

Fig. 22 授乳期の仔マウス（雌雄）の体重変化（左）及び離乳後の仔マウス（雄）の体重変化（右）と PTU の影響

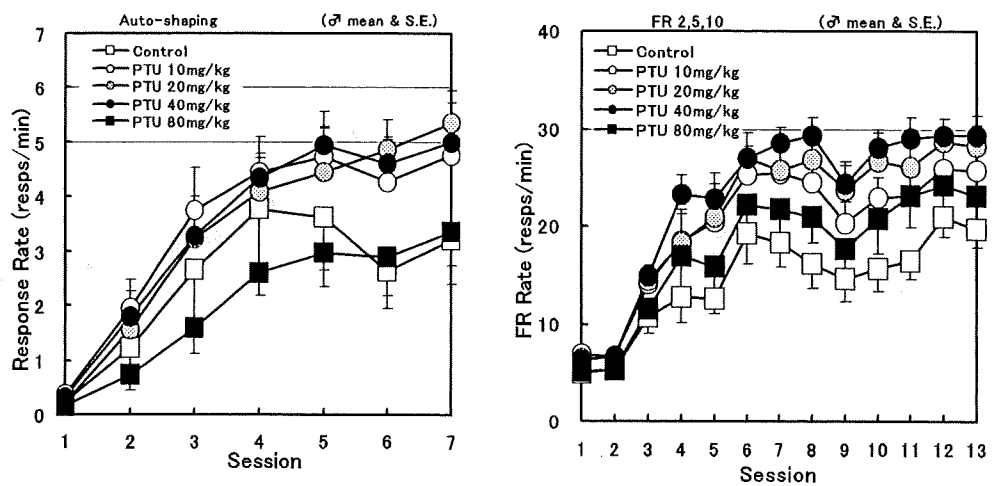


Fig. 23 マウスの自動反応形成スケジュール訓練時（左）及び定率強化スケジュール訓練時（右）の反応率の変化と PTU の影響

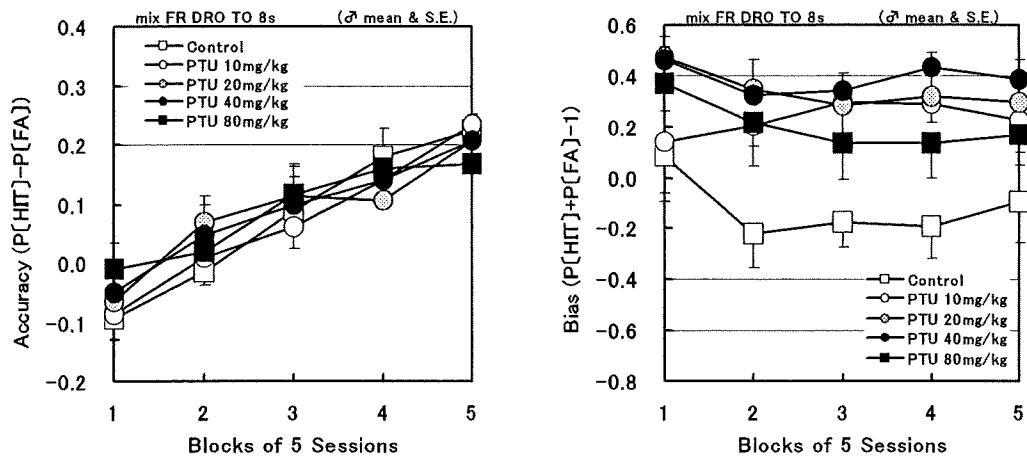


Fig. 24 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 8s スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と PTU の影響

