

後のDelay-Accuracy 曲線及びDelay-Bias 曲線、ドーパミン系に作用する薬物を用いた薬理的負荷試験、いずれにおいても BPA の影響は示されなかった。両実験の結果を慎重に比較検討する必要がある。なお、マウスの実験と今回のラットの実験では、BPA 混餌濃度は同一の設定であるが、体重当たりの曝露量としては一般にマウスではラットの 3 倍とされる。

一方、BPA 曝露がドーパミン系に及ぼす影響を示唆した研究は相当数存在する。我々の過去の実験でも、高用量投与ではあるがドーパミン系への影響を示唆するデータも得られている。しかし、今回の薬理的負荷試験は陰性結果を示すものとなった。

今回の実験は認知機能(学習・記憶)に焦点をあて SCOB の習得遅延という結果を得たものではあるが、DRO への影響という点に注目すると、曝露群における反応の抑制の困難さを示唆しており、場合によっては「衝動性」との関連で興味を持たれるかもしれない。ただし、齧歯類を用いた行動試験により衝動性を評価するためには、ヒトにおいて衝動的ととらえられる行動様式を(いわゆるキレやすさや低コストで短期に得られる利益を選好する傾向などが「衝動性」といった表現で一つにまとめられるものかどうかも含めて)整理し、これに対応する動物における行動モデルを確立することが前提となり、現在まで幾つかの試みがなされているものの十分な検討がなされているとは言えない状態である。したがって、本研究結果から安易に衝動性に言及することは控えたい。

### 陽性対照物質に関する予備的検討

上述したように、本年度は BPA 曝露によって用量に依存的であり、また統計学的にも有意な次世代行動影響が把握されたが、以前実

施したマウスの実験では、混餌による BPA 曝露レベルが今回と同様(体重当たりの摂取量ではより曝露レベルが高い)にもかかわらず影響は認められていない。このような陰性データが得られる場合には、試験方法の感度や妥当性が問題となる。したがって陽性対照群の設定が重要となるが、次世代認知機能に焦点をあてると陽性対照群の設定には種々の困難が存在する。以下、今年度実施した陽性対照についての予備的検討結果(実験 2-3)の概要を記載する。

### (実験2 陽性対照物質としてのインドール酢酸)

インドール酢酸(IAA)は微量で植物細胞の伸長を促進する作用がある天然の植物ホルモン(オーキシン)であり、植物の芽頂で作られる。本物質については、ラットやマウスが妊娠中の一定の時期に比較的大量の投与(1000 mg/kg)をうけると胎児に奇形(小脳症)が発生するとの報告がなされている(Furukawa et al., 2004, Furuawa et al., 2007)。今年度は、この IAA による小脳症動物を、次世代認知機能影響評価における陽性対照モデルとして用いることを検討した。マウス及びラットを用いて 250-1000 mg を妊娠中期に 1 回(マウス、GD12)または 3 回(ラット、GD12-14)強制経口投与し、得られた仔を用いて SCOB の測定を実施した。高用量では小脳症が生じることが確認されたが、奇形が大きい場合は出生後の生存率がわるく、また用量を減らすと殆ど肉眼的に観察した形態や脳重量に影響がなく、そのような状況で実施した SCOB 試験(実験1と基本的に同様のスケジュールを使用)でも明確な行動影響は認められなかった。ラットの実験時に、実験実施者からは、ハンドリングに対する反応が通常とことなるとの報告を受けており、さらに検討の余地はあるが、脳の形態奇形をともしないつつ仔を成長させ得る用

量範囲の設定がむずかしいとの結論に達した。一般毒性が低いなど、実験実施上の利点も多いため、再検討も考えたい。

### ( 実験3 陽性対照物質としてのプロピルチオウレア)

抗甲状腺ホルモン作用を示すプロピルチオウラシル(PTU)については、次世代行動影響に関してかなりの数の報告が存在する。現在、行動実験で陽性対照とする場合の適切な用量と投与方法について検討中である。

### ( 実験4 老化促進マウスの利用)

老化促進モデルマウスとして知られている SAMP マウス ( Senescence-Accelerated Mouse Prone)の内、早期の加齢とともに脳の機能的障害等が生じるといわれる SAMP8( 学習・記憶障害、免疫機能不全、概日リズムの異常) 及び SAMP10( 脳萎縮を伴う学習・記憶障害、老化アミロイドーシス) の 2 系統のマウス、及び対照となる SAMR1 ( Senescence-Accelerated Mouse Resistant) マウス、合計 3 系統を用いて、SCOB の測定を実施し、早期老化とともに行動指標にどのような影響が生じるかを解析している。現在 BPA の測定と同様のスケジュールの訓練が進行しつつあり、タイムアウト時間をセッション内で上昇させる条件での交替型タイムアウト付 FR-DRO 訓練後半を実施中である。3 系統では今のところ成績に明確な差は生じていない。8-10 カ月齢で老化が進むと考えられ、最終スケジュールでの適切な反応習得後、徐々にパフォーマンスの低下が SAM8 及び SAM10 マウスで生じることを期待し、実験を継続している。今後、薬物投与による陽性対照群の設定とは別の視点から、行動試験で得られる各種指標値の意味について考察するためのデータが収集されよう。それに基づいて、我々の開発した SCOB 試験について認

知機能試験としての妥当性の検討を行なう予定である。

### E. 結論

本年度の研究の結果を総括すると以下の結論が得られた。

1) ラットでは BPA の経胎盤・経母乳曝露( 33 ppm 混餌; 我々の同様の実験でマウスでは影響が認められず、また従来の LOAEL とされる量よりも低い用量) により、仔の学習進行の遅れが生じた。反応の抑制が必要な SCOB スケジュールの習得過程が主として影響を受けた。短期記憶の保持過程には影響が認められなかった。

2) 各種陽性対照の設定について検討中。陽性対照物質候補インドール酢酸についての予備試験では、行動試験実施が可能となるような用量設定に困難があった。甲状腺ホルモン拮抗剤 PTU についての検討を開始した。試験法の妥当性を別の面から検証するため、早期老化により認知機能に異常が生じるとされる SAMP マウスを用いた実験を実施(、SCOB 訓練) 中である。

( 謝辞: 本研究遂行にあたって村瀬正、小野寺英美、松田由希各氏から多大な技術的支援を受けた。)

### F. 健康危惧情報

特になし

### G. 研究発表( 過去3 年分)

#### 1. 論文発表

1) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi, Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring.

