

図表

(マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の神経系高次機能影響の評価)

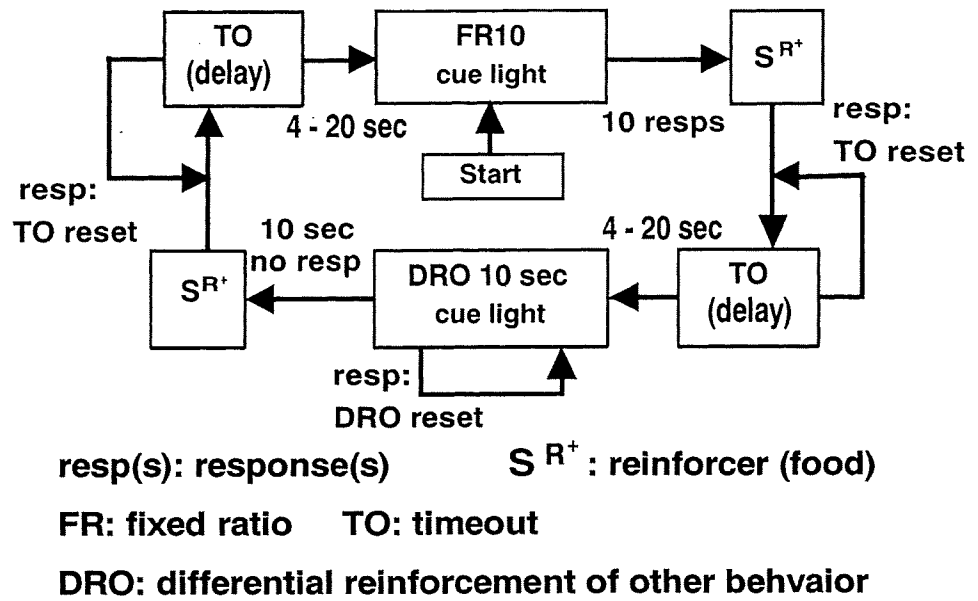


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

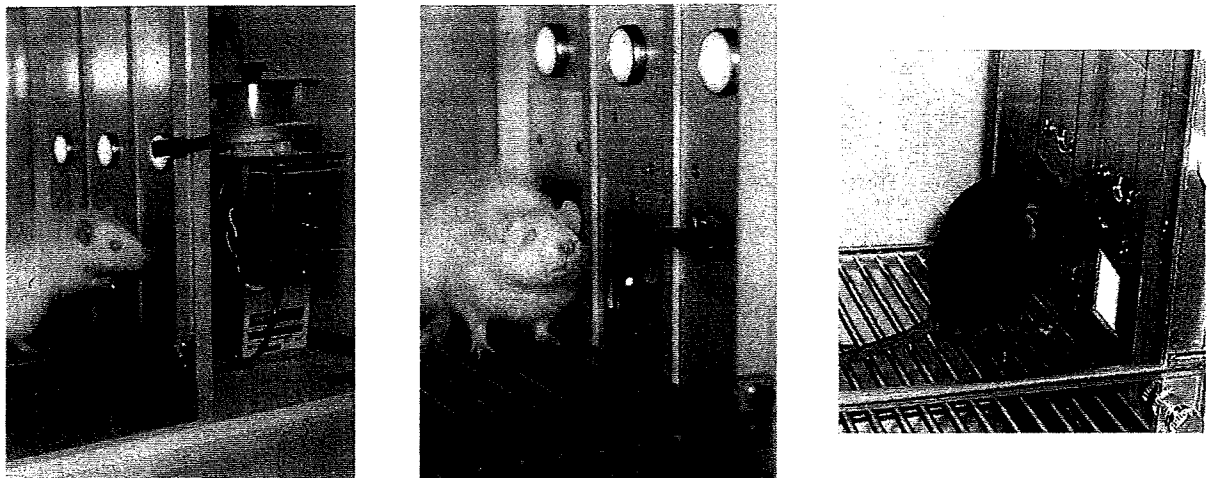


Fig. 2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 下でのSCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).
 左: 反応中のラット 中央: 待機中のラット 右: 待機中のマウス

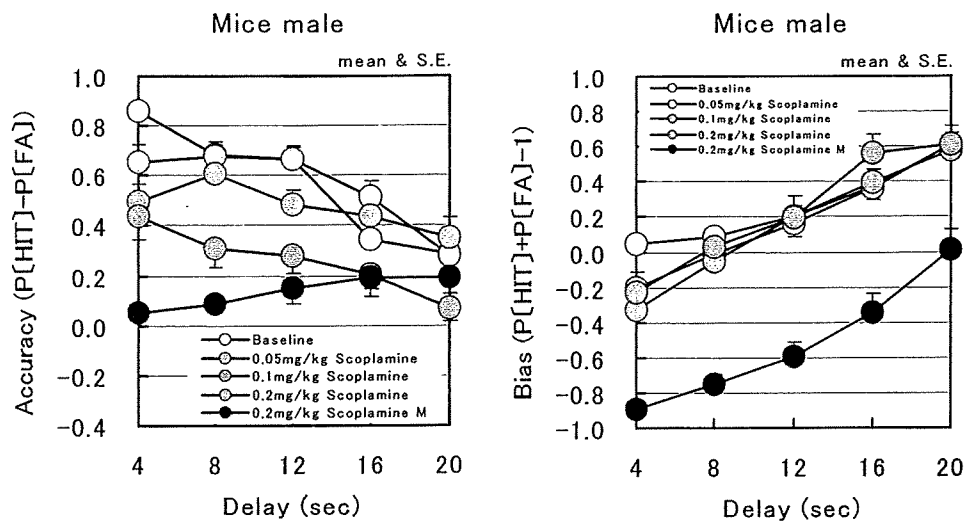


Fig. 3-1 スコポラミン/メチルスコポラミン投与によるマウスの Delay-Accuracy (左) および Delay-Bias 曲線 (右) の変化 (実験 1)

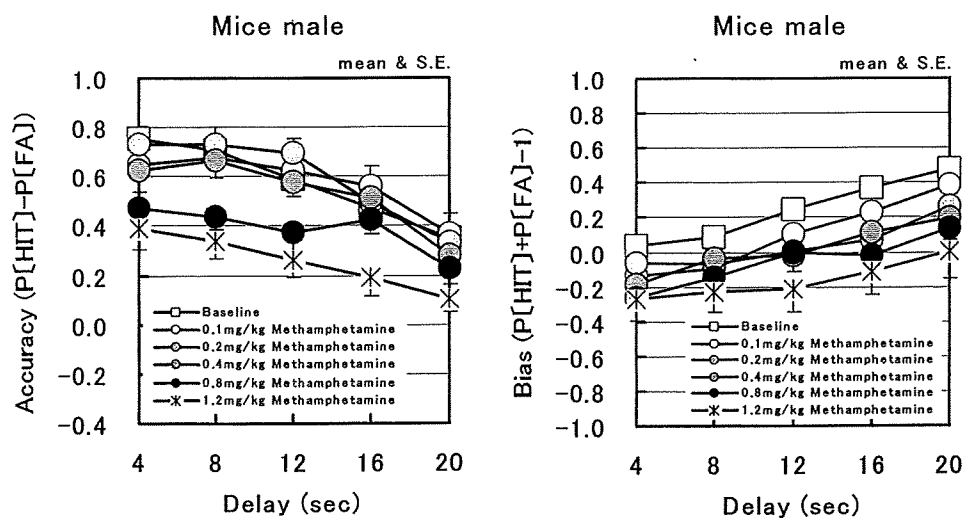


Fig. 3-2 メタンフェタミン投与によるマウスの Delay-Accuracy (左) および Delay-Bias 曲線 (右) の変化 (実験 1)

