

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-影響曲線と PTU 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。)(対照群 6 匹、低用量群及び中用量群は 1 群 8 匹、高用量群は 7 匹)

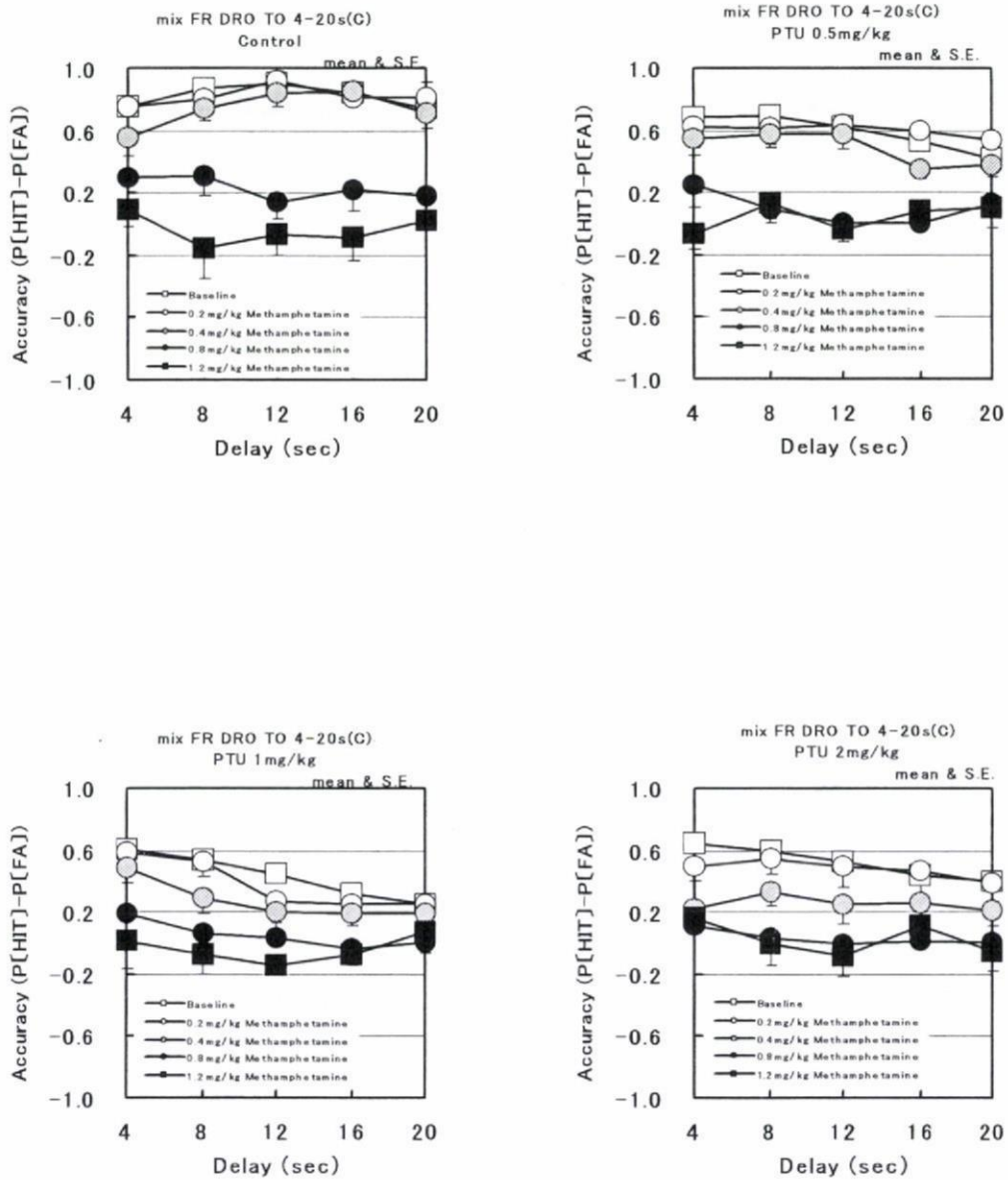


Fig. 16 ラットの Delay-Accuracy 曲線に及びす methamphetamine 負荷と PTU の影響 (対照群 6 匹、低用量群及び中用量群は 1 群 8 匹、高用量群は 7 匹)

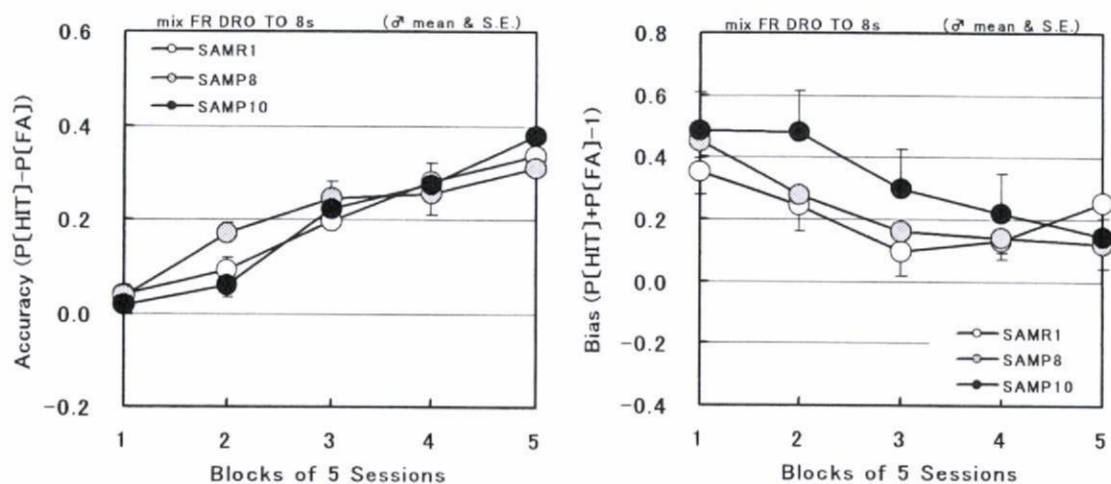


Fig. 17 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 8 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化(20 週齢～24 週齢時)

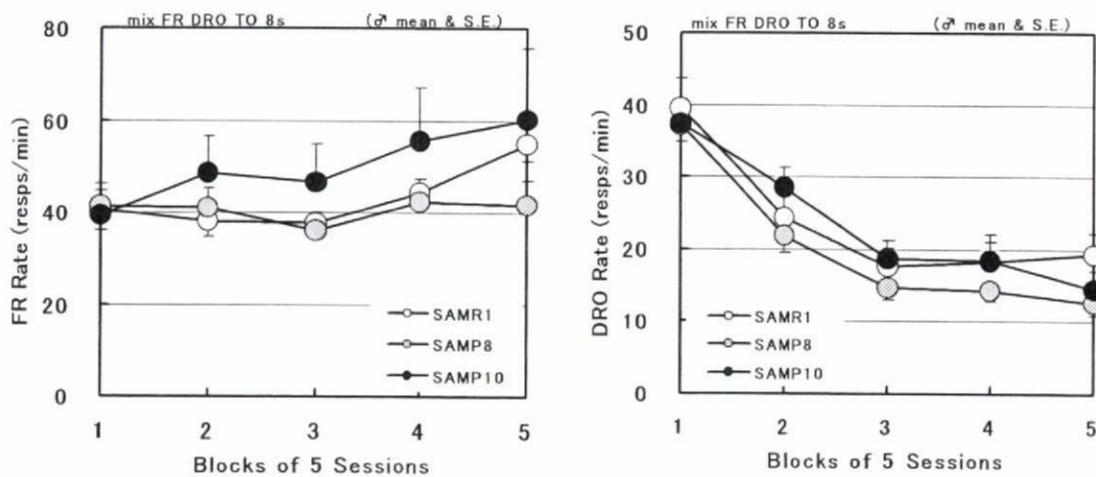


Fig. 18 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 1 段階(固定長タイムアウト 8 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化(20 週齢～24 週齢時)

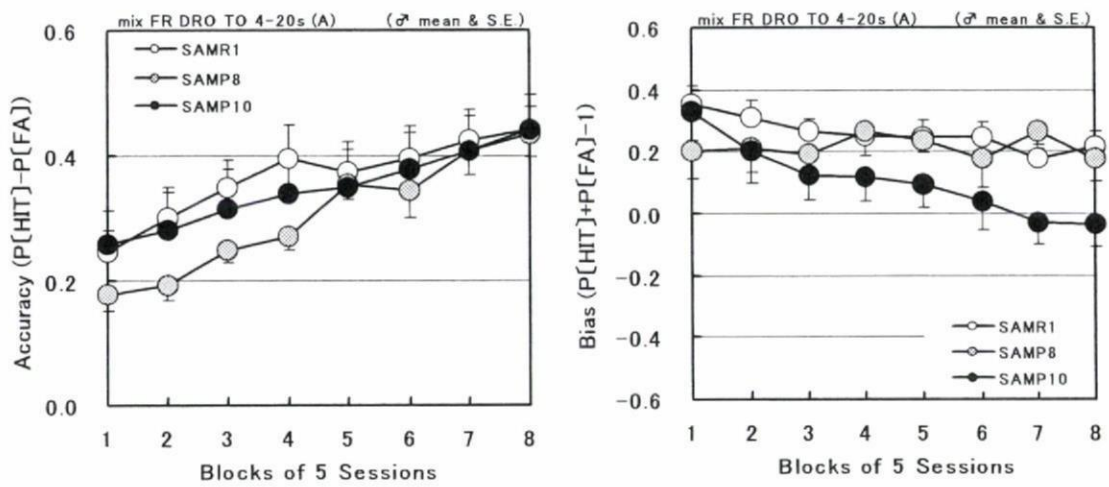


Fig. 19 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 2 段階(変動タイムアウト上昇系列 4-20 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化(25 週齢~32 週齢時)

