

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 25-27 年度 総合研究報告書

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. 23

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. 41

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. 53

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. 105

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. 125

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. 139

.研究成果の刊行に関する一覧表

..... p. 151

.研究成果の刊行物

..... p. 153

.総括研究報告

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

研究代表者 高橋 美和 国立医薬品食品衛生研究所病理部主任研究員
研究分担者 井上 薫 国立医薬品食品衛生研究所病理部 主任研究員
代田 眞理子 麻布大学獣医学部 准教授
渡辺 元 東京農工大学農学部 教授
横須賀 誠 日本獣医生命科学大学獣医学部 准教授
川口 真以子 明治大学農学部農学科環境学研究室 講師

研究協力者

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

研究要旨

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

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

可能性も示唆された。

3. 遅発影響の無影響量は経口投与で $0.016\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day} \times 5\text{days}$ であった。先行研究成果での単回皮下投与 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とほぼ同様である。また投与時期による遅発影響の閾値は約 10 日齢であった。したがって先行研究と併せ、**遅発影響の投与量と投与時期には閾値が存在する**ことが明らかとなった。
4. エストロゲン類の新生児期曝露の遅発影響は内側視索前野(POA)の Calbindin D-28k (CB)陽性細胞の雌雄差や行動神経内分泌系などその他の中枢系へも及んでいると考えられた。また卵巣へは投与直後からの直接影響も考えられた。
5. 遅発影響の発現機序を示す adverse outcome pathway (AOP)を構築した。また**既存の毒性試験ガイドラインでは検出できない可能性の高い遅発影響は、既存の OECD 繁殖毒性試験テストガイドラインに性周期長期観察用の試験群を追加設置等の改善を行うことにより検出可能**であると結論した。

A. 研究目的

生理活性物質が成育の適切な時期に限定して作用する臨界期は、化学物質に対しても著しく感受性が高い。エストロゲン作用物質の臨界期曝露により性周期異常の早期化、生殖機能障害や子宮癌リスク増加等、成熟後に不可逆性の悪影響が顕在化する遅発影響が知られている。しかし発現機序が不明で既存の毒性試験法で検出が難しいことから、新生児期曝露による遅発影響検出に対する対策が必要である。

本研究に先立ち、分担研究者らは平成 22 年から 24 年に「**化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発影響の機序解明と指標の確立**」(厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業 H22 - 化学 - 一般 - 003)を行い、エストロゲン類新生児期曝露により用量依存性の遅発影響が存在し、一般的な毒性試験の指標では捉えにくいこと、**性周期異常(持続発情)の発現時期早期化が最も鋭敏な長期指標**であることを明らかにした(図 1)。感受性の高いエストロゲン検出系とされている子宮肥大作用量とほぼ同用量の比較的低いエストロゲン量の投与でも遅発影響を引き起こされることもこの研究によって明らかとなった。しかし遅発影響の時系列的な発現機序の解析やその初期変化の同定に至らず、生殖行動学的影響や遅発影響の閾値の検討にも不明な点が残った。

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

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

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

化学物質のリスク評価行政に資するため、研究成果を総合解析して遅発影響の発現機序を示した adverse outcome pathway (AOP) を構築し、既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)にどのような検査項目やエンドポイントを追加すれば遅発影響が検出可能となるのか提案することも目的とした。

B. 研究方法

研究結果を横断的に解析できるよう、分担研究者間で以下の項目を予め設定した：

● 共通被験物質の設定

先行研究と同様に $17\alpha\text{-ethynylestradiol}$ (EE)

を共通の遅発影響誘発物質とした。

- **共通する遅発影響誘発量の設定**

分担研究間での横断的解析促進のため、遅発影響発現量の EE 20 µg/kg (短期では 200 µg/kg も考慮) 皮下投与を可能な限り各実験に組み入れた。先行研究で強制経口投与の同等性も確認されたことが、強制経口投与も同様に扱った。

- **EE 以外の遅発影響検討物質とその目的**

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

- **使用動物種**

基本使用動物種はラットとしたが、神経核の解析では一部マウスを用いた。系統差を観察するためにあえて共通の系統を使用せず、各実験の目的に適した系統(性周期が規則的な Wistar-Imamichi 系、生殖試験に汎用される SD 系、性周期が規則的且つ子宮癌好発系の Donryu 系)を用いた。

1. 実験と方法

実験計画を以下に示す([] 主な担当者)

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

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

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

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

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

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

2) 遅発影響の発現に関わる ER の役割を明確化するための検索 [井上]

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

(2) 遅発影響の初期変化検索として遅発影響量を含む EE を新生児期に単回皮下投与し 14 および 21 日齢の発達期の視床下部前部/後部における Kiss1 mRNA 発現解析、血清 FSH 濃度測定、雌性生殖器の組織学的検索を行った。

(3) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化の検討として、生後 0 日の雌性 Donryu ラットに PPT、DPN および ICI を 1 回皮下投与し、(2)と同様の検索を行った。

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

3) キスペプチンパルス制御部位と遅発影響

の関係および遅発影響と閾値の関連性に関する研究 [代田]

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

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

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

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

(1) 90 日齢において、発情前期 (午前および午後)、発情期、休止期の各発情周期ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定と、脳における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。

(2) 新生子期 EE 曝露の卵巣における影響の原因遺伝子を探るためにマイクロアレイ解析を行った。また、免疫組織化学的染色により、Hrk タンパク質が生後 1 日の卵巣の卵細胞に検出された。卵巣におけるアポトーシスを TUNEL 染色で比較した。また卵巣の卵胞数を解析した。EE の卵巣に対する直接作用を確認するため、生後 0 日の Wistar-Imamichi ラットから卵巣を採取して培養し、アポトーシス関連因子の遺伝子発現を解析した。さらに、Hrk をノックダウンした卵巣に EE を添加し TUNEL 染色をして鏡検した。

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

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

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

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

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

これまでの研究成果で得られた確立した遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の発現機序を示した AOP を構築し、遅発影響懸念化学物質を検出するための既存の毒性試験テストガイドライン(TG)への改善点を提言した。既存 TG は国際基準である OECD の 1 世代繁殖毒性試験(TG514)、2 世代繁殖毒性試験(TG416)、拡張型 1 世代繁殖毒性試験(TG445)を用いて、検査項目、投与量、観察期間、動物数、判定方法等、どのような点を改善すべきか検討した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)、特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成 10 年法律第 114 号)等の主旨に則り、作成された国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定および分担研究者が各々所属する機関に設定された動物委員会の規定等に基づき実施されたものであり、関連法令などを遵守して行われた。

C. 研究結果

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

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

(1)の結果、性周期異常の発現に先行して性

周期が正常に回帰する Young adult においてすでに、LH サージの低下、その時期の視床下部前方に存在する性周期制御中枢 AVPV の Kiss1 mRNA 発現低下、ISH/IHC 二重染色により AVPV の ER α を有するキスペプチンニューロン数の減少も認められた。卵胞発育中枢(視床下部後方)である ARC には変化は認められなかった。これらの現象は性周期を回帰する Middle aged 雌ラットと同様であった。

(2)の結果より、TMX、RLX 10 mg/kg 群(RLX10)の新生児期曝露ラットでも EE と同様な視床下部の変化および遅発影響が認められた。しかし TMX、RLX 全群は子宮肥大試験で明らかな抗エストロゲン作用を示し、同用量を正常雌ラットに投与しても EE とは異なり LH や AVPV の Kiss1 遺伝子を増加させなかった。

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

2) 遅発影響の発現に関わる ER の役割を明確化するための検索 [井上]

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

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

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

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

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

(1) 遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒学的意義の解明

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

(2) EE 投与直後の視床下部における ER α および Kiss1 遺伝子に関する検索

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

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

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

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

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

生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露は発育期でも次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの腔開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、雌では EE 投与において一時的な体重増加の停滞期が認められた。しかしこの体重増加の停滞は離乳時には解消された。3) 発情雌に対する USV 発声は、雌対照群では認められ無いのに対し EE 投与群では USV 発声を認める雌が存在した。4) POA での CB 細胞の分布パターンを観察したところ、EE 投与による CB 陽性細胞数の変化は、脳の構造的な変化を反映したものでは無いことが明らかとなった。5) RT-PCR によって雌では EE 濃度依存的に脳内 CB 遺伝子の上昇が誘導されていることが明らかとなった。しかし、GABA-B 受容体遺伝子への有意な影響は確認されなかった。

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

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

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

28 日間の 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露は卵巣の発達を抑制し、成熟後の性行動中の雌特異的な性行動を抑制することを明らかにした。

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

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

D. 考察

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

(1)(2)の結果より、EE 新生児期曝露による遅発影響には視床下部のキスペプチンが重要であり、その部位特異的な変化が遅発影響に密接に関連していることが明らかとなった。すなわち、エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露が性周期中枢である視床下部前方 AVPV のキスペプチン低下を引き起

し、その低下が成熟後の LH サージを低下させる。この性腺軸の変調持続が性周期異常の発現時期の早期化顕在化することが遅発影響の発現機序と考えられた。これらの変化は閉経相当時期のラット加齢性変化に類似していた。

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

また遅発影響の発現時期については、遅発影響の臨界期は生後 10 日まで持続し生後 14 日曝露では明らかでないと考えられ、発現時期に閾値が存在することも明らかとなった。

2) 遅発影響の発現に関わる ER の役割を明確化するための検査 [井上]

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

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

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

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

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

遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義の解明および EE 投与直後の視床下部における ER α および Kiss1 遺伝子に関して検索した結果、遅発影響発現量の閾値に関する一連の実験結果より、現行の評価法が遅発影響評価に必ずしも有効ではないことが示唆された。

新生児ラット視床下部の Kiss1 は LH パルスを起動する視床下部弓状核(ARC)の Kndy ニューロンにのみ発現していることが報告されている。したがって遅発影響の視床下部部位特異性、とくに後方の卵胞発育中枢に関する一連の実験結果から、遅発影響を含む EE 新生児期経口投与後直後のラットの視床下部で、すでに Kiss 遺伝子の発現が低下していたことは、新生児ラットに投与された EE はまず Kndy ニューロンの Kiss1 遺伝子発現を低下させ、GnRH 分泌制御を変化させることで、その後の視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の正常な発達を妨げ、遅発影響をもたらすことを示唆していた。すなわち EE 新生児曝露は ARC の Kiss1 発現を低下させ、性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を変化させて卵胞発育を抑制し、その後の視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の正常な発達を妨げ、遅発影響をもたらすことが示唆された。

4) 新生児期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子の検索 [渡辺]

胎子期および新生子期に受けた内分泌かく乱物質による影響は、不可逆的であり一生影響が残るものがある。先行研究より、雌ラットの出生後 24 時間以内に EE を投与すると生殖機能の早期停止と性成熟後の原始卵胞の減少が認められた。

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

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

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

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

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

6) 新生児期から発達期の EE 曝露が雌ラットの発達成長後の社会性行動発現への影響について

て [川口]

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

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

3年間の各分担研究結果の総合考察

主な成果として

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

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

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

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

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

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

これまでの研究成果で得られた確立した遅発影響指標と機序と閾値を総合解析し、遅発影響の発現機序を示したAdverse outcome pathway(AOP)を構築した。

エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露 視床下部サージ中枢視床下部キスペプチン陽性細胞数低下(MIE) LHサージ低下(KE) 性周期異常の発現時期の早期化(AO)[比較的高用量では 繁殖生涯への悪影響(AO)/子宮癌リスク増加(AO)(図8)

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

- 1) 性周期観察による性周期異常をエンドポイントとすること
- 2) 観察期間は生後6ヶ月までが必要である
- 3) 最も汎用されている二世代繁殖毒性試験(TG416)を用いることがよいが、そのほかの繁殖試験でも応用可と考える
- 4) F0世代に性周期を長期観察用の衛星群を設置すること
- 5) 1群あたりの匹数として、20例以上を推奨
- 6) 遅発影響を確認すべき物質は、ERと結合するエストロゲン作用/抗エストロゲン作用が強く疑われる物質。
- 7) 用量についてはエストロゲン作用を示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが望ましい。

このような追加の衛星群を設けることで遅発影響は検出可能である(図9)。

E . 結論

1. エストロゲン類あるいは ER を介した新生児期曝露により誘発される遅発影響の発現機序に、視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的な変化が必須の役割を果たしていることが明らかとなった。
2. さらなる検討が必要であるが遅発影響の新生児期曝露初期からすでに視床下部や卵巣等で変化が生じていると考えられる。
3. 遅発影響では視床下部以外の脳および性行動等の変化をもたらす。
4. 遅発影響の発現および臨界期には閾値が存在する。
5. 遅発影響の発現機序を示した Adverse outcome pathway(AOP)が構築可能で、既存の繁殖毒性試験テストガイドライン(TG)の改善により遅発影響は検出可能であると結論した。

F . 研究発表

F-1 . 論文発表

- 1) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Reprod. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.
- 2) Shiga T, Nakamura TJ, Komine C, Goto Y, Mizoguchi Y, Yoshida M, Kondo Y, Kawaguchi M. A Single Neonatal Injection of Ethinyl Estradiol Impairs Passive Avoidance Learning and Reduces Expression of Estrogen Receptor α in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats. *PLoS One*. 2016 Jan 7;11(1):e0146136
- 3) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha- Ethynylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reprod Toxicol.* 2015 51:145-56.
- 5) Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. *Reprod Toxicol.* **57**, 21-28, 2015.
- 6) Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague–Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)
- 7) Horii Y, Kawaguchi M. Higher detection sensitivity of anxiolytic effects of diazepam by ledge-free open arm with opaque walled closed arm elevated plus maze in male rats. *Behav Brain Res.* 2015 Nov 1;294:131-40
- 8) Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Effects of sulpiride and ethylene glycol monomethyl ether on endometrial carcinogenicity in Donryu rats. *J Appl Toxicol.* Online .Jul 14 2015.
- 9) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, 39, 775-784, 2014.
- 10) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptch1 Heterozygous Mice. *Toxicol Pathol.* 2014. 42(8):1174-87
- 11) Kaori Nozawa, Kentaro Nagaoka, Haolin Zhang, Kento Usuda, Sachiko Okazaki, Kazuyoshi Taya, Midori Yoshida, Gen Watanabe, Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats, *Reprod Toxicology*, 46, 77-84, 2014.
- 12) Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G, Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 76, 1105-1110, 2014.
- 13) Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(6):891-902.
- 14) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.

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

F-2.学会発表

- 1) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: **ヒト肝細胞キメラマウス(PXB マウス)における卵胞発育不全**:第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 2) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 白田賢人, 渡辺元, 吉田緑: **Ethynyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検察**: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 3) 高橋美和, 市村亮平, 井上薫, 森川朋美, 渡辺元, 吉田緑: **17 α -ethynylestradiol (EE) 新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下**: 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol in rats. (54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3))
- 5) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod Dhakal, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: **EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響**: 第 30 回日本毒性病理学会 (2014.1)
- 6) 高橋美和: **遅発性影響のメカニズムに迫る-神経内分泌側面から-**: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 7) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod DHAKAL, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: **Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスベプチンニューロンの異常**: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 8) Yoshida M, Ichimura R, Inoue K, Watanabe G*, Takahashi M: Disruption in the hypothalamus neonatally exposed to p-tert octylphenol is essential for induction of early occurrence of persistent estrus, a feature of delayed effect in rats. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2014.3)
- 9) 吉田緑 INHAND フォローアップ: 生殖器雌性生殖器に関する INAHD トピックスと問題点について (第 30 回日本毒性病理学会学術集会 (2014 年 1 月 30~31 日 徳島))
- 10) 田中 恵他「新生児期エチニルエストラジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロゲン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、高松市)
- 11) 代田 真理子, 吉田 緑「幼若動物を用いた毒性評価において認識すべき発達期の繁殖生物学の特徴」(第 42 回日本毒性学会シンポジウム、2015 年 6 月、金沢市)
- 12) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新周期エチニルエストラジオール経口曝露量と子宮肥大試験の検出感度」(第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月、金沢市)
- 13) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the Kiss1^{-/-} female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)
- 14) 代田 真理子「リプロダクティブヘルスからみた遅発影響 - 遅発影響検出のための実践的指標の探索」(第 41 回日本毒性学会シンポジウム、2014 年 7 月、神戸市)
- 15) 代田 真理子「ラット周生期エストロゲン活性物質曝露による遅発影響—毒性学的視点での解析」(第 106 回日本繁殖生物学会大会シンポジウム、2013 年 9 月、府中市)
- 16) 川嶋 潤他「新生ラットへのエチニルエストラジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響」(第 40 回日本毒性学会、2013 年 6 月、千葉市)
- 17) 田中 恵他「新生児期エチニルエストラジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロゲン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、徳島市)
- 18) 代田 真理子, 吉田 緑「幼若動物を用いた毒性評価において認識すべき発達期の繁殖生物学の特徴」(第 42 回日本毒性学会シンポジウム、2015 年 6 月、金沢市)
- 19) 田中 恵他「嚢胞状卵胞形成における新周期エチニルエストラジオール経口曝露量と子宮肥大試験の検出感度」(第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月、金沢市)
- 20) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the Kiss1^{-/-} female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)
- 21) 白田賢人, 野澤香織, 永岡謙太郎, 吉田緑、

- 田谷一善、渡辺元エチニルエストロゲンの雌ラットへの新生期曝露による血中ホルモンおよび生殖関連遺伝子発現の変化(第28回日本下垂体研究会学術集会2013年8月7-9日、花巻、岩手)
- 22) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats. The 107th SRD annual meeting (第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月20-24日、帯広)
- 23) シンポジウム「生殖・発生・行動と化学物質」、新生仔マウスへの化学物質曝露が及ぼす性分化と生後神経新生への影響。第106回日本繁殖生物学会大会(府中、東京)2013
- 24) 新生仔マウスの内分泌攪乱物質投与がおよぼすカルシウム結合蛋白質含有細胞の性的型への影響。第157回日本獣医学会学術集会 講演要旨集、P331(2014)
- 25) 磯部安奈、川口真以子 仔ラットの母子分離誘発啼鳴反応の発声回数に対する抗不安薬ジアゼパムの抑制作用には性差がある 第89回日本薬理学会年会(2016年3月9日-11日、神奈川)
- 26) 田邊郁也、小峰千亜希、吉田緑、川口真以子 生後24時間以内の雌ラットへのethynyl estradiol曝露が受動回避学習に及ぼす影響 第62回日本実験動物学会総会(2015年5月28日-30日、京都)
- 27) 立川直之、志賀健臣、中村孝博、小峰千亜希、堀井康之、渡辺元、田谷一善、溝口康、吉田緑、川口真以子 雌ラットへの生後24時間以内 ethynyl estradiol 曝露が大脳皮質と海馬のestrogen receptor(ER) α 及びER β 発現に及ぼす影響 第62回日本実験動物学会総会(2015年5月28日-30日、京都)
- 28) Nakajima S, Horii Y, Ohta R, Takahashi K, Sato Y, Sato K, Shiraishi Y, Kawaguchi M Altered emotional reactivity of offspring induced by cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats, and its relationship with maternal care 第38回日本神経科学大会(2015年7月28日-31日、神戸)
- 29) 中山愛里、服部達哉、宍戸浩孝、磯部安奈、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子 幼若期雌ラットへの ethynyl estradiol (EE) と triphenyl phosphate (TPhP) の28日間曝露が成熟後の臓器重量、情動行動、性選好性、性行動に及ぼす影響 環境ホルモン学会第18回研究発表会(2015年12月10-11日、栃木)
- 30) 中山愛里、服部達哉、大河原利、田辺郁也、磯部安奈、宍戸浩孝、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子 幼若期雌ラットへの ethynyl estradiol と triphenyl phosphate の28日間曝露が成熟後の性行動に及ぼす影響 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会(2015年9月17日-19日、宮城)
- 31) 千本隆志、神島愛未、小峰千亜希、吉田緑、川口真以子 生後24時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が学習行動に及ぼす影響 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 32) 植村英恵、神島愛未、堀井康行、渡辺元、田谷一善、滝上英孝、鈴木剛、近藤保彦、川口真以子 幼若期及び成熟期の TDCIPP 及び flutamide 慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、血中ホルモン濃度に及ぼす影響 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 33) 高橋光佑、堀井康行、佐藤祐司、(川口真以子) 高架十字試験の構造変化に伴うラットの不安様行動の変化 日本畜産学会第118回大会(2014年3月26-29日、つくば)
- 34) Horii, Y., Takahashi, K., Sato, Y., Nakajima, S., Sato, K., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M. Relationship between elevated plus maze arm structure and anxiety-like behavior in rats: the presence or absence of open arm ledges vs opaqueness of closed arm structure walls. 第37回日本神経科学大会(2014年9月11日-13日、横浜)
- 35) 小峰千亜希、近藤保彦、吉田緑、川口真以子 生後24時間以内の ethynyl estradiol 曝露が雌ラットの縄張り行動と社会性行動へ及ぼす影響 第20回日本行動神経内分泌研究会(2014年9月3日-5日、秩父)
- 36) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the the expression levels of ER α in adult female rats. 5th International NeuroMalaysia Symposium(2014年9月28日、Malaysia)
- 37) Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Yuji SATO, Sato, K., Nakajima, S., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M. Cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats altered emotional reactivity of male offspring. Neuroscience 2014(2014年11月15日-19日、Washington DC, U.S.A.)
- 38) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Komine, C., Goto, Y., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the learning performance and the expression levels of ER α in adult female rats. Neuroscience 2014(2014年11月15日-19日、Washington DC, U.S.A.)
- 39) Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo,

- Y., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on partner preference, territorial and sexual behavior Neuroscience 2014(2014年11月15日～19日、Washington DC、U.S.A.)
- 40) 神島愛未、鈴木剛、滝上英孝、堀井康行、渡辺元、田谷一善、近藤保彦、川口真以子 幼若期の tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) と flutamide (FI) の慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、生殖器重量および血中 testosterone 濃度に及ぼす影響 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 41) 小峰千亜希、吉田緑、近藤保彦、川口真以子 生後24時間以内の ethynyl estradiol 曝露が雌ラットの性選好性、縄張り行動、性行動へ及ぼす影響 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 42) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats. The 107th SRD annual meeting (第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月20～24日、帯広)
- 43) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Harigaya, T., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of antiandrogen on sexual behavior, organ weight and hormone levels of male rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 44) Shiga, T., Kawaguchi, M., Harigaya, T., Mizoguchi, Y. Ethynyl estradiol exposure within 24 hours of birth affects Estrogen receptor α expression levels in adult female rats. The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 45) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on feeding, learning and sexual behavior. 第36回日本神経科学大会(2013年6月22日、京都)
- 46) 川口真以子、小峰千亜希、神島愛未、近藤保彦 Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on sexual behavior. 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム(2013年9月12日～14日、東京)
- 47) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on feeding, learning and sexual behavior in female rat. 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 48) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Antiandrogen during juvenile induce hypoplasia of penis and suppression of sexual behavior of male rats. 4th International NeuroMalaysia Symposium(2013年9月28日、Malaysia)
- 49) Shiga, T., Nakamura, T. J., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. Neonatal exposure to ethynyl estradiol influences the expression levels of estrogen receptor α in the adult brain of female rats. Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 50) Komine, C., Kamishima, M., Odashima, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.(Kawaguchi, M.) Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on partner preference and sexual behavior in female rats. Neuroscience 2013(2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 51) Shiga, T., Nakamura, T. J., Chiaki, K., Kamishima, M., Goto, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Mizoguchi, Y., Kawaguchi, M. Exposure to ethynyl estradiol within 24 hours of birth decreases the expression levels of ER α in adult female rats. 第16回日本内分泌攪乱化学物質学会(2013年12月12日～13日、東京)

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

遅発影響の問題点

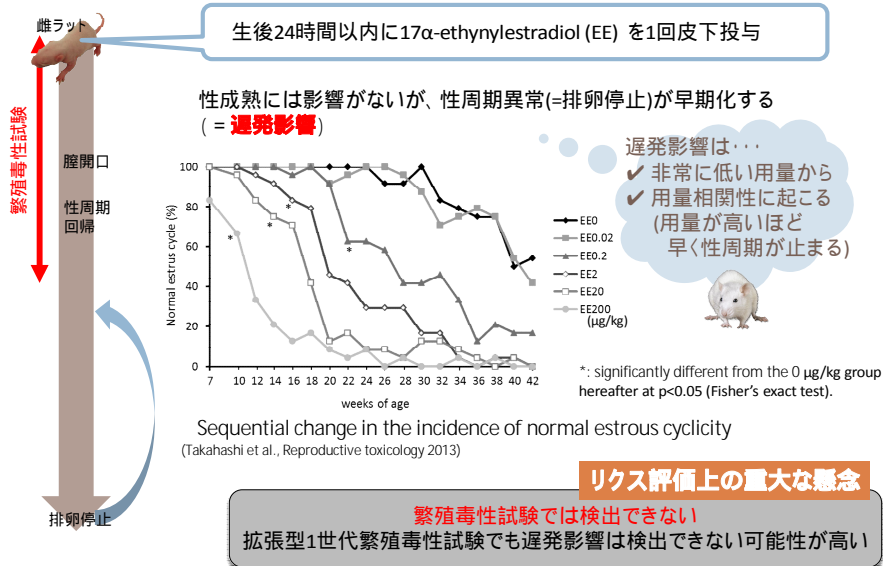


図1 遅発影響の問題点

キスペプチンニューロンの部位特異性

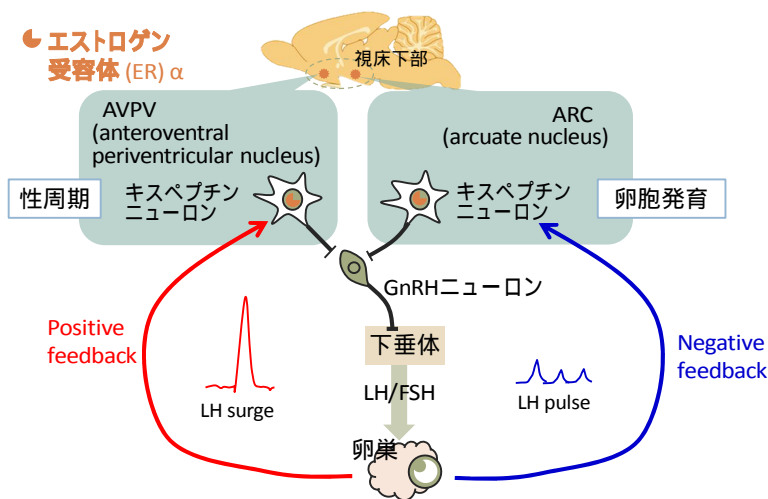


図2 視床下部キスペプチンニューロンの部位特異性

遅発影響の発現のメカニズム

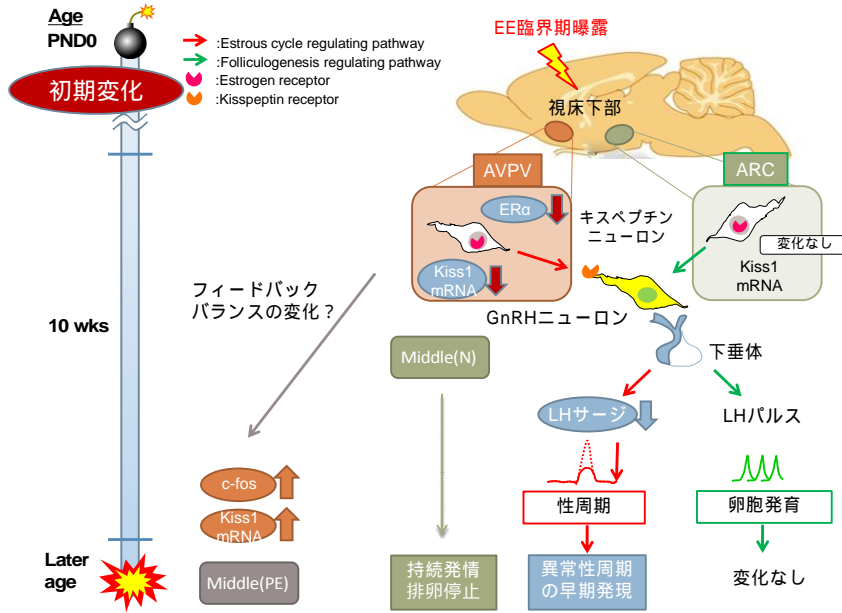


図3 遅発影響の発現メカニズム概念図

遅発影響のAOP

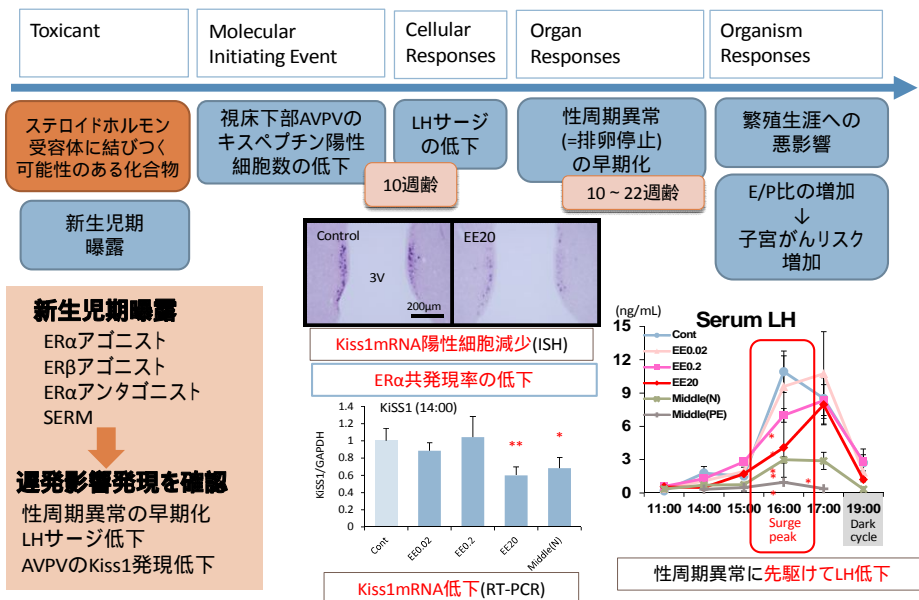


図4 遅発影響の Adverse Outcome Pathway (AOP)に関連する各因子

遅発影響の初期変化の検索

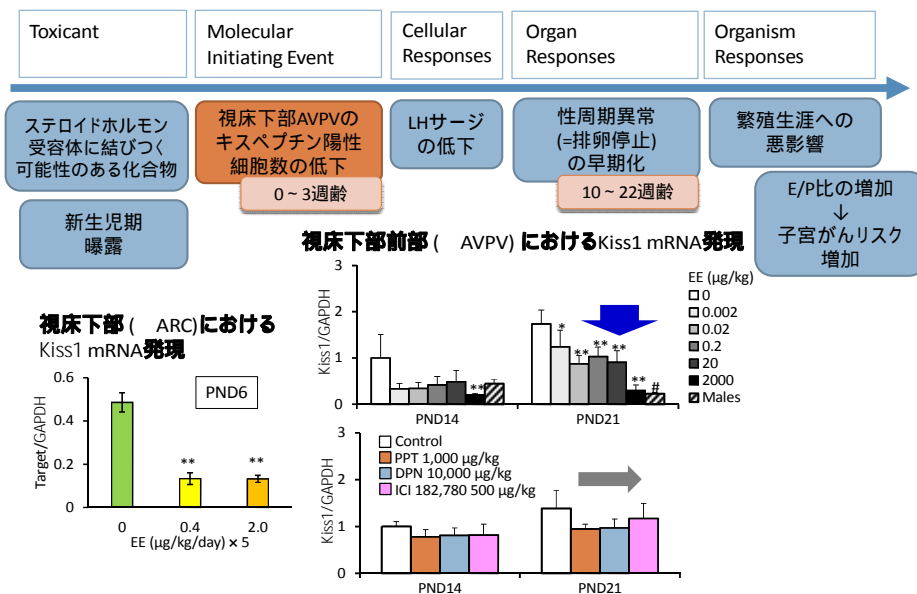


図5 遅発影響の初期変化のまとめ

新生児期曝露で認められたその他の影響

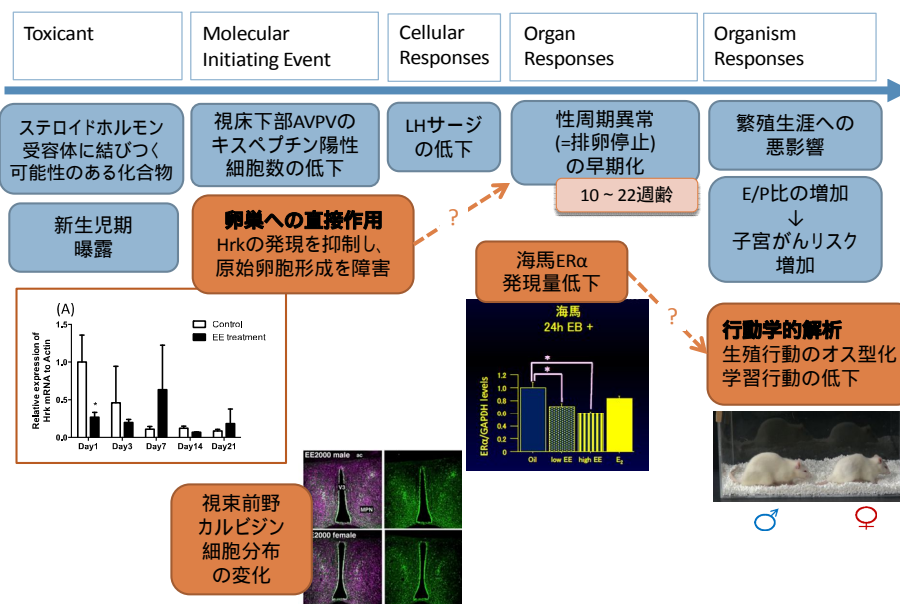


図6 新生児期曝露で認められたその他の影響のまとめ

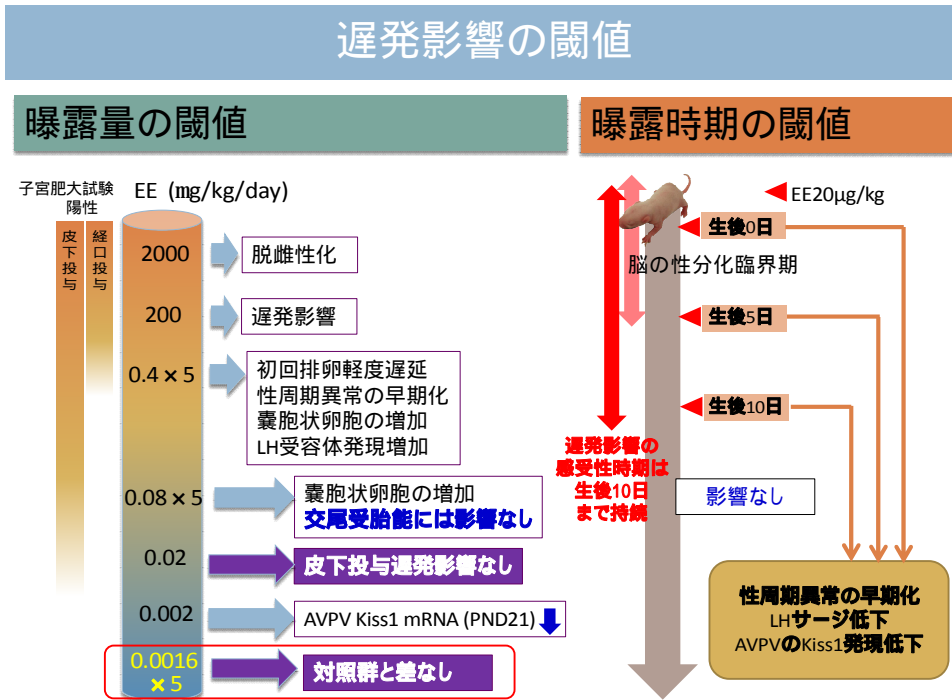


図7 遅発影響の曝露量と臨界期の閾値

結論

化学物質の臨界期曝露による雌性生殖器の遅発影響において

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

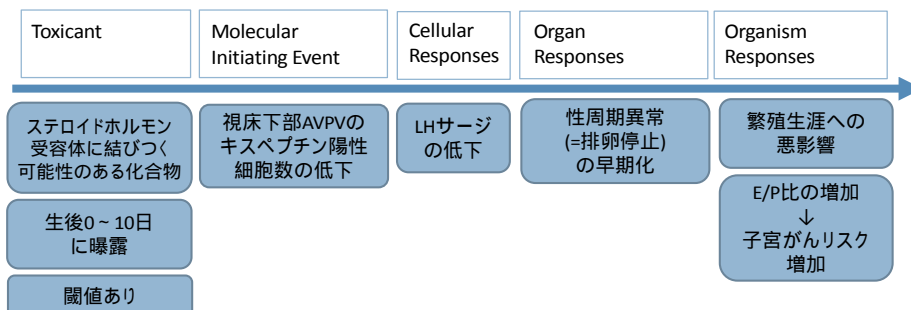


図8 AOPと本研究の結論

遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

(新生児期/臨界期曝露に限定した遅発影響を指す。以下同様)

1. 遅発影響の定義

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

2. 遅発影響の発現機序

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

3. 使用可能な既存の毒性試験ガイドラインと改善点

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

4. 衛星群の検査項目とそのエンドポイント

- 1) **衛星群の動物数** 1群20例以上。ただし衛星群への被験物質の直接投与実施しない、混餌投与の場合は離乳後は実施しない
- 2) **検査項目とエンドポイント** 継続的な性周期観察を必須検査項目とする。性周期観察により対照群と比較し、**性周期異常の発現時期早期化を遅発影響発現のエンドポイントとする。**
- 3) **観察期間**
生後6ヶ月
- 4) **母動物への投与量**
用量については母動物にエストロゲン作用を示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが望ましい。

5. 遅発影響検出対象化学物質

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

6. 機序試験における検査項目とエンドポイント

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

図9 遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

・ 分担研究者報告

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

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

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

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

研究要旨

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

1. 新生児期に遅発影響量エチニルエストラジオール (EE)曝露雌ラットでは、遅発影響の長期
指標である性周期異常に先行して視床下部前方に存在する性周期制御中枢 AVPV の Kiss1
mRNA 発現低下、同部位のエストロゲン受容体(ER) α を有するキスペプチンニューロン数の
の減少、LH サージの低下が認められた。卵胞発育中枢(視床下部後方)である ARC には変化
は認められなかった。これらの現象は閉経相当時期の雌ラットの加齢性変化に類似してい
た。
2. ER を介して組織特異的にエストロゲン/抗エストロゲン作用を示す selective estrogen receptor
modulator(SERM)のタモキシフェン(TMX)、ラロキシフェン(RLX)の新生児期曝露ラットでも
EE と同様な視床下部の変化および遅発影響が認められた。子宮肥大試験で TMX、RLX とも
明らかな抗エストロゲン作用を示した。
3. 1.2 の結果より、**エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露が性周期中枢である
視床下部前方 AVPV のキスペプチン低下を引き起こし、その低下が成熟後の LH サージを
低下させる。この性腺軸の変調持続が性周期異常の発現時期の早期化顕在化することが遅発
影響の発現機序**と考えられた。
4. 遅発影響の感受性時期の閾値について視床下部 AVPV と ARC のキスペプチンの変化と性周
期観察を指標に検索したところ、遅発影響の臨界期は生後 10 日まで持続し生後 14 日曝露で
は明らかでないと考えられた。
5. エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の発現機序の adverse outcome pathway (AOP)
は、新生児期エストロゲン/抗エストロゲン作用物質曝露→molecular initiating event は視床下
部サージ中枢キスペプチンニューロン抑制→key event は正常性周期より認められる LH サ
ージ低下→AO は性周期異常の早期発現、繁殖生涯への悪影響とした。また既存の毒性試験
ガイドラインでは検出できない可能性の高い遅発影響であるが、**既存の OECD 繁殖毒性試験
テストガイドラインに性周期長期観察用の試験群を追加設置等の改善を行うことにより検
出可能**であると結論した。

A . 研究目的

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

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

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

平成 25-27 年度の本研究の目的は以下の点である。

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

B . 研究方法

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

雌 Donryu ラットに合成エストロゲンであ

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

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

生後 24 時間以内(PND0)の Donryu 新生児雌ラットに TMX 10 $\text{mg}/\text{kg bw}$ (TMX)、RLX 0.1、1 あるいは 10 $\text{mg}/\text{kg bw}$ (RXL0.1,RLX1, RLX10)を単回皮下投与し、対照群には溶媒のセサミオイルを投与した。投与量は新生児期曝露により影響がでると報告されている量を選択した (Pinilla et al., 2001; Pinilla et al., 2002)。投与物質以外は実験 1 と同様の解析を実施した。

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

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

3. 遅発影響の感受期の検索

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

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

AOP 構築の資料として以下の 3 文献を基本の文献と用いた。

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

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

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

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

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

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日厚生労働省通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物の多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)、特定外来生物による生態系等に係る被害の防止に関する法律(平成 16 年法律第 78 号)及び感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(平成 10 年法律第 114 号)等の主旨に則り、作成された国立医薬品食品衛生研究所 動物実験の適正な実施に関する規定および分担研究者が各々所属する機関に設定された動物委員会の規定等に基づき実施されたものであり、関連法令などを遵守して行われた。

C. 結果

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

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

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

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

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

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

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

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

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

3. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索

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

性周期異常発現前の Young adult10 週齢で実

施した人工的 LH サージ誘発および視床下部 Kiss1 遺伝子解析結果では、16:00 の LH レベルは PND0、5、10 いずれにおいても有意に低下していたが PND14 群では変化は認められなかった(Figure 13)。AVPV を含む前部の Kiss1 mRNA も LH サージと同様 PND0、5、10 の EE 曝露群で発現が低下しており、PND0 から PND10 にかけてその低下は緩やかとなり、PND14 では変化は認められなかった(Figure 14)。ISH 法による解析でも RTPCR の結果と同様、Kiss1mRNA を示す細胞数の用量依存性の低下が認められた ARC の変化あるいはその他の遺伝子変化は認められなかった。

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

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

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

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

2. 遅発影響において必須の変化(Key Event, KE)の候補

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

3. 遅発影響 Adverse outcome (AO)の候補

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

既存の毒性試験 TG への提言については考察にまとめて記載した。

D. 考察

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

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

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

2. SERM の新生児期曝露による遅発影響と発現機序

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

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

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

3. 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索の解析

PND0、5、10 の EE 曝露群では PND0 より性周期異常発現時期が遅れて認められた。また性周期異常発現前の Young adult 時期にすでに LH サージ低下、AVPV の Kiss1mRNA 発現、陽性細胞数の低下も認められたが、曝露時期

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

遅発影響の AOP に至る流れ図として、エストロゲン/抗エストロゲン作用物質の新生児期曝露→視床下部サージ中枢視床下部キスペプチン陽性細胞数低下(MIE)→LH サージ低下(KE)→性周期異常の発現時期の早期化(AO) が考えられた。研究成果を盛り込んだ概念図を Figure 16 に示した。

既存の毒性試験 TG への提言

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

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

1 群あたりの匹数として、対照群であ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、最低限 1 群 20 例以上を推奨したい。また一代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型 1 世代繁殖毒性試験(TG433)についても、2 世代繁殖毒性試験と同様、F0 世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能であると提言する。

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

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

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

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

用量についてはエストロゲン作用を示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが

望ましいと提言する。

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

このような追加の衛星群を設けることで遅発影響は検出可能であると考えられる。本提言は Table 1 として本報告書末に記載した。今後の化学物質リスク評価に本研究結果が活用されることを強く期待する。

E . 結論

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

F . 研究発表

1. 論文発表

- Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M. Effects of piperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats. *J Toxicol Sci.* 2013;38(6):891-902.
- Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptc1 Heterozygous Mice. *Toxicol Pathol.* 2014. 42(8):1174-87
- Dixon D, Alison R, Bach U, Colman K, Foley GL, Harleman JH, Haworth R, Herbert R, Heuser A, Long G, Mirsky M, Regan K, Van Esch E, Westwood FR, Vidal J, Yoshida M. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014; 27(3-4 Suppl):1S-107S.
- Ichimura R, Takahashia M, Morikawa T, Inoue K,

Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reproductive Toxicol.* 2015. Online first

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.