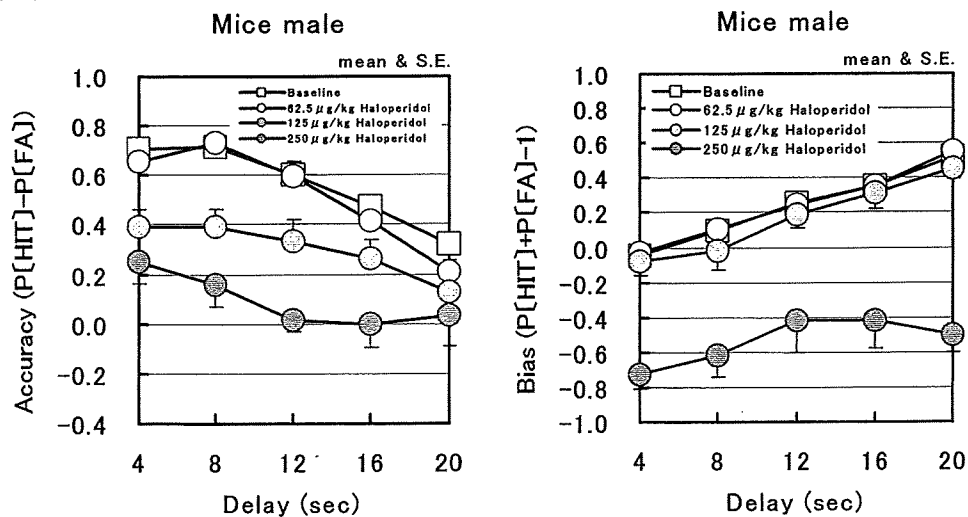


Fig. 3-3 ハロペリドール投与によるマウスの Delay-Accuracy (左) および Delay-Bias 曲線 (右) の変化 (実験 1)

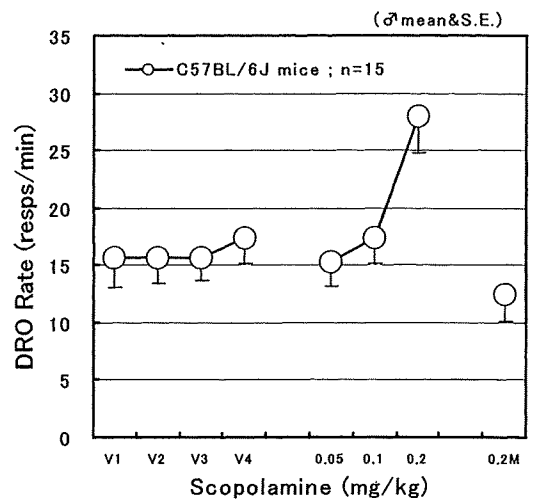
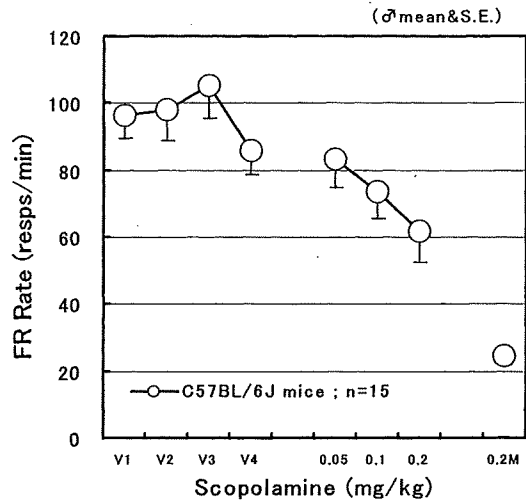
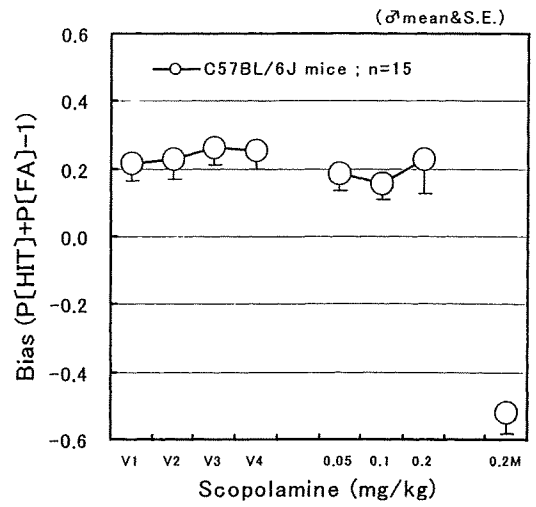
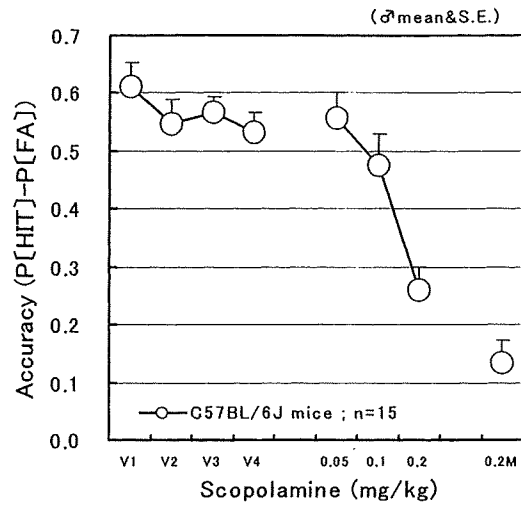


Fig. 4-1 スコポラミン (右端はメチルスコポラミン) 投与によるマウスの SCOB (Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO) 主要行動指標の変化 (V1~V4 は生理食塩水投与); Accuracy (左上)・Bias (右上)・FR 反応率 (左下)・DRO 反応率 (右下) (実験 1)

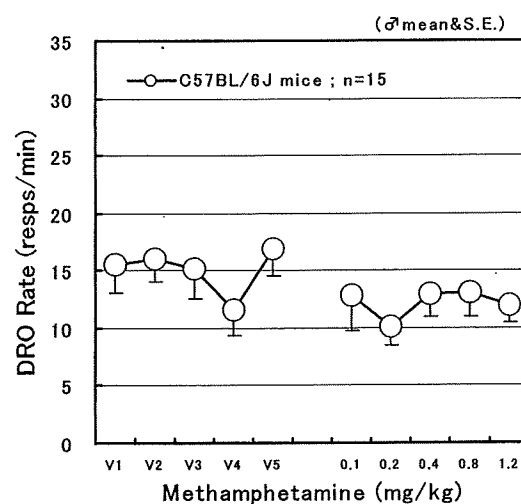
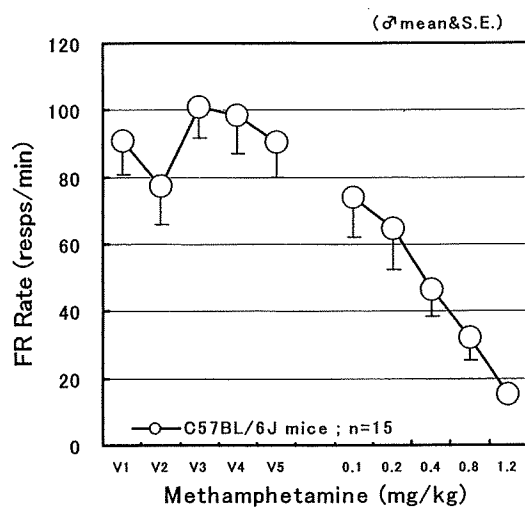
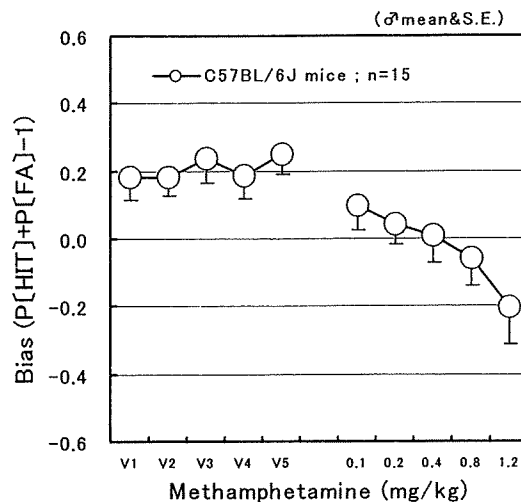
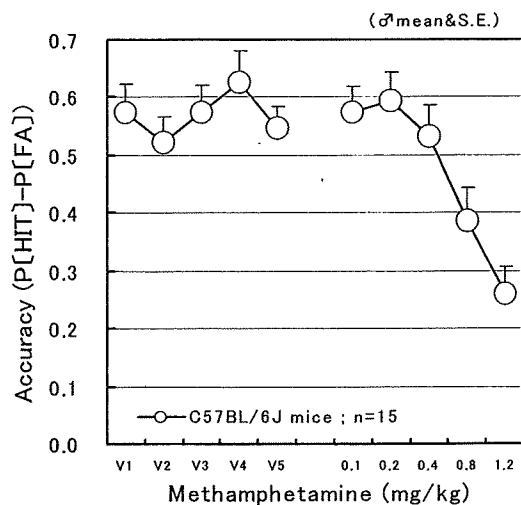


