露してキスペプチンの変化と支配下領域の生殖器の変化を検索した。

今年度の2点目の研究として、本研究により明らかになりつつある新生児期エストロゲン類曝露と遅発影響の機序と関連性をまとめるため、近年毒性発現機序を引き金からキーイベントを経て最終的な有害性に至るまでを記す概念図である adverse outcome pathway (AOP) (OECD, 2013; Villeneuve et al., 2014a,b) を遅発影響にあてはめ、遅発影響全体の流れ図の作成を試みた。また本研究班の成果を踏まえ、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化学物質の新生児期ばく露に起因する遅発影響を検出するため、既存の OECD テストガイドラインをどのように改善すべきか提言を試みた。

## B. 研究方法

### B-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

**実験1:** 生後24時間以内(PND0)のDonryu新生児雌ラットにTMX 10mg/kg bw、RLX 0.1, 1あるいは10 mg/kg bwを単回皮下投与し、対照群には溶媒であるセサミオイルのみを投与した。投与量は新生児期曝露により影響があると報告されている量を選択した(Pinilla et al., 2001; Pinilla et al., 2002)。遺伝的な因子を最小化するため同じ投与群の新生児は、投与後1腹雌雄併せて10匹ずつとなるよう無作為化して異なる母動物に哺乳させた。新生児雄にも同様の処置を施した。離乳後、1群あたり雌26匹を用いた。これらの雌は膣開口による性成熟および性周期等を観察し、10週齢にて各群10匹ずつを視床下部キスペプチンおよびLHサージの検索に用いた。すなわち、卵巣を摘出後、エストロゲンベンゾエート(EB)3日間とプロゲステロン(P4)最終日投与により人工サージを誘発し、試験実施設内の環境でLHサージ時刻と予想される夕方4時に剖検した。RIA法で血中黄体形成ホルモン(LH)および卵巣刺激ホルモン(FSH)を測定した。視床下部の部位別のキスペプチンの変化を観察するため、AVPVを含む視床下部前方と弓状核(ARC)を含む視床下部後方に分けて各部位のキスペプチン関連の遺伝子の変化(Kiss1, Kiss1receptor (Kiss1R), Gonadotropin

Releasing Hormone 1 (GnRH1、AVPVのみ)等をRT-PCR法で測定した(各群5例)。また形態学的にキスペプチンの変化を観察するため脳をバラホルムアルデヒドで還流固定後凍結し連続切片を作成してAVPVおよびARCに存在するKiss1遺伝子をin situ hybridization(ISH)法で検出し、ER $\alpha$ 抗体による免疫組織化学染色との二重染色を施し、それぞれの核における陽性細胞数を測定した(各群最大5匹)。これらの方法は以前の報告と同様の手法である(Ichimura et al., 2015a,b)。

残りの動物は26週齢まで性周期の変化について観察した。性周期観察は、5日間連続で膣スミアを採取し4~5日周期で定期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。26週齢まで観察後、すべての生存動物はイソフルラン深麻酔による放血殺により安楽死させ生殖器系の臓器を中心に形態学的観察を実施した。

**実験2:** TMXとRLXのエストロゲン作用の有無を確認するため、7週齢の無処置Donryu雌ラットの卵巣を摘出し、2週間後にTMX 10 mg/kg bwあるいはRLX 0.1, 1, 10 mg/kg bwを3日間皮下投与して子宮重量および子宮内膜の形態学的検査を行った(1群5匹)。子宮に対するエストロゲン作用を示し遅発影響発現量であるEE20  $\mu$ g/kgを陽性対照とした。さらにこれらのSERMがEEと同様に視床下部に対してエストロゲン作用を示すか検索するために、AVPVおよびARCのキスペプチンニューロン相当部位のKiss1遺伝子の発現をRT-PCRにて測定した。

**実験3:** 実験に用いたSERMの抗エストロゲン作用を確認するため、7週齢の雌Donryuラットを用いて実験2と同用量のSERMをEE1  $\mu$ g/kg bwとともに3日間連続投与し、子宮重量および子宮内膜の形態学的検索を実施した(1群5例)。また抗エストロゲン作用の陽性対照群としてICH182,780 500  $\mu$ g/kg bwをEE1  $\mu$ g/kg bwとともに3日間投与して比較した。

体重、臓器重量、血中LH濃度、Kiss1関連遺伝子の発現量および膣開口日齢は各群の分散をBartlett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検は Dunnett の方法で対照群との間で有意差検定を行った。正常性周期の割合は Fisher の直接確率法で検定した。有意差は 5%とした。

## B-2 .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, No1. 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)

また AOP 構築に用いた遅発影響に関連する文献を Table 1 にまとめた。

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. 一代繁殖毒性試験(TG415)  
<http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9741501e.pdf?expires=1456416463&id=id&accname=guest&checksum=4FCF49B246E619F1FCE5795467329900>
2. 二世繁殖毒性試験(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)

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. 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

実験 1:投与に関連した症状は観察されなかったが、体重変化において TMX 群では 11 週齢以降軽度な体重の高値で推移した。

**膣開口:** TMX 群と RLX 10mg/kg bw 群で膣開口の早期化および体重の有意な増加が認められた。そのほかの RLX 群は対照群と同様であった。

**性周期:**対照群では 18 週齢まで規則正しい性周期を示したが、その後持続発情を主とする異常周期を示す個体が増加し 26 週齢では正常周期を有する個体は 37.5%であった(Figure 1)。RLX 0.1 および 1 mg/kg bw 群は対照群とほぼ同様に推移した。

RLX10 mg/kg bw 群では早期より持続発情を主とする異常性周期が増加し 12 週齢では対照群に比し有意であった。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視床下部キスベプチン関連遺伝子の変化(実験 1) :

Figure 2 に AVPV を含む視床下部前部および ARC を含む後部における Kiss1、Kiss1R、

GnRH mRNA を、ISH により形態学的に測定した Kiss1 陽性細胞数を Figure 3(AVPV)および 4(ARC)に、ホルモン測定結果を Figure5 に示す。

視床下部前部の Kiss1 は RLX 投与では 10mg 群のみで有意差はないものの軽度に、TMX10 では明らかに低下し、RLX 群では変化が認められなかった視床下部後部でも TMX10 では明らかに低下していた。GnRH1 および Kiss1R はいずれの投与あるいは部位においても差は認められなかった。

ISH の染色結果より、AVPV の Kiss1 陽性細胞数が RLX10 および TMX10 で有意に低下し、TMX 投与で顕著であった。ARC では TMX 投与のみで有意に低下した。

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。

#### **RLX および TMX の子宮に対するエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部キス**

**ペプチンに対するエストロゲン作用(実験 2,3)**  
RLX および TMX の子宮に対するエストロゲンおよび抗エストロゲン作用を Figure 6 の A,B に、視床下部前部および後部の Kiss1 mRNA の変化を C に示した。

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 全投与群および 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。RLX 全投与群および TMX 投与とともに無処置成熟動物の視床下部前部および後部の Kiss1 発現量を増加させなかった。

#### **C-2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の AOP を構築および TG 改善への提言**

Table1 に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。

##### **4. 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**

##### **D-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**

得られた結果より以下のように考察した。

1. RLX10 投与で明瞭な性周期異常早期発現が認められたことより、RLX の新生児期曝露は遅発影響を誘発し、その発現は用量依存性である可能性が考えられた。また遅発影響発現量の RLX10 は視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現の低下、AVPV における Kiss1 陽性細胞数減少やサージ時の LH 低下等、エストロゲン新生児曝露と同様の結果が得られたことから (Ichimura et al., 2015)、RLX 新生児期曝露による遅発影響も AVPV におけるキスペプチンニューロンの変化が引き金であると推察した。
2. TMX 新生児期曝露による性成熟後早期からの性周期異常、AVPV および ARC における顕著な Kiss1 陽性細胞数の低下、LH サージ時の顕著な LH および FSH 低下および卵巣における黄体の欠如は、高用量のエストロゲン新生児期曝露により誘発された脱雌化と同様の結果である。したがって本実験の投与量の TMX の新生児曝露は、エストロゲン作用物質の同様、脱雌化を引き起こしている可能性が示唆された。遅発影響の発現は用量や投与時期との相関性があることが Takahashi ら(2013) や Ichimura ら(2015)で報告されていることから、さらに低い用量の TMX 新生児期曝露では遅発影響が誘発される可能性が示唆された。
3. 今回の投与量の TMX および RLX は子宮

に対しては明らかな抗エストロゲン作用を示し、成熟後の正常動物の視床下部キスペプチンを変動させなかった。この結果は、TMXあるいはRLXは新生児期にはエストロゲンと同様の機序で視床下部に作用し、遅発影響を起こすと考えられる一方、成熟後においてはエストロゲン様物質として視床下部に作用しないことを示唆している。

これら1~3の結果から、SERM新生児期曝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として働いていると考えられた。

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。

## D-2. 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

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)が血中のエストロゲン濃度の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と考えられていることから、新生児期遅発影響のMIEであると考えられた。

本研究結果よりMIEを誘発する化学物質は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も含まれることから、誘発物質はER結合物質とすることが適切であると考えられた。

しかし候補に挙げた変化のうち、視床下部ARCにおけるキスペプチンの低下は遅発影響量より、さらに高用量で誘発される脱雌化で

も観察されることから、KEから外した。

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、子宮がんの増加する可能性がある。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(KE)

繁殖生涯への悪影響(AO)/子宮癌リスク増加(AO)が考えられた。研究成果を盛り込んだ概念図を Figure 7 に示した。

### 既存の毒性試験 TG への提言

遅発影響の最も感受性が高く確実なエンドポイントが性周期観察による性周期異常の発現時期早期化であることから、同項目をエンドポイントとすることを提言する。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。

3つのTG内容を比較した結果、最も汎用されている二世世代繁殖毒性試験(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。1群あたりの匹数として、対照群であっ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、1群20例以上を推奨したい。また一世世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型1世代繁殖毒性試験(TG443)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、ERと結合する物質、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。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。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. SERMであるTMXあるいはRLXをラット新生児期に単回曝露した結果、エストロゲン物質と同様、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RLXでは遅発影響が誘発され、TMXでは

脱雌化が認められた。

2. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響のAOPとして、initiating molecular eventとしてサージ中枢視床下部キスペプチンニューロン抑制→key events: LHサージ低下→AO:性周期異常早期化(繁殖寿命への悪影響)を提案予定である。既存のTGに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。

### F. 研究発表

#### 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) 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.

#### 2. 学会発表

高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 $\alpha$ -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)

### G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 参考文献

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-ethinylestradiol on the estrous cycle

and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.

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*, **51**, 145-156, 2015a.

Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. *J. Vet. Med. Sci.* **76**(8): 1105–1110, 2014

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, 2015b.

Pinilla L, González LC, Gaytán F, Tena-Sempere M, Aguilar E. Oestrogenic effects of neonatal administration of raloxifene on hypothalamic-pituitary- gonadal axis in male and female rats. *Reproduction* **121**, 915-24. 2001.

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.

OECD. Guidance document on developing and assessing adverse outcome pathways. In Series on Testing and Assessment, No. 184, NoI. ENV/JM/MONO(2013)6 p.45, Organisation for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate Paris, France

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.* 2014b 142(2):312-20.

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.* 2014a, 142(2):321-30.

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.

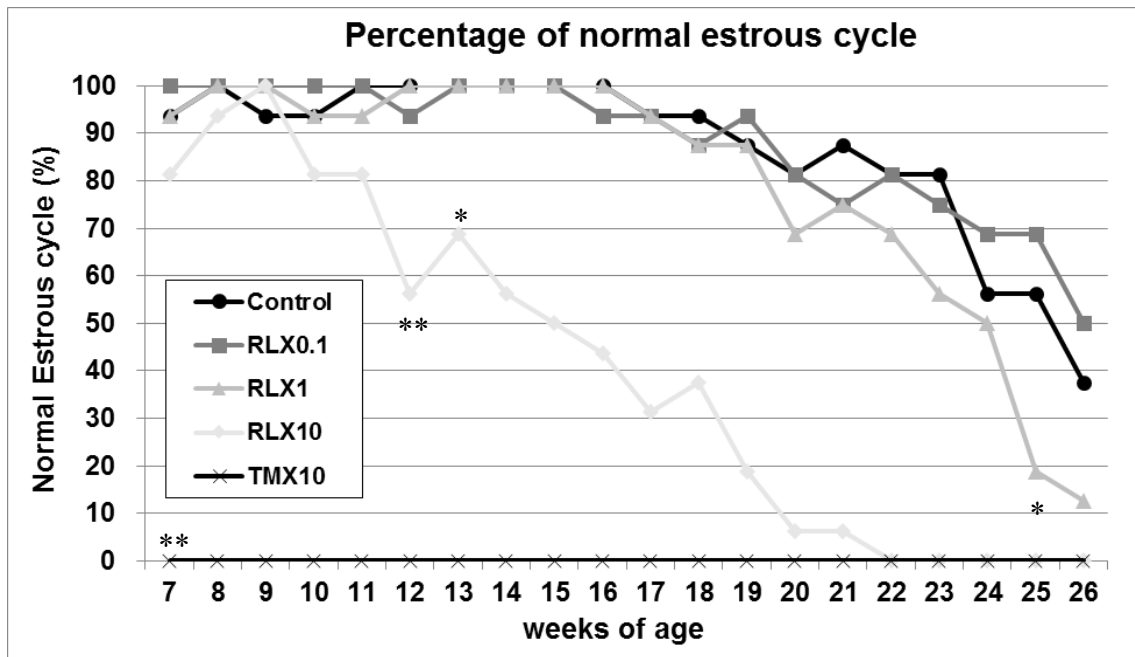


Figure 1. 正常性周期を示す個体の割合の推移

**AVPVを含む視床下部前方**

**ARCを含む視床下部後方**

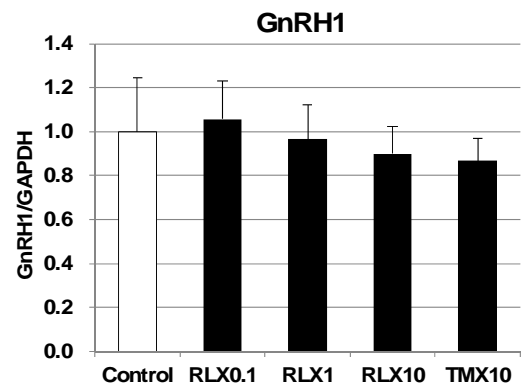
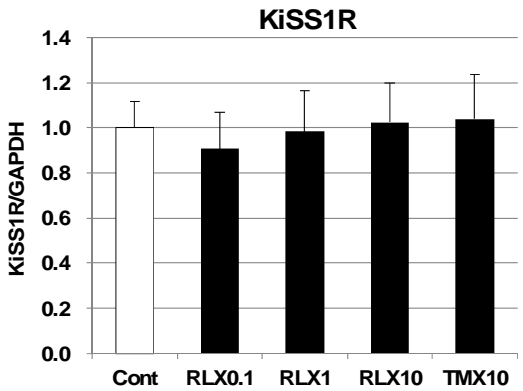
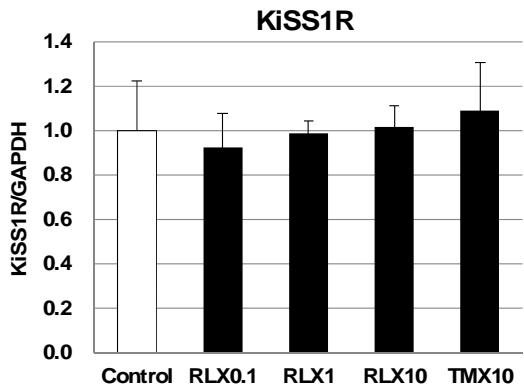
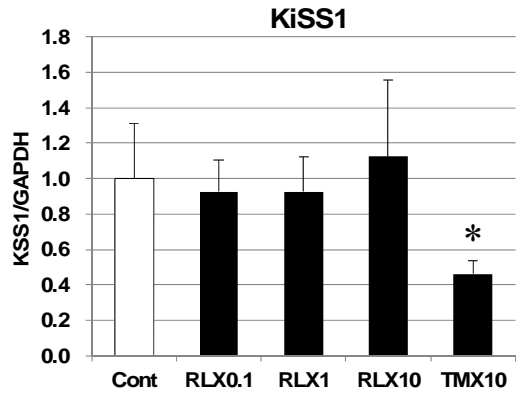
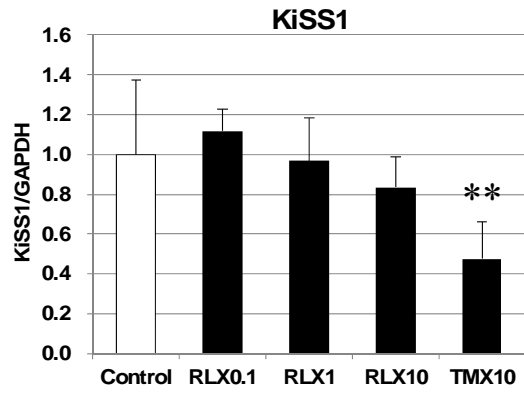


Figure 2 AVPVおよびARCにおけるKiss1, Kiss1RおよびGnRH (AVPVのみ)mRNAの発現

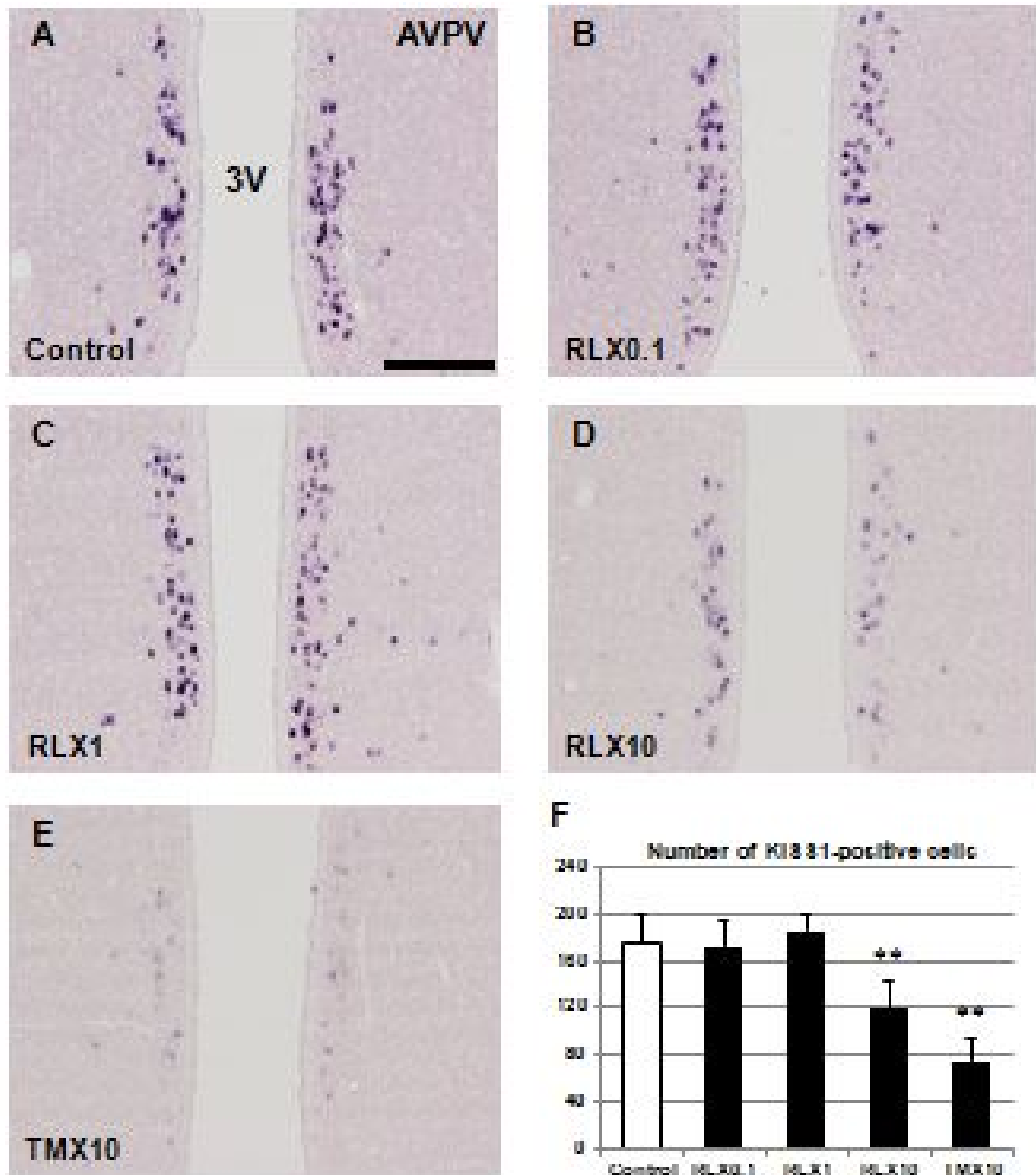


Figure 3. AVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較



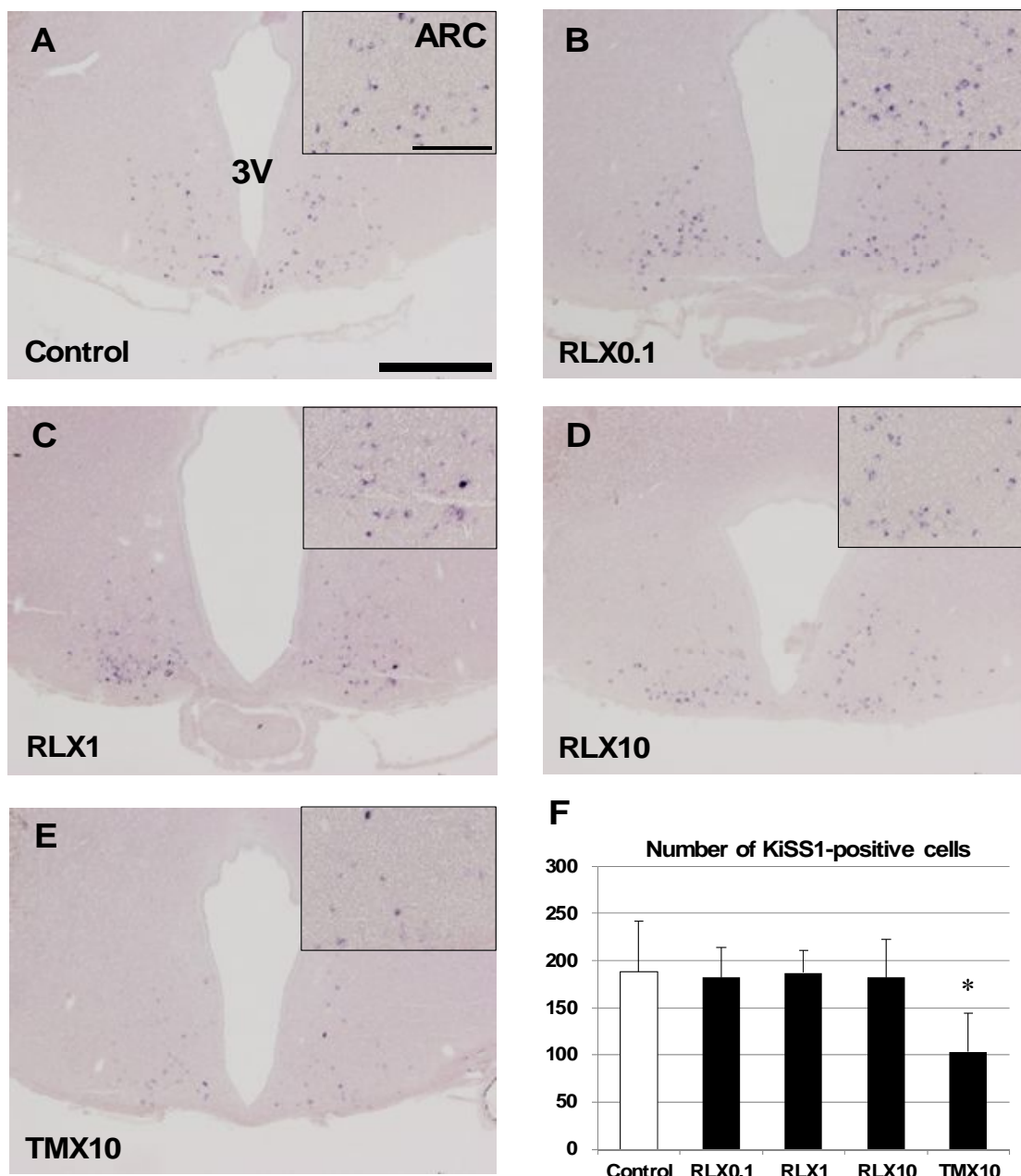


Figure 4. ARCを含む視床下部後方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較

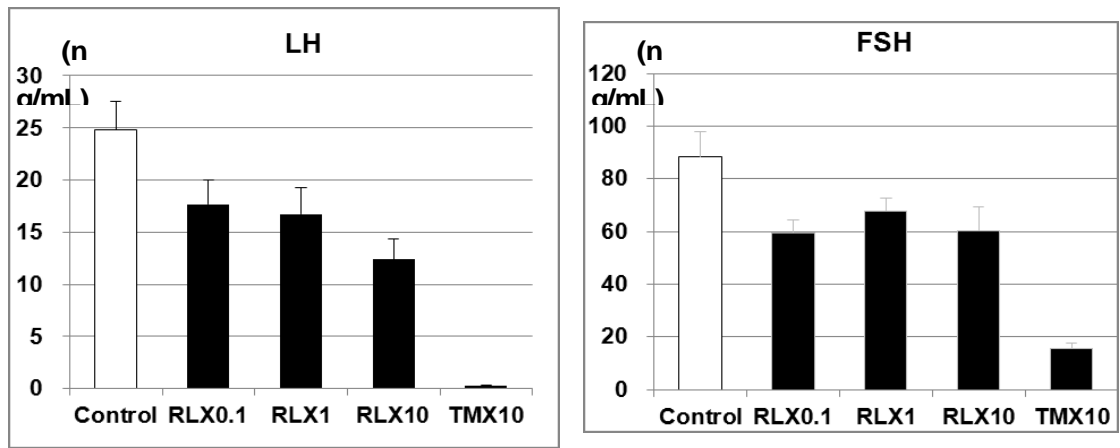


Figure 5. 誘発LHサージ時の血中LHおよびFSH値

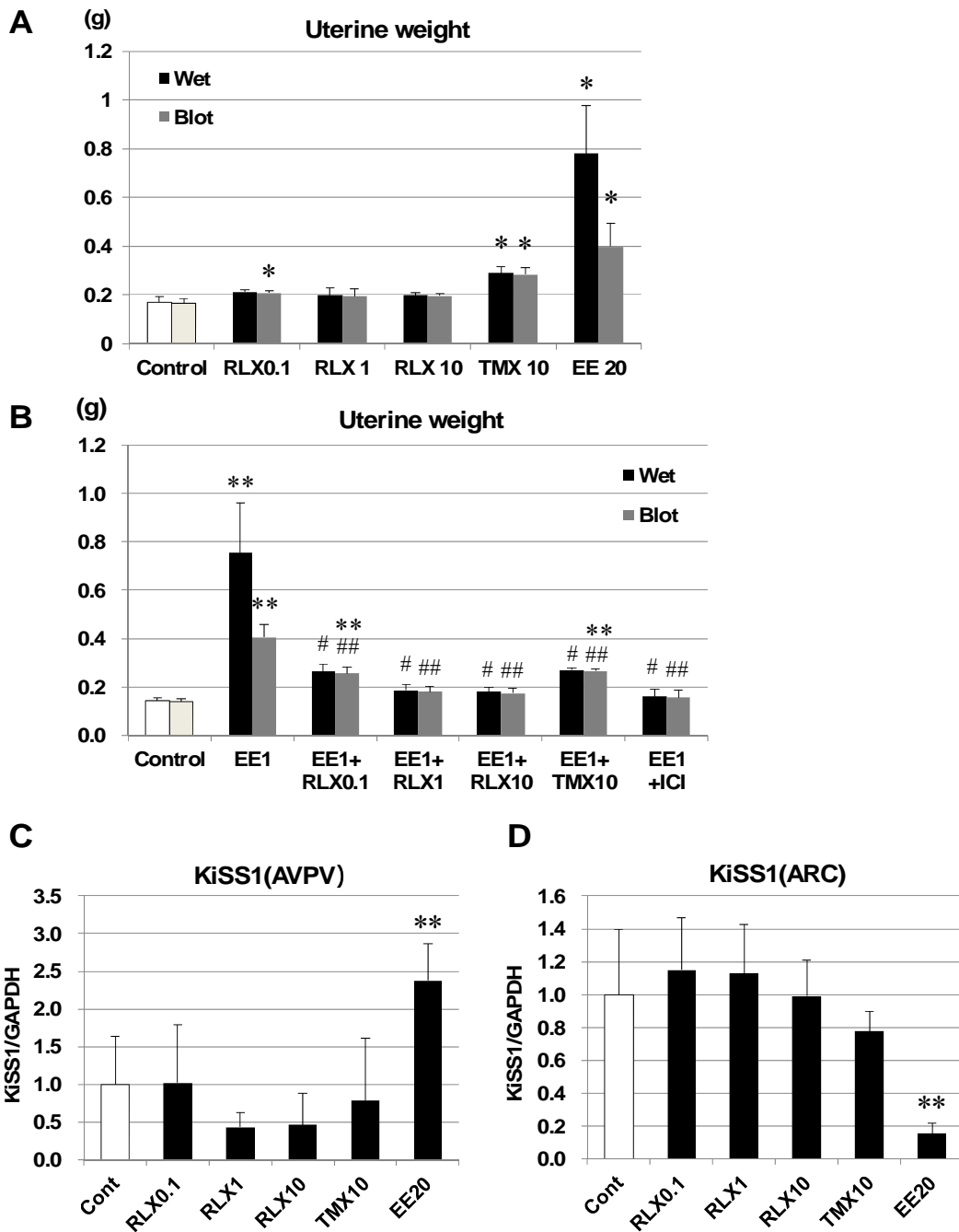


Figure 6. 成熟ラットの子宮に対するTMXとRLXのエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部に対するエストロゲン作用