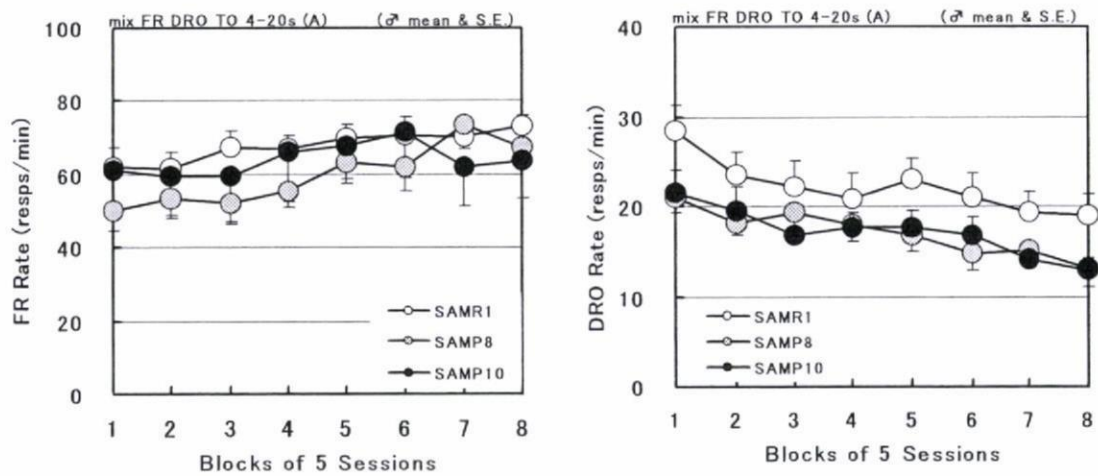


Fig. 20 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 2 段階(変動タイムアウト上昇系列 4-20 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化(25 週齢~32 週齢時)

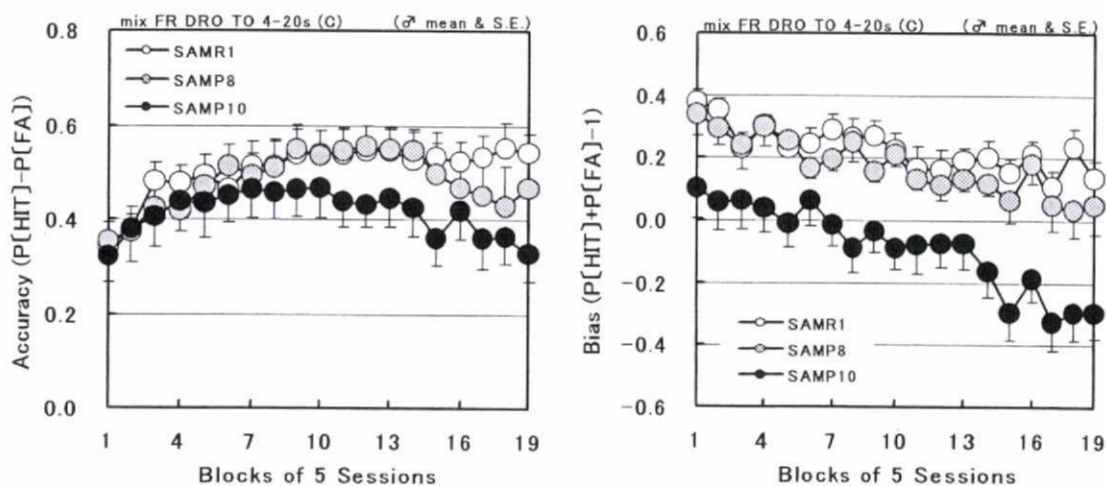


Fig. 21 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 3 段階(変動タイムアウト上下系列 4-20 秒)における Accuracy(左)及び Bias(右)の変化(33 週齢~51 週齢時)

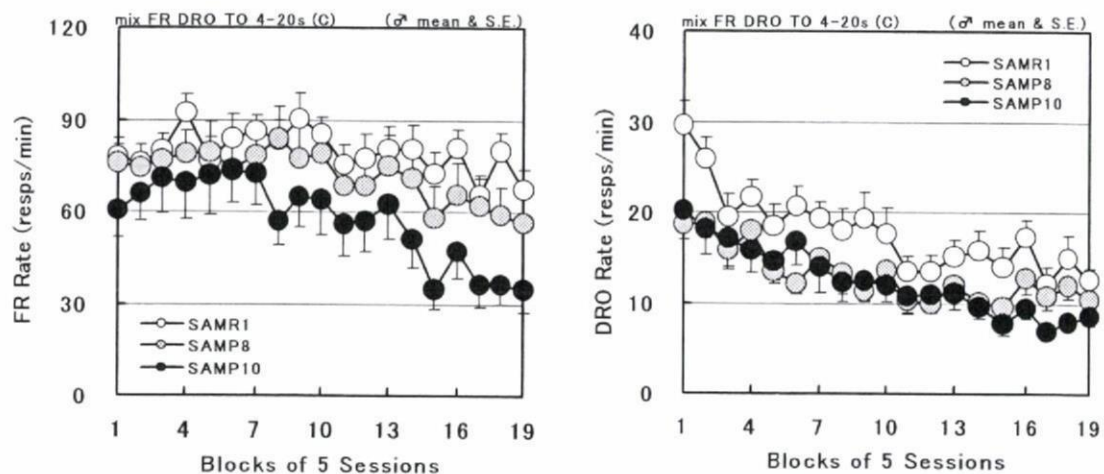


Fig. 22 SAMP マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュールでの訓練第 3 段階(変動タイムアウト上下系列 4-20 秒)における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右)の変化(33 週齢~51 週齢時)



Table 1. ラットの SCOB 訓練過程の統計検定結果

訓練過程	指標	Day/ Session/ Block	グループ (PTU)	交互作用	グループ (PTU) Dunnett (5%)
体重 (投与期)	kg	***	***	***	L, M, H
体重 (授乳期)	kg	***	***	***	L, M, H
Auto-shaping	Resp. rate	***	n.s.	n.s.	(H)
FR2-FR10	Resp. rate	***	n.s.	*	(L, M, H)
Mix FR DRO TO 4sec	FR rate	***	n.s.	n.s.	
	DRO rate	***	**	n.s.	L, M, H
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	(L, H)
	Bias	***	n.s.	n.s.	
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	***	n.s.	n.s.	(L, M, H)
	DRO rate	n.s.	**	n.s.	L, M, H
	Accuracy	*	**	n.s.	L, M, H
	Bias	***	n.s.	n.s.	(M, H)
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	**	n.s.	n.s.	
	DRO rate	n.s.	***	n.s.	L, M, H
	Accuracy	***	***	n.s.	L, M, H
	Bias	n.s.	n.s.	n.s.	(L, M, H)

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

L: 0.5 mg/kg/day 群、M: 1.0 mg/kg/day 群、H: 2.0 mg/kg/day 群

Dunnett 検定で対照群との差が有意となった群を右端の列に示した。主効果(グループ)が有意でない場合は括弧付とした。(対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

Table 2. Delay-Accuracy 曲線、Delay-Bias 曲線に関する統計検定結果

測定時期 (第3段階)	指標	遅延 (TO)	グループ (PTU)	交互 作用	グループ (PTU) Dunnett (5%)
Week 1	Accuracy	***	*	n.s.	L, M, H
	Bias	***	n.s.	n.s.	(M, H)
Week 2	Accuracy	***	***	n.s.	L, M, H
	Bias	***	n.s.	n.s.	(M, H)
Week 3	Accuracy	***	***	n.s.	L, M, H
	Bias	***	n.s.	n.s.	(M, H)
Week 4	Accuracy	***	***	n.s.	L, M, H
	Bias	***	**	n.s.	L, M, H
Week 5	Accuracy	***	***	n.s.	L, M, H
	Bias	***	n.s.	n.s.	(L, M, H)

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

L: 0.5 mg/kg/day 群、M: 1.0 mg/kg/day 群、H: 2.0 mg/kg/day 群

Dunnett 検定で対照群との差が有意となった群を右端の列に示した。主効果(グループ)が有意でない場合は括弧付とした。交互作用は有意でないため、PTU(対照群 6 匹、他は 1 群 8 匹)

Table 3. 薬理的負荷試験の統計検定結果

負荷薬物	指標	負荷薬 用量	グループ (PTU)	交互 作用	グループ (PTU) Dunnett (5%)
Methamphetamine	FR rate	***	n.s.	n.s.	
	DRO rate	***	***	***	L, M, H
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	(M)
	Bias	***	n.s.	n.s.	
(−) Quinpirole	FR rate	***	n.s.	n.s.	(H)
	DRO rate	n.s.	n.s.	n.s.	(L, M, H)
	Accuracy	***	*	n.s.	M, H
	Bias	n.s.	n.s.	n.s.	(L, H)
(±) SKF38393	FR rate	***	n.s.	n.s.	(L, H)
	DRO rate	n.s.	n.s.	n.s.	(L, M, H)
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	
	Bias	***	n.s.	n.s.	(M)