- Industrial Health 44: 510-524, (2006).
- 2) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Di (2-ethylhexyl) phthalate on Somatic and Physical Development in Rats Offspring. *Industrial Health*, 44: 652-660. (2006).
  - 3) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi and Takeshi Honma. Effects of in Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A on Thyroid Status in F1 Rat Offspring. *Industrial Health*, 43: 685-690. (2005).
- ## 2. 学会発表
- 1) 宮川宗之、小林健一、須田恵、王瑞生、奥野勉、平田衛. BPA の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とラットの次世代認知機能影響. 環境ホルモン学会第 10 回研究発表会 要旨集 p53、(2007).
  - 2) 須田 恵, 本間健資, 宮川宗之, 王 瑞生, 小林健一. 2-プロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響 その2. 日本産業衛生学会第 19 回産業神経・行動学研究会, 産業衛生学雑誌 (2007).
  - 3) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代生殖発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 47 回日本先天異常学会学術集会 要旨集 p66、(2007).
  - 4) 小林健一、大谷勝己、久保田久代、宮川宗之. マウス次世代発生におよぼすビスフェノール A の影響. 第 34 回日本トキシコロジー学会学術年会 プログラム・要旨集 pS116、(2007).
  - 5) 宮川宗之、小林健一. 低濃度ビスフェノール A への妊娠・授乳期曝露と次世代認知機能影響. 第 80 回日本産業衛生学会講演要旨集 p756、(2007).
  - 6) 須田恵、本間健資、宮川宗之、王 瑞生. 2-プロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響. 第 80 回日本産業衛生学会講演要旨集 p747、(2007).
  - 7) Kenichi Kobayashi, Katsumi Ohtani, Hisayo Kubota, and Muneyuki Miyagawa. Effects of Dietary Exposure to Bisphenol A on Development in C57BL/6J mice. 44th Congress of european societies of toxicology EUROTOX 2007. *Toxicol Lett.* 172, S186, (2007).
  - 8) 宮川宗之、小林健一. ビスフェノール A の妊娠・授乳期低濃度混餌曝露とマウスの次世代認知機能影響. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p50、(2006).
  - 9) 小林健一、大谷勝己、宮川宗之. ビスフェノール A のマウス次世代発生毒性. 環境ホルモン学会第 9 回研究発表会 要旨集 p202、(2006).
  - 10) Muneyuki Miyagawa Behavioral Toxicity of Chemicals: Usefulness of Behavioral Test Methods in the Assessment of Neurotoxicity. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会 企業セミナー(神経毒性試験における技術開発: In Vitro and In Vivo Approaches 共催シンジェンタ CTL) (2006).
  - 11) 宮川宗之、小林健一. マウスのスケジュール制御オペラント行動による認知機能影響評価. 第 33 回日本トキシコロジー学会学術年会. *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol.31 Supplement, S218, (2006).
  - 12) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa,

- Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Takeshi Honma. Effects of gestational exposure to 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl on postnatal development and thyroidal status in rat offspring. 43th EUROTOX, Toxicol Lett 164, S170. p13-06. (2006).
- 13) 小林健一、宮川宗之、王瑞生、須田恵、本間健資. 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB153) のラット出生前曝露が次世代の発達および甲状腺におよぼす影響. 第33回日本トキシコロジー学会学術年会. The Journal of Toxicological Sciences 31 (Suppl) S221. (2006).
- 14) 須田恵、本間健資、宮川宗之、王瑞生、小林健一. 1-ブロモプロパンの脳内モノアミン、アミノ酸におよぼす影響. 第79回日本産業衛生学会第79回日本産業衛生学会、産業衛生学雑誌 48(Suppl) 546. (2006).
- 15) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to PCB 153 on the Brain Neurotransmitters of Maternal and Offspring Rats. 45rd Annual Meeting & Toxexpo, Society of Toxicology (SOT), San Diego. (2006).
- 16) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Postnatal development in rat offspring following in utero and lactational exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate. 42th Congress of european societies of toxicology EUROTOX 2005, Toxicol Letters 158, S130. (2005).
- 17) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Somatic growth and physical development in rat offspring with gestational and lactational exposure to DEHP. 第52回日本実験動物学会 Exp Anim 54, 277. (2005).
- 18) 宮川宗之. 神経行動毒性の評価とスケジュール制御オペラント行動. 薬物・精神・行動の会10月例会講演、(2005).
- 19) 小林健一、宮川宗之、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ(2-エチルヘキシル)の経母体曝露がラット産仔の成長発達におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 605. (2005).
- 20) 王瑞生、宮川宗之、小林健一、須田恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 607. (2005).
- 21) 須田恵、本間健資、宮川宗之、小林健一、王瑞生. PCB153(2, 2', 4, 4', 5, 5' - hexachlorobiphenyl) 出生前曝露がラットの脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 685. (2005).
- 22) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの学習行動に及ぼす影響(2). 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 686. (2005).
- 23) 本間健資、須田恵、宮川宗之、小林健一、王瑞生. フタル酸ジ2-エチルヘキシル(DEHP)の経母体曝露(妊娠期・授乳期)がラット脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78

回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学  
雑誌 47(Suppl) 687. (2005).

- 24) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Neurochemical Changes in the Brain of Offspring Rats following Maternal Exposure to PCB 153. Society of Toxicology (SOT), Toxicologist p.221. (2005).

H. 知的財産所有権の出願・登録状況( 予定も含む)

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

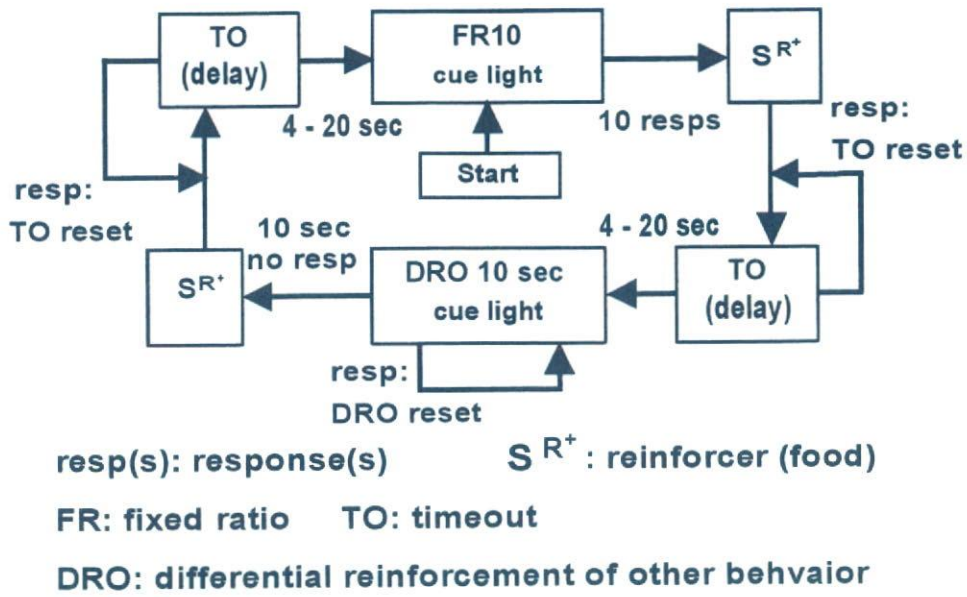


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.