Fig. 4-2 メタンフェタミン投与によるマウスの SCOB (Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO) 主要行動指標の変化 (V1~V5 は生理食塩水投与) ; Accuracy (左上) ・ Bias (右上) ・ FR 反応率 (左下) ・ DRO 反応率 (右下) (実験 1)

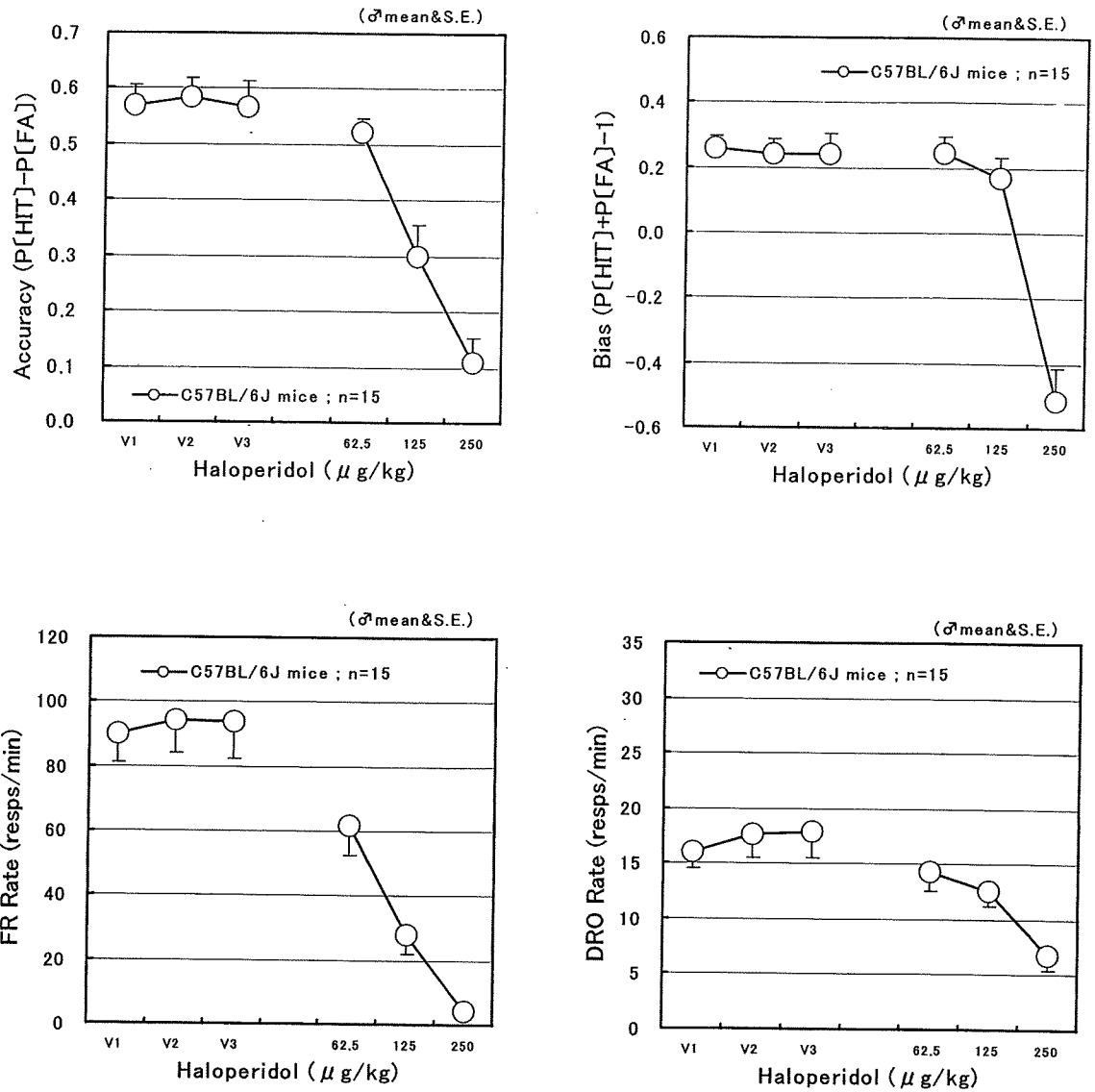


Fig. 4-3 ハロペリドール投与によるマウスの SCOB (Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO) 主要行動指標の変化 (V1~V3 は生理食塩水投与); Accuracy (左上)・Bias (右上)・FR 反応率 (左下)・DRO 反応率 (右下) (実験 1)