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

L: 0.5 mg/kg/day 群、M: 1.0 mg/kg/day 群、H: 2.0 mg/kg/day 群

Dunnett 検定で対照群との差が有意となった群を右端の列に示した。主効果(グループ)が有意でない場合は括弧付とした。薬理的負荷試験の検定では、溶媒投与をベースラインとして負荷薬物各用量で得られた指標値を変換したデータを使用しており、負荷薬物用量の効果は溶媒投与を除いて計算した。(対照群 6 匹、低用量群及び中用量群は 1 群 8 匹、高用量群は 7 匹)



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、ラットの新生児に生後 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発情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、経胎盤的に少量(0.2~20ng/kg)の DES に暴露された雌ラットの脳および下垂体を生後 29 週齢目及び 49 週齢目に病理形態学的に観察した。その結果、持続的に発情周期の異常が観察された例では、下垂体前葉において I 型細胞の減少、I 型細胞、II 型細胞ともに ER $\alpha$  および FSH の染色性が減少していることが明らかにされた。一方、DES 投与群で一過性に発情周期の異常が認められ、剖検時には正常の発情周期に復した動物においては、下垂体に持続性の発情周期の異常が観察された例に認められた形態学的変化は認められなかった。これらのことから、今回下垂体に観察された変化は、回復性の変化である可能性が高く、したがって発情周期の異常は下垂体に原因があるのではなく上位の制御機構の変調に起因した変化であることが明らかになった。なお、対照群および DES 投与群の視床下部前腹側室周囲核に変化はなく、両群の間で ER $\alpha$  陽性細胞にも差は認められなかった。

### 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 Estradio(E)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、特に発情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。これまでにわれわれはこの点に着目して、エストロジェン様作用物質の遅発効果と雌の視床下部前腹側室周囲核の変化との関連を明らかにする目的で研究を実施し、以下の成績を得ている。すなわち、エストロジェン受容体 $\alpha$ (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し、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、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発情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。一方、昨年度は雌雄ラットの新生児期に少量(0.2~20ng/kg)の DES を投与した結果、体重、一般状態には著変はなく、性成熟完了時期においても DES 投与

の影響はなく，発情周期に対する明らかな影響も観察されなかった。

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をより詳細に検討する目的で，経胎盤的に低用量の DES (0.2, 2.0 あるいは 20ng/kg) を投与した雌ラットの下垂体の変化，とくに FSH 産生細胞，prolactin 産生細胞への影響を病理形態学的手法を用いて検討した。

## B. 研究方法

下垂体の病理組織学的検査対象とした動物は，昨年度実施した経胎盤的に低用量の DES を暴露したのち，性成熟あるいは発情周期の変化を生後 29 週間に亘り観察した雌動物から選出した。群構成および発情周期の変化を表 1 に示した。すなわち，Sprague-Dawley 系ラット CrI: CD(SD) を用いて妊娠中に DES 0.2, 2.0 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，発情周期に遅発性効果の認められた動物から下垂体および脳組織を採取し，ホルマリン固定後，下垂体は前葉，中間葉，後葉を含む全組織を，脳に関しては主に視床下部(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，いずれも HE 染色をしたほか，免疫組織化学的手法により ER $\alpha$  を染色し，さらに下垂体には FSH および prolactin (PRL) 染色を施した。免疫組織化学的染色に使用した主な試薬は以下の通りである。

FSH:

- ・抗原賦活化: プレッシャークッカー 125°C 5min.
- ・1次抗体: Rabbit anti-rat FSH

polyclonal antibody

(AbD serotec 社 4561-7359)

dilution : 1/100

- ・洗浄: TBST
- ・ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
- ・発色: DAB Reagent Set (KPL 社)

PRL:

- ・抗原賦活化: なし
- ・1次抗体: Rabbit anti-rat PROLACTIN

polyclonal antibody

(AbD serotec 社 7770-5004G)

dilution : 1/100

- ・洗浄: TBST
- ・ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
- ・発色: DAB Reagent Set (KPL 社)

ER  $\alpha$  :

- ・抗原賦活化: プレッシャークッカー 125°C 5 min. (下垂体)

あるいはマイクロウェーブ

90°C 10 min. × 2 回 (視床下部)

- ・1次抗体: Mouse anti-estrogen receptor monoclonal antibody

(NOVOCASTRA 社 NCL-ER-6F11)

dilution : 1/80

- ・洗浄: TBST
- ・下垂体: ダコ EnVision™+ Dual Link (Dako 社) 使用
- 視床下部: ダコ LSAB2 System-HRP (Dako 社) 使用
- ・発色: DAB Reagent Set (KPL 社)

(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

対照群および DES 投与群の視床下部前腹側周囲核に変化はなく、両群の間で ER $\alpha$  陽性細胞にも差は認められなかった。また、発情周期に異常の認められた例と正常な発情周期を回帰した例の間にも ER $\alpha$  陽性細胞の分布に差は認められなかった。

一方、ラットの下垂体では、HE 染色により性腺刺激ホルモン産生細胞である前葉の好塩基細胞は、大型で円形の核が偏在し、一部には豊富な細胞質の中に周囲にハローを有する封入体構造を有する細胞（I 型細胞）と、円形の核が細胞質の中心に位置し卵円形でやや小型の細胞（II 型細胞）の 2 型が識別されている。I 型細胞では細胞質内には FSH 陽性の微細な顆粒が高密度で彌慢性に観察され、II 型細胞では、細胞質内には FSH 染色陽性の微細顆粒が散在性に分布していた。発情周期の変化に伴って、I 型細胞と II 型細胞の比率に変化が見られ、発情休止期あるいは発情後期に比較すると発情前期から発情期では I 型細胞が減少し、より多くの II 型細胞が観察された。ER $\alpha$  は I 型細胞、II 型細胞の細胞核に陽性を示したが、発情後期から発情休止期では I 型細胞、II 型細胞とも核が ER $\alpha$  に強陽性に染色された細胞が散見され、発情前期から発情期にかけては核が ER $\alpha$  に強陽性に染色される細胞は観察されなかった（図 1）。

DES を経胎盤投与された群で発情周期が正常に回帰していた動物の下垂体においては、対照群と比較して病理形態学的に差は認めら

れなかったが、持続発情あるいは発情休止が持続していた例では、HE 染色で I 型細胞の減少が観察され、これに伴って、I 型細胞と II 型細胞の中間型と考えられる、やや大型で好塩基性に染まる細胞質の一部に好酸性染色領域を有する卵円形ないし多型性細胞の増加が認められた。これとともに I 型細胞、II 型細胞ともに ER $\alpha$  および FSH 染色性が低下した（図 2, 3）。なお、観察期間途中で一時的に発情周期の乱れを生じたが、剖検時には正常の発情周期が観察された例では、下垂体に病理形態学的変化は認められなかった（図 4）。なお、各例いずれにも下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞に変性・壊死などの退行性変化は認められなかった。

さらに、今回の観察では DES 投与群と対照群の間に PRL 陽性細胞に差はなく、持続性の発情周期の異常が認められた例においても PRL 細胞に変化は認められなかった。

### D. 考察

われわれはこれまでに、ラットの新生児に生後 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発情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ゲ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発情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ゲ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、経胎盤的に少量(0.2-20ng/kg)のDESを投与された雌ラットの前腹側室周囲核におけるER $\alpha$ 陽性細胞を形態学的に観察するとともに、下垂体前葉の性腺刺激ホルモン産生細胞を通常のHE染色に加えて、ER $\alpha$ 、FSHおよびPRLを免疫組織学的手法で染色して観察した。その結果、持続的に発情周期の乱れが観察された例では、下垂体前葉のI型細胞の減少とともに、I型細胞、II型細胞ともにER $\alpha$ 、FSHの染色性が減少していることが明らかにされた(表1)。電子顕微鏡によるラットの下垂体前葉の観察では、性腺刺激ホルモン産生細胞内にLHに富む直径約150nmの小顆粒とFSHを多く含む直径約500nmの大顆粒が混在することから、FSHとLHが同一細胞により産生されることが明らかにされており、特にI型細胞に多くのFSHが含まれていると考えられている。今回持続性の発情周期の異常が観察された動物では特にI型細胞の減少が認められており、同時にER $\alpha$ も減少していることから、これらの動物ではエストロゲンに対する反応性の低下とFSHサージの消失によりネガティブフィードバック機構が障害され、持続的な発情周期の異常を来したものと考えられた。さらに、DES投与群で、一過性に発情周期の異常が認められたが、剖検時に発情周期が正常に復した動物においては、下垂体に持続性の発情周期の異常が観察された例に観察された形態学的変化が認められなかったことから、今回持続的な発情周期の異常を来した例に観察された下垂体の変化は、回復性の変化と考えられた。さらに、性腺刺激ホルモン産生細胞に

変性・壊死などの退行性変化も認められなかったことから、発情周期の異常は下垂体に原因があるのではなく上位の制御機構の変調に起因した変化であることが示唆された。一方、吉田らは遅発性の発情周期異常が観察された雌ラットの卵巣を正常発情が観察されているラットに移植すると正常な卵巣機能が観察されることから、遅発性の発情周期異常は、視床下部-下垂体-性腺系の上位に原因があると考察しており、今回の下垂体に観察された変化も視床下部から下垂体に至る制御機構に何らかの異常が生じた可能性が高いと考えられる。