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

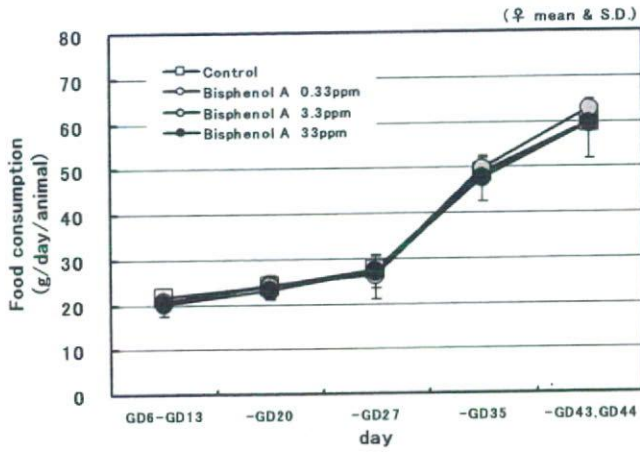


Fig. 3 妊娠期及び授乳期における母ラット摂餌量(1匹1日あたりの値)

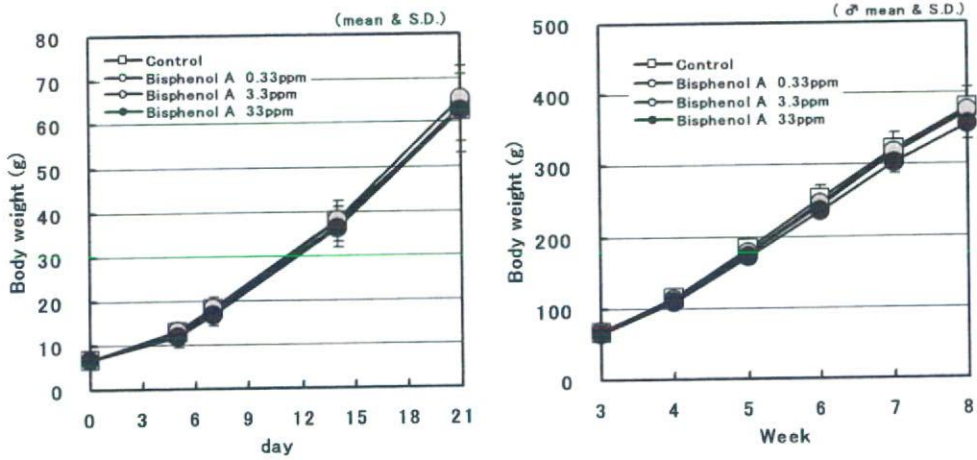


Fig. 4 授乳期の仔ラットの体重変化(左)及び離乳後の雄性仔ラットの体重変化(右)

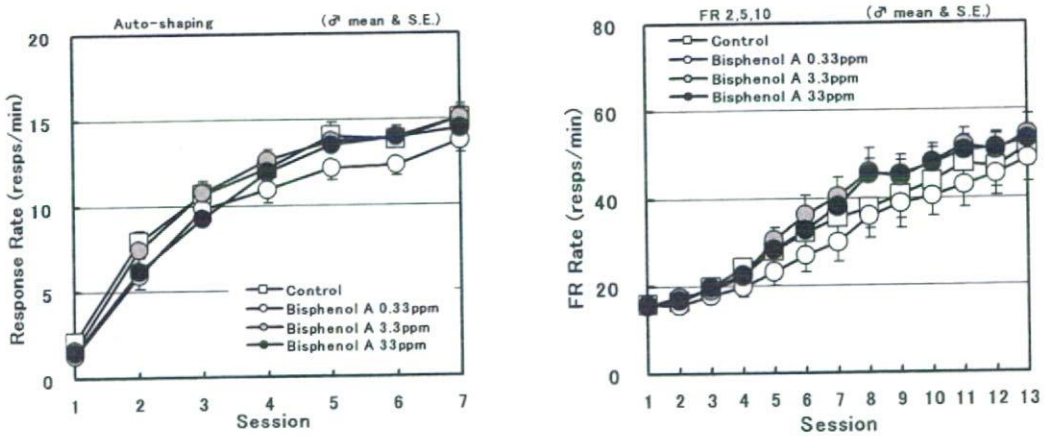


Fig. 5 自動反応形成スケジュール訓練時(左)及び定率強化スケジュール訓練時(右)の反応率の変化

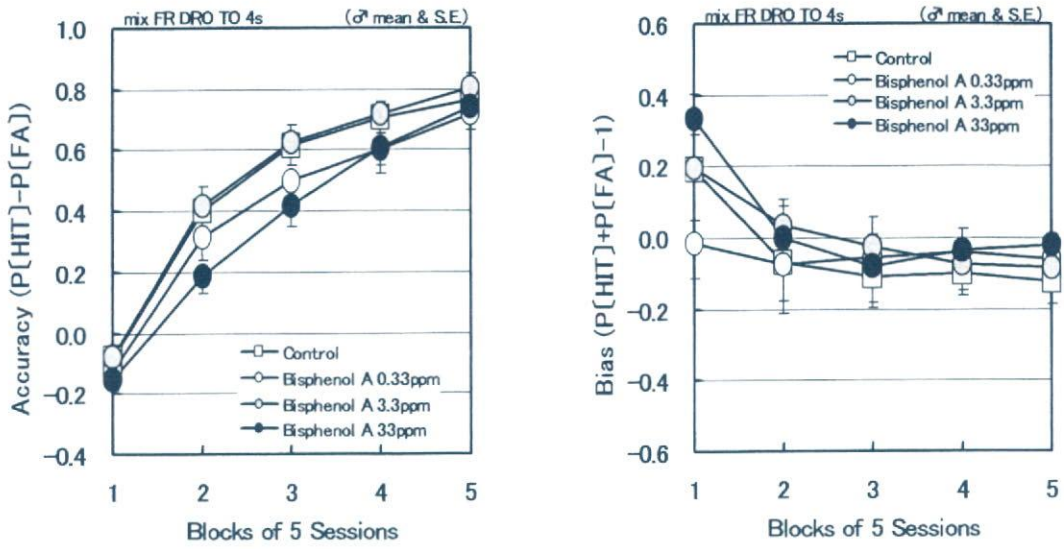


Fig. 6 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 4 秒)における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

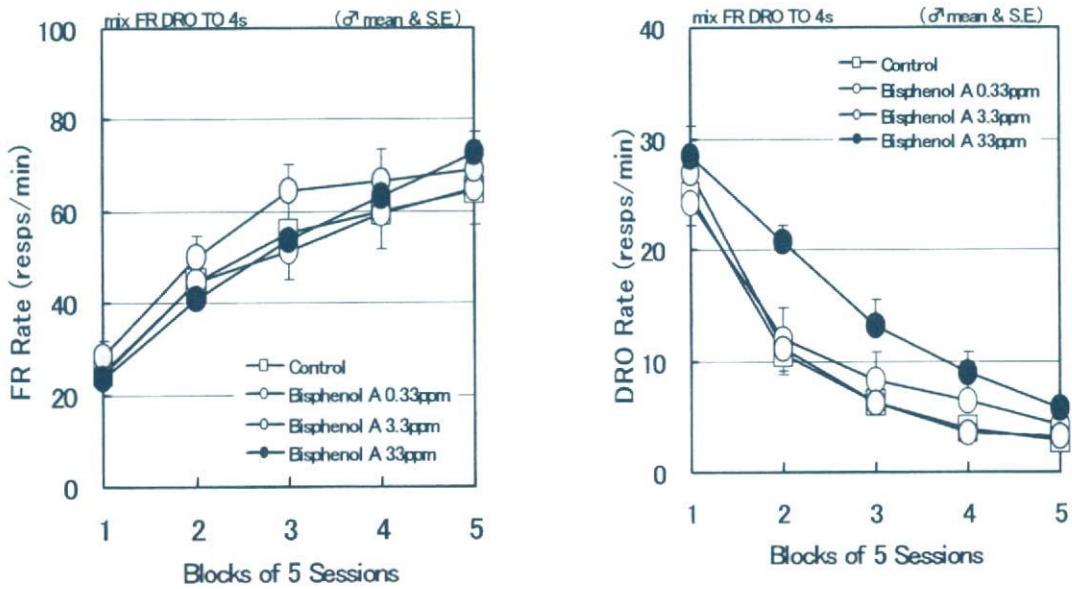


Fig. 7 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 4 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と BPA の影響