Table 1 遅発影響AOP構築に用いた文献および本研究成果から得られた各指標

番号	文献	視床下部 キスペプチンの低下	L H サ ー ジ 低 下	異常 性周 期早 期発 現	その他
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 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. <i>Reprod Toxicol.</i> , <b>40</b> , 16-23, 2013.	(AVPV, ARC込)			子宮がんの増加傾向
2	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. <i>Reprod Toxicol</i> , <b>51</b> , 145-156, 2015.	(AVPV)			KiSS1/ER*陽性細胞の減少
3	Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> <b>76</b> (8): 1105–1110, 2014	(AVPV)			
4	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. <i>J Toxicol Sci.</i> , <b>39</b> , 775-784, 2014.	(AVPV)			離乳まで
5	Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. <i>J Toxicol Sci</i> <b>2012</b> ;37:681-90.				経口投与でも同様
6	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. <i>Biol Reprod.</i> , <b>93</b> , 32, 2015.	(AVPV)			生後10日齢で遅発影響

7	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. <i>Reprod Toxicol.</i> 57, 21-28, 2015.				卵巣交換で遅発影響は中枢影響を確認
8	Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. <i>Mol Endocrinol</i> 2011;25:2157-68.				
9	Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, Asai S, Nakae D, Kurokawa Y, Taya K, Maekawa A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. <i>Carcinogenesis</i> 2002;23:1745-50.				子宮癌増加
10	Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. <i>Toxicol Pathol</i> 2011;39:823-34.				子宮癌増加
11	Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. <i>Trends Neurosci</i> 2007;30:504-11.				視床下部キスペプチンが繁殖生理を制御
12	Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. <i>Rev Endocr Metab Disord</i> 2007;8:21-9.				AVPVのキスペプチンが性周期を制御
13	Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. <i>Endocrinology</i> 2006;147:1154-8.				AVPV,ARCのキスペプチンがサージ、パルス中枢を各々制御

# 遅発影響のAOP

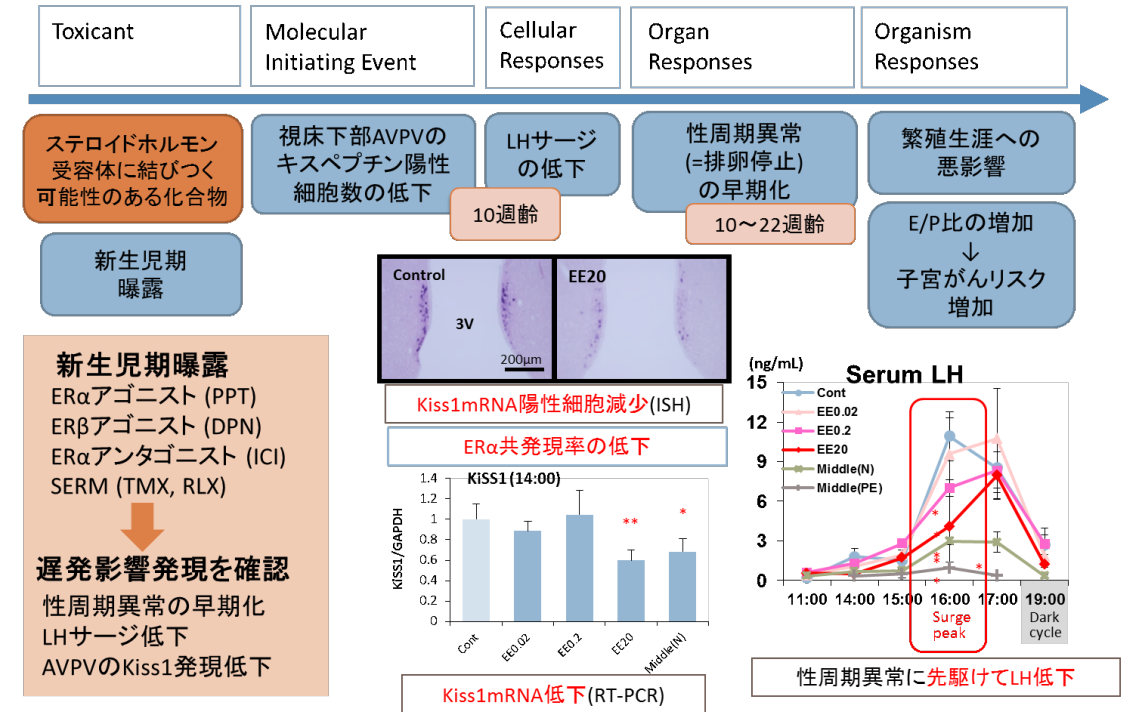


Figure 7. 遅発影響のAOP

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

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：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

遅発影響の発現に関わるエストロゲン受容体 (ER) の役割を明確にするため以下の検討を行った。

1. 卵巣摘出雌ラットを用いて、ER $\alpha$  アゴニストである PPT、ER $\beta$  アゴニストである DPN の子宮肥大試験を実施した。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。性周期への影響と照合すると子宮肥大試験の結果は遅発影響の発現と相関しないと考えられた。

2. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに PPT、DPN および ER $\alpha$  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。PPT、DPN、ICI の新生児期曝露は生後 14 および 21 日における Kiss1 mRNA の発現に影響せず、生殖器の発達に群間差はみられなかった。発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性周期停止と直結しないことが示唆された。

3. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに ICI 0、500、5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を 1 回皮下投与し、生後 23 週まで性周期の観察を行った。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 週以降では正常性周期の割合が対照群に比べて有意に低くなった。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。

### 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。

先行研究において、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、性成熟後に遅発影響として 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で性周期 (排卵) の早期停止を起こすことを報告した (Takahashi et al., 2013)。また、EE の新生児期曝露を受けたラットでは、性周期の早期停止に先行して、排卵制御中枢である視床下部前腹側周囲核 (AVPV) におけるキスペプチンニューロンの機能低下が生じていることを見いだしている (Ichimura et al., 2015)。昨年度には、新生児期 EE 曝露ラットの性成熟前

における Kiss1 mRNA 発現を解析した結果、視床下部前部 (AVPV に相当) では遅発影響量よりもさらに低い用量から Kiss1 mRNA の発現低下がみられ、AVPV のキスペプチンニューロンが EE の新生児期曝露に対して非常に高い感受性を持つことが示された。

一方、遅発影響の発現に関わるエストロゲン受容体 (ER) については、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、ER $\alpha$  が主要な役割を持つことは明らかである。しかし、非常に高用量の DPN では、PPT より作用は弱いものの、新生児期曝露によって性周期停止の早期化が認められ、遅発影響の発現における ER $\beta$

の関与の有無について結論を出すには至っていない。また、ER $\alpha$  アンタゴニストの新生児期曝露に関する検討は非常に限られている。

今年度は、遅発影響の発現に関わる ER の役割をさらに明確にするため、ER アゴニストおよびアンタゴニストを用いて、子宮肥大試験および新生児期曝露後の初期変化および性周期の観察を行った。

## B. 研究方法

### B-1. PPT, DPN による子宮肥大試験

OECD テストガイドラインに準拠して試験を行った(OECD TG 440)。6 週齢の雌性 Donryu ラットに卵巣摘出術を施した。14 日後、発情徴候がないことを確認した 36 匹を 6 群に分け、10%DMSO/sesame oil (溶媒対照)、PPT (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9) 100 および 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、DPN (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) 1,000 および 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (陽性対照) を 1 日 1 回・3 日間皮下投与した。投与用量、投与経路はこれまでにを行った遅発影響の観察結果を基に設定した。最終投与の 24 時間後にイソフルラン麻酔下で放血致死させた。子宮は膣とともに摘出し、脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度重量を測定した (blotted weight)。その後、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、子宮角全体を 5mm 間隔で横断し HE 標本作製した。左右子宮角の上・中・下部における子宮内膜上皮細胞の丈を計測し、6 か所の平均値をその動物の値とした。

### B-2. 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索

所内で維持している Donryu ラットを交配させ、同日中に自然分娩した 14 腹を実験に使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、生後 24 時間以内に児動物を全て回収・混合し、12 匹の母動物に雌児動物を優先的に 8 匹/腹ずつ割り付けた。溶媒である 10%DMSO/sesame oil 5mL/kg (対照群)、PPT 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (PPT 群)、DPN 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (DPN 群) および ICI 182,780 (Sigma, CAS No.

129453-61-8) 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ICI 群) を 3 腹/群の児動物に 1 回皮下投与した。PPT および DPN の投与用量は、先行研究において性周期停止の早期化を起こす用量に設定した。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。

生後 9、14 および 21 日に各群 5 匹の雌児動物について、体重を測定後、性ホルモン測定のため断頭採血し、血清を凍結保存した。生後 14 および 21 日では、脳、下垂体、卵巣・子宮・膣を摘出した。脳は視床下部を切り出し、視交叉を境界として前部 (AVPV に相当) と後部 (弓状核 (ARC) に相当) に分けて液体窒素で急速凍結した。比較のため、対照群の雄ラットについても同様に視床下部の組織を採取した。脳以外の臓器は 10%リン酸緩衝ホルマリンに浸漬した。組織固定後に卵巣および子宮重量を測定し、定法に従って HE 染色標本作製し、鏡検した。子宮角は 3mm 間隔で横断し、全ての切片について子宮腺の数を計測した。

Follicle-stimulating hormone (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)。

生後 14 および 21 日の視床下部前部および後部における遺伝子発現は real-time RT-PCR で解析した。Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を使用して凍結組織から total RNA を抽出した。Total RNA 2  $\mu\text{g}$  を鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による cDNA 合成を行い、ABIPRISM 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。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914\_ml, KISS1 receptor (Kiss1r): Rn00576940\_ml。内部標準である GAPDH の測定には、TaqMan $\text{\textcircled{R}}$  Rodent GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems) を用いた。各遺伝子の発現量を標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。生後



14日の視床下部前部における対照群の値を1として、相対的な発現量を算出した。

### B-3 .ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

所内で維持している Donryu ラットを交配させ、同日中に自然分娩した15腹を実験に使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、生後24時間以内に児動物を全て回収・混合した。12腹には雌児動物を優先的に8匹/腹に割り付け、1群4腹の児動物に sesami oil 5mL/kg (溶媒対照)、ICI 182,780 (ICI) 500 および 5,000  $\mu$ g/kg を1回皮下投与した。残りの3腹には雄児動物を優先的に割り付け、ICI 5,000  $\mu$ g/kg を1回皮下投与した。投与後2、4、24時間における肝臓および脳組織内の濃度を(財)日本食品分析センター(東京)に依頼し、LC-MS/MS法で測定した(定量限界0.01 ppm)。肝臓および脳は3例分の組織を一括して分析に使用した。

雌児動物は生後21日で離乳し、各群30匹に調整した。実験期間中、臨床観察および体重測定を毎週実施した。生後27~30日には膣開口の有無を観察し、膣開口を認めた日の体重を測定した。

7週齢から23週齢まで隔週で性周期の観察を行った。5日間連続で膣スメアを採取し4~5日周期で定期的に発情が回帰する場合は正常性周期、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日間連続した場合は持続発情とした。

### B-4 .統計学的解析

体重、臓器重量、血清FSH濃度、子宮腺の数、遺伝子発現量および膣開口日齢は各群の分散を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検はDunnnettの方法で対照群との間で有意差検定を行った。子宮肥大試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. PPT, DPN による子宮肥大試験

解剖時の体重に群間差は認められなかった。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  $\mu$ g/kg から、blotted weight では100  $\mu$ g/kg から有意な増加を示した(図1)。同様に、子宮内膜上皮細胞丈も用量依存性に増加し、1,000  $\mu$ g/kg において統計学的有意差が認められた。DPN群では、PPT群に比べて増加の程度は小さいが、10,000  $\mu$ g/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。

### C-2. 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索

途中解剖において、体重に統計学的有意差が散見されたが、一定の傾向や継続性はなく偶発的变化と考えられた(data not shown)。

血清FSH濃度は、PPT群では生後9日、その他の群では生後14日に最も高くなった(図2)。いずれの日齢においても対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。

卵巣および子宮重量の結果を図3に示す。PPTおよびDPN群では生後14日において、卵巣の相対重量が有意に低下した。

雌性生殖器の組織像を図4に示す。生後14日の卵巣では、原始卵胞から小型胞状卵胞までの卵胞が観察された。生後21日では小型胞状卵胞の径がより大きくなり、一部で大型胞状卵胞の出現が観察された。卵胞の発育段階は各群とも同程度であり、子宮および膣の組織像にも、投与による影響は認められなかった。生後14および21日における子宮腺の数に群間差はなかった(図5)。

視床下部前部および後部におけるKiss1 mRNA発現レベルを図6に示す。視床下部前部では、PPT群で発現レベルが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。視床下部後部におけるKiss1 mRNA発現は、

投与による影響はみられなかった。Kiss1 receptor の発現については、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)。

### C-3. ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

新生児ラットに皮下投与後 2、4、24 時間における肝臓および脳内の ICI 濃度を表 1 に示す。

各群の発育はほぼ同様に推移し、生後 23 週までの平均体重に群間差はみられなかった (図 7)。

生後 27 ~ 30 日の観察期間において、膣開口の平均日齢は ICI 群で用量相関性に早まり、膣開口時の平均体重は ICI 群で低値を示した (表 2)。

性周期の観察結果を図 8 に示す。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、正常性周期の割合が減少した。19 週以降では対照群と有意差が認められた。ICI 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

## D. 考察

### D-1. PPT、DPN による子宮肥大試験

PPT 群では用量依存性に子宮重量および子宮内膜細胞丈の増加が明らかであった。Wet weight において 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から有意差が認められ、今回の試験条件では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で *in vivo* エストロゲン活性を持つことが示された。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、DPN も *in vivo* エストロゲン活性を有するものと考えられた。

DPN は ER $\alpha$  より ER $\beta$  に対して約 70 倍の結合親和性、約 170 倍の転写活性を示し (Meyers et al., 2001)、ER $\beta$  選択的アゴニストとして使用されているが、ER $\alpha$  への作用が全くないわけではない。子宮肥大作用には主に ER $\alpha$  が関与すると考えられており (Harris et al., 2002)、DPN 群で観察された子宮重量や内膜上皮細胞丈の増加は ER $\alpha$  を介して生じた可能性が高い。したがって、前年度の研究において、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ず、ER $\beta$  の関与につい

て別の検討が必要であると考えられた。

一方、性周期に対する作用は、DPN 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と PPT 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で同程度であるが、子宮重量や内膜上皮細胞丈に対する作用には大きな差があった。また過去の検討において、PPT 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では性周期停止の早期化を認められていないが、子宮肥大試験では陽性結果を示し、遅発影響の発現は子宮肥大試験の結果とは関連しないことが示された。

### D-2. 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索

昨年度の研究において、EE の新生児期曝露では、最も低い用量から視床下部前部の Kiss1 mRNA の発現が低下し、AVPV のキスペプチンニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。同様に、生後 14 日における Kiss1 mRNA の発現低下は先行研究でも認められている (Takahashi et al., 2014)。一方、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では、生後 14 および 21 日の Kiss1 mRNA レベルに対照群との有意な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 のみで Kiss1 mRNA 発現低下が観察され、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。

卵巣重量の一部で有意な低値がみられたが、雌性生殖器官の発育に群間差はみられなかった。EE の新生児期曝露においても脱雌性化に達しない用量では、FSH 濃度、雌性生殖器官の発育に差はみられず、これらのパラメーターは性周期の早期停止の予測には直結しないことが示されており、これと一致する結果であった。

### D-3. ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

新生児ラットにおいて、皮下投与した ICI が脳内に分布することを確認し、24 時間後の脳内濃度は成熟ラットを用いた報告と同程度と考えられた (Alfinito et al., 2008)。

本検索において、ICI 群の膣開口日齢が用量相関性に早まったが、過去の報告では膣開口への影響はみられていない (Pinilla et al., 2002)。今回は観察期間が限られており、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。

性周期の観察において、5,000 µg/kg 群では加齢に伴って正常性周期の割合が低下し、ICI の新生児期曝露が性周期の早期停止を起こすことが示された。これは Pinilla らの報告と一致する (Pinilla et al., 2002)。また、性周期への影響は不明であるが、抗エストロゲン作用を持つ CI628 の新生児期曝露により卵巣の機能障害や性行動への影響が報告されている (McEwen et al., 1977)。CI628 は弱いエストロゲン作用も併せ持つことから、これが脳の性分化に影響したと考えられている。ICI は ER $\alpha$  のアンタゴニストであるが、特定の条件下ではアゴニスト作用を示すことが報告されている (Robertson et al., 2001; Alfinito et al., 2008)。したがって、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が考えられる。また、ICI は膜結合型 ER である GPR30 のアゴニスト作用を有することが知られており (Prossnitz et al., 2008)、GPR30 の関与を含め、ICI による遅発影響の詳細な発現機序についてはさらに検討が必要である。

## E. 結論

ER $\beta$  アゴニストである DPN は、ごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示された。性周期への影響と照合すると、子宮肥大試験の結果は遅発影響の発現と関連しないと考えられた。

PPT、DPN、ICI の新生児期曝露は生後 14 および 21 日における Kiss1 mRNA の発現に影響せず、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性周期停止と直結しないことが示唆された。

ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI 182,780 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。

## F. 研究発表

### 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- Ethynylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.

- 2) 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
- 3) 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.

### 2. 学会発表

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 回日本毒理学学会学術年会 (2015.6)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

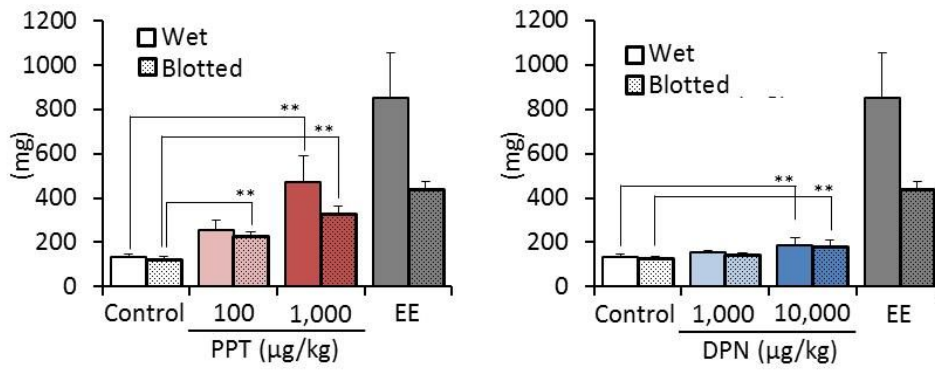
なし

## 参考文献

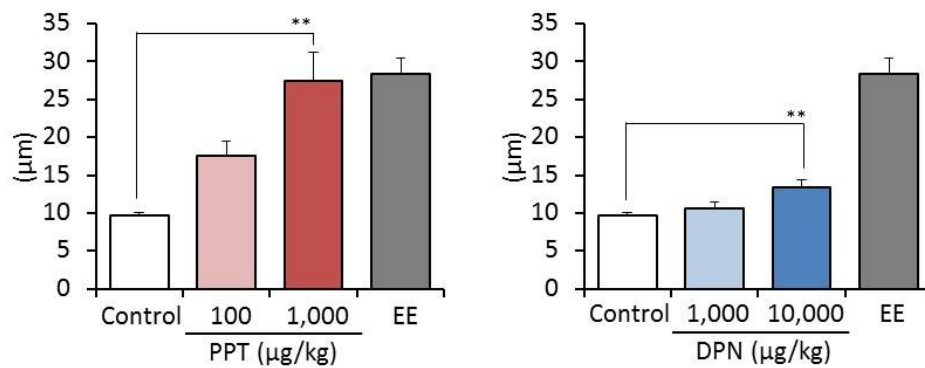
- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology*, **149**, 5219-5226, 2008.
- 2) Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERalpha-selective ligand. *Endocrinology*, **143**, 4172-4177, 2002.
- 3) 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.*, **51**, 145-156, 2015.
- 4) McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm Behav.*, **9**, 249-263, 1977.
- 5) 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.
- 6) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG440): Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, 2007.
  - 7) 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.
  - 8) Prossnitz ER, Sklar LA, Oprea TI, Arterburn JB. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci.*, **29**, 116-123, 2008.
  - 9) 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.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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.

### (A) 子宮重量



### (B) 子宮内膜細胞丈



n=6/group \*\* : p<0.01 vs control (Dunnett)

図1. 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)

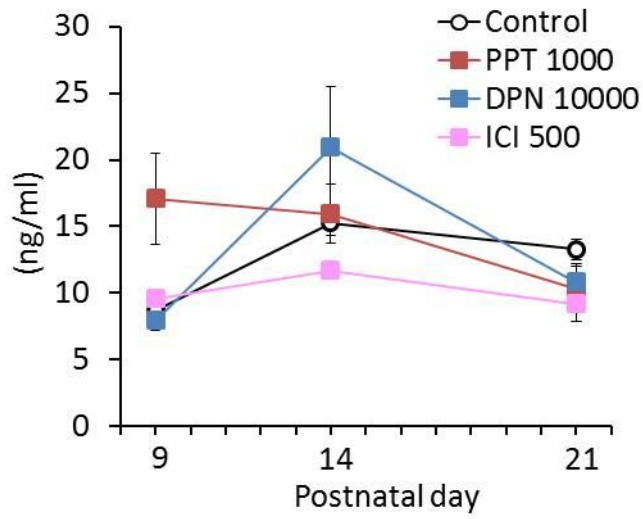
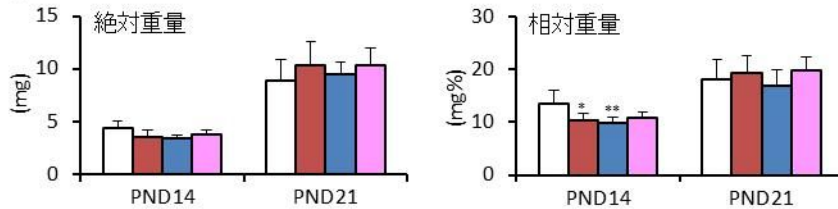
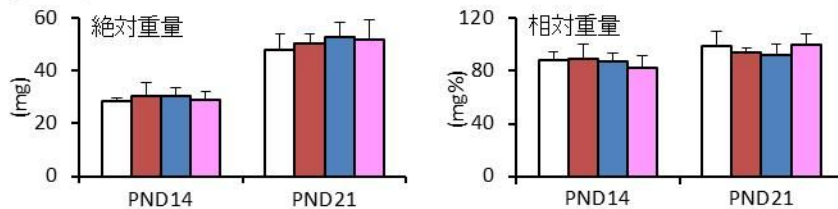


図2. 血清FSH濃度

(A) 卵巣重量



(B) 子宮重量



Cont PPT DPN ICI \*, \*\*: p<0.05, 0.01 vs Control (Dunnett test)

図3. 卵巣 (A)および子宮重量 (B)