なお、今回観察した視床下部前腹側室周囲核におけるER $\alpha$ 陽性細胞には変化が観察されなかったことから、今後遅発性の発情周期異常の発現機序を明らかにするために、視床下部から下垂体に至るホルモン産生に及ぼす制御機構の詳細な検討が望まれる。

## E. 結論

今回生理的条件に近い低用量のエストロゲン投与による遅発性影響を目的で、経胎盤的に少量(0.2-20ng/kg)のDESに暴露された雌ラットの脳および下垂体を生後29週齢目及び49週齢目に病理形態学的に観察した。その結果、持続的に発情周期の乱れが観察された例では、下垂体前葉においてI型細胞の減少、I型細胞、II型細胞ともにER $\alpha$ 、FSHの染色性がともに減少していることが明らかにされた。一方、DES投与群で一過性に発情周期の異常が認められた動物においては、下垂体に持続性の発情周期の異常が観察された例に認められたような形態拍的变化は認められなかった。これらのことから、今回下垂体に観察された変化は、回復性の変化である可



能性が高く、したがって発情周期の異常は下垂体に原因があるのではなく上位の制御機構の変調に起因した変化であることが示唆された。

**F. 健康危険情報**

なし

**G. 研究発表**

なし

**H. 知的財産所有権の出願・登録状況**

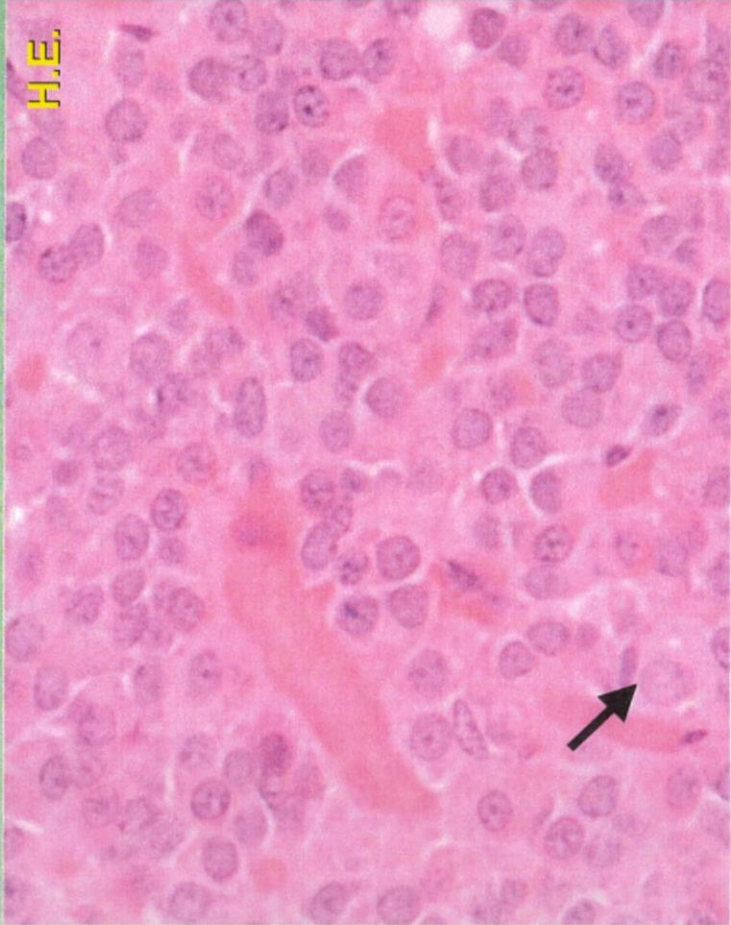
なし

**参考文献** 1) K.Sawaki et al. (2003) *In Utero* through Lactational Exposure to Ethinyl Estradiol Induces Cleft Phallus and Delayed

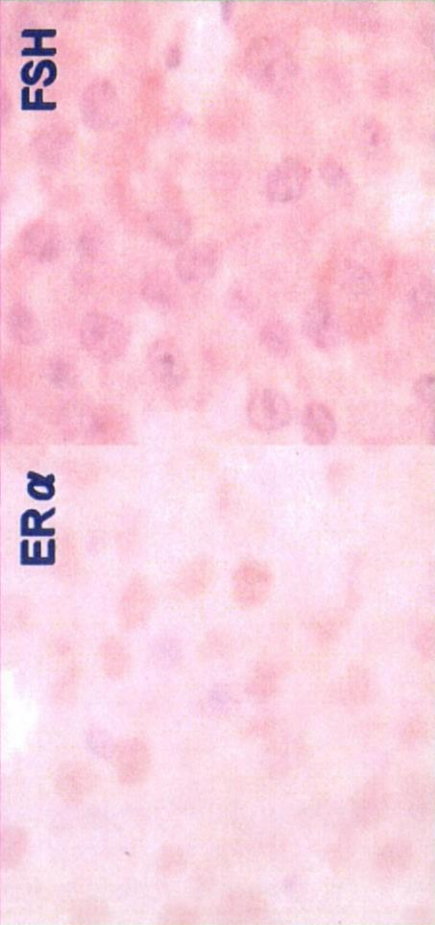
Ovarian Dysfunction in the Offspring. *Toxicol. Sciences* 75, 402-411

- 2) M. Yoshida et al. (2002) Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose *p-t*-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis* 23, 1745-1750
- 3) KD. Doehler et al. (1998) The Influence of Hormones and Hormone Antagonists on Sexual Differentiation of the Brain. *J. Clean Technol., Environ. Toxicol. & Occup. Med.* 7, 195-220
- 4) K.Kubo et al. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci. Lett.* 304, 73-76





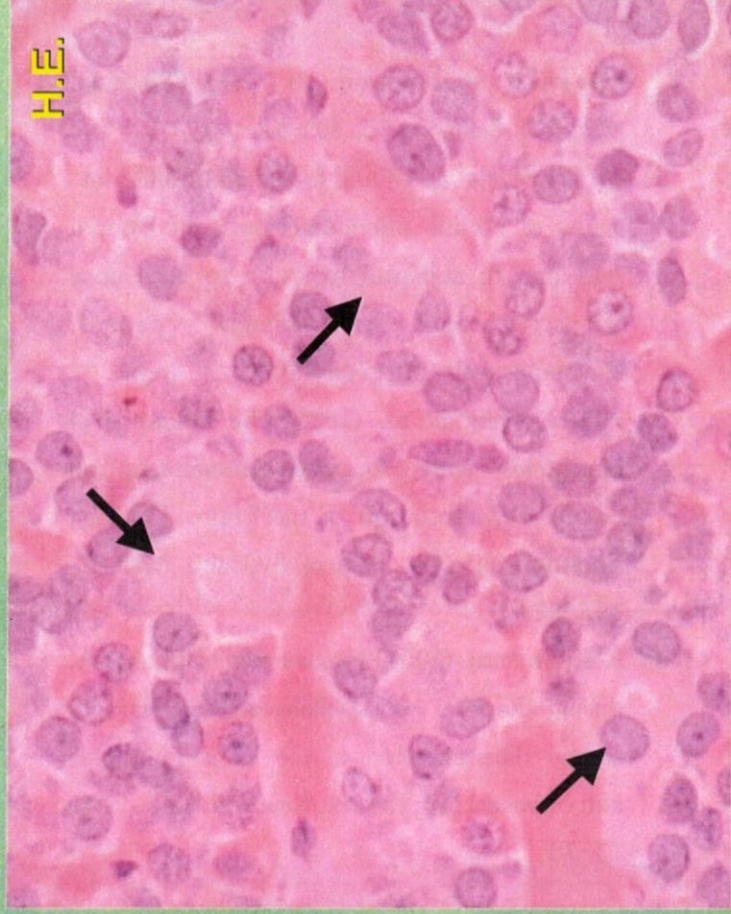
H.E.



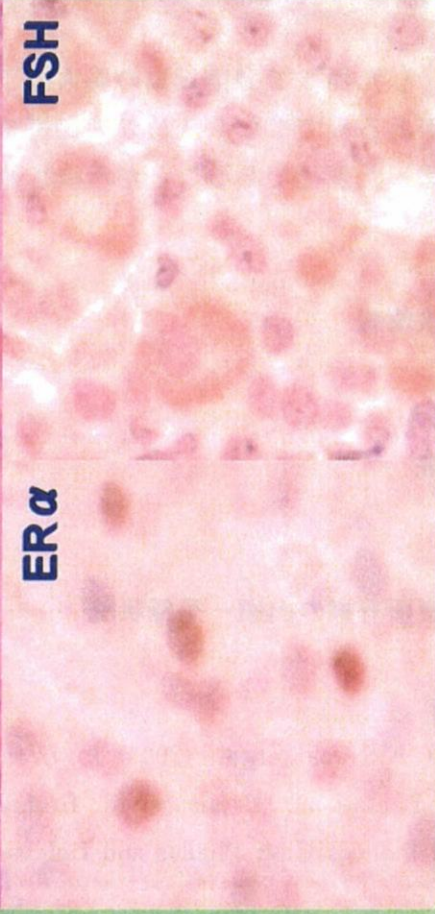
ERα

FSH

Control ( proestrus-estrus )



H.E.



