

新生児期エストロゲン曝露による
キスペプチンニューロンの発達障害および
雌性生殖器における遅発性影響に関する研究

2016 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

市村 亮平

目次

序論.....	1
第 1 章.....	5
緒言.....	6
材料および方法.....	8
結果.....	15
考察.....	19
小括.....	24
第 2 章.....	25
緒言.....	26
材料および方法.....	28
結果.....	33
考察.....	37
小括.....	42
第 3 章.....	43
緒言.....	44
材料および方法.....	46
結果.....	51

考察.....	56
小括.....	61
総合考察.....	62
結論.....	66
謝辞.....	67
引用文献.....	69
要旨.....	78
Abstract.....	82
図表.....	86

略語一覧

ADI	Acceptable daily intake (一日許容摂取量)
ARC	Arcuate nucleus (弓状核)
AVPV	Anteroventral periventricular nucleus (前腹側脳室周囲核)
CNS	Central nervous system (中枢神経系)
DES	Diethylstilbestrol (ジエチルスチルベストロール)
DIG	Digoxigenin (ジゴキシゲニン)
EB	Estradiol benzoate (安息香酸エストラジオール)
EDC	Endocrine disrupting chemical (内分泌かく乱物質)
EE	17 α -ethynylestradiol (17 α -エチニルエストラジオール)
ER	Estrogen receptor (エストロゲン受容体)
EV	Estradiol valerate (吉草酸エストラジオール)
E2	17 β -estradiol (17 β -エストラジオール)
FSH	Follicle-stimulating hormone (卵胞刺激ホルモン)
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)
GPR	G protein-coupled receptor (Gタンパク質共役受容体)
HE	Hematoxylin eosin (ヘマトキシリンエオジン)
IHC	Immunohistochemistry (免疫組織化学染色)
ISH	in situ hybridization (in situ ハイブリダイゼーション)
LH	Luteinizing hormone (黄体ホルモン)
NOAEL	No observed adverse effect level (無毒性量)
OVX	Ovariectomy (卵巣摘出)
PE	Persistent estrus (持続発情)
PFA	Paraformaldehyde (パラホルムアルデヒド)
PND	Postnatal day (生後日齢)
P4	Progesterone (プロゲステロン)
RLX	Raloxifene (ラロキシフェン)
SERM	Selective estrogen receptor modulator (選択的エストロゲン受容体モジュレーター)
TMX	Tamoxifen (タモキシフェン)
VO	Vaginal open (膣開口)
3V	3rd ventricle (第三脳室)

序論

人工的に産生される農薬、殺虫剤および医薬品等の化学物質の中には、内分泌機能の変調を介して集団やその子孫に悪影響を及ぼす内分泌かく乱物質（EDC）の存在が知られている。特にエストロゲン作用を有する EDC では、意図しない EDC への曝露がヒトの様々な生理機能やホルモンバランスに影響を及ぼすことから、その影響が古くから懸念されてきた[1, 2]。胎児期や新生児期における外因性のエストロゲン類への曝露は、哺乳類の内分泌系における発達過程を不可逆的に障害し、生後の視床下部-下垂体-性腺軸の形成や成熟後の生殖機能に深刻な影響を与えることが知られている[3, 4]。例えば、新生児期の雌ラットに大量のエストロゲン類を曝露させると、これらの化学物質は新生児の脳における性分化過程に直接的に影響し、生殖器系の発達異常や性周期が回らない等の様々な生殖機能障害を誘発することが知られている[5-7]。これらの変化は、性行動や生殖機能の「脱雌性化」あるいは「雄性化」と呼ばれ、いずれも出生直後～性成熟期の前後にかけてその影響がみられることが報告されている。

一方、新生児の同じ時期に、より短期間かつ少量のエストロゲン類の曝露を受けた場合は、「雄性化」とは少し異なるタイプの影響が異なるタイミングでみられることが知られている。例えば、周生期や新生児期に *p*-t-octylphenol（界面活性剤）や methoxychlor（農薬）あるいは合成エストロゲンである diethylstilbestrol（流産予

防薬)などの化学物質の曝露を受けると、性成熟期前後では生殖器系の発達や性周期に影響はみられないが、本来は加齢に伴って認められる性周期の停止時期が早期化し、これに関連した生殖機能老化の早期化や、子宮発がんリスクの増大といった遅発性の影響が認められることが報告されている[8-11]。すなわち、高用量のエストロゲンを曝露した場合は「雄性化」に代表される生殖器系への影響が即効性に発現し、一方、その曝露が低用量だった場合は性周期停止の早期化を中心とした影響が遅発性に現れるものと考えられる。これらの遅発性の影響は、1)比較的少量のエストロゲン類の周生期曝露により発現し、2)性周期の早期停止に関連した影響が性成熟後に発現することを特徴とし、過去の報告では「遅発影響」または「遅発性生殖機能障害」と総称されている[10-13]。また、遅発影響では、一般的な化学物質による生殖毒性と比較して発現時期が極端に遅いことから、既存の生殖発生毒性試験系の中でその作用を検出することが困難であり、遅発影響リスクを早期に検出できる試験系の創出が課題となっている。

遅発影響の発現機序については、「性周期の早期停止」をその特徴としていることから、視床下部の排卵制御機構に何らかの異常をきたしていることが示唆されてきたが、その詳細なメカニズムは明らかになっていない[10, 11]。そこで遅発影響の発現機序を解明するため、視床下部の排卵制御機構を GnRH のさらに上流から制御し、様々な雌性生殖機能において重要な役割を果たす分子として近年注目を集めている「キスペプチン」に着目した。キスペプチンは *KISS1* によってコードされる

神経ペプチドであり、G 蛋白共役型受容体である GPR54（キスペプチン受容体; KiSS1R）の内因性のリガンドとして発見され[14, 15], 視床下部においては GnRH および LH の放出制御に重要な役割を果たしていることが知られている[16-18]。キスペプチンニューロンは、ラットでは視床下部の前腹側脳室周囲核（AVPV）と弓状核（ARC）と呼ばれる 2 つの神経核に主に分布しており、AVPV では GnRH のサーージ状の分泌を介して排卵を制御し、また ARC では GnRH のパルス状の分泌を介して卵胞発育を促すことで、それぞれの神経核において部位特異的な役割を果たしていると考えられている[17-19]。さらに最近の研究では、キスペプチンニューロンが自身に発現するエストロゲン受容体（ER）を介し、AVPV ではポジティブな、ARC ではネガティブなエストロゲンのフィードバックを受け、キスペプチンニューロンがエストロゲンによるフィードバック機構の直接的なターゲットとなっていることが明らかになってきた[20-22]。

我々はこれまでの研究により、新生児期の雌ラットに合成エストロゲンである 17 α -ethynylestradiol（EE）を低用量で単回曝露させると、生後 10 週から 22 週齢にかけて、性周期の早期停止（加齢性に認められる異常性周期の早期発現）を特徴とした遅発影響が用量依存的に発現することを報告してきた[11]。投与により認められた異常性周期は、連続した発情期が認められる持続発情（persistent estrus ; PE）であり、加齢に伴って老齢ラットで通常認められる持続発情と類似していた。また、卵巣の組織学的な検索では卵胞発育等に異常が認められなかったことから、遅発影

響の発現には視床下部-下垂体-性腺軸における排卵の障害, 特に KiSS1/GPR54 シグナルを中心とした中枢側の要因が関連していることが示唆された。実際に, 老齢ラットや新生児期にエストロゲン曝露を受けたラットにおける KiSS1 mRNA の発現低下も報告されている[23-27]。しかしながら, これらの報告はいずれも「脳の雄型化」が生じていると考えられる高用量のエストロゲンを用いた検討であり, 低用量のエストロゲン曝露によって性周期への遅発性の影響が発現する機序, またその際のキスペプチンニューロンの変化については未だ明らかになっていない。

そこで本研究では, 低用量のエストロゲン新生児期曝露による遅発影響の発現機序の解明と, 遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにすることを目的とし, 第 1 章では, 遅発影響発現前の young adult 期におけるキスペプチンニューロン KiSS1/GPR54 シグナルの変化と, それに伴うゴナドトロピン分泌の変化を詳細に解析した。また, 第 2 章では, 遅発影響の臨界期の解明を目的とし, 生後 0~14 日齢までの様々な日齢のラットにエストロゲンを曝露し, 遅発影響発現の有無について検証を行った。さらに第 3 章では, 遅発影響発現の普遍性を検証するため被験物質を選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) に変更し, SERM 曝露による遅発影響発現の有無とエストロゲン活性との関連性について検証を行った。

第 1 章

17 α -ethynylestradiol の新生児期曝露による遅発性影響の発現に先駆けた

視床下部キスペプチンニューロンにおける KiSS1 の発現異常

緒言

哺乳類の脳では、性分化が進行する新生児期にエストロゲン作用を有する物質に曝露されると、その曝露が高用量だった場合、性行動や生殖機能の「脱雌性化」あるいは「雄性化」と呼ばれる、生殖器系の発達異常や性周期が回らない等の不可逆性の障害を誘発することが知られている[5-7]。一方、その曝露が脱雌性化用量に比較して低用量だった場合でも、性周期の早期停止によって特徴づけられる遅発性の生殖機能障害が生じることが報告されており[8-11]、意図しない新生児期におけるエストロゲン類の曝露による生殖内分泌系の発達への影響が古くから懸念されてきた[1, 2]。

遅発影響の発現機序については、「性周期の早期停止」をその特徴としていることから、視床下部の排卵制御機構に何らかの異常をきたしていることが示唆されており、視床下部-下垂体-性腺軸における排卵の障害、特に KiSS1/GPR54 シグナルを中心とした中枢側の要因が関連していると考えられる。実際に、老齢ラットや新生児期にエストロゲン曝露を受けたラットにおける KiSS1 mRNA の発現低下も報告されている[23-27]が、これらの報告はいずれも高用量のエストロゲンを用いた検討であり、低用量のエストロゲン曝露によって性周期への遅発性の影響が発現する機序、またその際のキスペプチンニューロンの変化については未だ明らかになっていない。

そこで第1章では、遅発影響の発現機序の解明と、遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、遅発影響発現前の young adult 期におけるキ

スペプチンニューロン KiSS1/GPR54 シグナルの変化と、それに伴うゴナドトロピン分泌の変化を詳細に解析した。また、遅発影響で認められる性周期異常が、加齢に伴う自然発生性の性周期異常に類似していたことから、遅発影響と老化に伴って認められる加齢性変化を相互に比較するため、加齢性の性周期停止が認められる週齢（約 22 週齢）の動物を用い、同様にキスペプチンニューロンおよびゴナドトロピンの変化を比較検討した。

材料および方法

使用動物および動物飼育条件

4 日間の明瞭な性周期を呈することで知られる Crj:Donryu ラット[8]を用い, 自家繁殖させている妊娠雌を実験 1 (n=40) および実験 2 (n=28) に使用した。妊娠雌は個体ごとに木製ソフトチップを敷き詰めたポリカーボネート製に収容し, 温湿度管理された動物室内 (温度, $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 相対湿度, $55^{\circ}\text{C} \pm 5\%$; 明暗周期 12 時間, 明期 5:00-17:00, 暗期 17:00-5:00) で飼育した。チップは週に 2 回交換し, 飼育期間中は基礎飼料 (CRF-1; オリエンタル酵母株式会社, 東京) を給餌し, 水道水を自由摂水させた。

化学物質

17 α -ethynylestradiol (EE, CAS No. 57-63-6), estradiol benzoate (EB, CAS No. 50-50-0) および progesterone (P4, CAS No. 57-83-0) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。EE は少量のゴマ油 (CAS No. 8008-74-0) に一晩溶解させ, その後ゴマ油を溶媒として各濃度に希釈して使用した。EE は内因性エストロゲンである 17 β -estradiol (E2) とは異なり, α -フェトプロテインとの結合率が低いため, α -フェトプロテインの豊富な胎児血中でも各組織に分布するエストロゲン受容体との結合が可能であり, 体内における代謝が速やかで新生児への曝露時間を投与後数時間に限定することが可能であることから被験物質として選択した[11, 28]。EE の用量は過去の

報告を参考に、遅発影響を誘発しうる用量（20 µg/kg および 0.2 µg/kg）および誘発しない用量（0.02 µg/kg）を設定した[11]。

実験 1

妊娠雌を正常分娩させた後、それぞれの母動物および新生児を対照群, EE0.02 µg/kg 投与群, EE0.2 µg/kg 投与群, EE20 µg/kg 投与群の 4 群と Middle-age 群の計 5 群に振り分け（1 群あたりの母動物数: 6-10）、対照群および EE 投与群の新生児（生後 24 時間以内）に媒体（ゴマ油）または EE（0.02, 0.2 または 20 µg/kg）を単回皮下投与した。生後 3 日に 1 母動物あたり胎児数が 10 匹かつ雌が多く残るように間引を行った。生後 21 日に離乳後、各群の子動物は 3-4 匹ごとにケージに収容され、10 週齢になるまで通常飼育し、生後 23 日以降には膣開口の有無を連日観察した。膣開口確認後は連続 5 日間の膣スメアの採取を開始し、性周期モニタリング、一般状態観察および体重測定を試験終了まで継続した。

10 週齢時に正常性周期を有する動物について卵巣摘出（OVX）を実施し、1 週間後に LH サージ誘発処置（EB 2 µg/kg を 9:00 に 3 日間連続皮下投与し、EB 投与 3 日目の 11:00 に P4 500 µg/kg を皮下投与）を行った。血中 LH および FSH 濃度の経時的解析を実施するため、サージ誘発日の 11:00-19:00（n=5-7/時点）に各動物から断頭採血し、遠心分離して得られた血清を測定まで -80℃ で保存した。その後頭蓋より脳を摘出し、過去の報告[29]に従って視床下部を剖出した後、視索を境界として肉眼的に

前部（AVPV）および後部（ARC）分離した。視床下部は摘出後直ちに液体窒素中で凍結し、RNA 抽出まで-80℃で保存した。その後子宮、膣および乳腺の摘出を行い、10%中性緩衝ホルマリンで固定後にヘマトキシリン・エオジン（HE）で染色した後、病理組織学的検索を実施した。

Middle-age 群では、性周期モニタリングを継続しながら 22 週齢まで通常飼育し、22 週齢時点で正常性周期を有する群（Middle（N）群）と既に持続発情を呈する群（Middle（PE）群）に振り分けた。その後は対照群および EE 投与群同様の処置を行った。Donryu ラットでは約 4 ヶ月齢前後より加齢性の持続発情を呈することが知られており[8], Middle-age 群は遅発影響と加齢性変化を比較するために設置した。なお、周期異常の判断は採取した 5 日間のスメアによって行われ、4-5 日間サイクルの正常性周期を正常、それ以外の周期は異常性周期と判断した。特に、発情期または発情前期が 5 日異常持続した場合は持続発情（PE）とした。

ホルモン測定

血清中の LH および FSH 濃度を 125I 標識抗原を用いたラジオイムノアッセイ（二次抗体法）によって定量した。National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease（NIDDK）ラジオイムノアッセイキット（抗ラット LH-S-11 と抗ラット FSH-S-11 抗体を含む）を用い、過去の報告に従って測定を実施した[30]。測定内および測定間変動係数は、LH でそれぞれ 3.45%および 17.40%、FSH でそれぞれ 5.09%および

20.75%であった。

定量的 real-time PCR

摘出した視床下部のライセートから ISOGEN (ニッポンジーン, 東京) を用いて total RNA を抽出し, 1 μ g の total RNA から High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City) を用いて逆転写を行った。得られた cDNA から 7900HT Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) および TaqMan[®] Gene Expression Assay (Applied Biosystems) を用い, 以下のプライマー-プローブセットの real-time PCR を実施した; *KiSS1* (*Kiss1*, Rn00710914_m1), *KiSS1r* (*KiSS1R*, Rn00576940_m1), *Esr1* (*ER α* , Rn01640372_m1), *Esr2* (*ER β* , Rn00562610_m1), *Fos* (*c-fos*, Rn00487426_g1)。各遺伝子の発現レベルは検量線を用いて相対的に定量し, 内因性 GAPDH (Taqman Rodent GAPDH Control Reagent, Applied Biosystems) にて補正した。

実験 2

視床下部キスペプチンニューロンの形態的な検索を実施するため, 実験 2 を行った。実験 2 では, 妊娠雌を実験 1 と同様 5 群に振り分け (n=4-9/群), 正常分娩させた後に実験 1 と同様の処置を行った。その後, 対照群および EE 投与群では 11 週齢, Middle-age 群では 22 週齢まで通常飼育し, 実験 1 と同様に OVX および LH サージ誘発処置を行った。各動物はサージ誘発日の 16:00-17:00 の間にペントバルビタール (共

立製薬，東京）で深麻酔（約 65 mg/kg）し，4%パラホルムアルデヒド（PFA）（ナカライテスク，京都）で全身を灌流固定した。摘出した脳は 4%PFA で一晩後固定した後，30%スクロース／PBS 溶液にて組織が沈殿するまで置換した。固定した脳組織は OCT コンパウンド（サクラファインテックジャパン，東京）で凍結包埋し，薄切まで -80℃で保存した。

なお，上述の実験計画はすべて実施施設（国立医薬品食品衛生研究所）の動物実験倫理委員会に事前承認されており，動物の取り扱いは実施施設の動物実験指針を順守して実施された。

in situ ハイブリダイゼーション（ISH）

視床下部 AVPV および ARC の全領域を検索するため，クリオスタット（Leica, CM1850UV）を用い，The Rat Brain（Paxinos and Watson, 6th edition）に従って AVPV（bregma を中心に 0.12 mm 前方-0.24 mm 後方）および ARC（bregma より 1.72 mm-3.60 mm 後方）の冠状断面連続切片（切片厚 20μm）を作成した。薄切後、各切片はスライドガラス上で完全に乾燥させた後、過去の報告[31]に従って ISH 法により KiSS1 mRNA 陽性細胞の検出を行った。スライドはプロテイナーゼ K 溶液（1 μg/mL），1% PFA，0.25%無水酢酸／0.1M トリエタノールアミンの順で処理した後，60℃，30 分のプレハイブリダイを経て，DIG 標識アンチセンス RNA（GenBank accession No. AY196983.1，ジェノスタッフ，東京）で 60℃一晩ハイブリダイズさせた（同時にセン

ス RNA をネガティブコントロールとして用いた)。ハイブリダイズ後、スライドは 4xSSC/50%ホルムアミド、RNase 溶液 (20 µg/mL)、2xSSC および 1xSSC の順で洗浄し、2%BSA (Sigma, St. Louis) によるブロッキング後に抗 DIG 抗体 (1:1000, Roche Applied Science, Mannheim) を結合させ、NBT/BCIP 溶液 (Roche Applied Science) と約 1 時間反応させて陽性反応を検出した。

ISH および免疫組織化学染色 (IHC) による二重染色

KISS1 mRNA の ISH を実施したスライドガラスを用い、KISS1 陽性細胞における受容体の発現変動を確認するため、ER α または c-fos の ISH/IHC 二重染色を実施した。スライドを 1%BSA (Sigma, St. Louis) でブロッキングし、ウサギ抗 ER α 抗体 (1:2000, sc-542, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA) またはウサギ抗 c-fos 抗体 (1:4000, sc-253, Santa Cruz Biotechnology Inc, CA) で一晩反応させた。PBS で洗浄後、ヤギ抗ウサギ抗体 (1:200, Vector Laboratories Inc, CA) およびアビジン-ビオチン標識 HRP 複合体 (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories Inc, CA) と反応させ、3,3-diaminobenzidine-tetrachloride (DAB) を用いて可視化した。

統計解析

Bartlett 検定で等分散を確認した後、膣開口日、体重、ホルモン濃度、mRNA 発現レベル、ISH または ISH/IHC 二重染色で得られた陽性細胞数または陽性細胞率につい

て、一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 検定を行った。有意差が認められた場合は、対照群と EE 投与群または Middle age 群について Dunnett の多重比較検定を実施した。なお、有意水準 5%以下を有意差ありと判定した。

結果

一般状態、膣開口日、性周期および卵巣組織所見

試験期間を通じ、死亡および一般状態の異常は認められなかった。4-5 週齢にかけてすべての EE 投与群において体重の有意な増加が認められたが、変化は一過性で 6 週齢以降では差が認められなかった。膣開口日に群間差は認められなかった。Middle (PE) 群を除き、すべての動物が OVX 前まで正常な性周期を維持していることを確認した。OVX 後は発情休止期に類似したスメア像を呈し、EB の 3 日連続皮下投与によりすべての動物で発情期のスメア像（角化細胞）が認められた。摘出した卵巣の組織像はスメアで確認された性周期と一致しており、対照群と EE 投与群の間で卵巣組織像に差は認められなかった。Middle (N) 群では、性周期に異常は認められなかったものの、病理組織学的検索では卵巣で数匹に新世代黄体の減少が認められ、直近数サイクルにおける無排卵傾向が示唆された。Middle (PE) 群では、ほとんどの個体で新世代黄体が欠如しており、数世代にわたって排卵がすでに停止していることが示唆された。

血清中 LH および FSH 濃度

血清中 LH および FSH 濃度の経時的な推移を Fig. 1-1 示した。LH 濃度はいずれの群においても 16:00-17:00 にかけて顕著に上昇したが、対照群では 16:00、EE 投与群

では 17:00 にそれぞれピークを迎え、EE 投与群におけるピーク時間の遅延が認められた。また、EE0.02 $\mu\text{g/kg}$ 投与群を除くすべての群において、対照群と比較して LH サージ面積の顕著な低下が認められた。EE0.02 $\mu\text{g/kg}$ 投与群のサージ面積は対照群とほぼ同等だった。各時点における各群の LH 濃度比較では、16:00 に EE20 $\mu\text{g/kg}$ 投与群における有意な LH 濃度の低下が認められた。Middle (N) 群では、16:00-17:00 にかけてわずかな LH 濃度の上昇が認められたが、Middle (PE) 群では LH 濃度の上昇は見られず、16:00 の比較では両群で有意な LH 濃度の低下が認められた。FSH 濃度は午後にかけて緩やかに上昇し、対照群で 15:00、EE 投与群で 17:00 にそれぞれピークを迎えた。EE0.02, EE20 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では、15:00 に対照群と比較して有意な FSH 濃度の低下が認められたが、そのほかに顕著な濃度推移の群間差は認められなかった。また、Middle (N) 群でも、15:00 において有意な FSH 濃度の低下が認められた。

定量的 real-time PCR

対照群の AVPV および ARC における KiSS1 mRNA の経時的な発現変動と、発現量の群間比較を Fig. 1-2 に示した。対照群の AVPV では、11:00 より KiSS1 mRNA の発現上昇がみられ、LH サージと同じ 16:00-17:00 にかけて発現がピークに達し、その発現は 19:00 まで持続していた。対照群の ARC では、KiSS1 mRNA の発現量は測定時点を通じて OVX 単独群の発現に比較して抑制されており、19:00 頃にわずかな発現上昇がみられた。各群の発現量の比較では、EE20 $\mu\text{g/kg}$ 投与群において 14:00 に AVPV

の KiSS1 mRNA 発現量の有意な低下がみられ、同様の減少傾向が 16:00 にも認められた。一方、ARC では群間の発現量の差は認められなかった。各群の 16:00 における KiSS1 関連遺伝子 (KiSS1R, ER α , ER β および c-fos) の発現量を Fig. 1-3 に示した。EE20 μ g/kg 投与群では、同時刻に KiSS1 mRNA 発現量の低下が認められたが、KiSS1 関連遺伝子の発現量に群間の差は認められなかった。また、Middle (N) 群では、KiSS1 および KiSS1 関連遺伝子のいずれにおいても、EE20 μ g/kg 投与群と同様の傾向が認められた。

ISH

AVPV および ARC における代表的な KiSS1 mRNA 陽性像を Fig. 1-4 および 1-5 に示した。AVPV では、KiSS1 mRNA 陽性細胞の多くは第三脳室 (3V) 周囲に分布し、EE20 μ g/kg 投与群では KiSS1 mRNA 陽性細胞数の有意な低下が認められた。また、EE20 μ g/kg 投与群では、陽性細胞数の減少に加え、個々の陽性細胞における発現強度の顕著な減弱も認められた。ARC では、KiSS1 mRNA 陽性細胞は第三脳室の下部に分布し、AVPV とは対照的に、対照群、EE 投与群および Middle age 群間における陽性細胞数に顕著な差は認められなかった。また、Middle (N) 群では、EE20 μ g/kg 投与群と同様に AVPV における KiSS1 mRNA 陽性細胞数の有意な低下と発現強度の減弱が認められた。