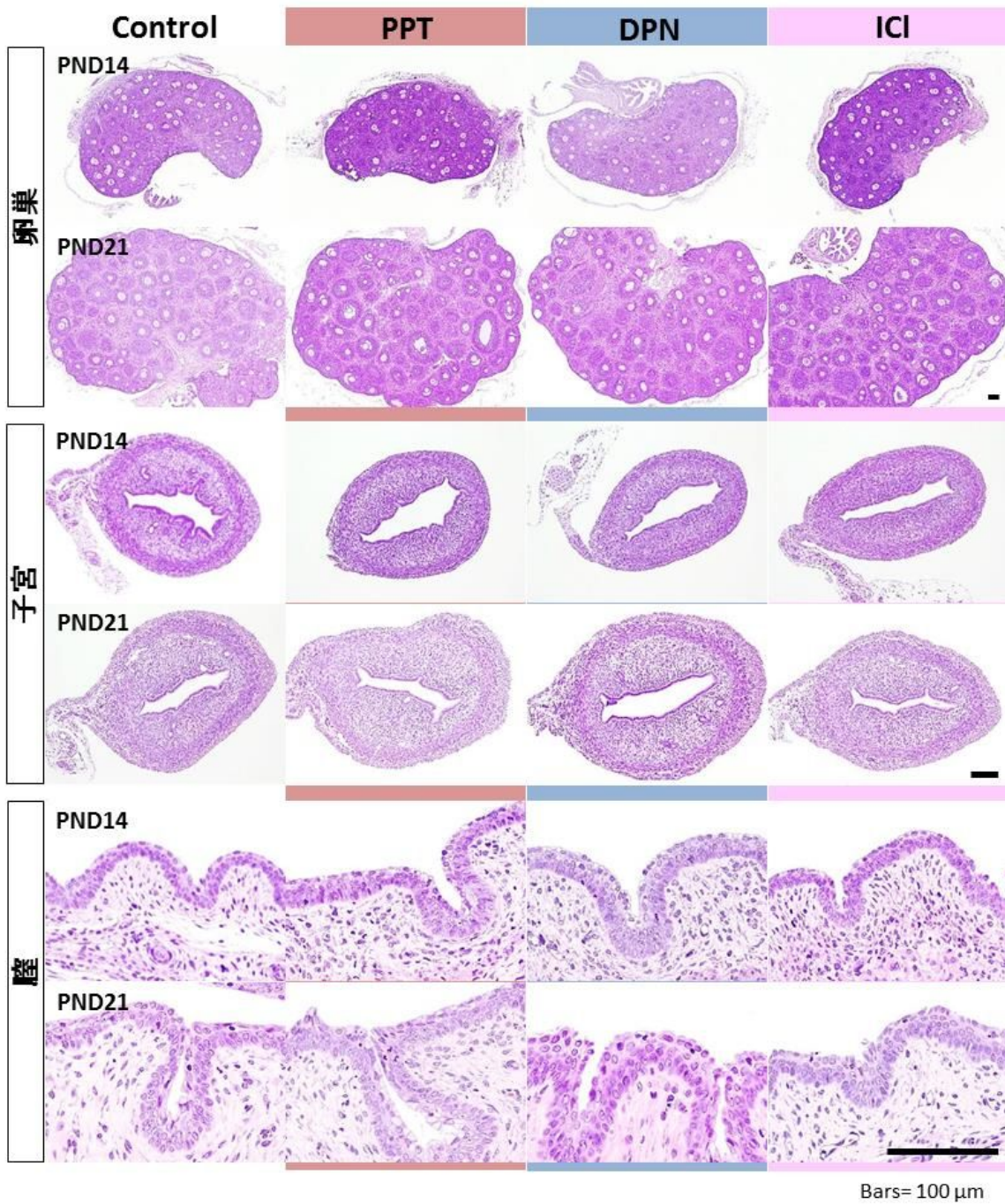


図4. 生後14および21日における卵巣・子宮・膣の組織像

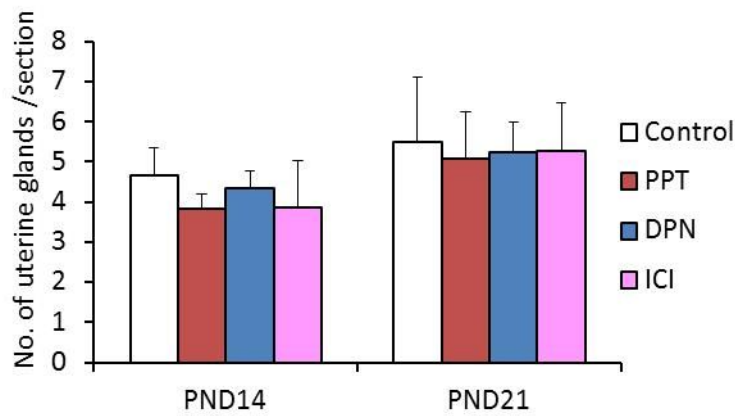


図5. 生後14および21日における子宮腺の数

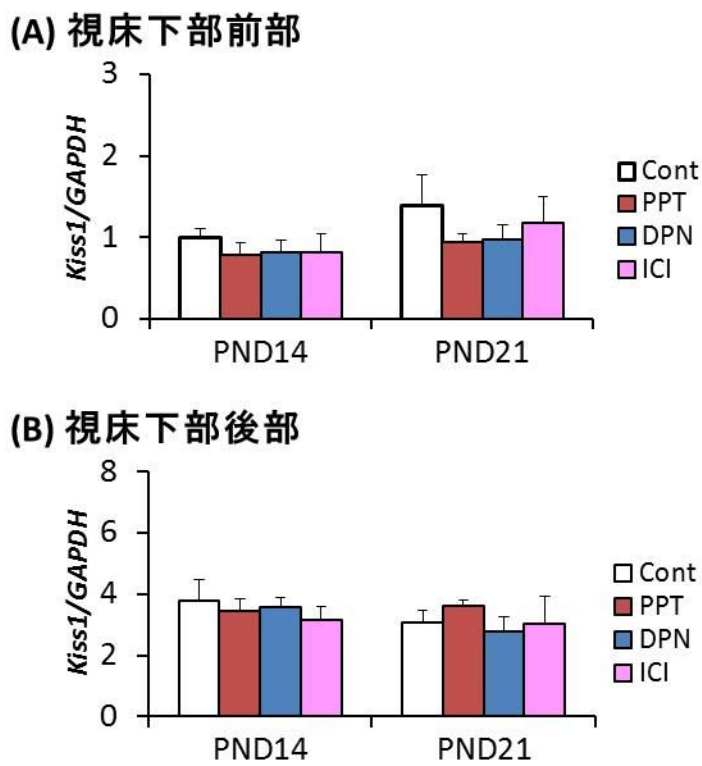
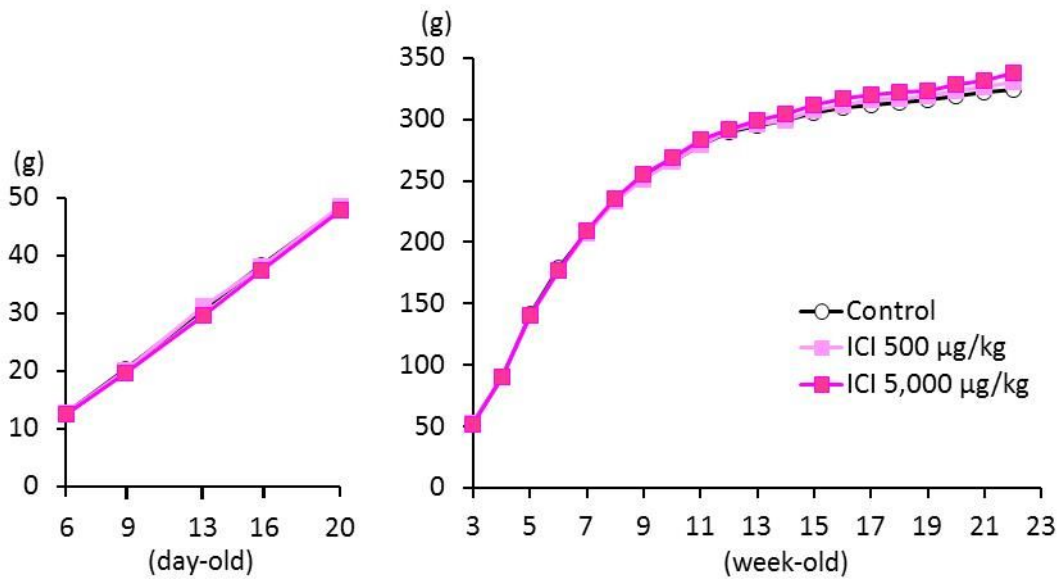


図6. 視床下部前部 (A) および後部 (B) における Kiss1 mRNA発現



**表1. 肝臓および脳内のICI濃度**

(h)	Liver (ppm)	Brain (ppm)
2	0.07	0.02
4	0.07	0.03
24	0.04	0.05

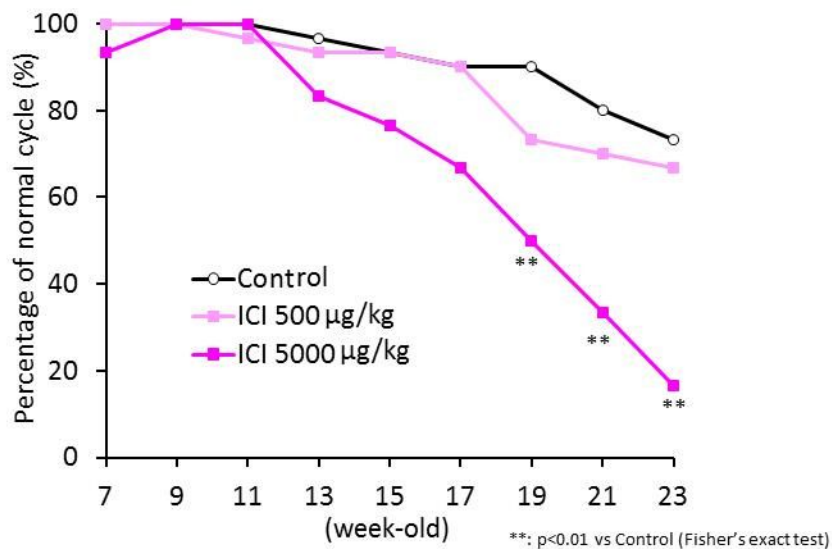


**図7. ICI新生児期投与後の体重推移**

**表2. 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 (μg/kg)	Postnatal day	Body weight (g)
0	28.0 ± 0.8	91.6 ± 7.4
500	27.6 ± 0.6 *	87.8 ± 5.8 *
5,000	27.3 ± 0.5 **	85.0 ± 6.1 **

(観察期間 生後27~30日)



**図8 正常性周期を示す動物の割合**

平成 27 年度 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

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。特にキスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係  
-遅発影響と閾値の関連性-

研究分担者：	代田 真理子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	渡辺 元	東京農工大学農学部
研究協力者：	束村 博子	名古屋大学農学部
研究協力者：	上野山 賀久	名古屋大学農学部
研究協力者：	代田 欣二	麻布大学獣医学部
研究協力者：	上家 潤一	麻布大学獣医学部
研究協力者：	田中 恵	麻布大学獣医学部
研究協力者：	鈴木 美帆	麻布大学獣医学部
研究協力者：	長谷川 雄太	麻布大学獣医学部
研究協力者：	田中 啓陽	麻布大学獣医学部
研究協力者：	古澤 理沙	麻布大学獣医学部
研究協力者：	吉河 佑莉	麻布大学獣医学部

研究要旨

エストロゲン活性化学物質のモデル化合物である 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE)を、新生雌ラットに単回又は 5 日間反復経口投与すると、エストロゲンの生理的変動範囲と同等以下の血中濃度でも、生殖内分泌機能に不可逆的遅発影響を及ぼし、その出現時期は用量に逆相関し、生殖機能の発達に伴い表現型が変化することが明らかになった。今年度は、遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義を明らかにするために、新生期にこの用量の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エストロゲン $\alpha$ 受容体(ER $\alpha$ )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。

その結果、遅発影響の最小影響量 (0.08  $\mu$ g/kg/day) 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 *ER $\alpha$*  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。新生ラットの視床下部では、*Kiss1* は LH パルスを起動する視床下部弓状核の *Kndy* ニューロンにのみ発現していることから、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が示唆された。

A . 研究目的

主要な器官の形成が終わった胎児期から新生児期までは、ヒトにおいても動物においても高次機能が分化発達する重要な時期と

いえる。

我々は、この時期の化学物質曝露の影響とそのメカニズムを明らかにするために、エストロゲン活性評価の陽性対照物質である EE

をモデル化学物質に選定し、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる新生雌ラットに EE を経口投与してその影響を検討し、この時期の EE 曝露は性成熟後の性周期回帰停止を始めとする様々な遅発影響を及ぼすことを報告してきた。特に、基底レベル以下のエストロゲンに相当すると考えられる血中 EE 濃度でも、性成熟後に性周期の回帰が停止し、卵巣に嚢胞状卵胞が形成されること、ならびに嚢胞状卵胞形成の最小用量は、子宮肥大試験の検出感度を下回ることを確認した。このような遅発影響は、視床下部/下垂体/性腺軸の変化に起因した生殖内分泌機能の変化を反映しているものと考えられる。

今年度は最終年度として、嚢胞状卵胞のみを増加させる遅発影響の生殖毒性学的意義を調べ、前年度得られた閾値の妥当性を検討することとした(実験1)。また、性周期回帰停止前の時期は、卵巣ではエストロゲン合成の律速酵素である aromatase を含む性ステロイド合成酵素遺伝子の発現亢進が認められたにもかかわらず、エストロゲンのフィードバックを受けて GnRH 分泌を上位から直接制御するキスペプチンを分泌する視床下部弓状核(ARC)および前腹側脳室周囲核(AVPV)における *Kiss1* 遺伝子はエストロゲンによるフィードバックが減弱した発現変化を示した。また、エストロゲンによるネガティブフィードバックを受ける ARC により駆動される LH パルスも大きくなり、視床下部および下垂体と卵巣との間で変化の方向に不一致が認められ、視床下部/下垂体/性腺軸の異常が、性周期早期回帰停止に関与している可能性が示唆された。そこで実験2では、遅発影響をもたらす EE による視床下部の初期変化を明らかにすることを目的とし、これまでの研究で得られた、用量と影響との関係および投与日齢と影響との関係に基づき、反復あるいは単回経口投与を行い、投与後の視床下部における *ERα* および *ERβ*、*Kiss1*、*GPR54* (キスペプチン受容体) ならびに *Kndy* ニューロンに局在してキスペプチンとともに GnRH パルスの発生に与っていると考えられている、ダイノルフィン(DYN) DYN と高親和性を有する κ オピオイド受容体、ニューロキニン B (NKB) ならびに NKB 受容体をそれぞれコードする遺

伝子の発現を解析した。とくに *ERα* および *Kiss1* については、ARC における発現に及ぼす影響を *in situ* hybridization により検討した。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質の調製

EE (Sigma-Aldrich、純度 98%以上) は、エタノール(和光純薬)に溶解して 100 mg/mL の濃度に調整し、これをストックソリューションとして冷蔵遮光保存した。投与検体はストックソリューションをコーン油(和光純薬)で段階希釈し、1回の投与用量が 10 mL/kg になるように濃度を調製した。調製検体は遮光室温保存して調製後 1 週間以内に使用した。

### 2. 使用動物および飼育条件

実験1および2ともに日本チャールスリバー株式会社(横浜)より購入した Sprague-Dawley 系妊娠雌ラット(Crl:CD(SD))あるいは同一系統の成熟雄ラットを購入し、これとの交配により作出した妊娠ラットから自然分娩により得た雌新生児を実験に用いた。妊娠21日から出産観察を行い、出生日を0日齢とした。出生翌日の1日齢に、各腹の雌出生児を各群に振り分け、墨汁(開明墨汁、開明、さいたま市)を四肢皮下に少量注入して個体を識別した。その際、哺育状態による影響を均等化するために、各腹に全ての投与群の出生児を配し、雄出生児を加えて同腹生児数を8匹とした。実験1では投与動物の性成熟後の生殖能力を調べるために、別途、同系統の成熟雄ラットを購入した。実験2では、脳の部位特定のため、同様の方法で得られた無処置雌新生児も用いた。また、*Kiss1* 遺伝子の *in situ* hybridization における陰性対照として、*Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット(*Kiss1*KO)を用いた。

これらの動物は麻布大学附置生物科学総合研究所の動物飼育施設内にて温度 16-25 および相対湿度 45-65%に設定し、明期 12 時間(8-20 時)暗期 12 時間の照明条件下で、木製チップ(床敷ソフト、三協ラボサービス、東京)を敷いたケージ(クリーン 200-PC、日本クレア、東京)内で、固形飼料(CE-2、日

本クレア、東京)および水道水を自由摂取させて飼育した。本研究における全ての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

実験1および2ともに、出生翌日の1日齢に、各腹の雌出生児を各群に振り分け、墨汁(開明墨汁、開明、さいたま市)を四肢皮下に少量注入して個体を識別した。その際、哺育状態による影響を均等化するために、各腹に全ての投与群の出生児を配し、雄出生児を加えて同腹生児数を8匹あるいは10匹に揃えた。

### 3. 投与方法及び投与量

Watanabeらの報告を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用い、実験1および2ではEEを1日齢から5日間反復経口投与した。実験2では、さらに1日齢または5日齢に単回経口投与を行った。

EEの用量は、平成26年度までの本研究に基づき設定した。すなわち、実験1では性周期の早期回帰停止は認められないが、嚢胞状卵胞の形成が認められる0.08 µg/kg/dayを選定した。実験2の反復投与では、10日齢で既に卵胞の発育遅延が認められ、初回排卵が遅れ、若齢で性周期の回帰が停止する2 µg/kg/day、ならびに性成熟後早期に性周期の回帰が停止する0.4 µg/kg/dayを選定した。また、さらに低用量での初発影響を調べるために、0.08 µg/kg/dayならびにこれらの遅発影響が認められない0.016 µg/kg/dayを設定した。単回投与では、先行研究において1、5あるいは7日齢における投与によって若齢で性周期の回帰を停止させる10 µg/kg/dayを設定し、この他に2 µg/kg(1日齢投与)あるいは20 µg/kg(5日齢投与)を設定した。いずれの実験も対照群の動物にはコーン油(和光純薬)を経口投与した。

### 4. 観察方法

#### (1) 実験1

投与前後に一般状態を観察し、身体的発達指標として眼瞼開裂日齢を調べた。投与動物は21日齢に離乳し、28日齢から膣開口の有無を調べ、8週齢から2週間、毎日膣垢を採取して性周期を観察した。10週齢から生殖能力の確認されている雄と同居させ、膣垢を観察し

て精子の確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日に帝王切開に供した。この間体重を、投与日および、7、10日齢ならびに14日齢からは1週間毎に個別体重を測定し、妊娠期間中は妊娠0、7、14および20日に測定した。

性周期は、観察期間中に4-5日で発情を回帰したものを正常周期に、それ以外を「その他」に分類し観察期間中に認められた発情期と発情前期の日数の合計を集計した。

#### (ア) 剖検

妊娠20日にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル、共立製薬、東京)深麻酔下で放血と殺した。卵巣は左右の黄体数を数え、ブアン液で固定した。左右子宮角は切開し、着床の状況を観察した後胎児及び胎盤を摘出し、それぞれ重量を測定した。遺残胎盤および死亡胎児の数も数えた。摘出した胎児は実体顕微鏡下で生死、性別および外表以上の有無を観察した。生存胎児は全てアルコール固定の後、Dawson法によりアリザリンレッドS透明骨格標本とし、骨格観察に供した。

#### (イ) 胎児の骨格観察

胎児骨格標本は実体顕微鏡下で骨格異常および変異の有無を観察した。また、骨化している仙尾椎、前及び後肢の基節骨ならびに胸骨分節の数を数えた。

#### (2) 実験2

##### (ア) 体重および一般状態

投与前後に一般状態を観察した。体重は投与期間中および剖検日に測定した。

##### (イ) 剖検

単回および反復投与のいずれにおいても最終投与24時間後に剖検し、脳を採取した。無処置雌は6日齢に、KissJKOは10日齢に剖検した。

遺伝子発現定量解析に供する動物は、冷却麻酔下で断頭し、直ちに脳を採取してRNAlater® Solution(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)に浸漬し、冷蔵保存した。遺伝子発現の観察あるいは脳の部位特定に供する動物は、冷却麻酔下でリン酸緩衝生理食塩液(PBS)により全身還流を行い放血後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で還流し、脳を採取した。採取した脳はさらにPFAに浸漬し、冷蔵

庫内で一晩固定した。

#### (ウ) 視床下部における性腺刺激ホルモン放出ホルモン関連遺伝子発現の定量

反復経口投与および単回経口投与の動物について実施した。

視床下部および上部領域の切り出し RNAlater 中に保存した脳は実体顕微鏡下で、ブレインマトリックス (RODENT BRAIN MATRIX Rat, 200-400 g, Colonal, ASI INSTRUMENTS, USA) を用いて視床下部と中脳との境界から視交叉までを含む領域を切り出し、次に乳頭体の左右の隆起を境界として外側領域を切り落として、さらに冠断面より前交連から視床下部領域とそれより上部の領域とに分割して、ER $\alpha$  についてはこの2領域を解析の対象とし、その他の遺伝子は視床下部領域を解析の対象とした。

#### Total RNA の抽出

採取した組織は碎装置用チューブ(トミー精工、東京)へ TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) 1 mL および細胞破碎装置用ビーズ(ジルコニア 2.0  $\Phi$ 、トミー精工、東京)とともに入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R(トミー精工、東京)によって 4000 rpm、4 で 90 秒間ホモジナイズした。次にクロロホルム(試薬特級、和光純薬工業、大阪) 200  $\mu$ L を加えて攪拌し、室温で2分間静置した後、遠心分離を 12,000 $\times$ g、4 で 15 分間行った。二層に分離したチューブの溶液から RNA を含む無色の上層を別のチューブへと移し、2-プロパノール(イソプロピルアルコール、分子生物学用、和光純薬工業、大阪)を 0.5 mL 添加して攪拌し、12,000 $\times$ g、4 で 10 分間遠心分離した。チューブ内に沈殿物が存在していることを確認後、上清を除去して 75%に希釈したエタノール(分子生物学用、和光純薬工業、大阪)を 1 mL 添加して沈殿物を洗浄し、7,500 $\times$ g、4 で 5 分間遠心分離した。75%エタノールを除去後、RNA 沈殿物を 5 分間乾燥させ、DEPC 処理水 (DEPC treated Water、ニッポンジーン、東京)を 100  $\mu$ L 添加した。これを 60 で 10 分間インキュベートして RNA 沈殿物を溶解し、RNA 溶液の吸光度の測定により抽出された RNA の濃度を求めた。得られた RNA 濃度をもとに各サンプルの RNA 濃度を DEPC treated Water

を加えて 100 mg/mL に調製し、-80 で保存した。

#### Real-Time RT-PCR

逆転写に先立ち、total RNA 溶液を deoxyribonuclease I (Amplification Grade、Life Technologies Corporation) で処理しゲノム DNA を除去した。逆転写のプライマーにはランダムプライマーを用い、Taqman<sup>®</sup> Reverse Transcription Reagents (Life Technologies Corporation) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として StepOne<sup>™</sup> Real Time PCR System (Life Technologies Corporation) を用い、TaqMan プローブ法による real-time PCR を行った。

定量解析の対象には、EE と結合するエストロゲン受容体をコードする ER $\alpha$  および ER $\beta$ 、キスペプチンをコードする Kiss1、キスペプチン受容体をコードする GPR54、DYN をコードするプロダイノルフィン遺伝子 (Pdyn) および DYN と高親和性を有する  $\kappa$  オピオイド受容体をコードする Opioid receptor kappa 1 (Oprk1)、NKB をコードする Tac3、ならびに NKB 受容体をコードする Tacr3 を選択した。各遺伝子の発現量は GAPDH mRNA で補正した相対発現量として求めた。使用したプローブおよびプライマーは表 1 に示す ER $\alpha$  および ER $\beta$  を除き TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA) の Rn00710914\_m1 (Kiss1)、Rn00571351\_m1 (Pdyn)、Rn00569758\_m1 (tac3)、Rn00566955\_m1 (tacr3)、Rn01448892\_m1 (Oprk1) を用いた。GAPDH 遺伝子は Pre-Developed Taqman<sup>®</sup> Assay Reagents Control Kits (Life Technologies Corporation) を用いた。

#### (3) Kiss1 遺伝子発現の観察

コーン油あるいは EE を 2  $\mu$ g/kg/day 反復経口投与した動物について観察した。遺伝子発現観察に先立ち、視床下部における ARC および AVPV 領域の位置を確認し、ついで、ARC における Kiss1 遺伝子発現部位を確認した。

#### ARC および AVPA 領域の確認

PFA 固定した 6 日齢無処置雌ラット脳は、ブレインマトリックス (Colonal, ASI INSTRUMENTS) を用いて視床下部と中脳の境界から吻側方向に向かって 6 mm 幅の領域

を冠状断で切り出した。これを常法に従いパラフィン包埋し、10  $\mu\text{m}$  厚の連続切片として Kluver Ballera (KB) 染色を施した。

KB 染色標本を観察し、Paxinos & Watson によるラット脳アトラスを参照して、6 日齢雌における ARC は、視床下部の尾側(乳頭体側)から吻側方向へ約 0.66 -1.21 mm の領域に位置し、また AVPV は約 1.89-2.11 mm の領域に位置することを確認した(図 1)。

ARC 領域における *Kiss1* 発現部位の確認

6 日齢無処置雌ラット脳の ARC 領域を、20  $\mu\text{m}$  間隔で 10  $\mu\text{m}$  厚の連続切片とし、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) を用いる ISH で確認した(図に示さず)。ISH は処方に従い行ったが、組織の前処理(pretreatment)における煮沸処理は 10 分間とし、protease 処理は 40、5 分間とした。また、*Kiss1* ISH 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションは 40 で 150 分間行い、陰性対照には、10 日齢の *Kiss1*KO 雌の脳組織標本を用いた。

EE 反復経口投与後の ARC における *Kiss1* 発現

1 日齢から EE 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  あるいはコーン油 (10 mL/kg/day) を 5 日間反復経口投与した 6 日齢ラットの ARC 領域のうち、の検討で、最も発現が多く認められた尾部を検索の対象とし、尾部から吻部に向かって 20  $\mu\text{m}$  間隔で 10  $\mu\text{m}$  厚の切片を 3 枚作製し、*Kiss1* の ISH に供した。ISH は、と同じ条件で行った。

#### (4) *ER $\alpha$* 遺伝子発現の観察

ARC 及び AVPV 領域における *ER $\alpha$*  遺伝子発現の確認

6 日齢無処置雌ラットの視床下部 ARC および AVPV 領域における *ER $\alpha$*  の発現を QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics) を用いる ISH で確認した(図 2)。Pretreatment および protease 処理ならびに *ER $\alpha$*  ISH 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションは上記イ)と同じ条件を採用した。

EE 反復経口投与後の ARC および AVPV における *ER $\alpha$*  の発現

1 日齢から EE 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  あるいはコーン油 (10 mL/kg/day) を 5 日間反復経口投与した 6 日齢ラットの視床下部 ARC および AVPV 領域

における *ER $\alpha$*  の発現を上記 で採用した方法を用いて観察した。

#### 5. 統計解析

統計解析ソフト JMP10 (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。その際、実験 1 の胎児における各指標については、一腹の平均値をその腹の代表値として扱った。二群間の解析は、F 検定を行い、分散の一樣性を確認して Student の t-検定を実施した。その他は、まず、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnett の多重比較検定を用いて、対照群と各投与群との間で有意差検定を行った。有意水準は 5%とした。

#### 6. (倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

#### C. 研究結果

##### 1. 投与動物の一般状態および体重増加

実験 1 および 2 とともに投与期間中の体重および一般状態に EE 投与群と対照群との間に差は認められなかった。

実験 1 については眼瞼開裂日齢ならびに膈開口日齢に EE 投与群と対照群との間で有意差は認められなかった(データは示さず)。体重推移については、7 週齢から交配までは EE 投与群が対照群と比べてやや低値で推移したが、有意差は認められなかった。

##### 2. 性周期の回帰状況および交配成績(実験 1)

8-9 週齢で性周期を観察した結果、対照群および EE 投与群ともに、正常周期に分類される 4 日周期あるいは 4 及び 5 日周期、ならびにその他の性周期が認められたが、それらの頻度はいずれも両群間で同等であった(表 2)。

対照群および EE 投与群ともに、10 週齢から交配適期である発情前期に生殖能力の確認された雄と同居させた。その結果、対照群の 7 例中 2 例は 2 回目の交配適期で交尾したがそれ以外は全例が 1 回目の適期で交尾し、全例が妊娠した(表 2)。

##### 3. 妊娠期間中の体重推移(実験 1)

妊娠0日から20日までEE投与群の体重が対照群と比べて有意な低値で推移したが、体重増加量は妊娠末期の妊娠14-20日の値のみに有意差が認められ、それ以前の時期は群間で差は認められなかった(表3)。

#### 4. 帝王切開所見(実験1)

EE投与群における黄体数、着床数ならびに着床率は対照群と比べてやや低値の傾向を示したが、有意差はなかった。生存胎児数、着床前死亡数あるいは着床後死亡数についても群間で差は認められなかった(表4)。

#### 5. 胎児所見(実験1)

表5に示すように、胎児の性比に対照群とEE投与群の間で有意差は認められなかった。一方、胎児体重は対照群と比べて有意な高値を示していた。

外表異常として全身浮腫の胎児がEE投与群に1例認められたが、それ以外に異常は観察されなかった。

骨格検査で奇形は観察されなかった。また、変異も対照群およびEE投与群の双方に少数例ずつ観察されたが、投与の影響を示唆する傾向は認められなかった。しかし、一般的に骨化の進行がEE投与群で亢進し、右第5基節骨が骨化している胎児の割合ならびに骨化仙尾椎数に有意差が認められた。

#### 6. EE反復経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図3に示すように、EE 2 µg/kg/day 群では視床下部における *ERα* mRNA 量が対照群と比較して有意な低値を示したが、上部領域では群間に差は認められなかった。

図4に示すように、視床下部における遺伝子発現量を対照群と 0.4 µg/kg/day 以上の投与群との間で比較したところ、EE 投与群における *Kiss1* mRNA 量が顕著に低下し、対照群との間に有意差が認められた。*ERα* mRNA についても、対照群と比較して、2 µg/kg/day 群では有意な低値を示し、0.4 µg/kg/day 群でも低下の傾向が認められた。Kndy ニューロンでキスペプチンとともに GnRH パルスの制御に関わると考えられている NKB および Dyn ならびにそれらをコードする遺伝子については、