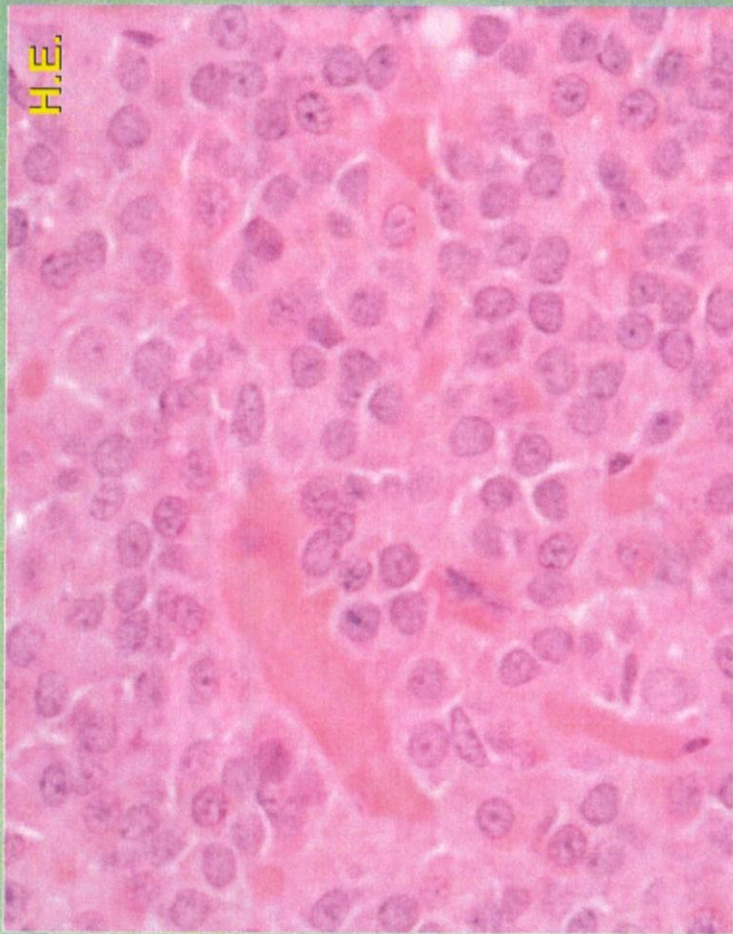
ERα

FSH

Control ( metestrus-diestrus )

图 1

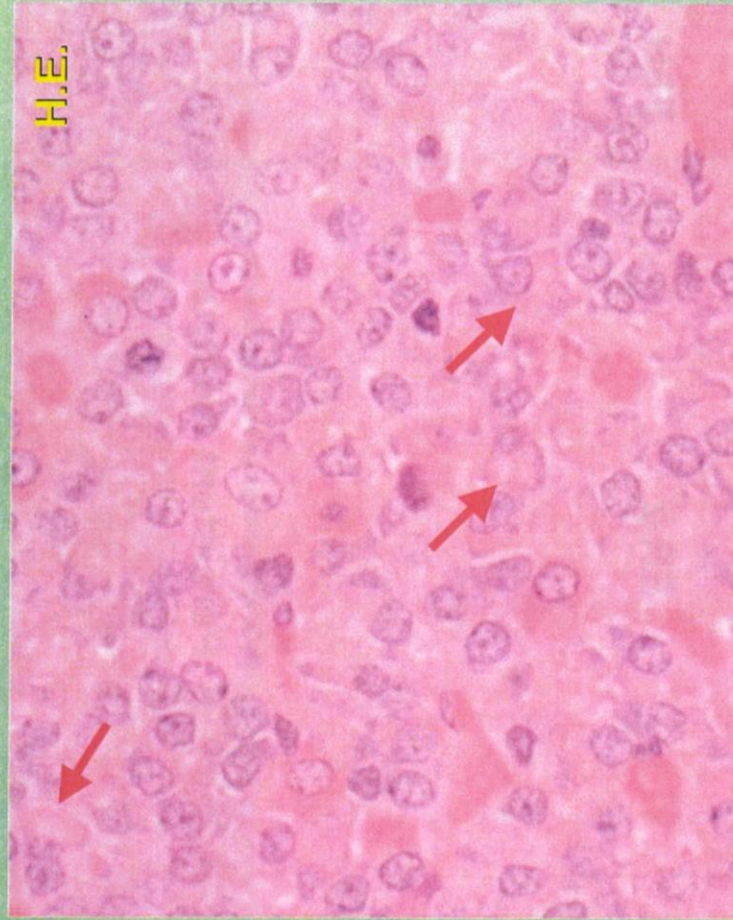




H.E.

ER $\alpha$

FSH



H.E.

ER $\alpha$

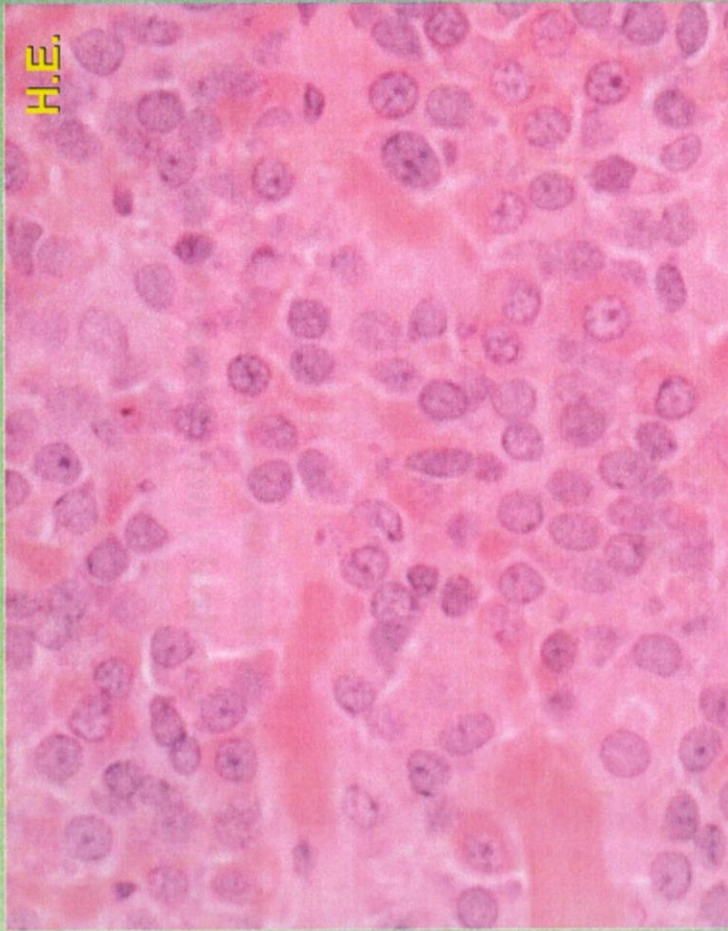
FSH

Control ( proestrus-estrus )