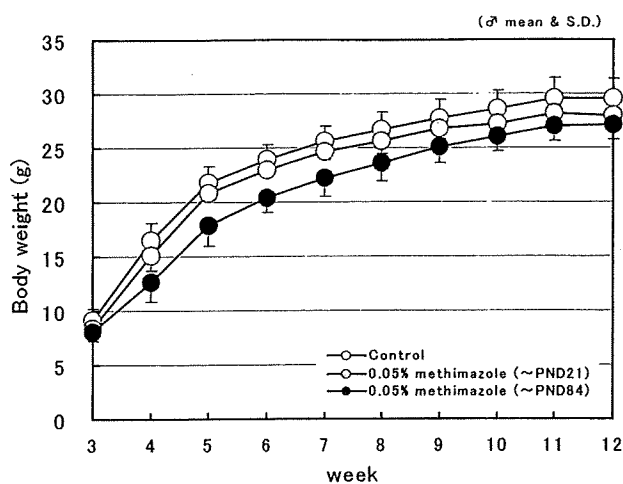


Fig. 5-1 仔マウス（離乳後）の体重変化とメチマゾールの影響（実験2）

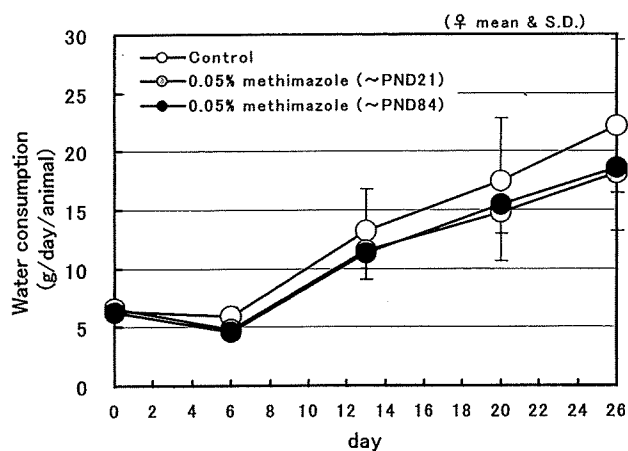


Fig. 5-2 母マウスの飲水量（横軸：メチマゾール投与開始日を day 0）（実験2）

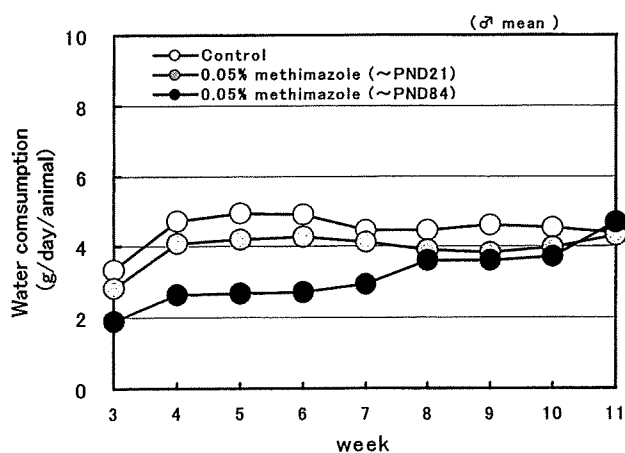


Fig. 5-3 仔マウス（離乳後）の飲水量（横軸：仔マウスの週齢）（実験2）

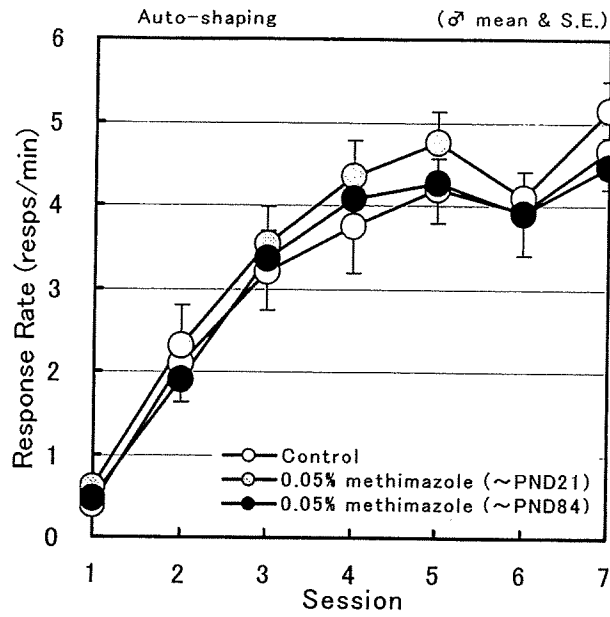


Fig. 6 マウスの自動反応形成スケジュール訓練セッションにおける反応率の変化 (平均値と標準誤差)とメチマゾール曝露の影響 (実験 2)

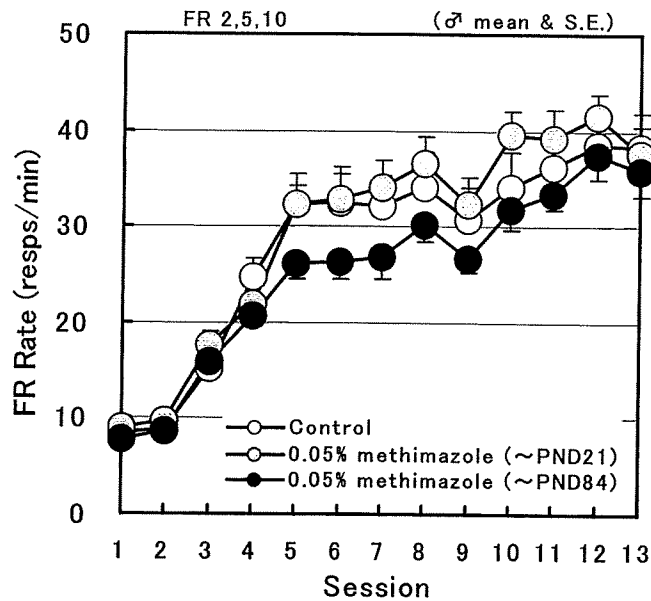


Fig. 7 マウスの FR スケジュール訓練セッションにおける反応率の変化(平均値と標準誤差、セッション 1-2 : FR2、セッション 3 : FR5、セッション 4-13 : FR10) とメチマゾール曝露の影響 (実験 2)

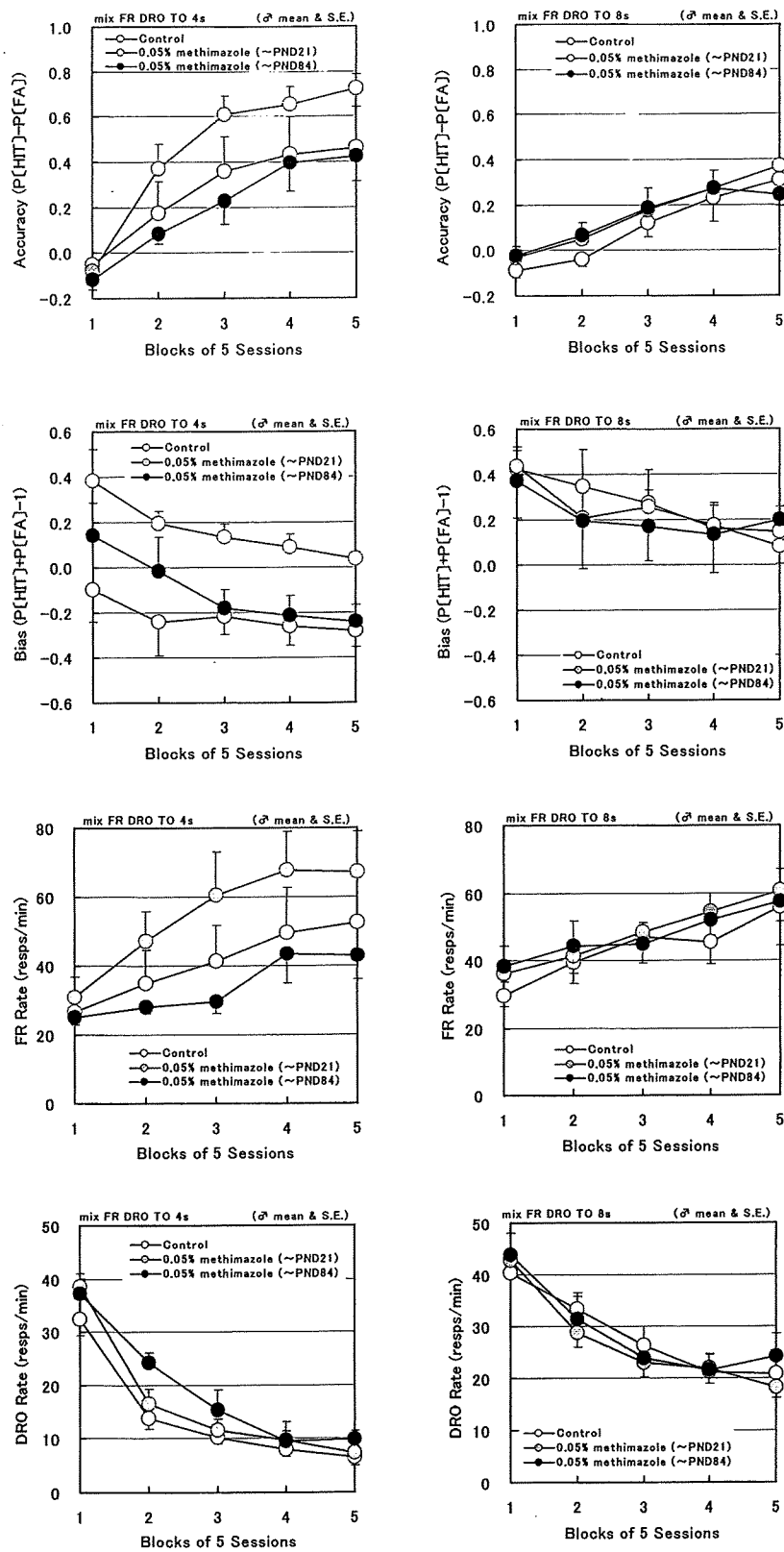


Fig. 8 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第1段階（固定長タイムアウト、左：4秒群、右：8秒群）における主要行動指標（Accuracy・Bias・FR 反応率・DRO 反応率）の変化とメチマゾールの影響（実験2）