対照群と EE 投与群との間に有意差は認められなかった。しかし、EE の用量に依存して NKB 受容体をコードする *Tacr3* の発現が低下し、DYN 受容体をコードする *Oprk1* の発現が増加した。

キスペプチン受容体をコードする *GPR54* および EE が結合する可能性のある *ERβ* については遺伝子発現量に群間で著差は認められなかった(図5)。

図6に示すように、0.08 µg/kg/day 以下の投与群については、対照群が1例であったため対照群との間で比較はできなかった。用量間で比較しても *ERα* および *Kiss1* のいずれも 0.016 µg/kg/day 群と 0.08 µg/kg/day 群との間で有意差は認められなかった。

#### 7. EE単回経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図7には1日齢における2あるいは10 µg/kg のEE単回投与翌日の視床下部における *ERα* および *Kiss1* 発現量を示した。*ERα* については対照群とEE投与群との間で差異は認められなかったが、*Kiss1* は両投与群ともに対照群と比べて有意な低値を示した。しかし、用量間で差は認められなかった。

図8には5日齢における20 µg/kg のEE単回投与翌日の視床下部における *ERα* および *Kiss1* 発現量を示したが、*ERα* および *Kiss1* ともに対照群と比較して有意な低値を示した。

#### 8. EE単回経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図9および10に代表例を示すように、*ERα* mRNA については、EE反復経口投与した動物でも対照群と同様にAVPVおよびARCのいずれにおいても局在が認められ、その程度にも明瞭な差は認められなかった。一方、*Kiss1* mRNA については、EE反復投与動物のARCで顕著な発現低下が観察された(図11)。

#### D. 考察

平成26年度までの研究から、新生期におけるEEの反復経口投与による遅発影響の閾値は0.016 µg/kg/day 付近にあると推定されている。これは0.08 µg/kg/day 群において、性周期は回帰したものの、卵巣に嚢胞状卵胞を有



する動物が増加したことによるものである。嚢胞状卵胞は加齢に伴い観察される変化であり、0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与では26週齢で対照群との間に有意差が認められている(平成25年度分担研究報告書)ことから、その生殖毒性的意義を検討するために、通常の生殖毒性試験で評価される週齢で生殖能力を検討した。その結果、全例の受胎能が確認され、胎児の生存にも影響は認められなかった。しかし、投与動物の妊娠後期における体重増加は有意に抑制されていた。この時期は、胎児体重が母体重に反映される時期であるが、EE投与群の胎児体重は対照群と比べてむしろ有意に増加していた。リッターサイズに差は認められなかったことから、EE投与群では妊娠後期における母動物自身の体重増加が抑制されていることが示唆された。

胎児については外表および骨格に奇形や変異の増加は認められなかったが、EE投与群では対照群と比べて骨化が促進されていた。体重変化を考慮すると、EE投与群では胎児の発育が促進されていたものと考えられる。

新生児期にEE投与を受けた動物が妊娠すると妊娠末期における母体重は抑制されるにもかかわらず、胎児の発育が促進される理由は明らかではない。用量反応性を考慮した検討が必要とされるが、これまで検討されなかった糖質や脂質代謝などにおける遅発影響も否定できない。

今年度は、新生児期のEE投与による初発影響を検討した。その結果、最も顕著な影響が*Kiss1*発現に認められた。すなわち、0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の反復投与あるいは1日齢における2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の単回投与あるいは5日齢における20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与によって、*Kiss1*の発現低下が認められた。ISHでもARCにおける*Kiss1*発現に明瞭な低下が確認されている。この日齢ではAVPVに*Kiss1*は発現していないことから、視床下部の定量解析で認められた*Kiss1*発現の低下は、ARCにおける*Kiss1*の発現低下を反映したものと考えられる。さらに、*Kiss1*の発現低下が認められた群はいずれも性周期の早期回帰停止が認められている。一方、嚢胞状卵胞の形成は認められるが、性周期の回帰は維持されている0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では*Kiss1* mRNAに影響が認められていない。

これらのことを考慮すると、ARCにおける*Kiss1*の発現低下は遅発影響の中でも性周期の早期回帰停止に深く関与している可能性が示唆される。

ARCにおける*Kiss1*の発現がEE投与によって低下する理由は本研究からは明らかではない。EEはまずERを介して生体に影響を及ぼすが、*Kiss1*の発現低下が認められた1日齢での10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与ではER $\alpha$ の発現量に影響は認められなかったことから、ARCにおける*Kiss1*の発現低下はER $\alpha$ の発現低下に起因するものではないと考えられる。

脳の様々な部位にER $\alpha$ は発現するが、前交連から上部の組織ではこのような変化は認められなかったことから、AVPVおよびARCを含む視床下部のみの変化であると推測される。ER $\alpha$ はこの日齢でもAVPVおよびARCの両神経核に発現していることが本研究でも確認されているが、ISHでは両神経核ともにER $\alpha$ の発現にEE投与の影響は認められなかった。従って、これらの神経核以外の部位でのEE投与による発現低下が疑われる。

ARCでキスペプチンとともにGnRHパルス状分泌を促進するNKBの受容体遺伝子*Tacr3*の発現がEE投与群で低下の傾向を示し、パルス状分泌を抑制するDYNの受容体遺伝子*Oprk1*の発現が増加の傾向を示していた。*Kiss1*の発現低下のような顕著な変化ではないが、Kndyニューロンで作動する3つの分子がいずれもGnRHパルスを抑制する方向に変化していることは、遅発影響に繋がる変化として注目すべきである。

前述のように*Kiss1*の発現低下はARCにおける*Kiss1*の発現低下を反映すると考えられるが、定量解析では*Kiss1*発現の低下に用量反応関係が認められなかった。この点は*Oprk1*あるいは*Tacr3*の変化とは異なっており、GnRHパルスを抑制する方向の変化ではあるが、*Kiss1*発現低下とは異なる機序の存在が伺われる。

ER $\alpha$ はエストロゲンによって誘導されることが知られているが、EE反復投与群では0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で最終投与翌日の視床下部におけるER $\alpha$ 発現量が低下した。1日齢の単回投与では10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも発現量が増減することはなかったため、EEを反復投与するこ

とで視床下部の *ERα* が低下したものと推察される。

以上のように、今年度の研究から、遅発影響の最小影響量 (0.08 μg/kg/day) は生殖能力評価では影響は認められないことが明らかになったが、妊娠末期の生理状態についてはさらに検討を要することが示唆された。また、投与した 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が示唆された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17α-ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Sciences* 37, 681-689 (2012)
- 2) 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).
- 3) Shirota 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 17α-ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)

### 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新生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)
- 4) Shirota, M., et al. Gonadotropin-

independent follicle development in the *Kiss1*<sup>-/-</sup> female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)

- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
無し

## 参考文献

Aatsinki JT, Pietilä EM, Lakkakorpi JT, Rajaniemi HJ. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. *Molecular Cellular Endocrinology* 84,127-135 (1992)

Akieda-Asai S, Ohta R, Shirota M, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K. Endocrinological differences between Hatano high- and low-avoidance rats during early two-way avoidance acquisition. *Experimental Animals* 60, 509-516 (2011)

Asai S, Ohta R, Shirota M, Sato M, Watanabe G, Taya K. Reproductive endocrinology in Hatano high and low-avoidance rats during the estrous cycle. *Endocrine* 18, 161-166 (2002)

Ayyanan A, Laribi O, Schuepbach-Mallepell S, Schrick C, Gutierrez M, Tanos T, Lefebvre G, Rougemont J, Yalcin-Ozuyisal O, Brisken C. Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Molecular Endocrinology* 25, 1915-1923 (2011)

- Bandiera S and Dworschak C. Effects of Testosterone and Estrogen on Hepatic Levels of Cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the Rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296, 286-295 (1992)
- Banu SK, Samuel JB, Arosh JA, Burghardt RC, Aruldas MM. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232,180-189 (2008)
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$  to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology* 54,105-112 (1998)
- Barraclough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68, 62-66 (1962)
- Betancourt AM, Eltoum IA, Desmond RA, Russo J, Lamartiniere CA. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 118, 1614-1619 (2010)
- Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillo WS, Mora JM, Li XF, Franks S, Bloom SR, O'Byrne KT, Murphy KG. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology* 155, 1091-1098 (2014)
- Becú-Villalobos D, González Iglesias A, Díaz-Torga G, Hockl P, Libertun C. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology* 17, 699-715 (1997)
- Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J Agriculture and Food Chemistry* 45,3541-3544 (1997)
- Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54, 138-153 (2000)
- Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ. A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives* 111, 1020-1036 (2003)
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53, 69-77 (1988)
- Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicoeur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 3, 1455-1461 (1989)
- Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *Journal of Nutrition* 132, 658-664 (2002)
- Brotans JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environment and Health Perspectives* 103, 608-612 (1995)
- Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Molecular Endocrinology* 11, 172-182 (1997)
- Bukovsky A, Ayala ME, Dominguez R, Keenan JA, Wimalasena J, McKenzie PP, Caudle MR. Postnatal androgenization induces premature aging of rat ovaries. *Steroids* 65, 190-205 (2000)
- Cao J, Joyner L, Mickens JA, Leyrer SM, Patisau HB. Sex-specific Esr2 mRNA expression in the rat hypothalamus and amygdala is altered by neonatal bisphenol A exposure. *Reproduction* 147, 537-554 (2014)
- Chakraborty TR, Gore AC. Aging-Related Changes in Ovarian Hormones, Their Receptors, and Neuroendocrine Function. *Experimental Biology and Medicine* 229, 977-987 (2004)
- Chang L-L, Wun W-S A, Paulus S, Wang PS. In utero and neonate exposure to nonylphenol develops

- hyperadrenalism and metabolic syndrome later in life. I. First generation rats (F1). *Toxicology* 301, 40-49 (2012)
- Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinology* 148, 3580–3590 (2007)
- Chung WCJ, Anthony PA. Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. *Pflugers Archives European Journal of Physiology* 465, 573–584 (2013)
- Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG, Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS. Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice. *Biology of Reproduction* 83, 114-121 (2010)
- Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology* 34, 120-131 (2013)
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceeding of National Academy Science U S A*. 104, 10714-10719 (2007)
- Downs JL, Wise PM. The role of the brain in female reproductive aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299, 32-38 (2009)
- Dufau ML, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Buczko E. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53, 283-291 (1995)
- Durlinger AL, Grijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 143, 1076-1084 (2002)
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews* 30, 624-712 (2009)
- Fernández M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environment and Health Perspectives* 117, 757-762 (2009)
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessi-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. Endocrine disrupters- a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 144-159 (2012)
- Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* 90, 1492-1498 (1972)
- González-Martínez D, De Mees C, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* 149, 2333-2340 (2008)
- Gore AC, Martien KM, Gagnidze K, Pfaff D. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and Autism. *Endocrine Reviews* 35, 961-991 (2014)
- Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Molecular Endocrinology* 25, 2157-2168 (2011)
- Graham R, Robertson, Geoffrey C, Farrell, Liddle C. Sexually Dimorphic Expression of Rat CYP3A9 and CYP3A18 Genes Is Regulated by Growth Hormone. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 242, 57–60 (1998)
- Greenstein BD. Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors. *Endocrinology* 130, 3184-3190 (1992)
- Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T. Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biology of Reproduction* 81, 1002–1009 (2009)
- Gorski RA. Influence of age on the response to perinatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* 82, 1001-1004 (1968)

- Herath CB, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome NP, Suzuki AK, Taya K. Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat. *Biology of Reproduction* 65,1623-1633 (2001)
- Hirshfield AH. Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29,10-15 (1997)
- Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biology of Reproduction* 81, 1216-1225 (2009)
- Hong H, Branham WS, Dial SL, Moland CL, Fang H, Shen J, Perkins R, Sheehan D, Tong W. Rat  $\alpha$ -Fetoprotein binding affinities of a large set of structurally diverse chemicals elucidated the relationships between structures and binding affinities. *Chemical Research of Toxicology* 25, 2553-2566 (2012)
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Developmental Biology* 157, 100-109 (1993)
- Hutter HS, Gibson MJ. Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice. *Biology of Reproduction* 38, 636-638 (1988)
- Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biology of Reproduction* 45, 547-552 (1991)
- 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 anteroventralperiventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol in female rats. *Reproductive Toxicology* 51, 145-156 (2015)
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda M, AND Hayashi S. Increased Expression of Mullerian-Inhibiting Substance Correlates with Inhibition of Follicular Growth in the Developing Ovary of Rats Treated with E2 Benzoate. *Endocrinology* 143, 304–312 (2002)
- Ikeda Y, Tanaka H, and Esaki M. Effects of Gestational Diethylstilbestrol Treatment on Male and Female Gonads during Early Embryonic Development. *Endocrinology* 149, 3970-3979 (2008)
- Jager W, Correia MA, Bornheim LM, Mahnke A, WALTER G, Hanstein WG, XUE L, and Benet LZ. Ethynylestradiol-mediated induction of hepatic *CYP3A9* in Female rats: implication for cyclosporine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 1505–1511 (1999)
- Jaroenporn S, Horii Y, Asai S, Wang KM, Nagaoka K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K . Endocrine mechanisms responsible for different follicular development during the estrous cycle in Hatano high- and low-avoidance rats. *Journal of Reproduction and Development* 57, 690-699 (2012)
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, and Peplig M. Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival. *Biology of Reproduction* 74, 161–168 (2006)
- Jefferson WN, Patisaul HB Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* 143, 247-260 (2012)
- Hu J, Du G, Zhang W, Huang H, Chen D, Wu D, Wang X. Short-term neonatal/prepubertal exposure of dibutylphthalate (DBP) advanced pubertal timing and affected hypothalamic kisspeptin/GPR54 expression differently in female rats. *Toxicology* 314, 65–75 (2013)
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1. *Environmental Health Perspectives* 109, 785–794 (2001)
- Kelly PA, Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Shirota M, Edery M, Dusanter-Fourt I, Djiane J. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biology of Reproduction* 40, 27-32 (1989)
- Kenny HA, Woodruff TK. Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology* 147, 51-60 (2006)

- Kezele P, Skinner MK. Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Endocrinology* 144, 3329–3337 (2003)
- Kimura F, Funabashi T. Two subgroups of gonadotropin releasing hormone neurons control gonadotropin secretion in rats. *News of Physiological Sciences* **13**,225-231 (1998)
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* 148:1968-1976 (2007)
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263 (1998)
- Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor-promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology* 151, 2297–2305 (2010)
- Lei L, Shiyong J, Kelly EM, Woodruff TK. The Interactions Between the Stimulatory Effect of Follicle-Stimulating Hormone and the Inhibitory Effect of Estrogen on Mouse Primordial Folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 82, 13–22 (2010)
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S. Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biology of Reproduction* 75, 749–759 (2006)
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews* **88**, 91-124 (2008)
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction* **64**, 293-298 (2001)
- McLachlan JA, Tilghman SL, Burow ME, Bratton MR. Environmental signaling and reproduction: A comparative biological and chemical perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* **354**, 60-62 (2012)
- Melinda E, Wilson R, Handa J. Ontogeny of Gene expression in the gonadotroph of the developing female rat. *Biology of Reproduction* 56, 563-568 (1997)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 46, 1080-1085 (1992)
- Mineshige T, Kamiie J, Sugahara G, Yasuno K, Aihara N, Kawarai S, Yamagishi K, Shiota M, Shiota K. Expression of periostin in normal, atopic, and nonatopic chronically inflamed canine skin. *Veterinary Pathology* 52, 1118-1126 (2015)
- Mogi K, Takanashi H, Nagasawa M, Kikusui T. Sex differences in spatiotemporal expression of AR, ER $\alpha$ , and ER $\beta$  mRNA in the perinatal mouse brain. *Neuroscience Letters* **584**, 88–92 (2015)
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biology of Reproduction* 53, 1198-207 (1995)
- Moral R, Santucci-Pereira J, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Russo J. In utero exposure to butyl benzyl phthalate induces modifications in the morphology and the gene expression profile of the mammary gland: an experimental study in rats. *Environmental Health* 10, 5 (2011)
- Morohashi KI, Omura T. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB Journal* **10**, 1569-1577 (1996)
- Murakami T, Sato A, Inatani M, Sakurai H, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Effect of neonatal exposure of 17beta-estradiol and tamoxifen on hepatic CYP3A activity at developmental periods in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19, 96-102 (2004)
- Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fertility* **113**, 27-33 (1998)
- Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K, Ikeda MA. Exposure of neonatal rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *Journal of Medical and Dental Sciences* **50**, 35-40 (2003)

- Nagaraja AK, Middlebrook BS, Rajanahally S, Myers M, Li Q, Matzuk MM, Pangas SA. Defective gonadotropin-dependent ovarian folliculogenesis and granulosa cell gene expression in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* **151**, 4994-5006 (2010)
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology* **150**, 2359-2567 (2009)
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* **81**, 1535-1565 (2001)
- Nozawa K, Nagaoka K, Zhang H, Usuda K, Okazaki S, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reproductive Toxicology* **46**, 77-84 (2014)
- Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata, T Ono H. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reproductive Toxicology* **34**, 323-330 (2012)
- Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K. Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats. *Experimental Animals* **58**, 471-479 (2009)
- Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federal Proceedings* **39**, 2365-2371 (1980)
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environment and Health Perspectives* **104**, 298-305 (1996)
- Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, Tsang BK, Kotsuji F, Yoshida Y. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* **154**, 2870-2880 (2013)
- Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL. Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research* **54**, 175-180 (1998)
- Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* **17**, 555-557 (1968)
- Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* **151**, 722-730 (2010)
- Pinilla L, Castellano JM, Romero M, Tena-Sempere M, Gaytán F, Aguilar E. Delayed puberty in spontaneously hypertensive rats involves a primary ovarian failure independent of the hypothalamic KiSS-1/GPR54/GnRH system. *Endocrinology* **150**, 2889-2897 (2009)
- Ramirez MC, Luque GM, Ornstein AM, Becu-Villalobos D. Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice. *Journal of Endocrinology* **207**, 301-308 (2010)
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP. Early maturation of gonadotropin-releasing hormone secretion and sexual precocity after exposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biology of Reproduction* **77**, 734-742 (2007)
- Richards JS. Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* **97**, 1174-1184 (1975)
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environment and Health Perspectives* **109**, 675-680 (2001)
- Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr. In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats. *Toxicological Sciences* **114**, 133-148 (2010)
- Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH, McLean MP.

- Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology*. 1998 **139**:4820-4831.
- Sakuma Y. Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat. *Journal of Neuroendocrinology* 21, 410-414 (2009)
- Sakurada Y, Sawai M, Inoue K, Shirota M, Shirota K. Comparison of aryl hydrocarbon receptor gene expression in laser dissected granulosa cell layers of immature rat ovaries. *Journal of Veterinary Medical Science* 73, 923-926 (2011)
- Schindler R, Nilsson E, Skinner MK. Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF. *PLoS ONE* 5, e12979 (2010)
- Schwarz JM, McCarthy MM. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. *Hormones and Behavior* 54, 662-668 (2008)
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* **349**,1614-1627 (2003)
- 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 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague–Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)
- Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Science* **37**, 681-690 (2012)
- Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K. Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125, 85-94 (2003)
- Shirota M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shirota K, Kelly PA. Detection of in situ localization of long form prolactin receptor messenger RNA in lactating rats by biotin-labeled riboprobe. *Endocrine Journal* 42, 69-76 (1995)
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 4, 1136-1143 (1990)
- Soga T, Kitahashi T, Clarke IJ, Parhar IS. Gonadotropin-inhibitory hormone promoter-driven enhanced green fluorescent protein expression decreases during aging in female rats *Endocrinology* 155, 1944–1955 (2014)
- Sokka T, Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin -stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *Journal of Endocrinology* **127**, 297-303 (1990)
- Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology* **130**, 1738-1740 (1992)
- Sokka TA, Huhtaniemi IT. Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction* 52, 1404-1409 (1995)
- Sokka TA, Hämäläinen TM, Kaipia A, Warren DW, Huhtaniemi IT. Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biology of Reproduction* **55**, 663-670 (1996)
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Molecular Cellular Endocrinology* 272, 22-37 (2007)
- 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. *Reproductive Toxicology* **40**, 16-23 (2013)
- Takumi K, Iijima N, Iwata K, Higo S, Ozawa H. The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of Kiss1 mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development. *Journal of Physiological Sciences* **62**, 453–460 (2012)
- Tena-Sempere M. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive



- development and function. *International Journal of Andrology* 33, 360–368 (2010)
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 19 (2006)
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15, 795–803 (2009)
- Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 414, 42-52 (2015)
- Toran-Allerand CD. Gonadal hormones and brain development: implications for the genesis of sexual differentiation. *Annual New York Academy of Sciences* 435, 101-111 (1984)
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie XZ, Dufau ML. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1355-11359 (1991)
- Umekita Y, Souda M, Hatanaka K, Hamada T, Yoshioka T, Kawaguchi H, animoto A. Gene expression profile of terminal end buds in rat mammary glands exposed to diethylstilbestrol in neonatal period. *Toxicology Letter* 205, 15-25 (2011)
- Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 76, 1105-1110 (2014)
- Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *Journal of Endocrinology* 191, 549–558 (2006)
- Vannier B, Raynaud JP. Long-term effects of prenatal oestrogen treatment on genital morphology and reproductive function in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility* 59, 43-49 (1980)
- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Developmental exposure to Bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149, 5848-5860 (2008)
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141, 3814-3820 (2000)
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131,1-9 (2006)
- Walker DM, Kirson D, Perez LF, Gore AC. Molecular profiling of postnatal development of the hypothalamus in female and male rats. *Biology of Reproduction* 129, 1-12 (2012)
- Wang C and Roy SK. Development of Primordial Follicles in the Hamster: Role of Estradiol-17 $\beta$ . *Endocrinology* 148, 1707–1716 (2007)
- Watanabe C, Kuwagata M, Yoshimura S, Azegami J, Kojima K, Ono H, Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Congenital Anomalies (Kyoto)* 43, 177-179 (2003)
- Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, Michelmann HW. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. *Biology of Reproduction* 63, 320-327 (2000)
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 93-115 (2003)
- Yasuno K, Sakashita H, Araki S, Kobayashi R, Sakurada Y, Shirota M, Kamiie J, Shirota K . Cutaneous hybrid cyst in a Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicologic Pathology* 25, 175-178 (2012)
- Yeh J, Kim B. Increasing blunting of inhibin responses to dynamic ovarian challenge is associated with reproductive aging in the rat. *Reproductive Sciences* 14, 10-19 (2007)
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 184, 122-137

(1997)

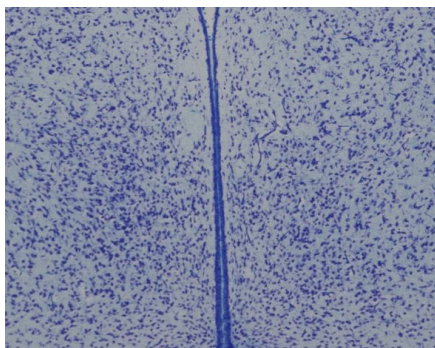
Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* **39**, 823-834 (2011)

Yoshida M, Watanabe G, Shiota M, Maekawa A, Taya K. Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in donryu rats. *Journal of Reproduction and Development* **51**, 707-714 (2005)

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* **15**, 172-183 (2001)

Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL. Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. *Fitoterapia*. **81**, 998-1002 (2010)

(A) AVPV



(B) ARC

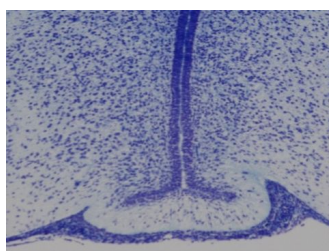
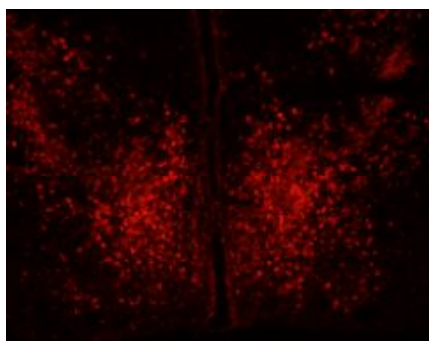


図1 . 6日齢雌ラットの視床下部における AVPV (A)および ARC (B) (KB 染色)

(A) AVPV



(B) ARC

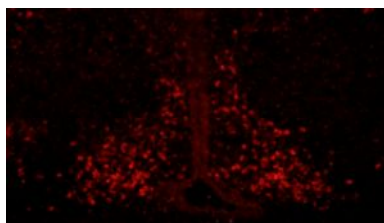
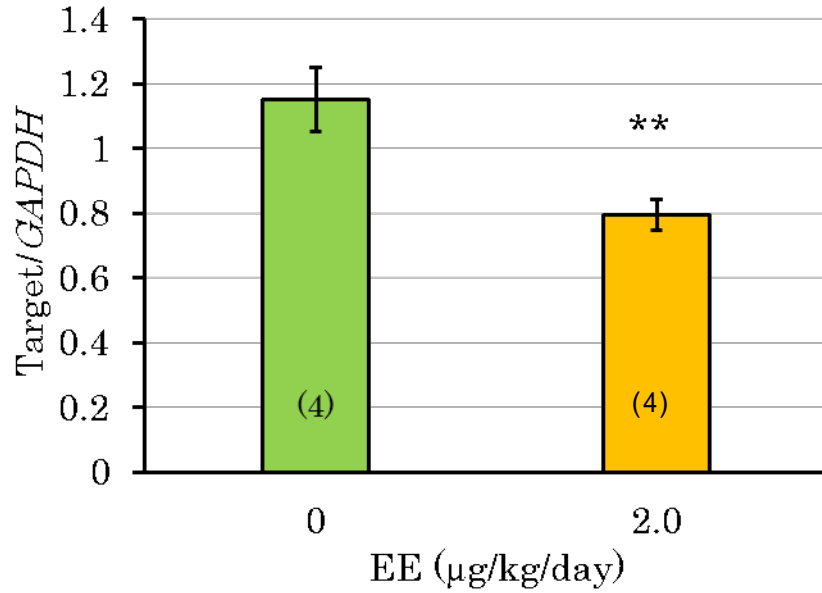


図2 . 6日齢雌ラットの AVPV 領域 (A) および ARC 領域 (B) における ER ISH  
 $ER\alpha$  mRNA は赤色蛍光として認められる。