ISH/IHC 二重染色

代表的な KiSS1 mRNA および ER α または c-fos との ISH/IHC 二重染色像を Fig. 1-6 および 1-7 に示した（いずれも AVPV）。二重陽性細胞（赤矢印）では、KiSS1 mRNA の細胞質領域における深紫色および ER α または c-fos の核領域における茶色の陽性反応がみられた。一方、Kiss1 mRNA 単独陽性細胞（白矢印）では KiSS1 に対する細胞質の染色のみが認められた。ER α との二重染色では、KiSS1 mRNA 陽性細胞の多くが ER α 陽性を示し、対照群における共陽性率は 79.9%に達した。一方、EE20 μ g/kg 投与群では、KiSS1 mRNA/ER α 共陽性細胞数の有意な減少がみられ、共陽性率も 66.8%に有意に低下していた。c-fos との二重染色では、KiSS1 mRNA/c-fos 共陽性細胞数に群間で顕著な変動はみられず、共陽性率は対照群および EE20 μ g/kg 投与群でそれぞれ 28.9%, 32.0%であった。また、Middle (N) 群では、EE20 μ g/kg 投与群と同様に KiSS1 mRNA/ER α 共陽性細胞数の有意な減少（共陽性率 66.1%）がみられた。一方、Middle (PE) 群では、KiSS1 mRNA/c-fos 共陽性細胞数がわずかに増加し、共陽性率は 46.1%と対照群と比較して有意に上昇していた。

考察

本章では、real-time PCR による解析により、AVPV における KiSS1 mRNA 発現は LH サージとほぼ同時刻である 16:00-17:00 にかけてピークを迎えることが明らかになった。視床下部における KiSS1 発現および下垂体からの LH 分泌のピーク時刻の一致は、キスペプチンおよび GnRH ニューロン間における神経伝達が非常に速やかに行われ、視床下部からの情報を受け取った下垂体が速やかにゴナドトロピン分泌していることを示唆している。発現量の群間の比較では、EE20 $\mu\text{g/kg}$ 投与群における KiSS1 mRNA の有意な発現低下が認められ、さらに ISH による部位特異的な解析では、同群の AVPV において KiSS1 mRNA 陽性細胞数および発現強度の顕著な減少が確認された。これらの結果は、LH サージ発現時刻における KiSS1/GPR54 シグナルの発現抑制と、視床下部-下垂体-性腺軸における神経伝達の遅延を示唆しており、遅発影響に伴い、外因性のエストロゲンに対する視床下部-下垂体間の神経内分泌系の反応性が著しく低下することを意味している。また、これらの KiSS1 mRNA の発現変動に加え、本章では同群における KiSS1 mRNA/ER α 共陽性細胞数および共陽性率の有意な減少も認められ、KiSS1/GPR54 シグナルのダウンレギュレーションが ER α の発現変化と関連している可能性も示唆された。一方で、ARC では上述の一連の変化は認められなかったことから、遅発影響に伴って認められる KiSS1 mRNA 発現への影響は AVPV 特異的な変化であり、遅発影響は卵胞発育等の ARC が制御する機能へはあま

り影響しないことが示唆された。

KiSS1 関連遺伝子については、ISH/IHC 二重染色により KiSS1/ER α 共陽性細胞数および共発現率の減少がみられたが、real-time PCR を用いた定量的な解析では、いずれの群でも ER α mRNA の発現変動は認められなかった。これは第三脳室周囲にはキスペプチンニューロン以外にも多くの ER α 陽性細胞が存在するためと推察され、ER のような広範囲で発現する遺伝子については、二重染色等による部位特異的な評価が検索手法としてより適切であると考えられた。また本章では、real-time PCR および ISH/IHC 二重染色のいずれの手法においても c-fos の発現変動は認められなかった。過去の報告では、c-fos 共発現率がキスペプチンニューロンの機能とそれに引き続く LH サージ活性と相関していたことが報告されている[20, 31]。これらの報告では、キスペプチンニューロンの活性化に伴って c-fos の共発現率が 60%程度に達する反面、KiSS1 発現総細胞数には変化がみられないことから、c-fos および KiSS1 の発現上昇のタイミングには時間差があることが推定される。過去の報告が LH サージ誘発日の 14:00 前後のサンプルを用いているのに対し、本章では KiSS1 発現上昇を焦点とした 16:00 のサンプルを用いていることから、これらの試験条件の違いが結果の相違に影響している可能性が考えられた。

血清中 LH 濃度の検討では、LH サージのピーク時間は対照群の 16:00 に対し、EE 投与群では 17:00 とやや遅延する傾向が認められた。また、EE0.2 および 20 μ g/kg 投与群ではピーク時の LH 濃度およびサージ面積の用量依存的な低下がみられた。LH

サージは視床下部のキスペプチンおよび GnRH ニューロンの活性化により誘発されることから[32], 本章で認められた KiSS1 mRNA 発現の低下がこれらの LH サージの減弱やサージ時間の遅延に結びついているものと推察された。そして, これらの LH サージの機能的変化は, Fig. 1-8 に示したような発現メカニズムを介し, 遅発影響における排卵障害や性周期の早期停止に寄与していくと考えられた。

新生児期に外因性に投与されるエストロゲンは脳の性分化過程に重大な影響を与え, 特にエストロゲンが高用量の場合は, 視床下部の神経核分布における性的二型(性差)が消失し, それに伴って性成熟時の AVPV における KiSS1 発現および性周期の回帰が見られなくなることが知られている。これが「脳の雄型化」と呼ばれる変化であり, 視床下部において生殖機能を制御する様々な神経核が雄型化することに起因すると考えられている。一方, その用量が小さい場合には, 上記のような神経核の変化を伴う即時型の影響はみられず, 性周期異常のような遅発性の影響が認められ, さらに本章の結果から, その前段の変化としてキスペプチンニューロンにおける KiSS1 発現の減弱化がみられることが明らかになった。これらの事実は, 低用量のエストロゲンでは即時型の影響は引き起こさないが, 視床下部では雄型化に準ずる何らかの潜在的な影響を及ぼしており, さらに加齢に伴って生殖機能の予備能が低下した際に, これらの影響が遅発性に顕在化してくる可能性を示唆している。本章ではサージ誘発時の KiSS1 陽性細胞数の減少が認められたことから, 潜在的な影響の一つとしてアクティブなキスペプチンニューロンの細胞数自体が減少している可能性が推察された

が、これがキスペプチンニューロンの総数の減少に起因するのか、あるいはサージを誘発するエストロゲンに対する感受性の低下に起因するのかを特定するためには、さらなる検証が必要と考えられる。

本章で認められたような EE 投与群における LH サージの遅延および減弱は、生殖機能における老化プロセスの一部として老齢ラットでも認められることが知られており[33-35]、これらの内分泌系の変化が「加齢性の性周期停止」に先駆けて起こることが報告されている[36]。また、近年これらの LH サージの変化に加えて、老齢ラットの視床下部における KiSS1/GPR54 シグナリングの低下が複数の研究において報告されていることから[23, 24, 37]、キスペプチンニューロンの機能低下が、加齢に伴って生じる一連の LH サージの機能障害や生殖機能老化の「引き金」になっている可能性が示唆されている[23]。本章においても、EE20 $\mu\text{g/kg}$ 投与群で認められた一連の変化はいずれも Middle (N) 群で同様に確認され、新生児期に EE を曝露したラットおよび老齢ラット群で類似した変化が認められたことから、EE 投与群の young adult 期に認められた神経内分泌系の変化が「生殖機能老化の早期化」を意味している可能性が示唆された。

また、本章におけるもうひとつの重要な発見は、新生児期のエストロゲン曝露によって生じる上述の神経内分泌学的な変化が、いずれも後に認められる性周期異常や生殖器系の変化に先駆けて生じている点である。最近、我々の研究室では、新たに新生児期に EE に曝露されたラットにおける FSH 濃度の低下（生後 14 日齢）や子宮内膜

上皮の ER α 発現減少（生後 10 週齢）等の遅発影響における早期変化を見出しており [38], これらの変化が「異常性周期の早期発現」に代わって遅発影響の有用な早期指標となりうる可能性が考えられた。

小括

本章では、遅発影響の発現機序と遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、新生児期に EE を曝露されたラットの young adult 期（性周期停止前）におけるキスペプチンニューロン KiSS1/GPR54 シグナルおよびゴナドトロピン分泌の詳細な検索を行った。

その結果、新生児期に EE を曝露したラットでは、LH サージのピーク時間の遅延とサージ面積の減少、ならびに AVPV における KiSS1 mRNA の発現低下がみられ、同時に KiSS1 mRNA 陽性細胞における ER α 共発現率の低下も認められた。これらの AVPV 特異的な変化は、視床下部-下垂体-性腺軸における LH サージ制御機構の機能障害を示唆しており、後に遅発性に発現する「性周期の早期停止」の寄与する変化であると考えられた。また、これらの神経内分泌系における変化は、遅発影響誘発ラットおよび老齢ラットの双方で認められたことから、遅発影響と生殖機能の加齢性変化は一部類似しており、遅発影響が「生殖機能老化の早期化」を意味している可能性が考えられた。

また、これらの変化がいずれも性周期の変化に先駆けて生じていたことから、LH サージの減弱や KiSS1 mRNA の低下といった神経内分泌系の早期変化が遅発影響の早期指標として利用できる可能性が期待された。

第 2 章

外因性エストロゲンの新生児期曝露による遅発影響の臨界期の検索

緒言

第1章の実験ではEEの新生児期曝露により、LHサージの減弱および視床下部キスペプチンニューロンにおけるAVPV特異的なKiSS1発現低下がみられ、これらの神経内分泌系の変化が遅発影響の早期指標になりうることを明らかになった。第2章では、新生児期の脳が、これらの変化を引き起こす外因性のエストロゲンに対していつまで感受性を有するか（遅発影響の臨界期）について、第1章で明らかになった遅発影響の指標を用いて検討を行った。

第1章でみられた神経内分泌系に対する様々な影響は、新生児期に外因性に投与したエストロゲンが「脳の性分化」に対して影響を与えていることに起因すると考えられる。脳の性分化は、その後の視床下部における神経ネットワークの発達と、それに関連した生殖機能の獲得に重大な影響を及ぼす発生上の重要なプロセスの一つである。哺乳類では、周生期（後期胎児期～出生後早期）に分泌される母体または胎児由来の内因性性腺ホルモンにより、脳の正常な性分化が誘導されることが知られている[39,40]。つまり、この時期に外因性のエストロゲン作用を有する物質に曝露された場合、正常な脳の性分化プロセスが障害され、成熟後の生殖機能の形成に重大な影響を及ぼすことが予想される。遅発影響についても、類似した発現メカニズムによって一連の変化を生じているものと推察されるが、一方で、新生児期脳の外因性エストロゲンに対する感受期については詳細な研究報告が少ない。

吉田らは、生後 1-5 日齢または 1-15 日齢まで連日 p-t-octylphenol に曝露されたラットでは、いずれの群でも性周期の早期停止が認められるものの、全動物の性周期が停止するまでに要した期間は、生後 15 日齢まで曝露された群（1.5 ヵ月）の方が、生後 5 日齢までしか曝露を受けなかった群（6 ヵ月）に比較して短かったことを報告している[8,39]。また別のグループでは、estradiol valerate (EV) を生後 14 日齢のラットに単回曝露すると、生後 50 日齢より性周期の異常が認められ、生後 71-90 日における正常性周期を有する動物の割合は対照群の 72%まで減少したことを報告している[41]。これらの事実は、脳の性分化が完了すると考えられている出生後期（生後 5 日齢前後）[42,43]をさらに超えて、新生児期の脳がエストロゲンに対する感受性を維持していることを示唆しているが、これまで「感受期のエンドポイント」を直接的に明らかにした研究報告はいまだ存在しない。

そこで第 2 章では、新生児脳における「遅発影響の臨界期」を明らかにするため、生後 0, 5, 10 および 14 日の新生児ラットに EE を単回皮下投与し、各群における遅発影響発現の有無を LH サージおよび KiSS1 mRNA 発現変動（早期の変化）ならびに性周期の変化（後期の変化）を指標に検討した。

材料および方法

使用動物および動物飼育条件

妊娠 14 日齢の雌性 Wistar Hannover GALAS ラット（日本クレア，n=37）を実験に用いた。第 1 章では性周期が明確な Donryu ラットを用いたが，遅発影響の系統間差と普遍性について検証するため，本章ではより一般的な系統として Wistar Hannover GALAS ラットを用いて実験を行った。妊娠雌は個体ごとに木製ソフトチップを敷き詰めたポリカーボネート製に收容し，温湿度管理された動物室内（温度， $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ；相対湿度， $55^{\circ}\text{C} \pm 5\%$ ；明暗周期 12 時間，明期 5:00-17:00，暗期 17:00-5:00）で飼育した。チップは週に 2 回交換し，飼育期間中は基礎飼料（CRF-1；オリエンタル酵母株式会社，東京）を給餌し，水道水を自由摂水させた。

化学物質

EE, EB および P4 の購入，ならびに EE の調整方法は第 1 章に準ずる。EE の用量は，第 1 章において明確な遅発影響を誘発した用量として $20 \mu\text{g/kg}$ を設定した。

ランダム化および群分け

遺伝的バイアスを排除するため，すべての胎児を出生後 24 時間以内に集めてランダム化し，1 母動物あたりの胎児数を 10 匹かつ雌が多く残るよう無作為に割り付け

を行った。ランダム化後，母動物を計 5 群に割り付け (n=7-8/群)，対照群には媒体 (ゴマ油) を生後 0 日齢に，その他の群には EE 20 $\mu\text{g/kg}$ を生後 0, 5, 10 または 14 日齢にそれぞれ単回皮下投与した (それぞれ PND 0, 5, 10 および 14 群)。生後 21 日に離乳後，各群の子動物は 2-4 匹ごとにケージに収容され (n=30/group)，生後 23 日から膣開口の有無を連日観察した。膣開口確認後は連続 5 日間の膣スメアの採取を開始し，性周期モニタリング，一般状態観察および体重測定を試験終了まで継続した。

LH サージ誘発処置

10 週齢時に正常性周期を有していた動物について OVX を実施し (n=10/群)，1 週間後に第 1 章と同様に LH サージ誘発処置を行った。その後，サージ誘発日の 16:00-17:00 に半数の動物を断頭採血 (n=5/群) し，第 1 章の方法に準じて real-time PCR 用のサンプルを取得し，RNA 抽出まで -80°C で保存した。残り半数の動物については，第 1 章の方法に準じて ISH 用の包埋サンプルを作成し (n=5/群)，薄切まで -80°C で保存した。また，全例で子宮および膣摘出を行い，10% 中性緩衝ホルマリンで固定後に HE 染色した後，病理組織学的検索を実施した。

性周期モニタリング

残りの動物 (n=16/群) は，性周期を長期間モニタリングするため 40 週齢まで飼育を継続した。なお，周期異常の判断は採取した 5 日間のスメアによって行われ，4-

5日間サイクルの正常性周期を正常、それ以外の周期は異常性周期と判断した。特に、発情期または発情前期が5日持続した場合は持続発情（PE）、発情後期または発情休止期が5日持続した場合は持続無発情（persistent diestrus）とした。40週齢時にすべての動物をイソフルラン麻酔下で剖検し、卵巣、子宮および膣を採取して重量を測定した。採取した器官は10%中性緩衝ホルマリンで固定後にHE染色した後、病理組織学的検索を実施した。

なお、本実験計画は実施施設（国立医薬品食品衛生研究所）の動物実験倫理委員会に事前承認されており、動物の取り扱いの実施施設の動物実験指針を順守して実施された。

定量的 real-time PCR

第1章の方法に準じてサンプルを調製し、以下のプライマー-プローブセットの real-time PCR を実施した；*KiSS1* (*Kiss1*, Rn00710914_m1), *KiSS1r* (*KiSS1R*, Rn00576940_m1), *Gnrh1* (*GnRH*, Rn00562754_m1)。

ISH

第1章の方法に準じて *KiSS1* mRNA 陽性細胞の検出を行った。

ホルモン測定

第 1 章の方法に準じて測定を実施した。測定内および測定間変動係数は、LH でそれぞれ 3.27%および 17.74%，FSH でそれぞれ 4.01%および 16.71%であった。

膣開口早期化の病理組織検査および免疫組織化学染色

予備検討時に、生後 10 または 14 日に EE を投与した動物において膣開口の早期化が認められたため、EE 新生児期投与による膣開口への影響を検討した。膣開口の早期化による組織学的な変化を比較するため、PND10 および PND14 群では膣開口の翌日に、対照群、PND0 および PND5 群では同じ日齢（膣開口前）にイソフルラン麻酔下で各動物を剖検し（n=4/群）、卵巣、子宮および膣を摘出した。採取した器官は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後に HE 染色した後、病理組織学的検索を実施した。また同組織を用い、一次抗体として抗 ER α 抗体（1:1000, sc-542, Santa Cruz Biotechnology Inc.）を、二次抗体および発色基質として Vectastain Elite ABC キット（Vector Laboratories Inc.）を使用した ER α に対する免疫組織化学的染色を行った。染色した標本を用い、過去の報告[38]を参考に、子宮内膜上皮または間質における ER α 陽性細胞率（スコア）を以下の基準に従ってそれぞれ算出した；0：陰性，1，弱陽性（20%以下）；2，部分的陽性（20%-50%），3，半数以上陽性（50%-80%）；4，大部分陽性（80%以上）。各群における平均スコアは、各個体で無作為に選択した 10 視野（200 倍）のスコアを集計して算出した。

統計解析

Bartlett 検定で等分散を確認した後、膣開口日、体重、器官重量測定、ホルモン濃度、mRNA 発現レベル、ISH 陽性細胞数および ER α 発現スコアについて、一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 検定を行った。有意差が認められた場合は、対照群と EE 投与群について Dunnett の多重比較検定を実施した。性周期モニタリングの結果については、Fisher の正確確率検定により比較した。なお、有意水準 5%以下を有意差ありと判定した。

結果

一般状態，体重および膣開口日

試験期間を通じ，死亡および一般状態の異常はみられなかった。また，投与に関連する体重の変動も認められなかった。各群の平均膣開口日齢と膣開口時の体重を Table 2-1 に示した。対照群と比較し，PND10 および PND14 群で有意な膣開口の早期化がみられ，膣開口時の体重も両群で有意に低下していた。

性周期モニタリング

40 週齢までの性周期の推移を Fig. 2-1 に示した。対照群では，ほぼすべての個体で 4-5 日周期の正常な性周期が 29 週齢まで維持されていた。その後，異常性周期を呈する個体の割合は徐々に増加し，正常性周期を示す個体の割合は 40 週齢で 43.8%まで低下した。一方，PND0, 5 および 10 群では正常性周期を示す個体の割合はより早期から低下し，PND0 群では 17 週齢，PND5 および 10 群では 19 週齢から，対照群と比較して有意な割合の低下が認められた。投与群間の比較では，PND0 群で割合の低下が最も早期からみられ，21-29 週齢にかけて PND5 および 10 群との間に統計学的な有意差が認められた。PND5 および 10 群はほぼ同様の推移を示し，40 週齢までのいくつかの時点において PND14 群との統計学的な有意差が認められた。PND14 群は 25 週齢まで対照群とほぼ同様の推移を示し，それ以降は対照群より若干早くの割合の低

下がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。

定量的 real-time PCR

LH サージ時刻における視床下部前部 (AVPV) または後部 (ARC) の KiSS1 mRNA 発現を Fig. 2-2 に示した。AVPV では、KiSS1 mRNA の発現量は PND0, 5 および 10 群で対照群と比較して有意に低下し、EE を曝露した日齢と相関した発現量の低下が認められた。また、統計学的有意差はみられなかったが、PND14 群でもわずかな発現量の減少傾向が認められた。ARC では、PND5 群において KiSS1 mRNA の有意な発現低下がみられたが、そのほかの群で有意な発現変動は認められなかった。また、この他に AVPV における KiSS1 関連遺伝子 (GnRH1 および KiSS1R) の発現についても検討を行ったが、対照群と EE 投与群の間に KiSS1 関連遺伝子の有意な発現変動は認められなかった。

ISH

AVPV および ARC における代表的な KiSS1 mRNA 陽性像を Fig. 2-3 および 2-4 に示した。第 3 脳室 (3V) 周囲において明瞭な青紫色の KiSS1 mRNA 陽性反応が認められ、AVPV では、PND0 群において陽性反応の顕著な減弱と KiSS1 陽性細胞数の有意な減少が認められた。同様の陽性反応の減弱および KiSS1 陽性細胞数の有意な減少は PND5 および 10 群でも認められた。一方、PND14 群では、KiSS1 mRNA 陽性細

胞数の有意な減少はみられず、先の real-time PCR および性周期モニタリングの結果と同様に、KiSS1 陽性細胞数の減少も EE を曝露した日齢との相関がみられた。ARC では、KiSS1 陽性細胞数のわずかな減少が PND0 および 5 群においてみられたが、統計学的に有意な減少は認められなかった。

血清中 LH および FSH 濃度

LH および FSH 濃度を Fig. 2-5 に示した。すべての血清は、本研究条件下における LH サージのピーク時刻である 16:00-17:00 の間にサンプリングされた[44]。各群における LH 濃度は対照群, PND0, 5, 10 および 14 群でそれぞれ 11.64 ± 3.87 , 5.56 ± 2.56 , 6.73 ± 2.07 , 2.70 ± 0.95 , 10.32 ± 2.51 ng/mL であり、PND0, 5 および 10 群においてピーク LH 濃度の低値傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった。一方、PND14 群の LH 濃度は対照群とほぼ同程度であった。各群における FSH 濃度は対照群, PND0, 5, 10 および 14 群でそれぞれ 19.25 ± 2.40 , 13.36 ± 2.35 , 20.44 ± 1.94 , 14.23 ± 3.48 , 28.80 ± 1.68 ng/mL であり、PND14 群において FSH 濃度の高値傾向がみられたが、他の群も含めて統計学的に有意な FSH 濃度の変動は認められなかった。

器官重量および病理組織検査

40 週齢時の子宮および卵巣の実重量および相対重量を Table 2-2 に、また、同週齢における各群の代表的な卵巣組織像を Fig. 2-6 に示した。卵巣では PND0, 5 および

10 群において、対照群と比較して卵巢実重量および相対重量の有意な減少が認められた。また、これらの群では、卵巢重量の低下と相関して中等度から重度の卵巢萎縮がみられ、嚢胞状卵胞の増加および黄体数の減少も同時に認められた。一方、対照群および PND14 群では、ほぼすべての個体で大型・充実性の黄体や小型～中型の嚢胞状卵胞が確認され、これらの群では多くの個体が当該週齢まで性周期を維持していたことが示唆された。剖検時に採取したその他の器官では異常所見は認められなかった。

膣開口早期化の病理組織検査および免疫組織化学染色

対照群（膣開口が正常な群）および PND14 群（膣開口が早期化した群）における代表的な卵巢組織像および膣の免疫染色像、ならびに各群における膣上皮または間質の ER α 発現スコアを Fig. 2-7 に示した。PND10 および 14 群（膣開口が早期化した群）では、初回排卵の証拠となる新生黄体の形成はみられず、卵巢、子宮および膣でその他の異常所見は認められなかった。また、膣における ER α 発現スコアを算出した結果、対照群、PND0, 5, 10 および 14 群の発現スコアは上皮でそれぞれ 3.88 ± 0.10 , 3.90 ± 0.14 , 3.93 ± 0.10 , 3.93 ± 0.10 , 3.90 ± 0.12 , 間質でそれぞれ 2.78 ± 0.30 , 2.80 ± 0.18 , 2.78 ± 0.10 , 2.53 ± 0.26 , 2.70 ± 0.16 であり、膣開口早期化の有無に関わらず、群間における統計学的有意差は認められなかった。

考察

本章では、PND0, 5 および 10 群において、AVPV における KiSS1 mRNA 発現および KiSS1 陽性細胞数の低下が認められたことから、遅発影響を誘発する用量の EE に対して感受性を有する期間が、ラット新生児脳では少なくとも生後 10 日まで維持されていることが明らかになった。上述の AVPV における KiSS1 mRNA の発現抑制は、外因性のエストロゲンに対する視床下部-下垂体-性腺軸の反応性の低下を示唆しており、同群において認められた血清中 LH 濃度の減少傾向に寄与しているものと推察される。ホルモン測定に用いたサンプルサイズが小さかったことから、本章では LH 濃度の減少に統計学的な有意差はみられなかったが、同様の傾向はより多くの例数と時点で測定した第 1 章の実験でも確認されている。また、同群では遅発影響の指標である「異常性周期の早期発現」もみられており、病理組織学的検査で認められた卵巣嚢胞の増加および黄体数の減少を伴った卵巣萎縮は、同群の性周期が長期間停止していたことを示している。これらの PND0, 5 および 10 群における一連の変化は、新生児期のキスペプチンニューロンにおける発達障害を示唆しており、新生児期後期まで新生児脳が外因性のエストロゲンに対する感受性を維持していると考えられる。