2

Constant estrus

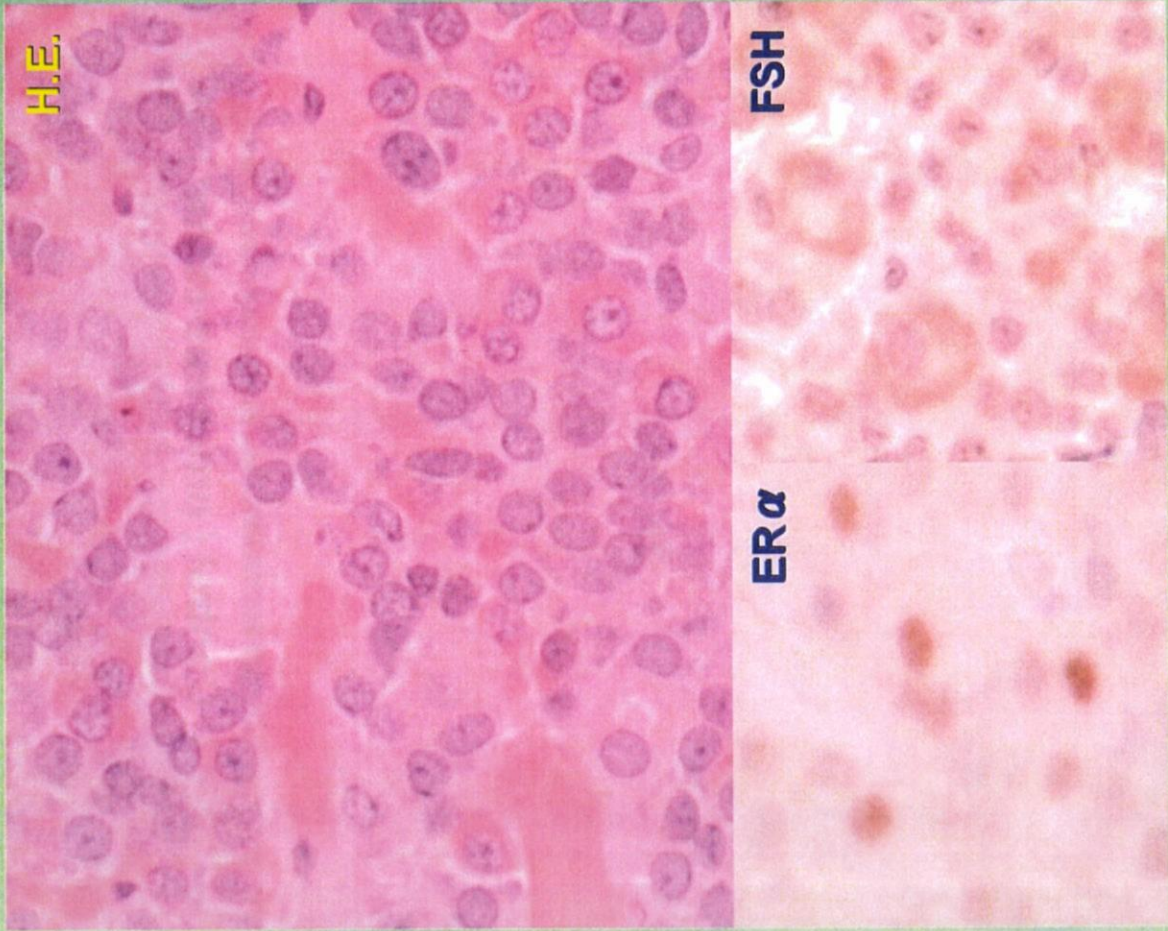




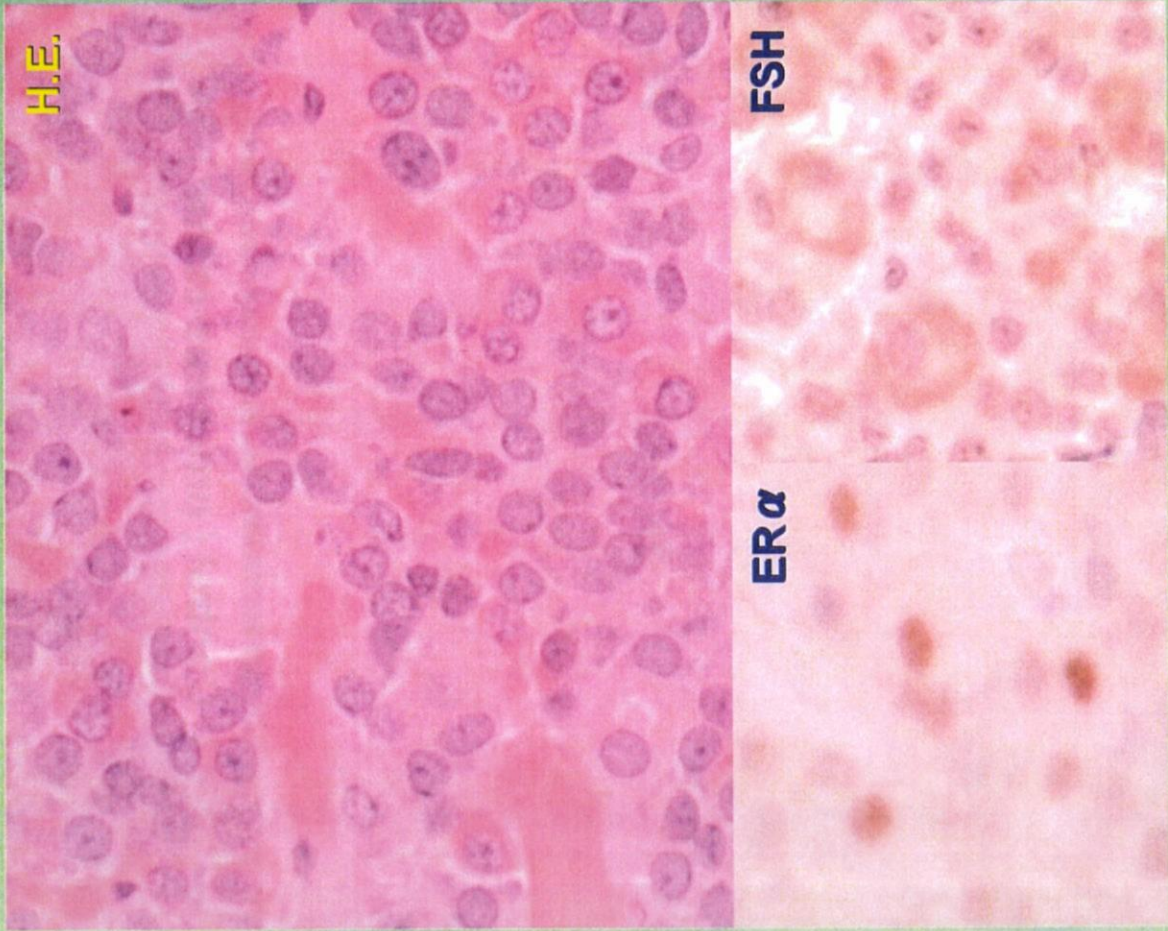
H.E.



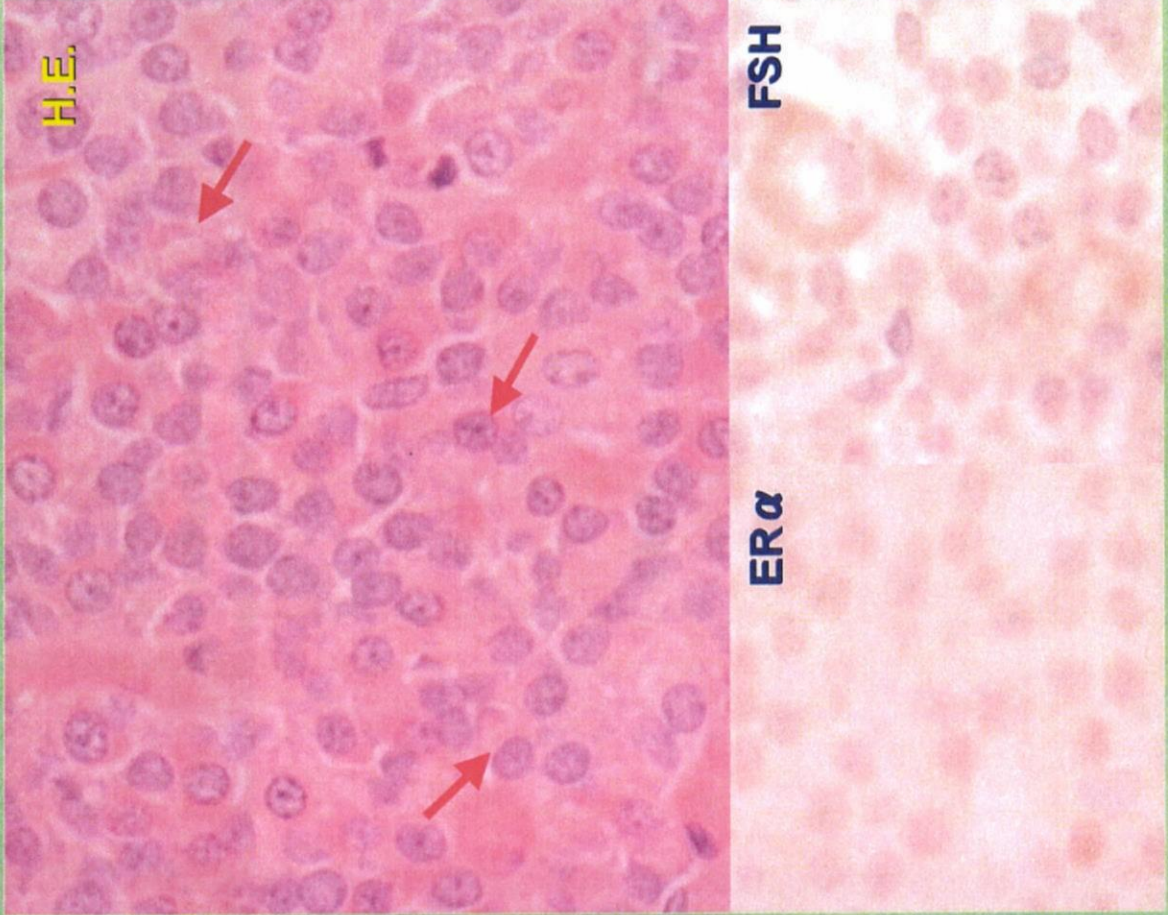
H.E.