(A) 視床下部



(B) 上部領域

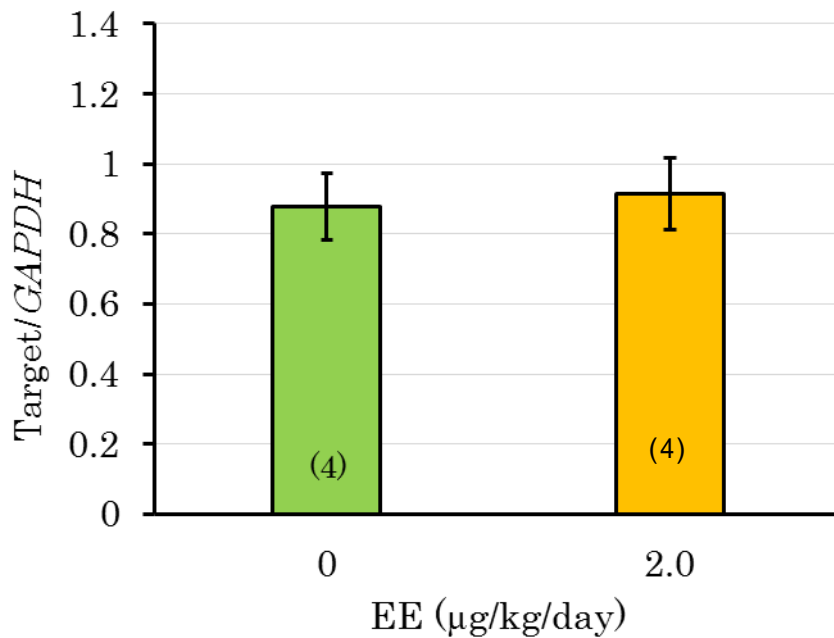
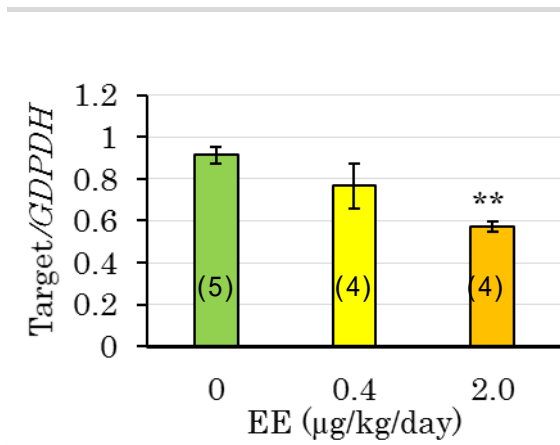
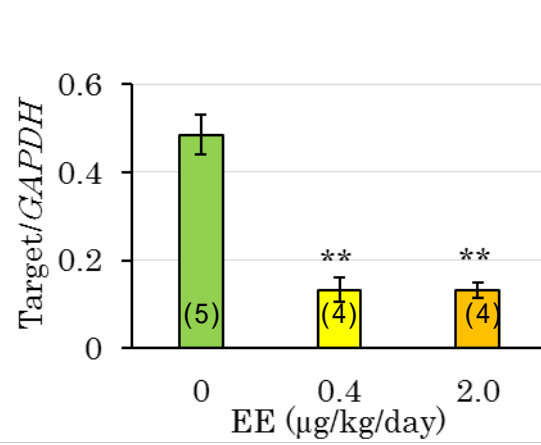


図3. 1日齢から5日間0または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの最終投与後24時間における視床下部(A)あるいはその上部領域(B)におけるER mRNAのGAPDH mRNAに対する相対発現量(平均±S.E.M)(N). \*\*対照群との間に有意差あり(P<0.01)

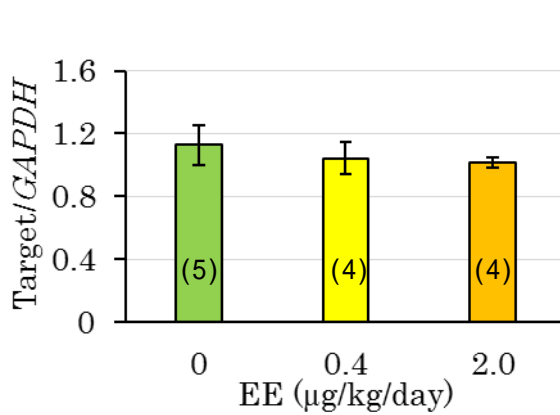
(A) *ER* mRNA



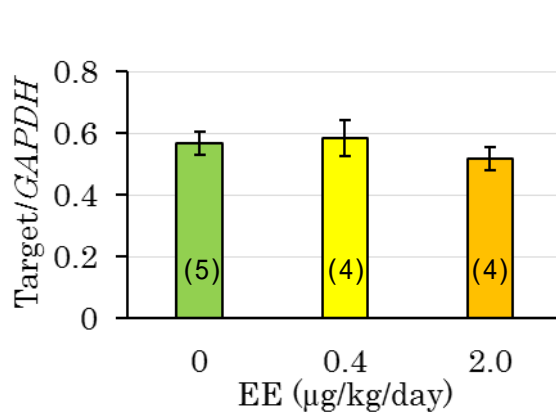
(B) *Kiss1* mRNA



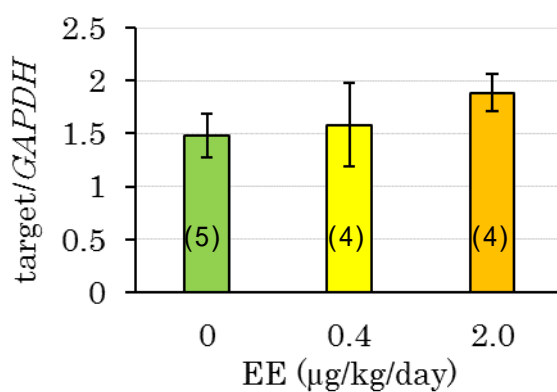
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Tac2* mRNA



(E) *Oprk1* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

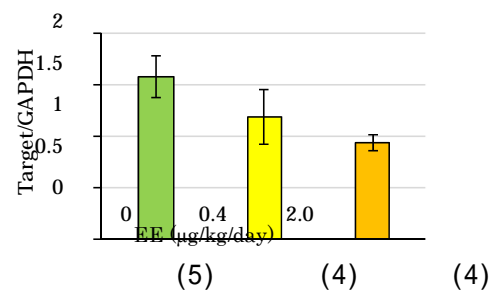
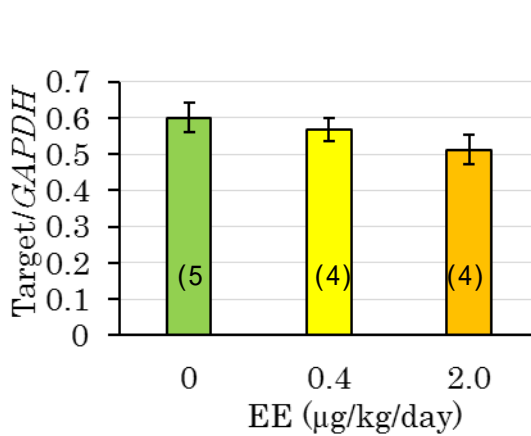


図4. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間におけるmRNA(*ERα* (A)、*Kiss1* (B)、プロダイノルフィン (*Pdyn*) (C)、オピオイド受容体 (*Oprk1*)、ニューロキニンBをコードする *Tac3* (E)ならびにその受容体をコードする *Tacr3* (F))の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M.) . (N) \*\*対照群との間に有意差あり (P<0.01)

(A) *GPR54* mRNA



(B) *ERβ* mRNA

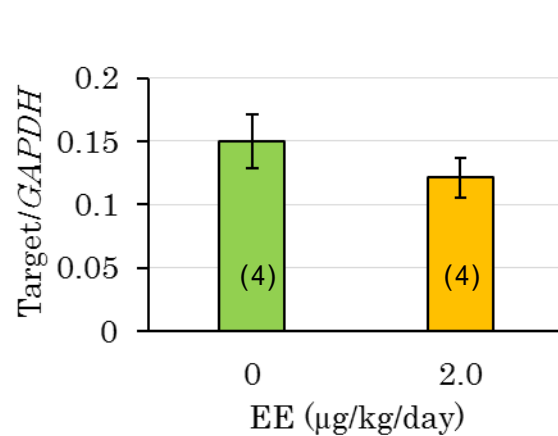
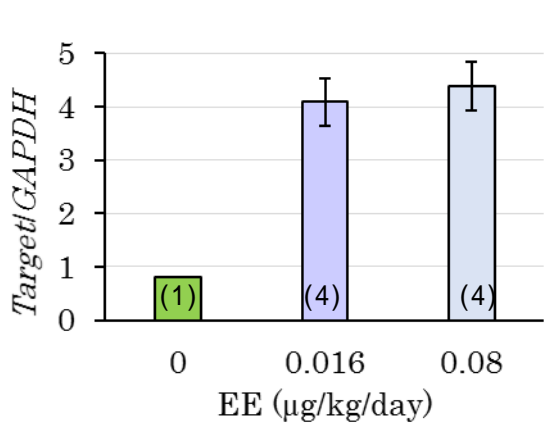


図5. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *GPR54* mRNA(A)および *ERβ* mRNA(B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

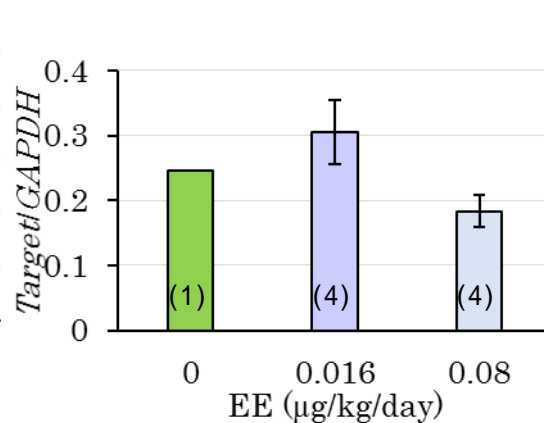
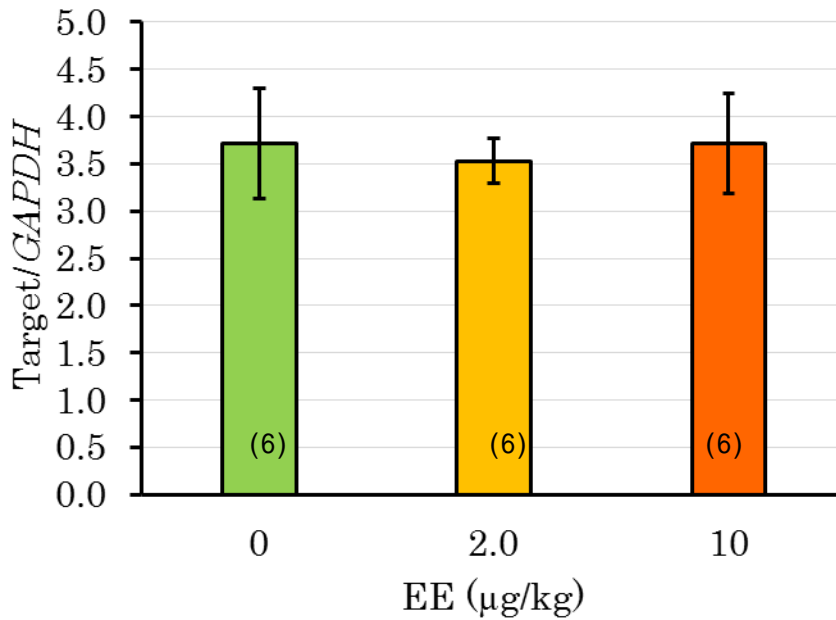


図6. 1日齢から5日間0、0.016または0.08 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (0 μg/kg/day 群を除き、平均 ± S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

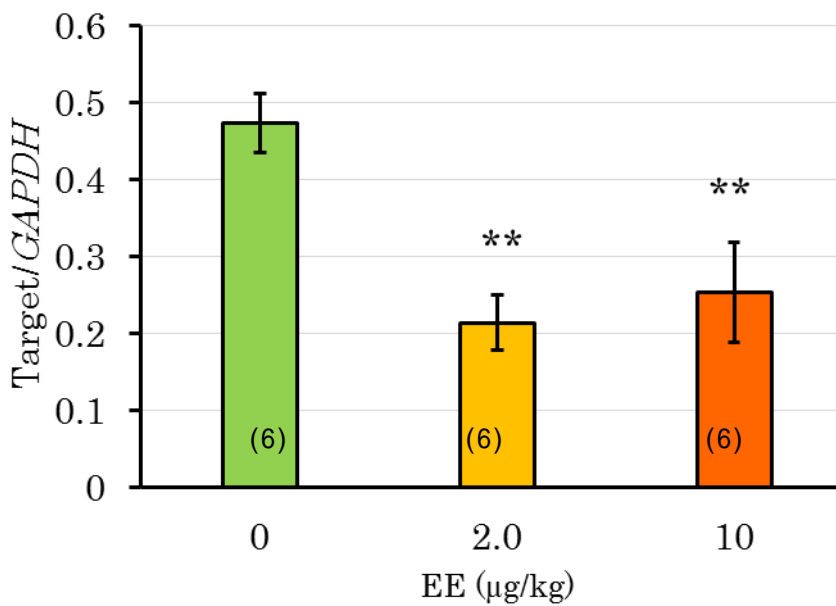


図7. 1日齢に0、2または10 μg/kgのエチニルエストラジオール(EE)を単回経口投与した雌ラット視床下部の投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M)

(N) \*\*対照群との間に有意差あり ( $P < 0.01$ )

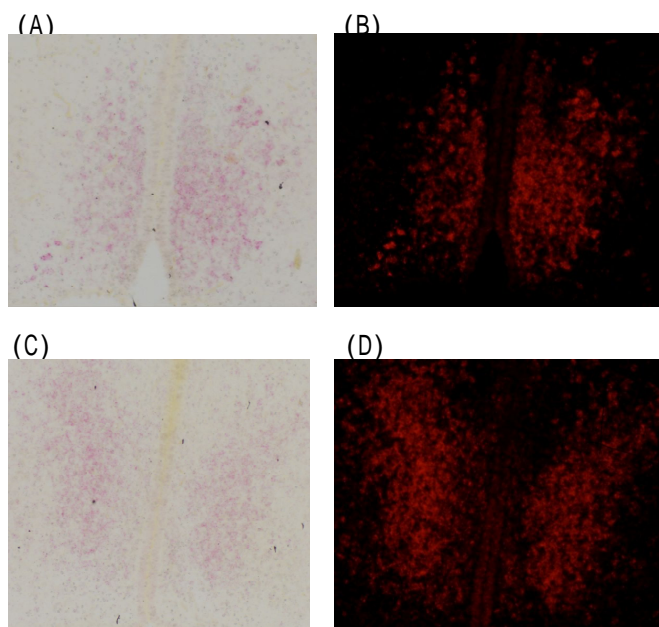


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$  ISH(代表例) コーン油を投与した対照群(AおよびB)ならびに $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野(AおよびC)および暗視野(BおよびD)像で、 $ER\alpha$  mRNAは赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

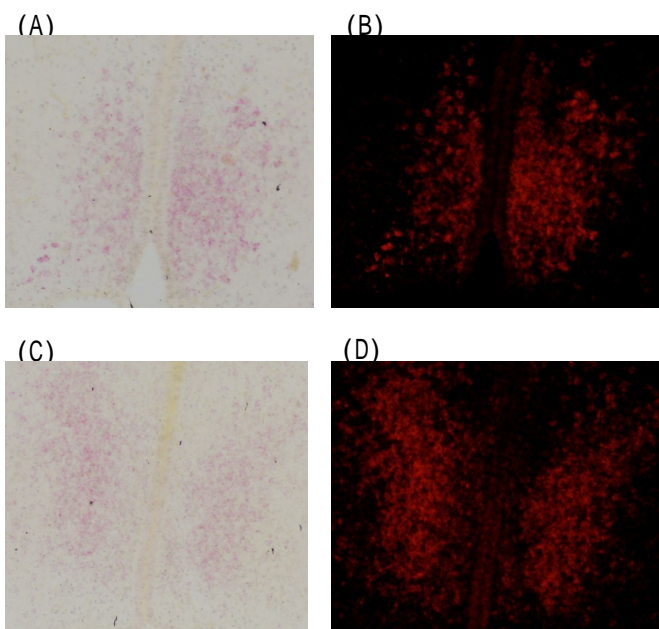


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$  ISH(代表例) コーン油を投与した対照群(AおよびB)ならびに $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野(AおよびC)および暗視野(BおよびD)像で、 $ER\alpha$  mRNAは赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。



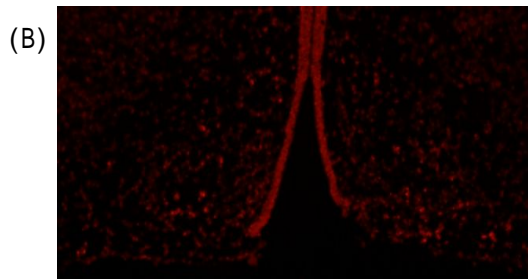
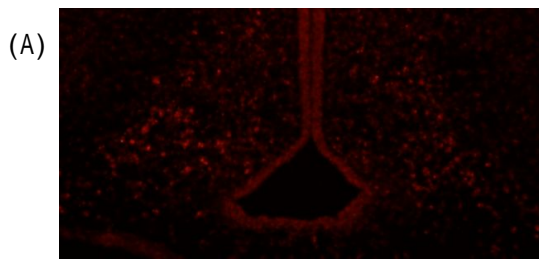


図 10. エチニルエストラジオール(EE)を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した 6 日齢雌ラットの ARC 領域における *ERα* ISH (代表例)  
コーン油を投与した対照群 (A) ならびに 2 μg/kg/day 投与群(B)の暗視野 (B および D) 像で、*ERα* mRNA は赤色蛍光として認められる。

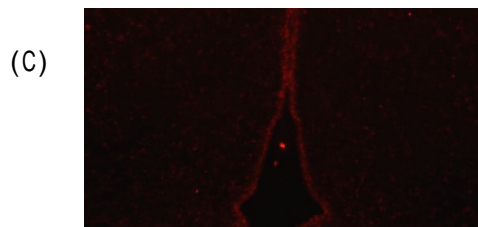
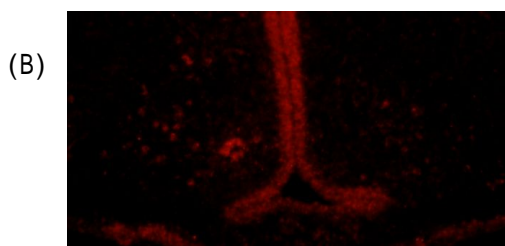
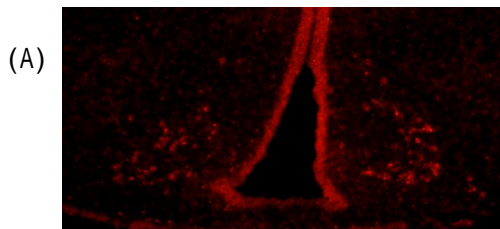


図 11. エチニルエストラジオール(EE)を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した 6 日齢雌ラットならびに 10 日齢の *Kiss1* ノックアウトラットの ARC 領域における *Kiss1* ISH (代表例)  
コーン油を投与した対照群 (A) ならびに 2 μg/kg/day 投与群(B)の暗視野像で、*Kiss1* mRNA は赤色蛍光として認められるが、ノックアウトラットの ARC 領域 (C) に蛍光は認められない。

表1 リアルタイム PCR 用に合成したプライマーおよびプローブ

ターゲット	Accession	配列 (5' 3')		
ER $\alpha$	NM 012689	プライマー	F	GAAAGGCGGGATACGAAAAGA
			R	TCTGACGCTTGTGCTTCAACA
		プローブ		CGCCGAGGAGGGAG
ER	NM 012754	プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
			R	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
		プローブ		TTATGAAGTAGGAATGGTCAAGTG

表2

1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの8-9週齢における性周期の型および10週齢からの交配成績

EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	0 <sup>a</sup>	0.08
Number of animals determined	7	6
Estrous cycle	6	5
Regular cycle	6	5
Irregular cycle	1	1
Fertility		
Copulated	7	6
Pregnant	7	6

<sup>a</sup> corn oil 10 mL/kg/day

表 3

1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの妊娠期間中における体重推移（平均±標準誤差）

EE (μg/kg/day)	0 <sup>a</sup>	0.08
Number of animals determined	7	6
Body weight (g)		
Gestational day 0	289.6 ± 4.9	267.0 ± 6.4*
day 7	334.1 ± 5.5	312.0 ± 5.1*
day 14	369.7 ± 4.8	349.7 ± 4.7*
day 20	457.0 ± 4.7	421.8 ± 6.3*
Body weight gain (g)		
Gestational day 0-7	44.6 ± 3.5	45.0 ± 3.0
day 7-14	35.6 ± 2.6	37.7 ± 2.3
day 14-20	87.3 ± 3.6	72.2 ± 2.3*

<sup>a</sup> corn oil 10 mL/kg/day

\* p<0.05

表 4

1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの帝王切開所見

EE (μg/kg/day)	0 <sup>a</sup>	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of corpus luteum	15.0 ± 0.6	13.8 ± 0.6
Number of implantation sites	14.7 ± 0.7	12.7 ± 2.0
Implantation index (%)	98.0 ± 1.9	92.0 ± 5.2
Pre-implantation loss	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.7
Number of live fetuses	13.4 ± 2.2	11.7 ± 1.8
Survival rate (%)	92.8 ± 6.7	92.9 ± 10.1
Post-implantation loss	1.3 ± 1.2	1.0 ± 1.4
Placental remnant	1.0 ± 0.3	1.0 ± 1.4
Dead fetus	0.3 ± 0.5	0

表 5

1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの妊娠末期胎児所見

EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	0 <sup>a</sup>	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of males	6.4 $\pm$ 1.5	5.7 $\pm$ 1.4
Number of females	7.0 $\pm$ 1.8	6.0 $\pm$ 1.5
Sex ratio (male %)	52.1 $\pm$ 3.5	51.4 $\pm$ 4.0
Feral body weight (g)	3.6 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.1*
Placental weight (g)	$\pm$	$\pm$
External abnormality (edema)	0	1
Skeletal anomalies	0	0
Skeletal variations	2	2
Absence of the 13 <sup>th</sup> rib	0	1
Short 13 <sup>th</sup> rib	1	0
Lumbar rib		1
Variation in number of lumbar vertebrae	1	0
Frequency of fetuses with ossified bones (%)		
Right forelimb phalanx (V)	19.4 $\pm$ 7.6	48.8 $\pm$ 7.8*
Left forelimb phalanx (V)	17.4 $\pm$ 6.4	39.8 $\pm$ 8.8
Starnebra (II)	98.9 $\pm$ 1.0	100 $\pm$ 0
Starnebra (III)	98.9 $\pm$ 1.0	100 $\pm$ 0
Starnebra (IV)	96.7 $\pm$ 3.1	98.5 $\pm$ 1.4
Starnebra (V)	41.1 $\pm$ 13.0	76.8 $\pm$ 6.5
Starnebra (VI)	24.8 $\pm$ 11.0	57.2 $\pm$ 11.3
Number of ossified caudal and sacral vertebrae	7.69 $\pm$ 0.24	8.37 $\pm$ 0.09*

<sup>a</sup> corn oil 10 mL/kg/day

\* p<0.05

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

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

研究分担研究課題：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の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ-エストロゲンの新生子期曝露による雌ラットの卵細胞制御遺伝子発現に対する影響-

研究分担者：渡辺 元 所属 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門  
研究協力者：臼田 賢人 所属 岐阜大学大学院連合獣医学研究科  
張 浩林 所属 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

### 研究要旨

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。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。新生子期 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。その結果、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。マイクロアレイ解析の結果を確認するために、生後 24 時間以内に EE あるいはゴマ油を投与し、生後 1, 3, 7, 14, 21 日齢に卵巣を採取してアポトーシス関連遺伝子量をリアルタイム PCR で定量した。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解析するために、TUNEL 染色を行ったところ、生後 1 日の卵巣で、EE 処置群より対照群の方がより強い染色性を示した。さらに、卵巣の卵胞数を解析した結果、EE 投与群では生後 8 日の原始卵胞数が減少していた。EE の卵巣に対する直接作用を確認するため、生後 0 日のラットから卵巣を採取し、EE 添加あるいは無添加で 1 日間培養し、アポトーシス関連因子の遺伝子発現を解析した。その結果、EE 添加群で Hrk 遺伝子発現が減少していた。さらに、Hrk をノックダウンした卵巣で、TUNEL で染色された卵細胞が減少した。以上を合わせて考えると、EE が新生子の卵巣に直接作用し、アポトーシスを抑制し、Hrk の発現抑制を介して、原始卵胞の形成を障害したものと考えられた。

### A. 研究目的

雌の生殖可能期間は卵巣における卵胞形成と卵胞発育によって決定される (Hirshfield, 1994)。形成された原始卵胞の数がおおむね将来排卵される卵胞の数を決定するので雌の生殖能力を左右する。一般的にラットでは原始卵胞が生後 1 週間に卵巣で形成される。卵巣内で被嚢生殖細胞が分散する際には卵細胞のアポトーシスが伴い、生き残った卵細胞が顆粒層細胞の前駆細胞によって囲まれ原始卵胞を形成する。扁平状の顆粒細胞が立方状になり、一次卵胞となる。単層の顆粒層細胞が分裂増殖し、多層になり二次卵胞となる。卵胞

はさらに発育し、成熟卵胞となり、排卵し、黄体となっていく (Skinner, 2005; Edson et al, 2009)。しかしながら、卵胞の形成と発育の過程は環境中の化学物質によって影響を受ける。

種々の内分泌かく乱物質 (EDCs) が環境中に認められ、多くの生物の発育、成長、代謝、生殖などの生理機能に有害な影響を与える可能性がある (Kavlock et al., 1996; Safe, 2000; Hotchkiss et al., 2008; Casals-Casas & Desvergne, 2011; Meeker, 2012; Kumar & Holt, 2014)。胎子期ならびに新生子期に内分泌かく乱物質に曝露されるのは大変危険である。なぜならその時期には内因性および外因性の化学物質に対

して感受性の高い臨界期が存在するからである (Ben-Shlomo & Kuh, 2002)。この臨界期に生じる毒性影響には不可逆的で一生残存するものがある (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009)。環境中には多くの人工化学物質がある。合成エストロゲンのひとつである 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol (EE) は、女性の経口避妊薬に使用されている。EE は河川などの水にも検出され、水棲生物の生殖かく乱を起こしている (Lai *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2005; Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010)。さらに、植物にも吸収・蓄積される可能性があり、陸上生物の食物連鎖にも水を介して蓄積される可能性がある (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011)。過去の報告では新生子期に EE に曝露すると、成熟後に影響が現れるいわゆる delayed effect (晩発影響/遅延影響) が見られたことを示した (Sawaki *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2009; Shiorta *et al.*, 2012; Mandrup *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2013)。野澤等は早期の発情周期の乱れや生殖可能期間の短縮を報告している (Nozawa *et al.*, 2014; Usuda *et al.*, 2014)。しかしながら雌の生殖機能における新生子期 EE 投与の晩発影響のメカニズムは未だ不明な部分が多い。

本研究では、EE 投与晩発影響のメカニズムを解明するために、EE 投与ラットの卵巣で原因遺伝子の網羅的解析をマイクロアレイ法を用いて行った。Bcl2 ファミリーに属しアポトーシスに関連する遺伝子 Hrk に注目した。発育途上のラットの卵巣における Hrk 遺伝子発現と EE 投与の関係を、EE を投与したラットで解析するとともに、器官培養下で EE に曝露された卵巣を用いて解析した。さらに、卵巣にける Hrk の役割を明らかにするために、ラット新生子卵巣の器官培養下で Hrk をノックダウンして、卵細胞のアポトーシスを解析した。

## B. 材料と方法

### 実験動物

雌雄の成熟 Wistar-Imamichi ラット (動物繁殖研究所、茨城) を使用し、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、14 時間明期 (05:00 から 19:00) 10 時間暗期で飼育した。繁殖用ラット固形飼料 (MR プリナー、日本農産工業) と水は自由摂取とした。

膣スミアの観察より発情周期を観察し、交配、出産させた新生子を実験に用いた。全ての実験は東京農工大学動物実験委員会の審査を経て行われた (23-1)。

### 実験計画

In vivo 実験: 雌新生子を以下の 3 群に分けた。1) 対照群: 溶媒として用いたゴマ油を投与、2) EE 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群、3) 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群。出生後 24 時間以内に頸部皮下に投与した。200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を投与したラットの卵巣を PND1、PND3、PND7、PND14、PND21 に採取した。2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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。

In vitro 実験: 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存し、マイクロアレイ解析を行った (各群  $n=5$ )。さらに PND0 の卵巣を採取し、器官培養下で種々の EE 濃度に曝露した (low: 1 ng/ml, middle: 10 ng/ml and high dose: 100 ng/ml)。基礎培地である DMEM には ITS supplement と antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を加えた。24 時間の培養後、卵巣を液体窒素で速やかに凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存後 real time PCR で解析した ( $n=5$ )。