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.

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

2. 学会発表

高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 α -ethynylestradiol (EE)新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下：第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)
市村亮平 ,高橋美和 ,森川朋美 ,Pramod Dhakal ,井上 薫 ,前田 潤 ,吉田 緑 ,渡辺 元：EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1mRNA 発現に及ぼす影響 . 第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2014.1)

Yoshida M, Ichimura R, Inoue K, Watanabe G*, Takahashi M : Disruption in the hypothalamus neonatally exposed to p-tert octylphenol is essential for induction of early occurrence of persistent estrus, a feature of delayed effect in rats. 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2014.3)

市村亮平 Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)

市村亮平 ,高橋美和 ,森川朋美 ,井上 薫 ,白田賢人 ,渡辺 元、吉田 緑：Ethynylestradiol の新生時期曝露による遅発影響の感受性期の検索 .第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会 (2015.1)

Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K,

Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in rats. (54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3)

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

G . 知的財産権の出願・登録状況

なし

Materials & methods

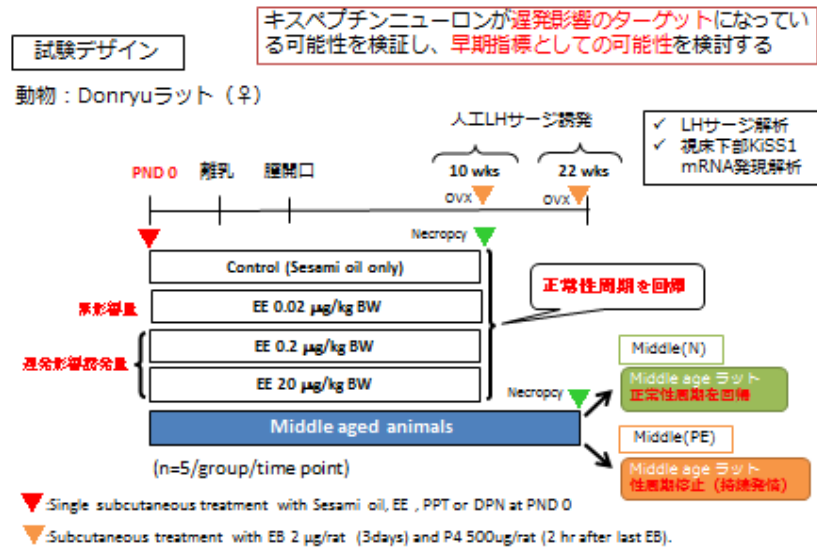


Figure 1 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がLHサージおよび視床下部キスペプチンニューロンに及ぼす影響の解析の実験デザイン

Results (LHサージ)

性周期異常に先駆けて、性周期を制御するLHサージの低下が認められた

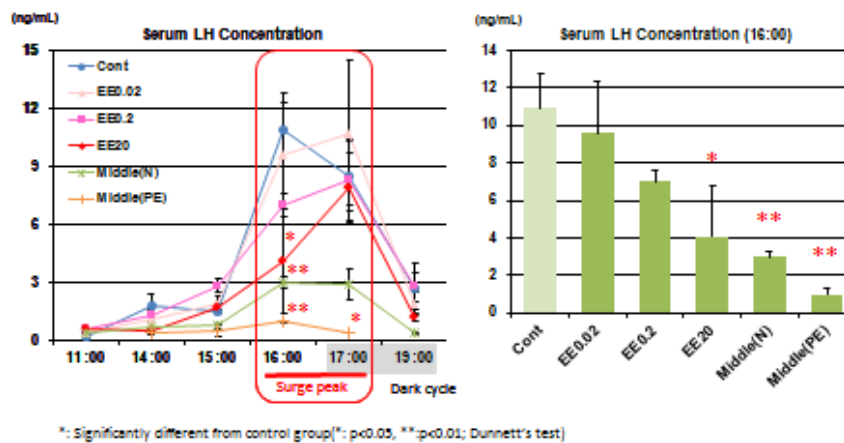


Figure 2 LHサージ時前後の血中LH濃度(左)と、LHサージ時(1600)における各群のLHレベル(右)。EE0.2、EE20群では用量依存的なLHサージ低下が認められ、性周期を回復するMiddle age 群(MiddleN)では低いもののLHサージがあり、回復しないMiddle age (Middle PE)群ではサージは認められなかった。

Results(KiSS1 mRNA発現/AVPV)

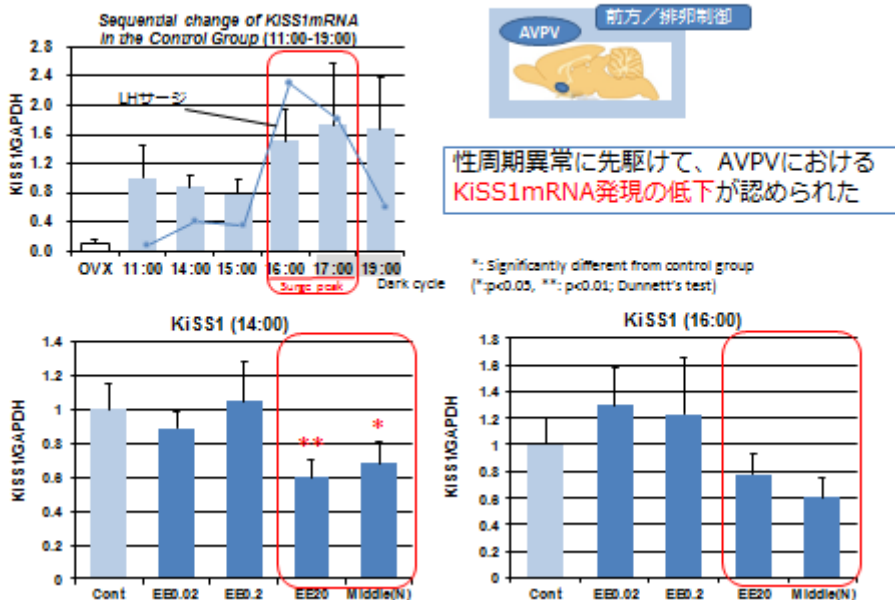


Figure 3 視床下部後方(AVPVを含む)におけるKiss1遺伝子発現(RTPCR)。EE20およびMiddle N群で14:00よりKiss1レベルで明らかに低下した。

Results(KiSS1 mRNA発現/ARC)

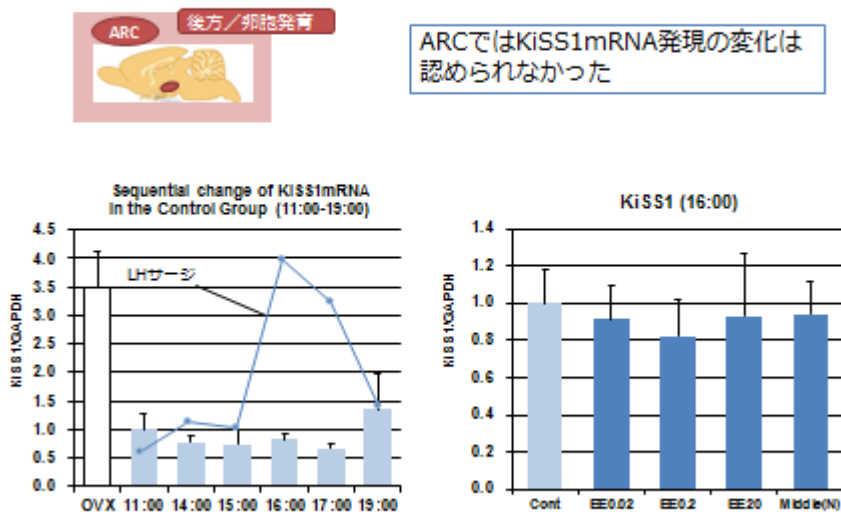


Figure 4 視床下部後方(ARCを含む)におけるKiss1遺伝子発現。ARCではいずれの時期においてもKiss1遺伝子の変化は認められなかった。

Results(KiSS1 in situ hybridization/AVPV)

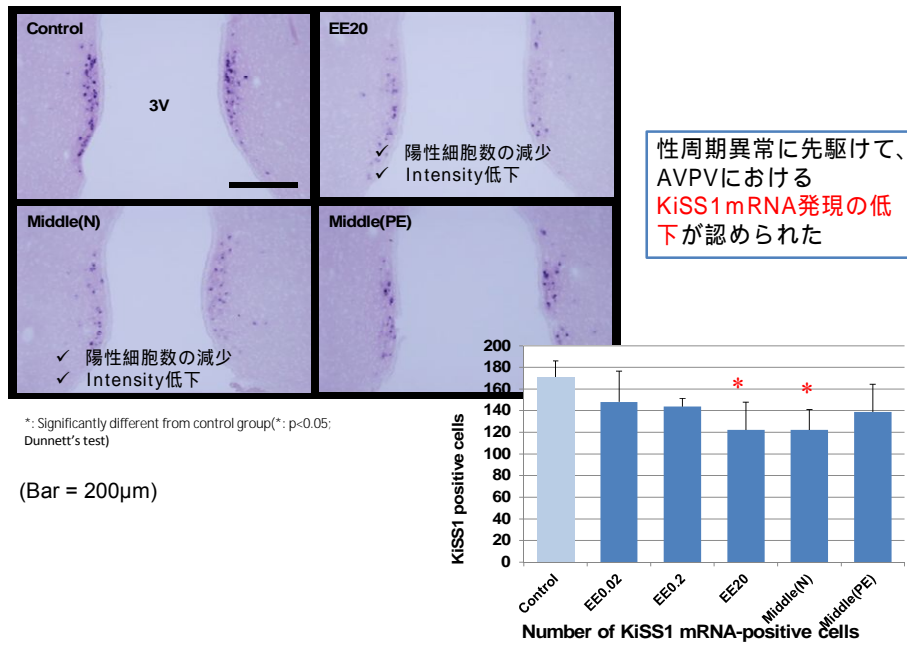


Figure 5 視床下部AVPVにおけるKiSS1陽性細胞数の変化

Results(KiSS1/ERα二重染色)

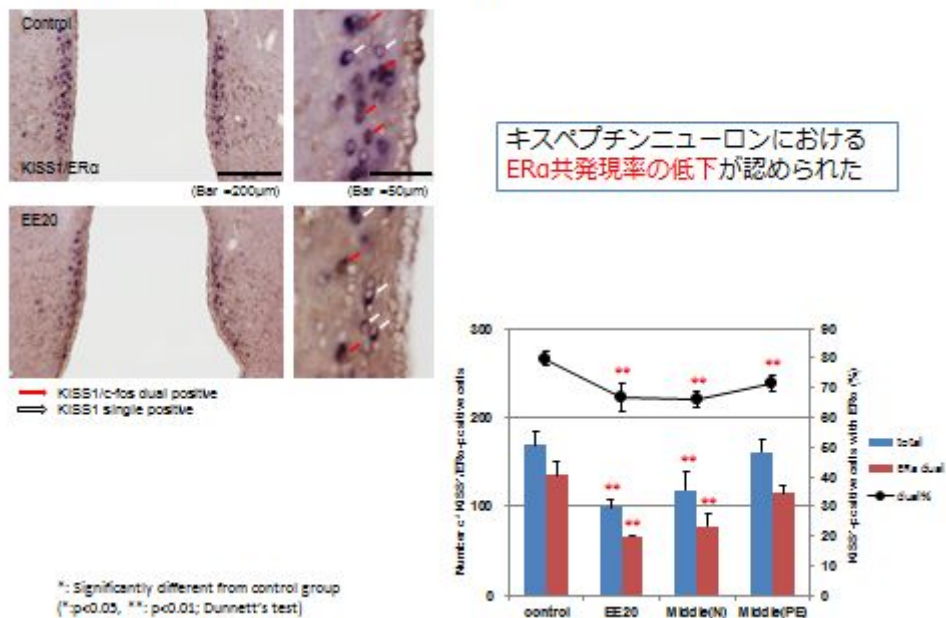


Figure 6 視床下部 AVPV における KiSS1 陽性細胞数と ERα の共発現率

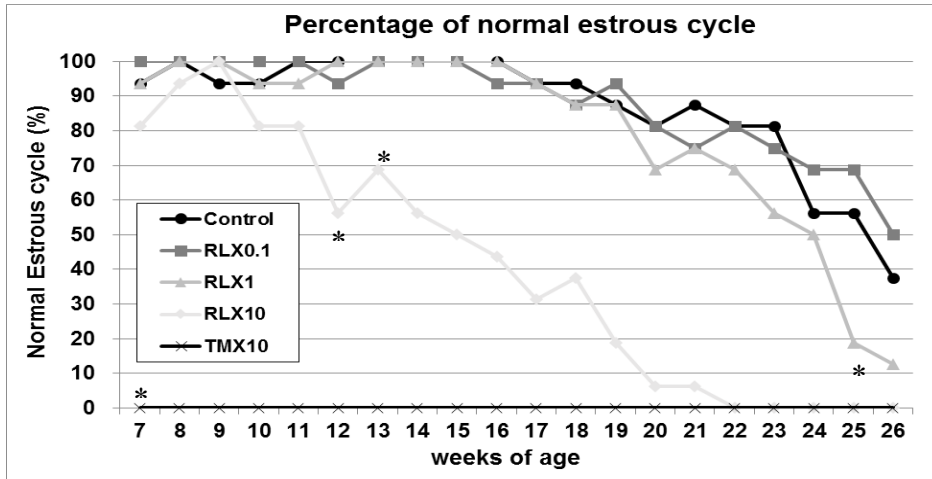


Figure 7 SERMを新生児曝露したラットの正常性周期を示す個体の割合の推移

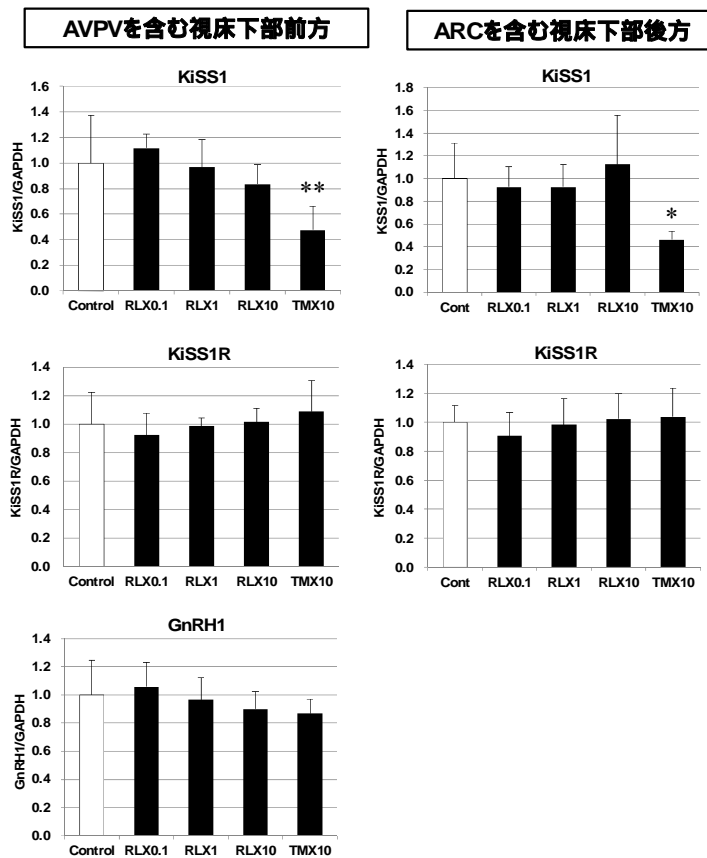


Figure 8 SERM新生児曝露ラットのAVPVを含む視床下部前方およびARCを含む視床下部後方におけるKiss1, Kiss1RおよびGnRH (AVPVのみ)mRNAの発現

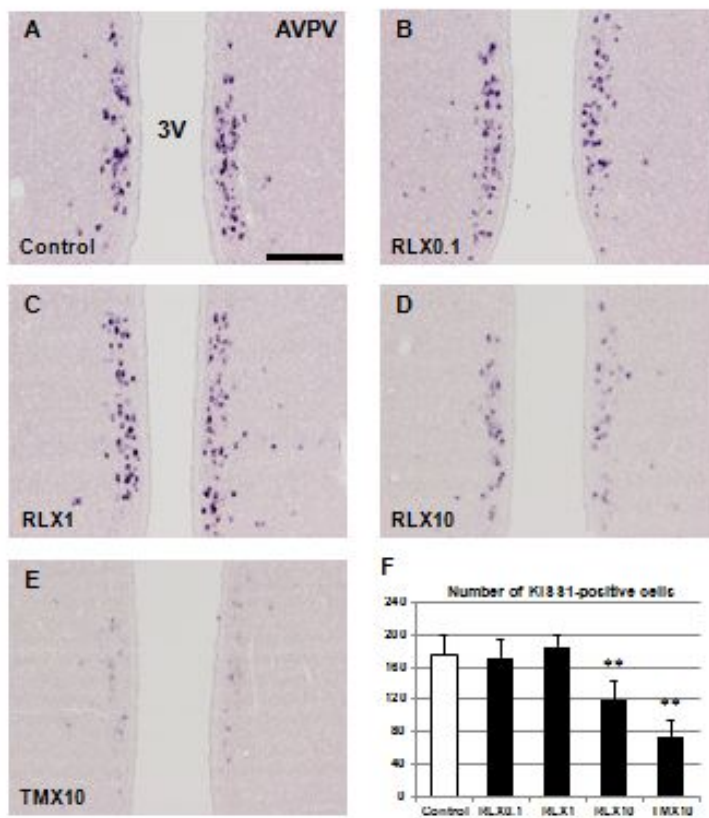


Figure 9 AVPVを含む視床下部前方におけるISHによるKiss1発現細胞の比較

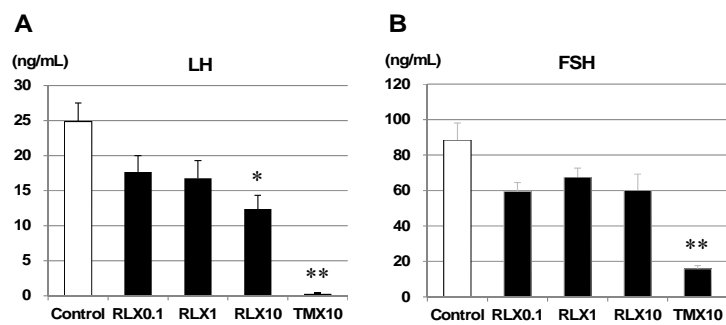


Figure 10 誘発LHサージ時の血中LHおよびFSH値

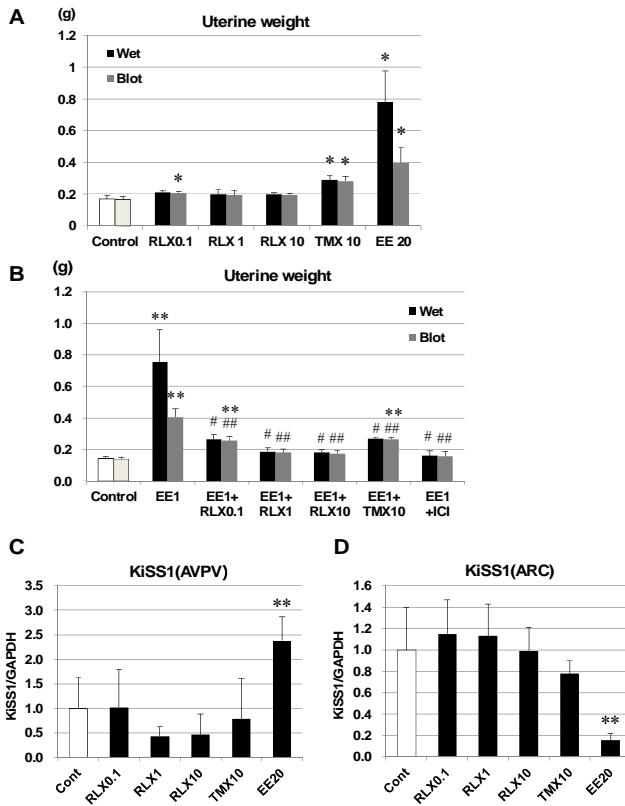


Figure 11 成熟ラットの子宮に対するTMXとRLXのエストロゲン/抗エストロゲン作用および視床下部に対するエストロゲン作用

Results (性周期)

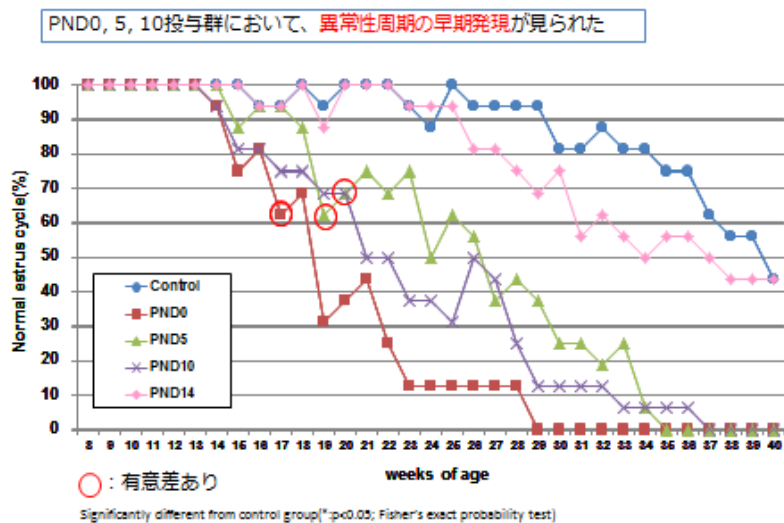


Figure 12 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索における性周期観察

Results (LH/FSH濃度)

PND0, 5, 10投与群において、ピーク時(16:00)におけるLHサージの低下が見られた

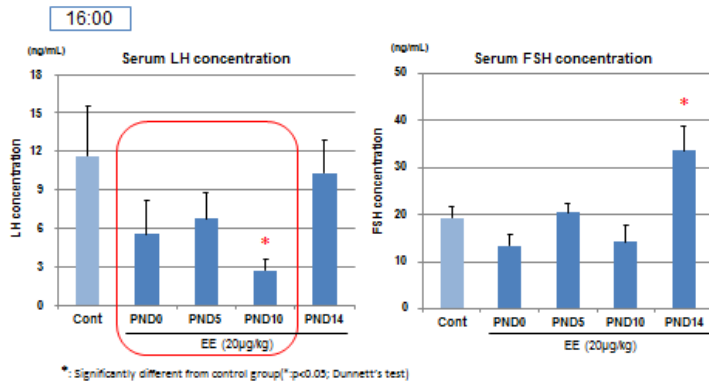


Figure 13 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるLHサージ

Results (KiSS1 mRNA発現/AVPV, ARC)

PND0, 5, 10投与群において、AVPVにおけるKiSS1 mRNA発現の低下が見られた

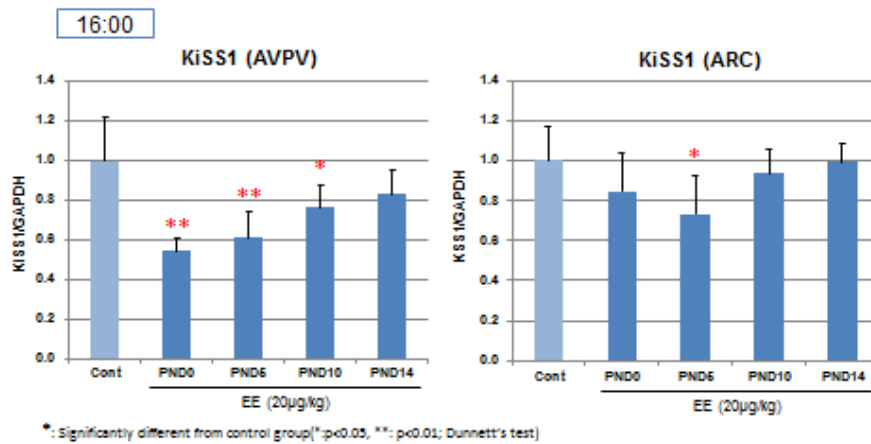


Figure 14 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響の感受期の検索におけるAVPVのKiSS1 mRNA発現

Discussion (想定される遅発影響の発現のメカニズム)

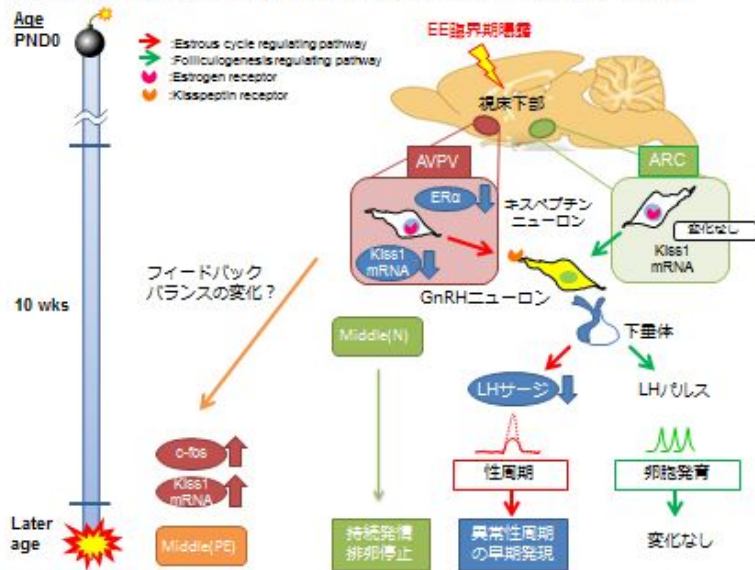


Figure 15 新生児期エストロゲン曝露による遅発影響がメカニズム予想図

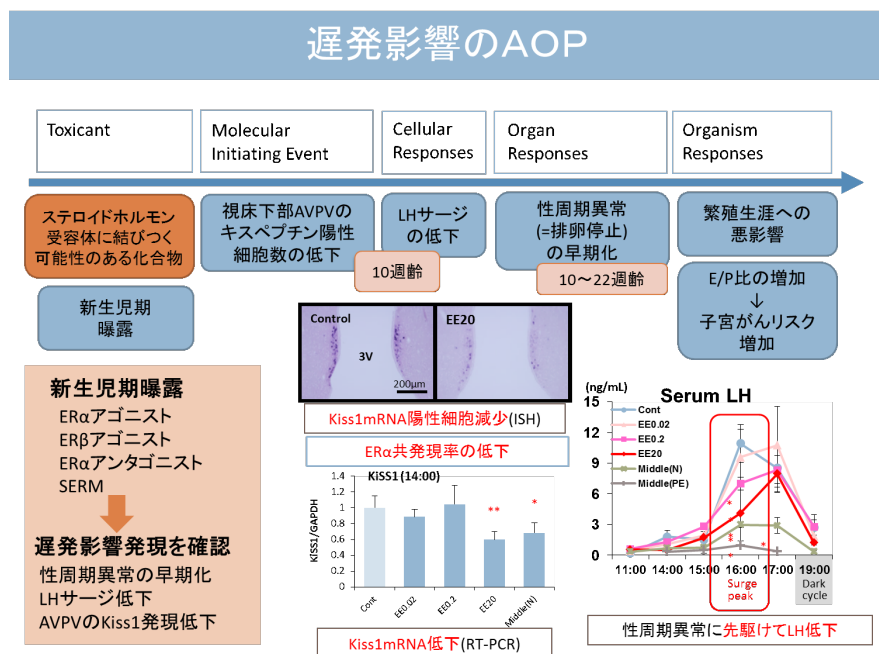


Figure 16. 遅発影響のAOP

遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

(新生児期/臨界期曝露に限定した遅発影響を指す。以下同様)

1. 遅発影響の定義

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

2. 遅発影響の発現機序

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

3. 使用可能な既存の毒性試験ガイドラインと改善点

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

一世代繁殖毒性試験(TG415)、あるいは拡張型一世代繁殖毒性試験(TG433)についても、F0世代に長期性周期観察用の衛星群を設けることにより遅発影響の検出への対応が可能

4. 衛星群の検査項目とそのエンドポイント

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

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

3) **観察期間**

生後6ヶ月

4) **母動物への投与量**

用量については母動物にエストロゲン作用を示す用量を含めて用量設定し、遅発影響が認められる用量および認められない用量を含むことが望ましい。

5. 遅発影響検出対象化学物質

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

6. 機序試験における検査項目とエンドポイント

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

Table 1 遅発影響検出のための既存の毒性試験ガイドライン改善の提言

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

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

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

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

研究要旨

化学物質の臨界期曝露による雌性生殖器の遅発影響について、その発現機序における受容体の役割を明確すること、遅発影響のリスク評価に有用な早期指標を確立することを目指し、(1) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響、(2) 新生児期エストロゲン曝露が LH サージにおよぼす影響、(3) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化、(4) 遅発影響と子宮肥大試験の関連について検討を行った。その結果、(1) ER β アゴニストである DPN や ER α アンタゴニストである ICI の新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響を生じる化学物質は ER α アゴニストに限らない可能性が示唆された。(2) 新生児期に EE あるいは PPT の曝露を受けたラットでは、性周期異常の発現に先行して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出され、遅発影響の発現には排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが重要な役割を持つことが示された。(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。(4) 遅発影響量の EE (20、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の新生児期曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。DPN はごく弱いながら ER α 作用を有することが示された。子宮肥大試験と遅発影響の発現が一致しない場合もあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

A. 研究目的

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

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

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

本研究では、遅発影響の発現機序として特に受容体の役割を明確すること、遅発影響のリスク評価に有用な早期指標を確立することを目指し、(1) **ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響**、(2) **新生児期エストロゲン曝露が LH サージにおよぼす影響**、(3) **ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化**、(4) **遅発影響と子宮肥大試験の関連**について検討を行った。

B. 研究方法

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

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

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

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

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

B-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

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

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

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

B-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

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

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

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

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

B-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

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

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

B-5. 血清ホルモン濃度測定

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

B-6. 遺伝子発現解析

凍結視床下部組織から Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を用いて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応後、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。Kiss1: Rn0071_0914_ml, KISS1 receptor (Kiss1R): Rn0057_6940_ml, FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos): Rn00487426_g1, estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372_ml, estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610_ml。内部標準には GAPDH を用いた。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。

B-7. 統計学的解析

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

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

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

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

C-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

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

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

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

C-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

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

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

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

/膣の組織像、子宮腺の数 (図 5B) に投与による影響はみられなかった。

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

C-4 . 遅発影響と子宮肥大試験の関連

実験 : EE 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では子宮重量が顕著に低下しており、子宮の発達異常が疑われた。遅発影響量である EE 20、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響を認めなかった (図 6)。

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

D . 考察

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

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

早期化に付随する二次的变化と考えられた。

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

D-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験 において、新生児期に EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の曝露を受けた雌ラットでは、加齢ラットと同様に、LH サージピークの低下および視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められ、視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出された。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが新生児期 EE 曝露の標的の一つであることが示唆された。

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

D-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

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

ARC は AVPV より影響を受けにくいことが示唆された。

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

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

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

D-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

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

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

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

EE、PPT、DPN および ICI の性周期への影響と照合すると、DPN や ICI のように子宮肥大試験が弱陽性あるいは陰性であっても EE や PPT と同様に性周期停止の早期化を起こすこともあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

E. 結論

(1) ER β アゴニストである DPN や ER α アンタゴニストである ICI 182,780 の新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響を生じる化学物質は ER α アゴニストに限らない可能性が示唆された。

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

(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。

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

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.
- 2) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Thickened area of external granular layer and

Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1^{+/-} mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.

- 3) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, 39, 775-784, 2014.
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17 α -Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, 93, 32, 2015.
- 5) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Reprod. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.

2. 学会発表

- 1) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod Dhakal, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: **EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響**: 第 30 回日本毒性病理学会 (2014.1)
- 2) 高橋美和: **遅発性影響のメカニズムに迫る-神経内分泌側面から-**: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 3) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod DHAKAL, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: **Ethinyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常**: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 4) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: **ヒト肝細胞キメラマウス(PXB マウス)における卵胞発育不全**: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 5) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 白田賢人, 渡辺元, 吉田緑: **Ethinyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検索**: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 6) 高橋美和, 市村亮平, 井上薫, 森川朋美, 渡辺元, 吉田緑: **17 α -ethynylestradiol (EE) 新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下**: 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology*, **149**, 5219-5226, 2008.
- 2) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure- activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 3) Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol.*, **18**, 399-406, 2004.
- 4) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG440): Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, 2007.
- 5) Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol.*, **172**, 441-448, 2002.
- 6) Robertson JA, Zhang Y, Ing NH. ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **77**, 281-287, 2001.
- 7) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.
- 8) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.
- 9) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, **69**, 265-270, 1983.