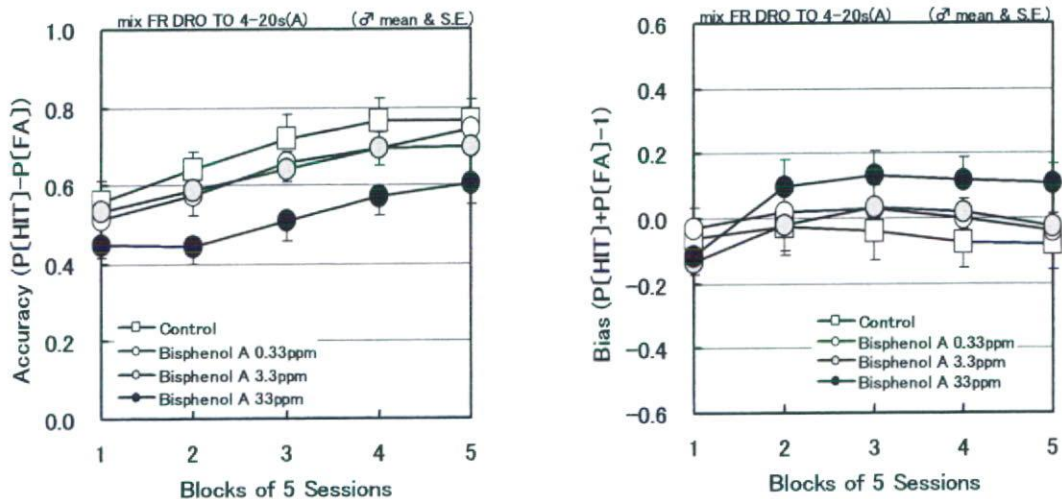


Fig. 8 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階(変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化と BPA の影響

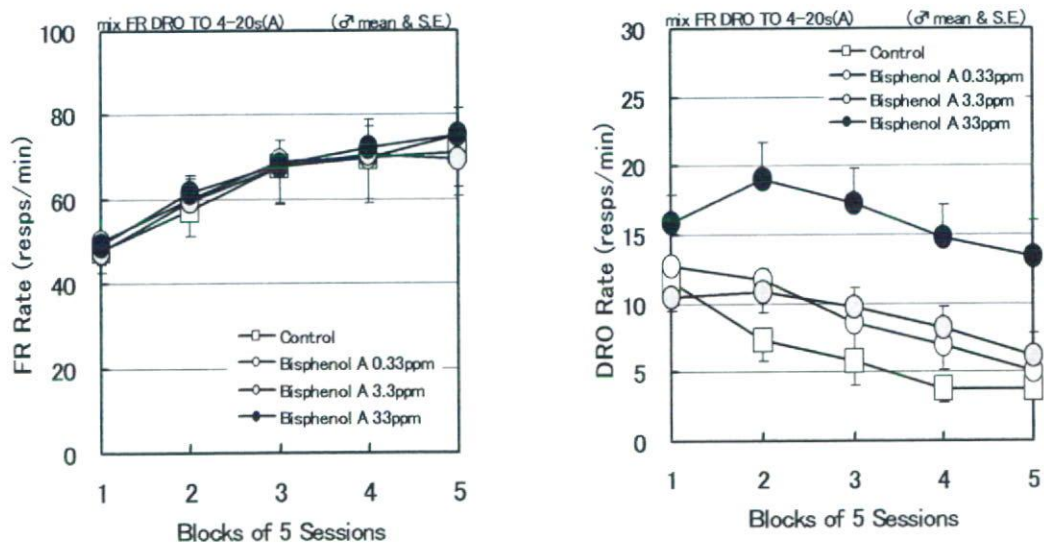


Fig. 9 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階(変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と BPA の影響

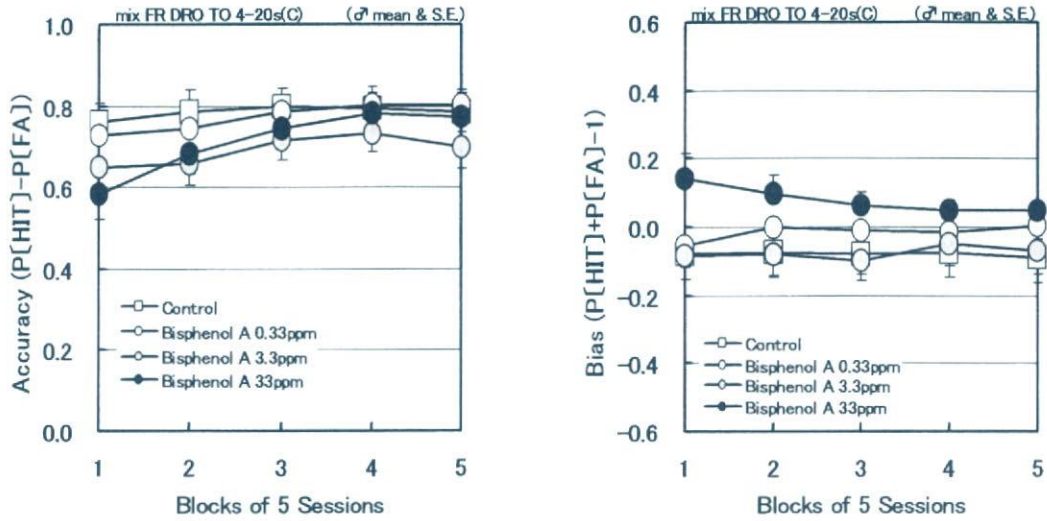


Fig. 10 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(変動タイムアウト上下系列 4 - 20 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化と BPA の影響

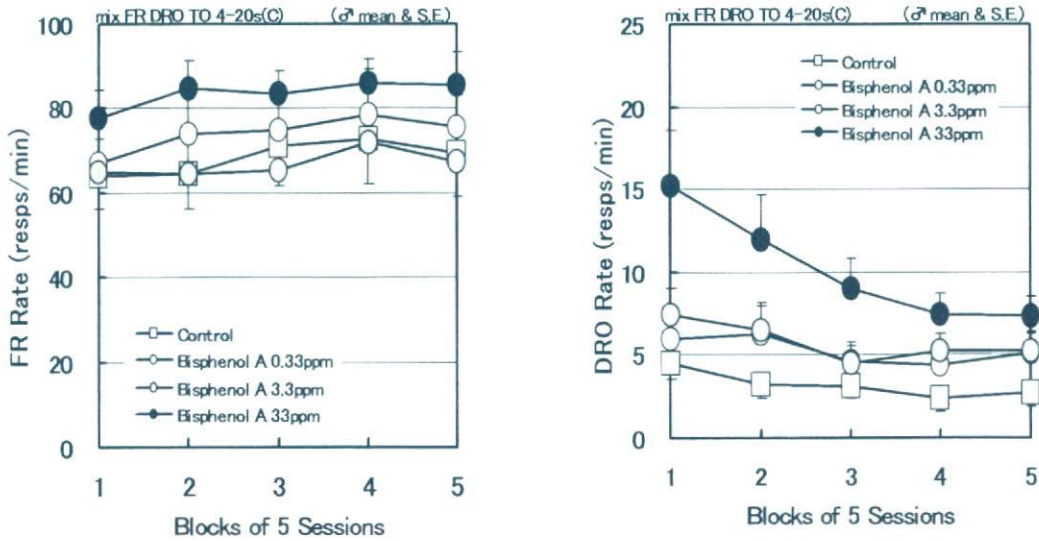


Fig. 11 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(変動タイムアウト上下系列 4 - 20 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化と BPA の影響