### マイクロアレイ法

RNA を各処置群の卵巣から抽出しマイクロアレイ解析を行った。

### 組織学的解析

卵巣を 4% パラフォルムアルデヒド PBS 溶液で固定し、定法によりパラフィン包埋後 6  $\mu\text{m}$  の切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。PND8 の卵巣の連続切片を作成し、2 枚おきの切片について卵胞のタイプ別 (被嚢生殖細胞、原始卵胞と一次卵胞) に計数した (1 卵巣あたり約 50 枚、各群 3 例)。

### 免疫組織学的解析

卵巣の切片を 10% 正常ヤギ血清で処理し、被特異結合を抑制した。その後各切片を 1 次抗体 anti-Hrk (Thermo Scientific, Prod #PA1-86773) を用いて一晩  $4^{\circ}\text{C}$  で反応させた。その後 rabbit VECTASTAIN ABC kit (Vector lab., Burlingame, CA) を用いて、ビオチンを結合させた 2 次抗体と反応させ、アビジンを結合したペルオキシダーゼを結合させた後に、diaminobenzidine (Sigma) を用いて可視化した。

最後にヘマトキシリンにより核を対比染色した。対照切片は正常ウサギ IgG 溶液(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)によって処置した。蛍光画像を蛍光顕微鏡 BX-51 (Keyence, Osaka, Japan)で撮影し、解析した。

#### TUNEL 染色

アポトーシスを示す卵細胞を TUNEL 法によって染色して、可視化した。ApopTag (Millipore, Darmstadt, Germany)をキット添付説明書どおりに使用し、連続切片の 2 枚おきに観察した。

#### qRT-PCR 解析

総 RNA を卵巣から TRIzol Reagent (Invitrogen Co., CA, USA) を用いて抽出した。PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、cDNA を作成した。qRT-PCR 解析用のプライマーを Primer 3 program を用いて作成した(Table 1)。PCR反応は、10 µl の試料に SYBR-Green I を含む、Ex TaqR Hot Start Version (Takara Bio) を加え、chrome4 Real-Time PCR System (Bio-Rad, CA)を用いて以下の条件で行った: 95 °C、30 秒、PCR反応を 5 秒間 95 °C で 40 サイクル、60 °C で 30 秒、その後分離行程。目的の遺伝子発現量は gamma-tubulin mRNA の量に対して、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method を用いて表した。

#### プラスミド設計とウイルス感染

以下の様に shHrk のレトロウイルス発現系を構築した:

sense oligo,

5'-TGATTCAAGAGCCAAGAAATTTCAAGAGAATTTCTTGGCTCTTGAATCTTTTTTC-3';

antisense oligos,

5'-TCGAGAAAAAAGATTCAAGAGCCAAGAAATTTCTTGAATTTCTTGGCTCTTGAATCA-3'.

annealing oligo を plasmid pLetiLox 3.7 に組みこんだ。レンチウイルスとレトロウイルスの発現系を含むそれぞれのプラスミドを、株化細胞である 293T 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて、共発現させた。ウイルスを含む上清を感染 48 時間後に回収し、ウイルス感染のため、-80 °C で保存した。

新生子の卵巣を採取し器官培養した培地に、ウイルスを含む培養上清を 1 日添加した。その後、卵巣を回収し TUNEL 染色と real-time

PCR で解析した。

#### 統計解析

統計解析には Prism 5 (Graphpad Software, Inc., CA, USA)を用いて、Student's t-test、あるいは One-way ANOVA に加え Turkey's multiple range test を行った。p<0.05 を持って有意差ありとした。

## C. 結果

### 卵巣における EE による Hrk 発現に対する影響

新生子期に EE を投与されたラットの卵巣における影響の責任遺伝子を明らかにするために、生後 1 日の卵巣をマイクロアレイで解析した。Table 2 に発現が増加あるいは減少した遺伝子の上位 5 番までを示した。アポトーシスに関連する遺伝子 Hrk が対照群に比べ有意に減少していた。

### EE 処置群の卵巣に見られた原始卵胞の減少

生後 8 日目卵巣の組織学的解析の結果を Fig. 2A に示した。顆粒細胞が立方上皮型を示す卵胞を一次卵胞、扁平上皮型の場合を原始卵胞、顆粒細胞に囲まれていない卵胞を前原始卵胞とした。それぞれの種類の総卵胞数を数えた結果、EE 処置群の卵巣で原始卵胞の数が対照群に比べわずかに減少していた。

### Hrk 遺伝子の卵細胞における発現

卵巣における免疫組織化学染色による Hrk タンパク質の発現を Fig. 3 に示した。EE 投与群では、Hrk タンパク質が PND1 卵巣の卵細胞において対照群に比べ減少していた。

### EE 直接曝露による Hrk 遺伝子発現の抑制

マイクロアレイ解析の結果を確認するため、real time PCR を行った。Hrk を含む Bcl2 遺伝子群の発現を解析した。興味深いことに Hrk 遺伝子発現が EE 処置生後 1 日の卵巣で有意に減少していた (Fig.4A)。

real time PCR で EE 添加培地で培養した卵巣を解析したところ、Hrk 遺伝子発現が対照群に比べ in vivo 実験と同様に有意に減少していた。(Fig. 4B).

### EE 曝露卵巣におけるアポトーシスを示す卵

#### 細胞の減少

TUNEL 染色によって染まる卵細胞は対照群に対して EE 処置群で減少した。さらに生後 1 日の卵巣で EE 処置群の卵巣では TUNEL 染色の強度が減弱していた(Fig. 5)。

#### Hrk 遺伝子をノックダウンした卵巣における卵細胞アポトーシスの減少

Hrk 遺伝子がノックダウンされているかを real time PCR で確認した。Hrk 遺伝子の発現は 70%以上減少していた。TUNEL 染色を行った結果、対照群に比べ明らかに EE 処置群でアポトーシスを示す卵細胞が減少した。

#### 他の内分泌かく乱物質による Hrk 遺伝子発現に対する作用

Hrk 遺伝子発現低下が、内分泌かく乱物質による新生子期の卵巣影響に共通して見られる影響か否かを検討するために新生子の卵巣を、10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2) あるいは 10 nm DES とともに 1 日培養した卵巣における Hrk 遺伝子発現を real-time PCR で解析した (Fig. 7)。その結果、EE 同様に E2 ならびに DES 曝露によっても Hrk 遺伝子発現が有意に低下した。

#### D. 考察

本研究の結果、新生子期の EE 曝露が卵巣において卵細胞のアポトーシスを抑制することで卵胞形成を傷害することが明らかとなった。卵細胞のアポトーシス減少はアポトーシス関連遺伝子である Hrk 遺伝子の発現を新生子期の卵細胞で抑制することによることが示唆された。本研究は内分泌かく乱物質の卵巣における直接作用の情報経路を示している。

卵巣において被嚢生殖細胞が崩壊して原始卵胞を形成する過程で卵細胞のアポトーシスが起きる。この過程は齧歯類の卵巣において、生後に起きる卵胞形成に重要である。しかしながら、この時期に内分泌かく乱物質に曝露されると原始卵胞の正常な形成過程が傷害される。本研究において、出生直後に EE を投与されたラットの卵巣ではアポトーシスを示す卵細胞が減少した。この現象は、EE 処置されたラットだけで見られたのではない。合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES)も

C57BL/6J において卵細胞のアポトーシス減少を起こすことが報告されている(Kim et al., 2009)。estradiol monobenzoate (EB) を新生子期に投与された生後 5 日のマウスの卵巣で、卵細胞のアポトーシスの減少が報告されている(De Pol et al., 2001)。これらの報告は新生子期のエストロゲン曝露が卵巣発達の初期において、卵細胞のアポトーシスを抑制することを示している。さらに、本研究の結果は EE を投与されたラットの生後 8 日の卵巣における原始卵胞の減少が、卵細胞のアポトーシス減少により原始卵胞の形成を阻害した結果であることを示している。本研究の結果は、新生子期のエストロゲンあるいはゲニステインによる処理が、被嚢生殖細胞の崩壊を抑制し、原始乱歩の形成を阻害するという過去の研究と一致している(Kezele & Skinner, 2003; Chen et al., 2007; Chen et al., 2009)。

細胞外からの刺激を受けて、ミトコンドリアの Bcl2 群タンパク質のアポトーシスへの引き金が引かれる(Czabotar et al., 2014)。アポトーシス誘導タンパク質 Hrk (harakiri)は抗アポトーシスタンパク質 A1、Bcl-W や Bcl-XL と相互作用する(Doerflinger et al., 2015)。本研究で出生直後の卵巣で、Hrk 遺伝子発現の減少に伴い TUNEL 染色陽性の卵細胞が減少した。さらに、免疫組織学染色により Hrk タンパク質は卵細胞に局在していた。合わせて考えると、Hrk 遺伝子発現の減少により卵細胞のアポトーシスが減少したと考えられる。また、in vivo と in vitro 実験結果から EE が直接、ラットの卵巣で Hrk 遺伝子の発現を抑制し得ることを示している。Hrk の遺伝子発現調節が、EE 投与による卵細胞のアポトーシス減少の標的となっていたと考えられる。卵巣における Hrk 遺伝子発現に関する研究は、数少ないものの、Hrk 遺伝子発現は EE の標的遺伝子というだけでなく、内分泌かく乱物質である他の多環芳香属炭化水素も同様にマウス新生子の卵巣およびヒト胎児卵巣でも標的遺伝子となっている(Juriscicova et al., 2007; Fowler et al., 2014)。しかしながら EE による Hrk 遺伝子発現調節メカニズムは今後の研究課題である。

一般に、雌の生殖機能は視床下部、下垂体と卵巣の相互作用によって制御されている。内分泌かく乱物質の曝露は卵巣のみならず、



下垂体や視床下部にも影響を与えられている(Dickerson & Gore, 2007)。本研究で卵巣へのEEの直接作用を解析するために、卵巣の器官培養系を用いた。その結果、EEの卵巣への間接作用ではなく、直接作用がHrk遺伝子発現の抑制を介していることが確認された。既に知られているように、エストロゲン様化合物により胎子期あるいは新生子期に曝露されると、障害が成熟後に現れてくる(Hotchkiss et al., 2008)。過去の報告では、新生子期ラットのEE曝露により成熟後の早期に発情周期が乱れ、PND90で原始卵胞の減少が見られている(Nozawa et al., 2014)。本実験の結果と合わせて考えると、新生子期にEEに曝露されたことにより、卵細胞のアポトーシス減少により原始卵胞形成障害が起きた結果、成熟後に卵巣機能が異常を示したのかもしれない。

## E. 結論

新生子期のEE曝露が直接卵巣の卵細胞におけるHrk遺伝子発現抑制により卵細胞のアポトーシスを抑制したことを示した。卵細胞のアポトーシス減少と原始卵胞数が減少した結果、成熟後の性周期異常と卵巣の機能障害を引き起こしたのかもしれない。

## F. 研究発表

### 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 17 $\alpha$ -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 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.
- 4) Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE)

disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats

(*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016年1月)

- 5) Zhang H, Taya K, Nogaoka K, Watanabe G. The hormone profiles in developing female rats after neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol (EE). (*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016年2月).

## 2. 学会発表

- 1) 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)
- 2) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -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)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## References

- Ben-Shlomo, Y. & Kuh, D. (2002) A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *International journal of epidemiology*, 31, 285-293.
- Casals-Casas, C. & Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
- Chen, Y., Breen, K. & Pepling, M.E. (2009) Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. *The Journal of endocrinology*, 202, 407-417.
- Chen, Y., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Padilla-Banks, E. & Pepling, M.E. (2007) Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary in vitro and in vivo. *Endocrinology*, 148, 3580-3590.
- Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G. (2010) Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied microbiology and*

biotechnology, 86, 1671-1692.

Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15, 49-63.

De Pol, A., Benelli, A., Arletti, R., Cavazzuti, E., Sena, P., Vaccina, F. & Marzona, L. (2001) Influence of estrogens and oxytocin on germ cells death in the neonatal mammalian ovary. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 106, 233-239.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30, 293-342.

Dickerson, S.M. & Gore, A.C. (2007) Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 8, 143-159.

Doerflinger, M., Glab, J.A. & Puthalakath, H. (2015) BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *The FEBS journal*, 282, 1006-1016.

Edson, M.A., Nagaraja, A.K. & Matzuk, M.M. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30, 624-712.

Fowler, P.A., Childs, A.J., Courant, F., MacKenzie, A., Rhind, S.M., Antignac, J.P., Le Bizec, B., Filis, P., Evans, F., Flannigan, S., Maheshwari, A., Bhattacharya, S., Monteiro, A., Anderson, R.A. & O'Shaughnessy, P.J. (2014) In utero exposure to cigarette smoke dysregulates human fetal ovarian developmental signalling. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29, 1471-1489.

Hirshfield, A.N. (1994) Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of reproduction*, 50, 421-428.

Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L. & Gray, L.E. (2008) Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disruptors and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 105, 235-259.

Juriscova, A., Taniuchi, A., Li, H., Shang, Y., Antenos, M., Detmar, J., Xu, J., Matikainen, T., Benito Hernandez, A., Nunez, G. & Casper, R.F. (2007) Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *The Journal of clinical investigation*, 117, 3971-3978.

Karnjanapiboonwong, A., Chase, D.A., Canas, J.E., Jackson, W.A., Maul, J.D., Morse, A.N. & Anderson, T.A. (2011) Uptake of 17alpha-ethynylestradiol and triclosan in pinto bean, *Phaseolus vulgaris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74, 1336-1342.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. & Tilson, H.A. (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104, 715-740.

Kezele, P. & Skinner, M.K. (2003) Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, 144, 3329-3337.

Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T. (2009) Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biology of reproduction*, 81, 1002-1009.

Kumar, E. & Holt, W.V. (2014) Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Advances in experimental medicine and biology*, 753, 55-70.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. & Lester, J.N. (2002) Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and environmental microbiology*, 68, 859-864.

Mandrup, K.R., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Axelstad, M., Dreisig, K., Hadrup, N., Vinggaard, A.M., Hass, U. & Boberg, J. (2013) Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 42, 180-191.

Mathews, E., Braden, T.D., Williams, C.S., Williams, J.W., Bolden-Tiller, O. & Goyal, H.O. (2009) Mal-development of the penis and loss of fertility in

- male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 112, 331-343.
- Meeker, J.D. (2012) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166, 952-958.
- Nozawa, K., Nagaoka, K., Zhang, H., Usuda, K., Okazaki, S., Taya, K., Yoshida, M. & Watanabe, G. (2014) Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 46, 77-84.
- Patisaul, H.B. & Adewale, H.B. (2009) Long-Term Effects of Environmental Endocrine Disruptors on Reproductive Physiology and Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3.
- Pedersen, J.A., Soliman, M. & Suffet, I.H. (2005) Human pharmaceuticals, hormones, and personal care product ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1625-1632.
- Safe, S.H. (2000) Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, 108, 487-493.
- Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S. & Yamasaki, K. (2003) In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 75, 402-411.
- Shiorta, M., Kawashima, J., Nakamura, T., Ogawa, Y., Kamiie, J., Yasuno, K., Shiota, K. & Yoshida, M. (2012) Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17alpha-ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *The Journal of toxicological sciences*, 37, 681-690.
- Skinner, M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human reproduction update*, 11, 461-471.
- Takahashi, M., Inoue, K., Morikawa, T., Matsuo, S., Hayashi, S., Tamura, K., Watanabe, G., Taya, K. & Yoshida, M. (2013) Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 40, 16-23.
- Usuda, K., Nagaoka, K., Nozawa, K., Zhang, H., Taya, K., Yoshida, M. & Watanabe, G. (2014) Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 76, 1105-1110.

**Table 1. 定量的real time PCR に用いたプライマー。**

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Hrk	tgtgaagctctggcacaatc	ggatggatgcacacacact
Bcl2	cgactttgcagagatgtcca	catccacagagcgatgttgt
Bax	cgagctgatcagaacctca	ctcagcccatcttcttccag
Bcl2l1	accggagagcattcagtgat	tgcaatccgactcaccaata
Bcl2l2	gctgaggcagaaggttatg	tggaaaagttcgtcggaaac
Mcl1	gggctggcttgcatatcta	gggagcacttttcccatgta
Bak	tctcagaggggctgacagat	ccgaccttcaaagtagcag
Bid	ggctttctccgaaacaatga	tggcaatgttgtggatgact
Bim	gcagtctcaggaggaacctg	agtgccttctccagaccaga
Puma	aaagccttctcaaccctg	aatgaatgccagtggtcaca
Bmf	ggtacagatcgccagaagc	gcgatctatccgacaagagc
Bad	gcttagcccttttcgaggac	gatcccaccaggactggata
Bik	at t t c a t g a g g t g c c t g g a g	t t t t c c c t g a g g t t g g t g a g
Bok	gaaggtggctaacgcagaag	ctcctcatccacaggctctc
Beta-Actin	agccatgtacgtagccatcc	ctctcagctgtggtggtgaa

**Table 2. EE処置ラットの卵巣で、マイクロアレイ法により検出された発現上昇遺伝子と低下遺伝子各5つずつ。**

Up-regulated genes	Down-regulated genes
Calb3	Sepp1
Mmp7	Ca3
Tnfrsf6	Hrk
Itmap1	Fxyd7
Dhdh	Vdr

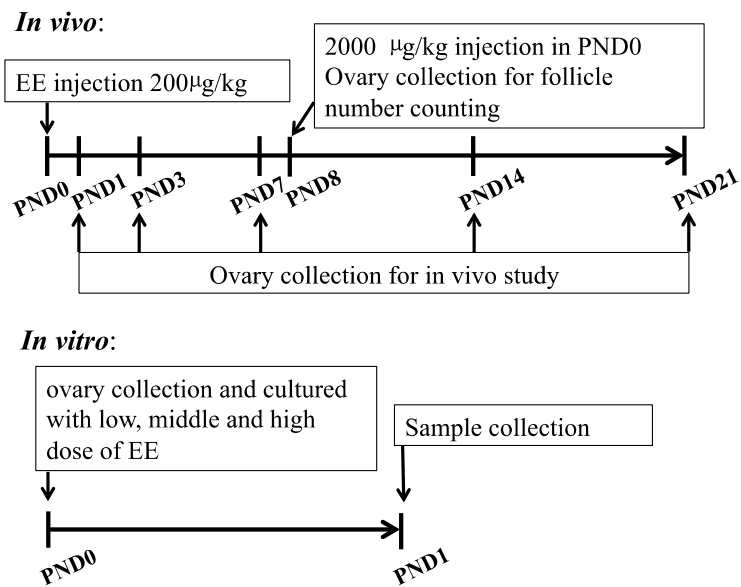


Fig. 1. in vivo および in vitro の実験計画。PND, postnatal day : 生後日齢。

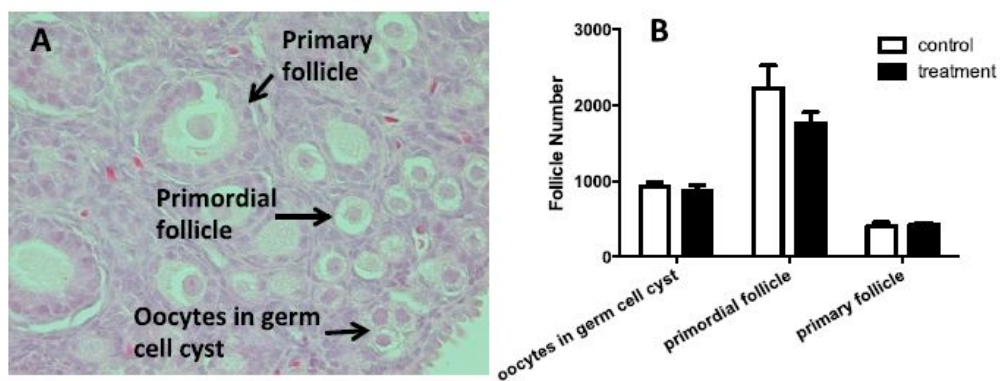


Fig. 2. (A) 生後 8 日のラット卵巢の組織象。(B) 生後 8 日のラット卵巢における種々の卵胞の総数。それぞれの卵胞は (A) の写真に示してある。

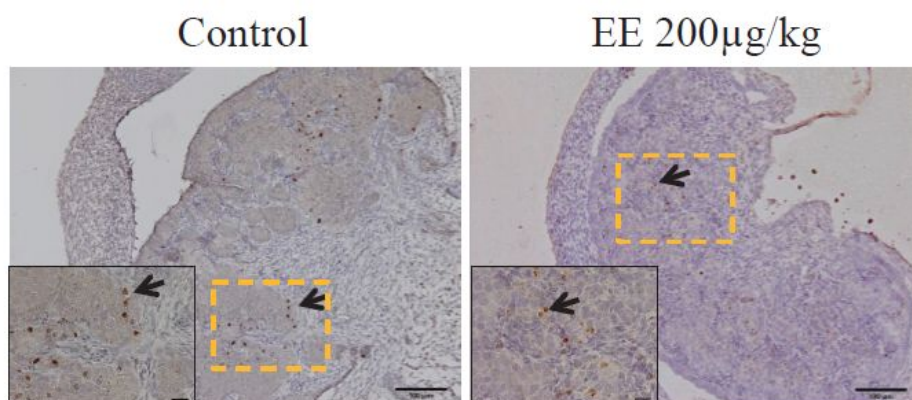


Fig. 3. 生後1日の対照群およびEE処置群 (200 $\mu$ g/kg) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。

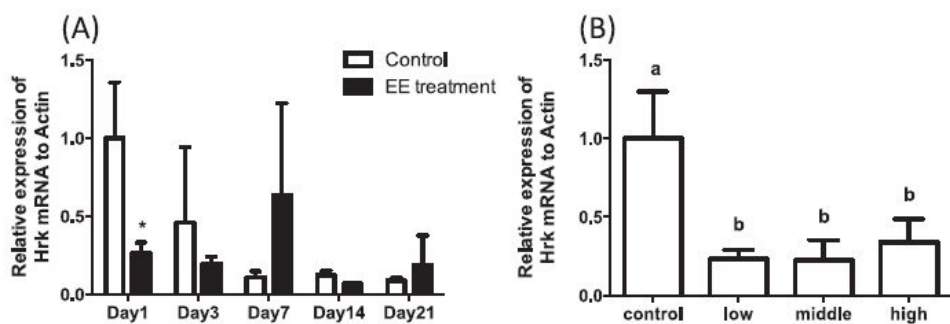


Fig. 4. EE処置群および対照群の *in vivo* 卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量 (A) と EE 添加 (low: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/ml)、あるいは非添加で新生子卵巣を培養したときの *Hrk* 遺伝子発現量 (B)。\*は有意差有り (P<0.05)。

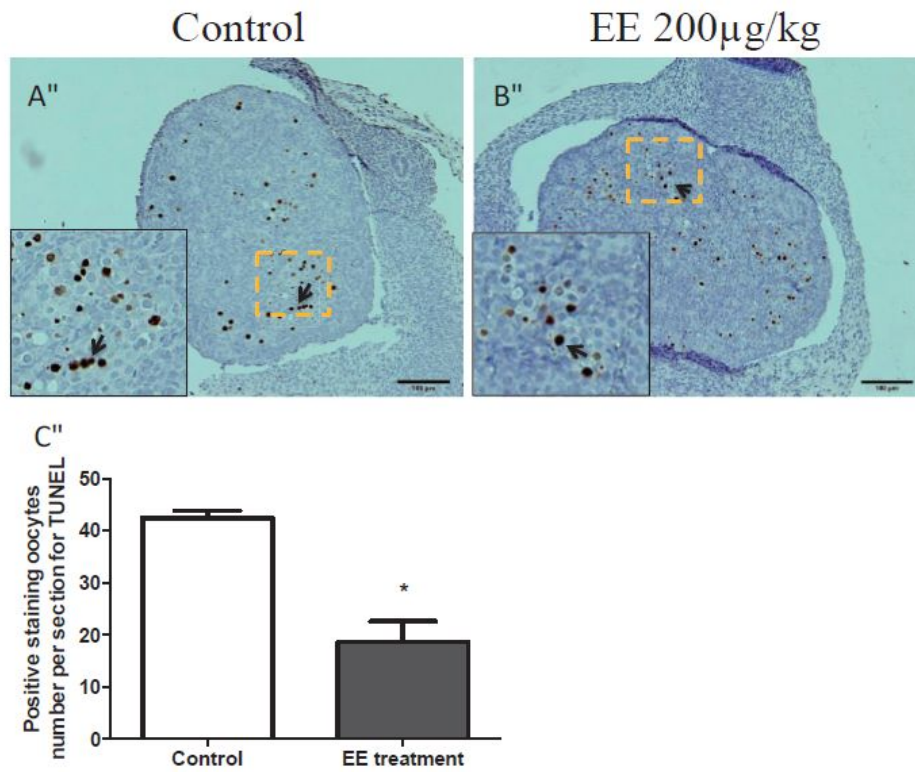


Fig. 5 生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。\*は有意差有り(P<0.05)。

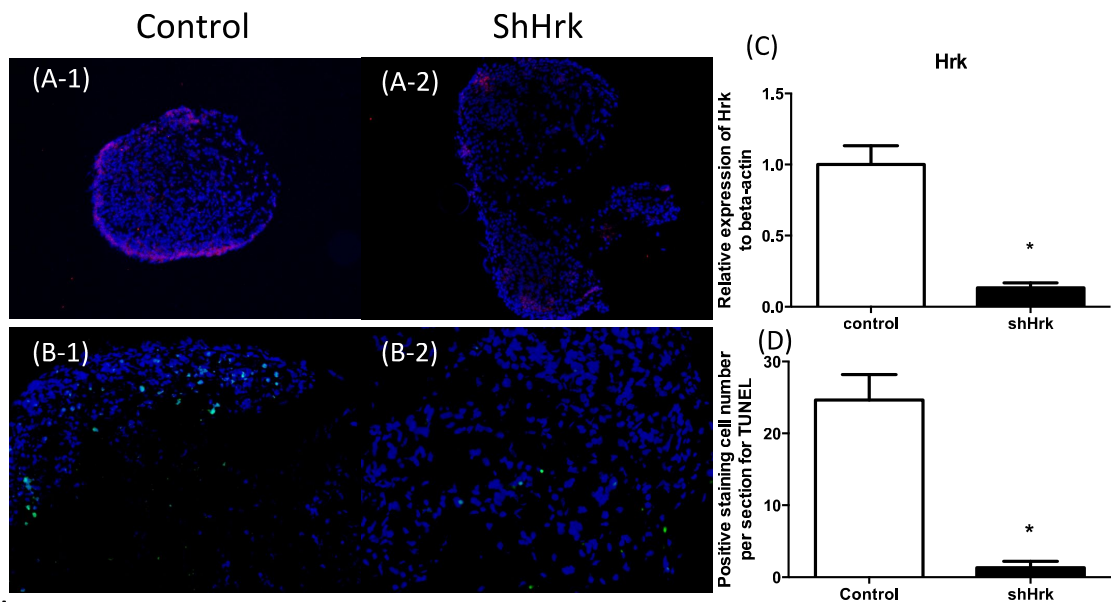


Fig. 6. (A) 1日培養後の卵巣におけるHrkタンパク質の蛍光免疫組織化学染色 (ShHrk)。 (B) TUNELの蛍光免疫組織化学染色。 (C) real time PCRによる、対照群とHrk遺伝子ノックダウン群 (ShHrk)の卵巣におけるHrk遺伝子発現量。 (D) 対照群とHrk遺伝子ノックダウン群 (ShHrk)の卵巣の切片中平均TUNEL陽性細胞数。\*は有意差有り (P<0.05)