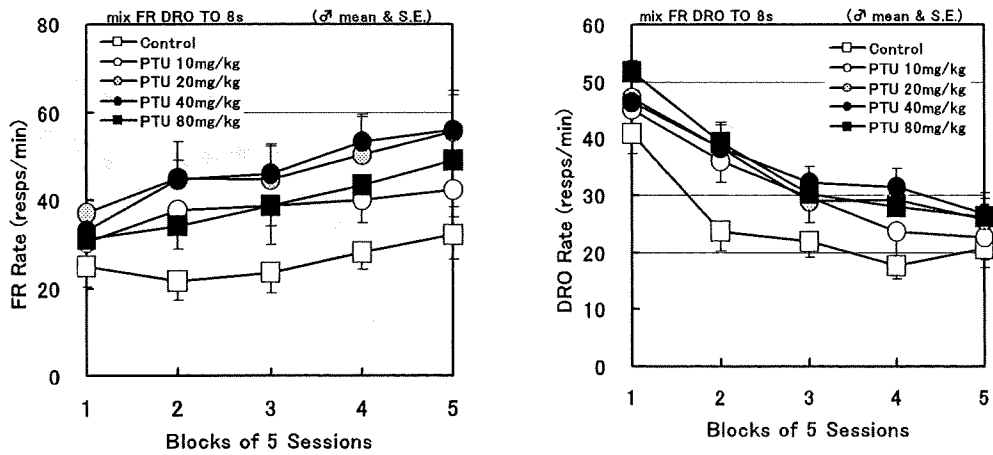


Fig. 25 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 8s スケジュール訓練第 1 段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と PTU の影響

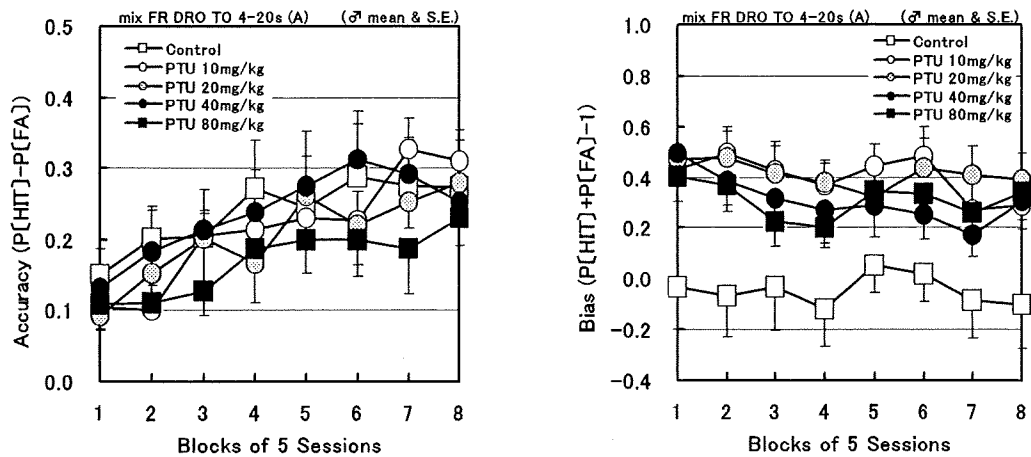


Fig. 26 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と PTU の影響

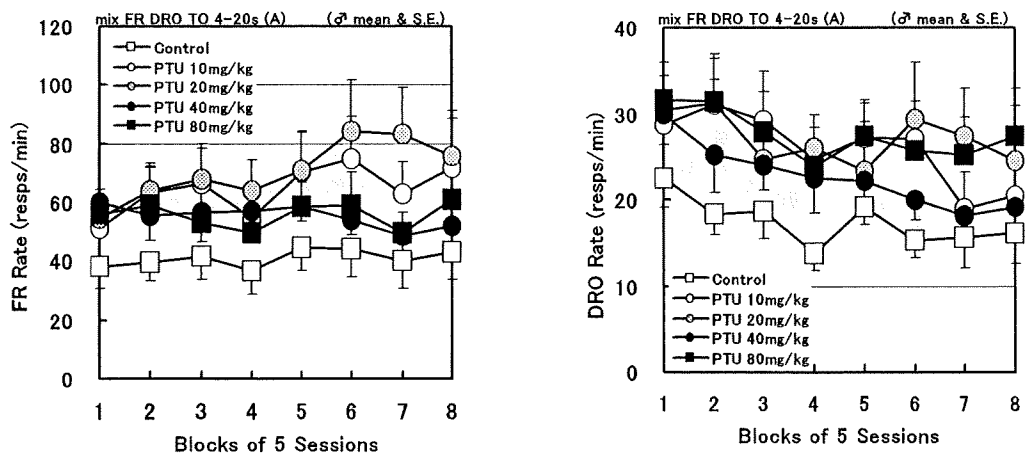


Fig. 27 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における FR 反応率(左)及び DRO 反応率(右) の変化と PTU の影響