本章におけるもう一つの重要な発見は、新生児期エストロゲン曝露に対する感受性（遅発影響発現の強さ）に曝露日齢との相関がみられた点である。PND0 群では、異常性周期の発現が 17 週齢から確認され、これは我々の過去の報告とほぼ一致してい

た[11]。一方、PND5 および 10 群でも 19 週齢から異常性周期の早期発現がみられたが、発現がみられた時期とその後の減少ペースは PND0 群と比較して明らかに遅延していた。これに加え、AVPV における KiSS1 mRNA 発現の解析では、real-time PCR および ISH のいずれの解析においても、曝露日齢に相関した KiSS1 発現の低下がみられていた。これらの結果は、新生児脳の外因性エストロゲンに対する感受性が脳の発達時期によって変化し、発達早期でより脆弱性が高いことを示唆している。一方、PND14 群では、性周期および KiSS1 mRNA 発現のいずれの解析においても明確な変化がみられなかったことから、遅発影響の臨界期のエンドポイントが PND14 付近に存在している可能性が示唆された。

周生期は「視床下部の性分化」が進行する時期であることから、内因性・外因性を問わずホルモンに対する感受性が特に高い時期であることが知られている[45]。ラットでは、古典的に受胎後 18～27 日とその時期に該当すると推定されていることから[42,43]、妊娠期間を 21 日と仮定した場合、後期胎児期から前期新生児期（胎生 18 日齢～生後 5 日齢）が中枢神経系（CNS）の性分化期間であると考えられている[40, 46]。また、妊婦への diethylstilbestrol (DES) 投与の事例[47]では、Swan らの大規模な臨床疫学調査によれば、vaginal adenosis（DES 投与患者で頻発する非腫瘍性の膣上皮形態異常）が認められた症例の 85%が妊娠 14 週までに DES 曝露を受けており、妊娠第 2 期に相当する 22 週齢以降の投与では同症例は認められなかったことを報告している[48]。DES 投与による vaginal adenosis の発現メカニズムは明らかではないも

の、これらの事実は、外因性エストロゲンに対する感受期が妊娠早期(胚／胎児期)に存在していることを意味しているが、本章の結果から、ラットの新生児脳では少なくとも生後 10 日齢 (ヒトの妊娠第 3 期に相当[49, 50]) まで外因性エストロゲンに対する感受性を維持していることが示唆され、より後期のエストロゲン曝露でも、キスペプチンニューロンの障害といった目に見えない潜在的影響を生じるリスクがあることが推察された。

臨界期のエンドポイントについては、これまで直接的に検証した研究報告がほとんど存在しない。Cruz らは、生後 1, 7 および 14 日齢のラットにおける EV 10 mg/kg 投与が、不可逆的な性周期の停止と嚢胞の増加を伴う卵巣の形態異常を引き起こすが、生後 21 または 30 日齢の投与ではこれらの影響が認められず、ラットのホルモン感受期は新生児～幼児期にかけて存在することを報告している。また、生後 14 日齢における感受性については、同研究グループが生後 14 日齢のラットへの EV 2 mg/kg 投与により、生後 70～90 日齢の性周期頻度が低下したことを報告している[41]。本章では、PND14 群における性周期や KiSS1 発現への影響は明らかではなかったが、上述の研究報告は、新生児ラットのホルモン感受期が生後 14 日齢まで維持されていることを示唆しており、用いられている EV の用量が極端に高いことを考慮すると、生後 14 日齢での影響発現にはより高用量の曝露が必要であり、そのほかエストロゲンの種類、用いるラットの系統や解析のタイミング等が結果に影響した可能性が考えられる。これら一連の結果は、少なくとも、生後 14 日齢における外因性エストロゲンに

対する感受性は弱いながらも維持されていることを示唆しており、遅発影響の臨界期のエンドポイントが生後 14 日齢前後に存在しているとの仮説を支持していると考えられる。

本章では、遅発影響の臨界期を検証する系統として Wistar Hannover GALAS ラットを用いたが、第 1 章の Donryu ラットの結果と比較し、PND0 に EE 20 μ g/kg を投与した遅発影響誘発個体における血中 LH 濃度および KiSS1 mRNA 陽性細胞数の変化に系統間で大きな差は認められなかった。一方、性周期モニタリングでは、試験終了時（40 週）における対照群の正常性周期維持率は約 50%であり、Donryu ラットの既存の成績（40 週齢時で正常性周期維持率 0%）と比較して明らかに正常性周期を維持している個体の割合が高かった。この正常動物における性周期閉鎖時期の違いは系統間差と考えられる。以上より、本章で用いた系統でも遅発影響誘発個体における KiSS1 発現の低下や性周期の早期停止が認められ、遅発影響発現の系統間における普遍性は確認されたが、同じ用量を投与した場合の性周期停止時期については、系統間で違いがみられることが予想された。

また本章では、生後 10 および 14 日における EE 投与により、当該群において膣開口の早期化が認められた。膣開口の早期化は周生期に高用量のエストロゲンを曝露した研究においていくつか報告されているが[16, 41, 51, 52]、その詳細な発現メカニズムは明らかになっていない[52]。卵巣の組織学的検索では、PND14 群において初回排卵の証拠がみられなかったことから、膣開口の早期化は視床下部-下垂体-性腺軸経

由ではなく，新生児期に曝露した EE の膣に対する直接的な影響によることが推察された。膣開口は内因性エストロゲンが一定レベルに到達することによって起きることから，膣におけるエストロゲン感受性の増大が一因として考えられたが，免疫染色による ER α の発現解析では膣開口の早期化による影響は認められなかった。本章の結果から，生後 10～14 日の新生児期後期が，出生直後と比較して膣開口の早期化に対してより感受性が高いことが示されたが，その発現メカニズムについてはさらなる検証が必要と考えられた。

小括

第2章では、外因性のエストロゲン新生児期曝露による遅発影響の臨界期を明らかにするため、生後0, 5, 10および14日の新生児ラットにEEを曝露し、視床下部キスペプチンニューロンの変化を指標に遅発影響の発現の有無を検索した。

その結果、生後0, 5および10日齢にEE 20 $\mu\text{g/kg}$ を曝露した群において、生後11週齢に遅発影響の指標であるKiSS1 mRNAの発現低下、KiSS1陽性細胞数の減少およびLHサージの減弱傾向が認められた。上述の群では、これらの変化と相関して異常性周期の早期発現も認められ、新生児期に曝露したEEによる遅発影響が発現していると考えられたが、生後14日齢にEEを曝露したPND14群ではこれらの一連の変化は明らかではなかった。

以上の結果から、ラットでは新生児早期（生後0～10日齢）が外因性のエストロゲンに対して脆弱性を有する遅発影響の臨界期であり、臨界期のエンドポイントは新生児後期である生後14日齢前後に存在していると推察された。

第 3 章

Selective Estrogen Receptor Modulator (SERM) の新生児期曝露による遅発影響の検索

緒言

第1章および第2章では、外因性エストロゲンの代表物質としてEEを用い、新生児期曝露による遅発影響の早期指標とその臨界期について詳細な検討を行った。第3章では、被験物質を組織選択的なエストロゲン活性を有する選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) に変更し、遅発影響発現の普遍性とSERMの新生児期曝露による遅発影響リスクの有無について検討を行った。

SERMは、組織選択的なエストロゲンまたは抗エストロゲン活性を有する化合物群として知られており、その特性から乳がん (タモキシフェン) や骨粗鬆症 (ラロキシフェン) の治療薬として広く使用されている[53, 54]。このSERMの二面的な特性 (エストロゲンまたは抗エストロゲン作用) については、治療に関連する乳腺や骨などのホルモン依存性組織でよく研究されているが、CNSをはじめとするそれ以外組織での作用についてはあまりよく知られておらず、特に新生児期に曝露した場合のCNSの発達への影響については報告が少ない。Pinillaらによれば、新生児ラットへのラロキシフェンおよびタモキシフェンの曝露により、性周期の早期停止や性成熟後のゴナドトロピンレベルの低下といった影響が生じることが報告されている[55, 56]。これらの報告は、SERMの新生児期曝露がその後のCNSおよび生殖機能の発達に対する潜在的なリスク因子になりうることを示唆している。これまでの章で見てきたように、視床下部キスペプチンニューロンがその発達障害のターゲットとなっている可

能性が考えられるが、SERM が新生児期の CNS やキスペプチンニューロンに対してエストロゲン作用を有するかどうかも含めて、SERM の新生児期曝露による障害発現のメカニズムは明らかになっていない。

そこで第 3 章では、被験物質として代表的な SERM であるラロキシフェンおよびタモキシフェンを用い、新生児ラットの脳の性分化に対する SERM の作用を検証するため、新生児期 SERM 曝露による遅発影響の発現とキスペプチンニューロンへの影響について、第 1 章で明らかにした遅発影響の早期指標をもとに検討を行った。さらに本章では、成熟ラットを用いた子宮肥大試験を参考にした SERM 投与実験を実施し、SERM のキスペプチンニューロンに対するエストロゲン活性の有無についても検証を行った。

材料および方法

使用動物および動物飼育条件

第1章で用いた自家繁殖させている Crj:Donryu ラットを用い, 妊娠雌を実験1 (n=28) に, young adult 期 (7 週齢) の雌を実験2 (n=30) および実験3 (n=35) に使用した。妊娠雌は個体ごとに木製ソフトチップを敷き詰めたポリカーボネート製に収容し, 温湿度管理された動物室内 (温度, $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$; 相対湿度, $55^{\circ}\text{C} \pm 5\%$; 明暗周期 12 時間, 明期 5:00-17:00, 暗期 17:00-5:00) で飼育した。チップは週に 2 回交換し, 飼育期間中は基礎飼料 (CRF-1 ; オリエンタル酵母株式会社, 東京) を給餌し, 水道水を自由摂水させた。

化学物質

17 α -ethynylestradiol (EE, CAS No. 57-63-6), raloxifene (RLX, CAS No. 84449-90-1), tamoxifen (TMX, CAS No. 54965-24-1) および ICI182,780 (ICI, CAS No. 129453-61-8) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より購入した。これらの被験物質はいずれも少量のゴマ油 (CAS No. 8008-74-0) に一晩溶解させ, その後ゴマ油を溶媒として各濃度に希釈して使用した。

実験 1

遺伝的バイアスを排除するため、すべての胎児を出生後 24 時間以内に集めてランダム化し、1 母動物あたりの胎児数を 10 匹かつ雌が多く残るよう無作為に割り付けを行った。ランダム化後、母動物を計 5 群に割り付け (n=5-6/群)、新生児 (生後 24 時間以内) に媒体であるゴマ油 (対照群)、RLX 0.1, 1, 10 mg/kg (それぞれ RLX0.1, 1, 10 群) または TMX 10 mg/kg (TMX10 群) を単回皮下投与した。EE, RLX および TMX の用量は、これまでの実験や過去の報告を参考に異常性周期の早期発現がみられる用量として設定した[55, 56]。生後 21 日に離乳後、各群の子動物は 2-4 匹ごとにケージに収容され (n=26/group)、生後 23 日から膣開口の有無を連日観察した。膣開口確認後は連続 5 日間の膣スミアの採取を開始し、性周期モニタリング、一般状態観察および体重測定を試験終了まで継続した。

その後は第 2 章に示した方法と同様に、10 週齢時に正常性周期を維持している個体について LH サージ誘発処置 (n=10/群) を行い、サージ誘発日の 16:00-17:00 に断頭採血または灌流固定 (それぞれ n=5/群) を実施して real-time PCR または ISH 用の視床下部サンプリングを行った。残りの動物 (n=16/群) は、第 2 章に示した判断基準に従って 26 週齢まで継続的に性周期をモニタリングし、26 週齢ですべての動物から組織採取 (卵巣, 子宮, 膣) および器官重量測定 (卵巣, 子宮) を実施した。採取した組織は定法に従って病理組織学的検索を実施した。

実験 2

RLX および TMX の子宮またはキスペプチンニューロンにおけるエストロゲン活性について検証するため、成熟ラットを用いた子宮肥大試験を実施し、同時に以下の方法で視床下部前部および後部における KiSS1 の反応性を調べた。実験 2 では、すべての動物 (n=30) について 7 週齢時にイソフルラン麻酔下で OVX を実施し、2 週間後、各動物を 6 群 (n=5/群) に割り付けてそれぞれ以下の被験物質を 3 日間連日皮下投与した；ゴマ油 (対照群), RLX 0.1, 1, 10 mg/kg (それぞれ RLX0.1, 1, 10 群), TMX 10 mg/kg (TMX10 群), EE 20 µg/kg (EE20 群; 陽性対照)。この 3 日間連日投与による子宮肥大試験は、in vivo エストロゲン活性検出法の国際的な標準プロトコールとして確立されている[57]。各動物を最終投与の約 24 時間後に剖検して子宮および膣を摘出し、周囲の脂肪や結合組織を丁寧にトリミングした。その後、子宮は子宮頸管および卵巣との境界部で切断し、湿重量および内腔液除去後の実質重量をそれぞれ測定した。これに加え、OVX に伴う KiSS1 発現の変化 (AVPV で発現が低下し、ARC で発現が上昇する) をエストロゲンが拮抗する作用を利用し、SERM 投与が視床下部に対してエストロゲン作用を有するかを検討するため、視床下部を摘出して前部と後部に分割し、real-time PCR で KiSS1 mRNA 発現を測定した。

実験 3

実験 3 では、RLX および TMX の子宮における抗エストロゲン活性について検証す

るため、EE の子宮肥大作用に対する RLX および TMX の抑制作用を比較した。実験 3 では、実験 2 と同様にすべての動物 (n=35) について 7 週齢で OVX を行い、2 週間後に各動物を 7 群 (n=5/群) に割り付けてそれぞれ以下の被験物質を 3 日間連日皮下投与した；ゴマ油 (対照群), EE 1 µg/kg (EE1 単独群), EE 1 µg/kg 投与後に RLX 0.1, 1, 10 mg/kg (それぞれ EE1+RLX0.1 群, EE1+ RLX1 群, EE1+RLX10 群), EE 1 µg/kg 投与後に TMX 10 mg/kg (EE1+TMX10 群), EE 1 µg/kg 投与後に ICI182,780 500 µg/kg (EE1+ICI 群; 陽性対照)。ICI182,780 は ER のフルアンタゴニストとして知られており [58], 子宮肥大抑制作用の陽性対照物質として使用した。その後は実験 2 と同様に最終投与の約 24 時間後に子宮および膣を摘出し、トリミングを実施して子宮の湿重量および実質重量をそれぞれ測定した。

なお、上述の実験計画はすべて実施施設 (国立医薬品食品衛生研究所) の動物実験倫理委員会に事前承認されており、動物の取り扱いの実施施設の動物実験指針を順守して実施された。

定量的 real-time PCR

第 1 章の方法に準じてサンプルを調製し、以下のプライマー-プローブセットの real-time PCR を実施した; *KiSS1* (Kiss1, Rn00710914_m1), *KiSS1r* (KiSS1R, Rn00576940_m1), *Gnrh1* (GnRH, Rn00562754_m1)。

ISH

第 1 章の方法に準じて KiSS1 mRNA 陽性細胞の検出を行った。

ホルモン測定

第 1 章の方法に準じて測定を実施した。測定内および測定間変動係数は、LH でそれぞれ 5.41%および 12.39%，FSH でそれぞれ 8.50%および 17.34%であった。

統計解析

Bartlett 検定で等分散を確認した後、膣開口日、体重、器官重量、ホルモン濃度、mRNA 発現レベル、ISH 陽性細胞数について、一元配置分散分析または Kruskal-Wallis 検定を行った。有意差が認められた場合は、対照群と RLX または TMX 投与群について Dunnett の多重比較検定を実施した。性周期モニタリングおよび病理組織検査の結果については、Fisher の正確確率検定により比較した。なお、有意水準 5%以下を有意差ありと判定した。

結果

一般状態、体重および膣開口日

試験期間を通じ、死亡および一般状態の異常はみられなかった。26 週齢までの経時的な体重推移を Fig. 3-1 に、平均膣開口日齢および膣開口時の体重を Table 3-1 に示した。TMX10 群では、11 週齢より対照群と比較して有意な体重の増加がみられ、この体重増加は試験期間終了時まで継続した。ほかの群では有意な体重の変化は認められなかった。また、RLX10 および TMX10 群では、対照群と比較して膣開口平均日齢の早期化がみられ、この 2 群では同時に膣開口時体重の有意な低下も認められた。

性周期モニタリング

26 週齢までの性周期モニタリングの結果を Fig. 3-2 に示した。対照群では、ほぼすべての個体で 4-5 日周期の正常な性周期が 18 週齢まで維持され、その後異常性周期を呈する個体の割合が徐々に増加し、正常性周期を示す個体の割合は 26 週齢で 37.5%まで低下した。RLX0.1 群および RLX1 群では、正常性周期を示す個体の割合の推移は対照群と同等であった。一方、RLX10 群では、より早期から正常性周期を示す個体の割合は低下し、対照群と比較して 12 週齢から 26 週齢まで有意な割合の低下がみられた。TMX10 群ではモニタリング開始時（7 週齢）から持続発情がみられ、試験期間を通じて正常な性周期は認められなかった。

定量的 real-time PCR

LH サージ時刻における視床下部前部 (AVPV) および後部 (ARC) の KiSS1 mRNA 発現を Fig. 3-3 に示した。視床下部前部では, TMX10 群において KiSS1 mRNA 発現レベルの有意な低下がみられ, RLX10 群においても対照群に比較して減少傾向が認められた。視床下部後部では, TMX10 群においてのみ KiSS1 mRNA の有意な発現低下が認められた。KiSS1 関連遺伝子では, 視床下部前部および後部の双方で GnRH1 および KiSS1R の mRNA 発現解析を行ったが, 対照群および SERM 投与群間で有意な発現変動は認められなかった。

ISH

AVPV および ARC における代表的な KiSS1 mRNA 陽性像を Fig. 3-4 および Fig. 3-5 に示した (Fig. 3-5 における写真右上の挿入図は KiSS1 陽性細胞の拡大図)。AVPV では, 第 3 脳室 (3V) 周囲において明瞭な青紫色の KiSS1 mRNA 陽性反応が認められ, TMX10 群において KiSS1 mRNA 陽性反応の顕著な減弱と KiSS1 陽性細胞数の有意な減少が認められた。同様に, 陽性反応性の減弱および KiSS1 陽性細胞数の有意な減少は RLX10 群でも認められた。一方, RLX0.1 および RLX1 群では, KiSS1 陽性反応の減弱はみられず, KiSS1 陽性細胞数は対照群と同程度であった。ARC では, 3V の脳底部側を中心とした KiSS1 陽性細胞の分布がみられ, TMX10 群においてのみ KiSS1

陽性細胞数の有意な減少が認められた。

血清中 LH および FSH 濃度

血清中 LH および FSH 濃度を Fig. 3-6 に示した。すべての血清は LH サージのピーク時刻である 16:00-17:00 の間にサンプリングされ、TMX10 群ではサージ時刻においても血清中の LH がほとんど検出されず、対照群と比較して LH 濃度はベースラインに近いレベルまで低下していた。また、RLX10 群でも有意な LH 濃度の減少がみられ、ピーク時の LH 濃度は対照群の約 50%程度まで低下していた。RLX0.1 および RLX1 群では LH 濃度の低値傾向がみられたものの、これらの 2 群の変化は対照群と比較して統計学的に有意な変化ではなかった。TMX10 群では、LH に加え、FSH 濃度でも顕著な減少がみられ、対照群と比較して FSH 濃度が有意に低下していた。一方、その他の群においても FSH 濃度の低値傾向がみられたものの、いずれの群でも対照群と比較して統計学的に有意な差は認められなかった。

器官重量および病理組織検査

26 週齢時の子宮および卵巣の実重量および相対重量を Table 3-2 に、また、同週齢における各群の代表的な病理組織像を Fig. 3-7 に、さらにその病理所見の集計を Table 3-3 に示した。RLX10 および TMX10 群では、卵巣重量の有意な低下がみられたが、子宮重量の有意な低下は TMX10 においてのみ認められた。病理組織検査では、卵巣

重量の低下と関連して、RLX1, RLX10 および TMX10 群において黄体数の減少, 閉鎖卵胞数の増加がみられ, RLX10 および TMX10 群では卵巣の萎縮が顕著であった。これに加え, TMX10 群ではさらに卵巣周囲被膜における線維化および肥厚がみられ, 同様の变化は同群の卵管周囲でも認められた, 子宮では, 子宮腺数の減少が RLX10 および TMX10 群の両群でみられた一方, 子宮内膜の扁平上皮化生は RLX10 群において, 内腔の顕著な縮小を伴う子宮萎縮は TMX10 群においてそれぞれ単独で認められた。

RLX および TMX のエストロゲン／抗エストロゲン活性の検討（子宮肥大試験）

実験 2 および実験 3 で得られた子宮重量の変化および AVPV または ARC における KiSS1 mRNA 発現の変化を Fig. 3-8 に示した。実験 2 では, EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ または TMX 10 mg/kg の 3 日間連日投与により子宮重量の有意な増加が認められた。一方, RLX 0.1, 1 および 10 mg/kg の投与では, RLX0.1 群における実質重量のごくわずかな上昇を除き, 有意な子宮重量の変化は認められなかった。実験 3 では, RLX 0.1, 1, 10 mg/kg または TMX 10 mg/kg の 3 日間連日投与により, EE 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与による子宮重量増加の有意な抑制作用が認められた。特に EE1+RLX1 および EE1+RLX10 群では, 陽性対照として設定した EE1+ICI 群と同程度の抑制作用が認められ, 成熟ラットの子宮における RLX の強力な抗エストロゲン作用が示唆された。実験 2 で実施した KiSS1 mRNA 発現解析では, EE 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の 3 日間連日投与により視床下部前部 (AVPV)

における KiSS1 の有意な発現上昇および視床下部後部（ARC）における KiSS1 の有意な発現低下がみられたが，RLX または TMX を投与したその他の群では，視床下部前後部におけるこれらの有意な KiSS1 の発現変動は認められなかった。

考察

本章では, SERM の新生児期曝露による遅発影響の発現と視床下部キスペプチンニューロンへの影響について検証を行った。その結果, 生後 0 日齢の新生児ラットへの RLX または TMX 10 mg/kg の単回投与により, young adult 期における性周期停止の早期化およびサージ時刻における血清中 LH 濃度の低下が認められ, 第 1 章および第 2 章での他のエストロゲン類の新生児期曝露で見られた作用と同様に, SERM の新生児期曝露により視床下部-下垂体-性腺軸の発達が障害されることが示唆された。これらの結果は, Pinilla らによって過去に報告された結果と一致しており, 生後 1~5 日齢のラットにおける 50-500 μ g の RLX 投与により, 性周期の早期停止, ギナドトロピン分泌の減少, エストロゲンによるフィードバック機構の阻害, 外因性 GnRH に対する下垂体の反応性低下などの神経内分泌系の障害が生じることが報告されている [55, 56, 59]。また, 同研究グループは生後 1~5 日齢のラットにおける 100 μ g の TMX 投与により, ギナドトロピン分泌の減少と卵巣の萎縮性変化が生じることとも報告しており, 文献中ではこれらの SERM が新生児ラットの視床下部分化過程においてエストロゲン様作用を有すると考察している。

これらの既知の知見に加え, 本章では新生児期の SERM 曝露により, これまでの章で検証してきた遅発影響の指標として, AVPV における KiSS1 mRNA の発現が低下し, KiSS1 陽性細胞数が減少することを明らかにした。キスペプチンニューロンに

における KiSS1 発現の変化は、その後の LH サージや性周期の調節異常における早期イベントとして知られており[44, 60, 61]、本章で認められた RLX および TMX10 群の変化は、SERM が視床下部-下垂体-性腺軸と成熟後の生殖機能の発達に障害を与える可能性、すなわち、他のエストロゲン類と同様に、新生児の脳の性分化に対してエストロゲン作用を示している可能性を示唆している。

SERM は ER に対して調節作用を有することが知られており、作用する組織の細胞学的な背景に応じて、組織選択的なエストロゲンまたは抗エストロゲン作用を示すことが知られている[62]。一方、SERM の視床下部および神経内分泌系に対する作用については、エストロゲン活性の有無も含めて報告が少なく、一定の結論を得ていない。