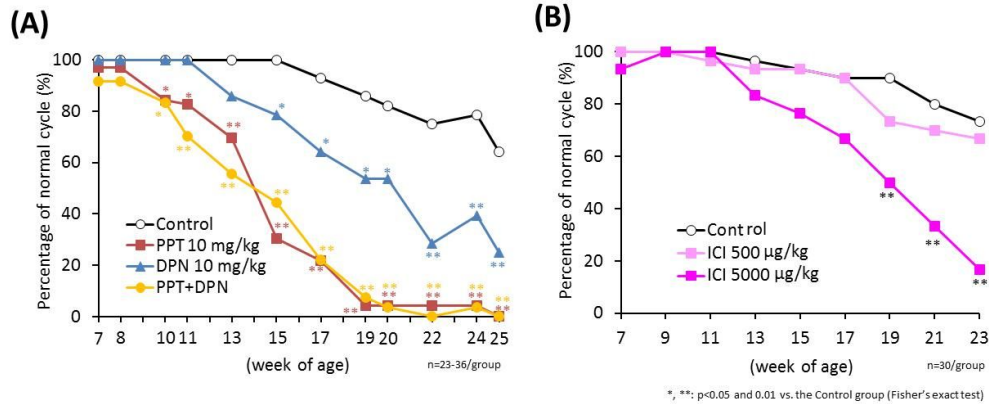


図1. PPTおよびDPN (A)、ICI 182,780 (B) 新生児曝露ラットにおける正常性周期の割合の推移

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

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

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

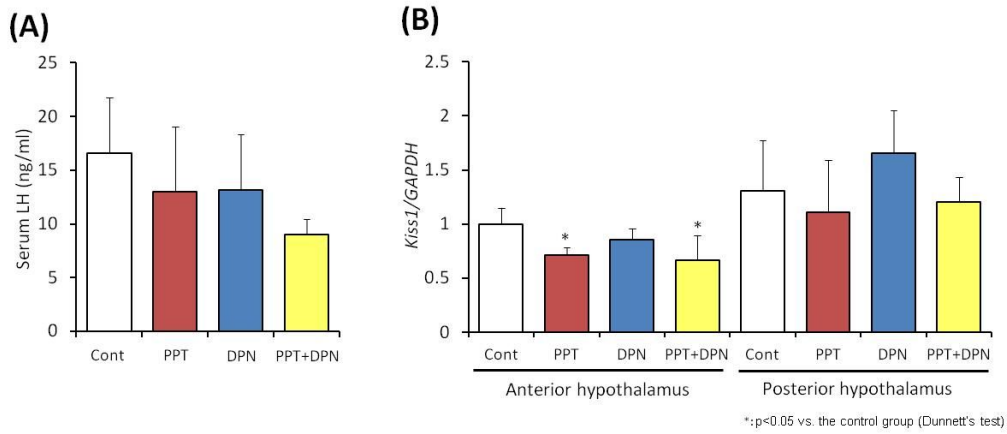


図2. PPTおよびDPNの新生児曝露を受けたラットの発情前期(16:00)における血清LH濃度(A)、視床下部Kiss1 mRNA発現(B)

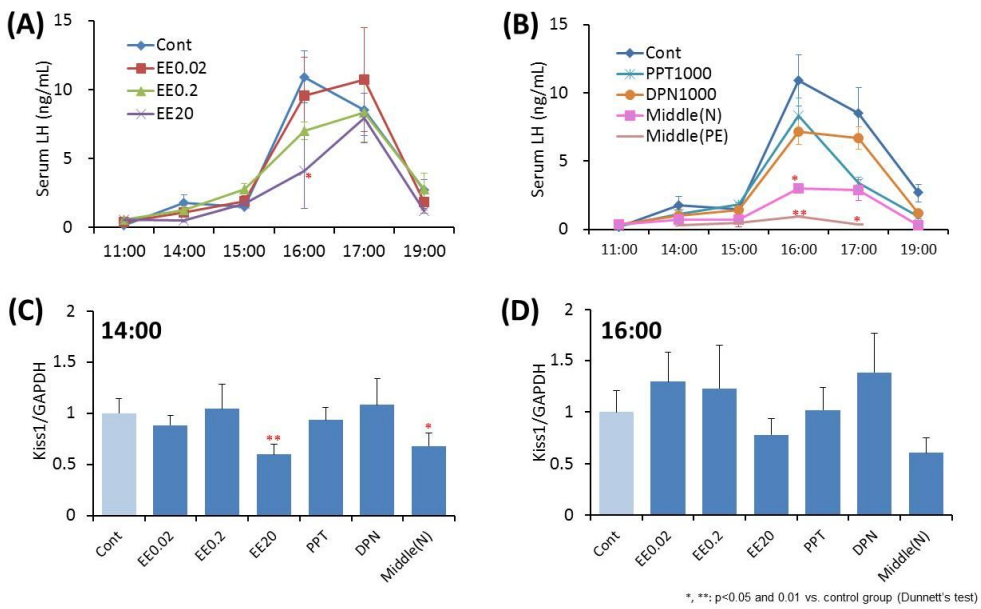


図3. 新生児期エストロゲン曝露ラットおよび加齢ラットにおけるLHサージ(A, B)と14:00(C)および16:00(D)の視床下部前部におけるKiss1 mRNA発現

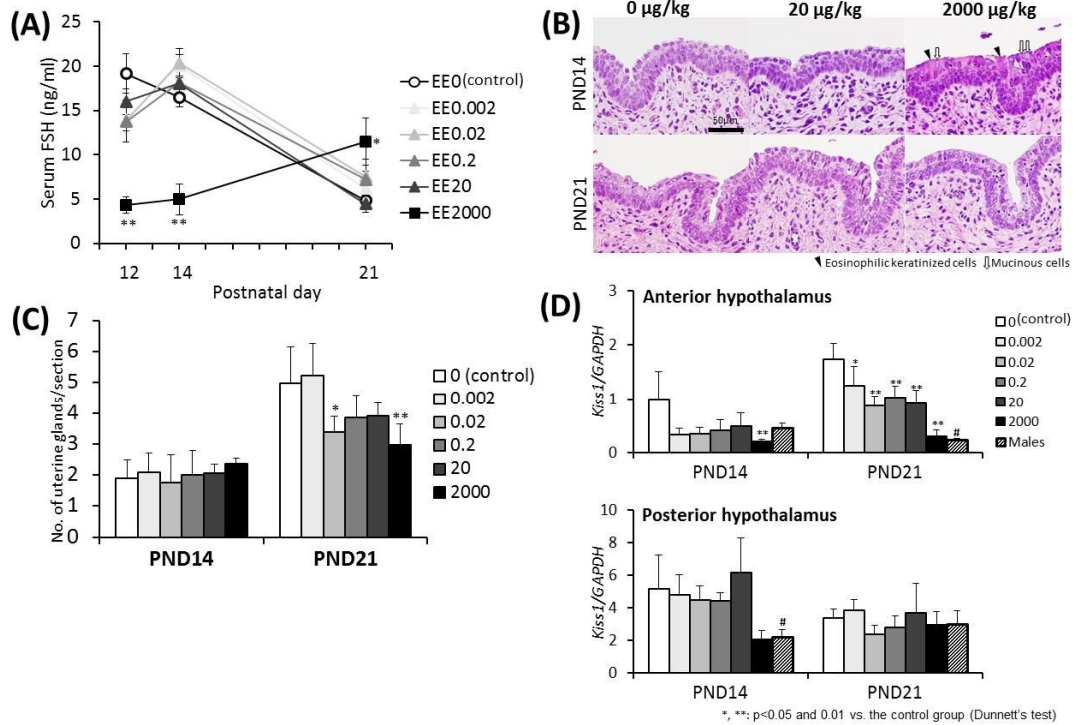


図4. EE新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度 (A)、膣の組織像 (B)、子宮腺の数 (C)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現 (D)

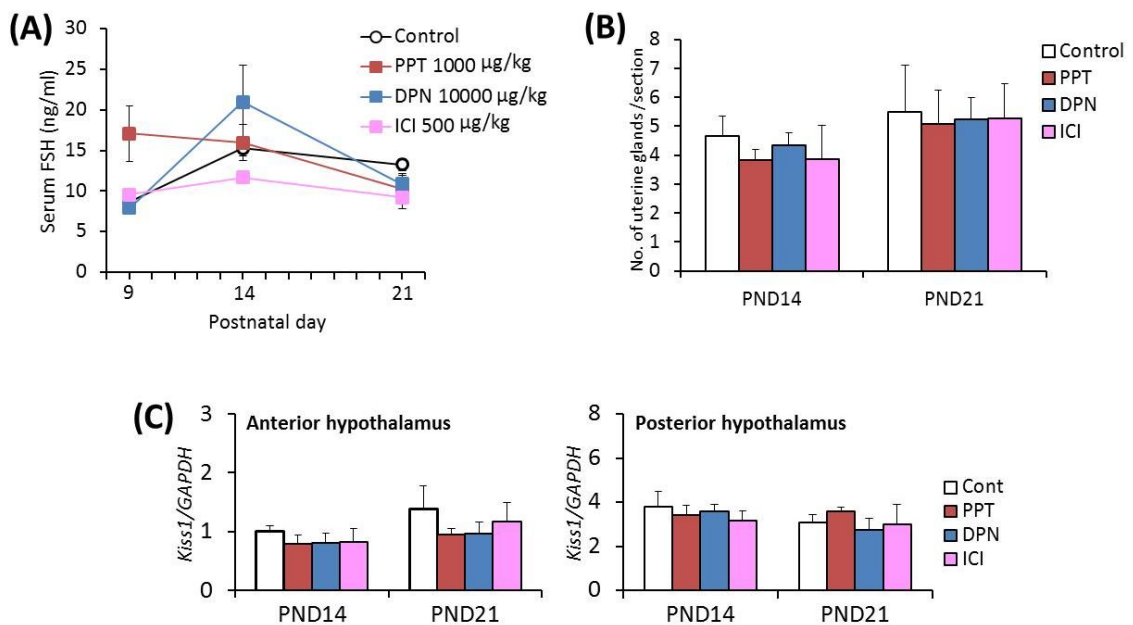


図5. PPT、DPN、ICI新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度 (A)、子宮腺の数 (B)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現 (C)

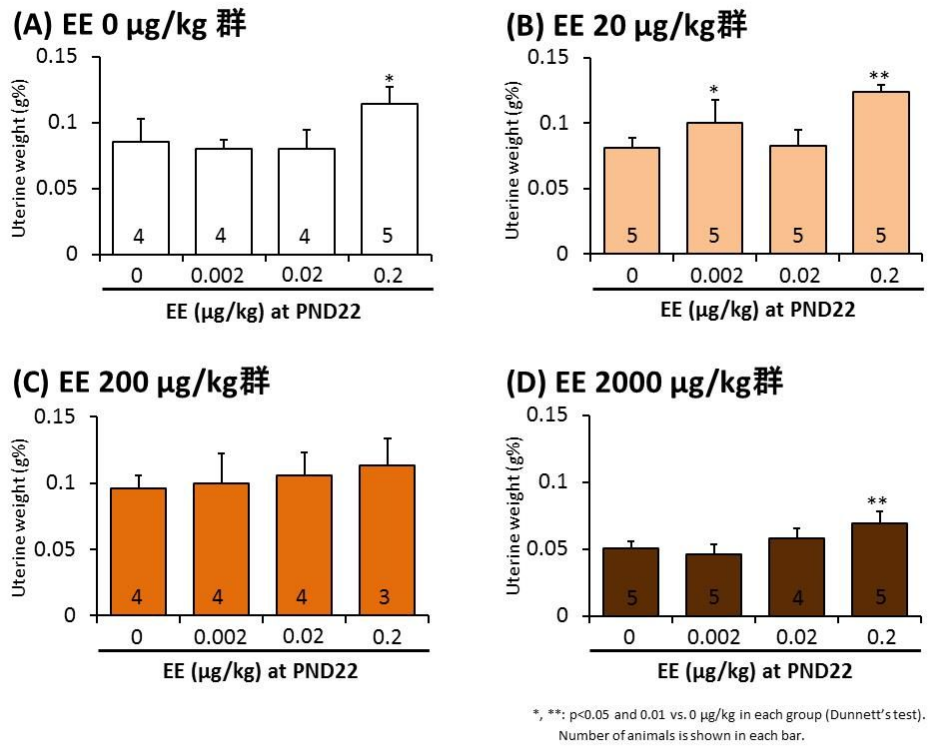


図6. EEの新生児期曝露を受けたラットによる子宮肥大試験

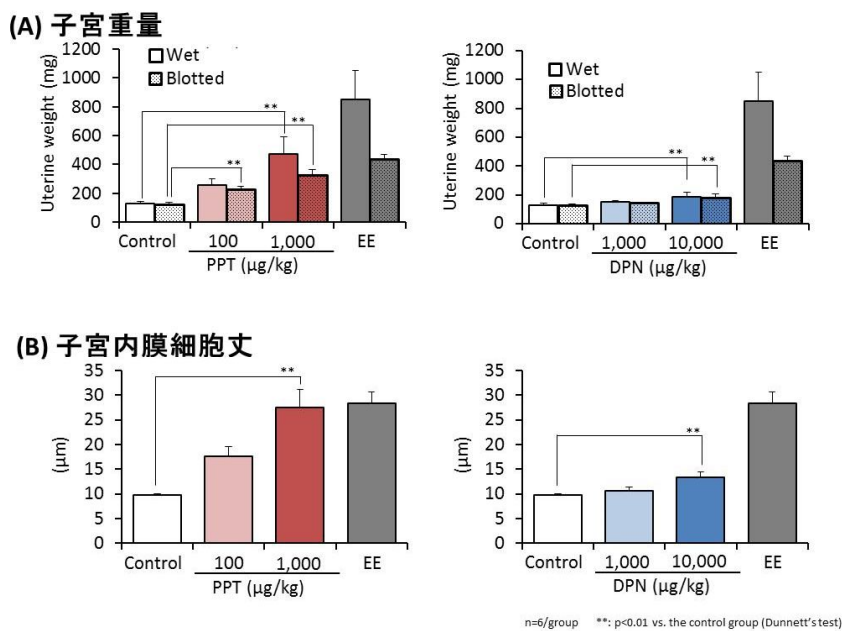


図7. PPTおよびDPNの子宮肥大試験における子宮重量 (A) および子宮内膜細胞丈 (B)

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

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

分担研究課題： 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：	川嶋	潤	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：	森	雅史	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高川	奈帆	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高山	尚大	麻布大学獣医学部
研究協力者：	林	美貴成	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

合成エストロゲン(17 α -ethinylestradiol, EE)をモデル化合物として、脳の性分化臨界期におけるエストロゲン活性物質曝露により生じる遅発影響について閾値となる用量を 27~28 週齢まで探索し、さらに遅発影響の最小影響量検出における評価手法の有効性を検討したところ、1 日齢から EE の 5 日間反復経口投与による遅発影響の最小影響量は卵巣の嚢胞状卵胞保有率を増加させる 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (無影響量 0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) であり、子宮肥大試験では陰性の用量であった。また、この用量を投与した動物を 10 週齢で雄と交配して帝王切開しても、妊娠末期母体重の増加抑制および胎児の発育促進以外に影響は認められず、現行の評価法が遅発影響評価に必ずしも有効ではないことが示唆された。

視床下部におけるキスペプチン(KP)パルス発生部位である弓状核(ARC)を中心に、KP をコードする *Kiss1* 発現と遅発影響との関係を、新生期から検討したところ、無影響量の EE でも新生期 ARC の *Kiss1* mRNA を低下させ、性周期回帰停止を促進する用量ではプラトーに達していることが明らかになった。視床下部 *ER α* mRNA も低下したが性周期早期回帰停止との明確な関係はなかった。10 および 23 日齢では最も発育の進んだ段階の卵胞数が減少し、LH 受容体の発現低下ならびにその下流のステロイドホルモン合成系遺伝子の発現低下が認められたが、血中 E_2 濃度に反映されていなかった。性周期回帰停止前では、これらの遺伝子発現に増加傾向が認められた一方、KP ニューロンは卵巣ホルモンによるフィードバックの減弱を示唆していた。以上の結果から、EE は ARC の *Kiss1* 発現を低下させ、性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を変化させて卵胞発育を抑制し、その後の視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の正常な発達を妨げ、遅発影響をもたらすことが示唆された。

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として用いられている 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てきた。平成 22 年から 24 年度までの研究では、EE の用量あるいは投与日齢と遅発影響との関係を詳細に検討し、EE 投与は原始卵胞の消長に影響を及ぼさないが、性周期の回帰停止をはじめとする遅発影響が出現するまでの期間は EE の用量に逆比例し、成熟雌ラットではエストロゲンの生理的変動幅に相当すると考えられる血中 EE 濃度で、春機発動の遅延が認められ、さら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、性成熟後の性周期回帰停止の促進あるいは乳腺の過形成などの不可逆的な影響が認められることを明らかにした。また、遅発影響の出現時期は EE の用量だけでなく、投与日齢によっても変動し、1 日齢での曝露が 5 あるいは 7 日齢での曝露より早期に遅発影響を出現させることを示した。

本研究では、これまでの研究に基づき、まず、リスク評価に資することを目的として遅発影響の閾値を探索し、さらに現行の評価方法(子宮肥大試験ならびに生殖能力試験)で、遅発影響を検出し得るのかどうかを、最小影響量について検討した(実験 1)。また、EE 投与による遅発影響は視床下部/下垂体/卵巣軸の異常を反映した変化であると考えられることから、投与直後の初発変化を知るために EE が結合して標的遺伝子の発現を制御する *ERα* 遺伝子の視床下部における発現ならびに性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)分泌を上位から直接制御している KP の ARC における遺伝子発現の変化を調べ、さらに KP 受容体の *GPR54*、ならびに *Kndy* ニューロンに局在して KP 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変化を検討した(実験 2)。次いで、視床下部/下垂体/卵巣軸の成立前後の時期

である幼若期について、特に日齢の進行に伴い発育の進んだ卵胞が認められるようになる卵巣の形態および機能の変化を検討した(実験 3)。さらに、春機発動後、性周期の回帰停止前の時期について、視床下部および卵巣の変化を検討するとともに、ARC の *Kndy* ニューロンにより駆動される KP パルスを反映した LH パルス状分泌の変化を検討した(実験 4)。このように本研究では平成 24 年度までに蓄積した EE 曝露と遅発影響との関係に関する知見に基づき、EE 曝露直後から遅発影響出現に至るまでの間の視床下部下垂体卵巣軸の発達を俯瞰して、遅発影響出現のメカニズムを考察した。

B. 研究方法

1. 被験物質の調製

EE (Sigma-Aldrich、純度 98%以上、分子量 296.4) 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

Kiss1 遺伝子の *in situ* hybridization における陰性対照として用いた *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット(*Kiss1*^{-/-})を除き、いずれの実験も日本チャールスリバー株式会社(横浜)より購入した Sprague-Dawley 系ラットを用いた。子宮肥大試験では養母と共に生後 15 日で購入した雌ラットを、生後 21 日に離乳して用いた。その他の実験では、妊娠雌ラット(Crl:CD(SD))あるいは成熟雄ラット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産児を用いた。EE を投与する産児は出生日を 0 日齢とし、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、必要に応じて雄出生児を加えて同腹生児数を 8 匹とした。実

験 1 では上記のほか投与動物を交配試験に供するために、別途購入した成熟雄ラットを用いた。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を用いた。

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。

3. 投与方法

いずれの実験も経口投与した。新生期の経口投与では 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、経口投与した。いずれの実験も対照群にはコーン油 (和光純薬) を 10 mL/kg/day 経口投与した。

4. 投与量

(1) 閾値の探索 (実験 1)

0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の用量で不可逆的影響が認められていることから、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を最高用量に設定し、以下公比 5 で除して、0.016 および 0.0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(2) 子宮肥大試験 (実験 1)

OECD 子宮肥大試験 Phase1 において経口経路でエストロゲン活性が認められ、先行研究において明瞭な遅発影響が認められた 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を最高用量とし、以下公比 25 で除して 0.08 および 0.0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を、22 日齢から 3 日間反復投与した。

(3) 生殖能力試験 (実験 1)

閾値の探索で最小影響量と判断された 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(4) 初発影響の検討 (実験 2)

若齢で性周期の回帰が停止する 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ならびに性成熟後早期に性周期の回帰が停止する 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。また、さらに低用量での初発影響を調べるために、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ および 0.016

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。単回投与後の影響を知るために、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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ あるいは単回皮下投与で遅発影響を誘発することが確認されている 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢に、また 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 5 日齢に単回投与した。

(5) 幼若期の卵胞発育に及ぼす影響の検討 (実験 3)

初回排卵に遅延が認められる 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ および性成熟後比較的早期に性周期の回帰を停止する 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(6) 性周期回帰停止前の時期における視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の変化 (実験 4)

視床下部および卵巣の変化は、春機発動後に性周期を回帰した後に連続発情となる 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を高用量とし 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ も設定した (実験 4-1)。パルス状 LH 分泌の変化の検討は先行研究において 8 週齢で既に異常な性周期を示す動物が増加し、初回排卵に遅延が認められている 0.4 あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を設定した (実験 4-2)。

5. 観察方法

(1) 閾値の探索 (実験 1)

投与前後に一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 26-27 週齢まで実験に供した。その間、以下に示す観察および測定を行った。

(ア) 体重

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、剖検日にも体重を測定した。

(イ) 眼瞼開裂の観察

12 日齢から毎日眼瞼開裂の有無を観察し、両側の眼瞼が開裂した日を眼瞼開裂日として体重を測定した。

(ウ) 腔開口の観察

4 週齢から毎日腔開口の有無を観察し、腔の開口が認められた動物は体重を測定した。

(エ) 性周期の観察

8 週齢から 4 週間に 1 回、2 週間にわたり、毎日腔垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は 25 週齢まで継続し、2 週間の観察期間中に 4-5 日で発情を

回復したものを正常周期に、また、連続した発情休止期が全く観察されなかったものを、連続発情に分類し、発情休止期が14日以上継続したものを無発情に、これら以外をその他に分類した。また、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。

(オ) 剖検

性周期の観察を上記の観察期間終了後も継続し、発情期あるいは発情休止期に剖検した。

剖検に際して、まず動物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)を腹腔内投与(1 mL/kg)し、深麻酔下で採血を行い、その後放血致死させた。剖検では脳、下垂体、卵巣、肝臓、副腎、子宮、乳腺、膣を採取し、一部の動物について下垂体、卵巣、肝臓、副腎および子宮の重量を測定した。また、全例について卵管を採取し、排卵検査を行った。重量測定後、卵巣は、リン酸緩衝ホルマリン液、4%パラホルムアルデヒド(PFA)あるいはブアンでの固定もしくは液体窒素を用いた急速凍結を行い、-50℃で保存した。

(カ) 卵巣組織の観察

固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 μmの厚さで薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定はAcuña [Acuña,2009]に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莖膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

(2) 子宮肥大試験(実験1)

(ア) 投与期間中の観察

一般状態を観察し、膣開口の有無を観察した。体重は投与開始日から剖検日まで毎日測定した。

(イ) 剖検

最終投与24時間後の25日齢に剖検を行った。剖検では、まず動物にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル)を腹腔内投与し、深麻酔下で採血を行い、放血と殺した。卵巣および子宮を膣とともに摘出し、実体顕微鏡下で脂肪を除去した後、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)。また両側卵巣の重量を測定した。

(3) 生殖能力試験(実験1)

(ア) 一般状態、身体的発達の観察および体重測定

投与前後に一般状態を観察し、身体的発達の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た。体重は、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。

(イ) 性周期観察および交配

8週齢から2週間、毎日膣垢を採取して性周期を観察し、上記(1)-(エ)に示したように分類し、集計した。10週齢から生殖能力の確認されている雄と交配し、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。

(ウ) 帝王切開

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。

(エ) 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。

(4) 初発影響の検討(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、*Kiss1* KO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 RNeasy Lysis 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%PFA で還流し、脳を採取した。採取した脳はさらに 4%PFA に浸漬し、冷蔵庫内で一晚固定した。

(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

RNeasy Lysis Solution 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 α 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) および細胞破砕装置用ビーズ (ジルコニア 2.0 ϕ 、トミー精工、東京) とともに入れ、冷却型ビーズ式細胞破砕装置 MS-100R (トミー精工、東京) によって 4000 rpm、4 分で 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) 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 $^{\circ}$ C 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) を添加して攪拌し、12,000 \times g、4 分で 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% エタノールを添加して沈殿物を洗浄し、7,500 \times g、4 分で 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) を添加した。これを 60 分で 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 μ g/mL に調製し、-80 $^{\circ}$ C 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 $^{\circledR}$ 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 $^{\text{TM}}$ 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、ER α 、ER β 、Kiss1、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 κ 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。使用したプロローブおよびプライマーを表 1 に示す。

ARC および AVPA 領域の確認

ブレインマトリックス (Colonal, ASI INSTRUMENTS) を用いて、4%PFA で固定した 6 日齢無処置雌ラット脳から視床下部と中脳の境界から吻側方向に向かって 6 mm 幅の領域を冠状断に切り出した。これを常法に従いパラフィン包埋し、10 μ 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 [Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6 $^{\text{th}}$ ed., Elsevier] を参照して、6 日齢雌における ARC が視床下部の尾側 (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 が約 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* の *in situ* hybridization

まず、6日齢無処置雌ラット脳のARC領域を、20 μm 間隔で10 μm 厚の連続切片とし、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA, USA) を用いる *in situ* hybridization で確認した(図に示さず)。確認の結果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 μm 間隔で10 μm 厚の切片を3枚作製し、*Kiss1* の *in situ* hybridization に供した。*In situ* hybridization 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 in situ* hybridization 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*^{-/-} 雌の脳組織標本を用いた。

視床下部ARCおよびAVPV領域における *ER α* の *in situ* hybridization

上記と同じ条件で pretreatment および protease 処理を行い、*ER α* の *in situ* hybridization 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションを40で150分間行った。

(5) EE 新生期曝露動物の幼若期卵胞発育(実験3)

(ア) 卵巣の採取

卵巣が受容体を介して性腺刺激ホルモンへの感受性を獲得している10日齢にEE投与動物の一部の動物を剖検して卵巣を採取した。残りの動物は21日齢に離乳後、視床下部-下垂体-性腺軸の発達が進み、外来性の性腺刺激ホルモンに反応し自然排卵することが可能となる23日齢に剖検して卵巣を採取した。

10日齢では低温麻酔下で断頭屠殺し、実体顕微鏡下で卵巣を採取した。23日齢ではペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル)の腹腔内投与による深麻酔下で腹大動脈から採血した後に放血致死させ、卵巣および子宮、下垂体を採取し重量を測定した。

採取した卵巣の片側は形態学的解析のために Bouin 液、リン酸緩衝ホルマリン液または4%PFAで固定した後、常法に従ってパラフィン包埋した。対側の卵巣は遺伝子発現解析のために、10日齢では RNA later (Life

Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) 中で保存し実体顕微鏡下でトリミングした後液体窒素中で急速凍結し、23日齢では液体窒素中で急速凍結し、いずれも-80で保存した。

23日齢に採取した子宮および下垂体はリン酸緩衝ホルマリン液で固定した。採取した血液は氷上に静置後、4、3,000 rpm で15分間遠心分離して血清を得た。得られた血清はホルモン測定のために-50で保存した。

(イ) 発育卵胞数の計測

EE投与の卵胞発育に及ぼす影響を知るために、Bouin 固定してパラフィン包埋した卵巣を6 μm 厚の連続切片とし、HE染色を行って発育卵胞数を計測した。計測はすべての切片を対象とし、光学顕微鏡下で観察して卵母細胞の核小体が明瞭に確認できた卵胞を、preantral、early antral ならびに antral に分類しそれぞれの数を計測した。各発育段階の卵胞は、Pedersen & Peters による分類[Pedersen T and Peters H, 1968]でそれぞれ type 4-5b、type 6 および type 7 に相当する。各発育段階の卵胞の代表例を図1に示す。

(ウ) Total RNA の抽出

凍結卵巣からの抽出は、細胞破碎装置用ビーズに「ステンレス $\phi 3.2$ 」を用いた他は、前記(4)-ウ) に記した方法で行った。なお、10日齢サンプルについては3個体分の卵巣を1サンプルとした。

(エ) Real-time RT-PCR

前記(4)-ウ) に記した方法で行った。定量解析の対象には幼若期の卵巣を構成する組織に特異的に発現する卵胞発育関連因子をコードする遺伝子、ならびにステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子を選択した。すなわち、卵母細胞に発現する GDF-9、顆粒層細胞に発現する FSH 受容体 (FSHR)、ER β 、インヒビンの各サブユニット (Inhibin α 、 β A、 β B)、ミューラー管抑制ホルモン (AMH) ならびに莢膜細胞に発現する LH 受容体 (LHR) を選択した。またステロイドホルモン合成経路では莢膜細胞でのミトコンドリアへのコレステロールの取り込みを促進する steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、ミトコンドリアでコレステロールからプレグネノロンの生成を行う cholesterol

side-chain cleavage enzyme (P450_{sc})、さらに細胞質でプレグネノロンを基質としてテストステロンを生成する酵素である3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)およびP450_{c17}、ならびに顆粒層細胞でテストステロンを基質として17 β -estradiol (E₂)を生成するaromataseをコードする各mRNAを定量した。使用したプローブおよびプライマーを表1に示す。

(オ) LHR タンパクの定量解析

タンパク質の抽出

凍結した23日齢の卵巣からRIPAバッファ- (0.1% SDS、1% Trion X-100 / Tris-HCl pH8.0)を用いてタンパク質を抽出した。組織重量1gあたり10mLのRIPAバッファ-を加え、RNA抽出時と同様にビーズ式細胞破碎装置によりホモジナイズした。ホモジナイズ後、Benzonase (Novagen, Madison, WI, USA)を1 μ L加え、氷上で15分間インキュベートした。その後15,000g、4℃で15分間遠心分離し、上清を回収しサンプルとなるタンパク溶液を得た。各サンプルのタンパク溶液はDC Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA)によりタンパク濃度を測定した。

Western Blotting

タンパク質10 μ g分のサンプルに水を加えて5 μ Lに合わせ、2 \times サンプルバッファ-を5 μ L加え100℃で5分間インキュベートした。その後、サンプル溶液の全量をポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL、アトー、東京)にアプライし、ミニスラブ電気泳動装置(AE-6530P、アトー、東京)を用いて20mAで80分間電気泳動した。電気泳動後、セミドライ式プロットング装置(WSE-4020、アトー、東京)を用いて152mAで30分間通電し、PVDFメンブレン(WSE-4051、アトー、東京)にプロットングした。プロットング終了後、メンブレンを0.1%Tween 20入り3%スキムミルクにより室温で30分間ブロッキングした。一次抗体にはanti-LHR(sc-25828、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz, CA, USA)およびanti- β -actin(#4967、Cell Signaling Technology、Danvers, MA, USA)をそれぞれ1:1000に希釈して用い、4℃で一晩インキュベートした。メンブレンを3%スキムミルク入りPBSで洗浄した後、二次抗体にDako

EnVision⁺ System-HRP Labelled Polymer(Dako、Glostrup、Denmark)を1:2000に希釈して用い、室温で1時間インキュベートした。メンブレンを0.1%Tween 20入りPBSで洗浄し、Liminata Forte Western HRP Substrate(Millipore、Billerica、MA、USA)と室温で5分間反応させた後、ImageQuant LAS 4000(GEヘルスケアジャパン、東京)により撮影した。撮影した画像は、バンドの発光強度を画像解析ソフトであるImageJにより測定しタンパク質の発現を定量した。LHRの発現量を β -actinの発現量により補正した、相対発現量により比較を行った。

(カ) 血清中 E₂ 濃度測定

田谷らの方法[田谷ら、1985]に従い、23日齢の血清中 E₂ 濃度をラジオイムノアッセイ(RIA)により測定した。RIAの一次抗体にはG. D. Niswender博士(Colorado State University)から供与された抗 E₂ 血清(GDN#244)を用いた。また、標識ホルモンには¹²⁵I標識 E₂(GEヘルスケアジャパン、東京)、二次抗体には抗ヒツジガンマグロブリンロバ血清(AB200K)をそれぞれ用いた。1、5、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、剖検日にも体重を測定した。

(6) 性周期回帰停止前の時期における視床下部/下垂体/性腺軸の解析(実験4)

(ア) 一般状態の観察

投与前後に一般状態を観察し、21日齢に離乳して12-13週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

(イ) 一般状態の観察(実験4-1)

投与前後に一般状態を観察し、21日齢に離乳して12-13週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

(ウ) 体重(実験4-1)

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、剖検日にも体重を測定した。

(エ) 眼瞼開裂の観察(実験4-1)

12日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた日を開眼日として体重を測定した。

(オ) 膣開口の観察 (実験 4-1)

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(カ) 性周期の観察 (実験 4-1)

8 週齢から 2 週間および 12 週齢から剖検まで、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期は、8 週齢から 2 週間、毎日膣垢を採取して観察し、上記(1)-エ) に示したように分類し、集計した。

(キ) 剖検 (実験 4-1)

12 週齢からの性周期観察において、原則として発情期と判断された動物を剖検に供した。

動物は、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル) 深麻酔下で卵巣および卵管を摘出した後に、4 %PFA による灌流固定を行い、脳は *in situ* hybridization による *Kiss1* 遺伝子および *ER α* 遺伝子の発現解析に供した。子宮、下垂体および卵巣は重量を測定し、右側の卵巣は遺伝子定量解析およびタンパク質解析のために液体窒素を用いた急速冷凍を行い、-80 で保存した。左側の卵巣は組織学的観察に供するために Bouin 液で固定した。

(ク) 卵巣の組織観察

Bouin 固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 μ m 厚で薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定は Acuña [Acuña,2009] に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莢膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

(ケ) Total RNA の抽出 (実験 4-1)

凍結卵巣からの抽出は、細胞破碎装置用ビーズに「ステンレス ϕ 3.2」を用いた他は、前記(4)-ウ) に記した方法で行った。

(コ) Real-time RT-PCR (実験 4-1)

前記(4)-ウ) に記した方法で行った。

定量解析は、(5)-エ) と同じ mRNA を対象とした。また内在性コントロールとして glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を定量し、*GAPDH* mRNA 発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

(サ) LHR タンパクの定量解析 (実験 4-1)

前記(5)-オ) および に記した方法で行った。

(シ) Double-labeled *in situ* hybridization (実験 4-1)

還流固定した脳は、Brain Blocker を用い、AVPV と ARC が含まれる部位を切り出し、パラフィンブロックとした。これをラット脳アトラス [Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed., Elsevier] を参照しながら、AVPV は Bregma 0.12 mm から -0.48 mm の領域を、ARC は Bregma -1.80 mm から -3.24 mm の領域を、20 μ m ごとに 10 μ m 厚で薄切して、各サンプル 3 枚の切片を *Kiss1* 及び *ER α* の *in situ* hybridization に供した。

In situ hybridization は、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) 用に設計されたプローブを用いて行った。その際、pretreatment による煮沸処理は 20 分間および protease 処理は 40 で 15 分間行い、ハイブリダイゼーションは 40 で 150 分間の条件で行った。*Kiss1* の *in situ* hybridization における陰性対照には、*Kiss1*-/-ラットの脳組織を用いた。

標本は光学顕微鏡下で鏡検し、発現陽性細胞数を求めた。

(ス) 実験 4-2

実験 4-1 と同様の日齢に体重を測定し、一般状態、開眼および膣開口の観察を行った。10 週齢にイソフルランによる吸入麻酔下で卵巣を摘出し、その後 1 週間にわたり膣垢像を観察して卵巣の残存がないことを確認した。卵巣は固定保存して形態観察に供した。14 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で右側頸静脈にカニューレを装着し、翌日、装着したカニューレから 6 分間隔で 100 μ L ずつ 2 時間にわたり血液を採取し血清を分離した。得られた血清は、測定まで -20 で保存した。

(セ) LH のラジオイムノアッセイ

血清中の LH 濃度測定は東京農工大学農学部渡辺 元博士(研究協力者)の協力を得て、米国 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット LH の RIA キットを用いて二抗体法により測定した(第一抗体 anti-rat LH S-10、第二抗体抗ウサギ γ グロブリンヤギ血清 #42-99318)。標識抗原は rat LH-I-5 をクロラミ

NT法により¹²⁵Iで標識して使用し、標準物質にはrat LH-RP-1を用いた。測定値は、研究協力者である名古屋大学農学部末村博士博士および上野山賀久博士の下でパルス解析を行い、パルス頻度、大きさ、ピークレベルおよび基底レベルを算出した。

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、分散の一様性を確認して 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. 新生期 EE(反復経口投与による遅発影響の閾値探索)(実験1)

(1) 投与動物の一般状態および体重増加

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(図2A)。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(図2B)。

眼瞼開裂日齢ならびに腔開口日齢にEE投与群と対照群との間で有意差は認められなかった(表2)。

(2) 性周期(図3、4)

0.08 μg/kg/day 群では観察期間全般にわたり発情周期が不規則な変化を示したが、連続発情を示す個体はなかった(図3)。

発情前期および発情期、発情後期および休止期の日数の割合についても EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。また、性周期の平均回帰回数においても EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった(図4)。

(3) 器官重量(表3)

0.016 μg/kg/day 群では、卵巢重量が対照群と比較し有意(P<0.05)な高値を示したが、用量に依存した変化ではなかった。その他の器官については対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

(4) 卵巢の組織学的観察結果(表4)

卵巢における黄体および嚢胞状卵胞の有無を観察した結果、黄体保有率は対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。一方、嚢胞状卵胞が認められた動物の割合は 0.08 μg/kg/day 群で有意に増加した。

2. 幼若雌ラットを用いたEEの経口投与による子宮肥大試験(実験1)

体重推移および一般状態に投与の影響は認められなかった(データは示さず)。

表5に示すように、子宮重量は、2 μg/kg/day 群では対照群との間に有意差(p<0.01)が認められたが、0.08 μg/kg/day 以下の投与群では対照群と同様の値であった。卵巢重量についても、2 μg/kg/day 群の値のみが対照群と比較して有意(p<0.01)な低値を示した。

3. 新生期 EE 投与動物の交配試験および胎児観察(実験1)

(1) 性周期の回帰状況および交配成績

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6)。

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例が2回目の交配適期で交尾した以外はEE投与群を含む全例が1回目の適期で交尾し、全例が妊娠した(表6)。

(2) 妊娠期間中の体重推移

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7)。

(3) 帝王切開所見

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8)。

(4) 胎児所見

表9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、全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。

4. 新生期新 EE 投与後の視床下部初期変化 (実験2)

(1) EE反復経口投与後の視床下部における遺伝子発現

図5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6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が、低下の程度に用量間で差は認められなかった。*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ってい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、対照群との間に有意差は認められなかったが、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7)。

図8に示すように、0.016 µg/kg/day 以上の投与群で用量に依存した *Kiss1* の有意な低下が認められた。対照群との間に有意差は認められなかったが、*ERα* も用量に依存した発現低下が認められた。

(2) 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10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。

(3) 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11および12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13)。

5. 新生児期エチニルエストラジオール曝露が幼若期卵巣における卵胞発育に及ぼす影響(実験3)

(1) 一般状態および発育

一般状態に異常は認められず、体重推移および眼瞼開裂日齢に対照群とEE投与群との間で有意差は認められなかった(図14、表10)。

(2) 23日齢における器官重量(図15)

EE 2 µg/kg/day 群では卵巣が対照群と比較して肉眼でも確認できるほど小さく、卵巣重量および子宮重量は対照群と比較し有意な低下を示した。0.4 µg/kg/day 群では卵巣重量に有意差はみられなかったが、低値の傾向が認められた。子宮重量については1例に高値(40.4 mg)を示す個体が認められたため、平均重量

が対照群と同等のレベルとなったが、この 1 例を除くと、有意差はみられなかったが対照群と比較して低下傾向を示していた。下垂体重量については対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

(3) 発育卵胞数の計測結果 (図 16)

10 日齢の卵巣では early antral 以前の発育段階の卵胞しか認められなかった。対照群と発育卵胞数を比較すると、preantral ステージの卵胞数は同等であったが、それより発育の進んだ early antral ステージの卵胞は、2 µg/kg/日対照群の 65 %程度、0.4µg/kg/day 群でも減少傾向を示していたが、統計学的有意差はみられなかった (図 16A)。

23 日齢の卵巣では 2 µg/kg/day 群の antral ステージの卵胞数が対照群と比較して有意に減少した。一方、それより以前の発育段階にある卵胞数に有意な変化はみられなかった。0.4 µg/kg/day 群では標本破損により 2 例のみの計測となったため統計解析は行わなかったが、各段階の卵胞数が低値の傾向を示した。用量相関性は antral ステージのみに認められた (図 16B)。

(4) 卵巣における卵胞発育関連因子 mRNA の発現 (図 17)

10 日齢卵巣では、LHR mRNA 発現が用量依存的な低下傾向を示し、2 µg/kg/day 群では対照群との間に有意差が認められた。その他の測定項目に有意な変化はみられなかったが、FSHR および ERβ mRNA については 2 µg/kg/day 群で若干の増加傾向が認められた (図 17A)。

LHR mRNA は 23 日齢でも 2 µg/kg/day 群において低値の傾向を示したが対照群との間に有意差はみられなかった。その他の測定項目には対照群と EE 投与群間で有意差はみられなかった (図 17B)。

(5) 卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA の発現 (図 18)

10 日齢の卵巣では、2 µg/kg/day 群で StAR mRNA の発現が有意に低下した。また有意差はみられなかったが、同群において P450scc、3β-HSD ならびに aromatase mRNA が低下傾向を示した。0.4 µg/kg/day 群でも StAR および P450scc mRNA 発現に同様の傾向が認められたが、3β-HSD および aromatase mRNA 発現は

対照群とほぼ同レベルであった (図 18A)。

23 日齢卵巣では、2 µg/kg/day 群において P450scc および P450c17 の各 mRNA 発現が対照群と比較し有意な低値を示した。また StAR および 3β-HSD、Aromatase mRNA についても有意差はなかったが、対照群に対する発現量はそれぞれ約 60、82、69 %と低下していた (図 18B)。

(6) 卵巣における LHR タンパク質の発現 (図 19)

23 日齢卵巣における β-Actin に対する LHR タンパク質の相対発現量が 2 µg/kg/day 群において低下した。

(7) 血清中 E₂ 濃度 (図 20)

23 日齢の血清中 E₂ レベルについて、対照群と EE 投与群との間で有意な差はみられなかった。

6. 性周期回帰停止前の視床下部下垂体性腺軸の変化 (実験 4)

(1) 発育および身体的発達

EE投与群と対照群との間に有意差は認められず、開眼あるいは膣開口の日齢にも投与の影響は認められなかった (データは示さず)。

(2) 性周期の回帰状況 (実験 4)

図21に示すように、8-9週齢で連続発情を示す動物はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、不規則な性周期を回帰する例が EEの用量に依存して増加し、0.4 µg/kg/day群では4-5日で発情を回帰する正常な性周期を示す例はなかった。

(3) 剖検所見および器官重量

表11に示すように、0.08 µg/kg/day群では対照群との間に有意差を認める器官はなかったが、0.4 µg/kg/day群では卵巣および子宮重量が有意な低値を示し、下垂体重量が有意な高値を示した。

(4) 卵巣の組織学的所見

嚢胞状卵胞を有する卵巣の代表的組織像を図22に、また、その保有率を図23に示す。10週齢に採取した卵巣では、0.4 µg/kg/day群における嚢胞状卵胞の保有率は対照群とほぼ同程度であったが、2 µg/kg/day群では5例全例に観察された (図23A)。0.08あるいは0.4 µg/kg/dayを投与して13週齢に卵巣を観察すると、EE投与群では用量に依存して保有率が増加し、0.4

μg/kg/day群では75%の動物に嚢胞状卵胞が観察された。(図23B)

(5) 卵巣における遺伝子発現およびLHR発現

図24に示すように、0.4 μg/kg/day群では発育卵胞の卵母細胞に発現する *GDF-9* (図24A) も、顆粒層細胞に発現する *FSHR* (図24B) およびインヒビンの各サブユニット(図24D-F) ならびに発育卵胞の莢膜およびグラフ卵胞の顆粒層細胞に発現する *LHR* (図24C) のいずれも対照群と比べて発現が増加し、*LHR* についてはタンパク質レベルでも増加傾向が認められた(図25)。0.08 μg/kg/day群では、これらの遺伝子の発現に有意差は認められなかったが、*LHR* mRNA については増加傾向が認められた。

ステロイドホルモン合成にかかわる因子としては、0.08 μg/kg/day群ではコレステロールの動員からプロゲステロン合成の間に働く *3β-HSD* および *StAR* の発現が有意に増加し、0.4 μg/kg/day群ではプロゲステロン合成からエストロゲン合成にかかわる *3β-HSD*、*P450c17* および *aromatase* の発現が有意に増加した(図26A-5E)。

(6) 視床下部における *Kiss1* および *ERα* 発現

図27および図28にはそれぞれARCおよびAVPVにおける *Kiss1* mRNA および *ERα* mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示した。

対照群およびEE投与群において、赤色顆粒で可視化されている *ERα* と青色顆粒で可視化されている *Kiss1* の発現細胞数を数えたところ、ARCでは *Kiss1* 発現細胞数が増加し(図27A)、AVPVでは *Kiss1* 単独あるいは *Kiss1/ERα* 共発現細胞数が共に減少していた(図28A)。

陰性対照とした *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織では、AVPVおよびARCのいずれの部位においても、*ERα* のシグナルである赤色顆粒は認められたが、*Kiss1* のシグナルである青色顆粒は認められなかった(図27Bおよび28B)。子宮では子宮腺に *ERα* のシグナルである赤色顆粒が局在していた(図28C)。