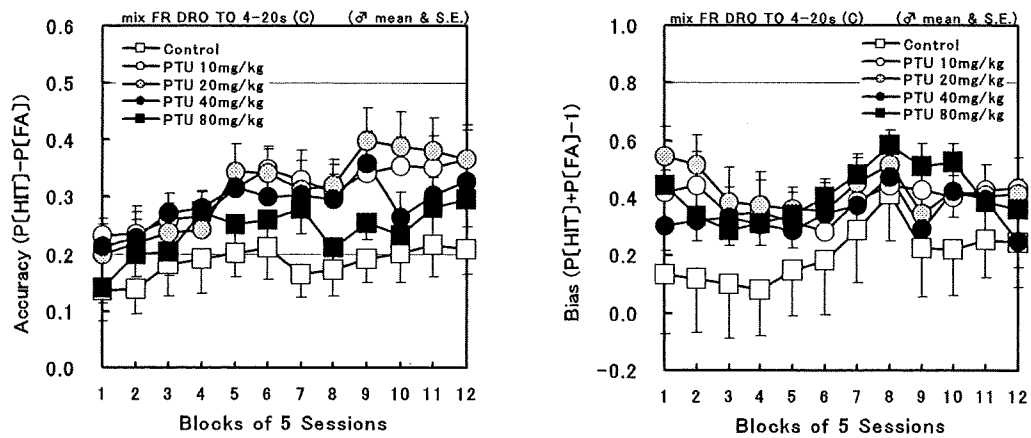


Fig. 28 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒)における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と PTU の影響

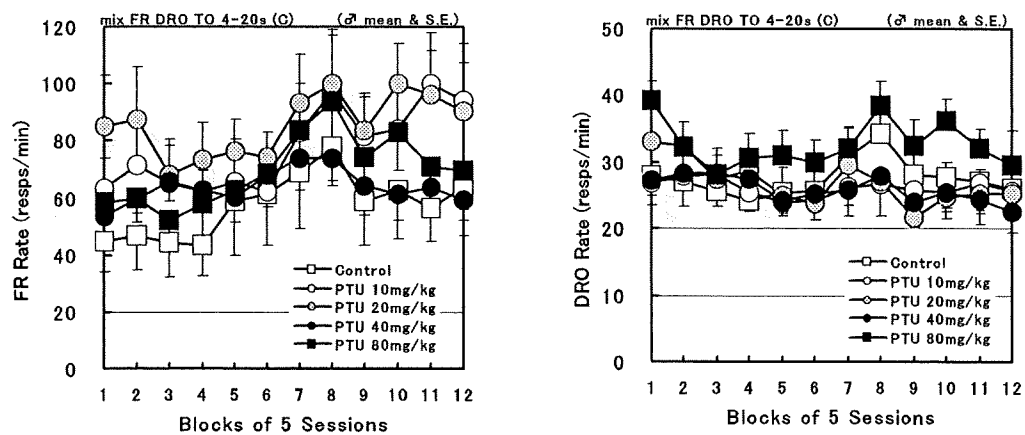


Fig. 29 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒)における FR 反応率(左) 及び DRO 反応率(右) の変化と PTU の影響