Wilson らは、480 $\mu\text{g/kg}$ の TMX およびエストロゲンを OVX アカゲザルに 21 日間併用投与した場合、TMX はエストロゲンによる LH 分泌抑制に対する拮抗作用を示したが、TMX の単独投与では LH 分泌に影響を及ぼさなかったことを報告している[63]。

対照的に、Sanchez-Criado らは、3 mg/kg の TMX 投与が正常性周期および GnRH 誘発 LH 分泌に対してエストロゲン／抗エストロゲン作用の両方を示し、RLX では抗エストロゲン作用のみがみられたと報告している[64]。さらに Pinilla らの報告では、OVX ラットへの RLX 500 $\mu\text{g/rat}$ 3 日間連日皮下投与が、OVX 後の LH 過剰分泌に対して抑制作用を示し、RLX 単独投与による LH 分泌へのエストロゲン作用の可能性を推察している。本章でも SERM のキスペプチンニューロンに対するエストロゲン作用について検証を行ったが、RLX および TMX は OVX ラットの AVPV および ARC にお

ける KiSS1 発現に対して影響を及ぼさなかった。我々は過去の実験結果から、成熟ラットでは OVX によって視床下部キスペプチンニューロンにおける KiSS1 発現が変化（AVPV で発現低下、ARC で発現上昇）し、さらにこれらの変化が LH サージ誘発のための外因性エストロゲン投与によって拮抗することを見出している。本章においても、陽性対照として設定した EE20 群で KiSS1 の AVPV における発現上昇および ARC における発現低下がみられたことから、少なくとも本章で用いた用量では、RLX および TMX は成熟 OVX ラットのキスペプチンニューロンに対してエストロゲン作用を示さないことが示唆され、新生児ラットへの SERM 投与により遅発影響の発現が認められた先の結果と相反する結果となった。この原因は明らかではなかったが、ひとつの可能性として、エストロゲン作用の有無の検証では成熟ラットを用いており、新生児と成熟ラットで視床下部の SERM の感受性が異なる可能性が考えられる。すなわち、SERM によるエストロゲン作用は組織に対する選択性だけでなく年齢依存的な側面も有しており、各組織の発達・成熟に伴って SERM の ER 調節作用に対する感受性が変化していく可能性が推察された。なお、本章で実施した子宮肥大試験では、TMX は子宮に対して単独ではエストロゲン、エストロゲン併用時は抗エストロゲン作用を示し、RLX は併用時の抗エストロゲン作用のみを示した。これらの結果は、SERM の子宮に対する作用を検証した過去の報告[65-67]と一致していた。

TMX10 群および RLX10 群における変化の比較では、性周期、KiSS1 発現および LH 濃度のいずれの変化についても TMX10 群でより顕著な変化がみられた。また、これ

らの遅発影響における既知の変化に加え、TMX10 群では体重増加、ARC における KiSS1 発現低下および KiSS1 陽性細胞数の減少ならびに FSH 濃度の低下といった、これまでの検証ではみられなかった変化が発現しており、新生児期の TMX 投与によるキスペプチンニューロンの障害が、FSH のパルス状分泌を司る ARC にも及んでいる可能性が示唆された。過去のより高用量の新生児期エストロゲン曝露について検証した報告でも類似した作用が報告されており[6, 26]、これらの報告では新生児脳の雄性化が示唆されていることから、本章の TMX10 群で認められた変化の一部は脳の雄性化に起因したものであり、同用量の RLX 曝露に比較してより強い作用が表れているものと考えられた。

病理組織学的検索では、RLX10 および TMX10 群における黄体数の減少、閉鎖卵胞数の増加および卵巣の萎縮性変化がみられたが、これらの変化は卵巣重量の低下と関連しており、長期間に及ぶ性周期の停止に起因した変化であると考えられた。加えて、RLX10 群では子宮内膜の過形成を伴う扁平上皮化生がみられたが、当該変化はエストロゲン／プロゲステロン比率のバランスの変化により生じることが知られており[68, 69]、同群で認められた黄体数の減少がプロゲステロンの低下に寄与している可能性が考えられた。一方、TMX10 群では当該変化はみられず、内腔直径の顕著な縮小を伴う子宮萎縮が認められたことから、TMX10 群ではさらにエストロゲン分泌も長期間低下していたことが示唆された。また、TMX10 群では卵巣および卵管部における被膜肥厚と微小血管形成を伴う顕著な線維化が認められた。これらの変化の毒性

学的意義は明らかではなかったが、TMX10 群では正常性周期が欠失していたことから、卵巣における何らかの発達障害を示唆している可能性が考えられた。

第3章では, SERM の新生児期曝露による遅発影響および視床下部キスペプチンニューロンにおける KiSS1 発現への影響について検証した。

その結果, 生後0日齢のラットへの RLX 10 mg/kg または TMX 10 mg/kg の投与により, young adult 期において LH サージの減弱, AVPV における KiSS1 mRNA 発現の低下および KiSS1 陽性細胞数の減少, ならびに加齢に伴う性周期停止の早期化が認められ, SERM の新生児期曝露が他のエストロゲン物質と同様に, これまでの章で検証してきたキスペプチンニューロンの発達障害とこれに引き続く遅発影響を誘発することが明らかになった。これに加え, TMX10 群では FSH 濃度の低下および ARC における KiSS1 陽性細胞数の減少がみられ, TMX の新生児期曝露による脳の雄性化が示唆された。

子宮肥大試験における SERM のエストロゲン／抗エストロゲン活性の検証では, 子宮における RLX および TMX のエストロゲン活性と, エストロゲン併用時の TMX による抗エストロゲン活性がみられたが, いずれの SERM もキスペプチンニューロンの KiSS1 発現には影響を及ぼさなかったことから, SERM のエストロゲン活性は組織に対する特異性だけでなく年齢依存的な側面も有している可能性が示唆された。

総合考察

新生児期におけるエストロゲン類の曝露は、視床下部-下垂体-性腺軸を中心とする神経内分泌系の発達を障害し、意図しない曝露による生殖機能の発達への影響が古くから懸念されてきた。特に曝露量が相対的に低用量だった場合、その影響は生後すぐには発現せず、目に見えにくい遅発性の影響として発現することが本研究の結果から示唆され、遅発影響の発現機序やそのターゲットを明らかにすることは、エストロゲン類のリスクアセスメントを考える上で非常に重要と考えられる。第 1 章の結果から、遅発影響ではその代表的な変化である「性周期停止の早期化」に先駆けて、AVPV における KiSS1 の発現低下や KiSS1 陽性細胞における ER α 共発現率の低下等のキスペプチンニューロンにおける機能障害を示唆する明らかな変化が認められたことから、新生児期に曝露されたエストロゲンの重要なターゲットの一つとしてキスペプチンニューロンが考えられ、遅発影響の発現メカニズムにキスペプチンニューロンの発達障害が深く関与している可能性が示唆された。また、老齢ラットを用いた検証でも、「加齢性の性周期停止」がみられる週齢の動物において遅発影響に類似した変化がみられ、遅発影響で認められた一連の変化が「生殖機能老化の早期化」を示唆している可能性が考えられたことから、影響が遅発性に発現するメカニズムとして、キスペプチンニューロンを中心とする神経内分泌系の潜在的な機能低下が、加齢に伴う機能低下と相乗することで初めて顕在化する可能性が考えられた。

これらの事象をヒトへ外挿した場合、ヒトでも胎児期における微量のエストロゲン曝露によって閉経の早期化や妊孕性の低下など、顕在化しにくい遅発性の影響が生じる可能性が考えられる。第2章の結果では、ラット新生児では生後0日から約10日齢までは遅発影響を引き起こす外因性のエストロゲンに対してははっきりと感受性を維持しており、さらに既存の文献報告も加味した場合、生後14日齢でも高用量の曝露に対しては感受性を維持している可能性が示唆されている。これはヒトの妊娠期間に外挿した場合「妊娠第3期 (third trimester)」に相当し、この時期の胎児は視床下部の性分化がまだ完了していないと考えられている[47,48]。これまでの疫学調査等に基づく報告では、外因性エストロゲンに対する感受期は妊娠早期(胚／胎児期)に存在し、影響の発現も妊娠第2期頃までの曝露に限定され则认为られているが、本研究の結果は、より後期のエストロゲン曝露でも、前述の「神経内分泌系の機能低下」や「生殖機能老化の早期化」といった潜在的な影響を生じるリスクがあることを示唆している。

また、第1章および第2章では、ERに対する純粋なアゴニスト作用を有するEEを用いた検証を行ったが、第3章の結果から、SERMのような組織選択的なエストロゲン活性を示す複雑な化合物でも、新生児への曝露によって遅発影響を誘発するリスクがあることが明らかになった。SERMはその薬理作用面における特性から、乳がんや閉経後骨粗鬆症の治療薬として長い間医療現場において広く用いられているが、妊婦や妊娠している可能性のある女性に対する投与が禁忌となっていることから、

SERM の生殖発生毒性は必ずしも十分に研究されていない。特に SERM の視床下部をはじめとする CNS に対するエストロゲン／抗エストロゲン活性の有無については、げっ歯類や霊長類を用いた報告でも一定の結論を得ていない。本研究でも、成熟動物を用いた検証では RLX および TMX のキスペプチンニューロンに対するエストロゲン活性が認められなかったが、一方では RLX および TMX の新生児曝露によって明確な遅発影響の発現がみられ、特に TMX では「脳の雄性化」に類似した強い影響が認められた。これらの検証結果から、他の純粋なエストロゲン作用を有する化合物と同様に SERM にも遅発影響誘発作用があり、さらに SERM では成熟動物におけるエストロゲン活性と相関しない強い影響が発現する可能性があることから、他のエストロゲン類に比較してより慎重な生殖発生毒性の検証が必要と考えられた。

上記の通り、本研究では第 1 章から第 3 章までの実験を通じて、低用量エストロゲン類の新生児期曝露による遅発影響の特徴とその発現メカニズムについて詳細な検討を行ってきた。そこで明らかになった遅発影響の特徴とは、1) 微量の曝露でも潜在的な影響を生じること、2) 従来想定されていたよりも長い感受期を有すること、3) 純粋なエストロゲン作用を有する物質以外でも類似の影響を及ぼしうることであり、これらの事象を考慮すると、エストロゲン作用に基づく内分泌かく乱が懸念される化学物質のリスク評価においては、遅発影響のような潜在的な影響が生じる可能性を念頭においた試験系での毒性評価を実施する必要があると考えられる。一方で、現実の評価系としてはそのような影響を検出可能な評価系とはなっておらず、現在実

施されている生殖発生毒性試験では、一世代の観察期間が最も長い拡張一世代生殖毒性試験（OECD TG443）であっても性周期観察は最大 PND90 までであり，本章で認められたような生後 20 週以降に顕在化する遅発影響を検出できない可能性が懸念される。これにより，結果として無毒性量（NOAEL）および許容一日摂取量（ADI）が高く見積もられ，特に農薬や食品添加物等で微量に反復曝露される可能性のある化学物質でリスクを高める結果となる可能性がある。また，TG443 の中では内分泌かく乱作用のスクリーニング評価系として子宮肥大試験（OECD TG440）を推奨しているが，第 3 章の RLX で認められたように，子宮に対するエストロゲン作用を示さない場合でも遅発影響を誘発する化合物が存在することから，視床下部をはじめとする CNS に対するエストロゲン作用を検出できるスクリーニング試験系も同時に必要となる。本研究では，子宮肥大試験の中で同時に KiSS1 を指標とした視床下部でのエストロゲン作用の検出を試みたが，成熟動物を用いた検証では作用を検出できなかったため，今後は幼若動物を用いた子宮肥大試験でも検討を実施する必要がある。このように，遅発影響の可能性を念頭においた場合，現状では必ずしも十分な評価が実施できていない現状をふまえ，遅発影響のさらなる研究に加えて評価系の構築も検討していく必要があると考えられる。

結論

本研究では、遅発影響の発現機序と遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、新生児期にエストロゲン類を曝露したラットにおけるキスペプチンニューロンの変化について様々な角度から検証を行った。

第1章の結果から、遅発影響の発現メカニズムには視床下部キスペプチンニューロンの発達障害が深く関与しており、その本質は、「生殖機能老化の早期化」を示唆する性成熟後の神経内分泌系の機能低下であると考えられた。

第2章の結果から、遅発影響の臨界期は、ラットではヒトの妊娠第3期に相当する生後0日から10日齢前後に存在し、これまで想定されていたより後期の曝露でも潜在的な影響が生じるリスクが明らかになった。

第3章の結果から、遅発影響はSERMを含む様々なエストロゲン活性を有する化学物質に共通したハザードであり、特にSERMの生殖発生に対するリスクについてはより慎重な検証が必要と考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり，終始御指導，御鞭撻を賜りました東京農工大学大学院農学
研究院動物生命科学部門 渡辺元 教授 ならびに 国立医薬品食品衛生研究所病
理部前第二室長 吉田緑 博士に深謝致します。

本研究の遂行および本稿作成に際し，懇篤な御指導，御助言を賜りました，日本獣
医生命科学大学大学院病態獣医学部門病態解析学分野 横須賀誠 教授，麻布大学獣
医学部動物比較毒性学研究室 代田真理子 教授，明治大学農学部農学科動物環境学
研究室 川口真以子 講師，東京農工大学大学院農学研究大学院動物生命科学部門 田谷
一善 前教授， 長岡謙太郎 准教授，臼田賢人 氏，国立医薬品食品衛生研究所病
理部第二室 高橋美和 博士，井上薫 博士に謹んで深謝の意を表します。

研究に際して，御指導，御協力を賜りました国立医薬品食品衛生研究所安全性生物
試験研究センター センター長 西川秋佳 博士，国立医薬品食品衛生研究所病理部
長 小川久美子 博士，第一室長 梅村隆志 博士，第三室長 曹永晩 博士，そし
て国立医薬品食品衛生研究所病理部の皆様に心より感謝致します。また本研究にあた
り動物飼育および病理標本作製に対する高度な技術で御協力いただいた国立医薬品
食品衛生研究所病理部 森川朋美， 才川文子， 小松芳美各氏に厚く御礼申し上げま
す。

本研究は，私が勤務している持田製薬株式会社から国立医薬品食品衛生研究所へ国

内留学した際に実施したものである。本研究の機会を与えていただきました持田製薬株式会社の関係者の方々に深く感謝致します。

引用文献

1. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 2009; 30:293-342.
2. Jeung EB, Choi KC. Toxicological mechanism of endocrine disrupting chemicals: is estrogen receptor involved? *Toxicol Res* 2010; 26:237-43.
3. Markey CM, Rubin BS, Soto AM, Sonnenschein C. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 83:235-44.
4. Newbold RR. Developmental exposure to endocrine-disrupting chemicals programs for reproductive tract alterations and obesity later in life. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:1939S-42S.
5. Christensen LW, Gorski RA. Independent masculinization of neuroendocrine systems by intracerebral implants of testosterone or estradiol in the neonatal female rat. *Brain Res* 1978; 146:325-40.
6. Katsuda S, Yoshida M, Watanabe G, Taya K, Maekawa A. Irreversible effects of neonatal exposure to p-tert-octylphenol on the reproductive tract in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000;165: 217-26.
7. McLachlan JA, Newbold RR, Shah HC, Hogan MD, Dixon RL. Reduced fertility in female mice exposed transplacentally to diethylstilbestrol (DES). *Fertil Steril* 1982; 38:364-71.
8. Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, Asai S, Nakae D, Kurokawa Y, Taya K, Maekawa A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis* 2002; 23:1745-50.
9. 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. *Mol Endocrinol* 2011; 25:2157-68.
10. Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicol. Pathol* 2011; 39:823-34.
 11. Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol* 2013; 40:16-23.
 12. 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. *J Toxicol Sci* 2012; 37:681-90.
 13. 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. *Reprod Toxicol* 2012; 34:323-30.
 14. Kotani M, Detheux M, Vandenbogaerde A, Communi D, Vanderwinden JM, Le Poul E, Brézillon S, Tyldesley R, Suarez-Huerta N, Vandeput F, Blanpain C, Schiffmann SN, Vassart G, Parmentier M. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J Biol Chem* 2001; 276:34631-6.
 15. Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T, Asada M, Yamada T, Suenaga M, Kitada C, Usuki S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411:613-7.
 16. Smith JT, Clifton DK, Steiner RA. Regulation of the neuroendocrine reproductive axis by

- kisspeptin-GPR54 signaling. *Reproduction* 2006; 131:623-30.
17. Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. *Trends Neurosci* 2007; 30:504-11.
 18. Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8:21-9.
 19. Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Endocrinology* 2006; 147:1154-8.
 20. Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 2007; 53:367-78.
 21. Smith JT. Kisspeptin signalling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res Rev* 2008; 57:288-98.
 22. García-Galiano D, Pinilla L, Tena-Sempere M. Sex steroids and the control of the Kiss1 system: developmental roles and major regulatory actions. *J Neuroendocrinol* 2012; 24:22-33.
 23. Lederman MA, Lebesgue D, Gonzalez VV, Shu J, Merhi, ZO, Etgen AM, Neal-Perry G. Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. *Neuropharmacology* 2010; 58:314-20.
 24. Neal-Perry G, Lebesgue D, Lederman M, Shu J, Zeevalk GD, Etgen AM. The excitatory peptide kisspeptin restores the luteinizing hormone surge and modulates amino acid neurotransmission in the medial preoptic area of middle-aged rats. *Endocrinology* 2009; 150:3699-708.

25. Bateman HL, Patisaul HB. 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* 2008; 29:988-97.
26. 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* 2009;150: 2359-67.
27. Patisaul HB, Todd KL, Mickens JA, Adewale HB. Impact of neonatal exposure to the ERalpha agonist PPT, bisphenol-A or phytoestrogens on hypothalamic kisspeptin fiber density in male and female rats. *Neurotoxicology* 2009; 30:350-7.
28. Düsterberg B, Kühne G, Täuber U. Half-lives in plasma and bioavailability of ethinylestradiol in laboratory animals. *Arzneimittelforschung* 1986; 36:1187-90.
29. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Barreiro ML, Roa J, Sanchez-Criado JE, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L, Tena-Sempere M. Developmental and hormonally regulated messenger ribonucleic acid expression of KiSS-1 and its putative receptor, GPR54, in rat hypothalamus and potent luteinizing hormone-releasing activity of KiSS-1 peptide. *Endocrinology* 2004; 145:4565-74.
30. Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S. Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil* 1983; 69:265-70.
31. Ishii MN, Matsumoto K, Matsui H, Seki N, Matsumoto H, Ishikawa K, Chatani F, Watanabe G, Taya K. Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-related disappearance of LH surge in middle-age female rats. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 193:121-9.
32. Clarkson J, d'Anglemont de Tassigny X, Moreno AS, Colledge WH, Herbison AE.

- Kisspeptin-GPR54 signaling is essential for preovulatory gonadotropin-releasing hormone neuron activation and the luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2008; 28:8691-7.
33. Cooper RL, Roberts B, Rogers DC, Seay SG, Conn PM. Endocrine status versus chronologic age as predictors of altered luteinizing hormone secretion in the "aging" rat. *Endocrinology* 1984; 114:391-6.
 34. DePaolo LV, Chappel SC. Alterations in the secretion and production of follicle-stimulating hormone precede age-related lengthening of estrous cycles in rats. *Endocrinology* 1986;118: 1127-33.
 35. Wise PM. Alterations in the proestrous pattern of median eminence LHRH, serum LH, FSH, estradiol and progesterone concentrations in middle-aged rats. *Life Sci* 1982; 31:165-73.
 36. Nass TE, LaPolt PS, Judd HL, Lu JK. Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in ageing female rats. *J Endocrinol* 1984; 100:43-50.
 37. Zhang J, Yang L, Lin N, Pan X, Zhu Y, Chen X. Aging-related changes in RP3V kisspeptin neurons predate the reduced activation of GnRH neurons during the early reproductive decline in female mice. *Neurobiol Aging* 2014; 35:655-68.
 38. 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* 2014; 39:775-84.
 39. Gibori G, Sridaran R. Sites of androgen and estradiol production in the second half of pregnancy in the rat. *Biol Reprod* 1981; 24:249-56.
 40. Gore AC. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:358-74.

41. Rosa-E-Silva A, Guimaraes MA, Padmanabhan V, Lara HE. Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. *Endocrinology* 2003; 144:4289-97.
42. MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 1981; 211:1294-1302.
43. Arnold AP, Gorski RA. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7:413-42.
44. 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.
45. Losa SM, Todd KL, Sullivan AW, Cao J, Mickens JA, Patisaul HB. Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat. *Reprod Toxicol* 2011; 31:280-9.
46. Dickerson SM, Cunningham SL, Patisaul HB, Woller MJ, Gore AC. Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology* 2011; 152:581-94.
47. Herbst AL, Anderson D. Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix secondary to intrauterine exposure to diethylstilbestrol. *Semin Surg Oncol* 1990; 6:343-6.
48. Swan SH. Intrauterine exposure to diethylstilbestrol: long-term effects in humans. *APMIS* 2000; 108:793-804.
49. Grumbach MM. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res* 2002; 57:2-14.
50. Rice D, Barone S Jr. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect* 2000; 108:511-33.

51. Sotomayor-Zárate R, Dorfman M, Paredes A, Lara HE. Neonatal exposure to estradiol valerate programs ovarian sympathetic innervation and follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 2008; 78:673-80.
52. Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, Patisaul HB. Neonatal bisphenol-a exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Biol Reprod* 2009; 81:690-9.
53. Musa MA, Khan MO, Cooperwood JS. Medicinal chemistry and emerging strategies applied to the development of selective estrogen receptor modulators (SERMs). *Curr Med Chem* 2007; 14:1249-61.
54. Pinkerton JV, Thomas S. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014; 142:142-54.
55. Pinilla L, González LC, Gaytán F, Tena-Sempere M, Aguilar E. Oestrogenic effects of neonatal administration of raloxifene on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female rats. *Reproduction* 2001; 121:915-24.
56. 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* 2002; 172:441-8.
57. 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. *Environ Health Perspect* 2001; 109:785-94.
58. Wakeling AE, Dukes M, Bowler J. A potent specific pure antiestrogen with clinical potential. *Cancer Res* 1991; 51:3867-73.
59. Tena-Sempere M, Barreiro ML, Aguilar E, Pinilla L. Mechanisms for altered reproductive function in female rats following neonatal administration of raloxifene. *Eur J Endocrinol* 2004; 150:397-403.

60. 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* 2015; 93:32.
61. 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. *Biol Reprod* 2009; 81:1216-25.
62. Martinkovich S, Shah D, Planey SL, Arnott JA. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. *Clin Interv Aging* 2014; 9:1437-52.
63. Wilson ME, Mook D, Graves F, Felger J, Bielsky IF, Wallen K. Tamoxifen is an estrogen antagonist on gonadotropin secretion and responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in female monkeys. *Endocrine* 2003; 22:305-15.
64. Sánchez-Criado JE, Guelmes P, Bellido C, González M, Hernández G, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Bello AR, Alonso R. Tamoxifen but not other selective estrogen receptor modulators antagonizes estrogen actions on luteinizing hormone secretion while inducing gonadotropin-releasing hormone self-priming in the rat. *Neuroendocrinology* 2002; 76:203-13.
65. Shelby MD, Newbold RR, Tully DB, Chae K, Davis VL. Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 1996; 104:1296-300.
66. Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 1997; 138:1552-8.

67. Qu Q, Zheng H, Dahllund J, Laine A, Cockcroft N, Peng Z, Koskinen M, Hemminki K, Kangas L, Väänänen K, Härkönen P. Selective estrogenic effects of a novel triphenylethylene compound, FC1271a, on bone, cholesterol level, and reproductive tissues in intact and ovariectomized rats. *Endocrinology* 2000; 141:809-20.
68. National Toxicology Program. Toxicology and carcinogenesis study of ethinyl estradiol (CAS No. 57-63-6) in Sprague-Dawley rats (feed study). Natl Toxicol Program. Tech Rep Ser 2010; 548:1-210.
69. 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; 27:1S-107S.