(7) EE曝露動物におけるパルス状LH分泌

図29には血清中LH濃度の個別変動を示し、表12にはパルス解析結果を示す。

いずれの投与群の動物にもLHパルスの発

生が確認されたが、各パラメーターのうち、0.4 μg/kg/day群のAmplitudeが対照群と比べて有意な高値を示した。その他のパラメーターに対照群とEE投与群との間で有意差は認められなかった。

D. 考察

脳の性分化臨界期にエストロゲン活性物質の曝露を受けると、性周期の早期回帰停止や乳腺の過形成等、性成熟後に影響が遅発して現れることを平成24年度までの本研究で明らかにした。本研究では、まずこのような遅発影響に閾値が存在するかどうかを確認した。平成24年度までの研究から、感受性の高い日齢である1日齢に単回投与するより、これを5日間に分割して反復投与する方がより若齢で性周期の回帰を停止することが明らかになったため、閾値は1日齢から5日間の反復経口投与を行って探索することとした。対照群でも性周期が変化し始める25週齢まで観察した結果、0.08 μg/kg/day投与以下の用量では性周期の回帰停止は認められなかった。1日齢にこの用量を単回皮下投与すると、33週齢で発情の回帰を停止する動物が現れてくることから、性周期の早期回帰停止に関する経口投与での閾値は0.08 μg/kg/day付近にあるものと推測される。

一方、0.08 μg/kg/day投与では、27-28週齢の観察で卵巣に嚢胞状卵胞を保有する動物の割合が有意に増加していた。0.016 μg/kg/day以下の用量では嚢胞状卵胞保有率は対照群と同程度であったことから、嚢胞状卵胞の保有に関する閾値は0.016 μg/kg/dayと考えられる。これまでの研究でも性周期の回帰が停止する用量で嚢胞状卵胞の保有率が増加していたが、性周期に著変の認められない用量でも嚢胞状卵胞の保有率が増加することが本研究で明らかになった。その他の観察項目にはEE投与の影響と考えられる変化は認められなかったことから、嚢胞状卵胞の保有率増加が最も低用量のEEで誘発される遅発影響であると考えられる。

嚢胞状卵胞は、加齢に伴い対照群の卵巣にも観察されるようになる。本研究で、閾値の探索以外を目的とした実験で13週齢に卵巣の嚢胞状卵胞の保有率を調べたが、0.08

μg/kg/day は対照群と差のない値であったことから、加齢に伴い増加する嚢胞状卵胞の形成が EE 投与により促進されたものと理解された。

子宮肥大試験は *in vivo* によるエストロゲン活性のバイオアッセイであり、種々の物質がこの試験でエストロゲン活性を評価されている。本研究では 0.08 μg/kg/day の EE で嚢胞状卵胞の保有率が増加したが、この用量を、OECD テストガイドラインに従った幼若雌ラットを用いる子宮肥大試験に適用したが、子宮重量は溶媒を投与した陰性対照と全く変わらず、遅発影響の閾値は子宮肥大試験の閾値より低いことが明らかになった。従って、遅発影響を誘発するエストロゲン活性の検出に、子宮肥大試験は必ずしも有効ではないことが示唆された。

生殖毒性試験では一般的に 10 週齢付近で交配を行って、交尾までの同居日数、交尾率、妊娠率、着床率、胚及び胎児の生存率などから生殖能力に及ぼす影響を評価する。0.08 μg/kg/day 投与を受けた動物は性周期を回帰しているため、生殖能力を確認した結果、交尾、および妊娠率に影響は認められなかった。また、黄体数も対照群と同様であったことから、この時期の排卵数は正常であったと考えられる。従って、嚢胞状卵胞を形成する用量でも少なくとも若齢では生殖能力には異常のないことが確認された。しかし、胎児胎盤重量が母体重に反映される妊娠末期における母体重増加が EE 投与群で低下していた。胎児の外表および骨格に異常は認められなかったが、EE 投与群では胎児体重が有意に増加し骨化の促進が認められた。これらの成績は、EE 投与群における胎児の発育促進と母体重の増加抑制を示唆するものである。胎児の発育促進は通常は悪影響とはされないが、母体重の増加が抑制されている中での発育促進については、母動物のエネルギー代謝などへの影響の可能性も排除できない。本研究では生殖内分泌を中心に検索を行ったため、一般毒性的観点からの詳細な解析は行わなかったが、卵巣に形態学的変化を生じさせる用量の EE が、妊娠期間中の全身状態に影響を及ぼす可能性があるかどうかは今後検討する必要がある。

閾値探索の研究から明らかになったように、新生児期の EE 投与は生殖内分泌機能に対する加齢性の変化を促進していることが伺える。EE は ER への結合を起点として、標的とする遺伝子の転写を調節しているものと考えられる。本研究では、脳の性分化、すなわち性成熟後の性腺刺激ホルモン分泌パターンを決定する時期に限定して EE を投与したことから、性腺刺激ホルモン分泌を制御する GnRH を分泌する視床下部における初発影響を検索した。検索の対象には、EE と直接結合する ERα と ERβ ならびに GnRH を上位から直接制御している KP とその受容体である GPR54 を選択した。また、ARC におけるパルスの発生に関与しているニューロキニン B およびその受容体ならびにダイノルフィンとその受容体も解析対象に加え、これらをコードする遺伝子の発現を定量解析した。その結果、最も顕著な変化は、視床下部における *Kiss1* 遺伝子の発現低下であった。*Kiss1* は KP をコードする遺伝子であるが、1 日齢における単回投与でも 24 時間後には視床下部の *Kiss1* 発現が低下し、これには EE との結合により標的遺伝子の転写を調節する ERα の発現低下を伴っていなかったことから、*Kiss1* 発現低下が初発影響の一つであると考えられる。

雌動物では KP は ARC と AVPV の両神経核に局在するが、AVPV では春機発動が近くなるまで発現が増加することはないと報告されている。本研究で行った *in situ* hybridization でも 6 日齢の AVPV に *Kiss1* は発現していないことが確認された。さらに ARC では EE 投与群における発現細胞の減少が確認されたことから、EE 投与による *Kiss1* の発現低下は ARC に限定された変化であると考えられる。従って、新生期 EE 投与による初発変化は ARC における *Kiss1* の発現低下と考えられる。

Kiss1 の発現低下は、性周期の早期回帰停止をもたらす用量では用量間で差の認められないレベルまで低下していたが、嚢胞状卵胞の形成を促進させる用量以下では用量反応関係が認められた。遅発影響に関する無影響量である 0.016 μg/kg/day でも対照群との間に有意差が認められ、無影響量は得られなかったが、投与動物の体重を考慮すると、閾値は 1 日あたりフェムトモルレベルの経口摂取と推測さ

れ、この時期は外来性エストロゲンに対して極めて高い感受性を有していることが明らかになった。

反復投与後の視床下部では、用量に依存した $ER\alpha$ の発現低下も認められた。 $ER\alpha$ は 6 日齢でも ARC および AVPV のいずれにおいても発現している。しかし、in situ hybridization ではいずれの神経核でも $ER\alpha$ の発現に投与の影響は認められなかった。 $ER\alpha$ の発現低下は視床下部より上部の領域では認められなかったことから、部位は特定できなかったが、視床下部に限定された変化であることは明らかである。

EE は $ER\alpha$ 遺伝子の転写を促進することが知られているが、投与 24 時間後の視床下部では発現が低下していた。0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の反復投与でも低下傾向が認められているにもかかわらず、1 日齢の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与では対照群あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と同等の発現量であったことから、 $ER\alpha$ の発現低下は、反復投与によりダウンレギュレーションが作動したものと推測された。

KP の受容体である $GPR54$ あるいは EE が結合するもう一つの受容体である $ER\beta$ については視床下部での発現に EE 投与の影響は認められなかった。一方、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。 $Kiss1$ にみられた顕著な発現変化ではないが、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と考えられる。GnRH パルスの発生開始時期は明らかではないが、10 日齢前後に持続的に上昇する血中性腺刺激ホルモン濃度に影響を及ぼす可能性は否定できない。実際、本研究で EE 投与群の 10 日齢および 23 日齢における卵胞に遅滞が認められた。LHR の発現も低下し、また、LH により刺激されるステロイドホルモン合成系の酵素遺伝子も発現が抑制されていた。これらの事実を合わせると、EE はキスペプチンパルス発生部位である弓状核 Kndy ニューロンに対して、まず GnRH パルスの発生に抑制的に作用し、その結果性腺刺激ホルモン分泌が低下し、

幼若期の卵胞発育が遅滞し、平成 24 年度までの研究で報告したように、初回排卵が遅延するものと考えられる。

初回排卵を経て、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でも不正ながら性周期を回帰している 12-13 週齢に視床下部 ARC および AVPV における $Kiss1$ の発現を調べると、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では対照群と同様の発現であったが、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では ARC における発現が増え、AVPV における発現が低下していた。成熟動物で AVPV の KP は卵巣からの性ステロイドによる正のフィードバックを受け、ARC は負のフィードバックを受けていることから、観察された変化は卵巣からのフィードバックの減弱を示唆するものと考えられる。実際、この群では子宮重量が低下し、血中エストロゲン濃度の低下が示唆される。しかし、卵巣では、LHR およびステロイドホルモン合成系の遺伝子に発現増加が認められている。これは、ステロイドホルモンの合成促進よりむしろ卵巣組織の構成成分が変化したことによるものと考えられる。すなわち、この群の卵巣では既に 75% に嚢胞状卵胞が観察されまた、黄体が減り、卵巣組織に占める卵胞の割合が大きくなっている。そのため、発育卵胞に発現する $GDF-9$ 、あるいは顆粒層細胞に発現する $inhibin-\alpha$ も含めて発現が増加したものと考えられる。

0.4 あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の EE を反復投与して発情の回帰停止前に卵巣を摘出して 14 週齢で頻回採血を行って LH パルスを調べた。その結果、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でパルスの Amplitude が対照群と比べて有意に増大し、パルス発生部位である ARC における $Kiss1$ の発現と一致する結果となった。2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では Amplitude は対照群と同様であったが、平均の LH 濃度が低下の傾向を示していた。LH パルスの変化に必ずしも EE の用量に応じた変化が認められなかったのは、性周期の回帰停止時期の違いによるものかもしれない。

以上のように本研究では EE 投与直後から新生期、幼若期、性周期回帰停止前と時期を分けて、視床下部 / 下垂体 / 卵巣軸の変化を検索した。性周期回帰停止は AVPV における KP の放出停止による変化であるが、初発影響は ARC における $Kiss1$ の発現低下であることが明らかになった。エストロゲン N 活性に対

して極めて感受性の高い *Kiss1* の発現低下を起点として、幼若期には卵胞発育を遅滞させて初回排卵の遅延が起こり、性周期の回帰が始まると、既に報告されているように性腺刺激ホルモンサージが低くなり、排卵を逃れた卵胞が嚢胞状になって卵巣に残存していくものと考えられる。このように新生期 EE 投与は、視床下部下垂体性腺軸の正常な発達をかく乱することにより、遅発影響をもたらすが、閾値が存在することが本研究より明らかになった。

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 17 α -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 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738

2. 学会発表

- 1) 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ゲン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、高松市)
- 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)
- 4) Shirota, M., et al. Gonadotropin-independent follicle development in the *Kiss1*^{-/-} 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ロ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-Ozuysal 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, Aruldhas 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 α and estrogen receptor β 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, Diaz-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, Shiota 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, Shiota 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 α -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 α -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 Pepling 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 α , and ER β 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 17 β -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 α -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 dichlorodiphenyl -trichloroethane. *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, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof 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, Shiota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague–Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)
- Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shiota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Science* 37, 681-690 (2012)
- Shiorta M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shiota K. Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125, 85-94 (2003)
- Shiorta M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shiota 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)
- Shiorta M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Ederly 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 α -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)

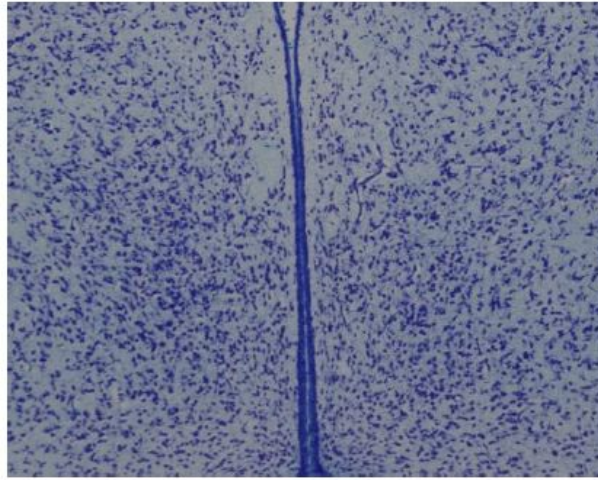
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15, 795–803 (2009)
- Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing 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 α -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 β . *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, Shiota M, Kamiie J, Shiota 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.



B.

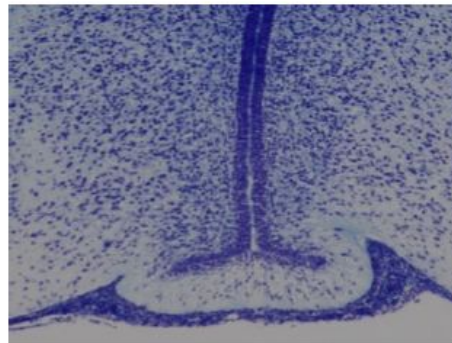
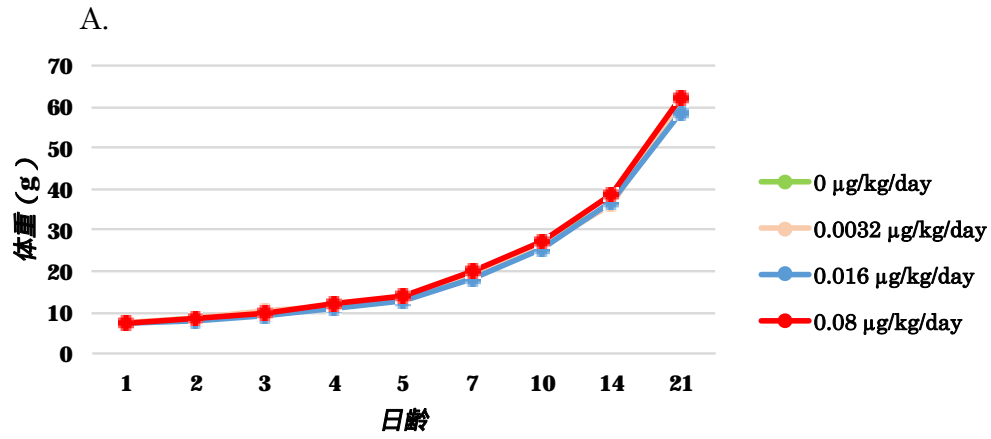


図 1

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



B.

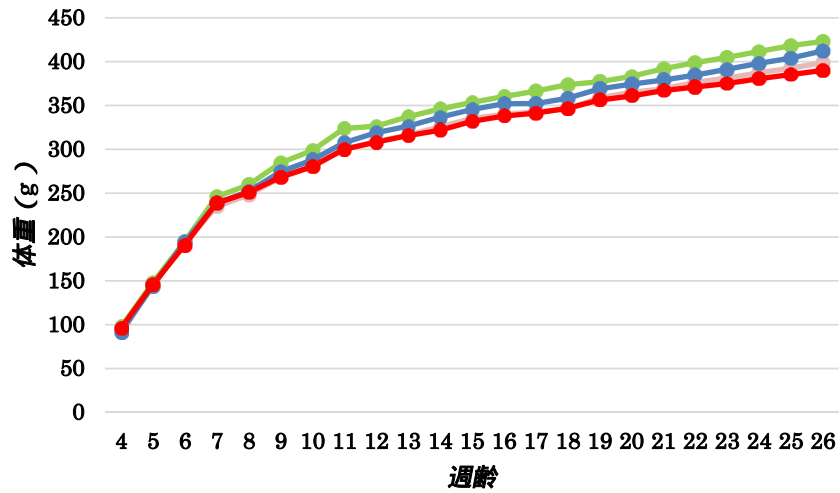
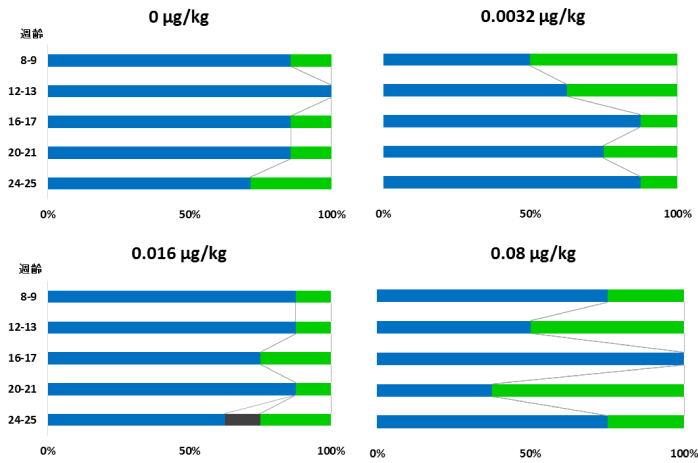


図2 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの離乳前(A)および離乳後(B)の体重推移



■ Frequency of animals revolving estrus at 4 to 5-day intervals
 ■ Frequency of animals revolving estrus at irregular intervals

図3 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの25週齢までの性周期

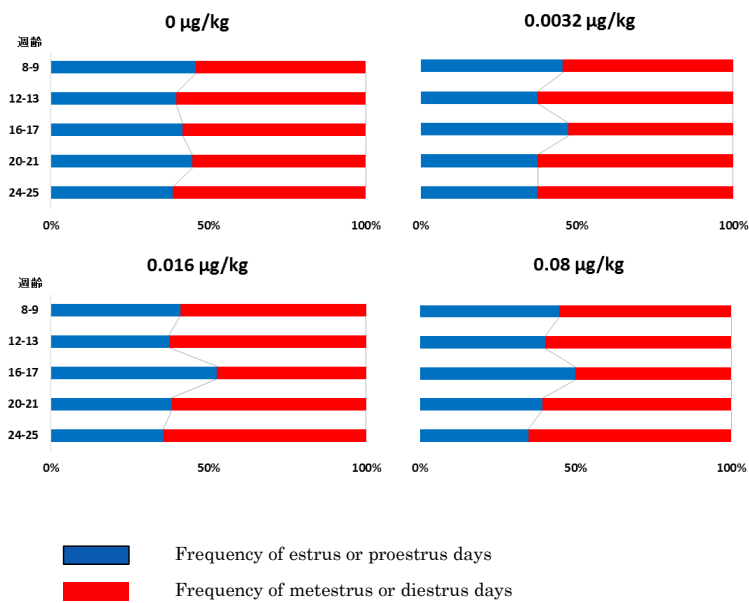
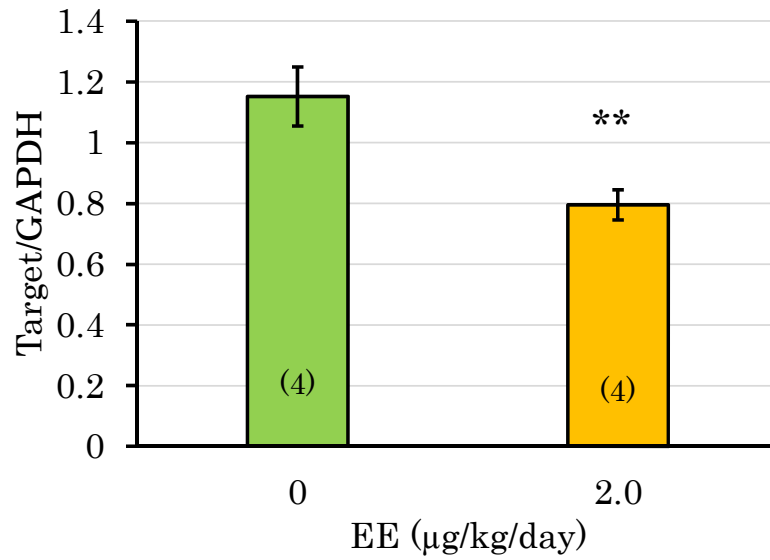


図4 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの発情期あるいは発情前期の割合

A. 視床下部



B. 上部領域

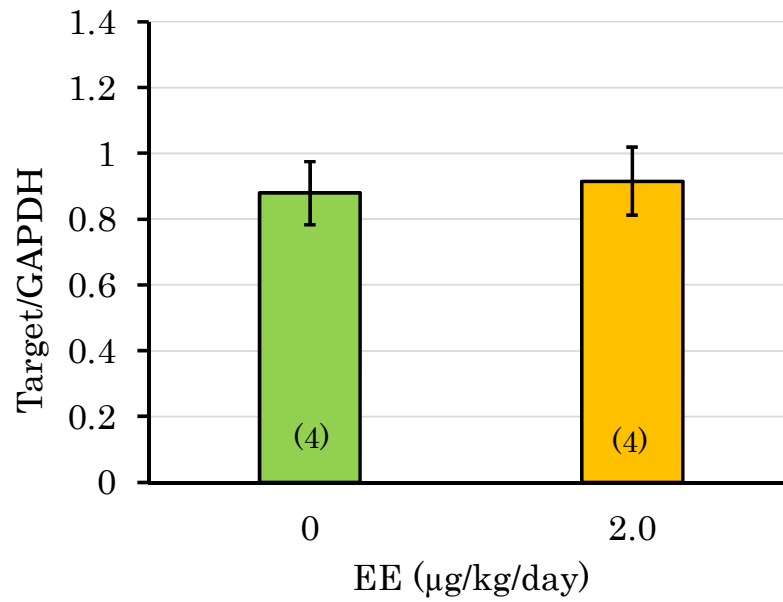
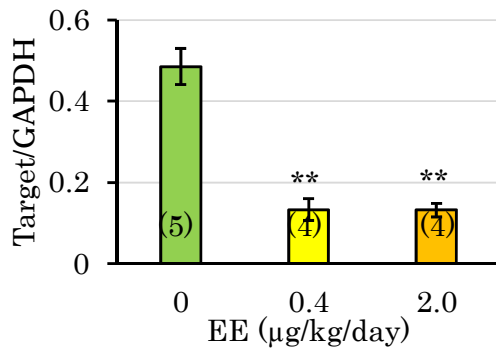


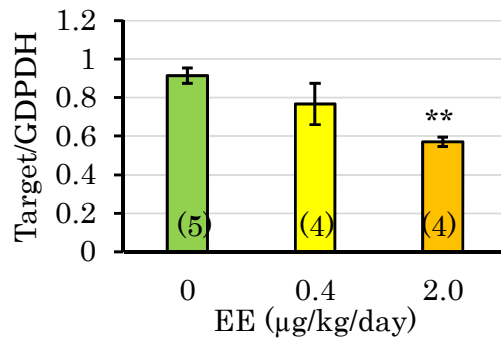
図 5

1 日齢から 5 日間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 ± 標準誤差, (N)). **P<0.01

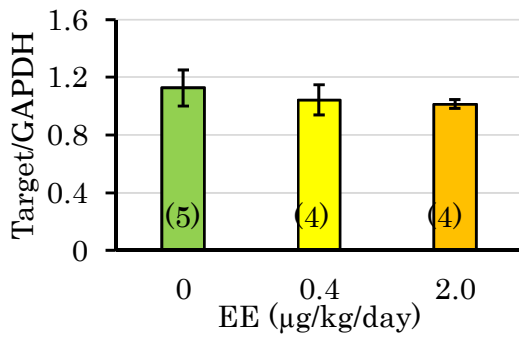
(A) *Kiss1* mRNA



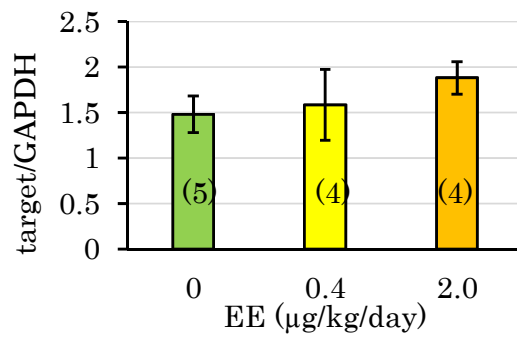
(B) *ERα* mRNA



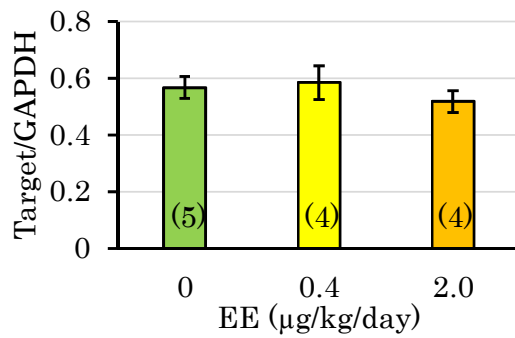
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Oprk1* mRNA



(E) *Tac2* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

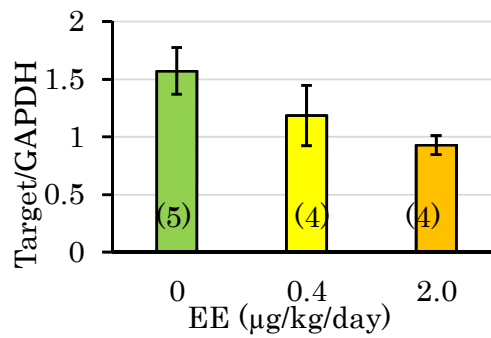


図 6

1 日齢から 5 日間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(*Kiss1* (A)、*ERα* (B)、プロダイノルフィン (*Pdyn*) (C)、その受容体(オピオイド受容体)をコードする *Oprk1* (D)、ニューロキニン B をコードする *Tac2* (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 ± 標準誤差, (N)), **P<0.01

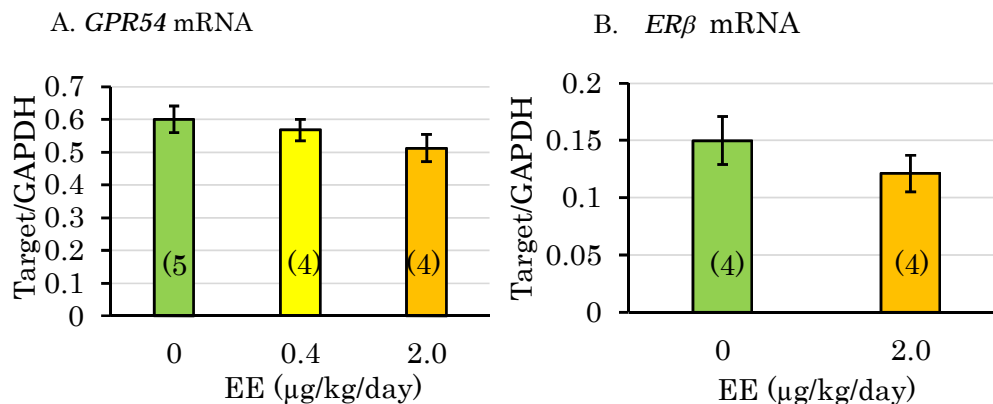


図 7

1日齢から5日間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 (N,平均 ± 標準誤差)

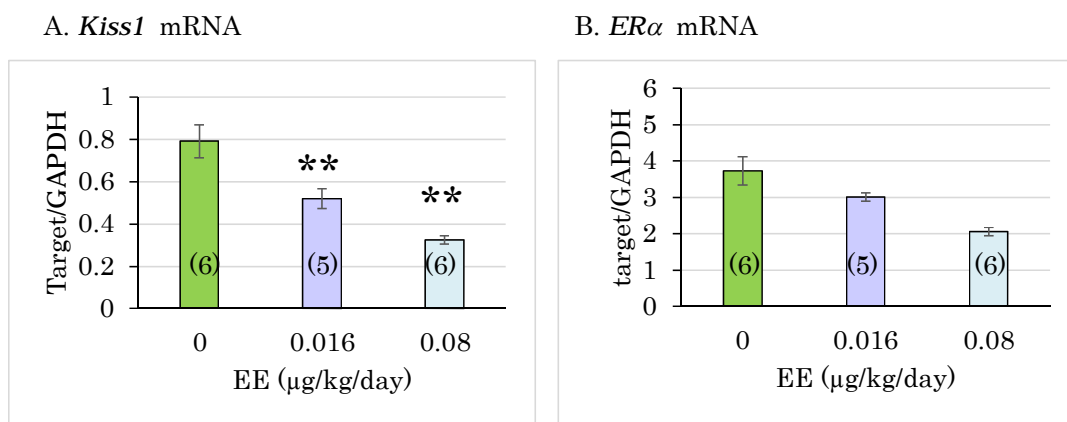
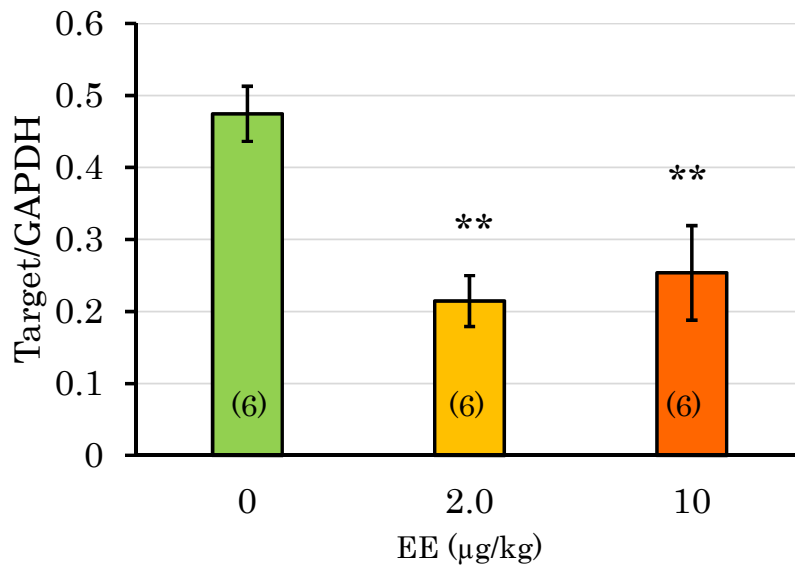


図 8

1日齢から5日間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 *Kiss1* mRNA (A)および *ERα* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± 標準誤差, (N)), **p<0.01

A. *Kiss1* mRNA



B. *ERα* mRNA

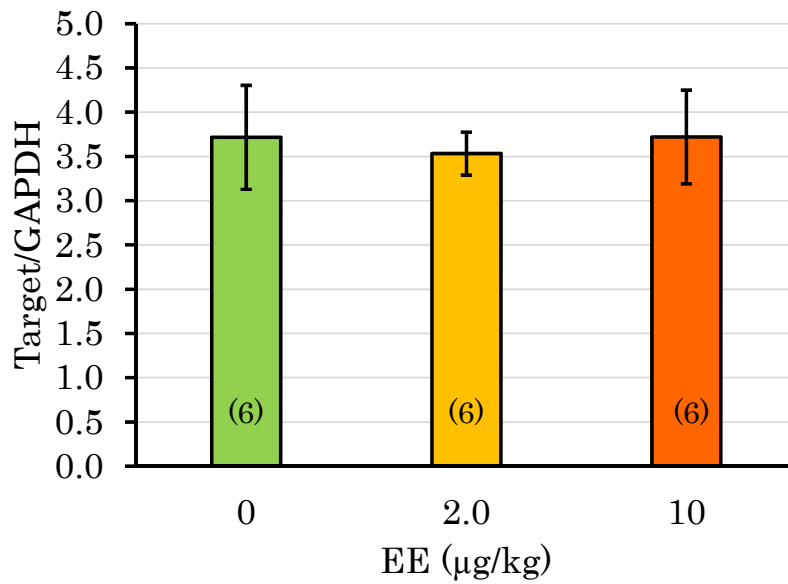
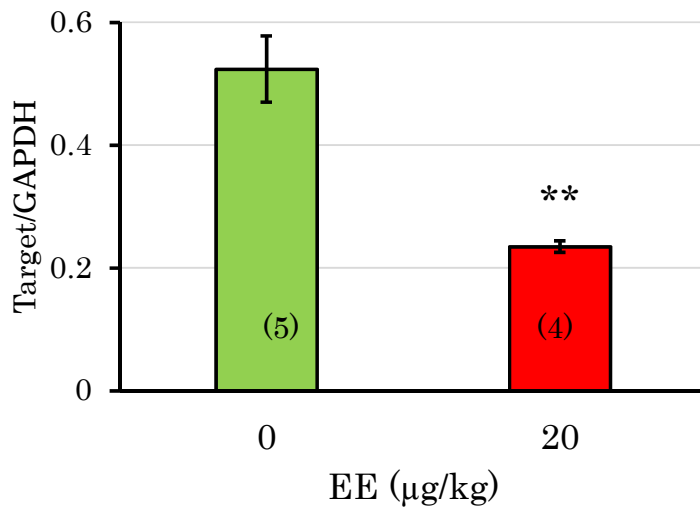


図 9

1 日齢に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 *Kiss1* mRNA (A)および *ERα* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± 標準誤差, (N))。 **P<0.01

A. *ERα* mRNA



B. *Kiss1* mRNA

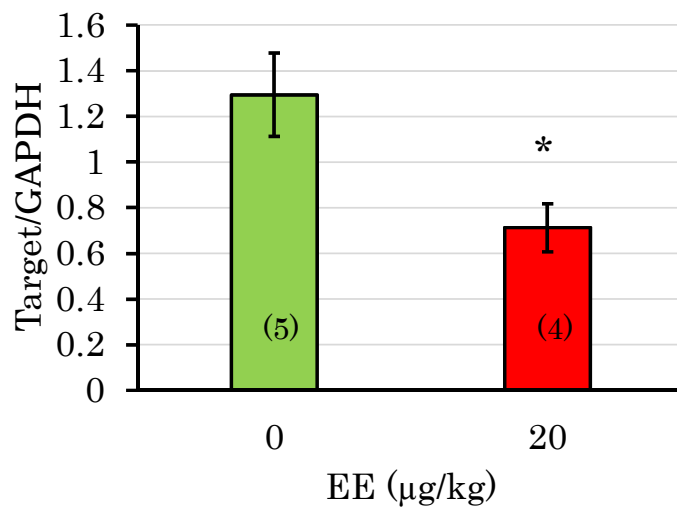


図 10

5日齢に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 *Kiss1* mRNA (A)および *ERα* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± 標準誤差, (N))

*または** $P < 0.05$ または 0.01

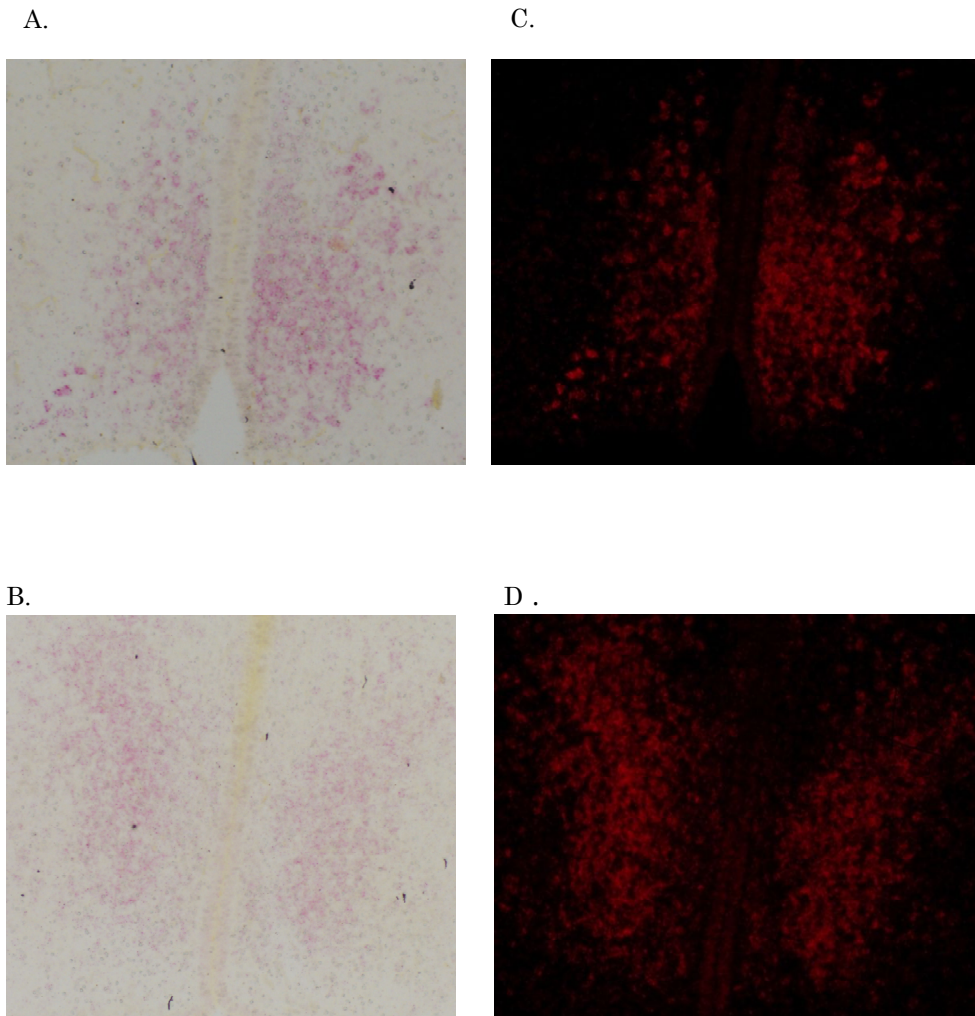
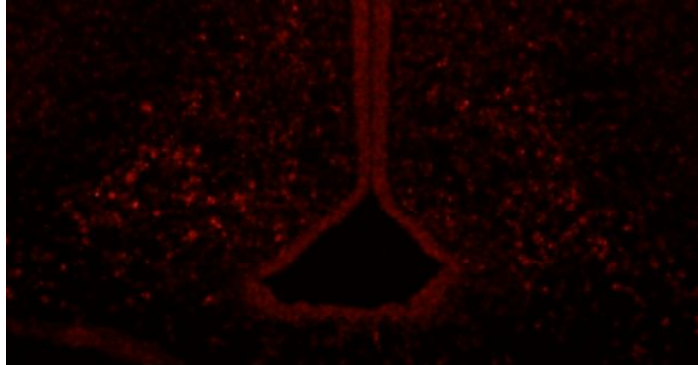


図 11

1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$ mRNAの発現

コーン油を投与した対照群(AおよびC)ならびに $2\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(BおよびD)の明視野(AおよびB)および暗視野(C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。

A.



B.

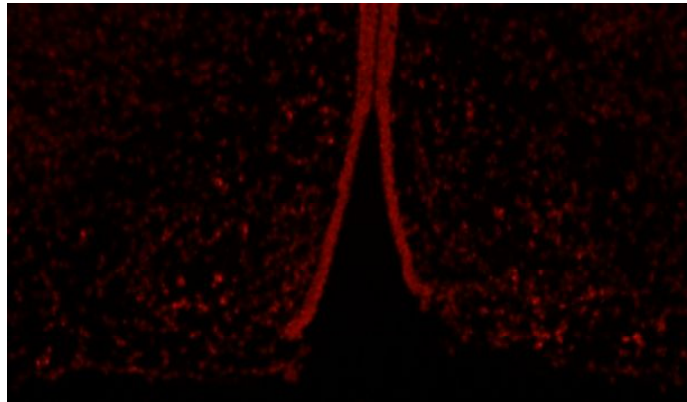
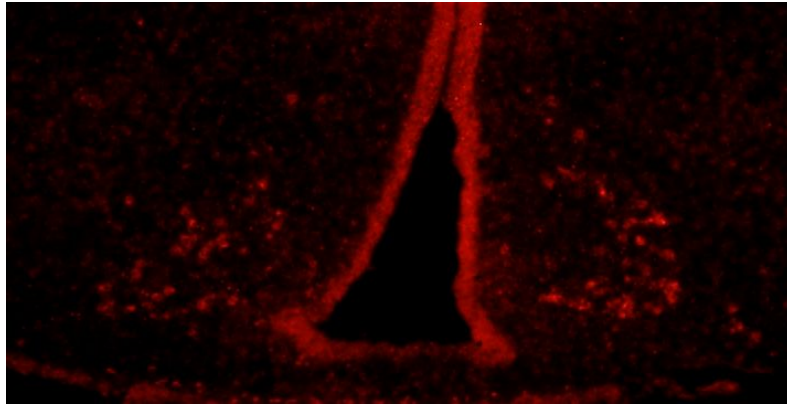


図 12

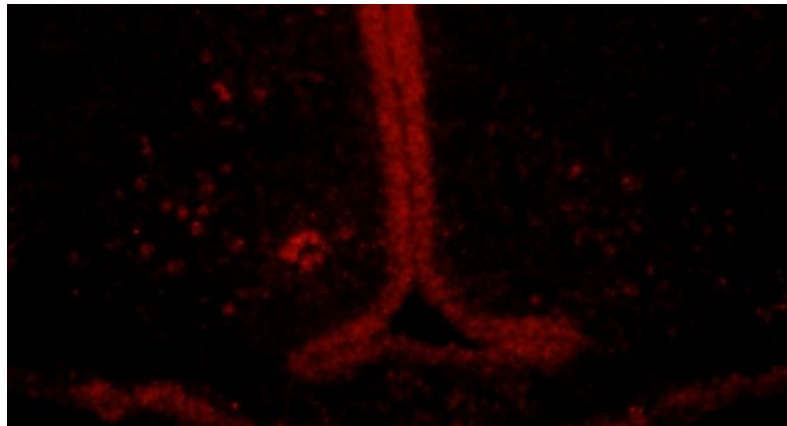
1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した6日齢雌ラットのARC領域における $ER\alpha$ mRNA の発現

コーン油を投与した対照群(A)ならびに $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(B)の暗視野像で、 $ER\alpha$ mRNA は赤色蛍光として認められる。

A.