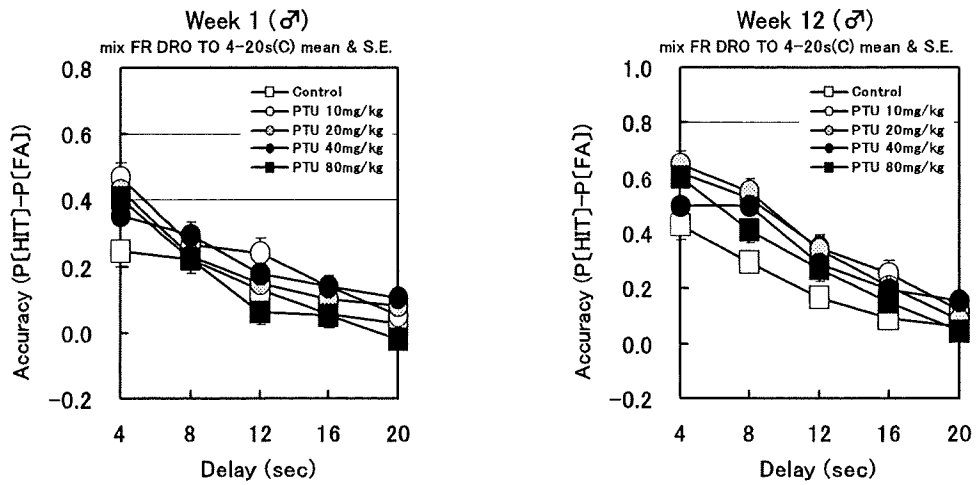


Fig. 30 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (タイムアウト長上下変動条件) の第 1 週 (左) 及び第 12 週 (右) における Delay-Accuracy 曲線と PTU の影響。

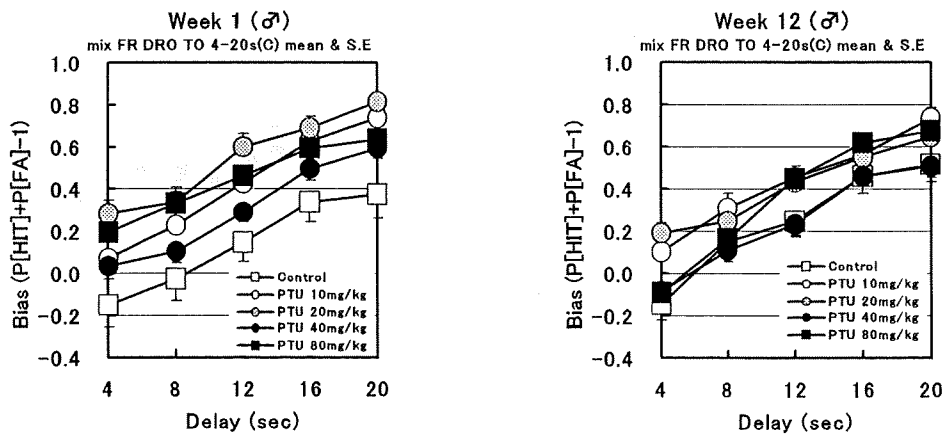


Fig. 31 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 3 段階 (タイムアウト長上下変動条件) における Delay-Bias 曲線と PTU の影響

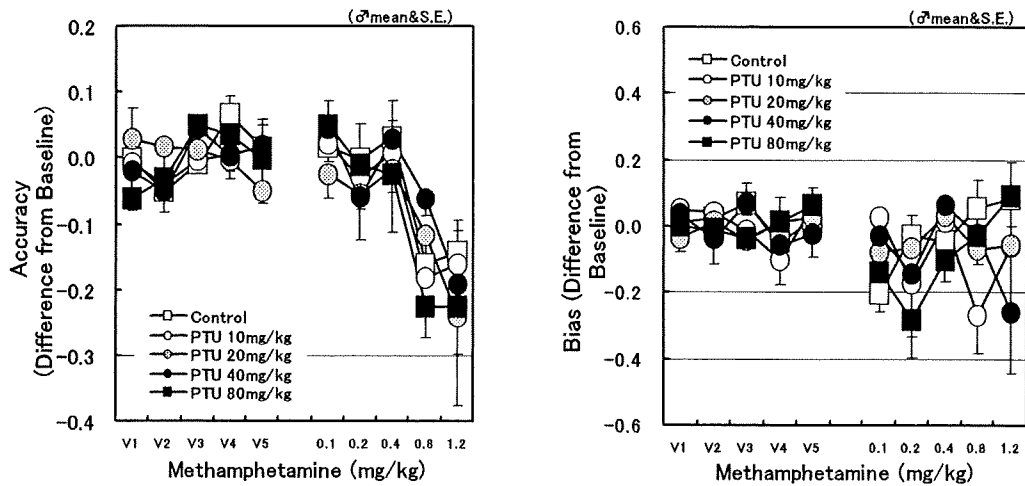


Fig. 32 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果; Accuracy (左) と Bias (右) を指標とした methamphetamine の量-影響曲線と PTU の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示した)。