要旨

哺乳類の脳では、新生児期に大量のエストロゲン作用を有する物質に曝露されると、「脱雌性化」あるいは「雄性化」と呼ばれる、成熟後の性行動や生殖機能における不可逆性の障害を誘発することが知られている。また、その曝露が小量だった場合でも、性周期の早期停止に特徴づけられる様々な遅発性の生殖機能障害（遅発影響）が生じることが報告されており、意図しない新生児期におけるエストロゲン類の曝露による生殖内分泌系の発達への影響が古くから懸念されてきた。遅発影響の発現機序については、これまでの研究報告から、視床下部の排卵制御機構に何らかの異常をきたしていることが示唆されているが、その影響が遅発性に生じるメカニズムや、その際のキスペプチンニューロンの変化については未だ明らかになっていない。そこで本研究では、遅発影響の発現機序と遅発影響におけるキスペプチンニューロンの関与を明らかにするため、新生児期にエストロゲン類を曝露したラットにおけるキスペプチンニューロンの変化について様々な角度から検証を行った。

第1章では、新生児期にEEを曝露されたラットの young adult 期（性周期停止前）における、視床下部キスペプチンニューロンおよびLHサージ分泌の詳細な検索を行った。その結果、新生児期にEEを曝露したラットでは、LHサージのピーク時間の遅延とサージ面積の減少、ならびに視床下部キスペプチンニューロンの AVPV における KiSS1 mRNA の発現低下がみられ、同時に KiSS1 mRNA 陽性細胞における ER α

共発現率の低下も認められた。これらの AVPV 特異的な変化は、視床下部-下垂体-性腺軸における LH サージ制御機構の機能障害を示唆しており、後に遅発性に発現する「性周期の早期停止」の寄与する変化であると考えられた。また、これらの神経内分泌系における変化は、遅発影響誘発ラットおよび老齢ラットの双方で認められたことから、遅発影響と生殖機能の老化に伴ってみられる変化は類似しており、遅発影響が「生殖機能老化の早期化」を意味している可能性が考えられた。また、これらの変化がいずれも性周期の変化に先駆けて生じていることから、LH サージの減弱や KiSS1 mRNA の低下といった神経内分泌系の変化が、「性周期の早期停止」に代わる遅発影響の早期指標として利用できる可能性が期待された。

第2章では、エストロゲンの新生児期曝露による遅発影響の臨界期を明らかにするため、生後 0, 5, 10 および 14 日の新生児ラットに EE を曝露し、視床下部キスペプチンニューロンの変化と遅発影響の発現の有無について詳細に検索した。その結果、生後 0, 5 および 10 日齢に EE 20 $\mu\text{g/kg}$ を曝露した群では、生後 11 週齢に遅発影響の指標である KiSS1 mRNA の発現低下、KiSS1 陽性細胞数の減少および LH サージの減弱傾向が認められた。上述の群では、これらの変化と相関して異常性周期の早期発現も認められ、新生児期に曝露した EE による遅発影響が発現していると考えられたが、生後 14 日齢に EE を曝露した PND14 群ではこれらの一連の変化は明らかではなかった。以上の結果から、ラットでは新生児早期（生後 0～10 日齢）が外因性のエストロゲンに対して脆弱性を有する遅発影響の臨界期であり、その臨界期のエンドポイント

は新生児後期（生後 14 日齢前後）に存在しているものと推察された。

第 3 章では, SERM の新生児期曝露による遅発影響および視床下部キスペプチンニューロンにおける KiSS1 発現への影響について検証した。その結果, 生後 0 日齢のラットへの RLX 10 mg/kg または TMX 10 mg/kg の投与により, young adult 期において LH サージの減弱, AVPV における KiSS1 mRNA 発現の低下および KiSS1 陽性細胞数の減少, ならびに加齢に伴う性周期停止の早期化が認められ, SERM の新生児期曝露が他のエストロゲン物質と同様に, これまでの章で検証してきたキスペプチンニューロンの発達障害とこれに引き続く遅発影響を誘発することが明らかになった。これに加え, TMX10 群では FSH 濃度の低下および ARC における KiSS1 陽性細胞数の減少がみられ, TMX の新生児期曝露による脳の雄性化が示唆された。子宮肥大試験における SERM のエストロゲン／抗エストロゲン活性の検証では, 子宮における RLX および TMX のエストロゲン活性と, エストロゲン併用時の TMX による抗エストロゲン活性がみられたが, いずれの SERM もキスペプチンニューロンの KiSS1 発現には影響を及ぼさなかったことから, SERM のエストロゲン活性は組織に対する特異性だけでなく年齢依存的な側面も有している可能性が示唆された。

以上の結果から, 遅発影響の発現メカニズムには視床下部キスペプチンニューロンの発達障害が深く関与しており, その本質は, 「生殖機能老化の早期化」を示唆する性成熟後の神経内分泌系の機能低下であると考えられた。また, 遅発影響の臨界期は, ラットではヒトの妊娠第 3 期に相当する生後 0 日から 10 日齢前後であり, これまで

想定されていたより後期の曝露でも潜在的な影響が生じるリスクが明らかになった。

また、遅発影響は SERM を含む様々なエストロゲン活性を有する化学物質に共通したハザードであり、特に SERM の生殖発生に対するリスクについてはより慎重な検証が必要と考えられた。

Abstract

In the brains of mammals, it is known that neonatal exposure to large amount of estrogens could cause irreversible abnormalities in sex behavior and reproductive function after maturation, known as “defeminization” or “masculinization”. On the other hand, shorter and lower-dose neonatal exposure to estrogenic compounds is also reported to cause delayed multiple reproductive dysfunction (delayed effect), which is characterized by the early cessation of estrous cycle. Therefore, unexpected neonatal exposure to various estrogen-like compounds has been of great concern to the development of endocrine and reproductive functions. Regarding the mechanism of delayed effect, disruption of the hypothalamic ovulation regulating system has been considered as one of major cause of the delayed effect; however, the precise mechanism underlying the delayed effect and involvement of changes in the kisspeptin neuron are remains unknown. Therefore, in the present study, we multidirectionally investigate the functional changes of the kisspeptin neuron in the rats neonatally exposed to various estrogenic compounds to clarify the pathogenesis of delayed effect and involvement of kisspeptin neuron.

In the chapter 1, we investigate the hypothalamic kisspeptin neuron and LH surge secretion in young adult rats (before cessation of estrous cycle) neonatally exposed to ethynylestradiol (EE). As a result, decreased KiSS1 mRNA expression in AVPV, delayed peak time and

decreased area of LH surge were observed in neonatally EE exposed rats, and the percentage of KiSS1-positive cells co-expressing ER α was also decreased in these animals. These AVPV specific changes indicate dysfunction of LH surge regulating system in hypothalamus-pituitary-gonadal axis, and also considered to be related to following “early cessation of estrous cycle”. These neuroendocrine changes were observed both in the delayed effect induced and aging rats, therefore, it is considered that changes observed in delayed effect are similar to that observed with reproductive aging, suggest that delayed effects might means “acceleration of the reproductive aging”. Furthermore, all these changes occurred before the cessation of estrous cycle, indicating that these neuroendocrine changes such as diminished LH surge and decreased KiSS1 mRNA expression might have the possibility to be early indicators for the delayed effect substitute for the “abnormal estrous cycle” occurred in later age.

In the chapter 2, to clarify the critical window for delayed effect induced by neonatal exposure to estrogen, we exposed EE to neonatal female rats at postnatal day (PND) 0, 5, 10 and 14, and investigate the changes in hypothalamic kisspeptin neuron and occurrence of delayed effect. As a result, decreased KiSS1 expression and KiSS1-positive cells in AVPV were detected, and LH surge also showed diminished tendency at 11 weeks of age in the groups exposed to EE 20 μ g/kg at PND 0, 5 and 10. In these groups, associated with hypothalamic changes, early onset of abnormal estrous cycle was also detected, suggesting occurrence of delayed effect induced by the neonatally exposed EE in these groups, however, these changes

are not evident in the group exposed to EE at PND 14. Considering together, critical window for the delayed effect is correspond to the early postnatal ages (PND 0 to 10), in which neonatal brains maintain the vulnerability to exogenous estrogens, and this window was considered to close gradually toward the late postnatal ages (PND14) being a provisional endpoint for the window.

In the chapter 3, we investigate influence of neonatal exposure to selective estrogen receptor modulator (SERM) on delayed effect occurrence and KiSS1 expression of hypothalamic kisspeptin neuron. As a result, diminished LH surge, decreased KiSS1 mRNA expression and KiSS1-positive cells in AVPV and early cessation of estrous cycle with aging were observed in young adult rats neonatally exposed to Raloxifene (RLX) and Tamoxifen (TMX) 10 mg/kg at PND0, suggesting that neonatal exposure to SERM could induce impairment of kisspeptin neuron development and following delayed effect the same as other estrogens examined in other chapters. In addition, diminished FSH levels and decreased number of KiSS1-positive cells in arcuate nucleus (ARC) were also detected in TMX 10 mg/kg group, indicating complete “masculinization” of neonatal brain by TMX exposure. In uterotrophic assay, we also confirm estrogenic activity of RLX and TMX and anti-estrogenic activity of TMX in uterus, however, both SERMs did not influence hypothalamic KiSS1 expression in adult rat, suggesting that the estrogenic activity of SERMs could be not only tissue-specific, but also age-dependent.

In conclusion, it was suggested that developmental impairment of kisspeptin neuron is deeply involved in pathogenesis of delayed effect. The essence of delayed effect is considered to be functional depression of neuroendocrine systems after sex maturation, and serial changes might indicate “acceleration of reproductive aging”. In addition, early postnatal ages (PND 0 to 10) in rats, which is equivalent to the third trimester of human gestation, are correspond to the critical window for the delayed effect, and developing brains have the possibility of maintaining sensitivity to exogenous estrogens longer than the previously expected period. Furthermore, delayed effect is common hazard to various estrogenic compound including SERMs, and further investigation are considered to be needed for identifying the risk of SERMs for reproductive development.

图表

Table 2-1 Mean post natal days and body weight of vaginal opening in rats exposed to EE at various postnatal days.

Groups		n	Vaginal opening days (Post natal day)	Body weight (g)
Sesami oil	Control	30	29.3 ± 2.2 ^a	79.2 ± 9.2
EE 20μg/kg	PND0	30	30.4 ± 2.1	83.6 ± 9.7
	PND5	30	28.2 ± 1.6	74.8 ± 13.5*
	PND10	30	24.5 ± 1.3**	58.2 ± 6.2**
	PND14	30	24.7 ± 1.1**	57.1 ± 4.1**

a: mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group (*p<0.05 and **p<0.01 by Dunnett's test)

Table 2-2 Mean weights of uterus and ovary in rats necropsied at 40 weeks of age.

Groups	Control	EE20 μ g/kg		
		PND0	PND5	PND10 PND14
40 weeks				
Uterus				
absolute (g)	0.91 \pm 0.23	0.95 \pm 0.35	1.00 \pm 0.19	1.12 \pm 0.38 0.94 \pm 0.22
relative (g/100gBW)	0.28 \pm 0.09	0.29 \pm 0.10	0.32 \pm 0.06	0.36 \pm 0.16 0.28 \pm 0.08
Ovary				
absolute (g)	0.080 \pm 0.018	0.062 \pm 0.014*	0.057 \pm 0.012**	0.060 \pm 0.020** 0.074 \pm 0.021
relative (g/100gBW)	0.024 \pm 0.005	0.019 \pm 0.004*	0.018 \pm 0.004**	0.019 \pm 0.007* 0.022 \pm 0.007

a: mean \pm S.D.

*, **: Significantly different from the control group (*p<0.05 and **p<0.01 by Dunnett's test).

Table 3-1 Mean post natal days and body weight of vaginal opening in rats exposed to EE at various postnatal days.

Group	N	Vaginal opening day (Post natal day)	Body weight (g)
Control	26	28.0 ± 1.6 ^a	81.4 ± 9.9
RLX0.1	26	28.5 ± 1.5	82.8 ± 8.8
RLX1	26	28.0 ± 1.9	82.5 ± 11.0
RLX10	26	24.5 ± 2.2**	65.2 ± 11.7**
TMX10	26	23.3 ± 1.0**	52.8 ± 5.7**

a: mean ± S.D.

** : Significantly different from the control group (p<0.01 by Dunnett's test)

Table 3-2 Mean weights of uterus and ovary in rats autopsied at 26 weeks of age.

Groups	Control	RLX0.1	RLX1	RLX10	TMX10
Ovary					
absolute (g)	0.062 ± 0.016 ^a	0.066 ± 0.021	0.053 ± 0.015	0.044 ± 0.018*	0.042 ± 0.010**
relative (g/100gBW)	0.020 ± 0.005	0.022 ± 0.007	0.017 ± 0.006	0.014 ± 0.006*	0.012 ± 0.003**
Uterus					
absolute (g)	0.74 ± 0.40	0.81 ± 0.16	0.93 ± 0.28	0.74 ± 0.12	0.51 ± 0.13*
relative (g/100gBW)	0.24 ± 0.13	0.27 ± 0.04	0.31 ± 0.10	0.23 ± 0.03	0.14 ± 0.04*

a: mean ± S.D.

*, **: Significantly different from the control group (*p<0.05 and **p<0.01 by Dunnett's test).

Table 3-3 Histopathological findings in rats necropsied at 26 weeks of age.

Groups	Control	RLX0.1	RLX1	RLX10	TMX10
Ovary					
Increased number, atretic follicle	5/16 ^a	4/16	11/16*	15/16**	16/16**
Decreased number, corpora lutea	5/16	4/16	11/16*	15/16**	16/16**
Atrophy	0/16	0/16	2/16	11/16**	13/16**
Fibrosis, capsule	0/16	0/16	0/16	0/16	16/16**
Oviduct					
Salpingitis	0/16	0/16	2/16	13/16**	2/16
Cyst	0/16	0/16	0/16	0/16	2/16
Fibrosis	0/16	0/16	0/16	0/16	16/16**
Uterus					
Increased number, uterine gland	1/16	2/16	1/16	0/16	0/16
Decreased number, uterine gland	0/16	0/16	0/16	15/16**	16/16**
Squamous cell metaplasia	1/16	2/16	3/16	13/16**	0/16
Atrophy	0/16	0/16	0/16	2/16	15/16**
Endometritis	0/16	0/16	0/16	0/16	1/16

a: number of animal with findings/number of animal examined

*, **: Significantly different from the control group (*p<0.05 and **p<0.01 by Fischer's exact test).

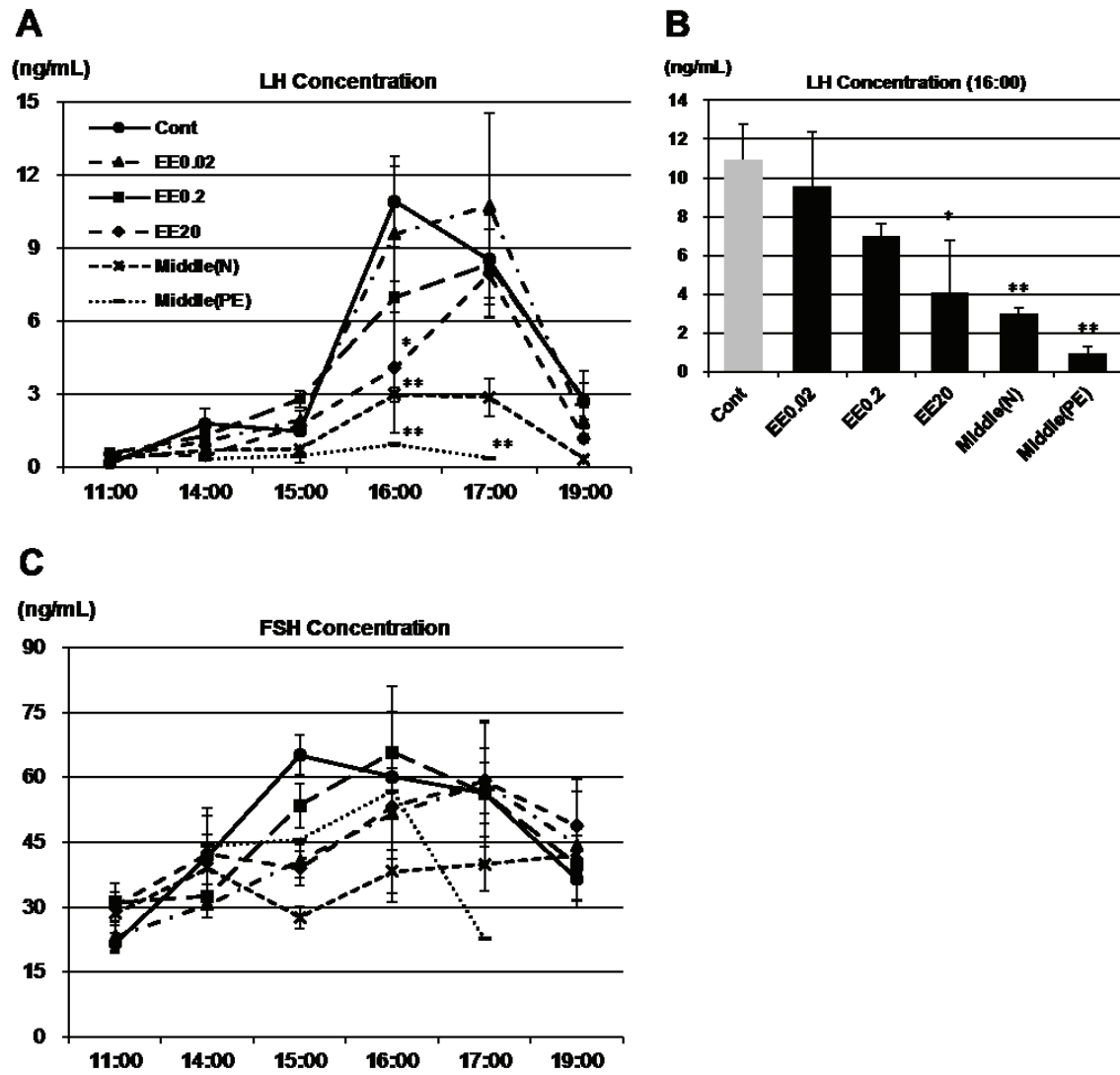


Fig. 1-1 Sequential changes in serum LH (A) and FSH (C) concentration in EE-exposed and middle-age groups and intergroup comparison of LH concentration at 16:00 (B).EE-exposed groups showed dose-dependent decrease in peak area and concentration of LH at 16:00, and this decrease was more evident in both middle-age groups. Data are presented as mean \pm SEM (n = 4–7/group). Symbols indicate significant difference from control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test, respectively).

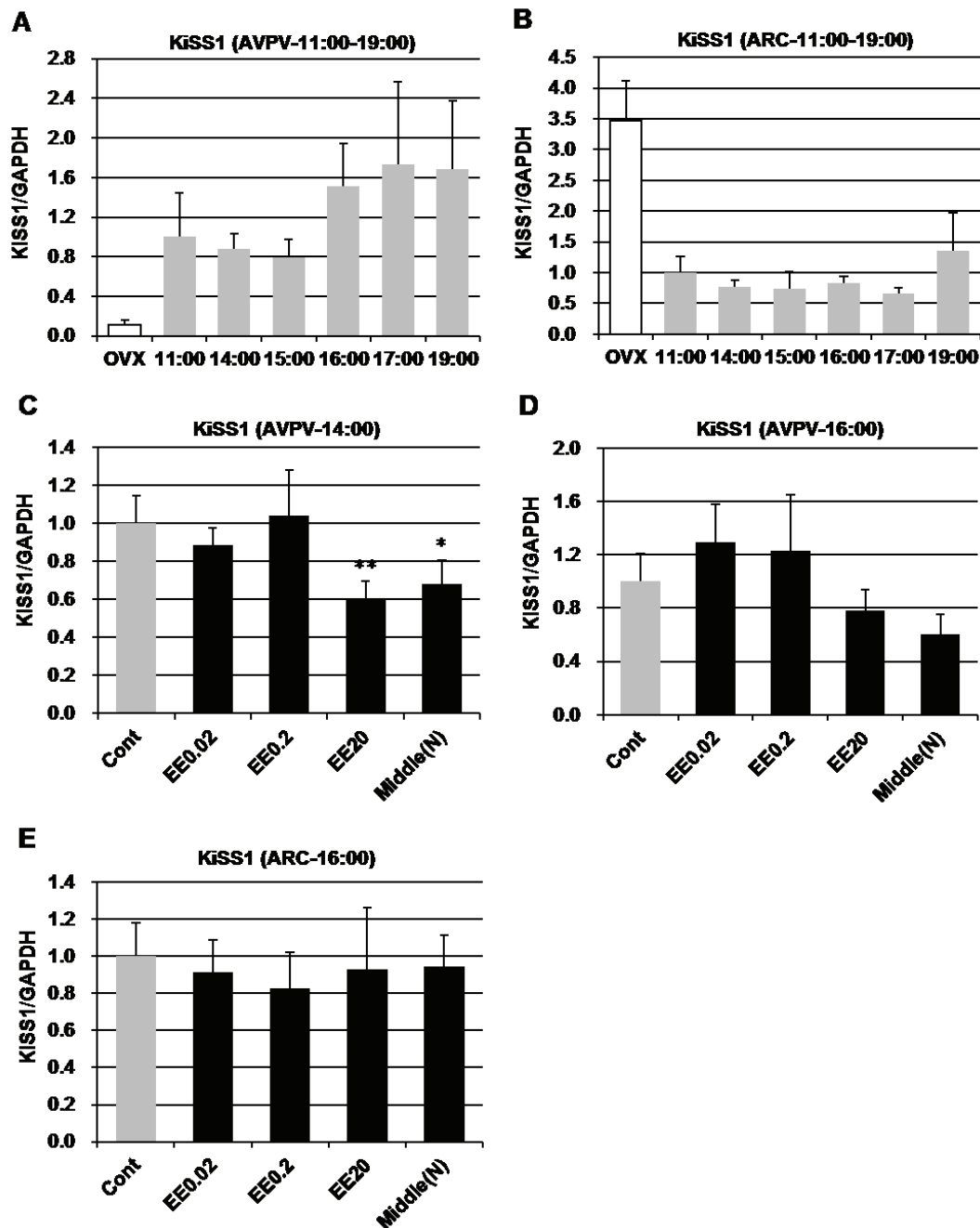


Fig. 1-2 Sequential changes in KiSS1 mRNA expression in the control group in the AVPV (A) and ARC (B), and intergroup comparison in the AVPV at 14:00 (C) and 16:00 (D) and in the ARC at 16:00 (E). The expression significantly decreased in the EE20 and Middle (N) groups in the AVPV at 14:00, but intergroup differences were not detected in the ARC. All data are presented as mean \pm S.D. (n = 5/group). Expression level at 11:00 (A and B) or control group (C–E) is adjusted to 1.0. The OVX only group was investigated as a negative control. Symbols indicate significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test, respectively).

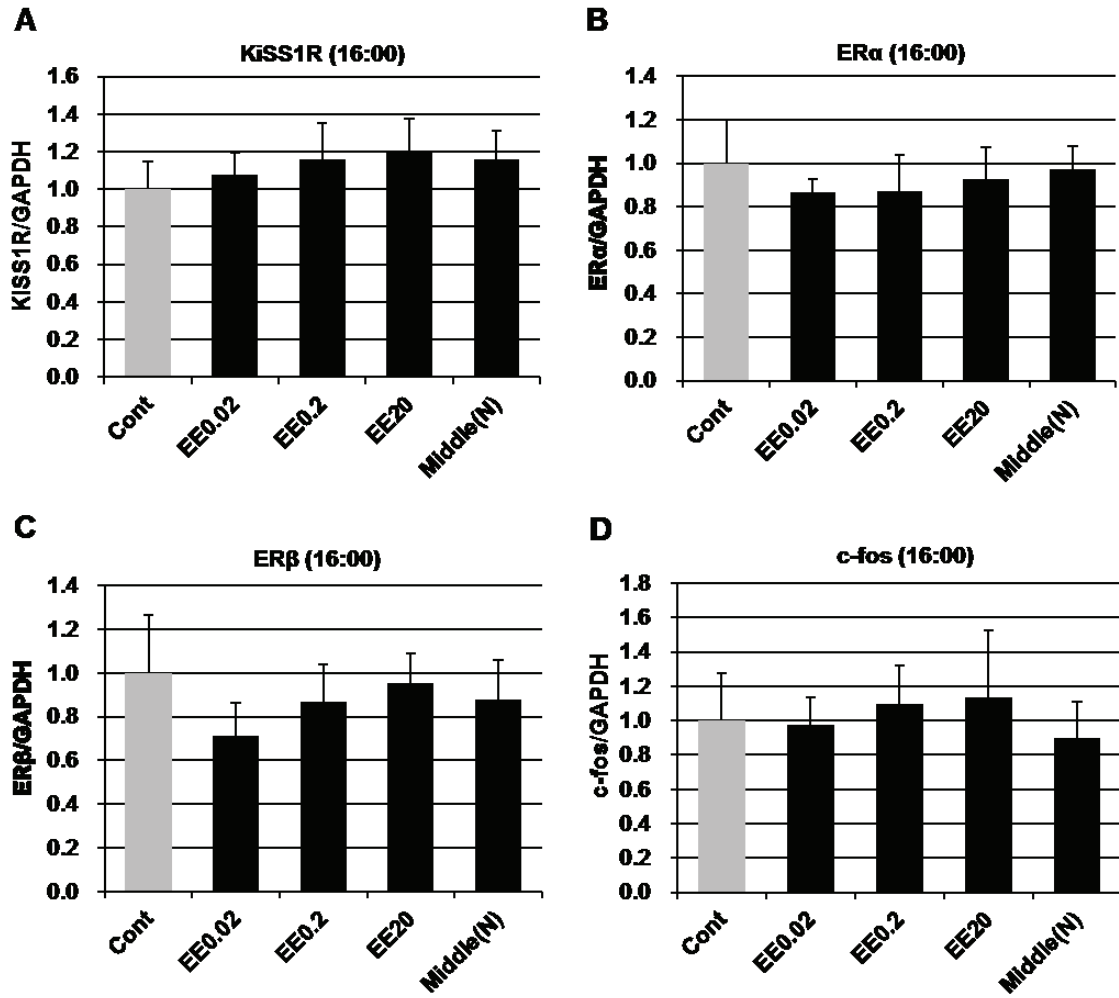


Fig. 1-3 mRNA expression of KiSS1R (A), ERα (B), ERβ (C), and c-fos (D) in the AVPV at 16:00. No intergroup difference was detected for any KiSS1-related gene. All data are presented as mean \pm S.D. (n = 5/group). Expression level of the control group is adjusted to 1.0.