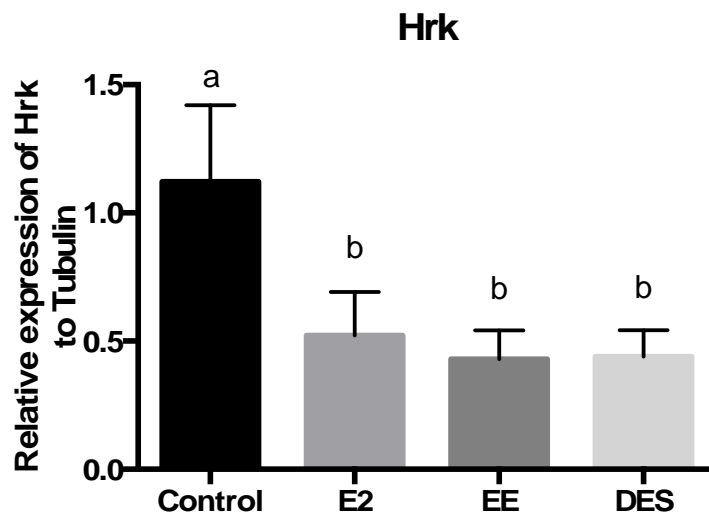


Fig. 7 新生子の卵巣の器官培養系におけるHrk遺伝子発現に対する影響。10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2)、EE(100ng/ml)、あるいは10nm DESとともに1日培養した卵巣におけるHrk遺伝子発現をreal-time PCRで解析した。



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

「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:新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後(遅発性)の影響  
～雌の膣開口、性周期ならびに雌雄の体重変化を中心とした観察と解析～

研究分担者： 氏名 横須賀誠 所属 日本獣医生命科学大学  
研究協力者： 氏名 無し 所属 無し

**[目的]** 出生 24 時間以内の新生仔マウスへの Ethynylestradiol (以下 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いる。これまで、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]** 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、膣スメ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。

**[結果]** 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 週目の間で高濃度 EE 投与群で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。

**[考察]** 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 系の発達に加え、エストロゲン受容体とも関連することが知られている。新生仔期の EE 曝露は、早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。

#### A．研究目的

経口避妊薬として現在でも使用されている Ethynylestradiol (以下 EE) の発育期曝露が及ぼすリスク指標と評価方法を確立することを目的に、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回 EE 投与 (皮下投与) モデルを用いて、発育期ならびに性成熟後における影響を検討した。

#### B．研究方法

新生仔期における化学物質曝露が発達期と成熟後の性的二型に及ぼすリスク評価を念頭に研究を行った。生後 24 時間以内の新生仔雌雄マウス (C57BL/6J: 日本クレアより妊娠動物を購入して日本獣医生命科学大学の実験動物施設にて出産させた) にゴマ油 (関東科学 N0.37036-02) に溶かした EE (0.2 $\mu$ g/kg, 20 $\mu$ g/kg, 2,000 $\mu$ g/kg) を 1  $\mu$ l のマイクロシリンジ (HAMILTON) を用いて皮下投与した。対象群には溶媒に用いたゴマ油 0.5  $\mu$ l (1 匹あたり) を投与した。したがって、実験は雌雄のゴマ油投与群 (対照群) 雌雄の 0.2  $\mu$ g/kg 投与群 (EE 0.2 群) 雌雄の 20  $\mu$ g/kg 投与群 (EE 20 群) 雌雄の 2,000  $\mu$ g/kg 投与群 (EE 2000 群) の計 8 群の間で比較した。

全ての動物は生涯を通じて推奨される一般飼育環境下で飼育した。生後 21 日目に離乳させ、雌雄別のケージに分別して継続飼育した。1 ケージの飼育数は 4 ~ 5 匹とした。全ての動物は出生当日 (Postnatal day 1 = PD1) より一定の間隔で体重測定した。さらに雌は PD10 から毎日外部生殖器を観察し、全ての雌動物が膣開口する日で確認を続けた。

生後 8 週齢以上に達した動物は、雌雄共に、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発声 (100 ~ 150kHz の超音波: 以下、USV) を記録した。

体重測定と USV 記録の終了後、(1) 免疫

組織化学染色用に 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で調整した 4% パラフォルムアルデヒドを用いて経心臓法で灌流固定し脳標本を得た。(2) CB およびエストロゲン受容体遺伝子の発現量を比較する RT-PCR 解析用に、断頭による安楽死を行った後に脳を採取した。

固定処理した脳標本は、内側視束前野 (POA) の全領域が含まれる領域 (The mouse brain, 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press; Figure 26-38) について、凍結マイクロトーム (Yamato) を用いて厚さ 40 $\mu$ m の連続前頭断切片として作成した。Anti-Calbindin D-28k (Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈) Anti-NeuN (mouse) による免疫組織化学染色 (二次抗体として Alexa 488, Alexa594, Molecular Probes-invitrogen を使用) と 0.5% クレシル紫 (MERCK 1.0693.0100) によるニッスル染色を施した。

標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM810) および光学顕微鏡 (Zeiss Axiovision) にて行った。

#### (倫理面への配慮)

動物への EE 投与、体重測定、膣開口確認、行動観察時の移動は、最低限の保定になるように心がけた。灌流固定を施す際には、ソムノペンチール (50 mg/kg BW) の腹腔内投与による深麻酔を施し痛覚が無くなったことを確認した後に行った。本実験は「日本獣医生命科学大学実験動物委員会」の審査の承認を受けて実施された (承認番号 13-69)

#### C．研究結果

##### 1) EE 投与による成長への影響

体重を指標とした出生当日 EE 投与による発育への影響として、雌において、授乳期間の中期における一時的な発育遅延が認められた (図 1 雌を参照)。その影響は EE2000 群において最も顕著であった。この発育遅延は離乳期までには解消され、その後の成長には影響しなかった (図 2)。一方、生後 5 週目までは雌雄とも体重の増加パターンの群間による

差は観察されなかったが、雌では EE20 群と 2000 群において体重のさらなる増加が記録された (図 2)。

## 2) 雌の膣開口への影響

出生当日 EE 投与は、EE 濃度依存的に膣開口の時期が早まる影響が認められた。特に EE2000 群では顕著に認められ、早い個体では離乳前の 18 日齢で膣開口する個体が認められた (図 3A)。平均値で比べると、EE 投与群でも投与濃度の高いほど膣開口が早期になっていた。膣開口時の体重は高濃度 EE の方がより軽い傾向があることが示された (図 3B)。

## 3) 離乳後の雌の性周期への影響

8 週齢に達した雌個体全てを用いて膣スミア像による性周期への影響を観察した。その結果、対照群雄では生後 14 週においては正常な周期性、生後 18 週にやや周期性に乱れを生じる個体が出現するものの全ての個体で周期性を維持していた。一方、EE 投与群では EE0.2 を含めて全ての群で生後 8 週目において性周期の異常が観察された (図 5)。

## 4) 視床・視床下部における Calbindin D-28k (CB)およびエストロゲン受容体遺伝子発現量に対する影響

RT-PCR による成熟後脳の CB およびエストロゲン受容体遺伝子の発現量の比較は、2015 年 11 月現在計測中で、本報告書の提出期限内に結果を得ることが出来なかった。

## D. 考察

出生当日マウスへの EE の単回曝露は、視床下部の CB 含有神経細胞の分布パターンの性差を攪乱するばかりでなく、授乳期の成長や成熟後の雌性周期にも影響を与えることが明らかとなった。授乳期における一過性の発育遅延は、投与した EE 濃度が高いほど影響が大きく現れた。これらの結果は、CB の性差と同様に、EE 作用容量が多いほど影響が大きくなることを示している。

これまでの多くの報告から示唆されるように、哺乳類の脳は原則的に雌であり、雄の脳は発育期にエストロゲンとアンドロゲンの作用を受けることで誘導される脳である。本来

はエストロゲンの作用を受けないことが前提である発育期雌の脳が EE 曝露によって通常レベルを超えたエストロゲン作用を受けると、脳の CB 発現パターンが雄に近づき、生殖器の発達や性周期に大きな障害を誘導するリスクが存在することを意味している。

本研究の結果は、発育期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質への曝露は仮に単回であったとしても、そしてそれが低濃度であっても、脳内のエストロゲン感受性の高い脳領域の発達に悪影響を及ぼし、さらには、雌の生殖機能に大きな影響を及ぼすことを示唆している。

## E. 結論

これまで我々は、新生仔期マウスへの EE 曝露は極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を起こし、脳は短時間の EE 曝露を受けることを明らかとしてきた。この短時間の脳への EE 作用は、性ステロイド感受性の高い脳領域である内側視束前野に CB 神経細胞の分布を生涯に渡って異常を及ぼすことを示してきた。今回さらに、新生仔期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質の曝露は、低濃度・短時間であったとしても、特に雌の生殖機能に異常を誘導する高いリスクを持つことを明らかにした。

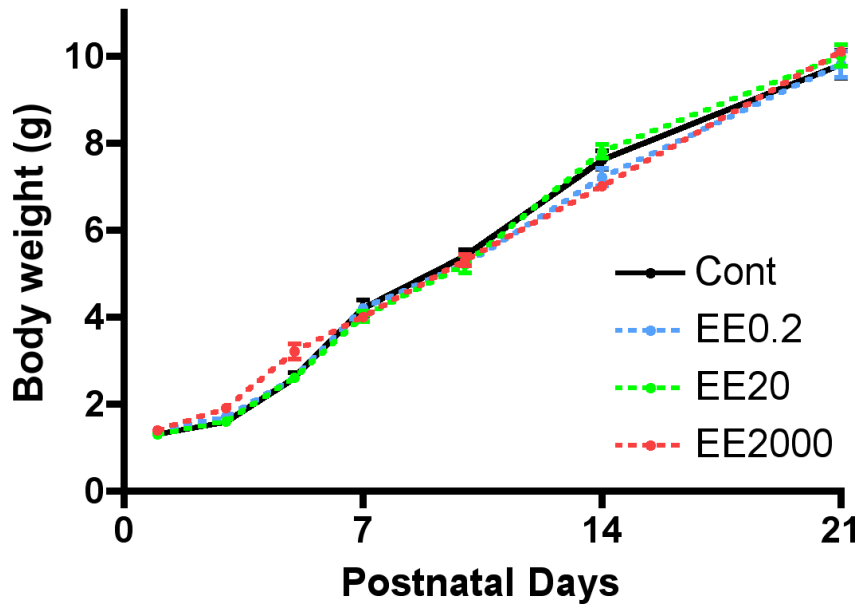
## F. 研究発表

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.

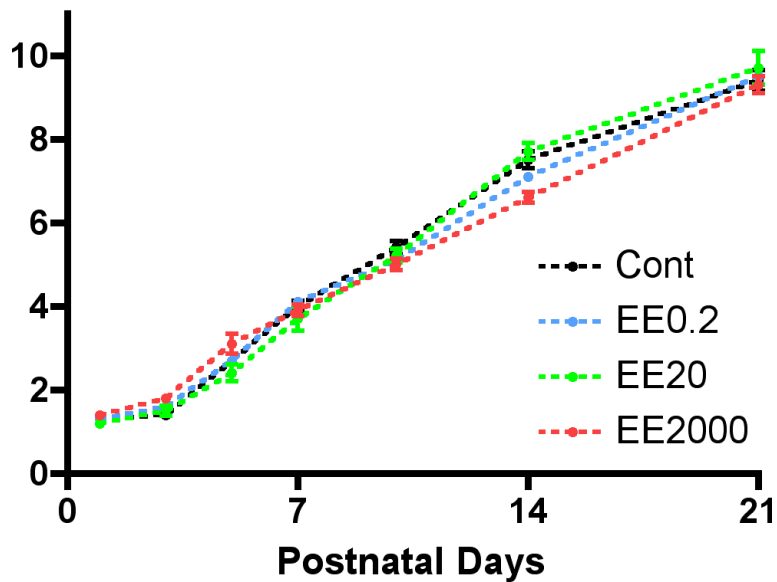
## G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

### Male (neonatal)

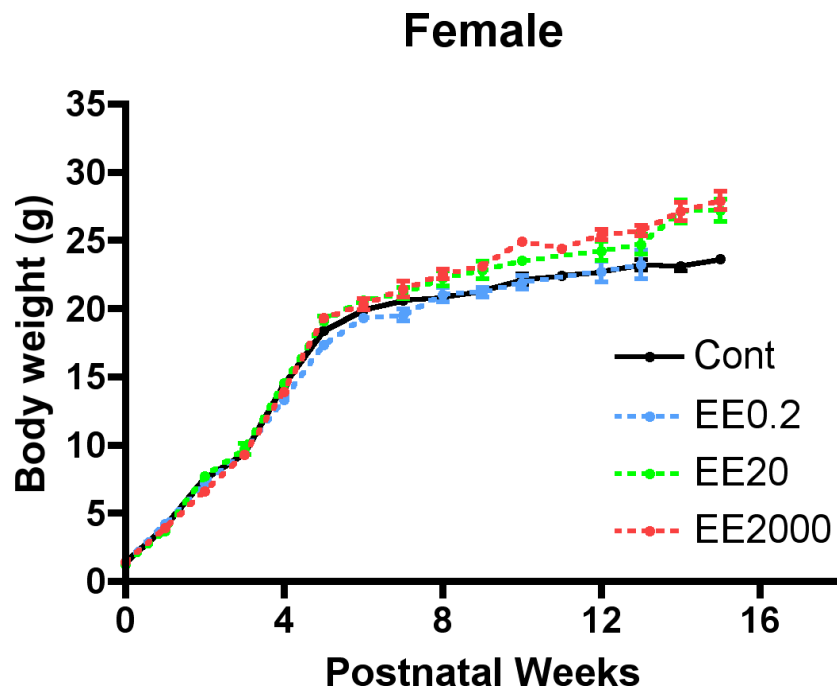
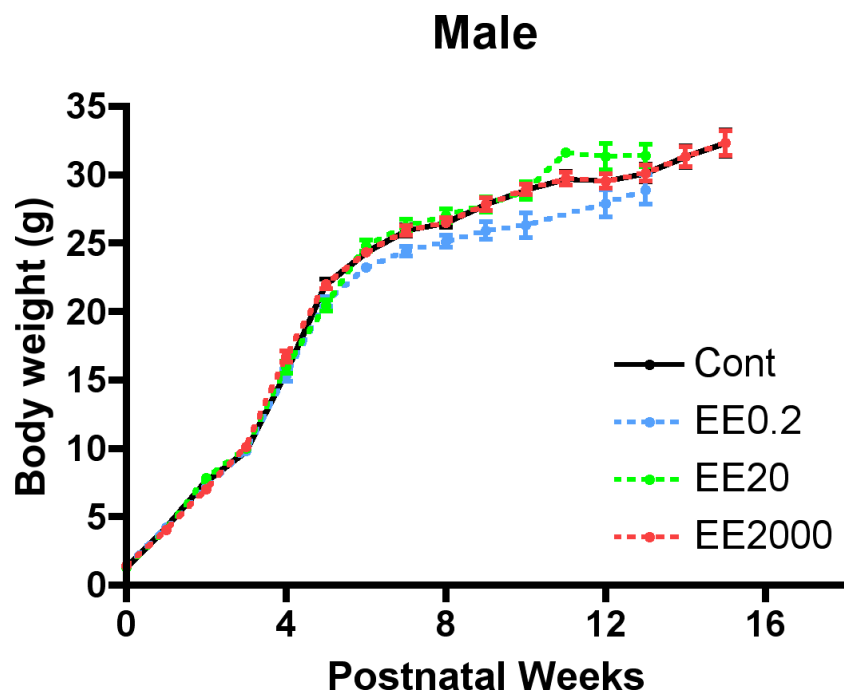


### Female (neonatal)



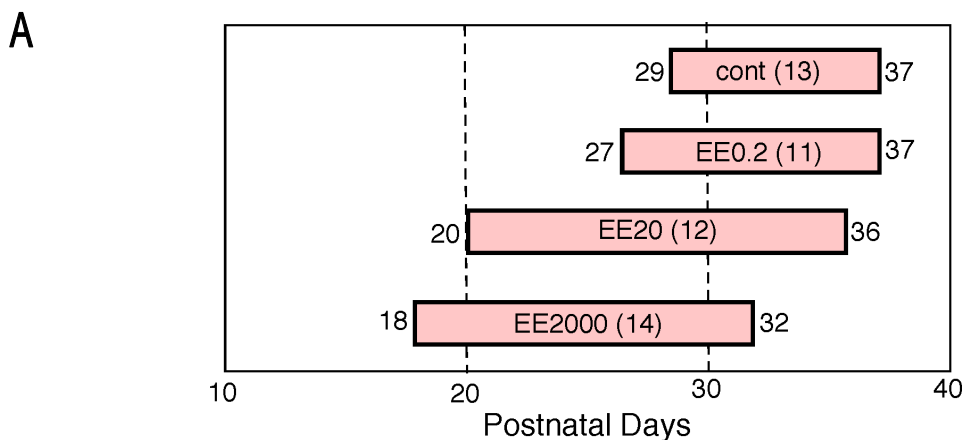
**図 1 : 新生仔マウスへのEEによる授乳期の体重変化**

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ（対象群：Cont）、Ethinylestradiol（EE）0.2 $\mu$ g/kg（EE0.2）、EE 20 $\mu$ g/kg（EE20）、EE 2,000 $\mu$ g/kg（EE2000）を投与した雄（Male）と雌（Female）の授乳期（誕生日：生後1日齢～生後21日齢）における体重の平均値の変化。離乳時（生後21日齢）では雌雄とも群間による差は観察されなかった。しかし、雌ではEE2000群において生後14日齢での一過性の発育遅延が記録された。



**図 2 : EE投与が及ぼす生涯の体重変化への影響**

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ（対象群：Cont）、Ethinylestradiol（EE）0.2 $\mu$ g/kg（EE0.2）、EE 20 $\mu$ g/kg（EE20）、EE 2,000 $\mu$ g/kg（EE2000）を投与した雄（Male）と雌（Female）の体重の平均値の変化。生後5週目までは雌雄とも群間による明らかな差は観察されなかった。しかし雌ではEE20群と2000群において体重の増加が記録された。

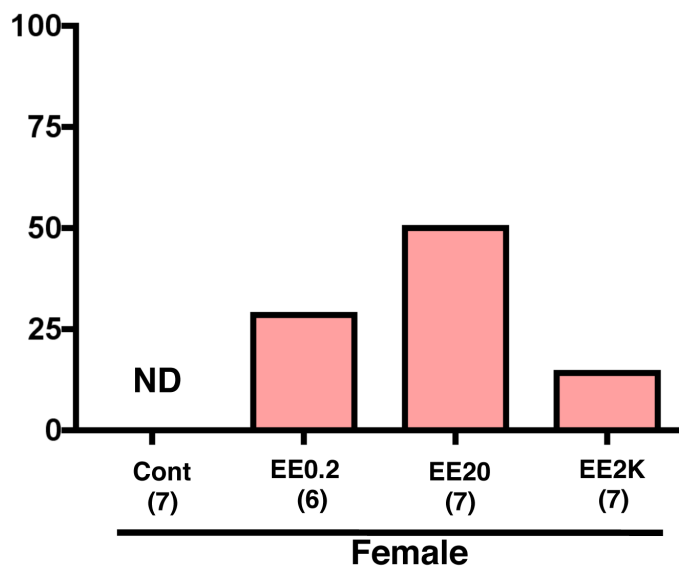


B

Dose of EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Cont	0.2	20	2000
Number of animals	13	11	12	14
Age at vaginal opening (day)	$33.0 \pm 0.8$	$32.3 \pm 1.0$	$29.6 \pm 1.3$	$25.0 \pm 1.3$
BW at vaginal opening (g)	$19.5 \pm 0.5$	$17.8 \pm 0.4$	$17.0 \pm 0.8$	$12.3 \pm 1.3$
Values represent mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M)				

**図3：新生仔マウスへのEE投与が及ぼす膣開口への影響。**

EE投与群(EE20とEE2000)において対照群に比べて膣開口を早期に示す個体が多く認められた(図A)。(図B)平均値で比べると、EE投与群でも投与濃度の高いほど膣開口が早期になっていた。そのため、膣開口時の体重は高濃度EEの方がより低い傾向にあることが示された。



**図4：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の発声。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。

	ID	8 week						10 week						14 week					
Cont	1	P	E	M	M	P	E	M	P	E	M	M	P	E	M	M	P	E	
	2	P	E	M	M	P	E	E	M	M	M	M	P	E	E	M	M	E	
	3	M	P	E	M	M	M	M	E	M	M	P	M	M	E	M	M	M	
	4	M	P	E	M	M	M	M	E	M	M	P	M	M	M	P	E	M	
	5	E	M	M	P	E	M	E	M	M	P	E	E	M	M	P	E	M	
	6	P	E	E	M	M	M	E	M	M	P	E	P	E	M	P	E	M	
EE0.2	1	E	E	M	M	M	E	M	M	M	E	E	E	E	M	M	E	E	
	2	M	E	E	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	E	M	
	3	E	M	E	E	E	E	E	P	E	E	M	M	M	M	M	M	M	
	4	E	P	E	P	M	E	M	E	E	M	M	E	E	M	E	E	M	
	5	M	E	E	E	E	M	M	E	E	E	M	E	E	M	M	E	E	
EE20	1	E	E	P	E	E	E	E	E	M	M	E	M	M	M	M	M	M	
	2	E	E	E	M	P	P	P	P	P	P	M	M	M	M	M	M	M	
	3	E	M	P	P	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	M	
	4	E	E	P	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	
	5	M	P	E	E	M	M	M	M	E	M	E	E	E	M	E	E	M	
	6	M	P	E	E	M	M	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	
EE2000	1	E	M	P	E	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E	M	M	M	
	2	E	E	E	E	P	P	P	P	P	P	E	P	E	E	M	M	P	
	3	E	E	P	P	P	P	P	E	M	P	P	M	P	E	E	E	P	
	4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	M	M	E	E	M	M	
	5	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	
	6	E	E	E	E	E	P	P	M	M	M	M	E	E	E	M	P	P	

図5：生後8週目以降の膣スミア像（性周期）への影響

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol(EE)0.2 $\mu$ g/kg(EE0.2)、EE20 $\mu$ g/kg(EE20)、EE2,000 $\mu$ g/kg(EE2000)を投与した生後8週、10週、14週の雌の膣スミア像を指標とした性周期の観察。図中のPは発情前期、Eは発情期、Mはそれ以外(発情後期、発情前期)を示す。発情前期(P)はオレンジ色、発情期(E)は赤色で示してある。対照群(Cont)はいずれの週齢においても周期性を示していた。しかし、EE投与群では生後8週目において性周期に大きな乱れが観察された。特に、EE2000群では8週目で連続発情を示す個体が複数観察された。





厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露による生殖内分泌機能の初期影響に視床下部  
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：化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影響  
に対する神経行動学的アプローチ

研究分担者：川口真以子 学校法人明治大学 農学部 動物環境学研究室  
研究協力者：服部達哉 学校法人明治大学 研究・知財戦略機構

**研究要旨（枠囲）**

本研究は周生期にエストロゲン様作用をもつ化学物質(EDs)のうち17 $\alpha$ -ethynyl estradiol(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。その結果、EE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することを明らかにした。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は、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を明らかにした。これらの結果は、EDs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であり、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。

**A 研究目的**

多くの動物は雌雄2つの性を持ち、有性生殖を行う。その結果、子孫は多様性に富み、変化し続ける周辺環境へ柔軟な対応をすることが可能になる。この有性生殖を行うためには、雌雄が互いに性特異的な行動を示すことが必要不可欠となる。雌特異的あるいは雄特異的な行動は、脳により制御されることから脳にもまた「性」が存在する。性的に未分化な状態の脳は、卵巣や精巣から分泌される性ホルモンにより性分化の方向性が決定される時期が存在し、これを臨界期と呼ぶ。ラットの臨界期は、出生前5日から出生後5日の間に存在すると報告されており、この時期に性ホルモン様作用をもつ化学物質の曝露を受けると正常な脳の性分化が阻害される場合がある(Negri-Cesi et al., J Steroid Biochem Mol Biol. 2008; Golub et al., Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol. 2010)。昨年度まで、私たちはエストロゲン様物質(EDs)の1つである17 $\alpha$ -etynyl estradiol(EE)を生後24時間以内(周生期)に単回曝露し、その成長後の社会性行動などへの影響を調査した。その結果、

EE曝露は濃度依存的に雌ラットの性選好性を消失させること、性行動中の雌特異的な行動を抑制することを見出した。これらの結果は、周生期の高濃度エストロゲン様物質曝露によって、正常な脳の雌化が阻害され、成熟後の雌特異的な行動の一部が抑制される可能性を示唆している。

室内ダスト中に検出される難燃剤の1つであるTriphenyl phosphate(TPhP)は、培養細胞を用いた(in vitro)研究からエストロゲン作用を持つ化学物質であると報告されている(Suzuki et al., Environ Sci. Technol. 2013)。しかしながら、TPhPが動物の体内(in vivo)に取り込まれた場合、エストロゲン様物質としてどのような影響をもつか、さらには、幼若期あるいは成熟期といった異なる成長段階にある動物へどのような影響をもつかもまた不明である。これまでに、周生期雄ラットに対し、TPhPを28日間連続で経口投与し成長後の社会性行動を解析した。その結果、TPhPを連続曝露された雄ラットは、雌ラットとの性行動中の雄特異的な行動の一部が低下することを見出した。

そこで本年度は、周生期雌ラットに対し、EE および TPhP を 28 日間経口投与し、成長後の社会性行動を解析することで、雌ラットへの EE ならびに TPhP の影響評価を行うことを目的とした。このため、本研究では以下の 2 つの解析を行った。

(1) 発達への影響を評価するために、連続経口投与終了直後である 4 週齢 (幼若期、 ) と 15 週齢 (成熟期、 ) の試験雌ラットの臓器重量を測定

(2) 社会性行動への影響を評価するために、12-14 週齢試験雌ラットの性選好性試験 ( )、試験雌ラットと同週齢の雄ラット ( ) あるいは同週齢の雌ラット ( ) との性行動を解析

上記の実験に加えて、EDs の行動学的早期指標を確立するために、母子分離誘発啼鳴反応試験にて性差が検出される条件について検討した。

## B 研究方法

### <EE ならびに TPhP 周生期曝露の影響>

生後 24 時間以内の Wistar-Imamichi 系雌ラットに対して、Sesame oil、Sesame oil に溶解した TPhP (和光純薬工業株式会社) あるいは EE (Sigma Aldrich, USA) を 28 日間連続で経口投与した。それぞれの物質の 1 日あたり投与量は、Sesame oil は 5 ml/kg (X-Ctrl 群)、TPhP は 25 mg/kg (X-LTP 群) あるいは 250 mg/kg (X-HTP 群)、EE は 15 µg/kg (X-EE 群) とし、4 群を作出した。また、周生期雄ラットに対して Sesame oi (5 mg/kg/day) を 28 日間連続で経口投与した群 (Y-Ctrl 群) を同時に作出した。これらの雌雄ラットは一腹あたり 8 匹ずつになるよう里子操作を行い、生後 21 日齢で離乳した。離乳した雌雄ラットは各ケージ 4 匹ずつ、同性で群飼育した。

### 幼若期臓器重量測定

4 週齢時、各試験雌ラット群のうち半数の体重を測定し、剖検後、肝臓、腎臓、卵巣、そして子宮の各臓器の重量を測定した。また同時に生殖器から肛門までの距離 (Anogenital distance) を測定した。

各群、残り半数は 8 週齢時に卵巣摘出術 (OVX) を行い、卵巣由来の性ホルモンによる影響を排除した。これらの OVX 雌ラットを

行動試験に用いる場合は、試験開始 48 時間前に Estradiol benzoate (EB) を 0.5 µg/ 0.1 ml、さらに 4 時間前に Progesterone を 500 µg/ 0.1 ml、それぞれ皮下投与し、発情誘起処置を行った。

### 性選好性試験

黒色塩化ビニル製ケージへ成熟雌ラットおよび雄ラット床敷を左右それぞれへ設置した。その後、試験開始前に発情誘起処置を行った 12 週齢の各群雌ラットおよび雄ラットを単独で導入し、5 分間の行動を上部から撮影し録画した。これらの動画を解析し、雌雄床敷領域への接近行動時間・滞在時間を測定した。