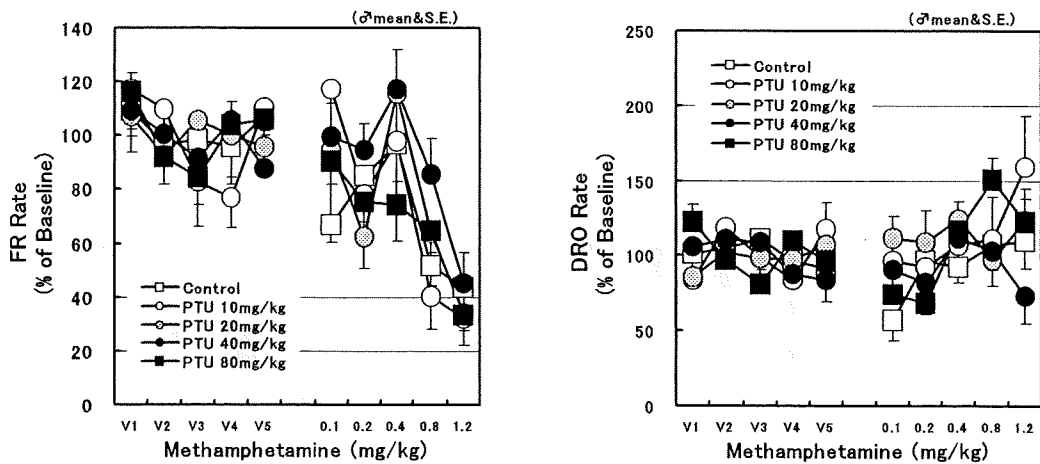


Fig. 33 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果; FR 反応率 (左) と DRO 反応率 (右) を指標とした methamphetamine の量-影響曲線と PTU の影響 (FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値をベースとしたパーセント値を示した)。

(参考)

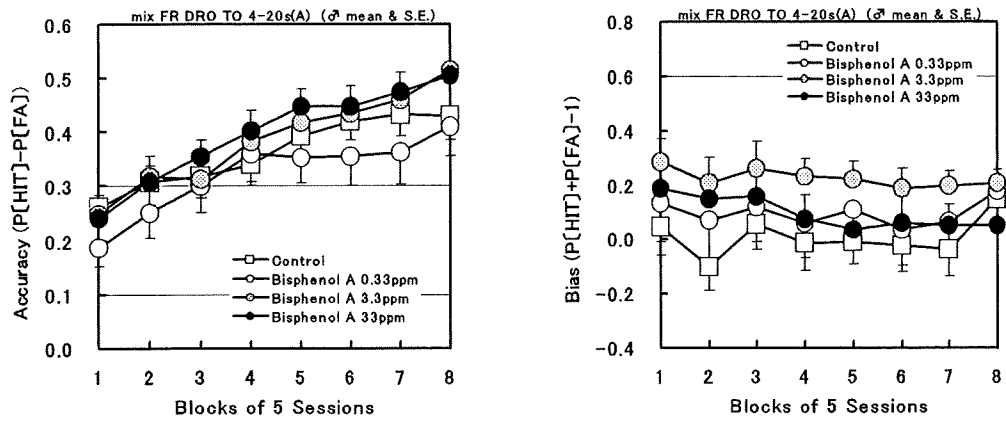


Fig. 34 平成 18 年度厚生労働科学小野班報告書から マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