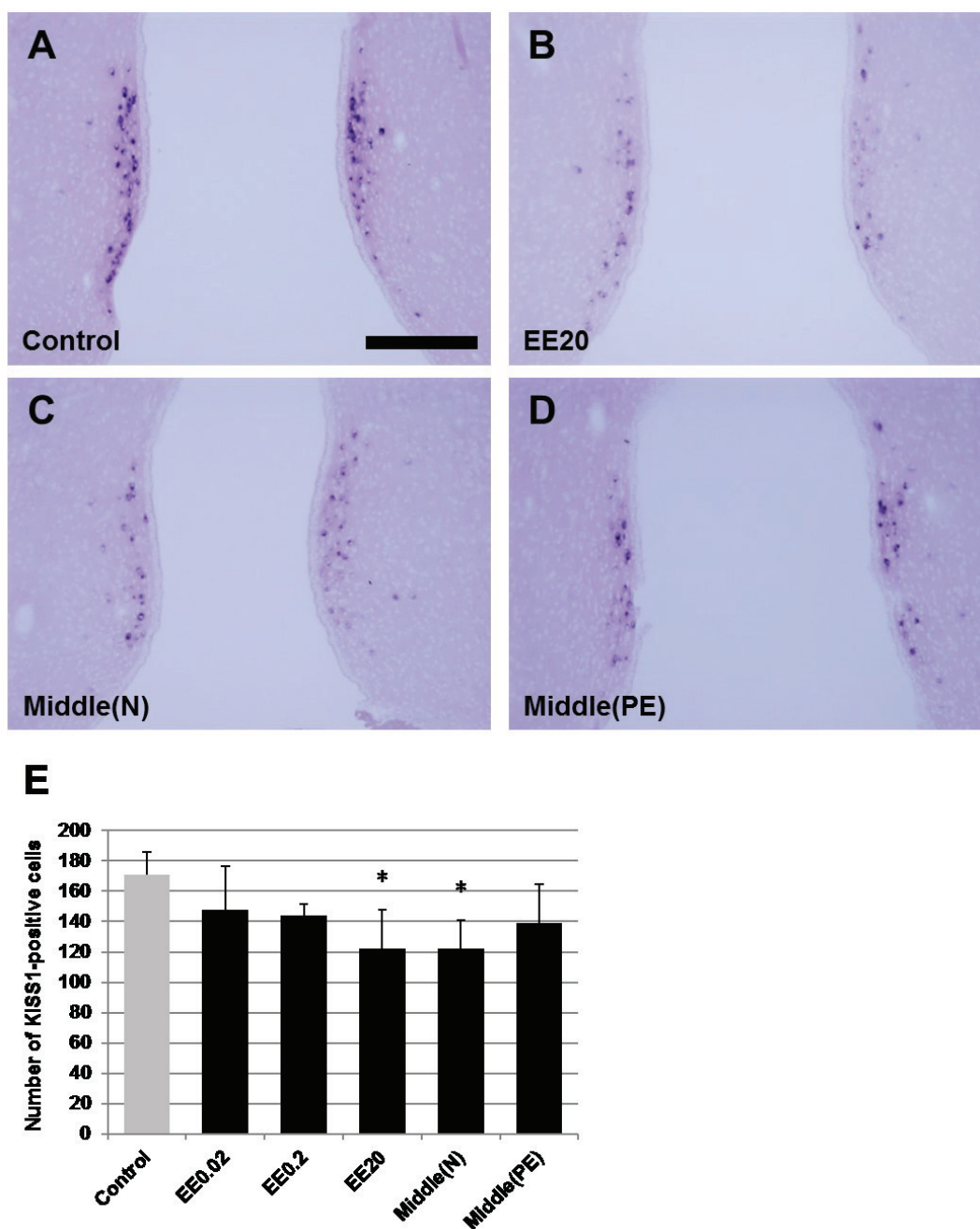


Fig. 1-4 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the AVPV in control (A), EE20 (B), Middle (N) (C) and Middle (PE) (D) groups. The number of positive cells was significantly decreased in the EE20 and Middle (N) groups (E). All brain samples were collected during the interval from 16:00–17:00. All data are presented as mean \pm S.D. (n = 4/group). Symbols indicate significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ by Dunnett's test). 3V: third ventricle. Bar = 200 μ m.

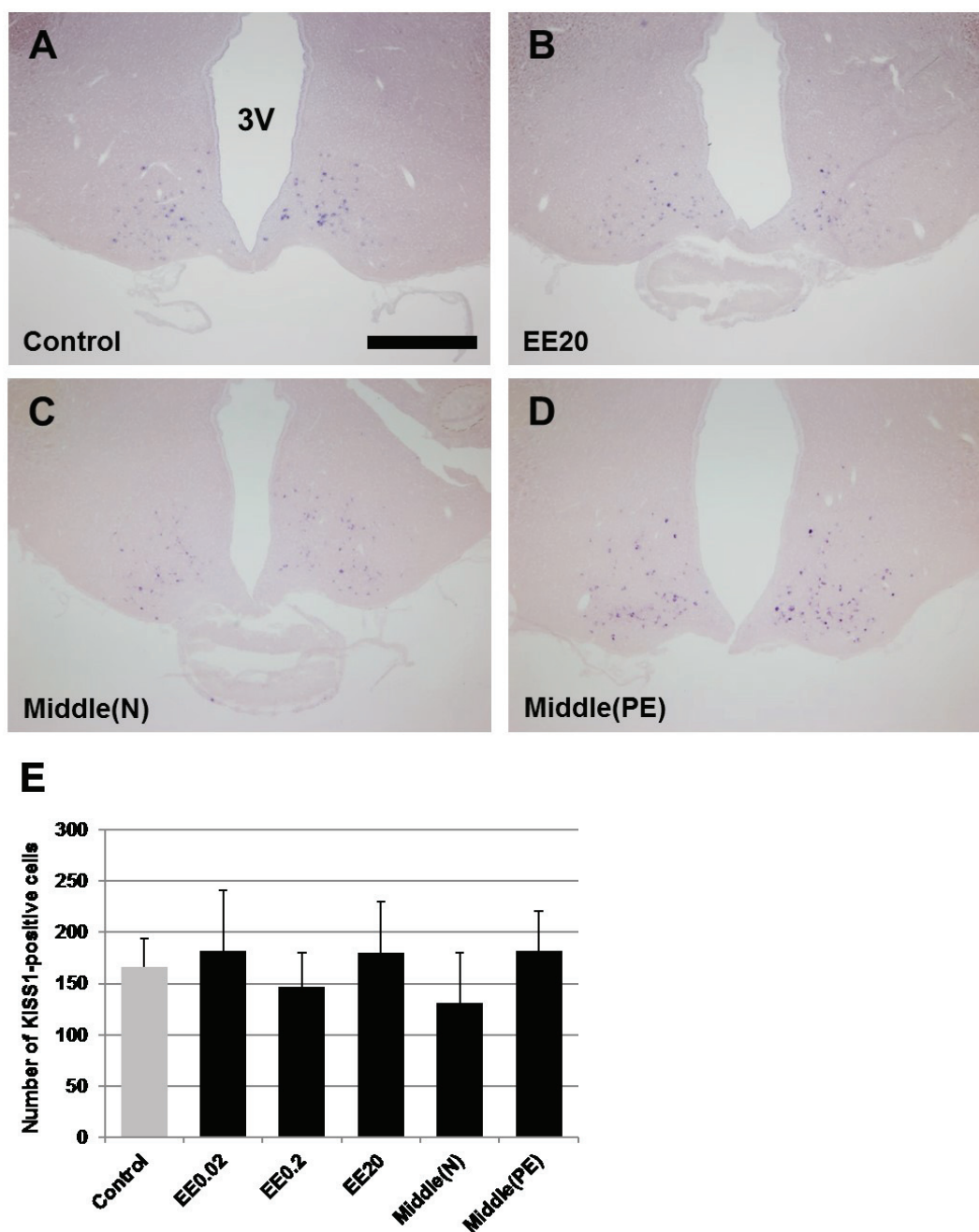


Fig. 1-5 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the ARC in control (A), EE20 (B), Middle (N) (C) and Middle (PE) (D) groups. No intergroup differences in the number of KiSS1-positive cells were detected in the ARC (E). All brain samples were collected during the interval from 16:00 to 17:00. All data are presented as mean \pm S.D. (n = 4/group). 3V: third ventricle. Bar = 500 μ m.

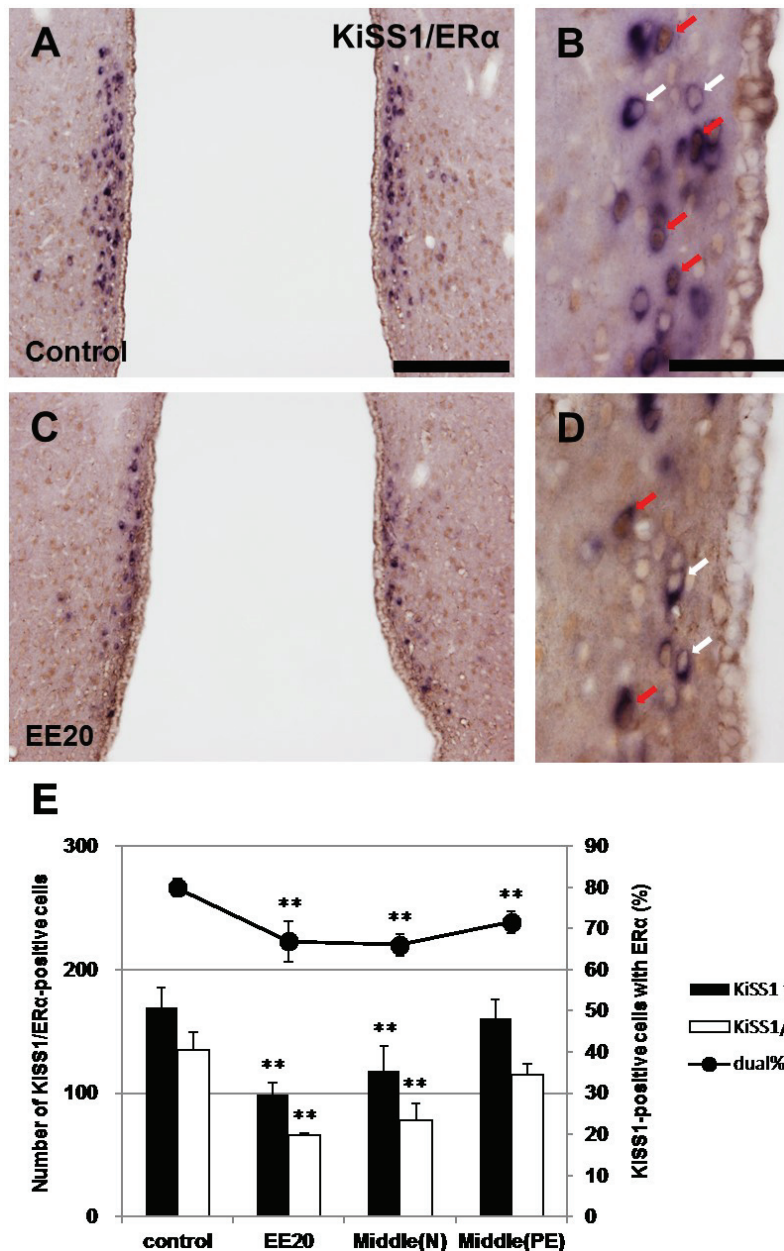


Fig. 1-6 Representative images of dual-labeling ISH/IHC for KiSS1/ER α in the AVPV in control (A and B) and EE20 (C and D) groups. Positive cells show dark blue cytoplasmic staining for KiSS1 mRNA and brown nuclear staining for ER α . Red arrows represent KiSS1/ER α -dual positive cells and white arrows represent KiSS1 mRNA-single positive cells. Percentage of KiSS1/ER α -dual positive cells significantly decreased in EE20, Middle (N) and Middle (PE) groups (E). Graph shows the total number of KiSS1-positive cells (closed bar), the number of KiSS1/ER α -dual positive cells (open bar) and percentage of KiSS1-positive cells showing ER α co-expression (line chart). Data are presented as mean \pm S.D. (n = 4/group). Symbols indicate significant difference from the control group (**: p < 0.01 by Dunnett's test). 3 V: third ventricle. Bars = 200 μ m (A and C) or 50 μ m (B and D).

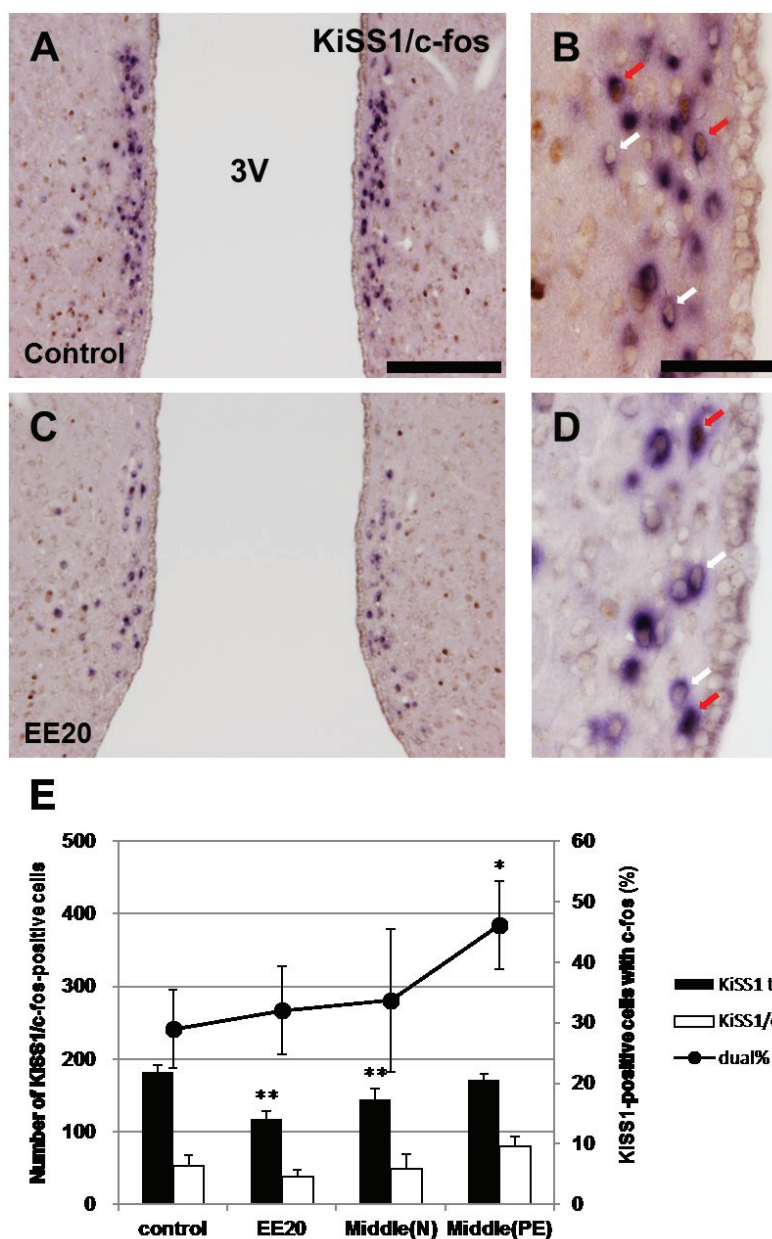


Fig. 1-7 Representative images of dual-labeling ISH/IHC for KiSS1/c-fos in the AVPV in control (A and B) and EE20 (C and D) groups. Positive cells show dark blue cytoplasmic staining for KiSS1 mRNA and brown nuclear staining for c-fos. Red arrows represent KiSS1/c-fos-dual positive cells and white arrows represent KiSS1 mRNA-single positive cells. Percentage of KiSS1/c-fos-dual positive cells was not changed in EE20 and Middle (N) groups, but significantly increased in Middle (PE) group (E). Graph shows the total number of KiSS1-positive cells (closed bar), the number of KiSS1/c-fos dual positive cells (open bar) and percentage of KiSS1-positive cells showing c-fos co-expression (line chart). Data are presented as mean \pm S.D. (n = 4/group). Symbols indicate significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test, respectively). 3 V: third ventricle. Bars = 200 μ m (A and C) or 50 μ m (B and D).

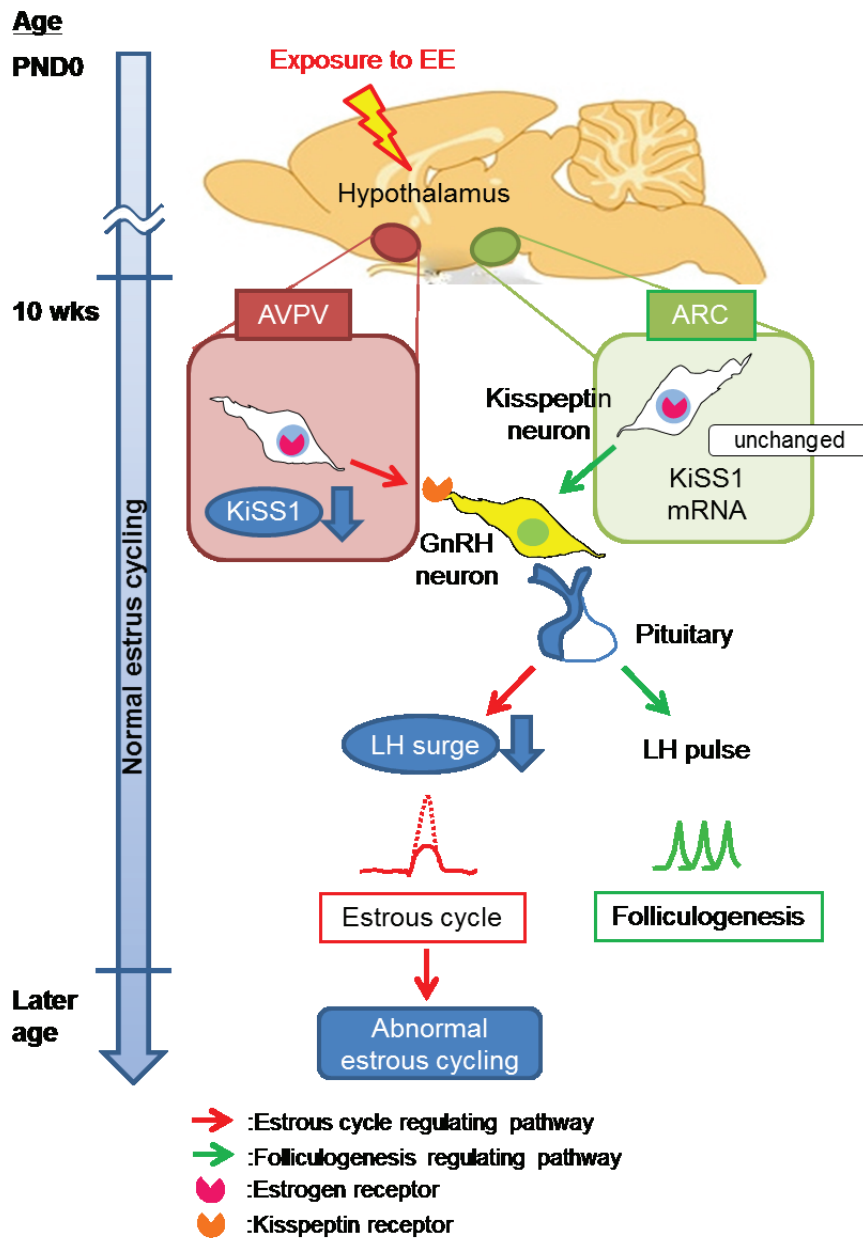


Fig. 1-8 Proposed pathway for the delayed effect. Neonatal exposure to EE induces an AVPV-specific decrease in KiSS1 and ER_α mRNA expression and a consequent attenuation of LH surge in young adult rats, leading to the early onset of abnormal estrous cycling.

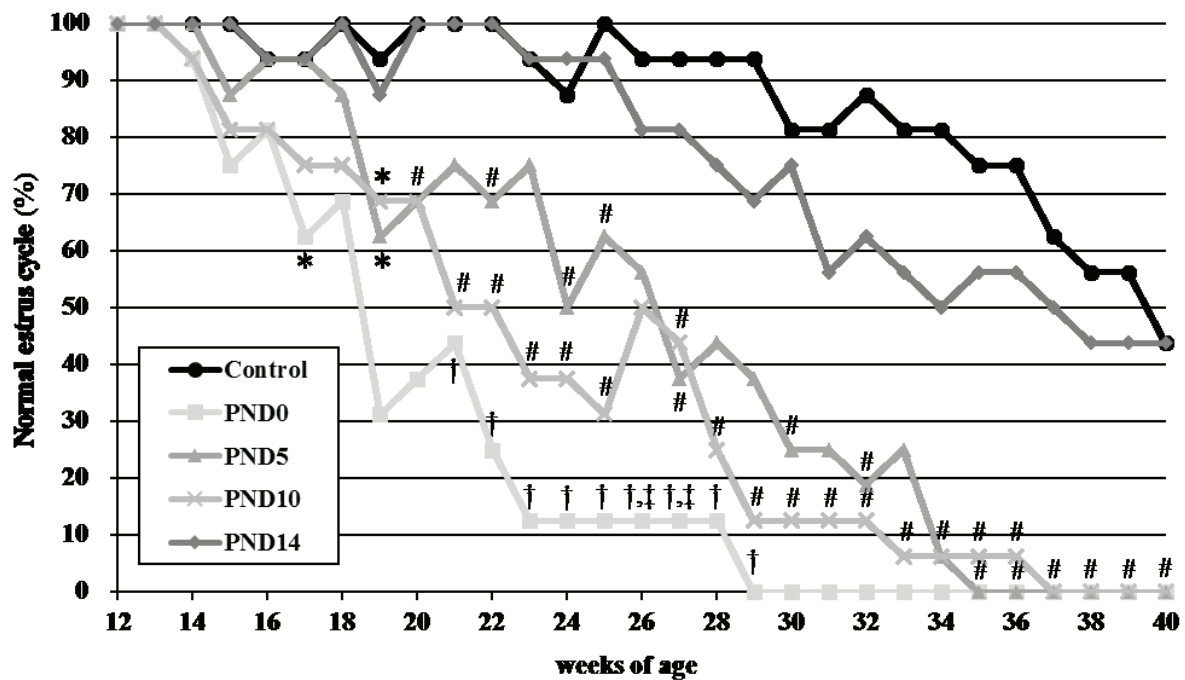


Fig. 2-1 Sequential changes in the percentage of animals maintaining a normal estrous cycle until 40 wk of age (n = 16/group). The vertical line indicates the percentage of animals that maintained a normal estrous cycle in each group, and the horizontal line indicates weeks of age. Symbols indicate significant differences (*: $p < 0.05$ thereafter until Week 40 without Week 20–23 in PND5 group vs control group; #: $p < 0.05$ vs PND14 group; †: $p < 0.05$ vs PND5 group; ‡: $p < 0.05$ vs PND10 group by Fisher exact test).