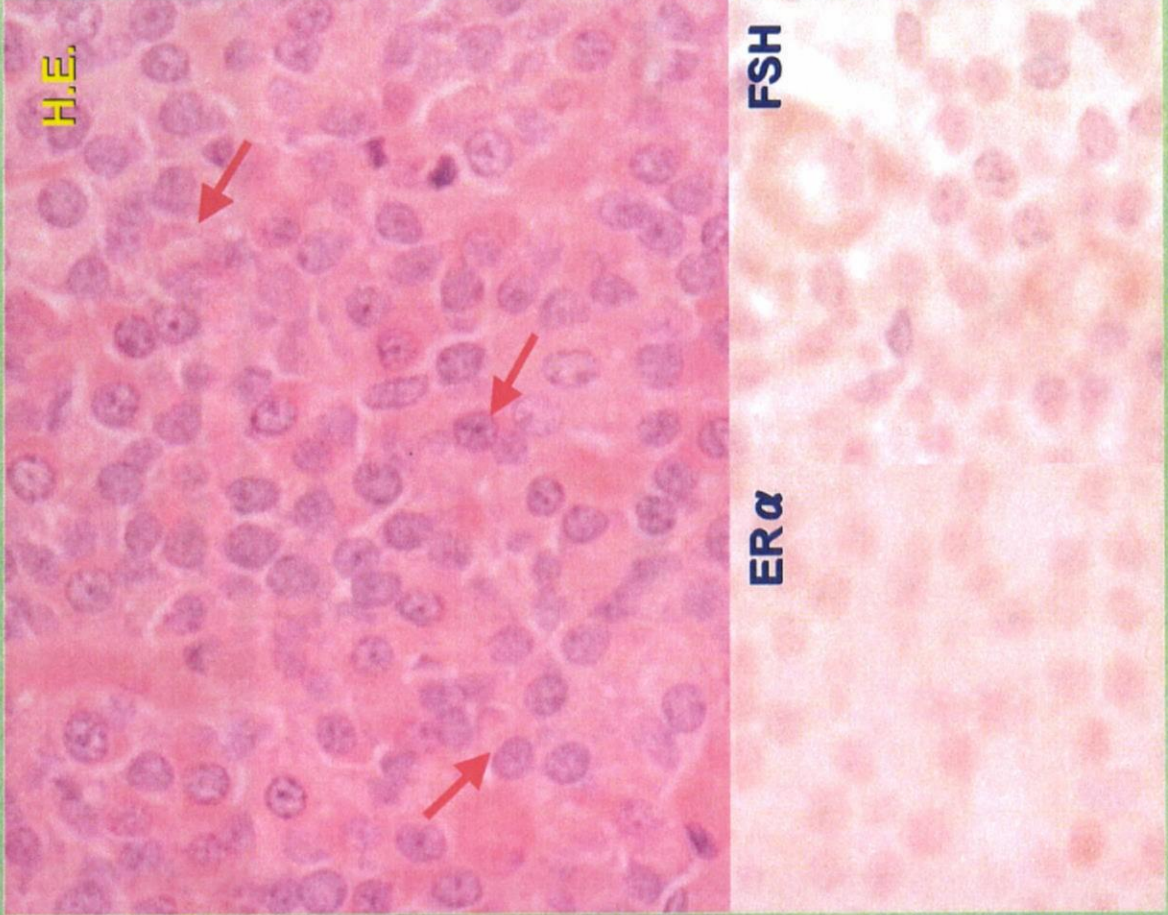
ERα



FSH



ERα



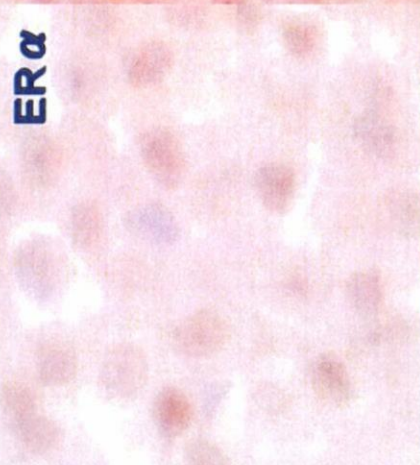
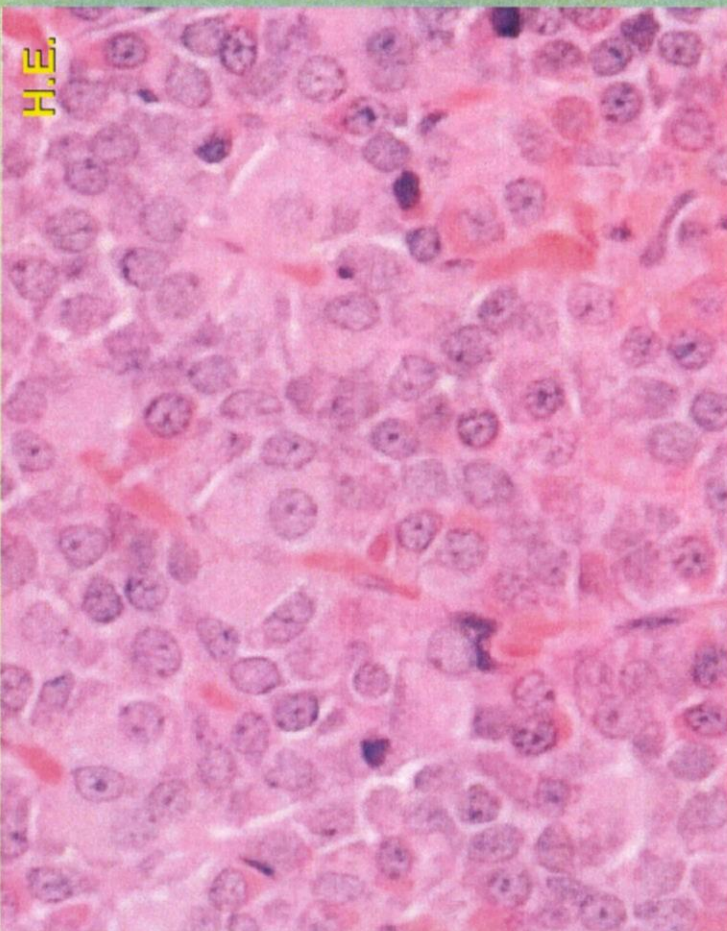
FSH

Control ( metestrus-diestrus )

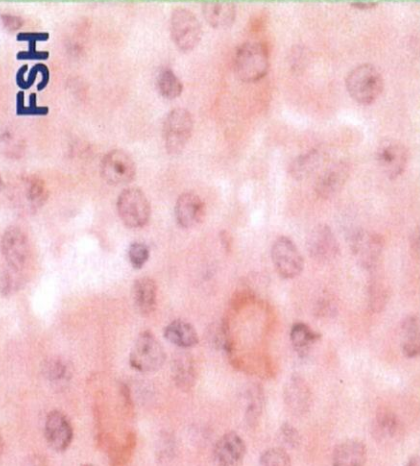
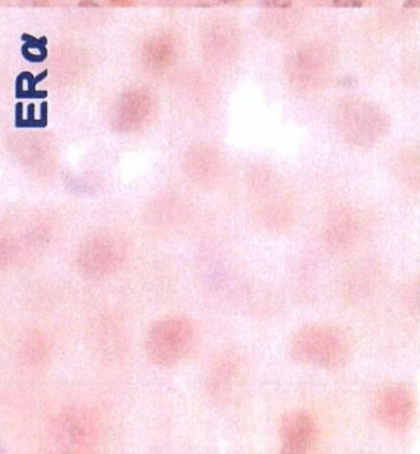
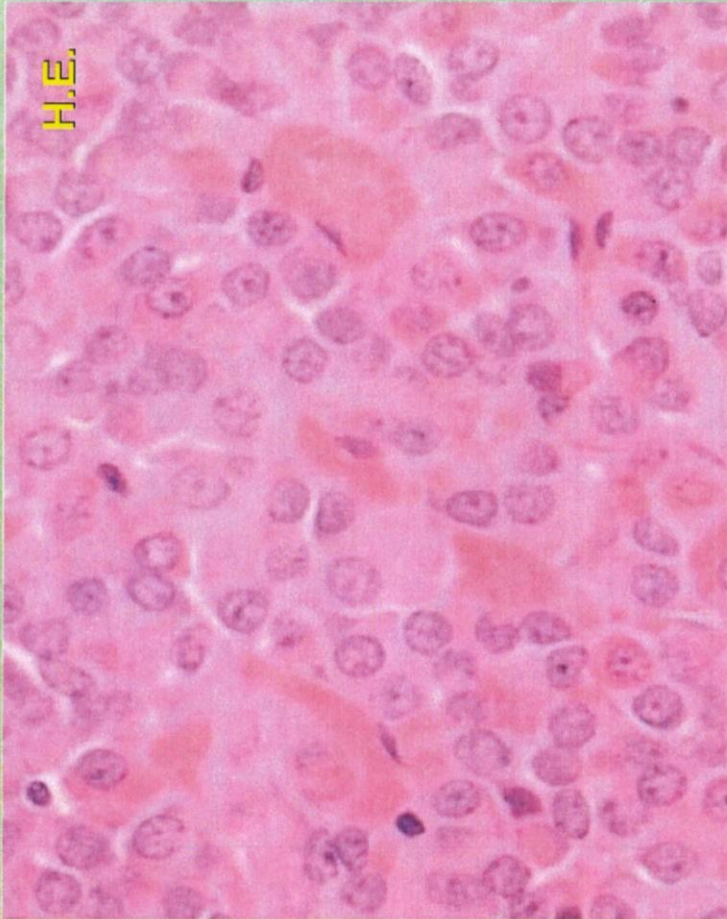
Persistent diestrus

☒ 3





Persistent estrus  
( estrus stage )



Persistent diestrus  
( estrus stage )