B.



C.

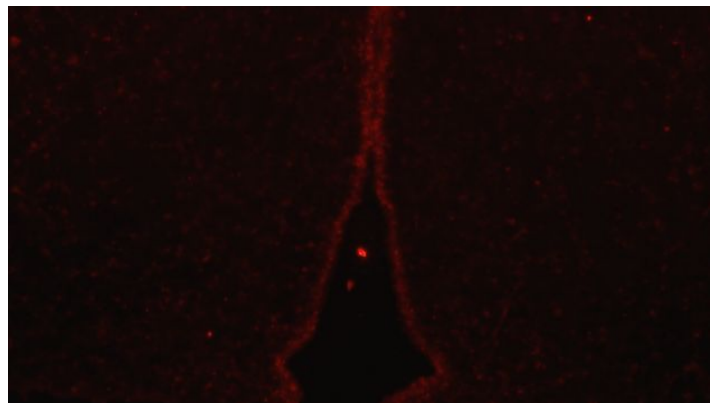


図 13

1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した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* mRNA の発現
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。

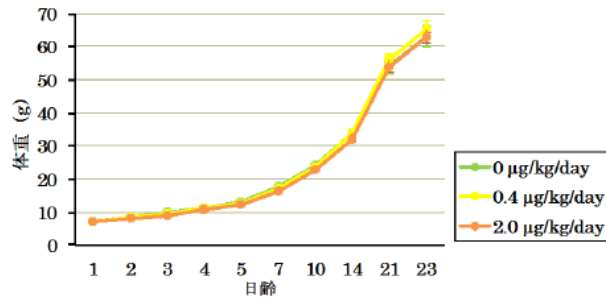


図 14
1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの 23 日齢までの体重推移

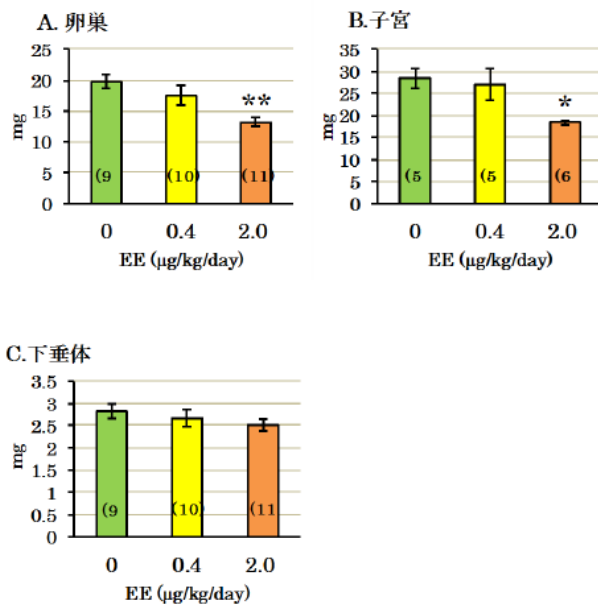


図 15
1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの 23 日齢における器官重量 (平均±標準誤差, N)。**p<0.01

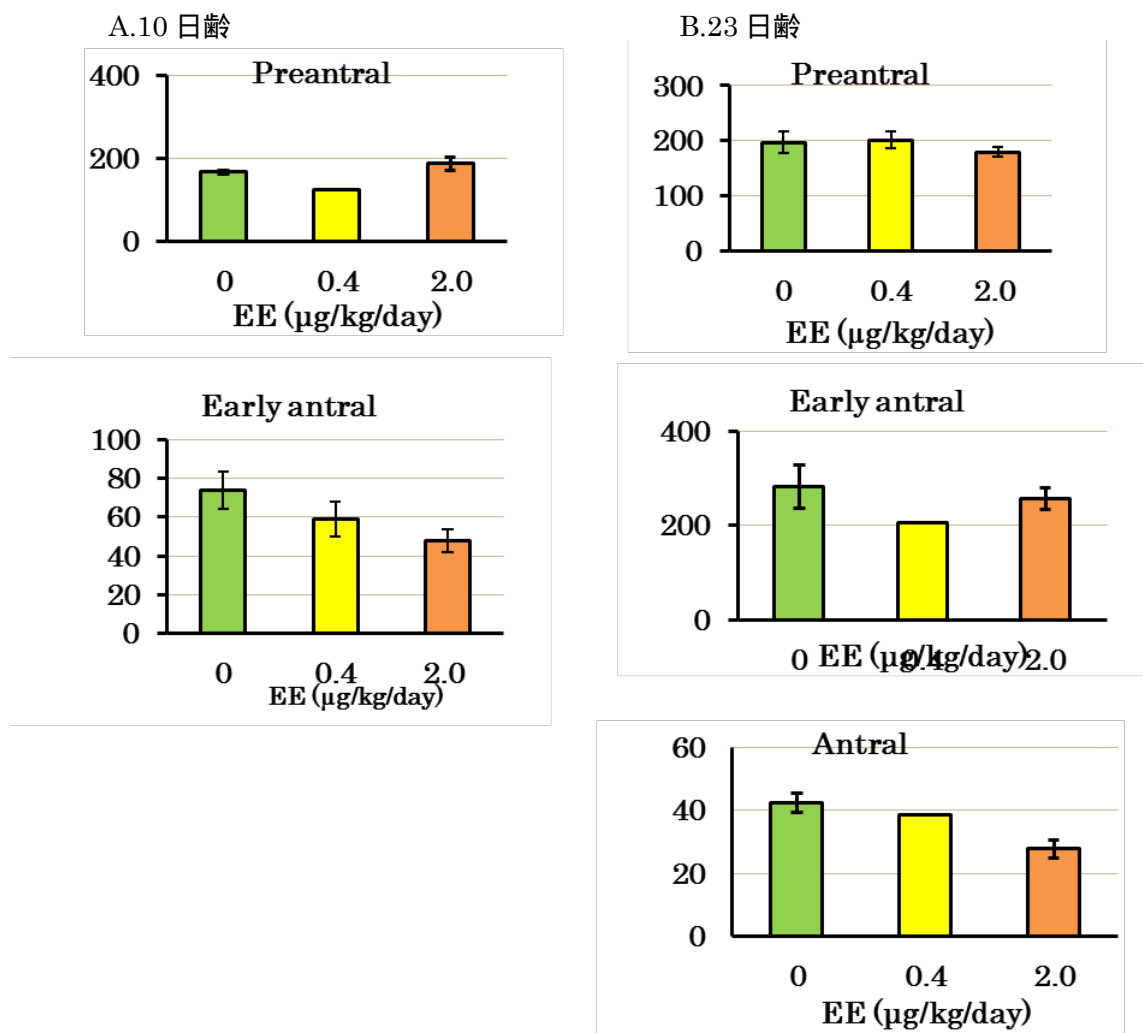


図 16
 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの雌ラットの
 10日齢あるいは23日齢の卵巣で数えられた発育卵胞数(平均±標準誤差, N)

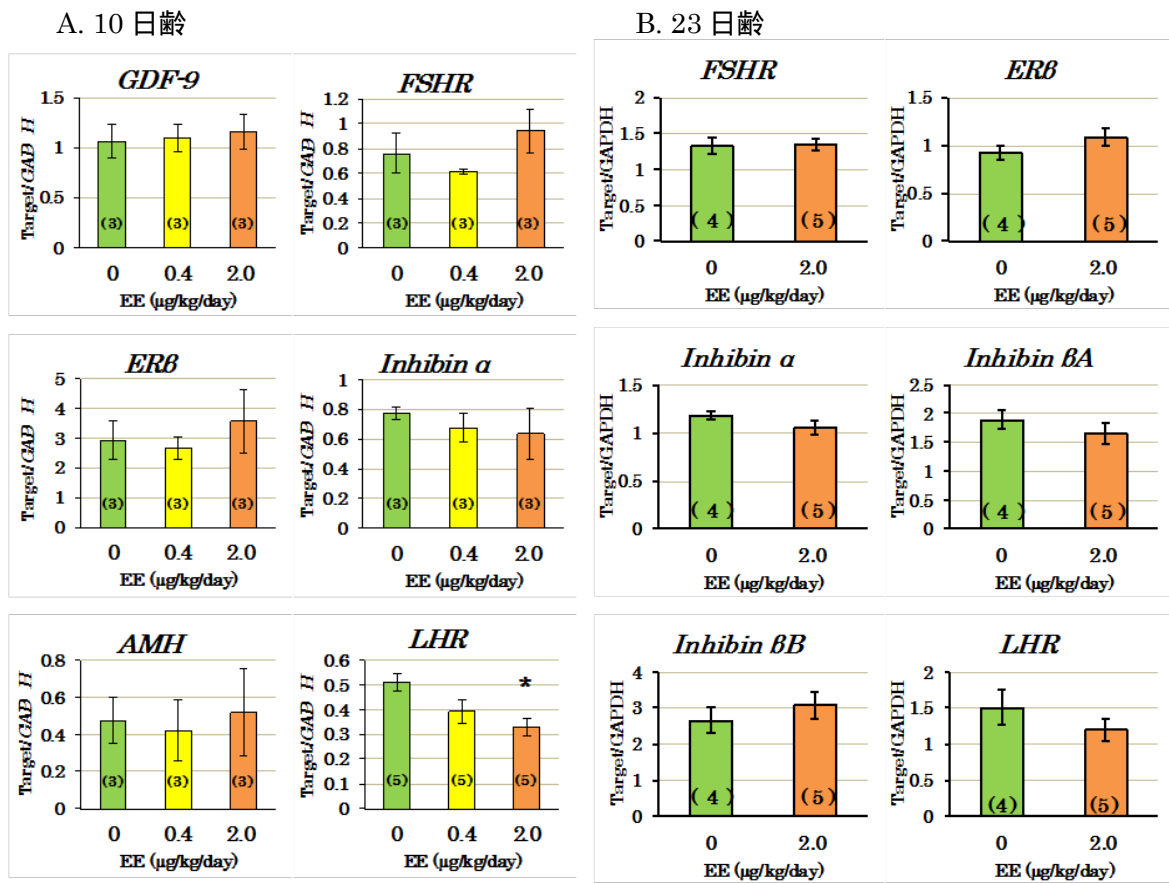


図 17

1 日齢から 5 日間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雌ラットの 10 日齢 (A) あるいは 23 日齢 (B) の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (平均 \pm 標準誤差, N). * $p < 0.05$

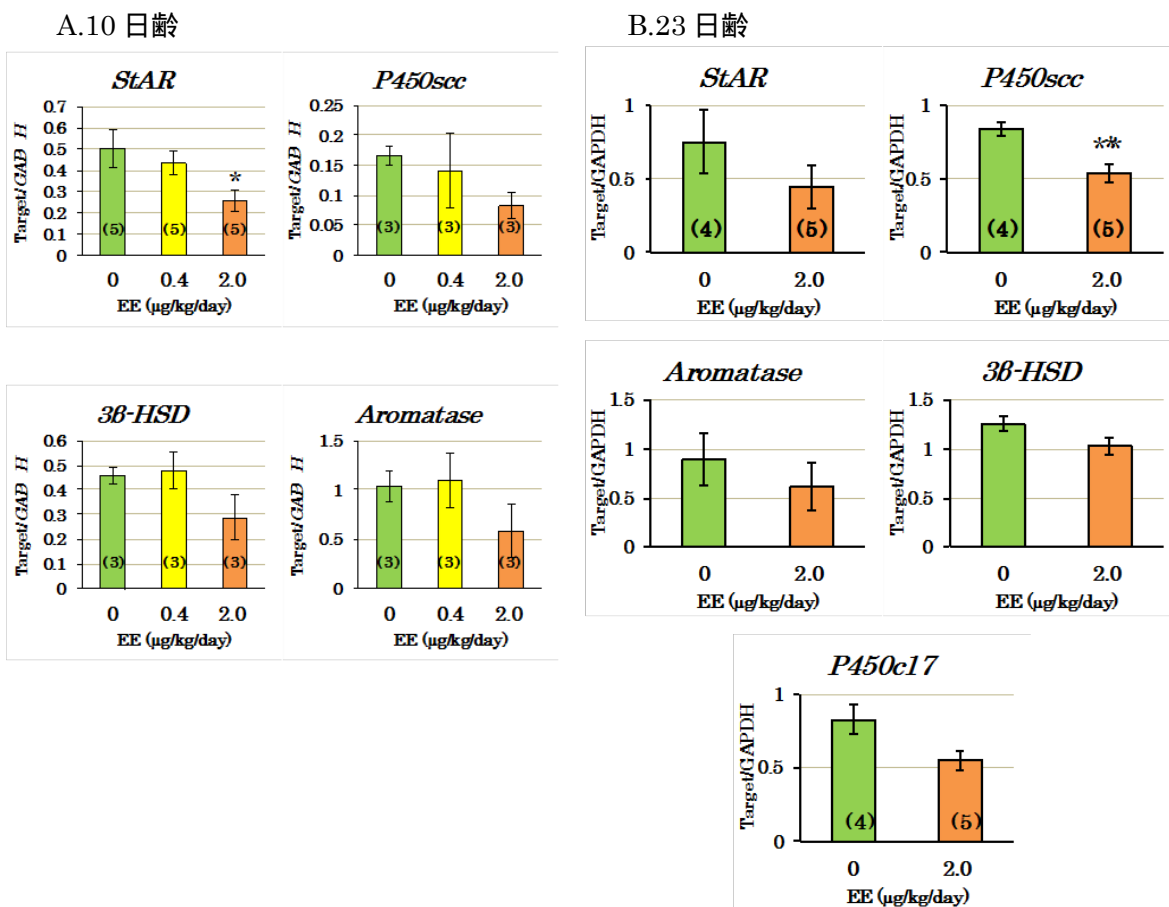
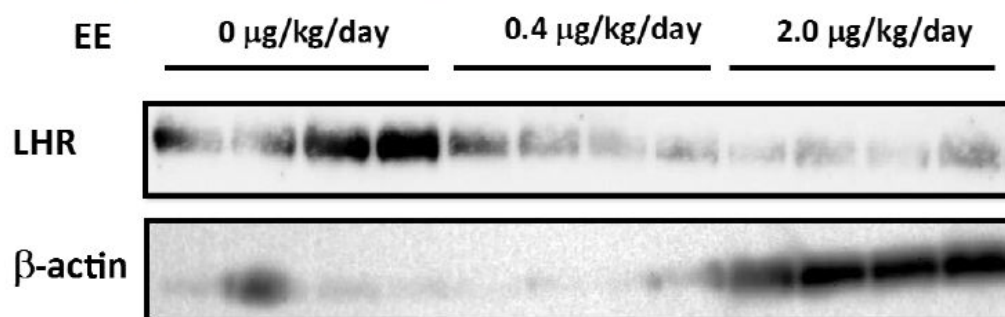


図 18

1日齡から5日間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雌ラットの10日齡(A)あるいは23日齡(B)の卵巢におけるステロイドホルモン合成関連遺伝子の発現(平均±標準誤差, N)。*または** $p < 0.05$ または 0.01

A. LHR と β -actin の Western blotting



B. LHR の β -actin に対する相対発現量 (平均 \pm 標準偏差)

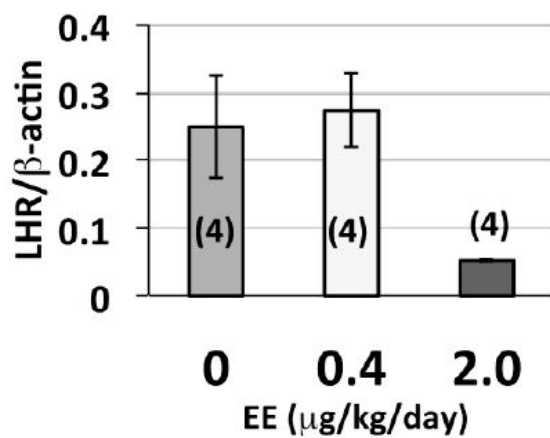


図 19

1日齢から5日間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雌ラットの23日齢卵巣における Luteinizing hormone (LH) 受容体タンパク質の発現

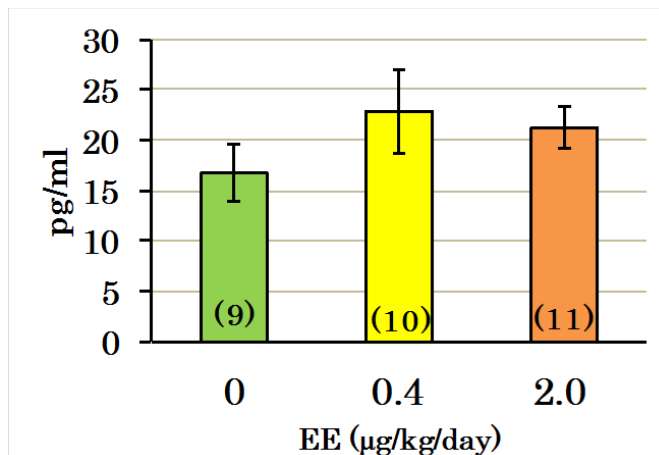


図 20 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの23日齢における血清中エストロゲン濃度(平均±標準誤差, (N))

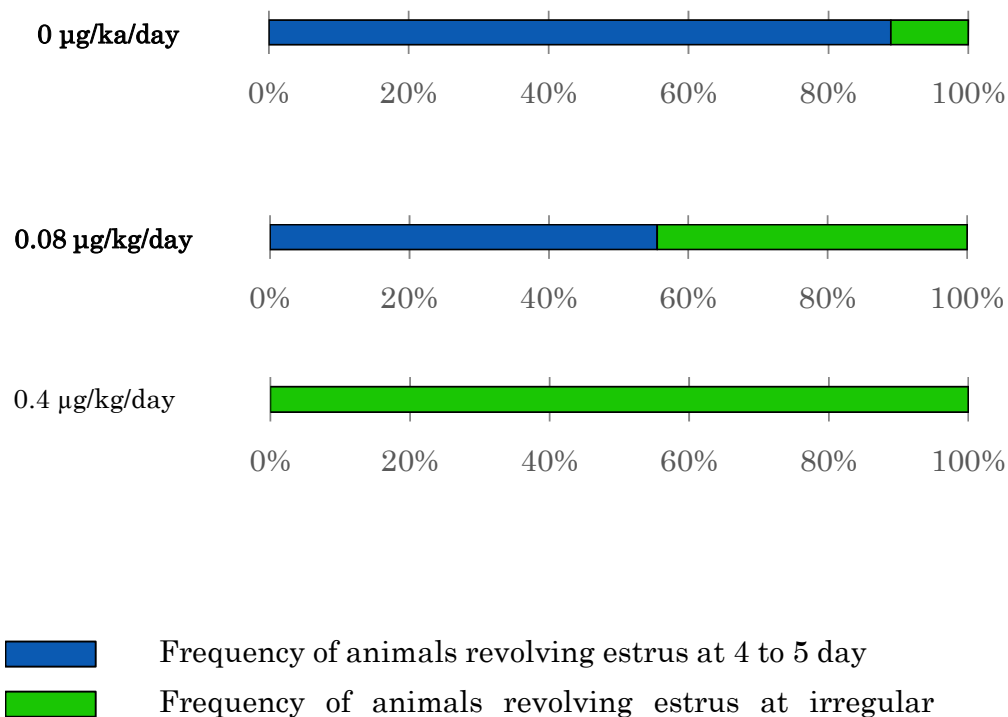


図 21 1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの8~9週齢の性周期

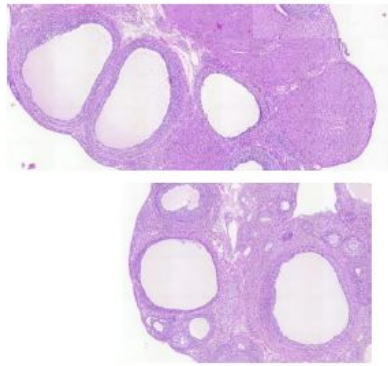


図 22
1日齢から5日間エチルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの卵巣にみられた
囊胞状卵胞の代表的画像

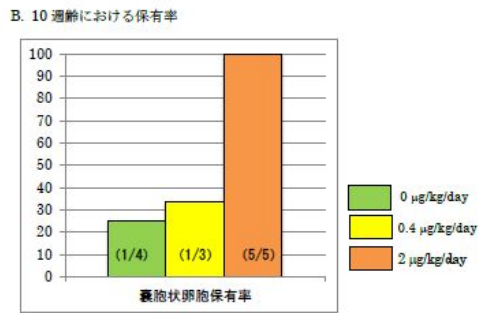
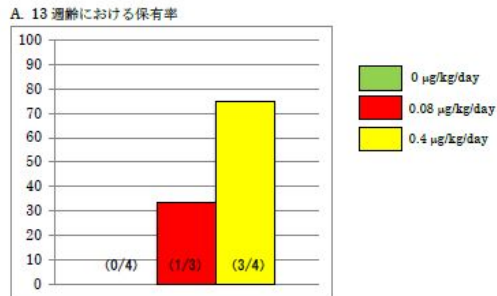


図 23
1日齢から5日間エチルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢の卵巣に
おける囊胞状卵胞保有率

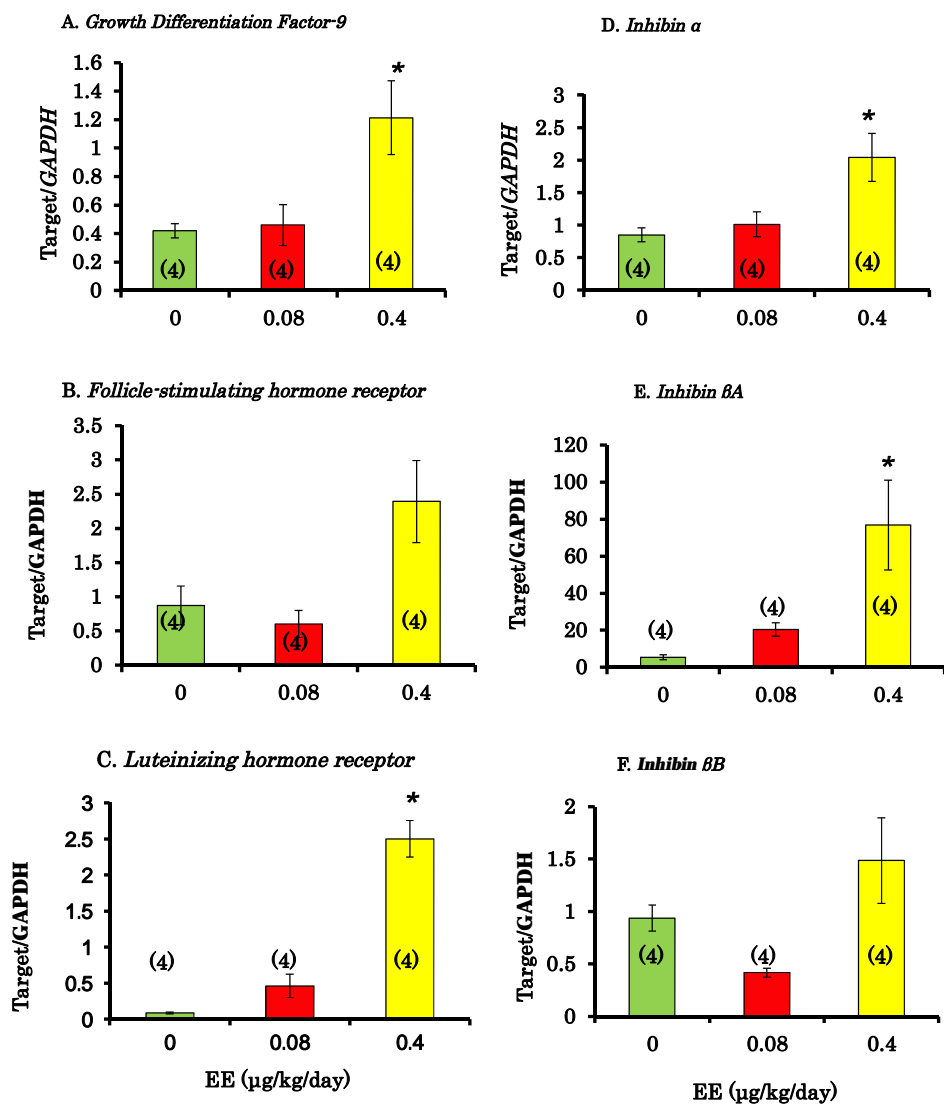
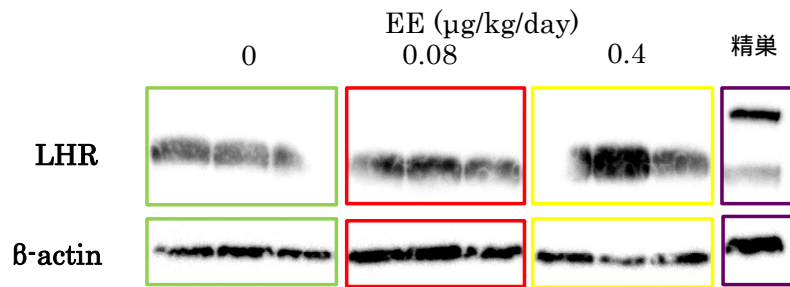


図 24 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオールの (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (平均 \pm 標準誤差, (N)), * $p < 0.05$

A. LHR と β -actin の Western blotting



B. LHR の β -actin に対する相対発現量(平均 \pm 標準誤差, (N))

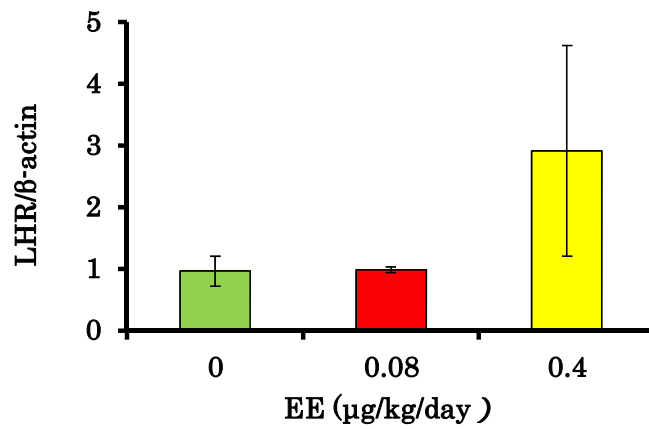


図 25 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における luteinizing hormone 受容体(LHR)タンパク質の発現

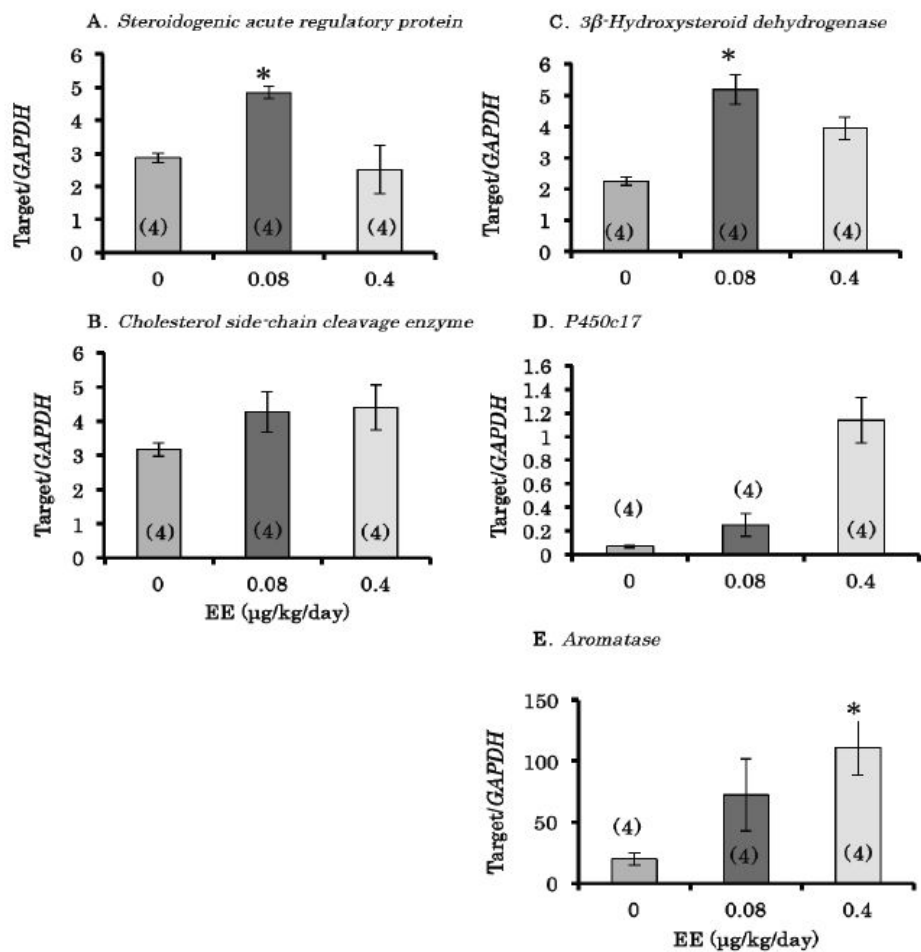
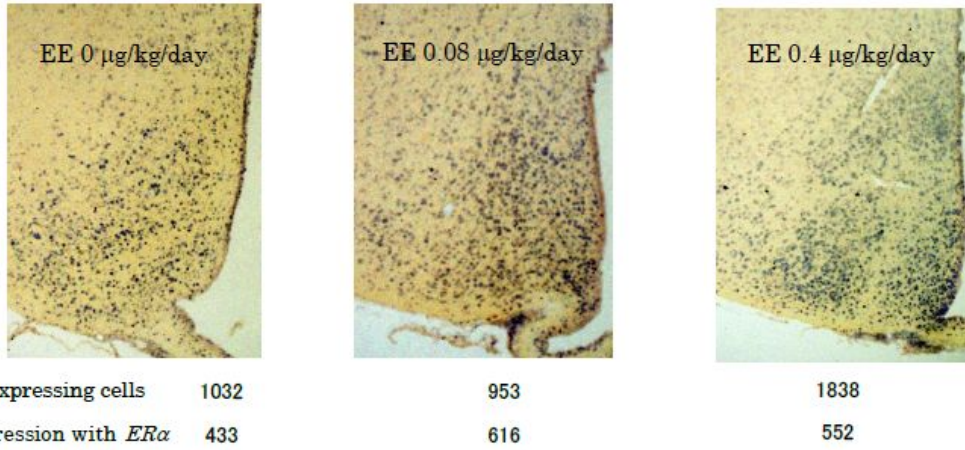


図 26

図 26
1 日齢から 5 日間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 13 週齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連遺伝子の発現 (平均±標準誤差, (N))。 * p<0.05

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット (陰性対照)

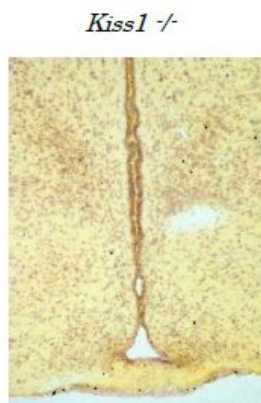
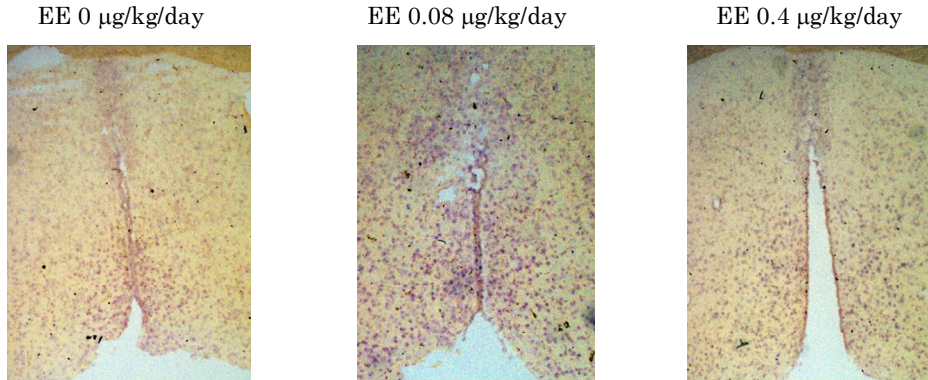


図 27 視床下部弓状核(ARC)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ER α* , 赤色顆粒)の double-labeled *in situ* hybridization

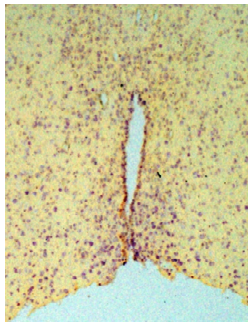
A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



<i>Kiss1</i> expressing cells	41	20	21
Co-expression with <i>ERα</i>	30	8	12

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット
(*Kiss1* の陰性対照)

Kiss1 ^{-/-}



C. 成熟ラットの子宮 (*ERα* の陽性対照)

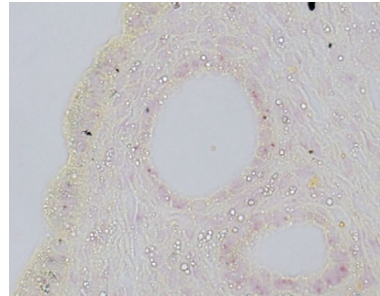


図 28 視床下部前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ERα*, 赤色顆粒) の double-labeled *in situ* hybridization

B は *Kiss1* の陰性対照、C は *ERα* の陽性対照

EE
($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

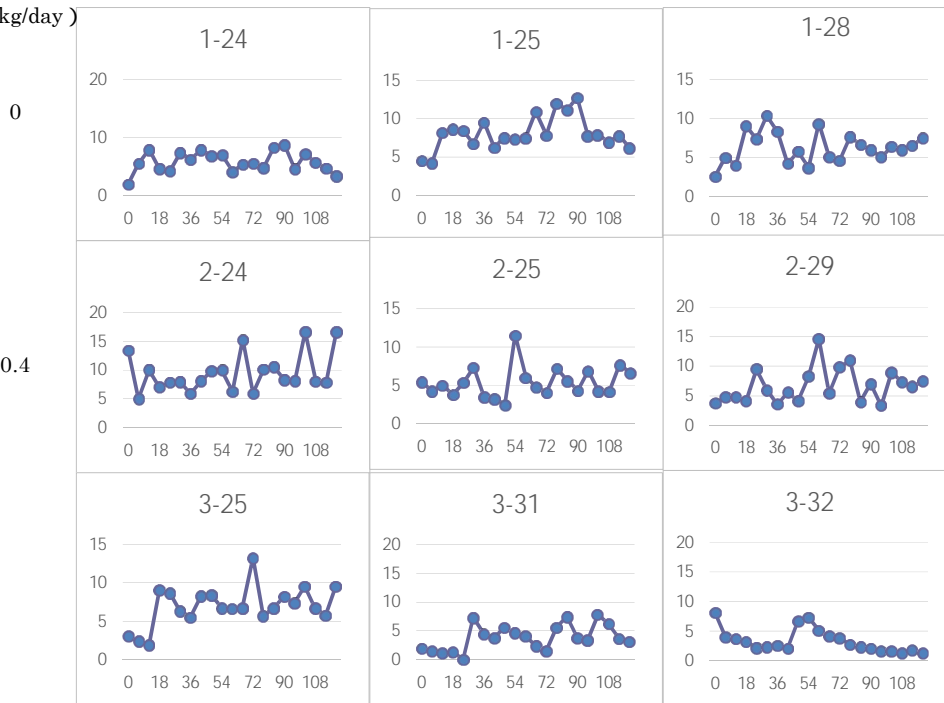


表1 リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ

ターゲット	Accession No.			配列 (5' 3')
<u>Receptors</u>				
<i>Estrogen α receptor (ERα)</i>	NM 012689	プライマー	F	GAAAGGCGGGATACGAAAAGA
			R	TCTGACGCTTGTGCTTCAACA
		プローブ		CGCCGAGGAGGGAG
<i>Estrogen β receptor (ERβ)</i>	NM 012754	プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
			R	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
		プローブ		TTATGAAGTAGGAATGGTCAAGTG
<i>Luteinizing hormone receptor (LHR)</i>	NM 012978	プライマー	F	CCGTCAGGGGTGTAGACAGAGAGT
			R	CGGTGCAGCTGGCTTCTT
				CACTGGCAAACACAG
<i>Kisspeptin receptor (GPR54)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00576940_m1)			
<i>Opioid receptor, kappa 1 (Oprk1)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan system (Rn01448892_m1)			
<i>Tachykinin receptor 3 (tac3)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan system (Rn00566955_m1)			
<u>Steroidogenic factors</u>				
<i>Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i>	NM 031558	プライマー	F	GGCATGGCCACACACTTTG
			R	AGTGGATGAAGCACCATGCA
		プローブ		AGATGCCTGAGCAAAG
<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)</i>	J 05156	プライマー	F	TCCCAGCGGTTTCATCGA
			R	GAAATAAGTCTGGAGGCATGTTGA
		プローブ		CCGCTTACCAGATGTT
<i>Steroid 17α-hydroxylase (P450c17)</i>	NM 012753	プライマー	F	TGGCTTTGGTGGTGCACAATC
			R	TGAAAGTTGGTGTTCGGCTGAAG
		プローブ		ATCCAAAAGGAGATTGACCA
<i>Aromatase</i>	M 33986	プライマー	F	GAAACGGTCCGCCCTTTCT
			R	TGGATTCCACACAGACTTCTACCA
		プローブ		ATGAAAGCTCTGACGGGC
<i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)</i>	L 17138	プライマー	F	AAGTATGCAATGTGCCACCATTT
			R	GCAAAAAGATGGCCGAGAA
		プローブ		CATTGGCTGCCAGCAC
<u>Growth factors, hormones and neurotransmitters</u>				
<i>Growth differentiation factor (GDF)-9</i>	AF 099912	プライマー	F	AGCTCAAATGGGACAACCTGGAT
			R	GGGACAGTCCCCTTTACAGTACCT
		プローブ		CCCCGCACAGATAC
<i>Inhibin/activin βA</i>	M 37482	プライマー	F	CCCAGAGGTGCCTGCTATGT
			R	CATTGCTCCCTCTGGCTATCA
		プローブ		CTTGGGCACTCACCTCACAATAGTTGG
<i>Inhibin/activin βB</i>	NM 080771	プライマー	F	CCCTGGGCGGTGAA
			R	CGTCATCAAAGTAGAGCATAGACATAGA
		プローブ		TTGCTGCATCCCCACCAAGCTGAG
<i>Anti Mullerian Hormone</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System(Rn00563731_g1)			
<i>Kisspeptin (Kiss1)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00710914_m1)			
<i>Prodynorphin (Pdyn)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00571351_m1)			
<i>Neurokinin B (tac3)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00569758_m1)			

表2 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの眼瞼開裂日齢および体重(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
N	7	8	8	8
眼瞼開裂(日齢)	13.1±0.3	13.5±0.3	13.3±0.3	13.3±0.3
体重(g)	34.0±1.8	34.9±2.6	35.2±1.4	35.4±1.8
膣開口(日齢)	34.3±0.7	33.6±0.8	34.0±0.6	33.4±0.4
体重(g)	149±4.8	140±5.0	142±4.0	140±3.2

^a 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を反復経口投与した雌ラットの27-28週齢における器官重量(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
N	3	4	4	4
体重(g)	429±18	404±12	416±21	379±19
下垂体(mg)	22.9±4.5	18.0±1.8	17.8±1.4	18.7±0.8
卵巣(mg)	69.8±4.0	84.3±7.1	106±7.0*	83.7±9.6
子宮(mg)	789±69	464±130	705±42	678±59
肝臓(g)	12.8±1.4	11.5±0.7	12.3±1.2	11.5±0.8
副腎(mg)	78.5±9.1	70.7±2.9	65.7±4.6	74.1±4.9