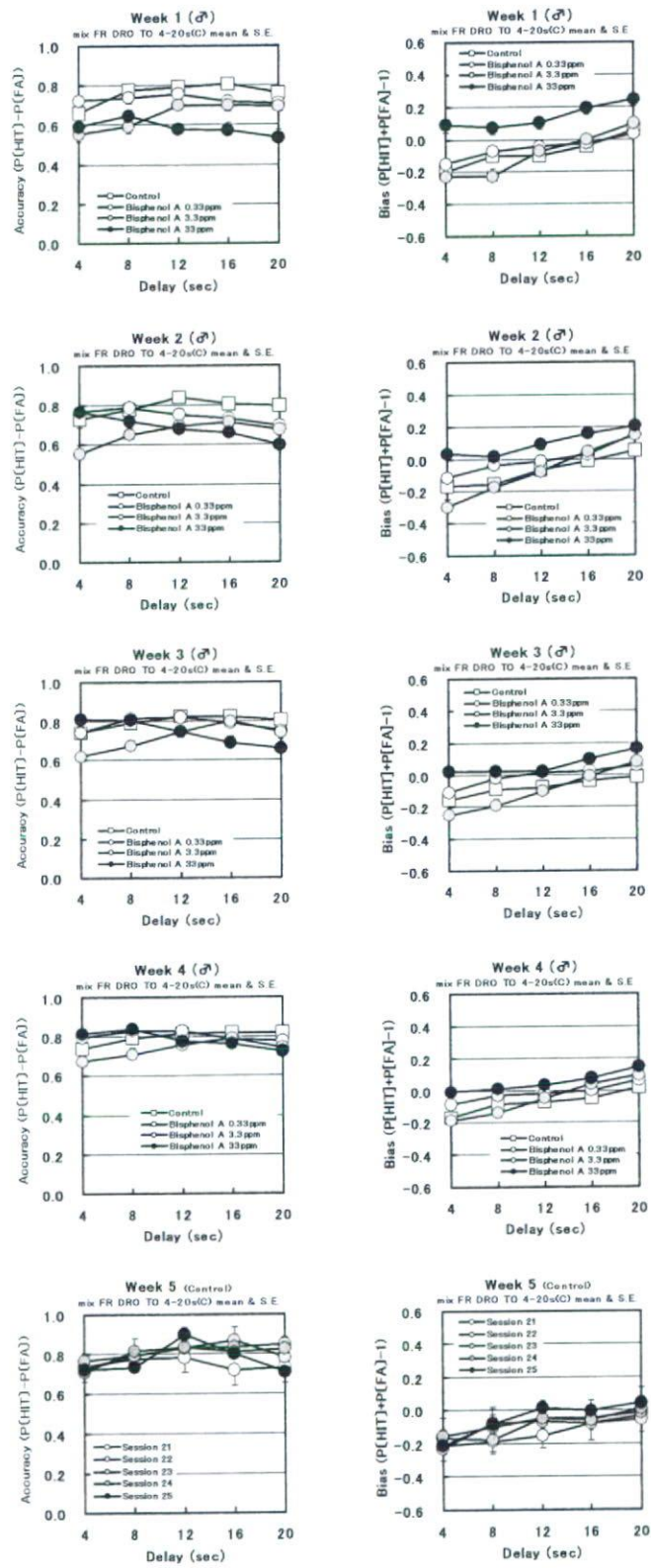


Fig. 12 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階(タイムアウト長上下変動条件)訓練 1 週目(上)から 5 週目(下)における Delay-Accuracy 曲線(左)/Delay-Bias 曲線(右)と BPA の影響

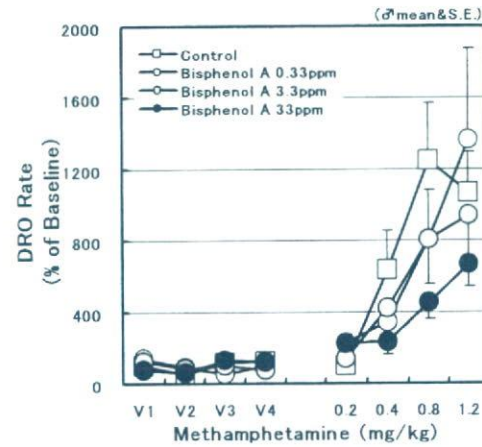
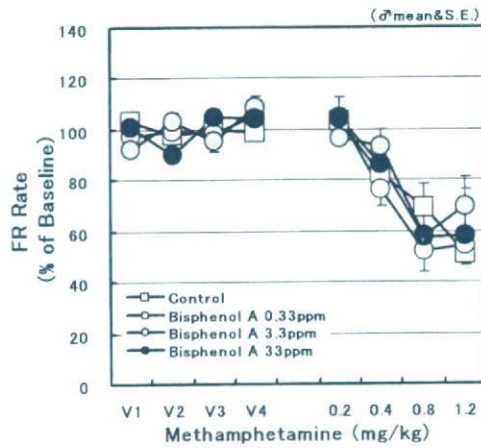
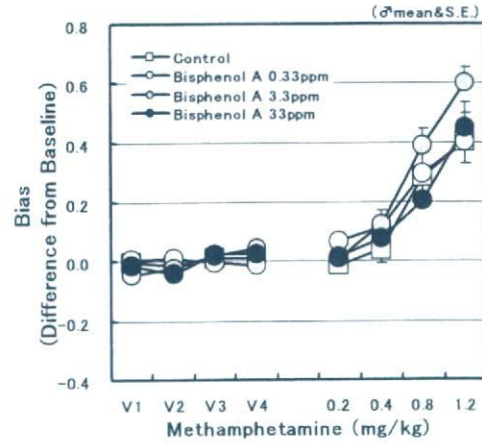
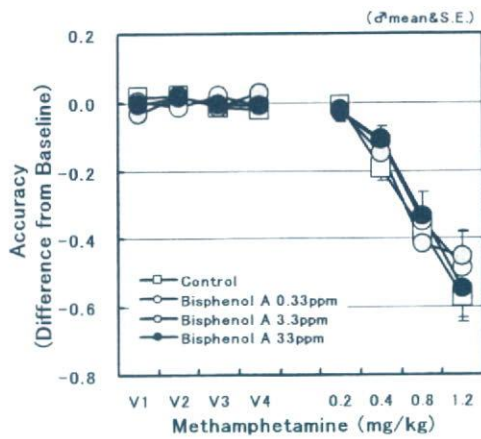


Fig. 13 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4-20s (C) スケジュール(タイムアウト長上下変動条件)下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果(1); Accuracy(左上)、Bias(右上)、FR 反応率(左下)、DRO 反応率(右下)を指標とした methamphetamine の量-影響曲線とBPAの影響 (AccuracyとBiasでは被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率とDRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を100とした%値を示した。)