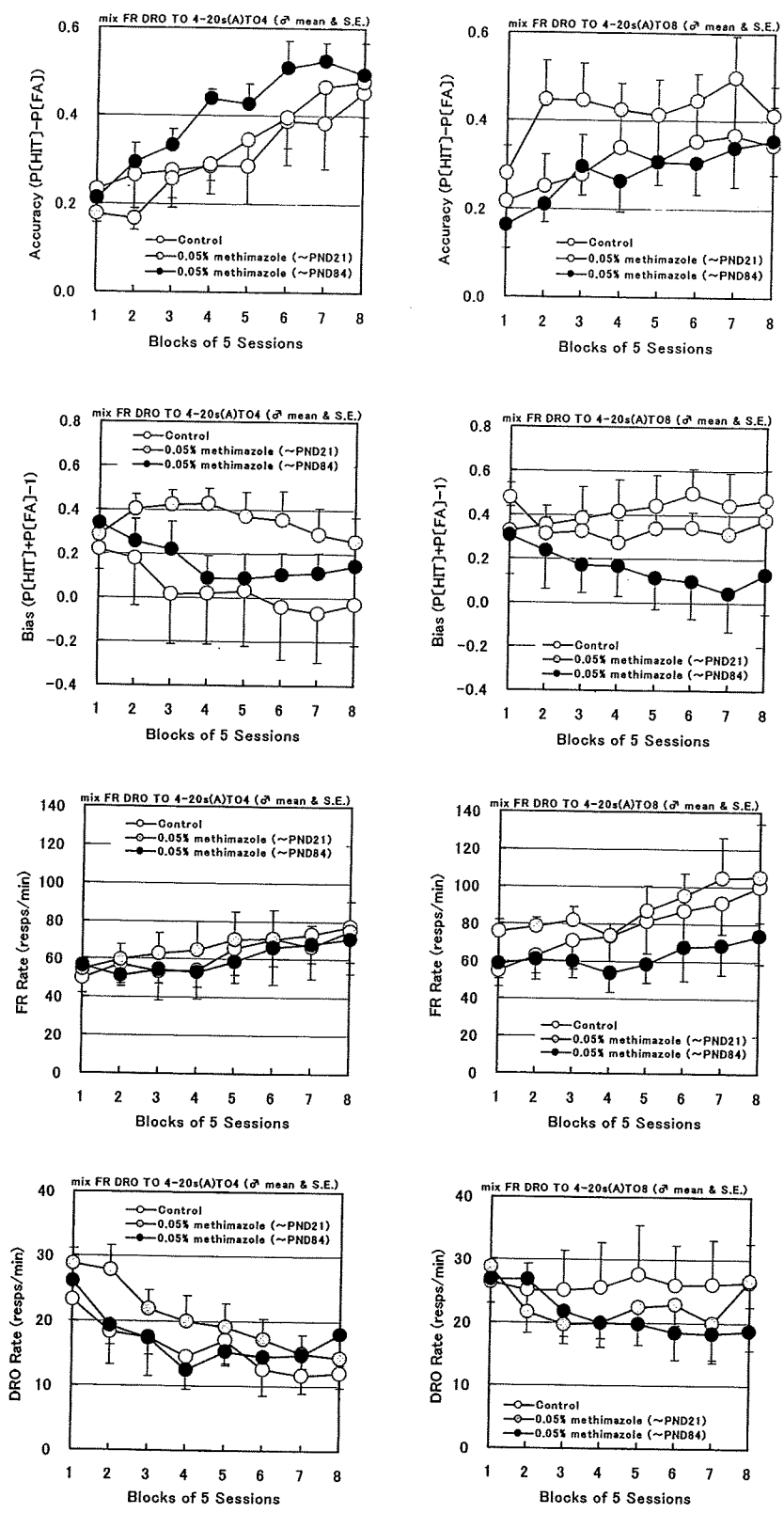


Fig. 9 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第2段階 (タイムアウト長上昇系列条件、左：第1段階4秒群、右：第1段階8秒群) における主要行動指標 (Accuracy・Bias・FR 反応率・DRO 反応率) の変化とメチマゾールの影響 (実験 2)

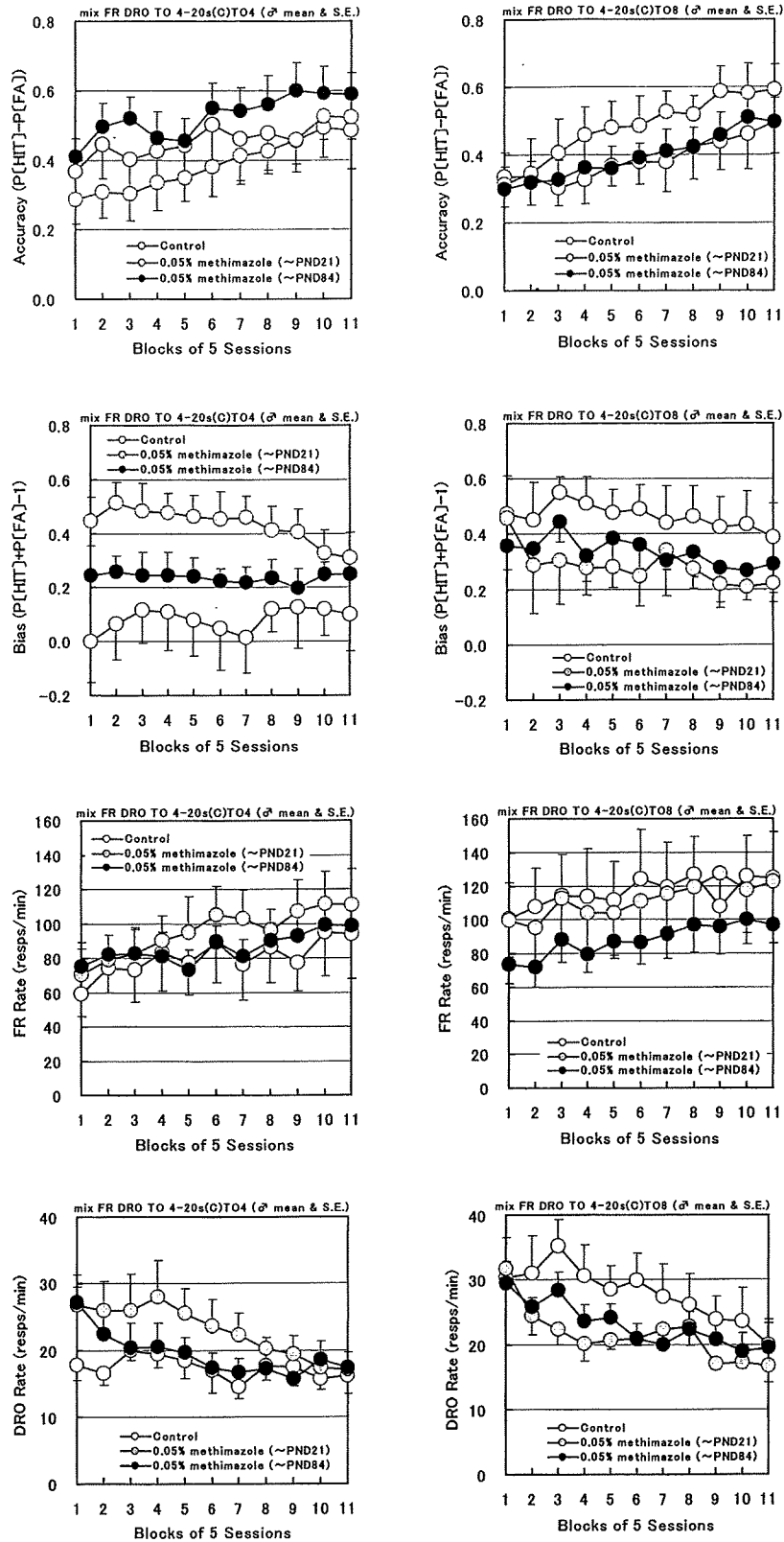


Fig. 10 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (タイムアウト長上下変動条件、左：第1段階4秒群、右：第1段階8秒群) における主要行動指標 (Accuracy・Bias・FR反応率・DRO反応率) の変化とメチマゾールの影響 (実験2)