^a 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を反復経口投与した雌ラットの27-28週齢における排卵率および卵巣所見

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
排卵率	3/7	6/8	3/8	4/8
嚢胞状卵胞保有率	2/7	2/8	2/8	6/8*
黄体形成率	7/7	7/8	6/8	8/8

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

表5 エチニルエストラジオールの幼若雌ラットを用いる子宮肥大試験成績(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.08	2
N	5	4	5	5
剖検時体重(g)	59.0±0.4	58.8±0.5	59.6±1.3	57.0±1.6
卵巣重量(mg)	17.2±0.5	14.4±0.9	14.9±0.8	12.7±1.0**
Blotted 子宮重量(mg)	29.4±2.3	27.2±2.7	24.3±3.1	70.7±4.7**

^a corn oil 10 mL/kg/day

**p<0.01

表6 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの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 (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Estrous cycle		
Regular cycle	6	5
Irregular cycle	1	1
Fertility		
Copulated	7	6
Pregnant	7	6

^a corn oil 10 mL/kg/day

表7 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与し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 ^a	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*

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

表8 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの帝王切開所見

EE (μg/kg/day)	0 ^a	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9 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの妊娠末期胎児所見

EE (µg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of males	6.4 ± 1.5	5.7 ± 1.4
Number of females	7.0 ± 1.8	6.0 ± 1.5
Sex ratio (male %)	52.1 ± 3.5	51.4 ± 4.0
Feral body weight (g)	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1*
External abnormality (edema)	0	1
Skeletal anomalies	0	0
Skeletal variations	2	2
Absence of the 13 th rib	0	1
Short 13 th 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 ± 7.6	48.8 ± 7.8*
Left forelimb phalanx (V)	17.4 ± 6.4	39.8 ± 8.8
Starnebra (II)	98.9 ± 1.0	100 ± 0
Starnebra (III)	98.9 ± 1.0	100 ± 0
Starnebra (IV)	96.7 ± 3.1	98.5 ± 1.4
Starnebra (V)	41.1 ± 13.0	76.8 ± 6.5
Starnebra (VI)	24.8 ± 11.0	57.2 ± 11.3
Number of ossified caudal and sacral vertebrae	7.69 ± 0.24	8.37 ± 0.09*

^a corn oil 10 mL/kg/day

* p<0.05

表 10 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
眼瞼開裂日齢 (平均±標準偏差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	9	10	11
眼瞼開裂 (日齢)	13.6 ± 0.5	13.5 ± 0.9	13.4 ± 0.7

表 11 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
13週齢における器官重量 (平均±標準偏差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08	0.4
N	9	10	9
Pituitary (mg)	13.8 ± 1.1	17.1 ± 1.0	21.3 ± 3.6**
Ovaries (mg)	94.4 ± 18.6	98.3 ± 14.7	57.8 ± 6.1**
Uterus (mg)	525 ± 56	493 ± 19	441 ± 93**

^a corn oil 10 mL/kg/day

** p<0.01

表 12 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
14週齢におけるパルス状 LH 分泌のパラメーター (平均±標準偏差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	3	3	3
Mean LH	6.72 ± 1.22	7.20 ± 2.06	4.91 ± 1.88
Basal LH	5.36 ± 1.12	5.56 ± 1.88	3.64 ± 1.77
Frequency	4.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0	3.3 ± 1.2
Amplitude	3.65 ± 0.28	5.35 ± 1.18*	4.16 ± 0.32

動物は10週齢で両側卵巣を摘出し、13週齢で装着した頸静脈カニューレから頻回採血した。

^a 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 (H25-27 総合研究報告書)

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

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

. 90 日齢において、発情前期 (午前および午後)、発情期、休止期の各発情周期ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定と、脳における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。EE 投与群では対照群に比べて EE 投与量に応じたサージピーク値の低下がみられた。脳においては、LH サージに関与する前腹側脳室周囲核(AVPV/POA)のキスペプチンの mRNA 発現量が EE 投与群で投与量に応じて低下していた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンおよび下垂体での LH mRNA 発現は対照群と EE 投与群で違いはみられなかった。EE の新生期曝露により、発情周期の乱れといった遅発性影響がみられる以前より、LH サージの低下および LH サージの誘起に関連するキスペプチンの遺伝子発現量の低下が確認されたことから、曝露後に脳内に移行した EE がキスペプチンの発現に直接関与する事が、遅発性影響に関与している可能性が示唆された。

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。また、免疫組織化学的染色により、Hrk タンパク質が生後 1 日の卵巣の卵細胞に検出された。卵巣におけるアポトーシスを TUNEL 染色で比較した結果、生後 1 日の卵巣で EE 処置群で対照群より染色性が減弱していた。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て培養し、アポトーシス関連因子の遺伝子発現を解析した。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て卵細胞の Hrk の発現抑制を介しアポトーシスを抑制し、原始卵胞の形成を障害したものと考えられた。

. 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

-A. 研究目的

内分泌かく乱物質 EDCs は人工合成あるいは天然の多様な化学物質を含んでおり、その

ほとんどがエストロゲン作用を示す(1)。エストロゲンは胎子期の発育過程で多様な器官の細胞機能を調節する。これらの化学物質がエストロゲン様作用を示すことから、これらの物質による感受期の曝露は胎子および新生子の発育を傷害し、生殖機能の内分泌および神経機構に重要な影響を与えることが知られている(4)。齧歯類では脳の性分化が胎子期末期から新生子期初期にかけて起こることが知られている(5)。雄では精巣で作られたアンドロゲンが血液脳関門を通過し、脳内の芳香化酵素によってエストラジオールに変換される(6)。雄ではこのエストラジオールが脳の正常な性分化に必要不可欠である。雌では発育中の卵巣からエストラジオールが分泌されるものの、末梢血液中で α -fetoprotein と結合し、血液脳関門を通過できない。(7)。しかしながら人工のエストロゲン様化学物質は α -fetoprotein と結合しない。したがって、人工エストロゲン様化学物質が周生期に体内に入れば雌では正常な脳の性分化が影響される可能性が危惧される。近年キスペプチンが、視床下部・下垂体・性腺軸を刺激して、春機発動を誘起し、発情周期を調節していることが明らかとなってきた(8)。キスペプチンは主に視床下部の二つの核で発現している。前腹側脳室周囲核(AVPV)と弓状核(ARC)である(9)。AVPVにおけるキスペプチンニューロンの数は性的二型を示し、雄より雌の方が多く、ARCではそのような性差が見られない(10)。雌マウスでAVPVのキスペプチンニューロン数は生後増加し、春機発動期に成体のレベルに達する(11)。キスペプチンニューロン数の増加が卵巣からのエストラジオールによって調節されている。キスペプチンニューロンはエストロゲン受容体 α (ER α)を発現している。実際、キスペプチンニューロンがER α を発現しないようにした動物では春機発動に至らず、正常な発情周期を示さない(12)。キスペプチンはGタンパク共役受容体GPR54を介して作用する(8)。この受容体は視索前野(POA)と弓状核(ARC)に存在するGnRHニューロンに発現している(8,13)。POAにおいてキスペプチンが受容体に結合してGnRHサージを誘起した結果、LHサージを生じる(14)。一方、ARCの受容体に結合したキスペプチンはGnRHとLHのバル

ス状分泌に関わっている(13,15)。EDCsがキスペプチンニューロンに影響して生殖機能障害を起こしているとする報告がある(16,17)。しかしながらEDCsがキスペプチンニューロンに作用するかどうかは不明な部分が多い。過去の研究からEE(20 μ g/kg)を生後24時間以内に1回投与すると生後171-190日に異常発情周期を示すことが明らかにされている。新生子期のEE投与によるキスペプチンニューロンに与える変化を明らかにするために、まだ発情周期が乱れていない90日齢において、生殖ホルモンの変化、AVPV/POAとARCにおける遺伝子発現の変化を解析した。

-B. 材料と方法

実験動物

成熟Wister-Imamichiラットを、14時間明期、10時間暗期の照明条件下(明期5時から19時)、室温 25 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 %で飼育した。餌にはMR-Breeder (Nosan Corporation, Yokohama, Japan)を用い、飲水とともに自由摂取とした。実験は東京農工大学動物実験委員会の承認のもと行った。

実験計画

Fig. -1に実験計画の概要を示した。新生子を各母親あたり9頭(雌6頭、雄3頭)にし、雌子ラットに以下の処置を施した。

- 1) ゴマ油投与群(対照群)。
- 2) EEを20 μ g/kg投与群。
- 3) EEを200 μ g/kg投与群。

出生後24時間以内に背部皮下に投与した(各処置群16頭)。

膣が開口した後、毎日膣スメアを観察し、90日齢まで記録した。その後、発情休止期2日の11時(D)、発情前期の11時(PE11)と17時(PE17)、発情期の11時(E)に安楽殺し、血液と脳を採取した(各採取時点4例ずつ)。血液は遠心して(3000 rpm、15分、4 °C)血清を分離して、-20 °Cでホルモンの測定まで保存した。脳のAVPV/POAとARC、下垂体前葉を採取し、液体窒素で凍結後、-80 °CでRNAの抽出まで保存した。AVPV/POAとARCを採取するために、ラットの脳地図(Paxinos and Watson atlas (21))を参照して、brain punch set (inner diameter of 1.0mm; Stoeling Corporation., IL, USA (20))を用いて脳のスライスから切り出した。

ホルモン測定

血清中の LH、follicle stimulating hormone (FSH)、プロラクチン濃度をそれぞれのラジオイムノアッセイキットを用いて測定した(NIH, Bethesda, MD)。ヨード化ホルモンには rat LH-I-7、rat FSH-I-7、PRL-I-6 を使用し、第一抗体には anti-rat LH-S-10、anti-rat FSH-S-11、PRL-S-9 をそれぞれ用いた。測定値はそれぞれ NIDDK rat LH-RP-3、rat FSH-RP-2、rat PRL-RP3 で表した。アッセイ内変動とアッセイ間変動はそれぞれ、2.7 % と 22.08 % (LH)、7.1 % と 22.75 % (FSH)、2.46 % と 22.20 % (プロラクチン)であった。

インヒビンは (ir-) inhibin として rabbit antiserum against bovine inhibin (TNDH-1) と 125I-labeled 32-kDa bovine inhibin を用いて測定した。測定値は 32-kDa bovine inhibin として表示した。アッセイ内変動とアッセイ間変動は 4.77 % と 10.30 % であった。

エストラジオールとテストステロンは、125I で標識したステロイドを用い、2 抗体法で測定した。エストラジオールの抗体には GDN #244 をテストステロンの抗体には GDN #250 を用いた。両抗体ともに Dr. G.D. Niswender (Animal 17 Reproduction and Biotechnology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA) より供与していただいた。アッセイ内変動とアッセイ間変動は、エストラジオールで 5.47 % と 18.40 %、テストステロンで 2.89 % と 21.28 % であった。

定量的 real-time PCR

総 RNA を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を用いて抽出した。相補的 DNA (cDNA) を PrimeScript reverse transcriptase (TaKaRa bio, Shiga, Japan) を用いて作製した。

Oligonucleotide primers は web-based Primer3 software を用いて作製した。

(Table 1) 全ての PCR は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) を用いて行い、それぞれの mRNA 値は GAPDH mRNA あるいは β -Actin mRNA に対する相対値として $2^{-\Delta\Delta CT}$ method を用いて算出した。

統計解析

データは平均値 \pm SEM で表し、分散分析後、他群間の有意差の解析には Graph Pad Prism5)

を用いた。有意さの水準として $p < 0.05$ を用いた。

-C. 結果

繁殖の指標に対する新生子期 EE 投与の影響

Fig. -2a に体重の変化を示した。全ての実験群が正常な発育を示した。群間に差が認められなかった。

春機発動期を示す膣の開口日齢を Fig. -2b に示した。群間に差が認められなかった。

90 日齢における正常発情周期を示す動物の割合を Fig. -2c に示した。最低 4 日間同様の膣スミア像を示した場合を異常とした。90 日齢で群間に差が認められなかった。

90 日齢における発情周期中におけるホルモン変化に対する新生子期 EE 投与の影響

LH、FSH、inhibin、prolactin、estradiol、と testosterone の変化を Fig. -3 に示した。LH サージが PE17 認められ、ピーク値の減少が投与された EE の用量に応じて見られた。他のホルモンでは、群間に差が見られなかった。90 日齢における視床下部の遺伝子発現に対する影響

AVPV/POA と ARC の kisspeptin (Kiss1)、GPR54、ER α 、GnRH precursor (GNRH1) の mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。AVPV/POA では Kiss1 mRNA が PE17 に EE 投与群で用量依存的に減少した (Fig. -4a)。その他の GPR54、ER α 、GNRH1 mRNA 発現量には有意差が見られなかった (Fig. -4b-d)。ARC では ER α mRNA 発現量が PE17 に EE 処置群で対照群に比べ増加した (Fig. -5c)。その他の Kiss1、GPR54、GNRH1 mRNA の発現量には差が見られなかった (Fig. -5a,b,d)。

90 日齢における下垂体の遺伝子発現に対する影響

下垂体における LH β 鎖 (LH β)、FSH β 鎖 (FSH β)、prolactin (PRL)、GnRH receptor (GNRHR) mRNA の発現量を real-time PCR で測定した結果を Fig. 6 に示した。LH β mRNA が D と PE17 に EE を 200 μ g/kg 投与した群で有意に減少していた (Fig. 6a)。他の遺伝子発現には差が見られなかった (Fig. 6b-d)

-D. 考察

本研究で、周生期に EDCs に曝露されると脳の発達に影響を受け、HPG 軸の性分化が影響を受けることが明らかになり、性成熟後に遅れて起きる生殖機能障害の原因である可能性が示唆された。新生子期の EE 曝露で、180 日齢には発情周期の異常を示す動物たちが、生後 90 日齢には LH サージが小さくなっていたと考えられた。これらの動物では AVPV/POA における kisspeptin mRNA の発現が減少していた。AVPV/POA の kisspeptin mRNA 発現量が雌より低い雄では LH サージが起こらない(10,23)。新生子期の EE 曝露が、脳の性分化時期に AVPV/POA の不完全な雄性化を引き起こした結果、kisspeptin mRNA 発現量を低下させ、90 日齢で LH サージの縮小を起こしたのであろう。

エストロゲンがキスペプチンニューロンの kiss1 mRNA の発現を調節する(8)。エストロゲン受容体には ER α と ER β 2 の種類が有る(24)。ER α mRNA は子宮、乳腺、精巣、下垂体、肝臓、腎臓などに多く発現している。一方 ER β mRNA は卵巣と前立腺に多く発現している(25)。キスペプチンニューロンは ER α を発現しており雄より雌に多い(26-28)。ER α ノックアウトマウスを卵巣除去し、エストロゲンを投与すると、キスペプチンニューロンの Kiss1 mRNA の発現は増加しない(29)。ER α が Kiss1 の発現を調節する主体である(30)。今回に実験結果は、対照群と EE 曝露群で AVPV/POA と ARC の ER α 発現量に差がないことを示している。さらに EE 投与群で血中エストロゲンレベルに変化が見られなかった。EE 曝露群で見られた AVPV/POA での Kiss1 発現量の低下の原因は、エストロゲン受容体以降で起こっているのかもしれない。

LH サージの低下が Kiss1 mRNA の低下とともに見られた。AVPV/POA と ARC では GnRH と GPR54 の mRNA 発現量に有意な変化が見られなかった。GnRH ニューロン自身は EE 曝露によって影響を受けないのかもしれない。GnRH サージは AVPV/POA から起こり、下垂体のゴナドトロフを刺激して LH サージを起こす。このサージは ARC におけるパルスの生成と異なり、LH の転写が伴わない。LH β と GnRHr mRNA の発現量には変化がなかったのはそのためであらう。したがって LH

サーージの縮小は、EE 曝露動物において AVPV/POA における Kiss1 mRNA 発現量の低下が直接関わっていると考えられる。

持続性発情期を示す老齢ラットでやはり LH サージの縮小が見られ、c-fos を発現しているキスペプチンニューロンの割合が AVPV で減少していたが、Kiss1 mRNA の発現レベルやキスペプチンニューロンの数は若い雌ラットと違いが認められなかったと報告されている(31-34)。新生子期の EE 曝露がキスペプチンニューロンの数の増加を抑制したのかもかもしれない。

-E. 結論

新生子期の EE 投与によるキスペプチンニューロンに与える変化を明らかにするために、まだ発情周期が乱れていない 90 日齢において、生殖ホルモンの変化、AVPV/POA と ARC における遺伝子発現の変化を解析した。その結果、新生子期の EE 曝露が LH サージのピーク値を抑制し、AVPV/POA におけるキスペプチンの遺伝子発現を低下させることを見いだした。

・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

-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 α -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 ブリーダー、日本農産工業) と水は自由摂取とした。膣スメ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°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: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/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°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 μm 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。

定量的 RT-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、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 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計系を構築した:

sense oligo,

5'-TGATTCAAGAGCCAAGAAATTTCAAGA
GAATTTCTTGCTCTTGAATCTTTTTTC-3';

antisense oligos,

5'-TCGAGAAAAAAGATTCAAGAGCCAAGA
AATTCTTGAATTTCTTGCTCTTGAATC
A-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細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、10 nM 17 β -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 H r k 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系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

巢への 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) Kaori Nozawa, Kentaro Nagaoka, Haolin Zhang, Kento Usuda, Sachiko Okazaki, Kazuyoshi Taya, Midori Yoshida, Gen Watanabe, Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats, *Reproductive Toxicology*, 2014, 46, 77-84.
 - 2) Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G, Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2014, 76, 1105-1110.
 - 3) Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats (*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016 年 1 月)
 - 4) Zhang H, Taya K, Nagaoka K, Watanabe G. The hormone profiles in developing female rats after neonatal exposure to 17 α -ethynyl 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子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 α -ethynyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats. The 107th SRD annual meeting (第 107 回日本繁殖生物学会大会、2014 年 8 月 20-24 日、帯広)

& -G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

-References

1. Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P. P., Matsumoto, H., Sokabe, M. and Chen, L. 2011. Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge systems in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology*. 152: 1562-1571.
2. Bateman, H. L. and Patisaul H. B. 2008. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*. 29: 988-997.
3. Cao, J. and Patisaul, H.B. 2011. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol*. 519: 2954-2977.
4. Clarkson, J. and Herbison, A. E. 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: Sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 147: 5817-5825.
5. Clarkson, J., Boon, W. C., Simpson, E. R. and Herbison A. E. 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*. 150: 3214-3220.
6. Couse, J. F. and Korach, K. S. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20: 358-417.
7. Dickerson, S. M., Cunningham, S. L., Patisaul, H. B. P., Woller, M. J. and Gore, A. C. 2011. Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology*. 152: 581-594.
8. Downs, J. L. and Wise, P. M. 2009. The role of the brain in female reproductive aging. *Mol. Cell*.

- Endocr. 299: 32-38.
9. Galliano, D. G., Pinilla, L. and Sempere, M. T. Sex steroids and the control of the kiss1 system: Developmental roles and major regulatory actions. 2011. *J. Neuroendocrinol.* 24: 22-33.
 10. Gore, A. C. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 358- 374.
 11. Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Harting, P. C., Ankley, G.T., Foster, P. M., Gray, C. L. and Gray, L. E. 2008. Fifteen years after "wingspread"-environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: Where we are today and where we need to go. *J. Toxicol. Sci.* 105:235- 259.
 12. Horii, Y., Dalpatadu, S. L., Soga, T., Ohta, R., Watanabe, G., Taya, K. and Parhar, I. S. 2013. Estrogenic regulation of kiss1 mRNA variants in Hatano rats. *Gen. Com. Endocrinol.* 181: 246-253.
 13. Ishii M. N., Matsumoto, K., Matsui H., Seki, N., Matsumoto, H., Ishikawa, K. hatani,F., Watanabe,G and Taya, K. 2013. Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-relate disappearance of LH surge in middle- age female rats. *Gen. Com. Endocrinol.* 193: 121-29.
 14. Juraska, J. M., Sisk, C. L. and DonCarlos, L. L. 2013. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Hor. Behav.* 64: 203-210.
 15. Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, ., Byquist, A. C., Crown, A. and Clifton, D. K. 2006. Sexual differentiation of kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology.* 148: 1774-1783.
 16. Li, X. F., Kinsey-Jones, J. S., Cheng, Y., Konx, A. M. I., Lin, Y. and Petrou, N. A. 2009. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLos. One.* 4: Issue 12.
 17. Maeda, K., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., and Okamura, H. 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain. Res.* 1364:103-115.
 18. Matt, D. W., Glison, M. P., Sales, T. E., Krieg R. J., Kerbeshian, M. C., Veldhuis, D. and Evans, W. S. 1998. Characterization of attenuated proestrous luteinizing hormone surges in middle-aged rats by deconvolution analysis. *Biol. Reprod.* 59: 1477-1482.
 19. Mayer, C., Martinez, M. A., Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U. and Levine, J. E. 2010. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons. *Neuroscience.* 107: 22693-22698.
 20. Mees, C. D., Laes J. F., Bakker, J., Smitz J., Hennuy,B., and Vooren P. V. 2006. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol. Cell. Biol.* 26; 2012-2018.
 21. Mueller, S. O. and Korach, K. S. 2001. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 613-619.
 22. Nozawa, K., Nagaoka, K., Zhang, H., Usuda, K., Okazaki, S., Taya, K. and Watanabe, G. 2014. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affect ovarian gene expression and causes reproductive dysfunction in female rats. *Reprod. Toxicol.* in press.
 23. Navaro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M. L., Casanueva, F. F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M. 2005. Effects of KISS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* 146: 1689-1697
 24. Ohta, R., Ohmukai, H., Marumo, H., Shindo, T., Nagata, T. and Ono, H. 2012. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low- dose diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.* 34: 323-330.
 25. Okamura, H., Yamamura, T. and Wakabayashi, Y. 2013. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. *Anim. Sci. J.* 84: 369-381.
 26. Overgaard, A., Holst, K., Mandrup, K. R., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Hass, U. and Mikkelsen, J. D. 2013. The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus. *Neurotoxicology:* 37: 154-162.
 27. Pnilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P. and Sempere, T. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92: 1235-1316.
 28. Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. 2005. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.* 146: 3686-3692.

29. Zhang, J., Yang, L., Lin, N., Pan, X., Zhu, Y. and Chen, X. 2014. Aging- related changes in the RP3V kisspeptin neurons predate the reduced activation of GnRH neurons during the early reproductive decline in female mice. *Neurobiol. Aging*. 35: 655-668.

-References

1. 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.
2. Casals-Casas, C. & Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
3. 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.
4. 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.
5. Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G. (2010) Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1671-1692.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Doerflinger, M., Glab, J.A. & Puthalakath, H. (2015) BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *The FEBS journal*, 282, 1006-1016.
11. Edson, M.A., Nagaraja, A.K. & Matzuk, M.M. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30, 624-712.
12. 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.
13. 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.
14. 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 disrupters 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.
15. Jurisicova, 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Kumar, E. & Holt, W.V. (2014) Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Advances in experimental medicine and biology*, 753, 55-70.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Meeker, J.D. (2012) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166, 952-958.
 25. 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.
 26. Patisaul, H.B. & Adewale, H.B. (2009) Long-Term Effects of Environmental Endocrine Disruptors on Reproductive Physiology and Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3.
 27. 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.
 28. Safe, S.H. (2000) Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, 108, 487-493.
 29. 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.
 30. Shiorta, M., Kawashima, J., Nakamura, T., Ogawa, Y., Kamiie, J., Yasuno, K., Shirota, 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.
 31. Skinner, M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human reproduction update*, 11, 461-471.
 32. 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.
 33. 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.

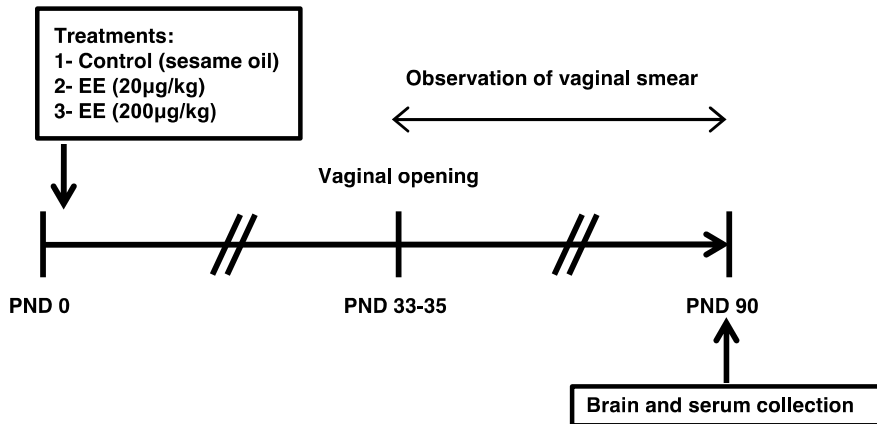


Fig. -1
Schematic representation of experimental protocol. PND, postnatal day.

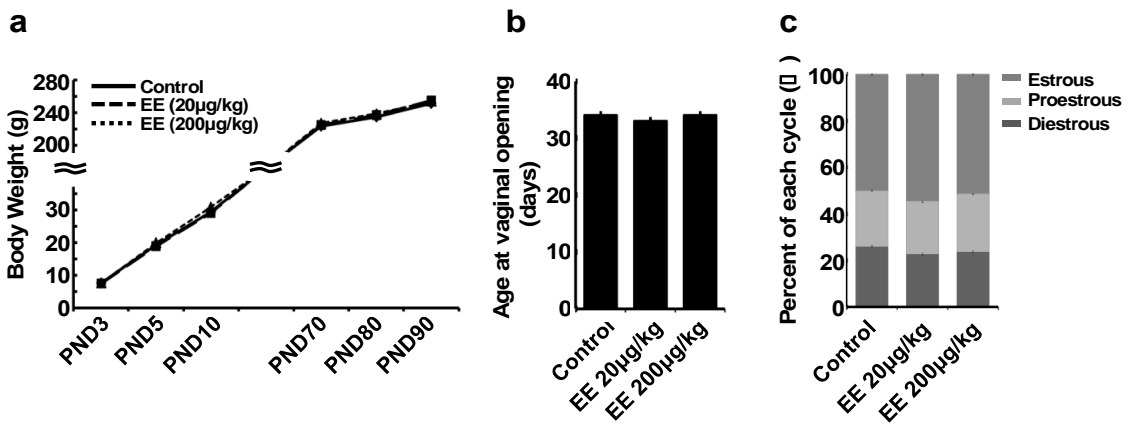


Fig. -2
Effect of neonatal EE exposure on body weight and reproductive parameters. (a) Body weight from PND3 to PND10 and from PND70 to PND90. PND, postnatal day. (b) Age at vaginal opening. (c) Percent of time spent in each cycle day during PND75-90. Rats were neonatally treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg, 2000 µg/kg). Estrous stage was determined by vaginal cytology. Data are presented as the mean ± SEM.

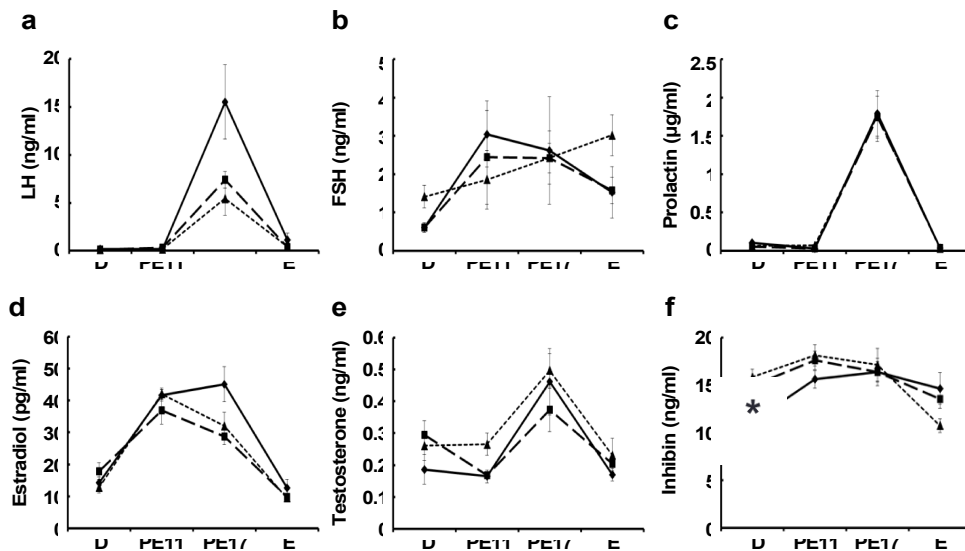


Fig. -3

Changes in serum level of LH (a), FSH (b), prolactin (c), estradiol-17 β (d), testosterone (e) and inhibin (f) in neonatal EE treated rats. Bloods were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). Hormone level was measured by RIA. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ($p < 0.05$). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

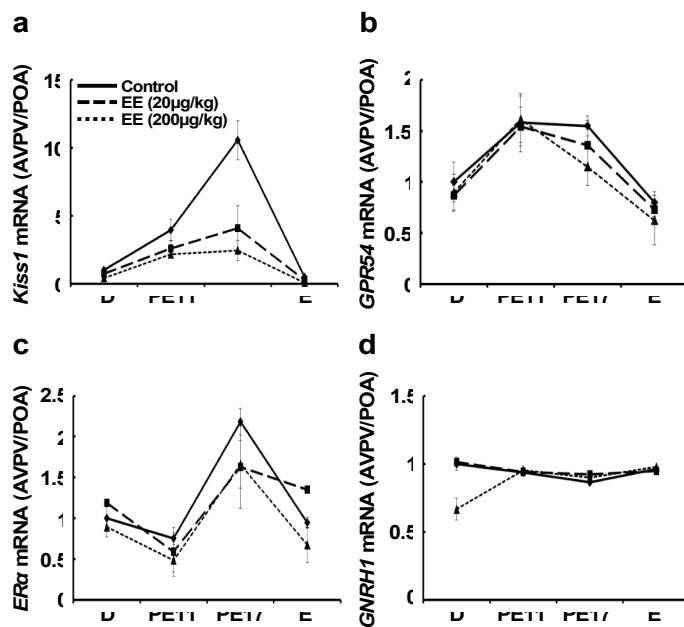


Fig. -4

Changes in Kiss1 (a), GPR54 (b), ER α (c) and GNRH1 (d) mRNA expression in AVPV/POA. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ($p < 0.05$). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

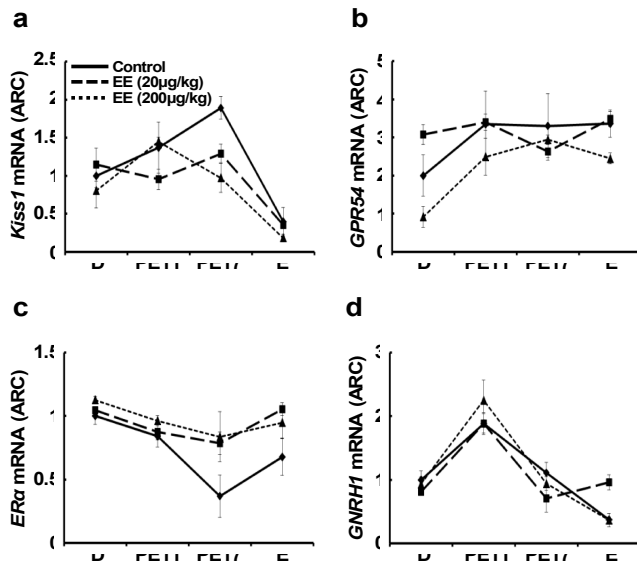


Fig. -5
 Changes in Kiss1 (a), GPR54 (b), ER α (c) and GNRH1 (d) mRNA expression in ARC. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ($p < 0.05$). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

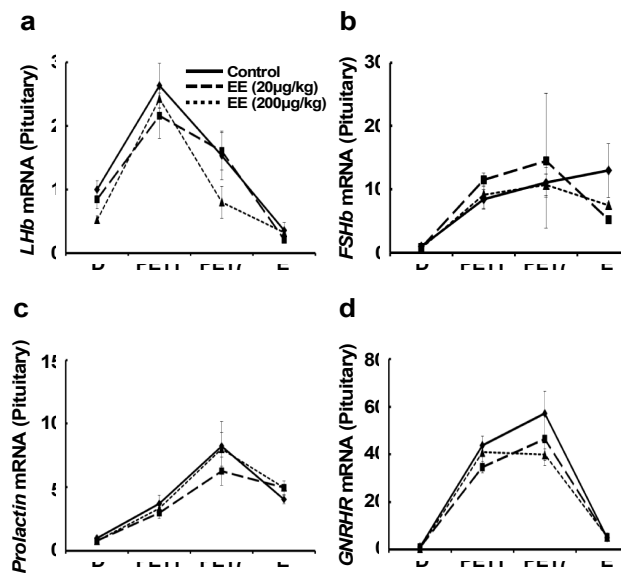


Fig. -6
 Changes in LHb (a), FSHb (b), prolactin (c) and GNRHR (d) mRNA expression in pituitary. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ($p < 0.05$). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

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	gctgaggcagaagggttatg	tggaaaagttcgtcgaaac
Mcl1	gggctggcttggcatactca	gggagcacttttcccatgta
Bak	tctcagaggggctgacagat	ccgaccttccaaagtagcag
Bid	ggctttctccgaacaatga	tggcaatgttgtggatgact
Bim	gcagctcaggaggaaacctg	agtgccttctccagaccaga
Puma	aaagccttctcaaccctagtg	aatgaatgccagtggtcaca
Bmf	ggtacagatcgccagaaagc	gcgatctatccgacaagagc
Bad	gcttagcccttttcgaggac	gatcccaccaggactggata
Bik	atctcatgaggtgcctggag	tttccctgaggttggtgag
Bok	gaaggtggctaacgcagaag	ctcctcatccacaggctctc
Beta-Actin	agccatgtacgtagccatcc	ctctcagctgtggtggtgaa

Table -2. E E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
Tnfip6	Hrk
Itmap1	Fxyd7
Dhdh	Vdr

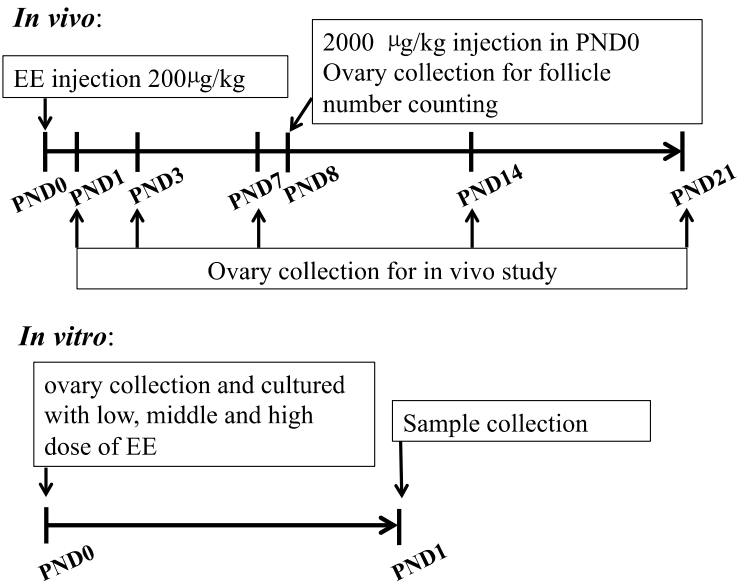


Fig. -1. in vivo および in vitro の実験計画。PND, postnatal day : 生後日齢。

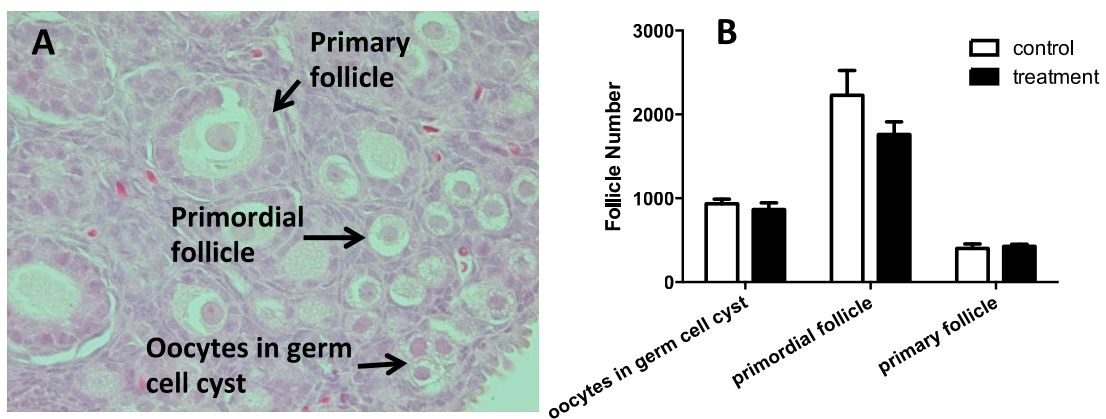


Fig. -2. (A) 生後 8 日のラット卵巣の組織象。(B) 生後 8 日のラット卵巣における種々の卵胞の総数。それぞれの卵胞は (A) の写真に示してある。

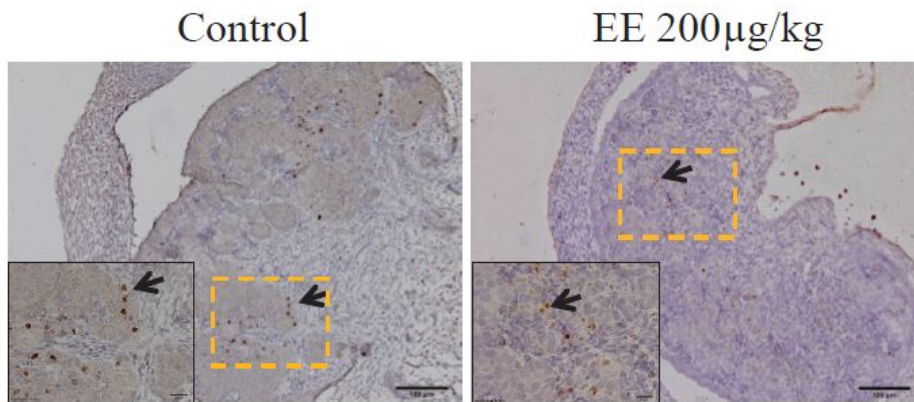


Fig. II-3. 生後1日の対照群およびEE処置群 (200 μ g/kg) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。

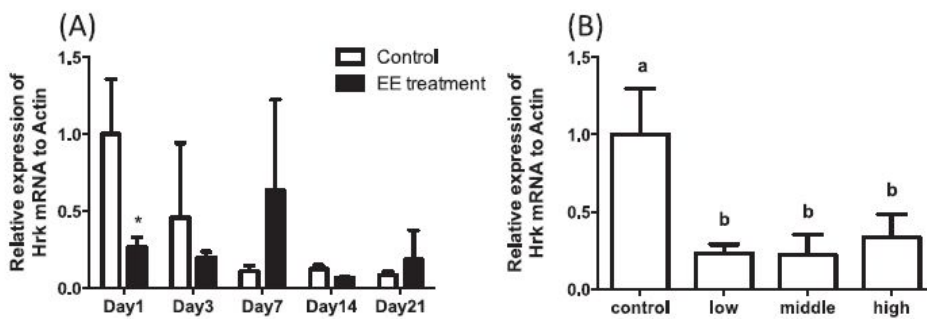


Fig. II-4. EE処置群および対照群の *in vivo* 卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量(A)とEE添加 (low: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/ml)、あるいは非添加で新生子卵巣を培養したときの *Hrk* 遺伝子発現量 (B)。*は有意差有り (P<0.05)。

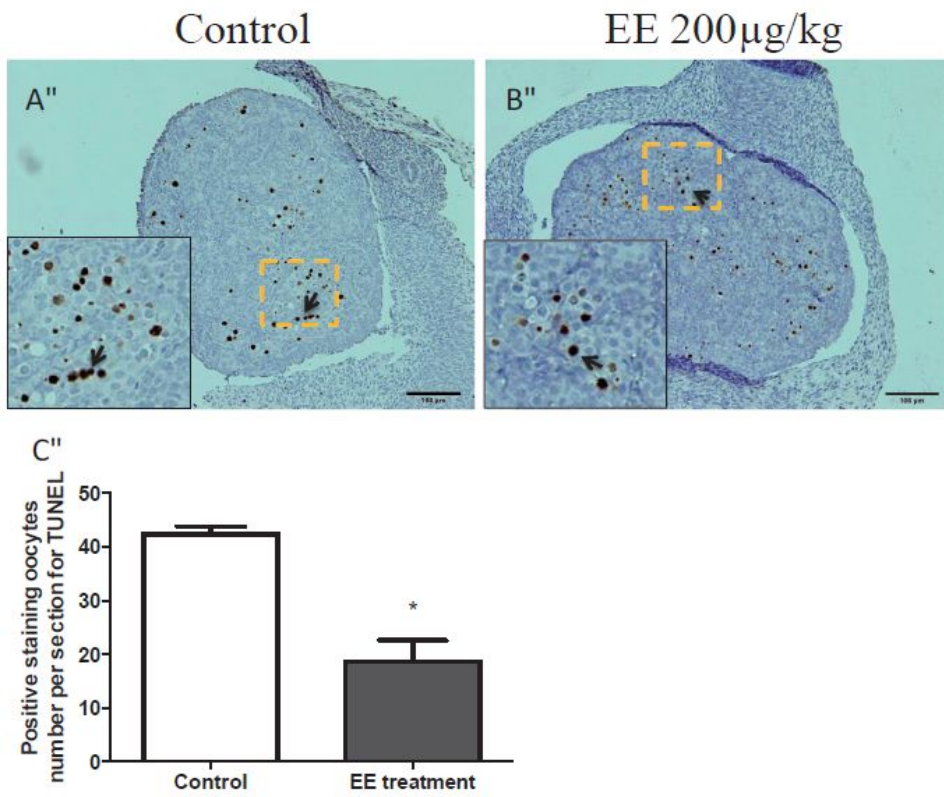


Fig. II-5 生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。
*は有意差有り(P<0.05)。