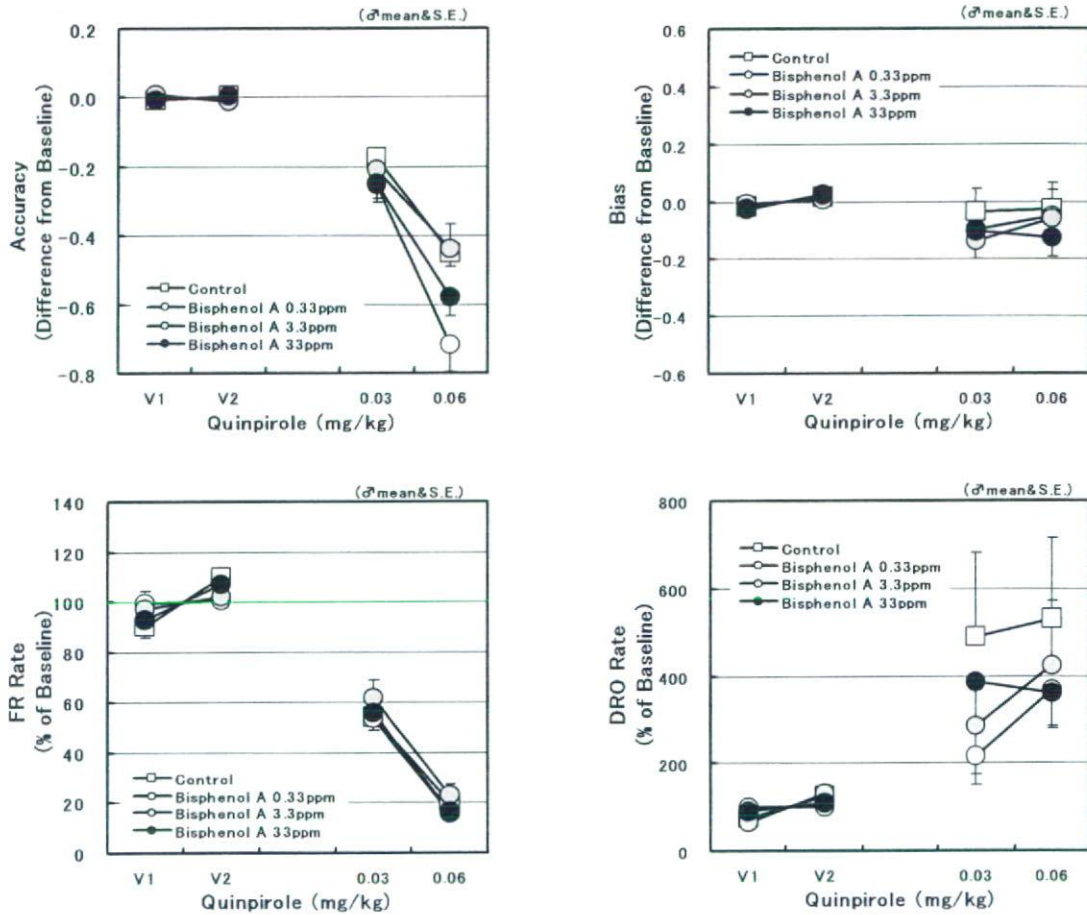


Fig. 14 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール(タイムアウト長上下変動条件)下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果(2); Accuracy(左上)、Bias(右上)、FR反応率(左下)、DRO反応率(右下)を指標とした quinpirole の量-影響曲線と BPA の影響(Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした%値を示した。)

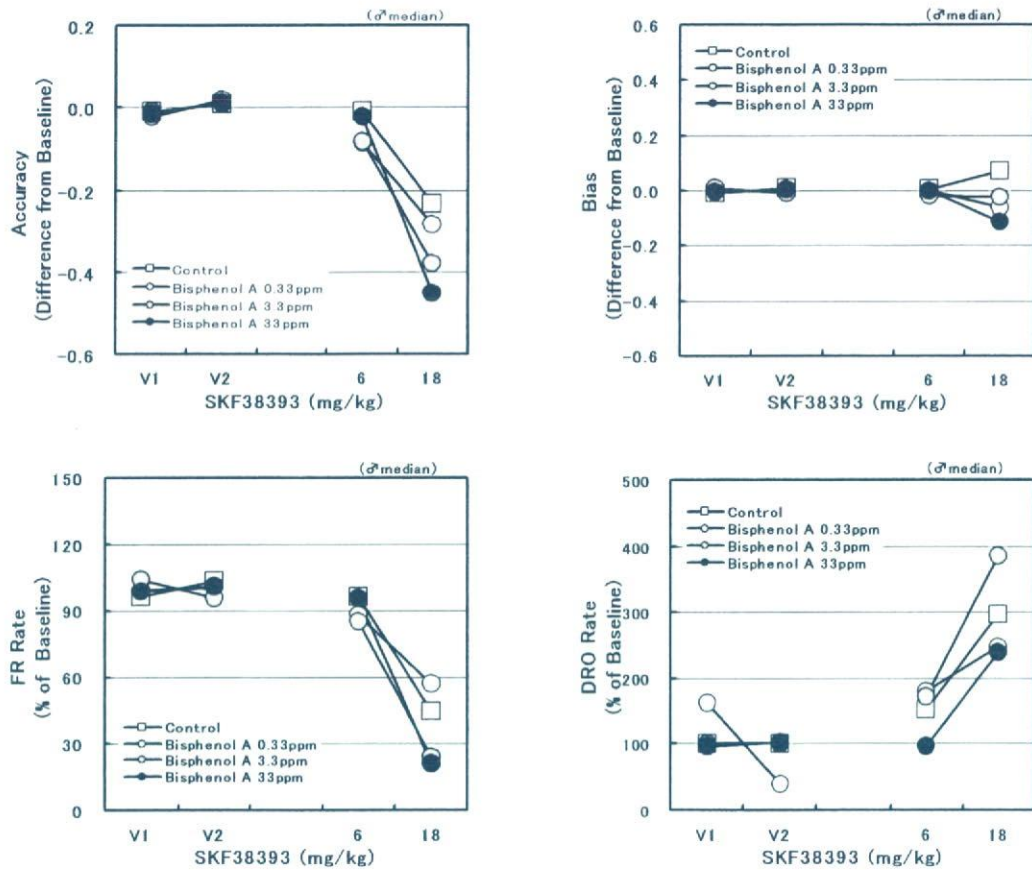


Fig. 15 ラットの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール(タイムアウト長上下変動条件)下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果(3); Accuracy(左上)、Bias(右上)、FR 反応率(左下)、DRO 反応率(右下)を指標とした(±)SKF38393 の量一影響曲線とBPAの影響(AccuracyとBiasでは被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率とDRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を100とした%値を示した。)