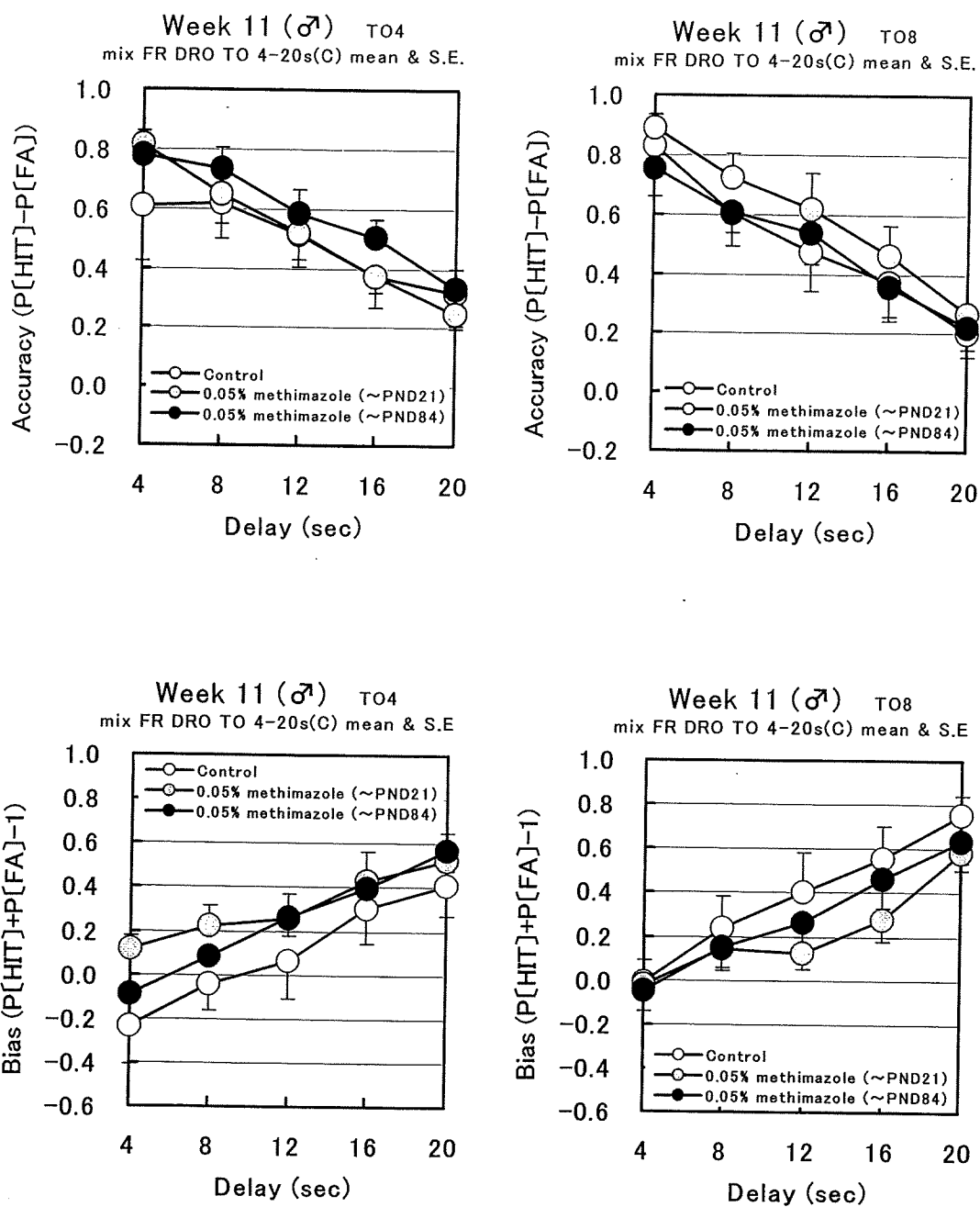


Fig. 11 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (タイムアウト長上下変動条件での訓練 11 週目、左: 第1段階 4 秒群、右: 第1段階 8 秒群) における Delay-Accuracy の変化 (上) および Delay-Bias 曲線 (下) (実験 2)

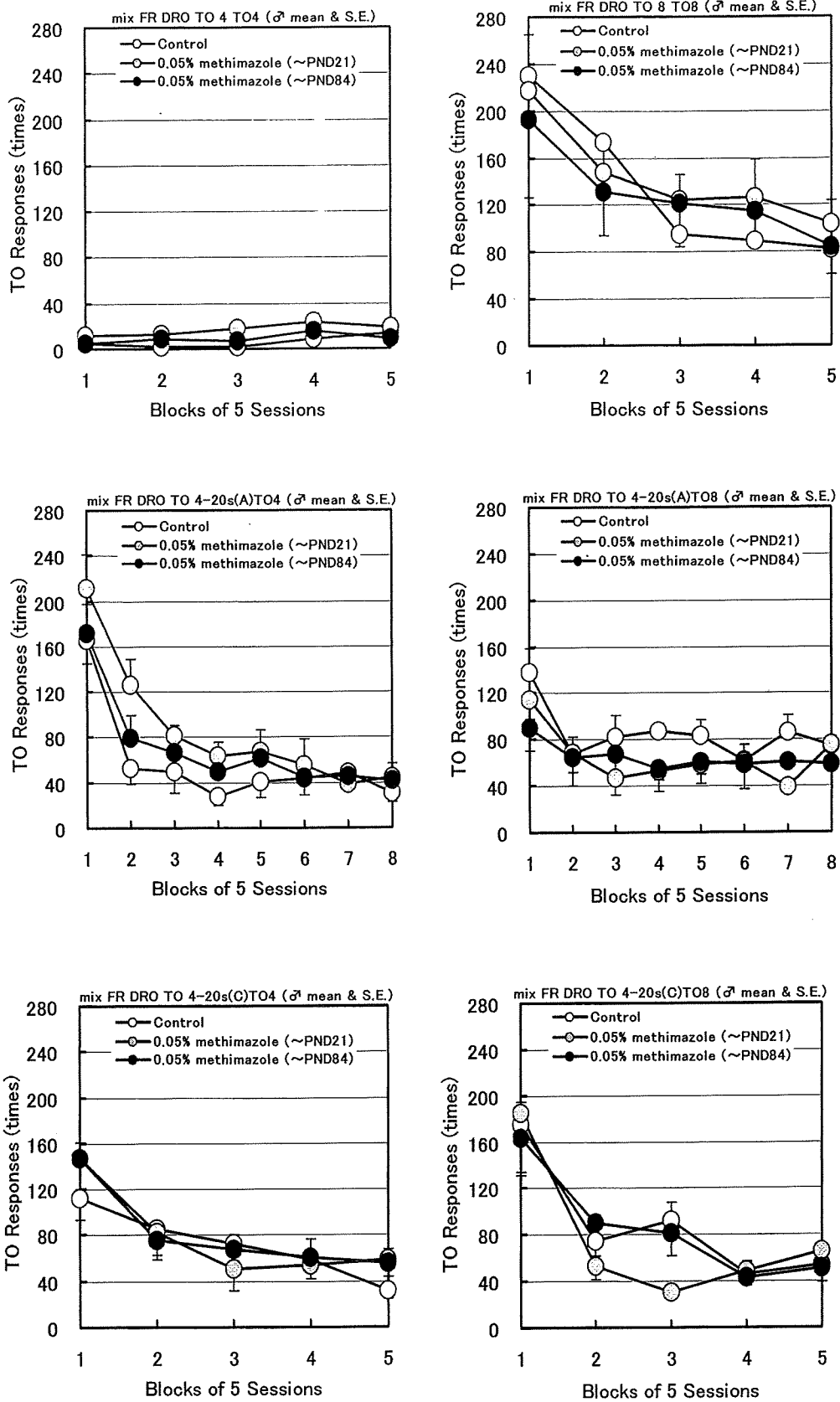


Fig. 12 マウスのタイムアウト付交替型FRDRO訓練の第1段階(上)、第2段階(中)、第3段階(下)におけるタイムアウト中の反応数の変化(左:第1段階4秒群、右:第1段階8秒群)(実験2)

4. 内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

分担研究者 今井 清 (財)食品農医薬品安全性評価センター 技術総括 部長
研究協力員 大平東子

研究要旨 新生児期における性機能に關与する神経発達の経過を明らかにする目的で、エストロゲン受容体 α (ER α)を免疫組織化学染色を施し、経時的に観察した結果、性的二型核の大部分を占める内側視索前核特に内側視索前核前部から視床下部前腹側室周囲核にかけてER α 陽性細胞が数多く存在し、雄より雌においてより多くの陽性細胞が観察された。また、雄ではPND 5でER α 陽性細胞の数は最多になり、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したが、雌では少なくともPND 10までは陽性細胞の減少は認められなかった。更にPND1-5にEEを皮下投与した結果、雌雄ともに0.5 μ g/kg以上の投与量で内側視索前核のER α 陽性細胞数が増加したが、増加の程度は雌においてより著明であった。