### 雄ラットとの性行動試験

性選好性試験終了後、雌ラットは透明アクリル製ケージへ移動し、60 分の馴化後、同週齢の性経験済み相手雄ラットを導入し、60 分間の行動を正面から撮影し録画した。これらの動画を解析し、相手雄ラットのマウント行動発現回数、試験雌ラットの誘惑行動 (Ear wiggling、Hopping)、拒否行動、そして雄受容姿勢 (Lordosis) の発現回数を測定した。さらに、雄受容姿勢発現回数は、雄ラットのマウント行動発現回数に対する割合を示す Lordosis 商に用いた。

### 雌ラットとの性行動試験

試験 終了から 1 週間後、再び試験雌ラットへ発情誘起処置を行い、試験 と同様の透明アクリル製ケージへ移動し、60 分の馴化後、同週齢の発情誘起処置済み OVX 相手雌ラットを導入し、60 分間の行動を正面から撮影し録画した。これらの動画を解析し、試験雌ラットのマウント行動発現回数、誘惑行動 (Ear wiggling、Hopping)、攻撃行動を測定した。

### 成熟期臓器重量測定

OVX の際に体重と卵巣重量を測定した。また全ての行動試験終了後、各群の試験雌ラット (15 週齢) の体重を測定し、剖検後、肝臓、腎臓、そして子宮の各臓器重量を測定した。また同時に Anogenital distance を測定した。

### <母子分離誘発啼鳴反応の性差>

0 週齢 Wistar-Imamichi 系雌ラットにおいて、母親および同腹仔から引き離されると発する、20 kHz ~ 60 kHz の超音波領域に主成分を持つ啼鳴反応を指標に、啼鳴反応における 3 時間

前のジアゼパム経口投与の影響が、性差を有するか否かを検討した。仔ラットを母獣から分離後、すぐに防音箱内のシャーレに入れ5分間測定した。鳴き声はマイクロホン(CO-100K、三研マイクロホン株式会社)で集音してアンプ(OCTA-CAPTURE、ローランド株式会社)で増幅し、Spectra PLUS 5.0 (Pioneer Hill Software、Poulsbo)にて解析した。

#### <倫理面への配慮>

動物の管理、行動試験の実施は明治大学農学部動物実験委員会の許可の下で行った。特に、行動試験は、動物に対し耐え難い苦痛を与えないよう十分な配慮のもと行った。

### C 研究結果

#### <EE ならびに TPhP 周生期曝露の影響>

##### 幼若期臓器重量測定

測定した体重について群間で差はなく、各化学物質の影響は認められなかった( $F_{(3,10)} = 2.05, P = 0.11$ ) (表1)。また、体重あたりに換算した各臓器重量について群間で差は認められず、各化学物質の影響は認められなかった(肝臓： $F_{(3,10)} = 0.87, P = 0.52$ 、腎臓： $F_{(3,10)} = 1.39, P = 0.27$ 、卵巣： $F_{(3,10)} = 0.37, P = 0.86$ 、子宮： $F_{(3,10)} = 1.61, P = 0.20$ ) (表1)。Anogenital distance については、群間で差が認められ( $F_{(4,61)} = 27.22, P < 0.01$ )、Y-Ctrl 群がその他全ての群と比較して長くなったが( $P < 0.01$ )、各化学物質の影響は認められなかった(図1A)。

##### 性選好性試験

性選好性試験では、各群について雌床敷への接近行動時間と雄床敷への接近行動時間の差(性選好性スコア)について比較したところ、群間に差が認められ( $F_{(4,35)} = 4.61, P < 0.01$ )、X-EE 群と Y-Ctrl 群の性選好性スコアが、X-Ctrl 群のそれと比較して高いことが明らかになった( $P < 0.05$ ) (図2)。一方で、X-LTP 群あるいは X-HTP 群の性選好性スコアは、いずれの群とも差がなかった(図2)。

##### 雄ラットとの性行動試験

性行動試験では、各群に対する相手雄ラットのマウント行動発現回数に群間で差が認められ( $F_{(3,27)} = 3.87, P < 0.05$ )、X-EE 群へのマウント行動発現回数が、X-LTP 群と比較して

少ないことが明らかになった( $P < 0.01$ ) (図3A)。また、試験雌ラットの Lordosis 商に群間で差が認められ( $F_{(3,27)} = 18.34, P < 0.01$ )、X-EE 群の Lordosis 商が、他の全ての群と比較して低いことが明らかになった( $P < 0.01$ ) (図3B)。試験雌ラットの誘惑行動の1つである Ear wiggling の発現回数にも群間で差が認められ( $F_{(3,27)} = 8.08, P < 0.01$ )、X-EE 群の Ear wiggling 発現回数が、他の全ての群と比較して少ないことが明らかになった( $P < 0.05$ ) (図3C)。さらに Hopping 発現回数に群間で差が認められ( $F_{(3,27)} = 5.80, P < 0.01$ )、X-HTP 群と X-EE 群の Hopping 発現回数が、X-Ctrl 群と比較して少ないことが明らかになった( $P < 0.01$ ) (図3D)。一方で、X-LTP 群の Hopping 発現回数は、他のすべての群と比較して差は認められなかった(図3D)。そして雄のマウント行動に対する拒否行動の発現回数は群間で差は認められなかった( $F_{(3,27)} = 1.35, P = 0.28$ ) (図3E)。

##### 雌ラットとの性行動試験

性行動試験では、雌ラットに対する各試験雌ラットマウント行動発現回数に群間の差は認められなかった( $F_{(3,27)} = 4.07, P = 0.78$ ) (図4A)。また、試験雌ラットの誘惑行動のいずれの発現回数にも群間の差は認められなかった(Ear wiggling:  $F_{(3,27)} = 1.34, P = 0.28$ ; Hopping:  $F_{(3,27)} = 0.91, P = 0.45$ ) (図4C, D)。そして雌ラットに対する攻撃行動の発現回数も群間の差は認められなかった( $F_{(3,27)} = 2.15, P = 0.12$ ) (図4B)。

##### 成熟期臓器重量測定

OVX 時(8週齢)に測定した試験雌ラットの体重に群間で差が認められ( $F_{(3,60)} = 8.75, P < 0.01$ )、X-EE 群の体重が他の全ての群と比較して増加していることが明らかになった( $P < 0.05$ ) (表2)。また体重あたりに換算した卵巣重量について群間で差が認められ( $F_{(3,60)} = 7.51, P < 0.01$ )、X-EE 群の卵巣重量が低下していることが明らかになった( $P < 0.05$ ) (表2)。

全ての行動試験終了後の15週齢時には、測定した体重について群間で差が認められたが( $F_{(5,21)} = 3.99, P < 0.05$ )、各化学物質の影響は認められなかった(表3)。また、体重あたりに換算した各臓器重量については群間で差はなく、各化学物質の影響は認められなかった

(肝臓:  $F_{(5,22)} = 1.18, P = 0.36$ 、腎臓:  $F_{(5,22)} = 2.32, P = 0.08$ 、子宮:  $F_{(5,21)} = 1.92, P = 0.15$ ) (表 3)。Anogenital distance については、群間で差が認められ ( $F_{(4,46)} = 116.03, P < 0.01$ ) Y-Ctrl 群がその他全ての群と比較して長くなったが ( $P < 0.01$ ) 各化学物質の影響は認められなかった (図 1B)。

#### <母子分離誘発啼鳴反応の性差>

ジアゼパム 1 ml/kg 投与による母子分離誘発啼鳴反応の低下が雄で有意に表れる一方、雌では表れにくいという性差を検出した。

### D 考察

#### <EE ならびに TPhP 周生期曝露の影響>

エストロゲン様物質の発達への影響を評価するために、幼若期および成熟期のそれぞれの体重と化学物質の代謝に関わる肝臓、体外の排泄に関わる腎臓、エストロゲンの主要産生組織である卵巣、そして性ホルモンの作用部位の 1 つである子宮、これら各臓器の重量を測定した。その結果、化学物質の曝露終了直後では、体重と各臓器重量へ化学物質の影響は認められないことが明らかになった。その一方で、性成熟完了直後の 8 週齢時では、EE 曝露によって体重の増加と卵巣重量の低下が認められた。成熟期では、ふたたび体重や卵巣以外の各臓器重量への化学物質の影響が認められなかった。これらの結果は、周生期 EE 曝露が、卵巣組織の発達を抑制していること、さらには体重の増加が認められたことから摂食行動を抑制する卵巣由来のエストロゲン分泌量の低下、あるいはエストロゲンの作用点であるエストロゲン受容体の活性低下を引き起こしている可能性が示唆された。一方で、個体の成長にともない顕著に雌雄で異なる長さを示す Anogenital distance については、幼若期および成熟期のいずれの時期において、化学物質の影響は認められなかった。

社会性行動への影響を評価するために、成熟ラットの床敷に対する接近行動を解析し、雌雄どちらの床敷に対して性選好性を示すかを調査した。その結果、雌ラットへの EE 曝露は、雄床敷よりも雌床敷へ強い性選好性を示す、すなわち雄型の性選好性を示すことを明らかにし、EE 曝露によりその性選好性が雄

型化する可能性が示唆された。その一方で、TPhP 曝露は、雄ラットの性選好性スコアとの差を消失させることから、正常な雌型性選好性の成立を阻害する可能性が示唆された。成熟雄ラットとの性行動試験では、雌特異的な性行動である雄受容姿勢、誘惑行動に着目し解析した。その結果、雌ラットへの EE 曝露により雄受容姿勢、誘惑行動のいずれも示さなくなることが明らかになった。一方で、TPhP 曝露は雄受容姿勢の発現に影響はないものの、高濃度の TPhP 曝露では誘惑行動のうち Hopping の発現が減少する、すなわち曝露濃度により異なる影響があることが明らかになった。成熟雌ラットとの性行動試験では、試験雌ラットのマウント行動、誘惑行動、攻撃行動のいずれの行動発現回数についても化学物質の影響は認められなかった。しかしながら、EE 曝露によって雌ラットへの攻撃行動が増加していることや、TPhP は曝露濃度の違いにより、雌ラットに対してマウント行動が増加する、あるいは攻撃行動が増加することが見出せつつある。これらの行動試験の結果は、周産期のエストロゲン様物質の連続曝露によって、成熟後の雌特異的な社会行動の一部が抑制、あるいは消失し、さらには雄特異的な社会行動の発現が起こることを示している。

以上の結果から、周産期雌ラットへのエストロゲン様物質曝露、特に EE 連続曝露は脳の正常な性分化に影響を与え、卵巣の発育あるいは機能を抑制し、成熟後の雌特異的な性行動を抑制する可能性が示唆される。また TPhP は、曝露濃度依存的に特定の雌特異的な行動の発現を抑制する可能性が見出された。

#### <母子分離誘発啼鳴反応の性差>

成熟動物の一部の行動において抑制影響に性差が見られるジアゼパムを投与することにより、母子分離誘発啼鳴反応の性差を検出できるのではないかと考え検討し、雄子ラットのほうが雌仔ラットに比べ、ジアゼパムが引き起こす影響が強く現れることを明らかとした。このことから、母子分離誘発啼鳴反応が EDs の早期指標となり得ることを示した。

### E 結論

本年度は、雌ラットに対して、EE ならびに in vitro でエストロゲン様作用をもつ化学物質 TPhP を周生期に 28 日間連続で経口投与し、in vivo 条件下でどのような影響をもつかを検討した。その結果、幼若期の体重や臓器重量に影響がないが、EE 曝露は性成熟完了に至るに従い、エストロゲンの主要産生臓器である卵巣の発育を抑制することを示した。また、EE 曝露によって、成熟後の性行動中の雌特異的な行動が抑制されること、TPhP はその曝露濃度によって性行動中の誘惑行動の一部が抑制されることが明らかになった。加えて、母子分離誘発啼鳴反応が EDs の早期指標となり得ることを示した。

## F 研究発表

### 1 論文発表

- 1) 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
- 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  $\alpha$  in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats. PLoS One. 2016 Jan 7;11(1):e0146136

### 2 学会発表

- 1) 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)
- 2) 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) $\alpha$  及び ER $\beta$  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)

3) 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)

4) 中山愛里、服部達哉、大河原利、田辺郁也、磯部安菜、穴戸浩孝、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)

5) 中山愛里、服部達哉、穴戸浩孝、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、性嗜好性、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)

6) 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

### 1 特許取得

該当なし

### 2 実用新案登録

該当なし

### 3 その他

該当なし

表1 幼若期（4週齢）体重および臓器重量測定の結果

Treatment	B.W.	Per kg			
		Liver	Kidney	Ovary	Uterus
Ctrl	77.3 ± 5.98	43.0 ± 0.62	10.7 ± 0.32	0.3 ± 0.06	0.9 ± 0.27
LTP	81.5 ± 3.41	43.1 ± 1.68	9.8 ± 0.41	0.4 ± 0.04	0.9 ± 0.11
HTP	79.7 ± 1.59	49.8 ± 1.99	10.2 ± 0.21	0.4 ± 0.03	1.0 ± 0.13
EE	86.7 ± 3.34	46.9 ± 1.48	10.8 ± 0.40	0.3 ± 0.05	2.1 ± 0.22

表2 性成熟完了後（8週齢）体重および卵巣重量測定の結果

Treatment	B.W.	Per kg
		Ovary
Ctrl	225.2 ± 3.49	0.7 ± 0.01
LTP	226.3 ± 3.06	0.6 ± 0.01
HTP	227.2 ± 4.05	0.6 ± 0.01
EE	248.5 ± 3.97 *	0.4 ± 0.00 *

表3 成熟期（15週齢）体重および臓器重量測定の結果

Treatment	B.W.	Per kg		
		Liver	Kidney	Uterus
Ctrl	383.3 ± 21.88	35.2 ± 1.69	5.3 ± 0.30	0.3 ± 0.03
LTP	360.9 ± 1.22	35.3 ± 2.60	6.1 ± 0.26	0.9 ± 0.31
HTP	409.6 ± 10.70	35.9 ± 0.39	5.0 ± 0.06	0.4 ± 0.02
EE	434.0 ± 21.10	37.1 ± 2.09	5.2 ± 0.20	2.1 ± 1.13

表中のCtrlはSesame oil（5 ml /kg /day）曝露群、LTPは低TPhP（25 mg /kg /day）曝露群、HTPは高TPhP（250 mg /kg /day）曝露群、EEはEE（15 µg /kg /day）曝露群を示す。\*: P < 0.05

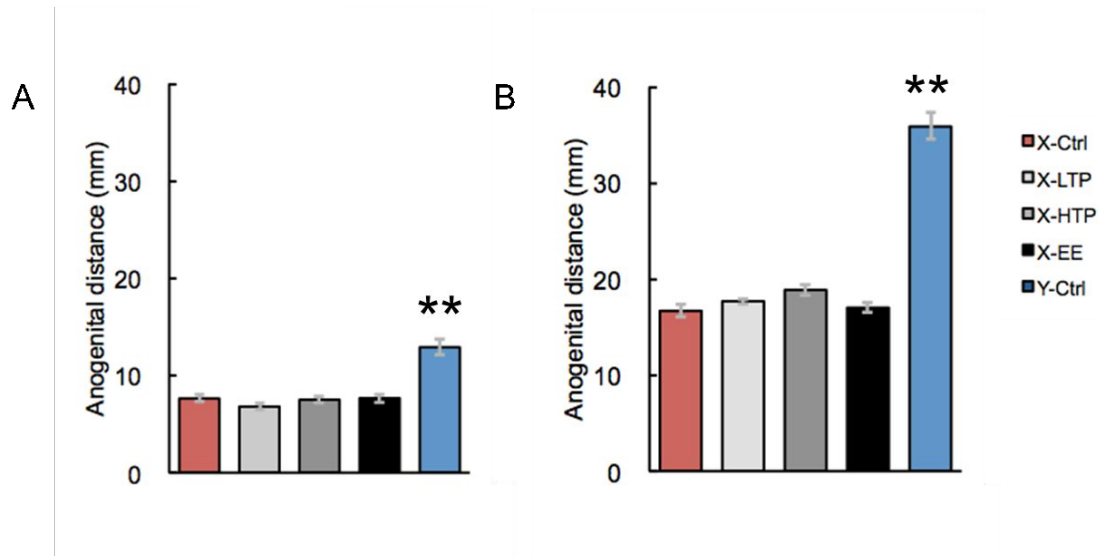


図1 幼若期（4週齢）および成熟期（15週齢）Anogenital distance測定の結果

幼若期のAnogenital distance測定の結果（A）、Y-Ctrl群がその他の全ての群と比較して長かった（ $P < 0.01$ ）。成熟期のAnogenital distance測定の結果（B）も同様に、Y-Ctrl群がその他の群と比較して長かった（ $P < 0.01$ ）。図のX-CtrlはSesame oil（5 ml /kg /day）曝露雌群、X-LTPは低TPhP（25 mg /kg /day）曝露雌群、X-HTPは高TPhP（250 mg /kg /day）曝露雌群、X-EEはEE（15  $\mu$ g /kg /day）曝露雌群、Y-CtrlはSesame oil（5 ml /kg /day）曝露雄群を示す。\*:  $P < 0.01$

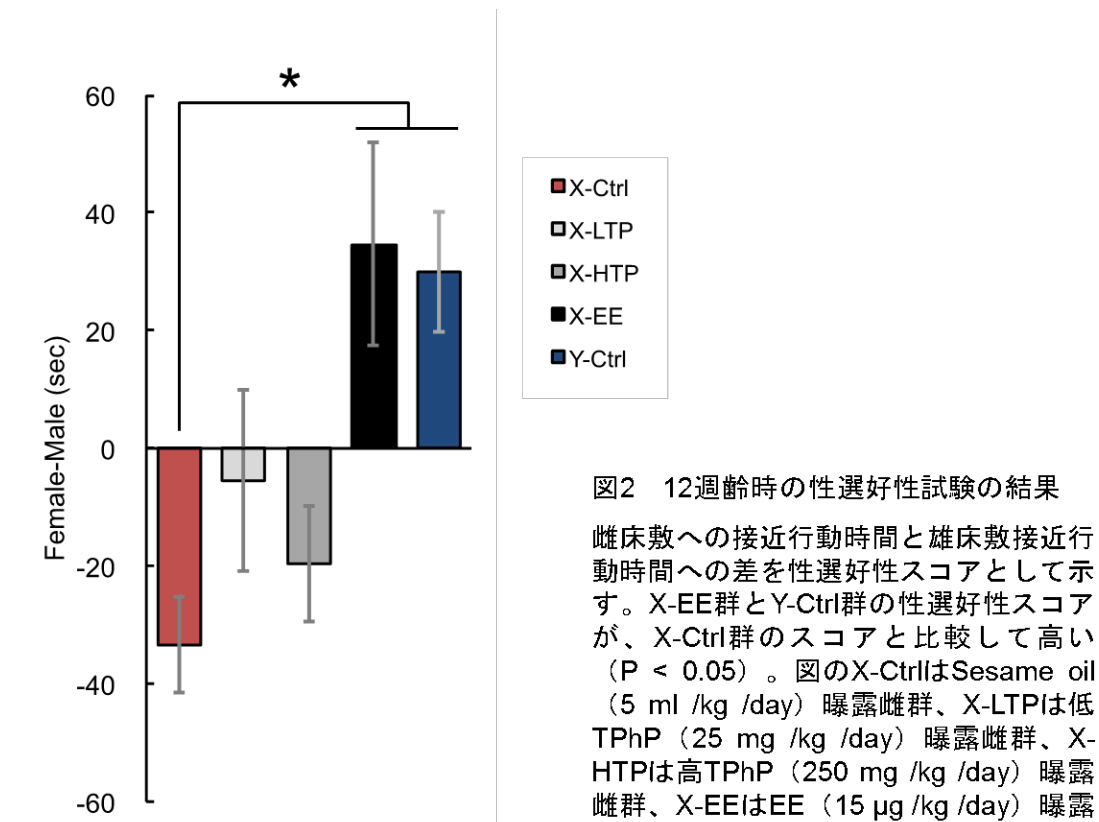


図2 12週齢時の性選好性試験の結果

雌床敷への接近行動時間と雄床敷接近行動時間への差を性選好性スコアとして示す。X-EE群とY-Ctrl群の性選好性スコアが、X-Ctrl群のスコアと比較して高い（ $P < 0.05$ ）。図のX-CtrlはSesame oil（5 ml /kg /day）曝露雌群、X-LTPは低TPhP（25 mg /kg /day）曝露雌群、X-HTPは高TPhP（250 mg /kg /day）曝露雌群、X-EEはEE（15  $\mu$ g /kg /day）曝露雌群、Y-CtrlはSesame oil（5 ml /kg /day）曝露雄群を示す。\*:  $P < 0.05$

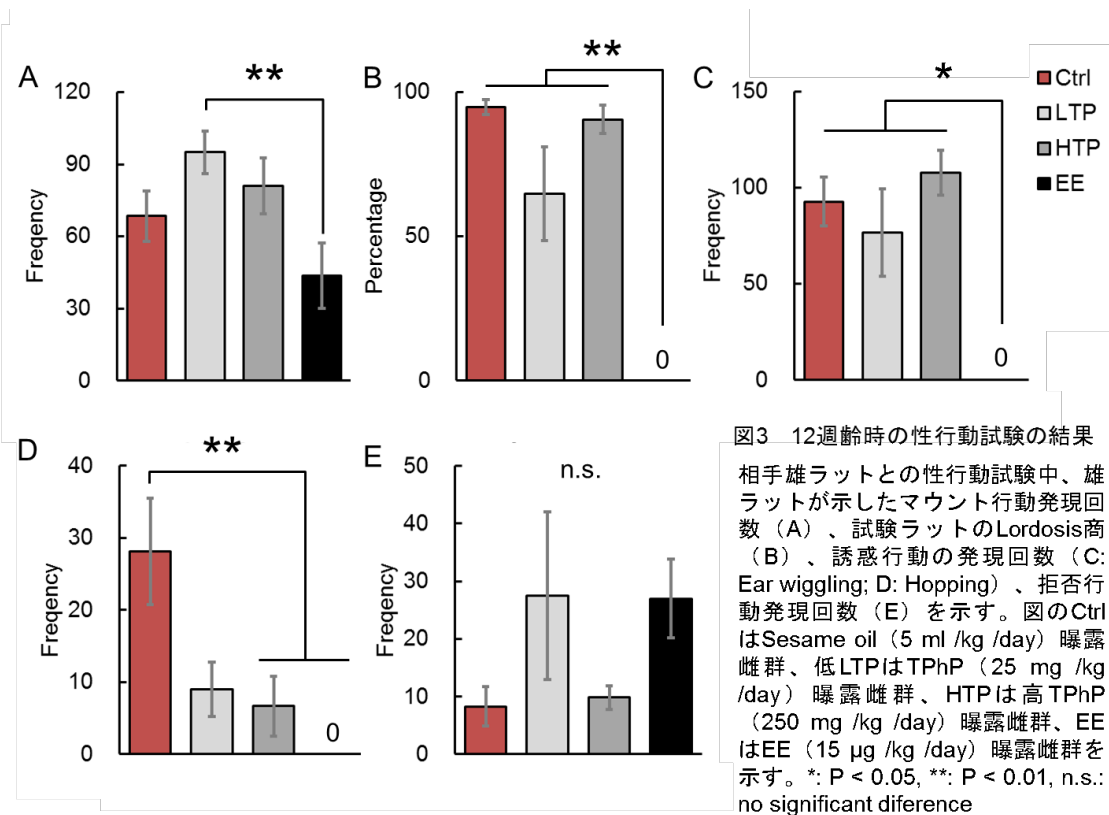


図3 12週齢時の性行動試験の結果

相手雄ラットとの性行動試験中、雄ラットが示したマウント行動発現回数 (A)、試験ラットのLordosis商 (B)、誘惑行動の発現回数 (C: Ear wiggling; D: Hopping)、拒否行動発現回数 (E) を示す。図のCtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雌群、低LTPはTPhP (25 mg /kg /day) 曝露雌群、HTPは高TPhP (250 mg /kg /day) 曝露雌群、EEはEE (15  $\mu$ g /kg /day) 曝露雌群を示す。\*: P < 0.05, \*\*: P < 0.01, n.s.: no significant difference

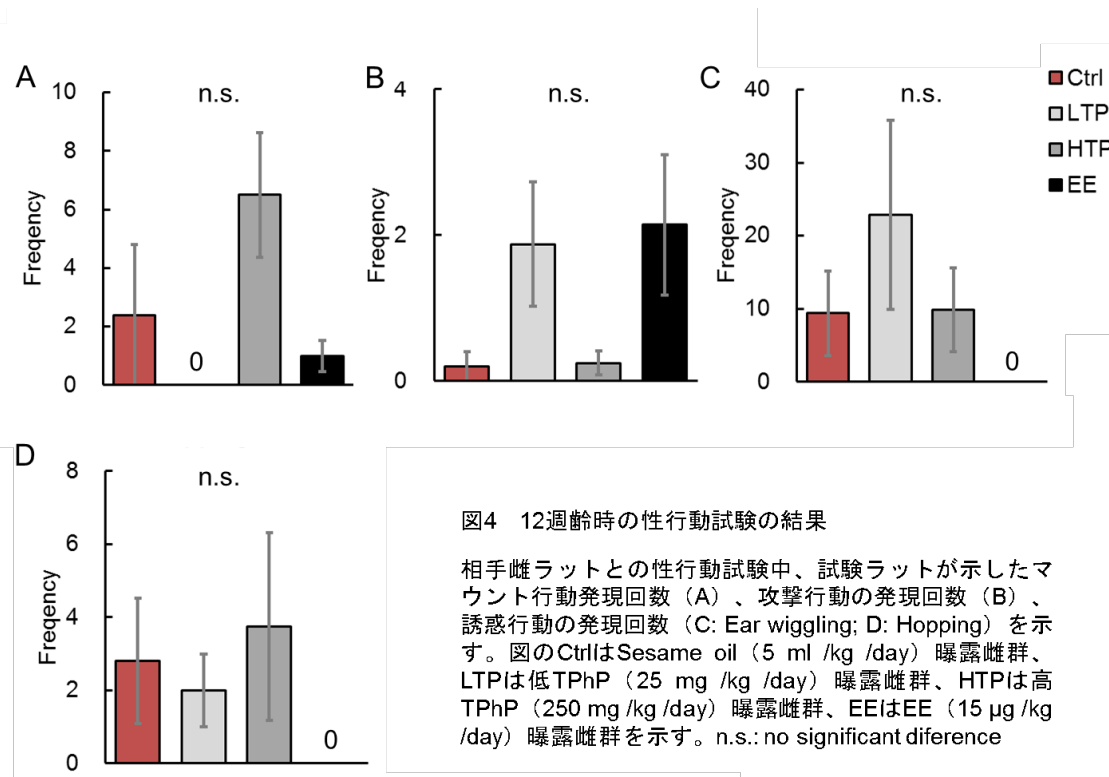


図4 12週齢時の性行動試験の結果

相手雌ラットとの性行動試験中、試験ラットが示したマウント行動発現回数 (A)、攻撃行動の発現回数 (B)、誘惑行動の発現回数 (C: Ear wiggling; D: Hopping) を示す。図のCtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雌群、LTPは低TPhP (25 mg /kg /day) 曝露雌群、HTPは高TPhP (250 mg /kg /day) 曝露雌群、EEはEE (15  $\mu$ g /kg /day) 曝露雌群を示す。n.s.: no significant difference



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 雑誌

著者名	タイトル	雑誌名	刊・号・ページ	年
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.	Reproductive Toxicology	60, 33-38	2016
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 $\alpha$ in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats.	PLoS One	Jan 7;11(1): e0146136	2016
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.	Biol Reprod.	93 (2), 32	2015.
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.	Reproductive Toxicology	51, 145-156	2015
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.	Reproductive Toxicology	57, 21-28	2015.
Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shiota K, Yoshida M.	Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague–Dawley rats.	Journal of Toxicological Sciences	40, 727-738	2015
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.	Journal of Applied Toxicology	Online Jul 14	2015