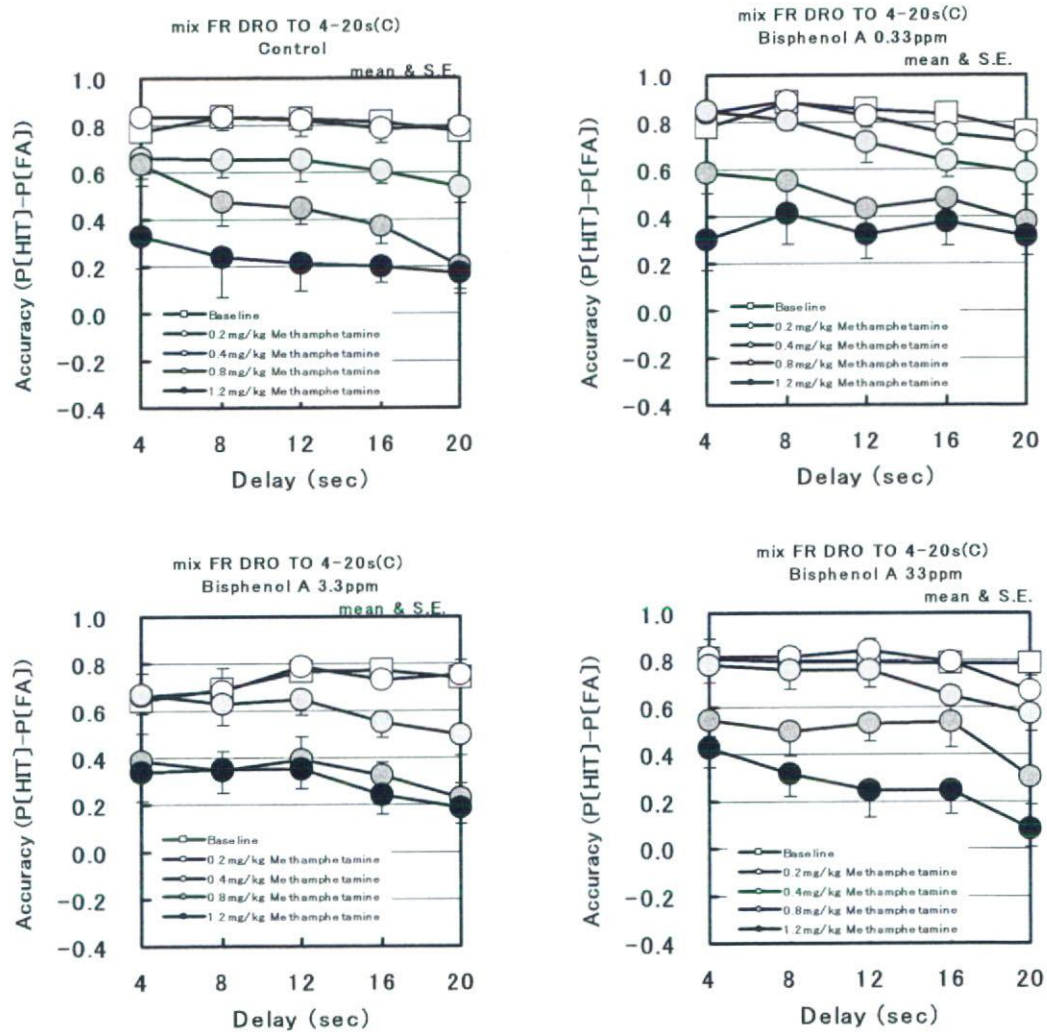


Fig. 16 ラットの Delay-Accuracy 曲線に及びす methamphetamine 負荷と BPA の影響

表1. SCOB 訓練過程の統計検定結果

訓練過程	指標	ブロック	グループ	交互作用	Dunnnett (5%)
Mix FR DRO TO 4sec	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	**	n.s	H
	Accuracy	***	n.s	n.s	
	Bias	***	n.s	*	
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	***	n.s	L, M, H
	Accuracy	***	*	n.s	L, M, H
	Bias	***	n.s	**	
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	***	n.s	n.s	
	DRO rate	***	**	***	L, M, H
	Accuracy	***	n.s	**	
	Bias	n.s	n.s	n.s	

\*: p<0.05 \*\* : p<0.01 \*\*\* : p<0.001

L: 0.33 ppm 群、M: 3.3 ppm 群、H:33 ppm 群



4. 新生児脳の性分化への化学物質高感受性影響に関する研究  
(低用量エストロジェンの視床下部前腹側室周囲核(AVPvN-SDA)の発達・分化への影響に関する研究)

研究分担者 今井 清 財団法人 食品農医薬品安全性評価センター 技術総括部 技術顧問

### 研究要旨

われわれは、これまでに生後1日から5日間高用量のエストロジェン活性物質を1日1回連続皮下投与すると、性成熟後に起きる異常性周期の発現に先立って、雌の新生児期に、視床下部前腹側室周囲核におけるER $\alpha$ 陽性細胞数の持続性の増加が認められることを見出した。今回は、生理的条件に近い低用量のエストロジェン投与による性成熟ならびに脳、特に視床下部の性分化に及ぼす影響を明らかにする目的で、新生児期に少量(0.2-20ng/kg)のDESを投与された雌雄ラットの視床下部前腹側室周囲核におけるER $\alpha$ 陽性細胞数を形態計測し、その推移を明らかにする実験を開始した。現在、新生児期に低用量のエストロジェンを投与された動物の体重、一般状態には著変はなく、性成熟完了時期あるいは性周期に対する影響も観察されていない。

### A. 研究目的

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ジェン様作用物質であるEthinyl Estradiol(EE)あるいは*p-t*-octylphenol(OP)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特に性周期の異常が現れること(遅発効果: delayed effect)が知られており、その発現機序としては、エストロジェン様作用物質の生殖器官への直接作用ではなく中枢神経系を介した作用である事が示唆されている<sup>1) 2)</sup>。一方、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。即ち、周産期にアンドロジェンあるいはエストロジェ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ジェンを投与されたSDN-POAの容積が減少する。さらに、SDN-POAは成熟ラットではアドレナリン作動性神経支配を受けており、新生児期の雌に $\alpha$ 受容体作動薬を投与すると血中のLH濃度が増加し、これに伴ってlordosis(脊柱前湾)反応が増加するが、 $\beta$ 受容体作動薬を投与すると、LHの血中濃度が減少しlordosis反応が低下する<sup>3)</sup>。さらに、ラットではストレスや新規刺激に反応し記憶として定着させるのに関与していると考えられている中脳の青斑核は、雄より雌の方がより大きな容積を有しており、その生理機能が注目されている。青斑核におけるこれらの性差は、ビスフェノールAあるいはDES投与によって逆転することも明らかにされているが<sup>4)</sup>、その生理学的な意義については十分に解明されていない。

一方われわれは、エストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )陽性細胞が、雄に比較すると雌の視床下部内側視索前核から前腹側室周囲核にかけてより多数存在することを見出しており、このことが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であると考えられる。さらに、雄に比較すると雌ではこの部においてER $\alpha$ 陽性細胞が消失せずに長期間保持されていること明らかにし、加えて、生後1日から5日間エストロゲン活性を有するEE, DES, OPを1日1回連続皮下投与した結果、性成熟後に起きる異常性周期の発現に先立って、特に雌の新生児期では視床下部前腹側室周囲核におけるER $\alpha$ 陽性細胞数の持続性の増加が認められることを見出した。しかし現在、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く、特に視床下部前腹側室周囲核の生理機能は十分に解明されていない。

そこで本研究は雌における低用量のエストロゲン様作用物質の遅発効果と中枢神経系の関係を明らかにすることを主な目的とした。

## B. 研究方法

### 1. 新生児期に低用量DESを投与したラットの脳の性分化への影響

#### 1.1 供試動物

CrI:CD(SD)ラット (SPF)