A. 研究目的

成熟したラットのみならず多くの哺乳動物の視床下部には、雌に比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核(性的二型核:SDN-POA)と、雌の方が大きな容積を持つ神経核(前腹側室周囲核:AVPvN-SDA)が存在することが明らかにされており、雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は、これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている。一方、周産期にアンドロゲンあるいはエストロゲンに暴露された雌ではSDN-POAの容積が増大し、周産期に去勢あるいはエストロゲン投与されたSDN-POAの容積が減少するが、雌ラットでは胎生期あるいは新生児期のある一定時期(臨界期)に生理的な範囲を超えた大量のエストロゲン様物質に暴露されるとandrogenizationが起き、正常な性成熟を迎えるにもかかわらず、早期に生殖機能の障害が現れること(遅発効果:delayed effect)が知られている。しかしながら、周産期に急速に発達分化する視床下部における、ホルモン受容体

との関連を含め神経線維網の発達・過程に関しては不明の点も多い。

そこで昨年度は、ドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼおよびER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞の数は視床下部性的二型核において雌雄差はなく、ER α 陽性細胞はむしろ雌に多数観察されたことから、今年度は、新生児期のラットの脳、特に視床下部におけるER α 陽性細胞の数を経日的に計測するとともに、雌において生殖器への遅発効果が明らかにされている大量のエストロゲン投与が視床下部におけるER α 陽性細胞数に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

PND 1, 5, 7, 10, 21日目および10週齢のSprague-Dawley系ラット雌雄各4匹の脳の連続切片を作製し、ER α の免疫染色を施して、性的二型核が存在する視床下部を中心にER α 陽性細胞の数を計測し

た。さらに、生後直後の新生児を雌雄それぞれ4匹からなる4群に分け、1群を溶媒対照群とし、他の3群にゴマ油に溶解したEEをそれぞれ0.5, 5あるいは50 μ g/kgの用量で5日間皮下投与した。その後PND 6 (投与終了翌日), PND 10 (投与終了5日後), PND 21 (投与終了16日後)に動物をエーテル麻酔下で安楽死させ剖検し、脳を10%フォルマリンで固定し連続切片を作成し、ER α 染色およびTUNEL染色を施して、それぞれ陽性細胞を計数した。

C. 研究結果

内側視索前核後部に比較すると、雄では、性的二型核が雌より大きな容積を占めているが、雌は雄に比較すると、前腹側側室核の容積が大きいことが明らかにされている。Fig. 1, 2および3に示すように、雌では内側視索前核後部に比較すると、性的二型核の一部である内側視索前核前部から前腹側室周囲核にかけて、はるかに多数のER α 陽性細胞が観察された。また、Table 1に示すように、内側視索前核から前腹側室周囲核にかけて、雌雄ともにはるかに多数のER α 陽性細胞が観察され、雄ではPND 5でその数は最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したのに対し、雌では少なくともPND 10までは陽性細胞の減少は認められなかった。一方、性的二型核の最後部に位置する神経核においては、ER α 陽性細胞数は雌雄ともにPND 1-5にかけて急速に増加し、その後離乳期まではER α 陽性細胞数はほぼ一定で、その数は雄より雌がやや多くなる傾向にあった。(Table

2)。

Table 3に示すように、EE 0.5 μ g/kg以上の投与により、雌雄とも内側視索前核前部において投与終了後1日目にはほぼ用量依存的に明らかなER α 陽性細胞数の増加が認められた。さらに、内側視索前核後部においても雌雄いずれもEE 5 μ g/kg以上の投与群でER α 陽性細胞の軽度の増加が認められたが、投与後16日即ち離乳時には対照群との間に差は認められなくなった。

なお、現在PND 21および10週齢の無処置動物およびEE処理後5日後(PND 10)および16日後(PND 21)の内側視索前核前部におけるER α 陽性細胞の数およびTUNEL染色陽性細胞数を計測中である。

D. 考察

成熟したラットのみならず多くの哺乳動物の視床下部には、雌に比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核(性的二型核:SDN-POA)と、雌の方が大きな容積を持つ神経核(前腹側室周囲核:AVPvN-SDA)が存在することが明らかにされており、雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は、これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている。今回、雌雄ともに、視床下部性的二型核、特に内側視索前核前部から、雌の方が大きな容積を有すると考えられている視床下部前腹側室周囲核にかけて多数のER α 陽性細胞が観察され、雄ではPND 5でその数は最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したのに対し、雌では少なくともPND 10までは陽性細胞の減少は認められないことが明らかにされた。従って、視床下部前

腹側室周囲核において雄より雌の容積が大きくなる要因の一つとして、雌ではこの部においてER α 陽性細胞が消失せずに長期間保持されていることに起因している可能性が示唆された。

PND 1～5に大量のEEを連続投与すると、雌雄とも性的二型核の大部分を構成する内側視索前核および前腹側室周囲核にER α 陽性細胞の著しい増加が認められたが、現在これらの変化の経時的な推移を検討している段階であり、現時点ではその毒性学的あるいは内分泌生理学的意義は明らかにはすることは出来なかった。

E. 結論

新生児期における性機能に関与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、ER α 陽性細胞は、雄に比較すると雌に多く特に内側視索前核から視床下部前腹側室周囲核にかけ多数観察された。雄ではPND 5でその数が最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したが、雌では少なくともPND 10までは陽性細胞の減少は認められなかった。このことから視床下部前腹側室周囲核において雄より雌の容積が大きくなる要因の一つとして、雌ではこの部においてER α 陽性細胞が消失せずに長期間保持されていることに起因している可能性が示唆された。また、PND 1～5 EEを皮下投与した結果、雌雄ともに0.5 μ g/kg以上の投与量で内側視索前核のER α 陽性細胞数が増加し、増加の程度は雌においてより著明であったが、現時点でこれらの変化の毒性学的あるいは内分泌生理学的意

義は明らかではない。

F 健康危惧情報

無し

G 研究発表

1. 論文発表

A. Maekawa, M. Yoshida, S. Katsuda and K. Imai
“Toxicologic/Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents” J. Toxicol. Pathol. 17, 69-84, 2004

2. 学会発表

大平東子, 今井 清ほか, 第22回日本毒性病理学会, (2006), 鹿児島

H 知的財産賞有権の出願・登録状況

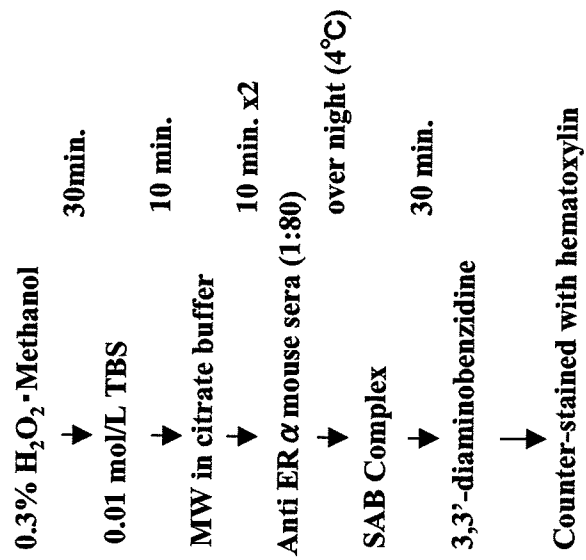
無し

研究方法

実験 1

- ・ 使用動物種: Sprague-Dawley (Crl:CD(IGS))系ラット
- ・ 検索材料: 脳(生後1, 3, 5, 7, 10, 21日齢および10週齢新生児より採取)
- ・ 検索方法: 免疫組織学的手法による形態計測

エストロゲン α (ER α)