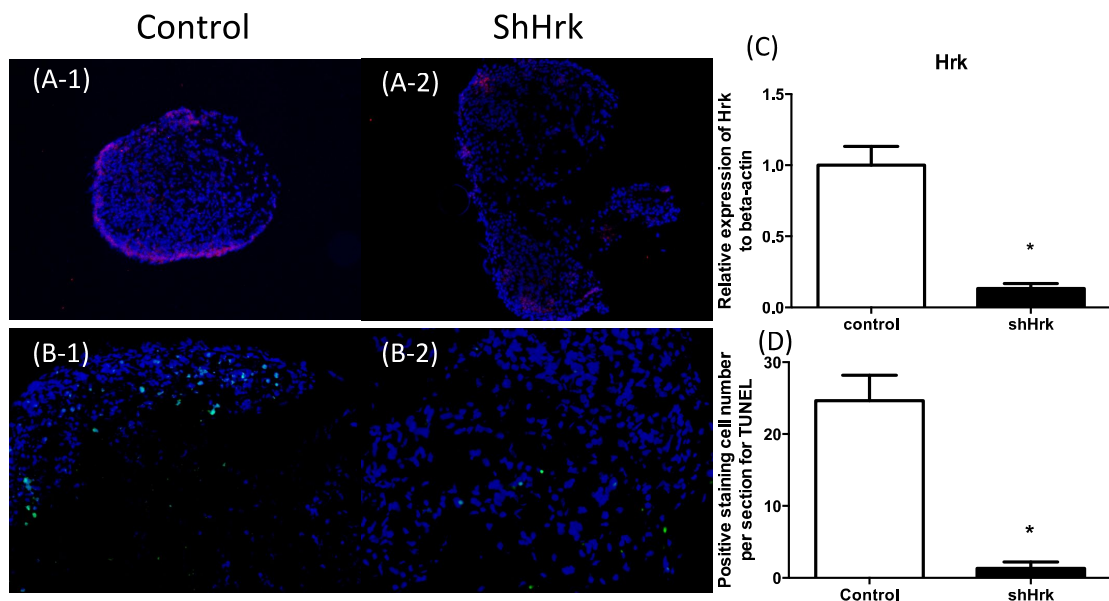


Fig. -6 (A)新生子の卵巣を採取し器官培養した培地に、*Hrk*遺伝子発現をノックダウンするために、ウイルスを含む培養上清を添加して1日培養後の卵巣における*Hrk*タンパク質の蛍光免疫組織化学染色 (ShHrk)。 (B) TUNEL の蛍光免疫組織化学染色。 (C)real time PCR による、対照群と*Hrk*遺伝子ノックダウン群(ShHrk)の卵巣における*Hrk*遺伝子発現量。 (D) 対照群と*Hrk*遺伝子ノックダウン群 (ShHrk) の卵巣の切片中平均 TUNEL 陽性細胞数。 *は有意差有り(P<0.05)

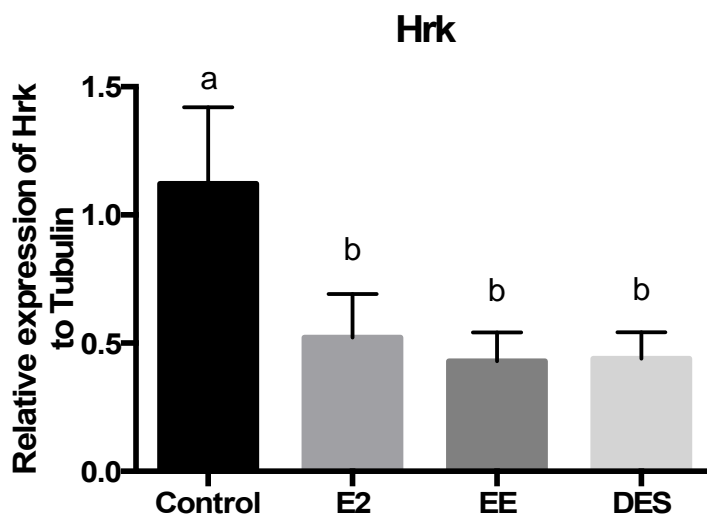


Fig. -7 新生子の卵巣の器官培養系における *Hrk* 遺伝子発現に対する影響。10nM 17 β -estradiol (E 2) EE(100ng/ml)、あるいは 10nm DES とともに 1日培養した卵巣における *Hrk* 遺伝子発現を real-time PCR で解析した

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 (H25-27 総合研究報告書)

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

分担研究課題: 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
～カルシウム結合タンパク質と GABA 受容体の性差、雌の膣開口と性周期ならび
に雌雄の体重変化に及ぼす遅発型影響の観察と評価～

研究分担者: 氏名 横須賀誠 所属 日本獣医生命科学大学

研究要旨

[目的] エストロゲン様化学物質の発育期曝露が脳に及ぼす遅発型影響のそのリスクについて客観的評価基準の確立を目標に、出生 24 時間以内のマウスへの Ethynylestradiol (以下 EE) 投与モデルを用いて、その発育や性成熟後の脳の性差、さらには、行動学的パラメーターに及ぼす影響の評価を行った。これまでに、成体の海馬歯状回における神経細胞やグリア細胞の成体細胞新生頻度に影響しないこと、内側視束前野 (POA) における Calbindin D-28k(以下 CB)陽性細胞の分布パターンに認められる性的 2 型が不鮮明化することなどの所見を得ることに成功してきた。このプロジェクトの期間中に、CB 含有細胞の性的 2 型の不鮮明化の基盤を明らかにする検討に加え、全生涯を通じた発育への影響、成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声 (以下 USV) への影響なども評価して、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼすリスク評価をさらに検討した。さらに、生殖機能制御の中心システムである性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の神経活動を制御するキスペプチンへの影響を検討するため、近年、キスペプチン分泌の重要な制御システムであることが示されている GABA-B 受容体の遺伝子発現への検討も試みた。

[方法] 生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J) に 0.2 µg/kg、20 µg/kg および 2,000 µg/kg の EE、対象群として EE の溶媒であるゴマ油を投与し、一般飼育環境 (室温 22 から 25、湿度 40%から 60%) で飼育管理した。体重測定、膣開口、性周期の観察に加えて、超音波の記録解析装置による USV の記録解析も行った。解析を終了した個体は、(1) 免疫組織化学解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本を準備した。内側視束前野 (POA) を含む脳切片標本 (厚さ 40µm の連続した冠状断切片) に対して Neu-N、CB、GABA-B 受容体への一次抗体を用いた免疫組織化学を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価した。また、(2) RT-PCR によって CB および GABA-B 受容体の視床・視床下部における遺伝子発現量を相対比較した。

[結果] 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露は発育期でも次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、雌では EE 投与において一時的な体重増加の停滞期が認められた。しかしこの体重増加の停滞は離乳時には解消された。3) 発情雌に対する USV 発声は、雌対照群では認められ無いのに対し EE 投与群では USV 発声を認める雌が存在した。4) POA での CB 細胞の分布パターンを観察したところ、EE 投与による CB 陽性細胞数の変化は、脳の構造的な変化を反映したものでは無いことが明らかとなった。5) RT-PCR によって雌では EE 濃度依存的に脳内 CB 遺伝子の上昇が誘導されていることが明らかとなった。しかし、GABA-B 受容体遺伝子への有意な影響は確認されなかった。

[考察] 出生当日のマウスへの EE 曝露は、(1) 雌の膣開口を早める。(2) 授乳期の雌に一時的な発育遅延を誘導する。(3) 雌では早期に性周期異常を誘導される。(4) 雌では 5 週齢以降にさら

なる体重増加が誘導される。(4) 通常は USV 発声しない成体雌が発情雌に対して USV 発声を行うようになる。(5) POA の形態的变化が誘導されないまま、雌では CB 細胞数の増加が誘導される。一方の雄では CB 細胞数の減少が誘導する。(6) 雌では CB 遺伝子数の増加が濃度依存的に誘導される。(7) GABA-B 受容体遺伝子の出現には明瞭な影響は及ばない。

このように、EE のマウス新生仔への単回曝露は、特に雌に対して大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。その神経基盤の一つとして、雌脳における CB 含有神経細胞の「雄性化」が関与していることが示された。哺乳類の脳の基本形は雌である。脳の性分化の臨界期にある雌脳が生理条件以上のエストロゲン作用に曝露されると、それが単回(あるいは短時間)の曝露であっても、発育の一時的遅延、さらには生涯にわたっての生理機能異常が誘導されることが本研究で明らかとなった。

A . 研究目的

経口避妊薬として現在も使用されている Ethynylestradiol (以下 EE) の発育期マウスへの曝露が及ぼす影響とそのリスク評価を明らかにすることを目的とした。生後24時間以内の新生仔マウスに単回 EE 投与(皮下投与)を行って、(1)生涯に渡っての体重変化、膣開口時期、性周期に及ぼす影響 (2)発情雌に出会った際に認められる100kHzを超える周波数帯発声(USV)への影響、(3)内側視束前野において性的二型が認められるカルシウム結合蛋白質カルビンジン(CB)の免疫陽性細胞分布パターンに及ぼす影響、(4)視床・視床下部におけるCBおよびGABA-B受容体遺伝子の発現量への影響、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)にゴマ油(関東科学 N0.37036-02)に溶かしたEEを、1 μ l マイクロシリンジ(HAMILTON)を用いて皮下投与した。対象群は溶媒に用いたゴマ油を投与した。したがって、実験は雌雄のゴマ油投与群(対照群) 雌雄0.2 μ g/kg 投与群(EE 0.2) 雌雄20 μ g/kg 投与群(EE 20) 雌雄2,000 μ g/kg 投与群(EE2000)の計8群の間で比較した。

全ての動物は、生涯を通じて国内の基準

値として推奨される飼育環境で飼育した。生後21日目に離乳させ、雌雄別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)より一定間隔で体重測定した。雌はPD10から外部生殖器を観察して膣開口が認められるまで確認した。生後8週齢以上に達した動物は超音波測定装置(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。

全ての計測を終えたのち、以下の処理を行った。(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、GABA-B受容体遺伝子の発現量を比較するために、RT-PCR解析脳標本を得るために断頭による安楽死を行った後、新鮮脳を採取した。

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, 3rd edition, Academic Press; Figure 26-38)について、凍結ミクロトーム(Yamato)を用いて厚さ40 μ mの連続前頭断切片として作成した。Anti-Calbindon D-28k(Rabbit; Swant CB-28a, 2,000倍希釈) Anti-NeuN(mouse)、Anti-GABAB receptor(Rabbit)による免疫組織化学(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）

動物への薬物投与、体重測定、膣開口確認、行動観察時の移動などは最低限の拘束になるように心がけた。灌流固定時には、ソムノベンチール（50mg/kg BW）の腹腔内投与で深麻酔して痛覚が無くなったことを確認した後にいった。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 投与による体重変化への影響

体重を指標とした発育への影響として、雌では授乳期間における一時的な発育遅延が認められた（図1）。その影響は EE 2000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。一方、生後5週目までは雌雄とも体重の増加パターンの実験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 の方がより少な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）。

3) 成熟雌のUSV発声

超音波測定装置（Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany）が設置された観察ケージを用いた。最初に、USV測定する動物を導入し、装置に馴化させたのち、その後正常発情雌を導入し、対面時におけるUSV発声（100～150kHz）の有無を確認・記録した。その結果、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。（図4）。

4) 内側視束前野（POA）の Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布について

マウスのPOAにおける Calbindin D-28k（CB）免疫陽性細胞の分布は、雄ではPOAの中心にCB陽性細胞の大きな塊が観察される。一方、雌の同領域ではこのようなCB陽性細胞の集合は観察できない。これを基本形として、新生仔期 EE 投与による成熟後の雌雄マウスPOAにおけるCB陽性細胞数の分泌パターンの変化を調べた。

まず、このCB陽性細胞の塊は、すべて神経細胞によって構成されていることが判明した（図6）。

出生当日におけるEE単回皮下投与により、雄ではPOAにおけるCB陽性細胞の大きな塊のピークがEE投与の濃度依存的に後方にシフトすることが判明した。一方、雌ではEE投与によって本来はCB陽性細胞の塊が観察されないPOAの後方に、雄型のCB陽性細胞の塊として新しく発現することが判明した（図7から図10）。一方、これらCBの変化に伴う脳の組織学変化は観察できなかった（図8から図10）。

5) 成熟後の視床・視床下部領域のCBおよびGABA-B受容体mRNA発現への影響

出生当日マウスへのEE単回投与は、特に雌のCB遺伝子の発現量に影響を与える

ことが明らかとなった。0.2 µg/kg、20 µg/kg、2000 µg/kg で比較したところ、濃度依存的に CB の mRNA の発現量の増加が認められた (図12)。一方、GABA-B 受容体の遺伝子に関しては 1 型と 2 型とも、EE 投与による影響は、雌雄ともに認められなかった (図 8)。

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。発育期におけるエストロゲン様化学物質の曝露は、曝露される容量が多いほど一過性の発育遅延の誘導と生涯に渡る脳の性分化異常を誘導するリスクが高くなることを示している。

USV による結果は、雌における影響は「雄的パターンへの接近」であることが挙げられる。この影響パターンは POA における CB を指標とした雌雄差への影響と同じ傾向である。これらの結果は、上述したように、哺乳類の脳の性は原則的に雌であり、雄は発育期のステロイドホルモンによって作られる性であることを指示しており、

それ故にエストロゲン作用を持つ EE の発育期曝露は避けなければならない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、単回であったとし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、特に本来は発育期のエストロゲン曝露から免れているはずの雌がこの作用を受けてしまうと、大きな影響を受けてしまう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

シンポジウム「生殖・発生・行動と化学物質」、新生仔マウスへの化学物質曝露が及ぼす性分化と生後神経新生への影響。第 106 回日本繁殖生物学会大会 (府中、東京)

新生仔マウスの内分泌攪乱物質投与がおよぼすカルシウム結合蛋白質含有細胞の性的型への影響。第 157 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集、P331 (2014)

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

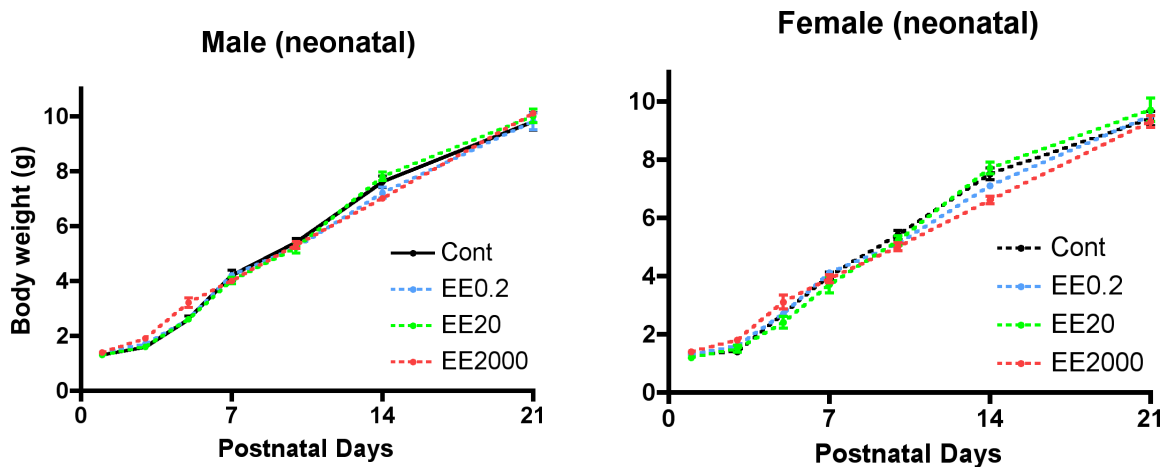


図1：新生仔マウスへのEEによる授乳期の体重変化

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol(EE)0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EE0.2)、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EE20)、EE 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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。

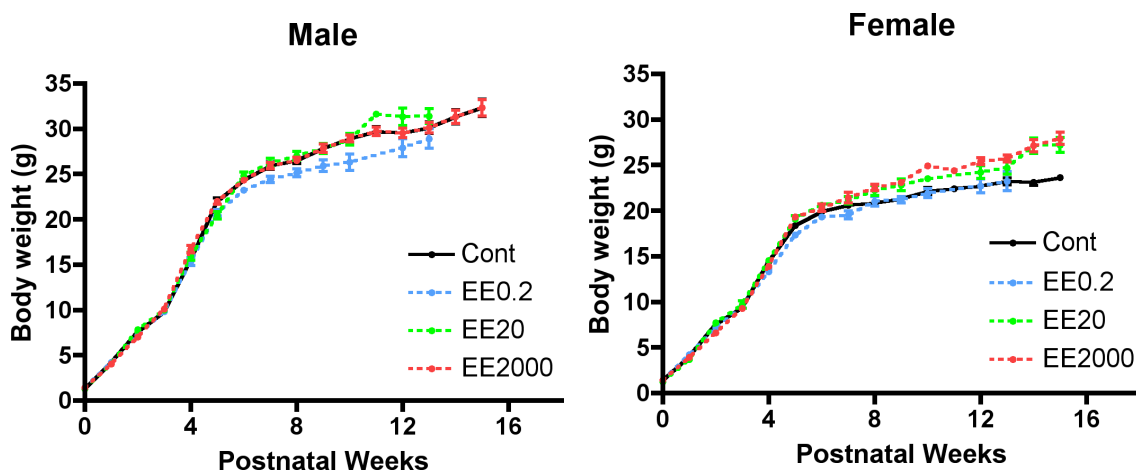
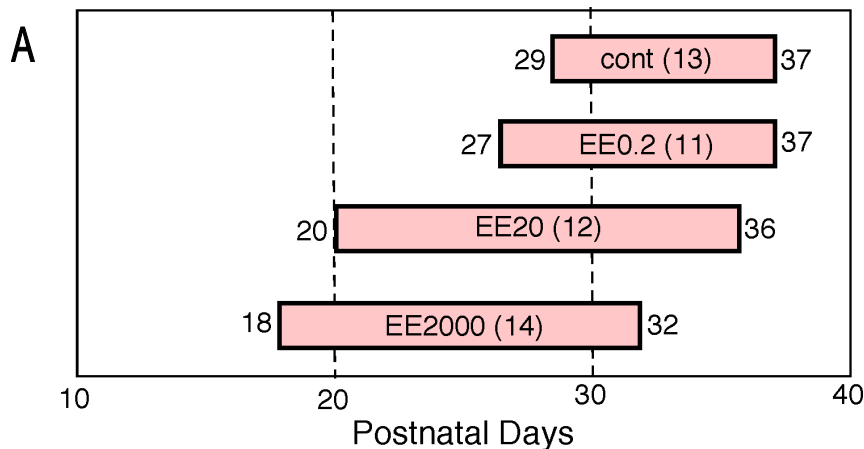


図2：EE投与が及ぼす生涯の体重変化への影響

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol(EE)0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EE0.2)、EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (EE20)、EE 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (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 ± 0.8	32.3 ± 1.0	29.6 ± 1.3	25.0 ± 1.3
BW at vaginal opening (g)	19.5 ± 0.5	17.8 ± 0.4	17.0 ± 0.8	12.3 ± 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。

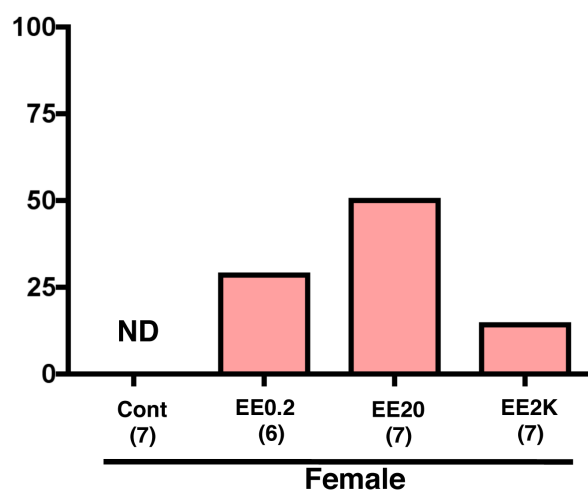


図4：発情雌との接触におけるEE処置雌マウスのUSV発声

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) 2 μ g/kg(EE0.2)、EE 20 μ g/kg(EE20)、EE 2,000 μ 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。

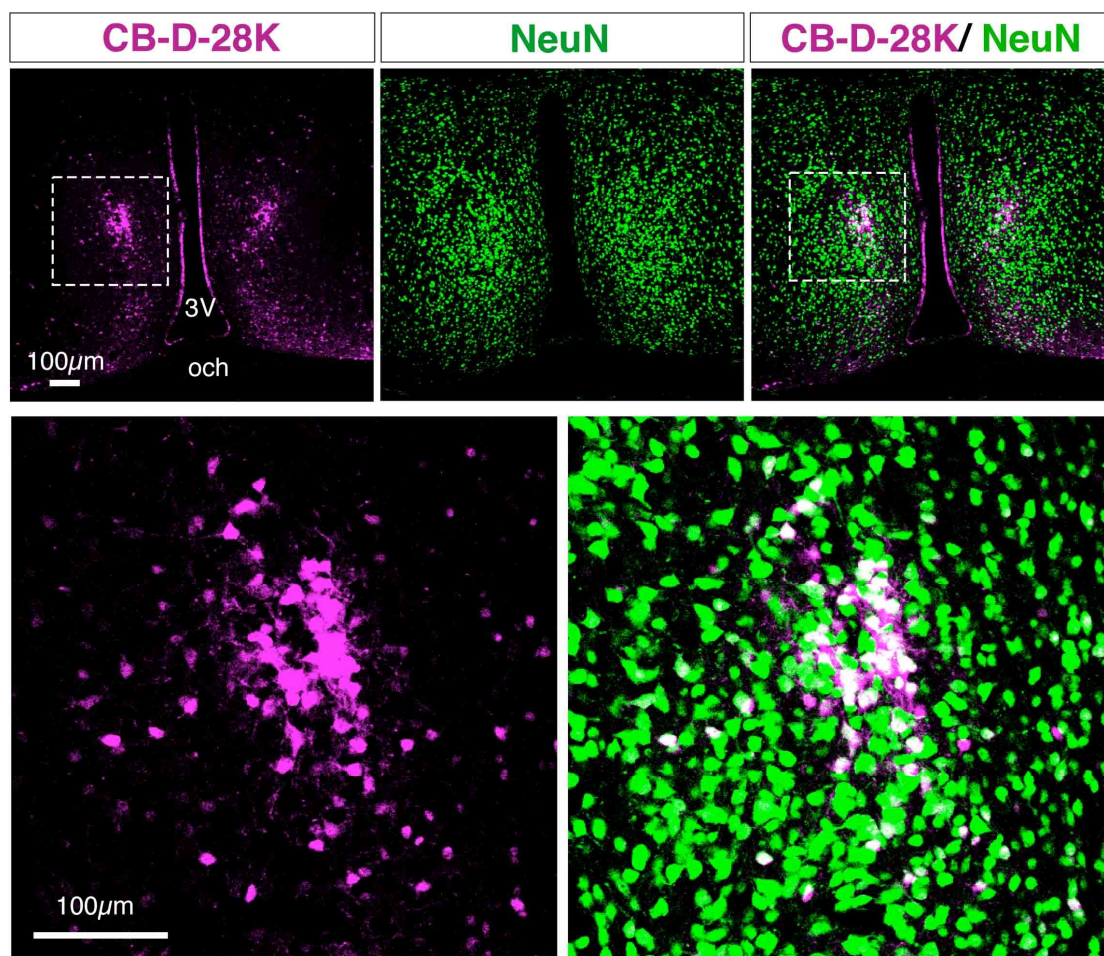


図6：内側視束前野にみられる Calbindin 免疫陽性細胞の塊は神経細胞である。

対照群マウスの内側視束前野（POA）における Calbindin（CB）とニューロンマーカである NeuN の二重免疫組織化学の結果を示す。CB 免疫陽性細胞（紫色）のすべてが NeuN 免疫陽性細胞（緑色）であることを判る。このことは、POA に認められる CB 免疫陽性細胞の塊は神経細胞であることを示している。

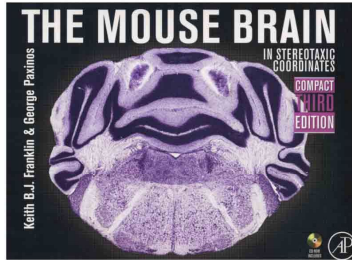


Figure 30

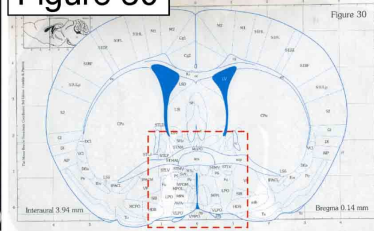


Figure 34

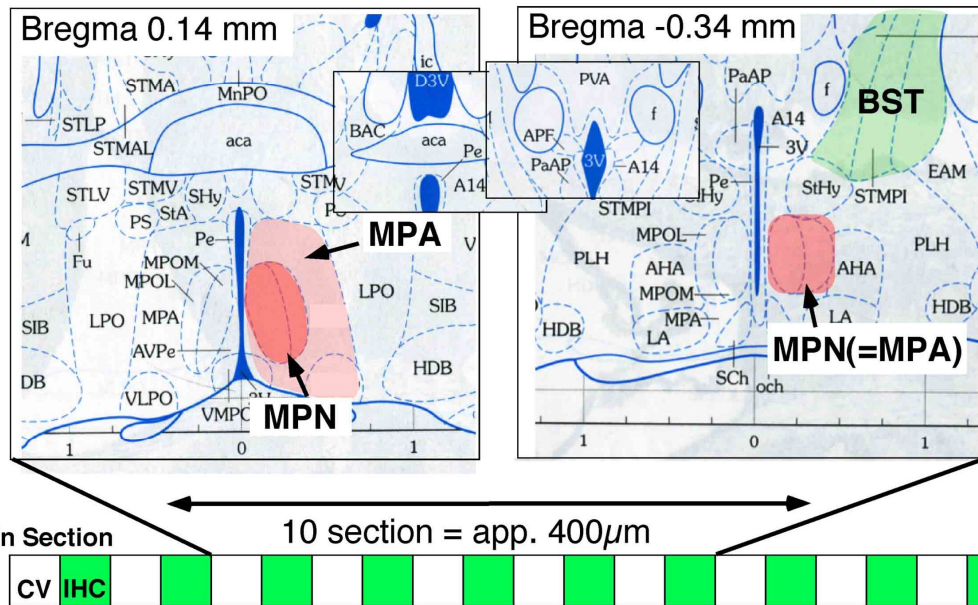
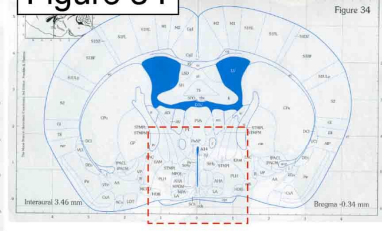


図7：内側視床前野に Calbindin 免疫陽性細胞の分布パターンの解析。

EE 投与が誘導する成熟後マウス内側視床前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布パターンを解析するために、1枚間隔 (40 μ m 間隔) で免疫組織化学を施した切片とニッスル染色した切片を用いた。緑色がCBの免疫組織化学、白抜きがニッスル染色した隣接切片。前公連 (MnPO) の位置 (Bregma +0.14mm) から分界状床核 (BST) が現れる位置 (Bregma -0.34mm) の間に含まれる全ての切片を解析した。

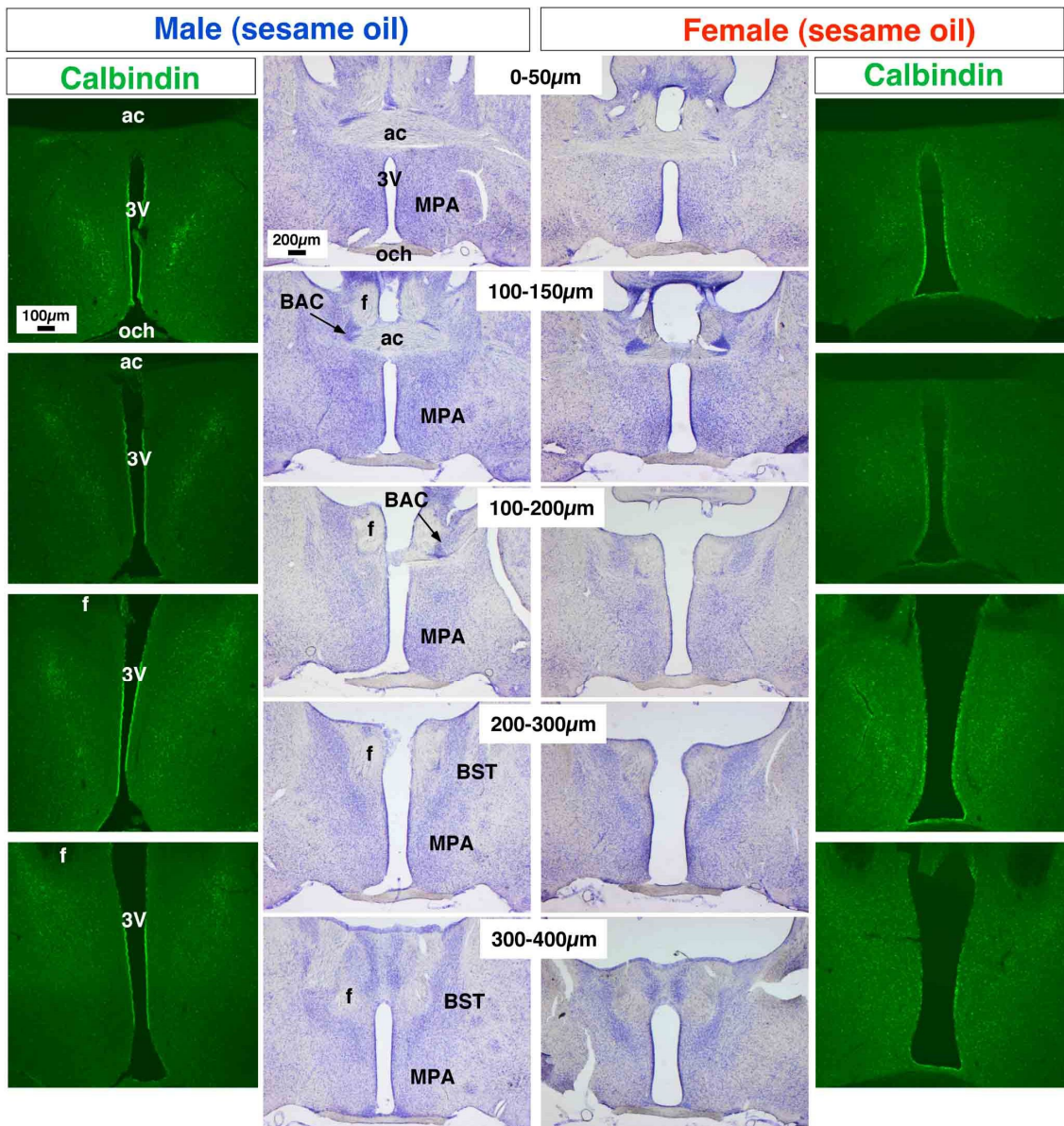


図 8 : 対照群の内側視束前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図 7 に基づいて内側視束前野 (POA) の連続切片を示す。

雄では、POA の前方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が確認できる。一方、雌ではそのような塊は確認できない。Calbindin シリーズ (緑色写真) は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真は、ニッスル染色による POA の組織構造。雌雄間で POA における脳の構造的性差 (性的二型) は認められないことがわかる。

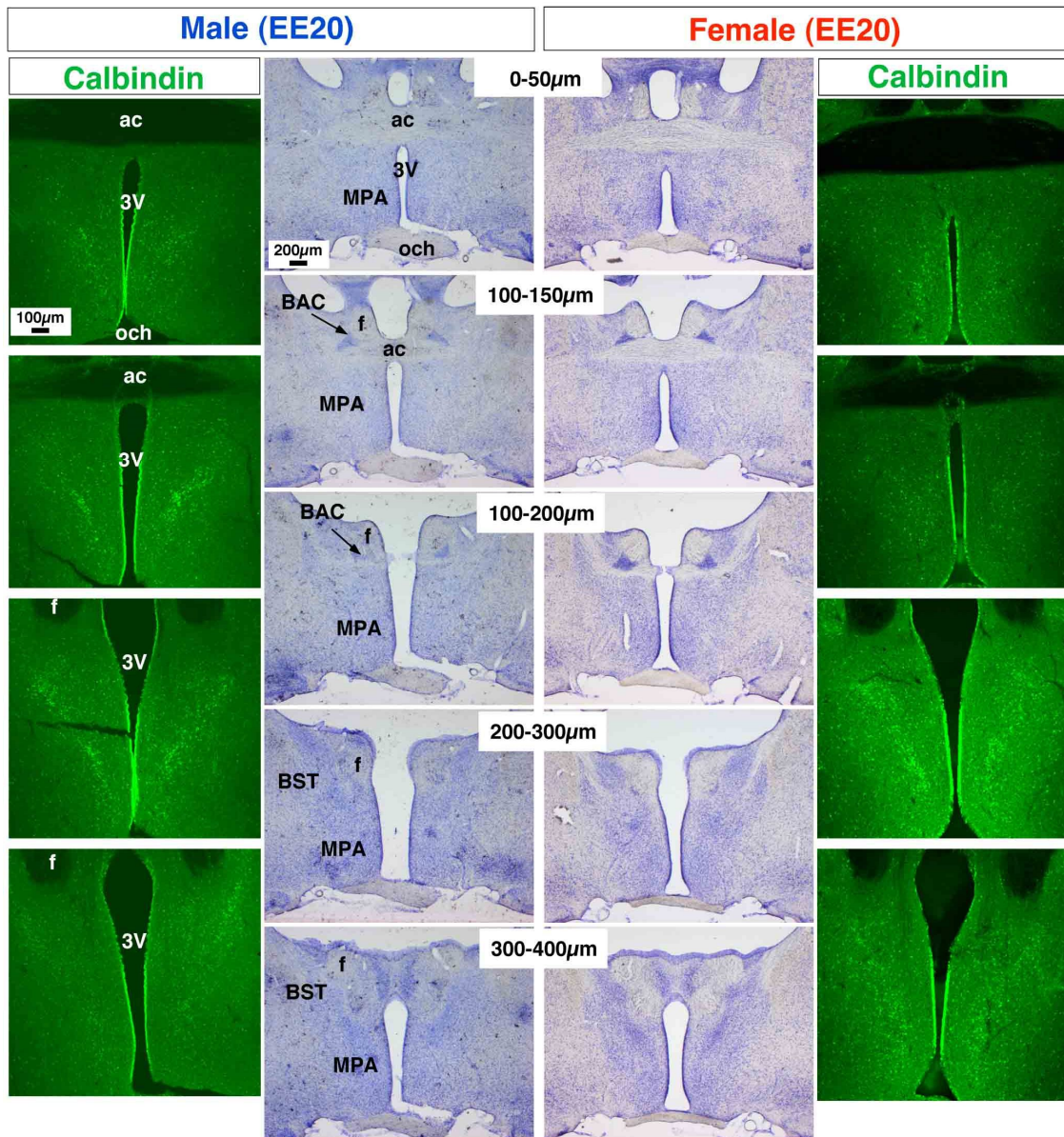


図9：新生仔 EE20 μ g/kg 投与の内側視束前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図7に基づいて内側視束前野 (POA) の連続切片を示す。

EE20 μ g 投与によって、雄では POA の前方からやや後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊がシフトしていることが確認できる。一方、雌では本来は確認できない POA の後方に CB の塊が確認できる。対照群と同様、雌雄間で POA における脳の構造的性差 (性的二型) は認められない。Calbindin シリーズ (緑色写真) は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真はニッスル染色による POA の組織構造。

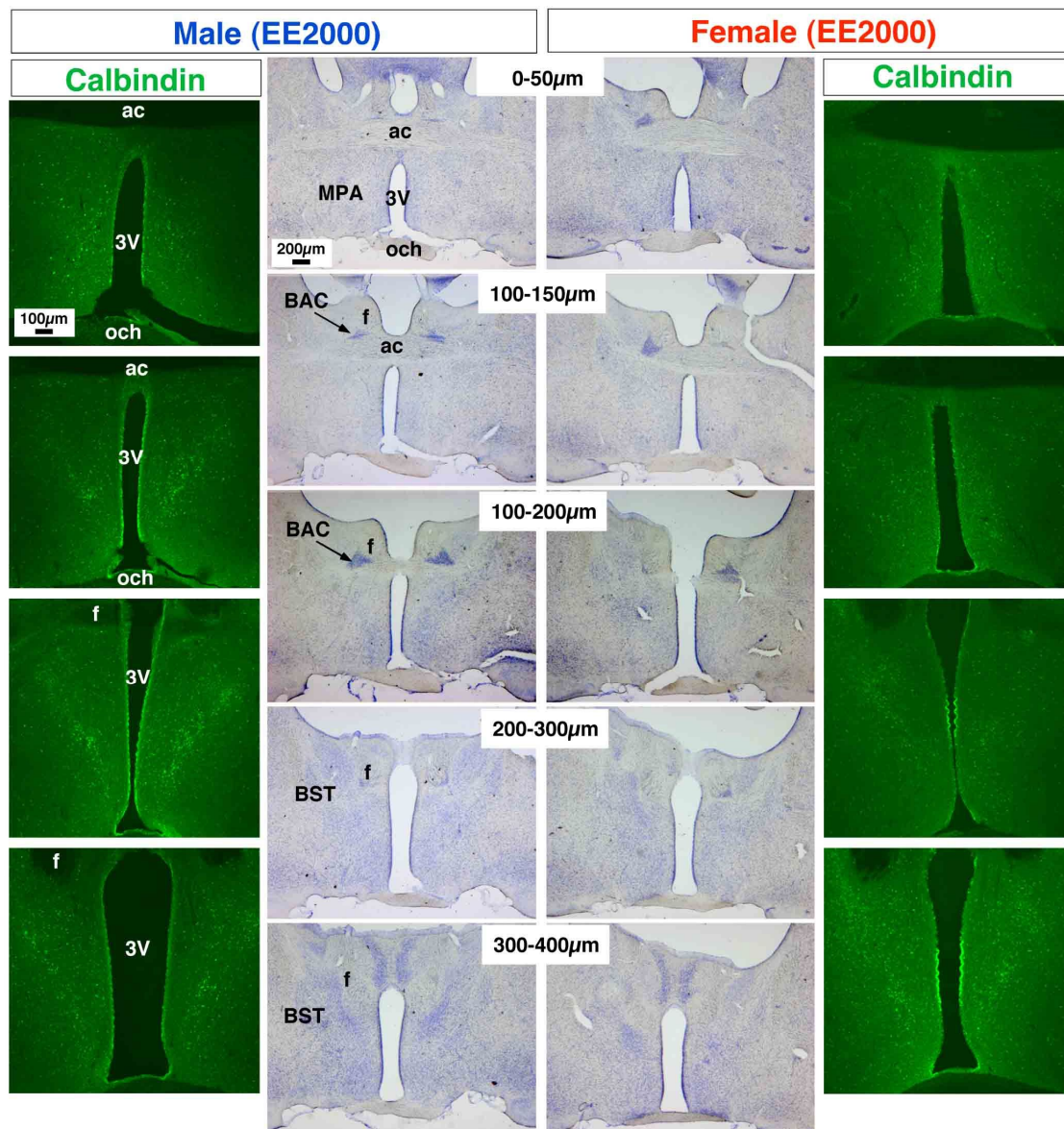


図 10 : 新生仔 EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与の内側視東前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図 7 に基づいて内側視東前野 (POA) の連続切片を示す。