2007年9月26日に妊娠15日の雌12匹を購入した。妊娠動物は全例自然分娩させ、分娩終了を確認した日を生後0日とした。得られた新生児を各群に振り分けた。

### 1.2 投与物質

Diethylstilbestrol(DES: MPBiomedicals)

媒体: 10vol% Dimethyl Sulfoxide (DMSO)を含むコーンオイル

### 1.3 試験群の構成および投与量

Sprague - Dawley系の妊娠ラット (CrI:CD:SD) 12匹を購入し、自然分娩させて得られた新生児を、Table 1に示すように雌雄それぞれ一群雄12匹、雌15匹からなる4群に分け、雌雄ともに第1群は溶媒対照群として10%のDMSOを含むコーンオイルを、第2群、第3群および第4群には、上記溶媒に溶解したDESをそれぞれ0.2, 2.0あるいは20ng/kgの割合で、生後1日(分娩終了を確認した日を生後0日とした)から5日間1日1回皮下投与した。その後投与を中止して生後6日目(投与終了翌日)、10日目(投与終了5日後)、21日目(投与終了16日後)に各群から雌雄各4匹を選出して剖検し、脳の形態学的観察に供した。さらに、各群残りの雌3匹を通常の飼育条件下で育成させ、後述のように性成熟の指標として膣開口までの日数を記録し、その後性周期を確認した。

### 1.4 投与方法および投与日

投与物質をDMSOに溶解し、DMSOの容量が10%となるようにコーンオイルで希釈した。

投与期間は生後1日から生後5日までとし、毎日1回、午前中に分娩が終了した母動物から得られた出生児には午前中に、午後4時まで分娩が終了した母動物から得られた出生児には午後に投与した。投与量は10 mL/kgとし、生後1日の体重値を基に算出した。

## 1.5 観察、測定および検査

### 1.5.1 一般状態および体重測定

一般状態は、1日1回観察し、5日間の投与期間中は投与前および投与後に1日2回観察した。体重は、全ての出生児について出生翌日の生後1日に測定し、さらに、脳の形態学的観察に供した動物については、それぞれ生後6日、生後10日および生後21日の剖検日に測定した。また、後述の性成熟確認のため育成させた各群の雌3匹については、6週齢時から週1回および膣開口確認日に体重を測定した。

### 1.5.2 性成熟の確認

育成させた各群3匹の雌については、離乳後から膣開口が確認されるまで1日1回観察し、膣開口日翌日から膣スメア法により性周期を確認・記録した。

### 1.5.3 脳の形態学的観察

生後6日(最終投与24時間後)、生後10日、生後21日に安楽死させ剖検した。各動物から脳を採材し、ホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核、内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋後、連続切片作製をして、HE染色および免疫組織化学的に、ER $\alpha$ 染色、TUNEL染色を施した。なお、現在、各標本を病理組織学的に観察し、ER $\alpha$ およびTUNEL陽性細胞数を計測中である。

## 2. 妊娠期・授乳期に少量のDESを投与され、遅発性性周期異常が観察されたラットの脳性分化への影響

国立医薬品食品衛生研究所からDESの性成熟に及ぼす遅発性効果を明らかにする目的で委嘱された実験、即ちSprague-Dawley系ラットCrj:CD(IGS)を

用いて妊娠中にDES 2あるいは20 ng/kgを投与された母動物から出生し、長期飼育された雌動物の観察において、性周期に遅発性影響の認められた動物から脳組織を採取し、ホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核、内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋後、連続切片作製をして、HE染色および免疫組織化学的手法によるER $\alpha$ 染色を施した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育および取り扱いに際しては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」および「財団法人食品農医薬品安全性評価センター 動物実験に関する指針」に従い、適正に使用した。

## C. 研究結果

### 1.1. 死亡、一般状態および体重変化

Table 2 に示すように、DESの0.2 ng/kg群で、雌1例が生後4日に死亡した。性周期観察中の育成例を含めその他の生存例では、一般状態の異常は認められておらず、また、体重にも溶媒対照群と比較した有意な差は認められなかった。

### 1.2. 性成熟

Table 3 に示すように、膣開口完了時期に溶媒対照群とDES投与群との間に明確な違いはなく、膣開口完了時の体重にも有意な差は認められなかった。

また、生後20週例に達した時点では、各群の動物の性周期に異常は認められなかった。

### 1.3. 性周期能の形態学的変化

現在、新生児期剖検例および妊娠期・授乳

期例について、脳、特に視床下部を中心に病理形態学的観察および形態計測を実施中であるが、現時点において明確な形態学的変化は認められていない。

#### D 考察

われわれは、これまでに生後 1 日から 5 日間 エストロジェン活性を有する EE, DES, OP を 1 日 1 回連続皮下投与した結果、性成熟後に起きる異常性周期の発現に先立って、特に雌の新生児期では視床下部前腹側室周囲核における ER $\alpha$  陽性細胞数の持続性の増加が認められることを見出し、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ジェン様作用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特に性周期の異常が現れるいわゆる遅発効果 (delayed effect) の発現に重要な意味を持つ可能性を指摘してきた。

今回は、生理的条件に近い低用量のエストロジェン投与による性成熟ならびに脳、特に視床下部の性分化に及ぼす影響を明らかにする目的で、新生児期に少量(0.2-20ng/kg)の DES を投与された雌雄ラットの 前腹側室周囲核における ER $\alpha$  陽性細胞数を形態計測するとともに、妊娠期・授乳期に DES を投与され、遅発性性周期異常が観察された雌ラットの 前腹側室周囲核における ER $\alpha$  陽性細胞数を形態計測し、その推移を明らかにする実験を開始した。現在、動物への DES 投与を終了し、新生児期に経時的に脳組織の採取を終え、形態学的観察を実施中で、一部の動物については性成熟後の性周期の変化についても経過観察中であるが、新生児期に低用量のエスト

ロジェンを投与された動物の体重、一般状態には著変はなく、性成熟完了時期あるいは性周期に対する影響も観察されていない。これと並行して、国立医薬品食品衛生研究所から委嘱されて DES の性成熟に及ぼす遅発性効果を明らかにする目的で実施した実験では、妊娠期に DES 2あるいは 20 ng/kg を投与された母動物から出生した雌動物の経過観察中に生後 7 ヶ月齢の時点で一部の動物に性周期の異常が観察されている。

今回の新生児期投与実験では、20 週即ち約 4 ヶ月半を経過した時点では性周期に異常は観察されていないが、さらに観察を継続するとともに、視床下部における ER $\alpha$  陽性細胞数を形態計測が完了した時点で低用量のエストロジェンの脳における性分化への影響とエストロジェン作用物質の遅発効果との関連を考察したい。

#### E. 結論

今回生理的条件に近い低用量のエストロジェン投与による性成熟ならびに脳、特に視床下部の性分化に及ぼす影響を明らかにする目的で、新生児期に少量(0.2-20ng/kg)の DES を投与された雌雄ラットの脳を経時的に採取し、視床下部前腹側室周囲核を主体に ER $\alpha$  陽性細胞数を形態計測し、その推移を明らかにする実験を開始した。現在、動物への DES 投与を終了し、新生児期の脳組織の採取を終え、形態学的観察を実施中で、一部の動物については性成熟後の性周期の変化についても経過観察中であるが、新生児期に低用量のエストロジェンを投与された動物の体重、一般状態には著変はなく、性成熟完了時期あるいは性周期に対する影響も観察されていない。