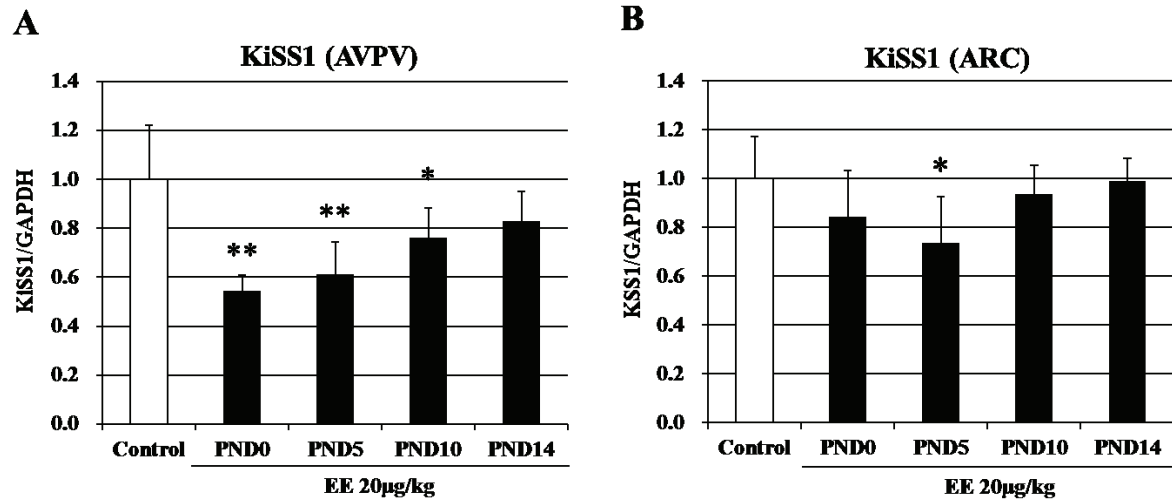


Fig. 2-2 KiSS1 mRNA expression in the AVPV (A) and ARC (B) at the time of LH surge. All data are presented as mean \pm S.D. ($n = 5/\text{group}$). Expression levels in each group are normalized to GAPDH levels, and the level of the control group is adjusted to 1.0. Symbols indicate significant differences from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett test).

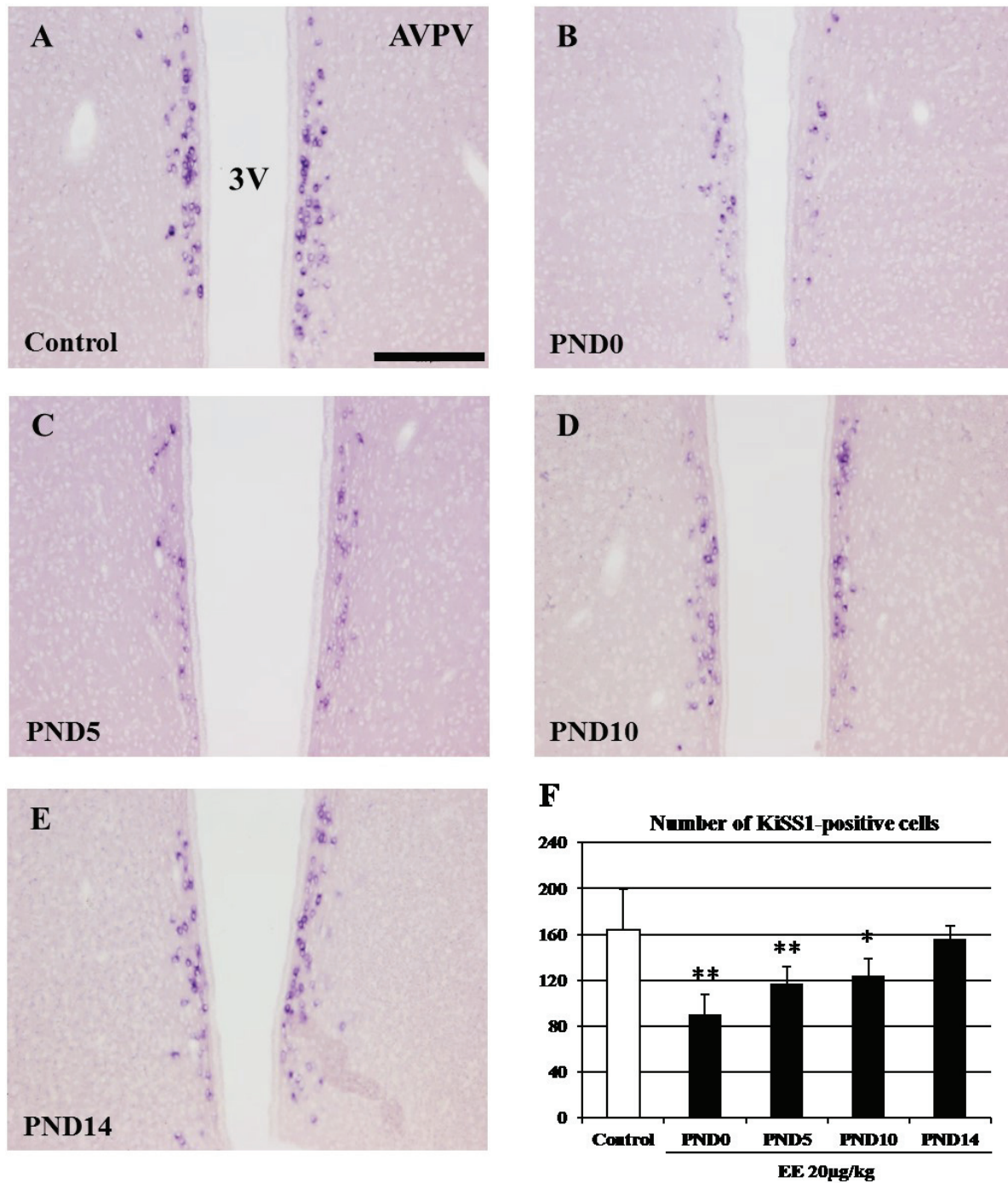


Fig. 2-3 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the AVPV of control (A), PND0 (B), PND5 (C), PND10 (D), and PND14 (E) groups, and total number of positive cells (F). All the brain samples were collected during the interval 1600–1700. All the data are presented as mean ± S.D. (n = 4–5/ group). 3V: third ventricle. Bar = 200 μm. Symbols indicate significant differences from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett test).

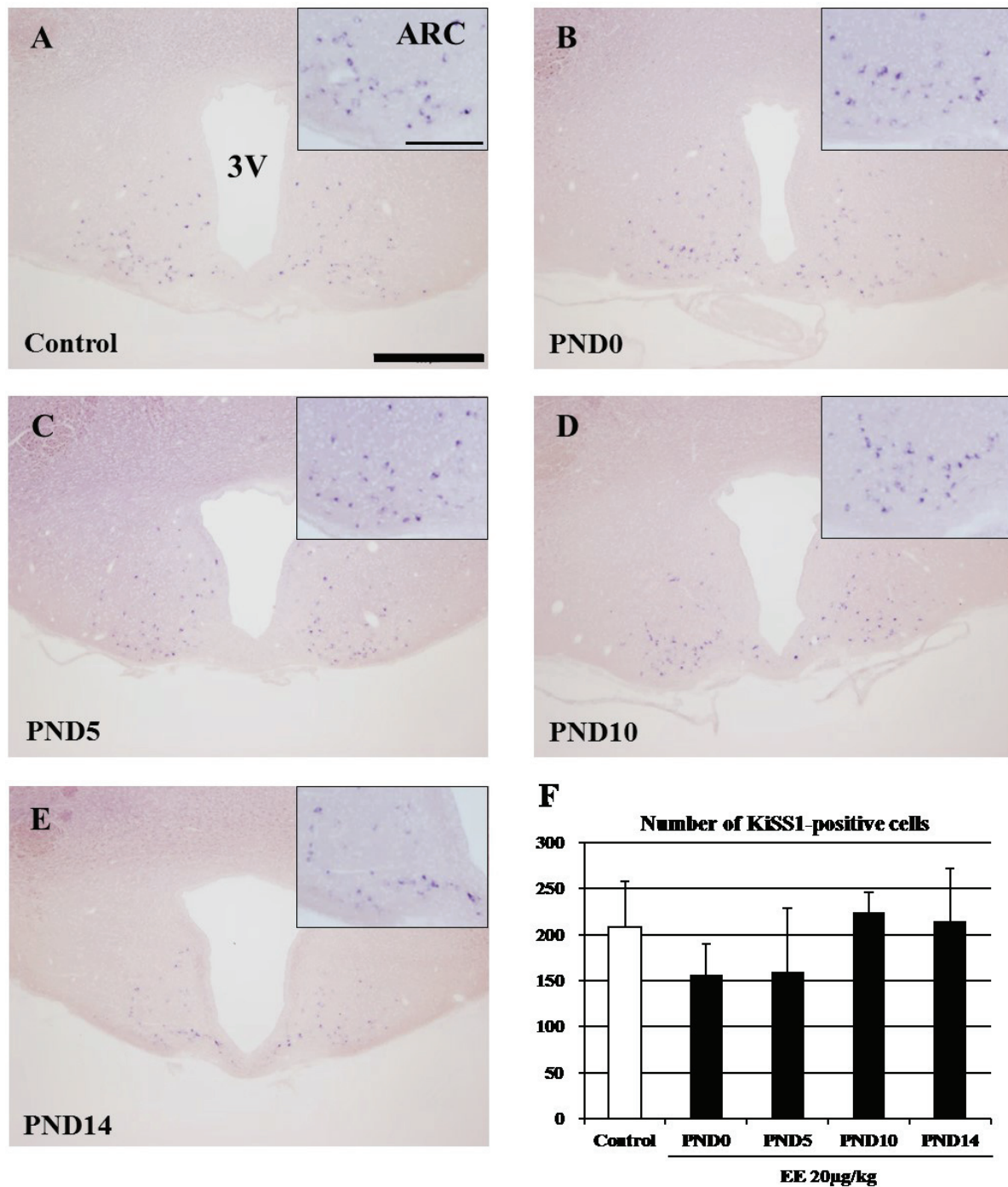


Fig. 2-4 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the ARC of the control (A), PND0 (B), PND5 (C), PND10 (D), and PND14 (E) groups, and total number of positive cells (F). The insets in A–E represent a higher magnification. All the brain samples were collected during the interval 1600–1700. All the data are presented as mean \pm S.D. ($n = 5/\text{group}$). 3V: third ventricle. Bars = 500 μm (low magnification) or 200 μm (high magnification).

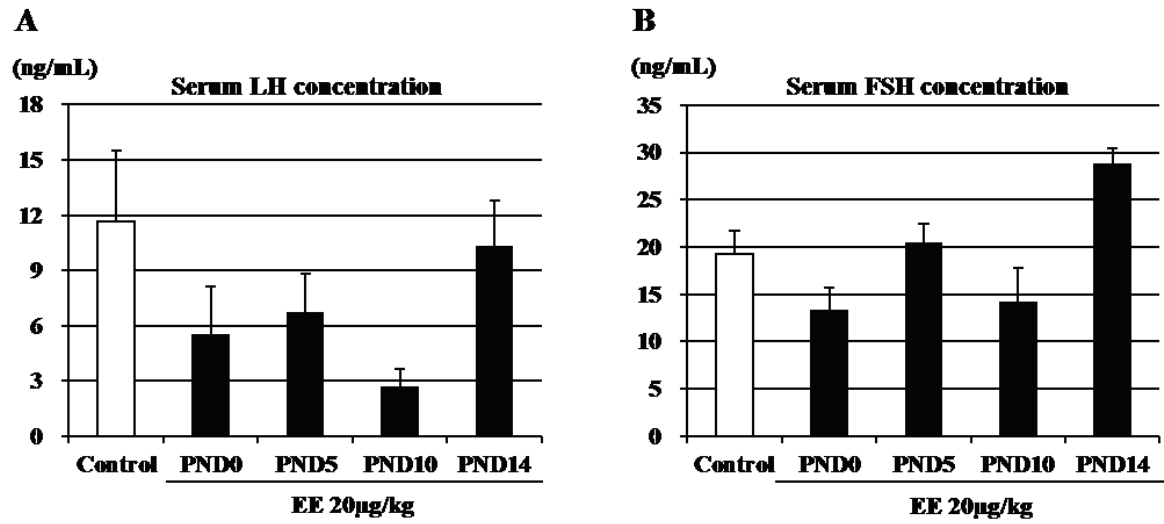


Fig. 2-5 Serum concentration of LH (A) and FSH (B) at the time of LH surge. All the data are presented as mean \pm SEM (n = 5/group).

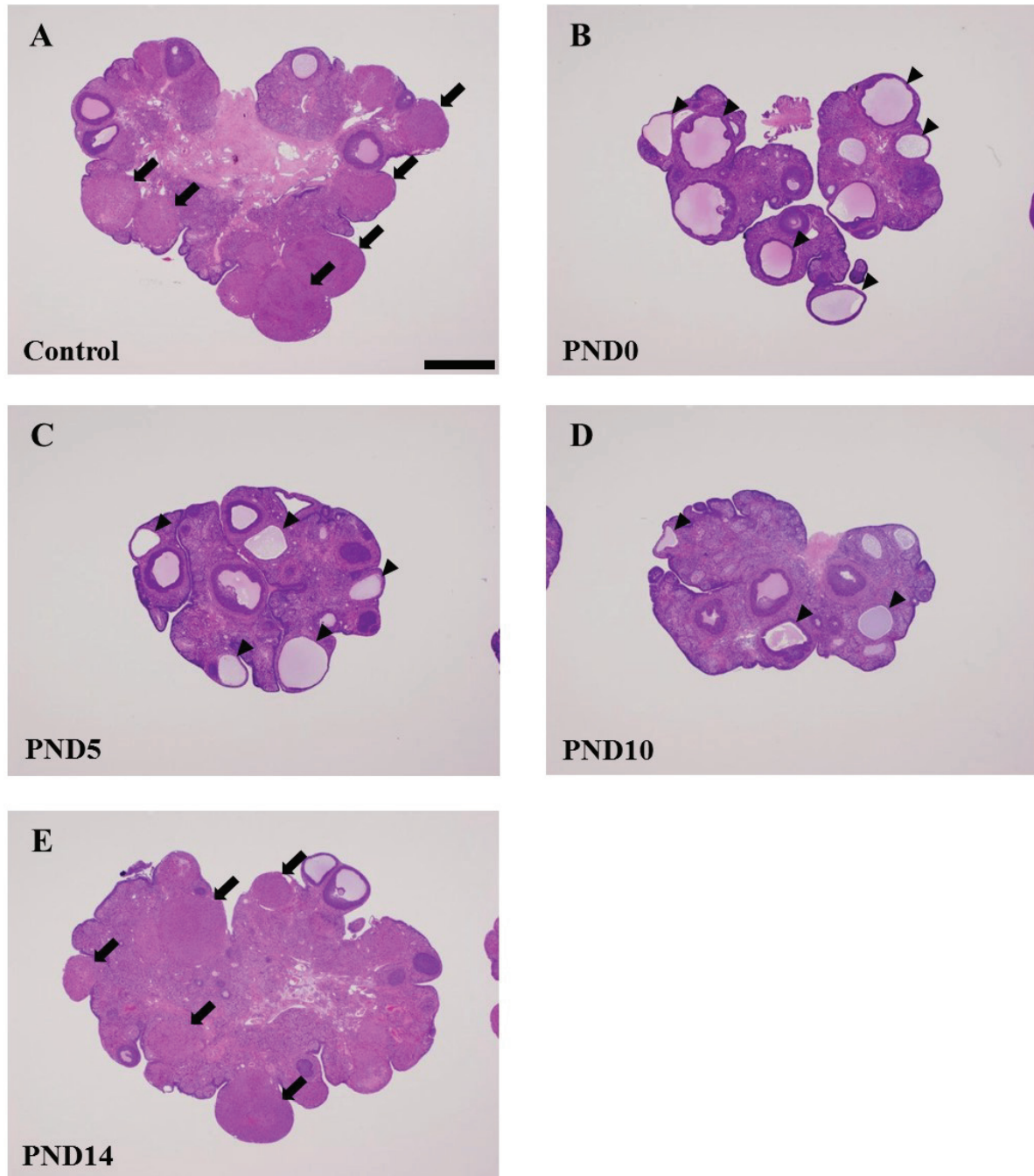


Fig. 2-6 Ovarian histology of the control (A), PND0 (B), PND5 (C), PND10 (D), and PND14 (E) groups at 40 wk of age. Graphics indicate corpora lutea (CL) (arrows) or follicular cysts (arrowheads). HE stain. Bar = 1 mm.

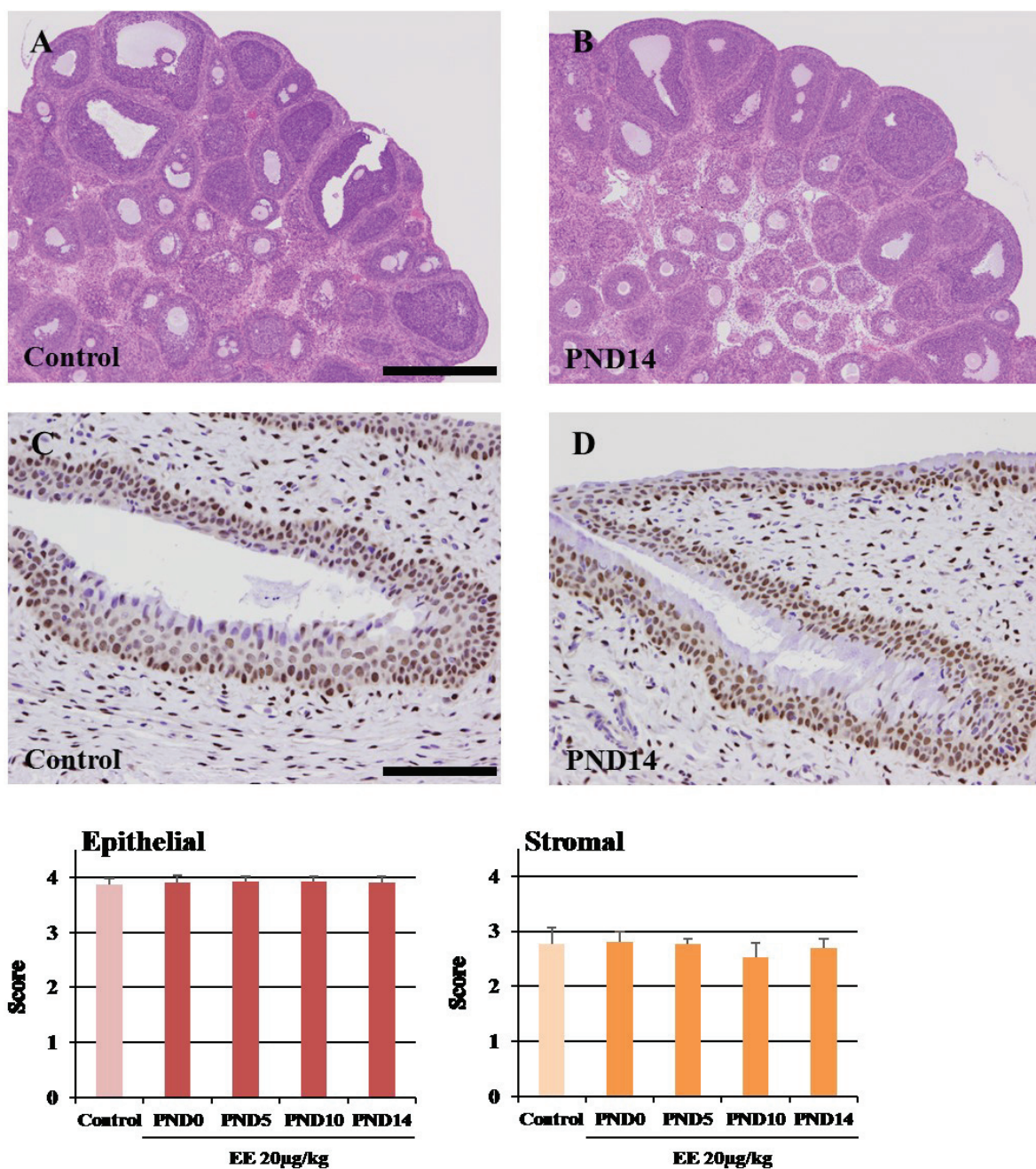


Fig. 2-7 Ovarian histology and vaginal IHC for ER α in the control group before VO (A and C) and PND14 group after VO (B and D). Animals in PND14 group were necropsied on the next day of the day of accelerated VO. Lower graphs show the scores of ER α expression in the epithelial and stromal cells in each group. Score: 0, negative; 1, slightly positive (<20%); 2, partly positive (20%–50%); 3, positive more than half (50%–80%); 4, mostly positive (>80%). HE stain (A and B). Bars = 500 μ m (A and B) or 100 μ m (C and D).

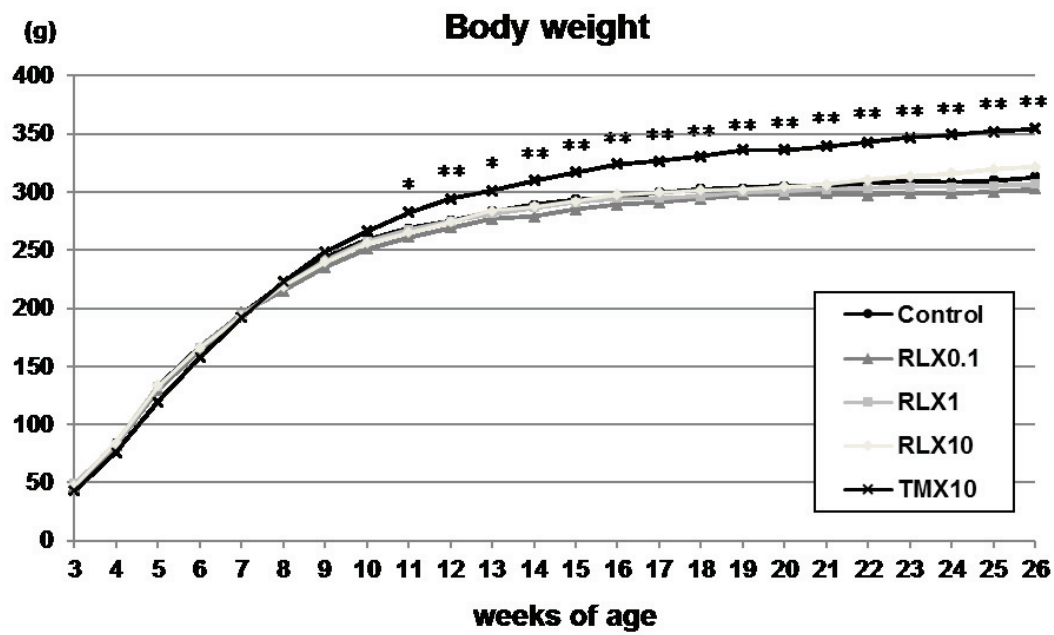


Fig. 3-1 Sequential changes in body weight through the study period (26 weeks of age; n = 16/group). The TMX10 group showed a significant increase in body weight. Symbols indicate a significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test).

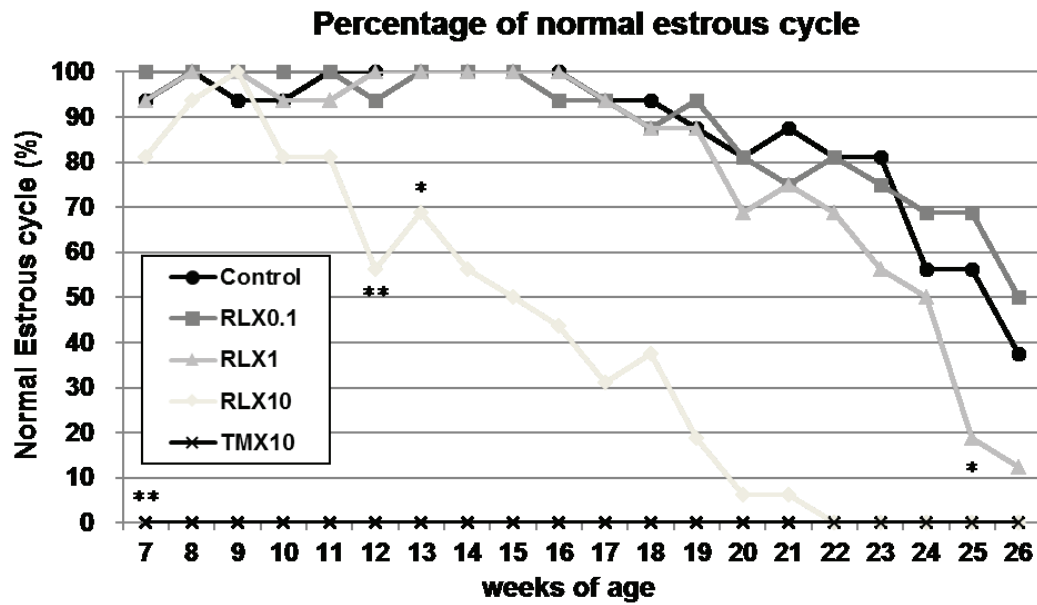


Fig. 3-2 Sequential changes in estrous cycling status through the study period (26 weeks of age; n = 16/group). Estrous cycle in the TMX10 group had already ceased by the start of analysis (7 weeks of age). The RLX10 group showed early cessation of the estrous cycle, and the percentage of animals with a normal estrous cycle was significantly decreased beginning at 12 weeks of age. Symbols indicate a significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Fischer's exact test).