EE2000 μg 投与によって、雄では対照群と比較して (図 8) POA の前方から後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊がシフトしていることが確認できる。一方、雌では本来は確認できない POA の後方に CB の塊が確認できる。対照群と同様、雌雄間で POA における脳の構造的性差 (性的二型) は認められない。Calbindin シリーズ (緑色写真) は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真はニッスル染色による POA の組織構造。

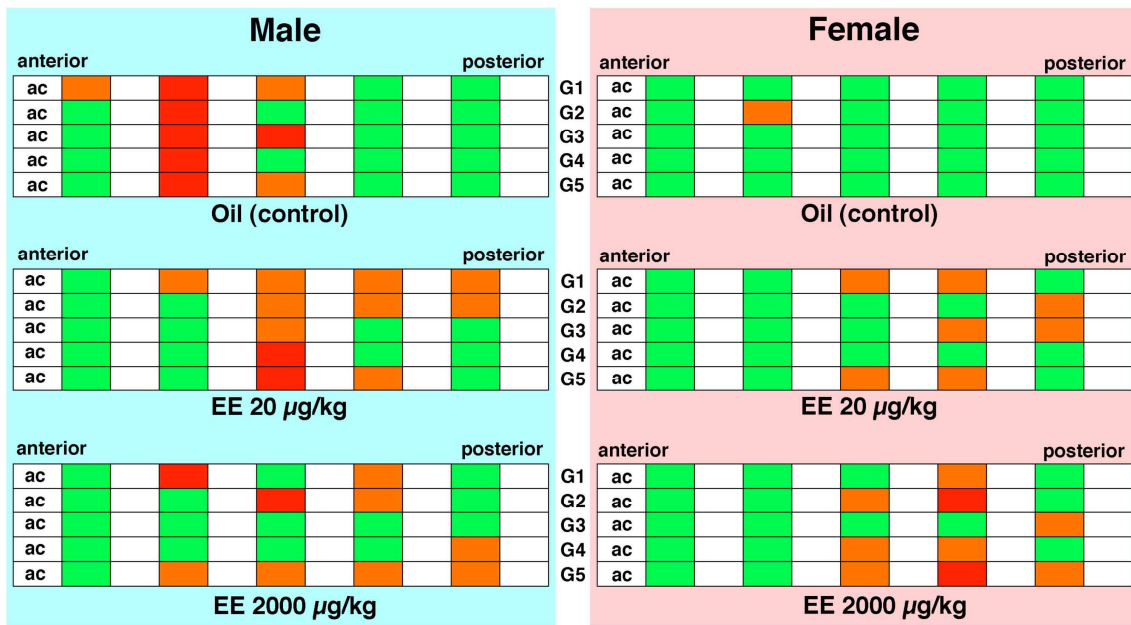


図 11: EE 単回投与によって誘導される内側視床前野の Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の塊のピークの後方シフトを示す解析。

赤の四角は CB 免疫陽性細胞の塊が最もよく観察された切片 (CB 細胞の塊のピーク)、オレンジの四角はやや弱い CB 免疫陽性細胞の塊が観察された切片。緑色の四角は CB 細胞の塊が観察されない切片。EE 投与によって、雄では CB 陽性細胞の塊のピークが EE 投与濃度依存的に消失している。一方雌では、CB 陽性細胞の塊が EE 投与濃度依存的に POA の後方に出現している。

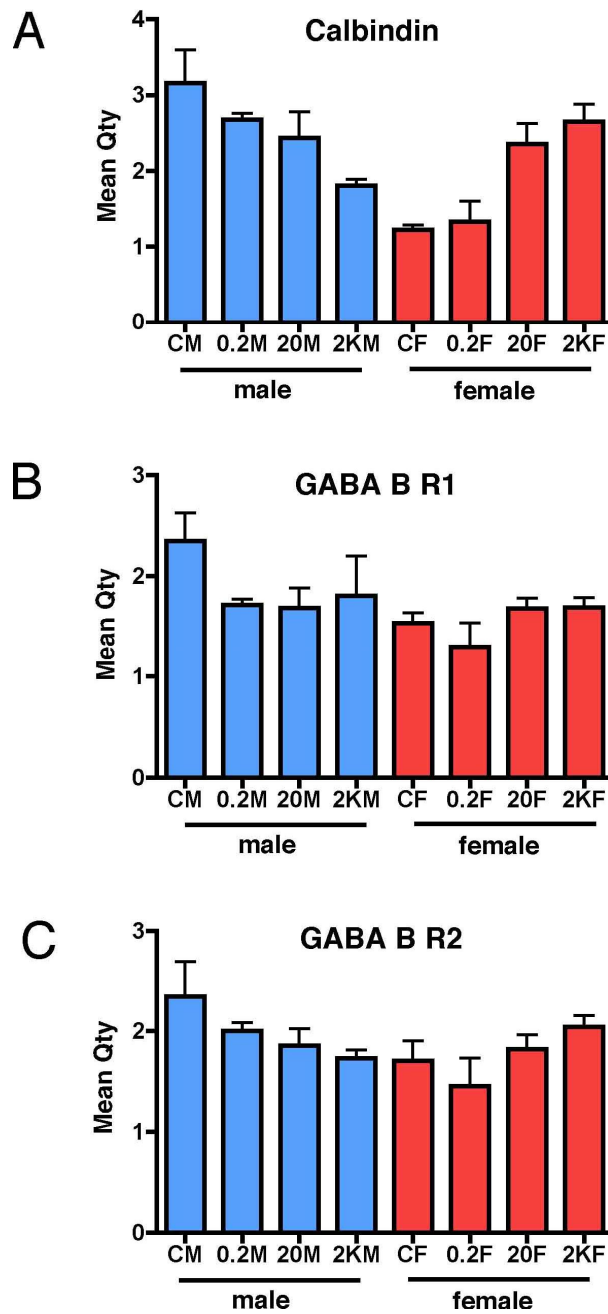


図 12 : EE 単回投与による成熟後の視床・視床下部領域における Calbindin と GABA-B 受容体 (1 型、2 型) の遺伝子の発現量への影響。

(A): Calbindin の mRNA は、雌において、EE の投与濃度依存的に遺伝子の発現量の増加が認められる。しかし、雄ではやや減少傾向はみられるが、統計学的には変化は認められない。(B) GABA-B 1 型受容体遺伝子は、雌雄差と EE 濃度群による影響は認められない。(B) GABA-B 2 型受容体遺伝子に関しても、1 型同様に雌雄差と EE 濃度群による影響は認められない。

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

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

分担研究課題：化学物質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	農学部農学科	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	
	堀井康行	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	中村孝博	学校法人明治大学	農学部生命科学科	動物生理学研究室
	溝口康	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室
	小峰千亜希	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	志賀健臣	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室

研究要旨

本研究は臨界期にエストロゲン様物質を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とする。具体的にはエストロゲン様物質である 17α -ethynyl estradiol (EE) を生後 24 時間以内あるいは生後 28 日間、ならびに Triphenyl phosphate (TPhP) を生後 28 日間曝露し、各種神経行動学的解析を行った。その結果、雌ラットへの生後 24 時間以内の EE 曝露は、縄張り行動試験においては高濃度の 2 mg/kg EE 曝露量で影響を及ぼすこと、受動回避学習試験では、エストロゲン存在下でのみ遅発影響誘発量である 20 μ g/kg EE 曝露により学習成績が低下する一方、高濃度 EE 曝露では影響を及ぼさないことが示された。また、成熟雌の海馬において EE 曝露によりエストロゲン受容体 (ER) α 発現はエストロゲン存在下でのみ低下する一方、ER β 発現はエストロゲン非存在下でのみ低下し、大脳皮質では EE 曝露によりエストロゲン非存在下でのみ ER α 発現が低下した。幼若期の海馬では EE 曝露による ER α ・ER β 発現が低下した。また、28 日間の 15 μ g/kg EE 曝露は卵巣の発達を抑制し、成熟後の性行動中の雌特異的な性行動を抑制することを明らかにした。さらに、TPhP は、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示した。加えて、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明らかとした。

A. 研究目的

エストロゲンは脳に構造的、機能的な変化を引き起こすことが知られ、その作用は形成作用と活性作用とに分けられると考えられている (図 1)。エストロゲンの形成作用は出生前後の一時期におこる不可逆的なもので、未発達で可塑性に富んだ神経組織に作用して神経細胞の形態や神経回路を固定化する (1, 2)。従って、この時期にエストロゲン様作用をもつ化学物質 (EDs) に曝露されると、正常な脳の分化が阻害される場合がある (3, 4)。一

方、活性作用は神経細胞や神経回路の活動を賦活するもので、可逆的である。多くの場合、ホルモンによって形成作用が引き起こされる神経機構に対し、発達後に活性作用が認められる。エストロゲンが形成作用を及ぼす神経機構は、生殖、摂食、情動、学習と多岐にわたり (図 2) その多くは遅発型影響である (5, 6)。しかし発達期 EDs 曝露が引き起こす神経機構への遅発型影響の機序は一部しか解明されていない。

川口らの今までの研究において、生後 24 時

間以内の 17 α -ethynyl estradiol(EE)投与では、性行動および性選好性といった生殖行動に関しては、性周期を早期に停止させる遅発影響誘発量 (7) では十分影響せず、それより 100 倍高い濃度で性行動の低下を引き起こすことが示されている。一方、無処置 6~8 週齢における受動回避学習試験において、遅発影響誘発量で学習成績が低下することも明らかとしている。

そこで本研究では、今まで生後 24 時間以内の EE 皮下投与により確立した実験系を進展させ、卵巣へのエストロゲン様物質曝露の影響を排除するために卵巣摘出 (OVX) してエストロゲン量をコントロールしたラットを用い、受動回避学習試験、学習行動調節機構の一部である海馬および大脳皮質におけるエストロゲン受容体 (ER) α ・ β 発現、縄張り行動試験、床敷きのみを刺激とした性選好性試験、雄ラットとの性行動試験および雌ラットとの性行動試験を、生後 24 時間以内の EE 曝露 [実験 1-1]、あるいは生後 1 日から 28 日間の EE 曝露 [実験 2] で検討した。さらに、実際にハウスダストなど環境中に存在する難燃剤の一つで *in vitro* でエストロゲン様作用を示している triphenyl phosphate (TPhP) (8) の生後 1 日からの 28 日間曝露の影響 [実験 2] についても検討した。

加えて本研究では早期指標の確立をめざし、生後 24 時間以内に EE を皮下投与し、幼若期の海馬および大脳皮質の ER α ・ER β 発現が成熟期と同様に変化しているか否か検討した [実験 1-2]。また、行動学的早期指標の確立を目指し、幼若期の母子分離誘発蹄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 [実験 3]。

B. 研究方法

[実験 1: 生後 24 時間以内単回 EE 曝露試験]

生後 24 時間以内の Wistar-Imamichi 系雌ラットに Sesame oil に溶解した 17 α -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA) 20 μ g/kg (low EE) 2 mg/kg (high EE) 陽性対照として 17 β -estradiol (E2, Sigma Aldrich, USA) 20 mg/kg、あるいは Sesame oil (oil) を各々皮下投与した。陽性対照である E2 は、繁殖行動の一部を司る視床下部の性的二型核

SDN-POA の雌における大きさを、雄と同じくらしいの大きさにすることが報告されている濃度を用いた(9)。これらの動物は、一腹あたり 8 匹ずつになるよう調整し、生後 21 日齢で離乳させた。

[実験 1-1: 成熟期への影響]

卵巣への EE 曝露の影響を排除するために、10 週齢で卵巣摘出 (OVX) を行い、以下の実験に供した。

<縄張り行動試験> OVX し EB 5 μ g/0.1 ml および P 500 μ g/0.1 ml を投与して発情誘起した 14~15 週齢雌ラットを用いた。ステンレス製格子等で 3 部屋に区切られた黒色塩化ビニル製 3 チャンバーケージを実験に用い (図 3) 試験前に予め動物を慣らした。縄張り行動である排尿を数値化するため、相手雄あるいは相手発情雌近傍でテストラットが排出した尿をろ紙で吸収し、ニンヒドリン試薬により染色された面積を ImageJ にて解析した。相手雌雄ラットは同週齢の Wistar-Imamichi 系ラットを用いた。相手雌ラットは OVX し EB 5 μ g/0.1 ml および P 500 μ g/0.1 ml を投与して発情誘起した。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手ラットの組み合わせは 1 回目と 2 回目を変えた。

<受動回避学習試験> OVX あるいは OVX して獲得試行の 24 時間前に estradiol benzoate (EB) 投与した 16~17 週齢雌ラットを用い、受動回避学習試験装置 (実験箱 PAA-3001、コントロール装置 PA-2010 A、小原医科産業株式会社、図 4) にて嫌悪刺激の 24 時間後における学習成績について検討した。

<ER α ・ER β 発現量測定> OVX あるいは OVX してサンプリング 24 時間前に EB 投与した 14~19 週齢雌ラットの海馬と大脳皮質における ER α および ER β タンパク質発現量を Western blot 法にて検討した。凍結組織より Mammalian Protein Extraction Buffer (GH Healthcare) と Inhibitor Cocktail kit (Thermo Scientific) を混和した抽出 Buffer で抽出し、2-D Quant Kit (GE Healthcare) のプロトコルに従い定量を行った。40 μ g/ μ l のタンパク質を SDS-PAGE を用いて分離した。免疫染色には一次抗体 (Anti-ER α 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Anti-ER β 1:2000, Abcam, GAPDH 1:5000, Santa Cruz Biotechnology) 二

次抗体 (Anti-rabbit 1:10000、Promega、Anti-mouse 1:10000、Promega) を用いて反応させた。検出には LAS-4000 IR multi color (Fujifilm) を用い、バンドの濃さからタンパク量を比較した。

〔実験 1-2：幼若期への影響〕

<ER α ・ER β 発現量測定> 早期指標の確立をめざし、2 週齢雌ラットの海馬および大脳皮質をサンプリングし、〔実験 1-1〕<ER α ・ER β 発現量測定> と同様に ER α および ER β タンパク質発現量を Western blot 法にて検討した。

〔実験 2：生後 28 日間 EE・TPhP 曝露試験〕

Wistar-Imamichi 系雌ラットに対して、Sesame oil、Sesame oil に溶解した EE あるいは TPhP (和光純薬工業株式会社) を生後 24 時間以内から 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 μ g/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 oil (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。8 週齢時に 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 EB を 0.5 μ g/0.1 ml、さらに 4 時間前に Progesterone を 500 μ g/0.1 ml、それぞれ皮下投与し、発情誘起を行った。

<床敷きを刺激とした性選好性試験> 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> 雄ラットとの性行動試験終了から 1 週間後、再び試験雌ラットへ発情誘起処置を行い、雄ラットとの性行動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。

〔実験 3：母子分離誘発啼鳴反応試験における性差の検出〕

<母子分離誘発啼鳴反応試験> 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 (図 5)。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〕

動物実験は明治大学農学部動物実験委員会委員の許可の下で行った。行動実験はラットに対し堪え難い程の苦痛を与えないレベルで行った。

C. 研究結果

〔実験 1：生後 24 時間以内単回 EE 曝露試験〕

〔実験 1-1：成熟期への影響〕

縄張り行動試験において、E2 曝露で雄近傍での排尿面積が有意に増加した (図 6)。また、2 mg/kg EE 曝露でも増加傾向が表れた。

受動回避学習試験においては、実験 24 時間前に EB を投与した条件下では、20 μ g/kg EE 曝露で学習が低下傾向を示した (図 7)。しか

し実験 24 時間前に EB 投与を行わない場合は学習への影響は検出されなかった (図 8)。

海馬では、実験 24 時間前の EB 投与をした場合に、生後 24 時間以内の EE 曝露で ER α 発現量が減少した (図 9)。しかし、実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合は生後 24 時間以内の EE 曝露の影響は認められなかった (図 9)。一方、ER β 発現量は実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合にのみ EE 曝露により減少し、EB 投与した場合は E2 曝露でのみ減少した (図 10)。大脳皮質では、実験 24 時間前 EB 投与をした場合の群間の差は検出されなかったが (図 11)、実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合は生後 24 時間以内の EE 曝露で ER α 発現量が減少した (図 11)。しかし ER β 発現量には EE あるいは E2 曝露の影響は表れなかった (図 12)。

〔実験 1-2：幼若期への影響〕

2 週齢において、海馬では、生後 24 時間以内の EE 曝露で ER α および ER β 発現量が減少した (図 13、14)。一方、大脳皮質では、ER α 発現量における群間の差は検出されなかったが (図 13)、ER β 発現量は高濃度 EE 曝露により増加した (図 14)。

〔実験 2：生後 28 日間 EE・TPhP 曝露試験〕

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、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 (図 15)。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 15)。

雄ラットとの性行動試験では、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、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 (図 16A)。また、試験雌ラットの Lordosis 商に群間で差が認められ、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 (図 16B)。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、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

(図 16C)。さらに Hopping 発現回数に群間で差が認められ、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 (図 16D)。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 16D)。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 (図 16E)。

雌ラットとの性行動試験では、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 (図 17A)。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 (図 17C、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 (図 17B)。

〔実験 3：母子分離誘発蹄鳴反応試験における性差の検出〕

0 週齢 WI 雌ラットにおいて、ジアゼパム 1 ml/kg 投与による母子分離誘発蹄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

前プロジェクトで報告した生後 24 時間以内の EE 曝露において、生殖行動試験である性選好性試験、性行動試験結果と同様、縄張り行動試験においても高濃度の EDs 曝露でのみ影響が示された。従って、生殖行動に対しては濃度依存的に高濃度で影響が表れるものと考えられる。

受動回避学習試験では、エストロゲン存在下で遅発影響誘発量曝露群における学習能力が低下傾向を示した。本実験では、受動回避学習試験と同じエストロゲン存在下で主要な学習行動調節機構である海馬の ER α 発現が生後 24 時間以内の EE 曝露により低下していることを示している。従って、生後 24 時間以内の EE 曝露による受動回避学習試験の成績低下の少なくとも一部は、海馬における ER α 発現量低下を反映している可能性がある。また、我々は前プロジェクトで、無処置動物における受動回避学習試験においても遅発影響誘発量曝露が学習行動を低下させたことを明らかとしている。今回の結果は、その原因の一部

が海馬のER α 発現量変化に起因している可能性も示した。また、その海馬の変化は幼若期から表れていることが示された。

生後24時間のEE曝露により、ER α 発現量は、海馬ではエストロゲン存在下で、大脳皮質ではエストロゲン非存在下で減少した。一方ER β 発現量は、海馬ではエストロゲン非存在下で減少し、大脳皮質ではいずれの条件でも変化が認められなかった。さらに幼若期で認められた変化は必ずしも成熟期の変化と同様なものではなかった。従って、ER発現への生後24時間以内のEDs曝露の影響は脳領域、時期およびサブタイプにより異なり、さらにエストロゲンの機能的作用も部位特異的に変化させる可能性が示された。

生後28日間EEを経口投与した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。このEE曝露濃度の一日当たりの投与量は、前プロジェクトでは性選好性試験や性行動試験に影響を及ぼさなかった生後24時間以内の20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与より少なく、体内吸収も少ない経口投与であるが、反復して曝露することにより脳を雄型化する可能性が示唆された。

一方、生後28日間のTPhP経口投与は、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。雄との性行動試験においては、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

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

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

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) Kamata, S., Yamamoto, J., Kamijo, K., Ochiai, T., Morita, T., Yoshitomi, Y., Hagiya, Y., Kubota, M., Ohkubo, R., Kawaguchi, M., Himi, T., Kasahara, T., and Ishii, I. Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014; 58 (6):1309-21
- 2) 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
- 3) Shiga, T., Nakamura, T.J., Komine, C., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. A single neonatal injection of ethinyl estradiol impairs passive avoidance learning and reduces expression of estrogen receptor α in the hippocampus and cortex of adult female rats. *PLoS One.* 2016 Jan 7; 11(1):1-11
- 4) Komine, C., Kondo, Y., Horii, Y., Yoshida, M., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethinyl estradiol exposure on female paced mating behavior in rat. (*Journal of Applied Toxicology* へ投稿予定)

2. 学会発表

- 1) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Harigaya, T., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Effects of antiandrogen on sexual behavior, organ weight and hormone levels of male rats.: The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 2) Shiga, T., Kawaguchi, M., Harigaya, T., Mizoguchi, Y.: Ethynyl estradiol exposure within 24 hours of birth affects Estrogen receptor α expression levels in adult female rats.: The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)
- 3) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on feeding, learning and sexual behavior.: 第36回日本神経科学大会 (2013年6月22日、京都)
- 4) 川口真以子, 小峰千亜希, 神島愛未, 近藤保彦: Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on sexual behavior.: 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013年9月12日～14日、東京)
- 5) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on feeding, learning and sexual behavior in female rat.: 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 6) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Antiandrogen during juvenile induce hypoplasia of penis and supression of sexual behavior of male rats.: 4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)
- 7) Shiga, T., (Nakamura, T. J., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.): Neonatal exposure to ethynyl estradiol influences the expression levels of estrogen receptor α in the adult brain of female rats.: Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 8) Komine, C., Kamishima, M., Odashima, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. (Kawaguchi, M.): Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on partner preference and sexual behavior in female rats.: Neuroscience 2013 (2013年11月8日～13日、San Diego, U.S.A.)
- 9) Shiga, T., Nakamura, T. J., Chiaki, K., Kamishima, M., Goto, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Mizoguchi, Y., Kawaguchi, M.: Exposure to ethynyl estradiol within 24 hours of birth decreases the expression levels of ER α in adult female rats.: 第16回日本内分泌攪乱化学物質学会 (2013年12月12日～13日、東京)
- 10) 千本隆志, 神島愛未, 小峰千亜希, 吉田緑, 川口真以子: 生後24時間以内の雌ラットへの ethynyl estradiol 曝露が学習行動に及ぼす影響 日本畜産学会第118回大会 (2014年3月26～29日、つくば)
- 11) 植村英恵, 神島愛未, 堀井康行, 渡辺元, 田谷一善, 滝上英孝, 鈴木剛, 近藤保彦, 川口真以子: 幼若期及び成熟期のTDCIPP及び flutamide 慢性曝露が雄ラットの性行動, 副生殖腺重量, 血中ホルモン濃度に及ぼす影響: 日本畜産学会第118回大会 (2014年3月26～29日、つくば)
- 12) 高橋光佑, 堀井康行, 佐藤祐司, (川口真以子): 高架十字試験の構造変化に伴うラットの不安様行動の変化: 日本畜産学会第118回大会 (2014年3月26～29日、つくば)
- 13) Horii, Y., Takahashi, K., Sato, Y., Nakajima, S., Sato, K., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M.: Relationship between elevated plus maze arm structure and anxiety-like behavior in rats: the presence or absence of open arm ledges vs opaqueness of closed arm structure walls.: 第37回日本神経科学大会 (2014年9月11日～13日、横浜)
- 14) 小峰千亜希, 近藤保彦, 吉田緑, 川口真以子: 生後24時間以内の ethynyl estradiol 曝露が雌ラットの縄張り行動と社会性行動へ及ぼす影響: 第20回日本行動神経内分泌研究会 (2014年9月3日～5日、秩父)
- 15) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the the expression levels of ER α in adult female rats: 5th International NeuroMalaysia Symposium (2014年9月28日、Malaysia)
- 16) Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Yuji SATO, Sato, K., Nakajima, S., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M.: Cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats altered emotional reactivity of male offspring. Neuroscience 2014 (2014年11月15日～19日、Washington DC, U.S.A.)
- 17) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Komine, C., Goto, Y., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the learning performance and the expression levels of ER α in adult female rats: Neuroscience 2014 (2014年11月15日～19日、Washington DC,

- U.S.A.)
- 18) Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on partner preference, territorial and sexual behavior: Neuroscience 2014 (2014年11月15日～19日、Washington DC、U.S.A.)
- 19) 神島愛未、鈴木剛、滝上英孝、堀井康行、渡辺元、田谷一善、近藤保彦、川口真以子: 幼若期のtris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) と flutamide (FI) の慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、生殖器重量および血中testosterone濃度に及ぼす影響: 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 20) 小峰千亜希、吉田緑、近藤保彦、川口真以子: 生後24時間以内のethynyl estradiol曝露が雌ラットの性選好性、縄張り行動、性行動へ及ぼす影響: 第17回日本内分泌攪乱化学物質学会(2014年12月9日～10日、東京)
- 21) 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)
- 22) 立川直之、志賀健臣、中村孝博、小峰千亜希、堀井康之、渡辺元、田谷一善、溝口康、吉田緑、川口真以子: 雌ラットへの生後24時間以内 ethynyl estradiol 曝露が大脳皮質と海馬の estrogen receptor(ER) α 及びER β 発現に及ぼす影響: 第62回日本実験動物学会総会(2015年5月28日～30日、京都)
- 23) Nakajima, S., Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Sato, Y., Sato, K., Shiraiishi, 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)
- 24) 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)
- 25) 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)
- 26) 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

(予定を含む。)

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

- (1) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J, Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, Epub ahead of print.
- (2) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain., Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, et. al., *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21, 553-61.
- (3) Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, et. al., *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010, 89, 441-66.
- (4) Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences., Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, et.al., *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2008, 109, 294-9.
- (5) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice., Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, et. al., *Environ Res.* 2008, 108, 150-7.
- (6) Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data., Rasier G, Toppari J, Parent AS, et. al., *Mol Cell Endocrinol.* 2006, 254-255, 187-201.
- (7) Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethinylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats., Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, et al. *Reprod Toxicol.* 2013, 40, 16-23.
- (8) Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays., Suzuki G, Tue NM, Malarvannan G, Sudaryanto A, Takahashi S, Tanabe S, Sakai S, Brouwer A, Uramaru N, Kitamura S, Takigami H. *Environ Sci Technol.* 2013, 19, 47(6), 2898-908.
- (9) Estrogen Receptor Gene Promoter 0/B Usage in the Rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area., Hamada T and Sakuma Y, *Endocrinology*, 2010, 151(4),

図1 Estrogen (E2)が引き起こす作用



1923-1928.

図2 E2が作用する中枢神経系の機能



図3 縄張り行動試験



- 格子越しに相手ラットに接近できる3チャンパーケージを用いた。
- テストラット、雌雄相手ラットを、各部屋へ入れ、5分間観察した。

格子前にろ紙を敷き、尿を吸収させた。ろ紙にニンヒドリン5%試薬を散布し、染色された面積をImage Jを用いて解析した。

図4 受動回避学習試験装置



図5 母子分離誘発啼鳴反応試験

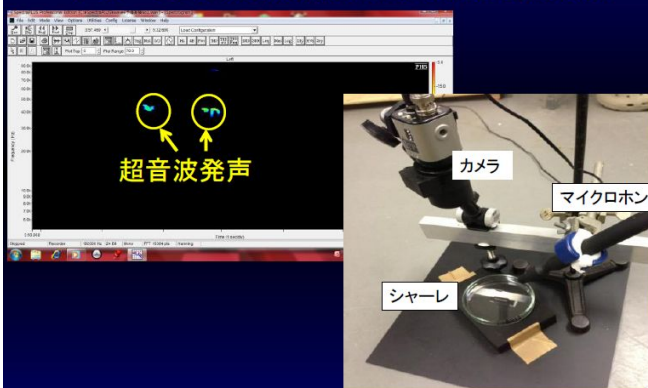


図6 縄張り行動試験結果

(Oil群における雄に対する尿面積=1)

* : p<0.05

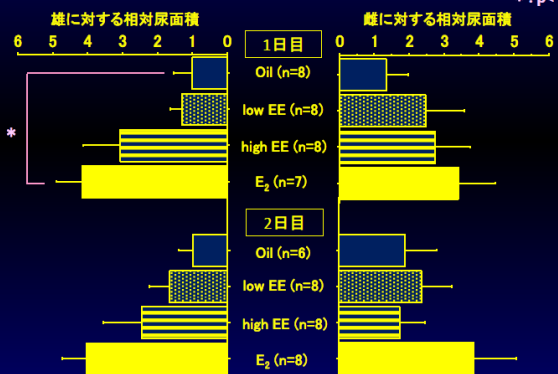


図7 EB投与時の受動回避学習試験結果

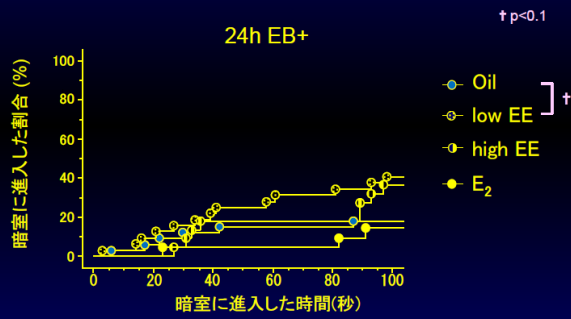


図8 EB非投与時の受動回避学習試験結果

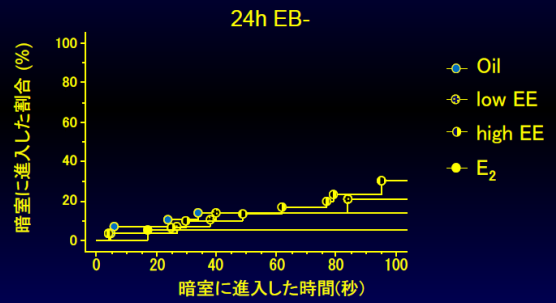


図9 海馬における成熟期ERα発現量

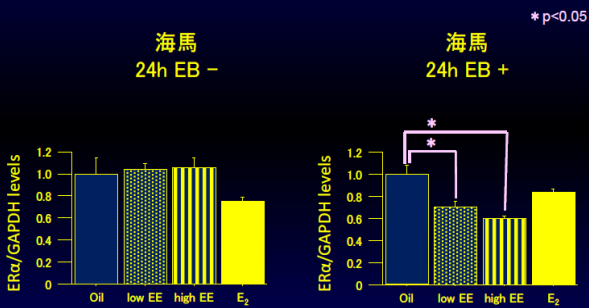


図10 海馬における成熟期ERβ発現量

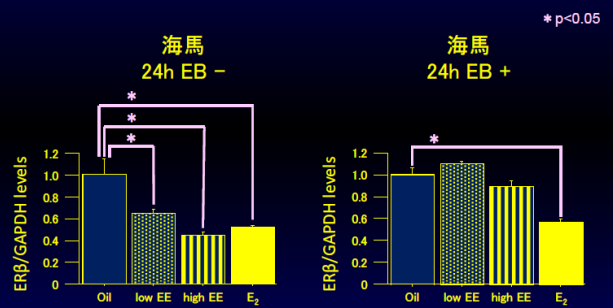


図11 大脳皮質における成熟期ERα発現量

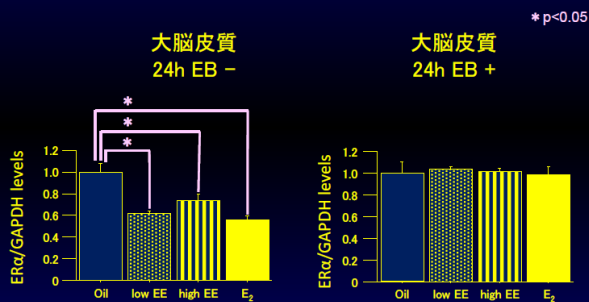


図12 大脳皮質における成熟期ERβ発現量

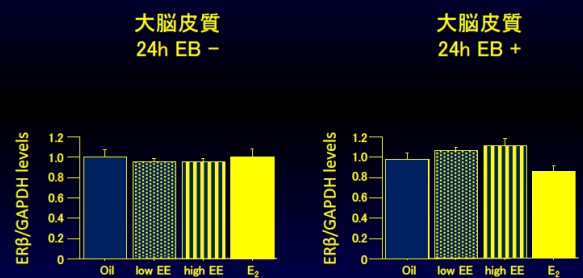


図13 大脳皮質・海馬における幼若期ERα発現量

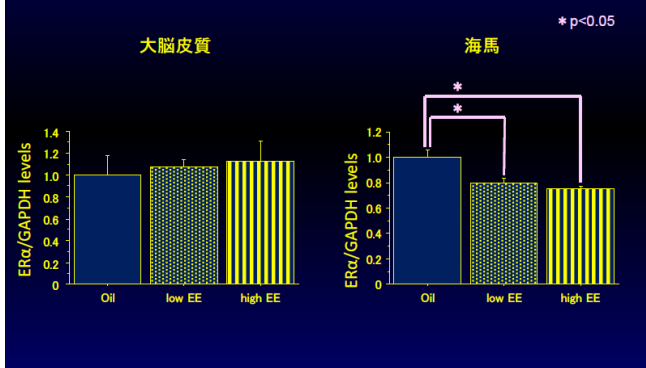


図14 大脳皮質・海馬における幼若期ERβ発現量

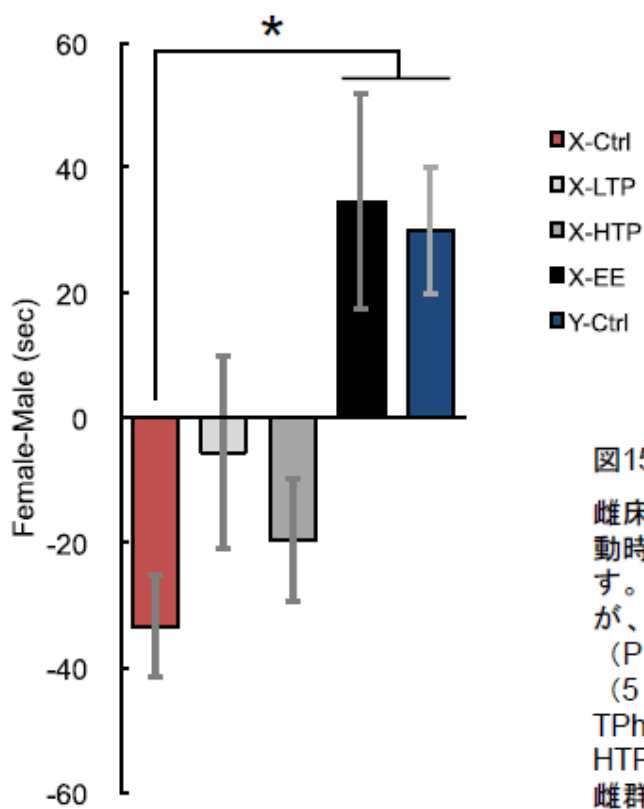
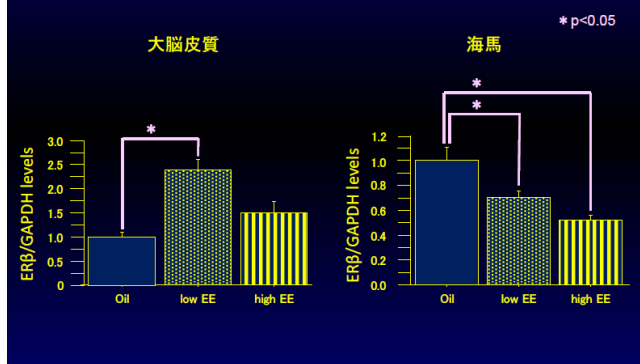


図15 12週齢時の性選好性試験の結果

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 μg /kg /day) 曝露雌群、Y-CtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雄群を示す。*: $P < 0.05$

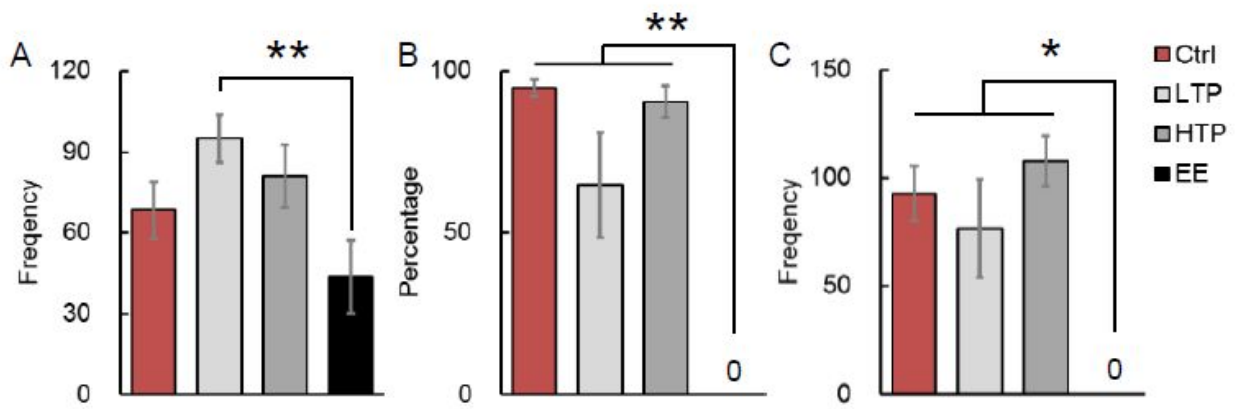


図16 12週齢時の性行動試験の結果

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 μ g /kg /day) 曝露雌群を示す。*: P < 0.05, **: P < 0.01

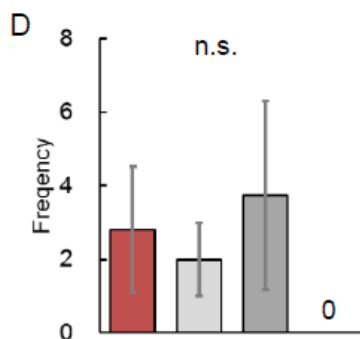
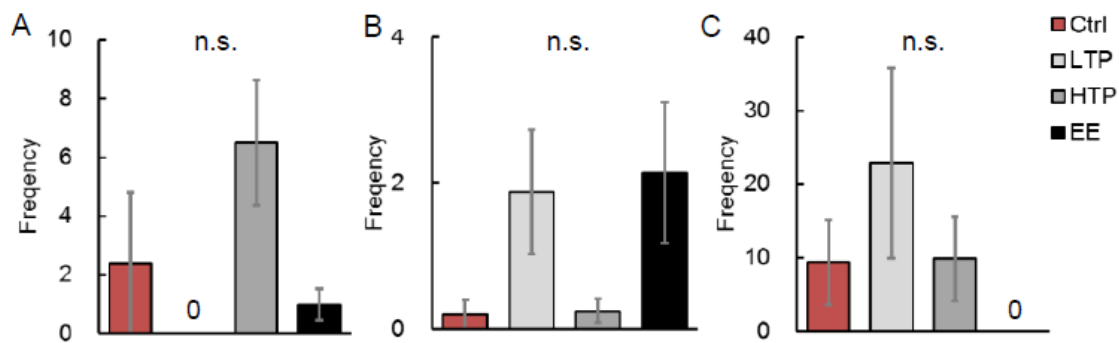
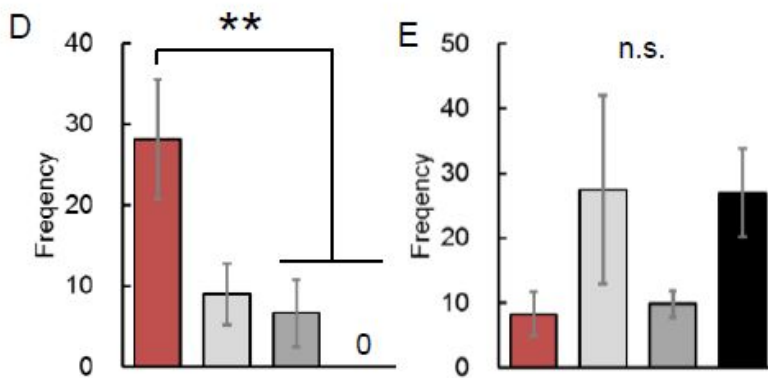


図17 12週齢時の性行動試験の結果

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 μ 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	巻・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..	Repro Toxicol.,	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 α in the Hippocampus and Cortex of Adult Female Rats.	PLoS One	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, 32, 2015.	93, 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 Toxicol	51:145-56.	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.	Reprod Toxicol.	57, 21-28	2015.
Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M.	Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats.	Journal of Toxicological Sciences	40, 727-738	2015
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

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	294:131-40	2015
Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.	Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol.	J Toxicol Sci	39, 775-784,	2014
Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M.	Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in Ptch1 Heterozygous Mice.	Toxicol Pathol.	42(8):1174-87	2014.
Nozawa K Nagaoka K, Zhang H, Usuda K, Okazaki S, Taya K, Yoshida M, Watanabe G.	Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats,	Reprod Toxicology,	46, 77-84	2014.
Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G.	Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats	The Journal of Veterinary Medical Science	76, 1105-1110,	2014.
Hayashi S, Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Matsuo S, Irie K, Watanabe G, Yoshida M.	Effects of pyperonyl butoxide on the female reproductive tract in rats.	J Toxicol Sci.	38(6):891-902.	2013
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 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats.	Reprod Toxicol.,	40, 16-23	2013
Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M.	Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1 ^{+/-} mice.	Exp Toxicol Pathol	65, 863-73	2013.
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