4



表 1

7ヶ月齢までに発情周期異常が認められた雌動物

動物番号	親動物DES 投与量	7ヶ月齢までに発情周期異常が認められた雌動物						sacrificed week	Histological findings			
		3M	4M	5M	6M	7M	Decrease, Type I ?		Weak ER?	Weak FSH	Increase, intermediate cell	
2004-3F	0 ng/kg					p.d.	49W	Not examined	-	±	-	-
2006-1F	0 ng/kg				p.d.		29W	Not examined				
2007-3F	0 ng/kg					p.e.	37W	Not examined				
2102-5F	0.2 ng/kg					c.d.	49W	Not examined				
2104-2F	0.2 ng/kg	p.e.					49W	Not examined				
2105-2F	0.2 ng/kg					p.d.	49W	Not examined				
2105-6F	0.2 ng/kg			p.d.			29W	+	+	+	+	+
2106-1F	0.2 ng/kg					p.d.	29W	+	+	+	+	+
2108-2F	0.2 ng/kg				p.e.		29W	+	+	+	+	+
2109-2F	0.2 ng/kg	p.d.					29W	-	-	-	-	-
2109-3F	0.2 ng/kg	p.d.	c.d.		p.d.	c.d.	29W	+	+	±	+	+
2109-5F	0.2 ng/kg	p.d.				p.d.	49W	Not examined				
2109-6F	0.2 ng/kg	p.d.	p.d.				49W	Not examined				
2201-2F	2.0 ng/kg				p.e.		49W	Not examined				
2202-4F	2.0 ng/kg				p.e.	c.e.	29W	+	±	±	+	+
2203-6F	2.0 ng/kg					c.d.	29W	+	-	-	±	+
2203-6F	2.0 ng/kg			c.d.			49W	Not examined				
2204-3F	2.0 ng/kg	c.d.					49W	Not examined				
2204-6F	2.0 ng/kg	c.d.					49W	Not examined				
2205-2F	2.0 ng/kg			p.d.			29W	-	-	-	-	-
2207-1F	2.0 ng/kg					p.d.	49W	Not examined				
2208-2F	2.0 ng/kg				c.d.		49W	Not examined				
2208-3F	2.0 ng/kg				p.e.		29W	+	±	+	+	+
2209-1F	2.0 ng/kg		p.d.			c.d.	49W	Not examined				
2301-6F	20 ng/kg				p.e.		29W	±	-	-	±	+
2302-5F	20 ng/kg						49W	Not examined				
2303-2F	20 ng/kg		p.e.				29W	±	-	-	±	+
2304-2F	20 ng/kg				c.d.		29W	-	-	-	-	-
2306-3F	20 ng/kg		p.d.				49W	Not examined				
2310-3F	20 ng/kg				p.e.		49W	Not examined				

p.d. : persistent diestrus (d : 5-9days)

c.d. : constant diestrus (d : over 10days)

p.e. : persistent estrus (e : 3-7days)

c.e. : constant estrus (e : over 8days)

下垂体の病理組織検査は発情周期異常動物のうち7ヶ月齢剖検動物に対し実施。

\*3ヶ月齢解剖は基本的に発情前期の動物を解剖。

\*7ヶ月齢解剖は最終発情周期観察から5日後,12ヶ月齢解剖は最終発情周期観察から7日後に解剖。



## 2) 免疫

### 5. 周産期化学物質暴露による免疫異常発現メカニズムの解明

研究分担者 林 良夫 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学分野 教授  
研究協力者 石丸直澄 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学分野 准教授

#### 研究要旨

性ホルモンは免疫系に大きな影響を与えることが知られている。また、内分泌かく乱物質に関しても免疫システムに影響を与えることが報告されている。本研究では生体内で女性ホルモンが著しく変動する妊娠期における TCDD の暴露による母体の免疫学的影響及び自己免疫病変の発症との関係をシェーグレン症候群のモデルマウスを用いて検討したところ、妊娠後期に TCDD を投与により唾液腺に局限した炎症性病変が観察された。胸腺組織における自己抗原発現に重要とされる転写因子 Autoimmune regulator (AIRE) の発現が TCDD 投与により低下すること、末梢 T 細胞における T-bet を介した Th1 サイトカインの産生亢進することが妊娠後期に TCDD を投与されたマウスに観察された自己免疫性病変の発症に関与している可能性が示された。

#### A. 研究目的

シェーグレン症候群は涙腺・唾液腺を中心とする外分泌器官を標的臓器として発症し、ドライアイ・ドライマウスなどの乾燥症状を臨床的特徴とする原因不明の難治性自己免疫疾患であるが、極めて高率に女性優位に発症することから性ホルモンとの関連が指摘されている。当研究室では NFS/*sld* ミュータントマウスを用いてシェーグレン症候群疾患モデルを開発し、その病因・病態解析を実施してきた。NFS/*sld* マウスは生後 3 日目の胸腺摘出(3d-Tx)を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に局限する自己免疫病変を必発し涙液・唾液分泌障害を伴うヒト・シェーグレン症候群に極めて類似した病態を呈することから、薬剤などの治療効果の判定に有用な疾患モデルマウスである。平成 16-18 年度において、内分泌かく乱化学物質が免疫機能に及ぼす影響を検討するために、NFS/*sld* ミュータントマウスの胎児期及び新生児期に TCDD を投与することにより、自己免疫疾患の発症の有無を解析したところ、新生児期に TCDD に暴露されると、涙腺、唾液腺を中心とした自己免疫性病変が誘導された。さらに、平成 19 年度には妊娠期の NFS/*sld* ミュータントマウスに内分泌かく

乱物質ダイオキシン (TCDD) を投与することによって母体側にシェーグレン症候群に類似した自己免疫性病変が確認された。本年度は母体側に誘導された炎症性病変の発症機序に関して中枢性及び末梢性免疫トランスの破綻という観点から詳細に検討を加えた。

#### B. 研究方法

##### 1) マウスおよび投与方法

雌 NFS/*sld* マウスを使用 (有効匹数雌 49 匹)。NFS/*sld* マウスは舌下腺粘液細胞に分化異常をきたすミュータントマウスとして樹立され、当施設にて SPF (specific pathogen-free) 下で繁殖飼育されている。雌 NFS/*sld* マウスは生後 3 日目の胸腺摘出を施すことにより 4 週目以降、涙腺・唾液腺に局限する自己免疫病変を発症し、ヒト・シェーグレン症候群類似の病態を呈する。代表的なダイオキシン類として 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Cambridge Isotope Lab. Ins.) を各濃度(100, 1000ng/kg 体重)にて妊娠マウス(臍内プラーク確認 3 日目及び 15 日目)に腹腔内投与後、出産、授乳及び離乳後、6 ヶ月齢での変化を非妊娠対照群と比較した。基剤としてコーンオイルが用いられた。各々の

マウスにつき体重測定を実施した。なお、TCDDを用いた動物実験は国立医薬品食品衛生研究所毒性部(菅野純部長)との共同研究のもとで同研究所内特殊実験施設において実施した。

## 2) 病理組織学的検索

全身諸臓器は臓器重量を測定後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、有機溶媒に浸染したのち軟パラフィン包埋後 4 $\mu$ の組織切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を施した。唾液腺における炎症性病変の組織学的評価は White らの分類に従って評価した。

## 3) フローサイトメトリー解析

各群における全てのマウスから頸部リンパ節、胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後各種抗体(CD4, CD8; e-Biosciences)と反応させた後に 3%パラホルムアルデヒドにて固定し、有機溶媒に浸染したのち細胞自動解析装置(FACSCanto, BD)にて解析した。

## 4) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

実験マウスにおける血清中の各種サイトカインの測定を実施した。TCDD 投与マウスの脾細胞を用い、抗 CD3 抗体(1 $\mu$ g/ml)及び抗 CD28 抗体(20 $\mu$ g/ml)を固相化した 96 穴培養プレートに、 $1 \times 10^5$  個の T 細胞を 24 時間培養した。培養上清中の各種サイトカイン(IL-2, IL-4, IL-10, IFN- $\gamma$ )の濃度を ELISA にて定量化した。即ち、96 穴マイクロタイタープレートに各抗サイトカイン抗体を固相化後、1%子牛血清アルブミン(BSA)でブロックし、希釈した培養上清( $\times 5$ )及び標準サイトカインを加え反応させた。洗浄後、ビオチン標識各サイトカイン抗体を添加反応させ、ストレプトアビジン標識ホースラディッシュペルオキシダーゼを加えた後、基質として o-phenyldiamine を用い発色させ、マイクロプレートリーダー(BioRad)にて 490nm における吸光度を検出した。

## 5) Real-time PCR 法

脾臓から Th1, 2 抗体及びマグネットビーズを

用いて T 細胞を分離し、トライゾールにて Total RNA を調整した。また、各組織に関してもトライゾール及びホモジナイザーによって total RNA を分離した。逆転写反応後、PTC-200 DNA Engine Cycler 装置(MJ Research, Waltham, MA)を用い、下記プライマーにて各 mRNA を定量化した。

### T-bet;

F:5'-CCTGTTGTGGTCCAAGTTCAAC-3',  
R:CACAAACATCCTGTAATGGCTTGT-3',

### GATA-3;

F:5'-GACTTGCCAGAAAGGCAGAC-3',  
R:5'-AAAGAGGTCACCACCCACAG-3',

### NF- $\kappa$ B;

F:5'-ATGGCAGACGATGATCCCTA-3',  
R:5'-TAGGCAAGGTCAGAATGCAC-3',

### AIRE;

5'-TCTGCTAGTCACGACCCTGTTC-3',  
R:5'-GGCGTGACATGCTCTGGAT-3',

### SP-1;

F:GGCTCTGAACTCAGGCAGA-3',  
R:TGCAAATCATCCACGTTGT-5',

### GAD67;

F:TGCAACCTCCTCGAACGCGG-3',  
R:5'-CCAGGATCTGCTCCAGAGAC-3',

### Insulin;

F:AGACCATCAGCAAGCAGGTC-3',  
R:CTGGTGCAGCACTGATCCAC-3',

### $\beta$ -actin;

F:5'-GTGGGCCGCTCTAGGCA-3',  
R:5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG-3'

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大