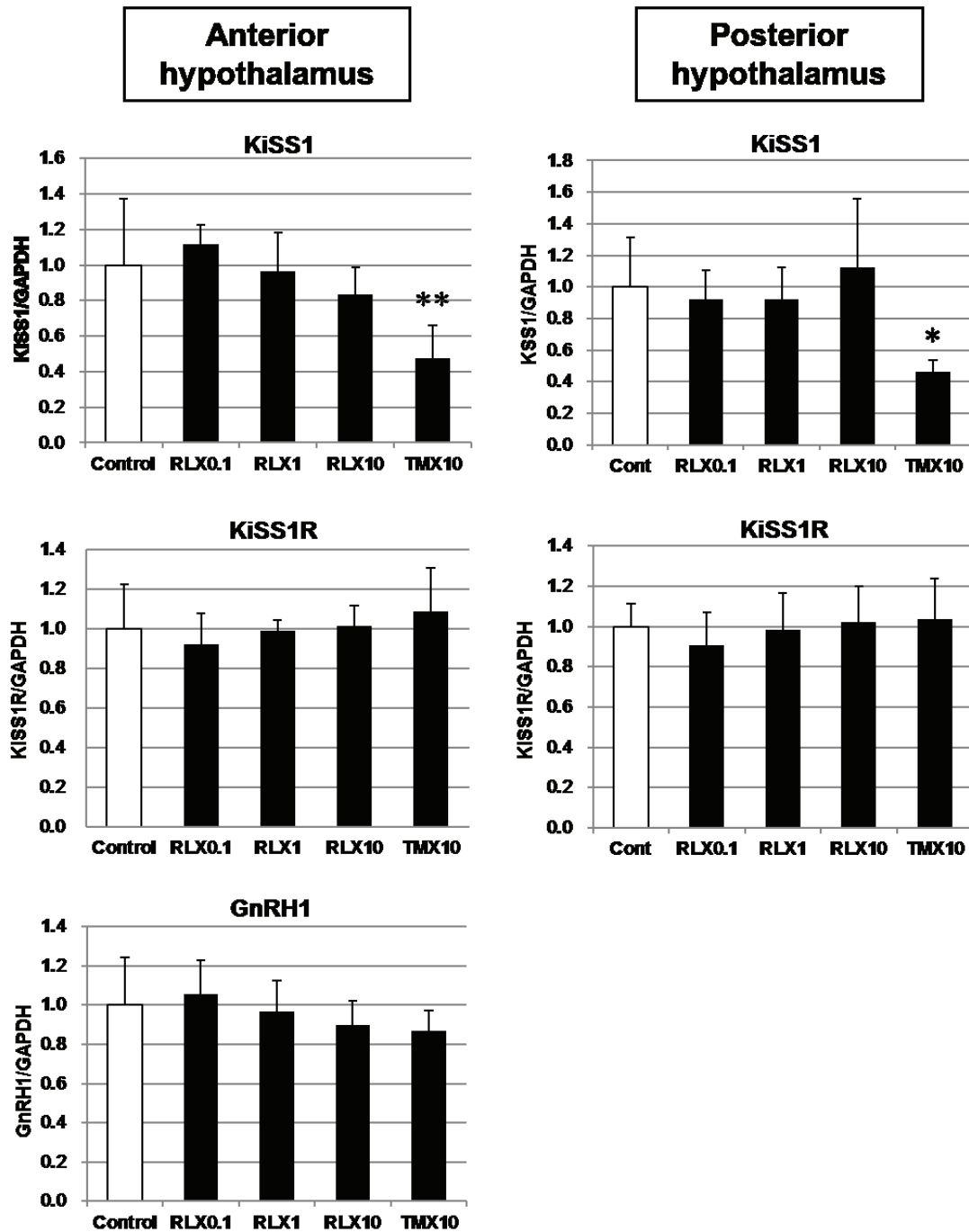


Fig. 3-3 Relative mRNA expression of KiSS1, KiSS1R and GnRH in the AVPV and ARC at the time of LH surge in young adults (11 weeks of age). KiSS1 expression was significantly decreased in the TMX10 group in both the AVPV and ARC, but expression of the other genes was unchanged. KiSS1 expression in the RLX10 group showed a slight decreasing trend. Data are presented as the mean \pm S.D. (n = 5/group). Relative expression level of Control group was adjusted to "1.0". Symbols indicate a significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test).

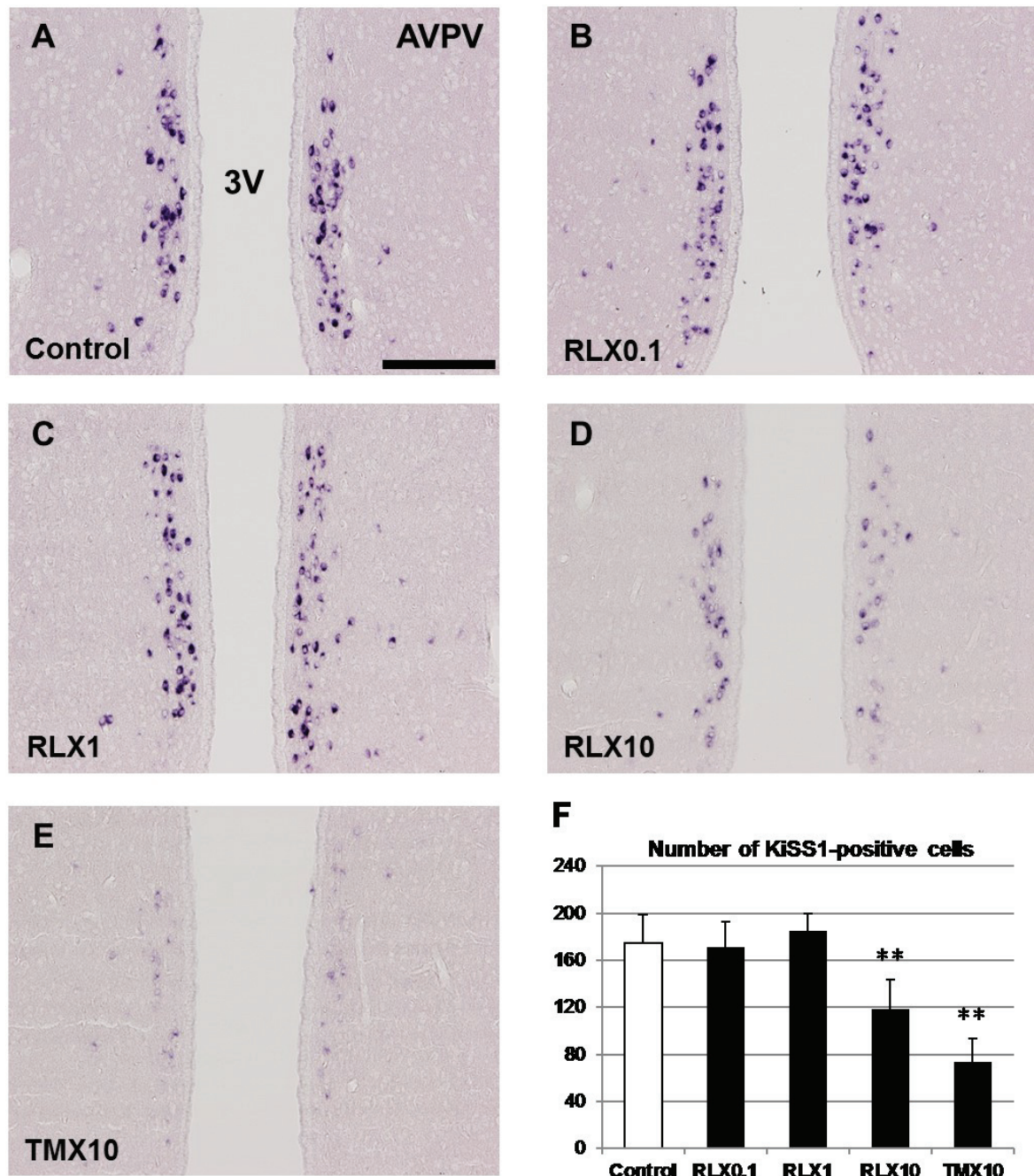


Fig. 3-4 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the AVPV in the control (A), RLX0.1-10 (B-D) and TMX10 (E) groups in young adults (11 weeks of age). The number of KiSS1-positive cells was significantly decreased in the RLX10 and TMX10 groups (F). All brain samples were collected between 16:00-17:00. Data are presented as the mean \pm S.D. ($n = 5$ /group). Symbols indicate a significant difference from the control group (**: $p < 0.01$ by Dunnett's test). 3V: third ventricle. Bar = 200 μ m.

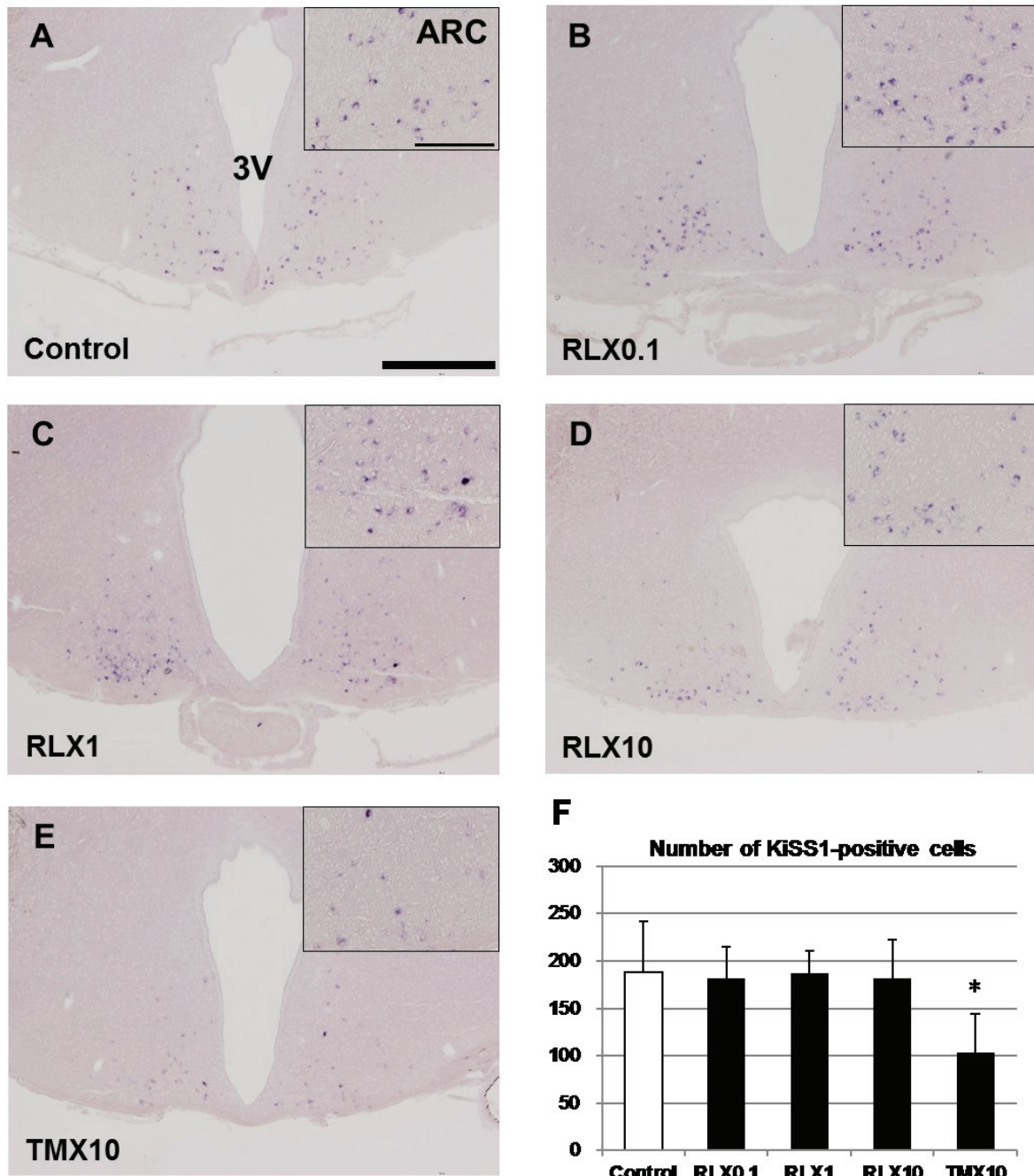


Fig. 3-5 Representative images of KiSS1 mRNA-positive cells in the ARC in the control (A), RLX0.1-10 (B-D) and TMX10 (E) groups in young adults (11 weeks of age). The number of positive cells was significantly decreased in the TMX10 group only (F). The insets in A-E represent higher magnifications of the same regions. All brain samples were collected between 16:00-17:00. Data are presented as the mean \pm S.D. (n = 5/group). Symbols indicate a significant difference from the control group (*: p<0.05 by Dunnett's test). 3V: third ventricle. Bars = 500 μ m (low magnification) or 200 μ m (high magnification).

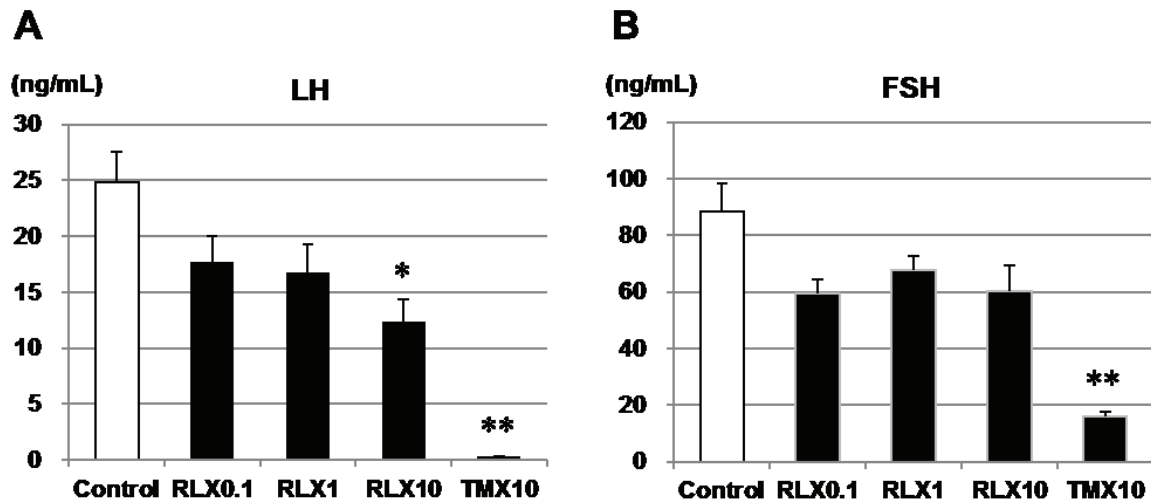


Fig. 3-6 Serum concentrations of LH (A) and FSH (B) at the time of the LH surge in young adults (11 weeks of age). LH concentrations significantly decreased in the RLX 10 and TMX 10 groups, and this decrease was especially prominent in the TMX10 group. FSH concentration was significantly decreased in the TMX10 group only. Data are presented as the mean \pm SEM (n = 5/group). Symbols indicate a significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test).

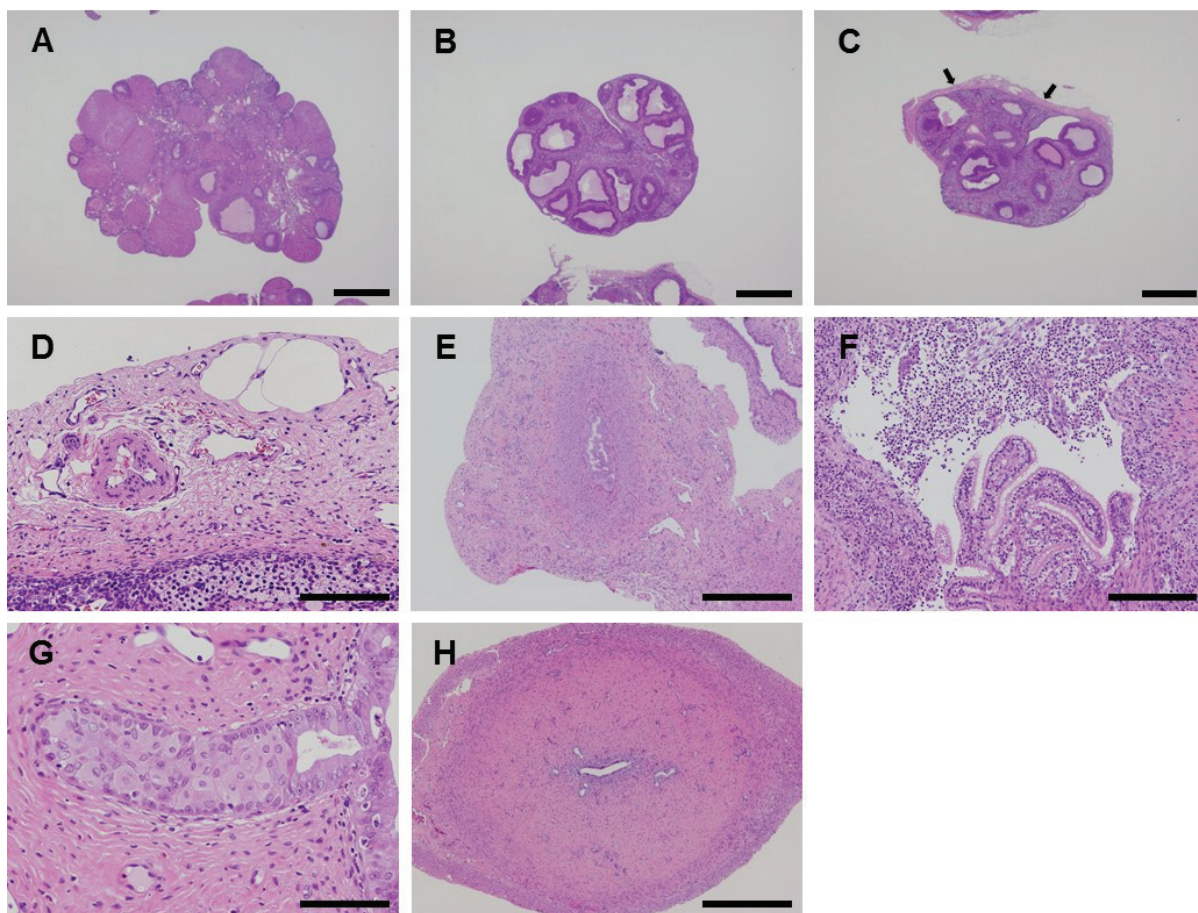


Fig.3-7 Representative images of the histopathological findings. (A-C) Ovarian atrophy in the control, RLX10 and TMX10 groups, respectively. Arrows in C indicate the prominent fibrosis observed in the TMX10 group. Bars = 1 mm. (D) Higher magnification of the fibrosis of the ovarian capsule in the TMX10 group. Bar = 100 μ m. (E) Fibrosis of the oviduct in the TMX10 group. Bar = 500 μ m. (F) Salpingitis in the RLX10 group. Bar = 200 μ m. (G) Squamous cell metaplasia in the RLX10 group. Bar = 100 μ m. (H) Atrophy of the uterus in the TMX10 group. Bar = 500 μ m.

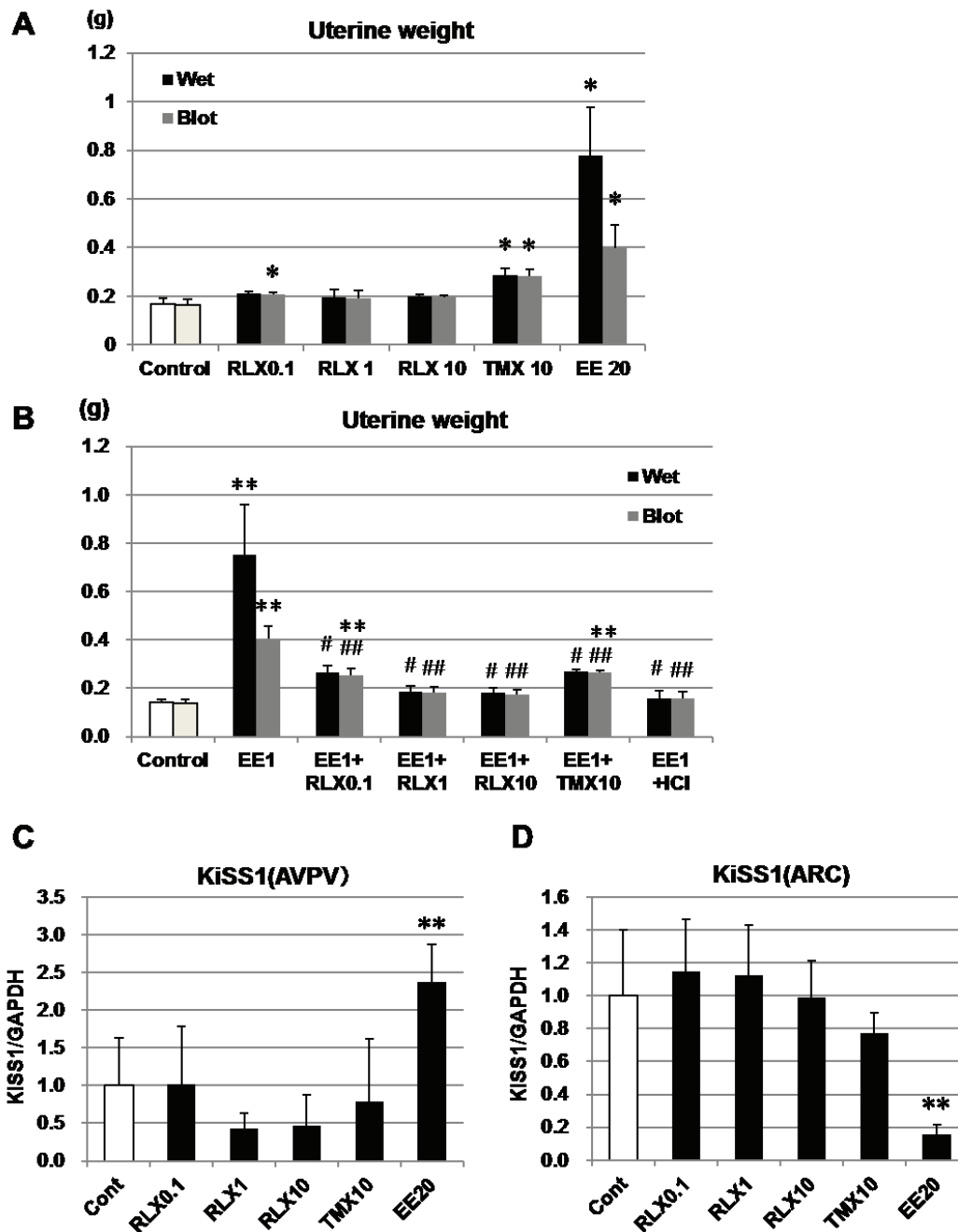


Fig. 3-8 Uterine weight from the uterotrophic assays of experiment 2 (A) and experiment 3 (B) and relative mRNA expression of KiSS1 in the AVPV (C) and ARC (D) in experiment 2. A significant decrease in uterine weight (an estrogenic effect) was detected in the TMX10 and EE20 groups, and a significant suppression of uterine weight increase (an anti-estrogenic effect) was observed in the SERM- and ICI-treated groups. KiSS1 expression in adult OVX rats was not influenced by SERM treatment. Data are presented as the mean \pm S.D. (n = 5/group). Symbols indicate a significant difference from the control group (*: $p < 0.05$ and **: $p < 0.01$ by Dunnett's test) or from the EE1 group (#: $p < 0.05$ and ##: $p < 0.01$ by Dunnett's test).