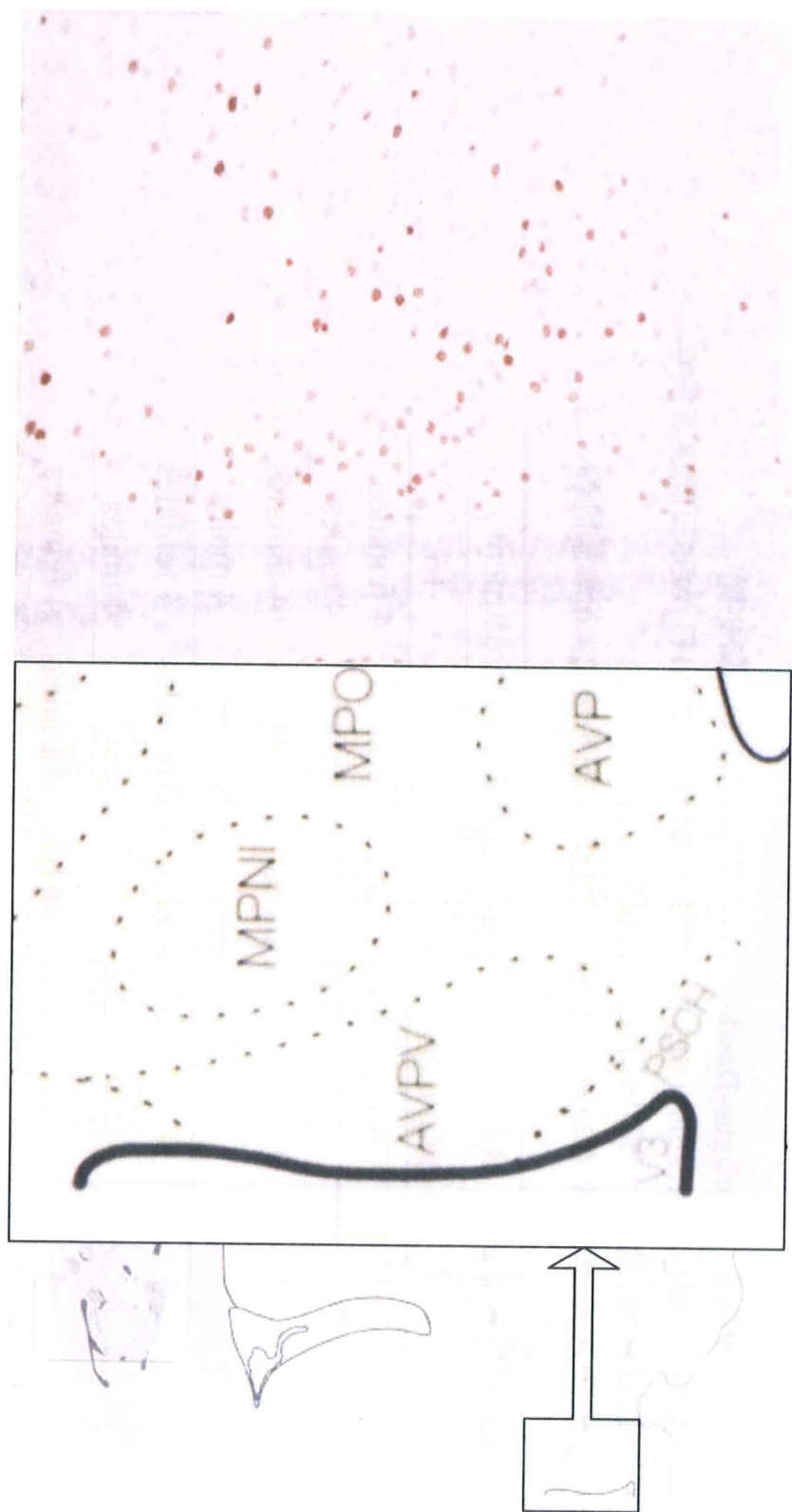
研究方法

実験 2

- ・ 使用動物種: Sprague-Dawley (Crj: CD (IGS)) ラット新生児
- ・ 処置: Ethinyl Estradiol (EE) をゴマ油に溶解して生後1日から5日間皮下投与
- ・ 検素材料: 投与1, 5, 16日後に脳を採取
- ・ 検素方法: エストロゲン α (ER α) 免疫組織学的手法による形態計測

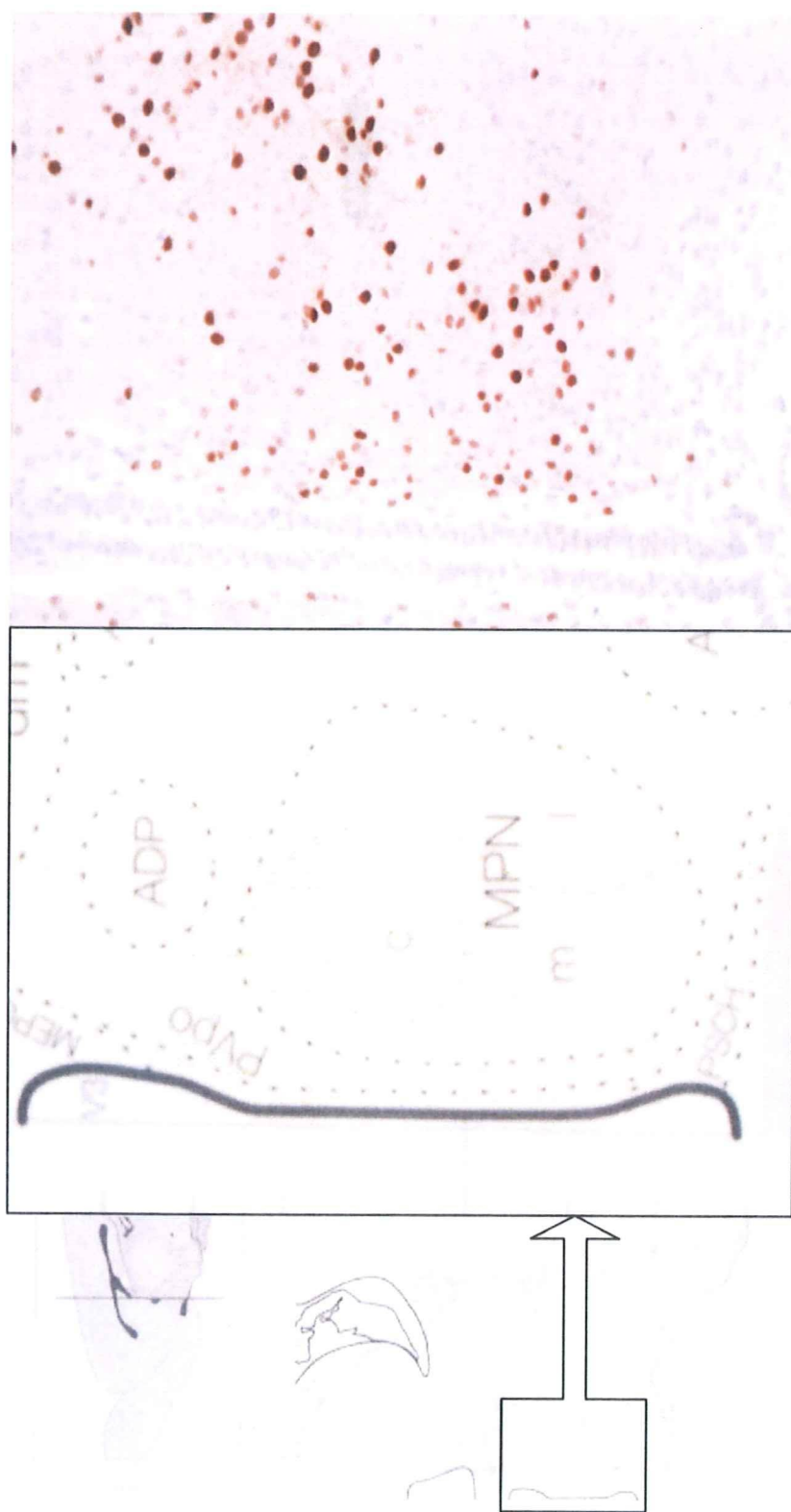
Group	Dose (μ g/kg/day)	Autopsy day after treatment			
1	0	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males
2	0.5	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males
3	5	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males
4	50	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males	4 females 4 males

Fig.1 前腹側室周囲核(AVPvN-SDA)におけるER α 陽性細胞



L. W. Swanson "Brain Maps: Structure of the Rat Brain" 2nd.Ed.より転写

Fig.2 性的二型核(SDN-PON)におけるER α 陽性細胞



L.W. Swanson "Brain Maps: Structure of the Rat Brain" 2nd.Ed.より転写