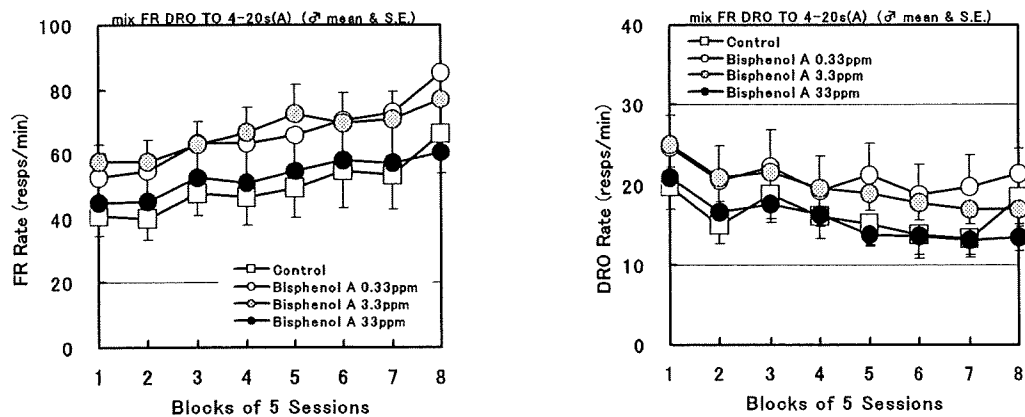


Fig. 35 平成 18 年度厚生労働科学小野班報告書から マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

Table 1. BPA 曝露ラットの体重及び 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 (BPA)	交互作用	グループ (BPA) Dunnett (5%)
体重 (投与期)	kg	***	***	**	L, M, H
体重 (授乳期)	kg	***	n.s.	n.s.	(M, H)
Auto-shaping	Resp. rate	***	n.s.	n.s.	
FR2-FR10	Resp. rate	***	n.s.	*	(L, M)
Mix FR DRO TO 4sec	FR rate	***	n.s.	n.s.	
	DRO rate	***	n.s.	n.s.	
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	
	Bias	***	n.s.	n.s.	
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	***	n.s.	n.s.	
	DRO rate	***	n.s.	n.s.	
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	(H)
	Bias	n.s.	n.s.	n.s.	(M, H)
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	***	n.s.	n.s.	(L, H)
	DRO rate	***	n.s.	n.s.	(L, M)
	Accuracy	***	n.s.	n.s.	(L)
	Bias	*	n.s.	n.s.	(L, M, H)

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

L: 0.33ppm 群、M: 3.3 ppm 群、H: 33 ppm 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。



Table 2. BPA 曝露マウスの体重及び SCOB 訓練過程の統計検定結果

	指標	Day/ Session/ Block	グループ (BPA)	交互作用	グループ (BPA) Dunnett (5%)
体重 (投与期) (含不使用仔)	kg	***	***	***	M, H, L
体重 (授乳期)	kg	***	n. s.	**	(M, H, L)
Auto-shaping	Resp. rate	***	n. s.	n. s.	(L)
FR2-FR10	Resp. rate	***	n. s.	n. s.	(L, H, M)
Mix FR DRO TO 8sec	FR rate	***	n. s.	n. s.	(L)
	DRO rate	***	n. s.	n. s.	
	Accuracy	***	n. s.	n. s.	(M)
	Bias	***	n. s.	**	(L)
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	***	***	***	L
	DRO rate	***	*	n. s.	L, M
	Accuracy	***	n. s.	*	(H, L, M)
	Bias	***	*	n. s.	L
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	***	**	n. s.	L, H, M
	DRO rate	***	*	n. s.	L, M, H
	Accuracy	***	n. s.	n. s.	(M)
	Bias	***	n. s.	n. s.	(L, M, H)

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

L: 0.33ppm 群、M: 3.3 ppm 群、H: 33 ppm 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。

Table 3. PTU 曝露マウスの体重及び SCOB 訓練過程の統計検定結果

	指標	Day/ Session/ Block	グループ (PTU)	交互作用	グループ (PTU) Dunnnett (5%)
体重 (投与期) (含不使用仔)	kg	***	***	***	2, 3, 4
体重 (授乳期)	kg	***	***	n. s.	4, 2, 3, 5
Auto-shaping	Resp. rate	***	n. s.	n. s.	(4, 3, 2)
FR2-FR10	Resp. rate	***	*	***	4, 3, 2, 5
Mix FR DRO TO 8sec	FR rate	***	*	n. s.	4, 3, 2, 5
	DRO rate	***	*	n. s.	5, 4, 3, 2
	Accuracy	***	n. s.	n. s.	
	Bias	**	*	n. s.	4, 3, 2, 5
Mix FR DRO TO 4-20sec (A)	FR rate	n. s.	n. s.	n. s.	(2, 3, 4, 5)
	DRO rate	***	n. s.	n. s.	(5, 3, 2, 4)
	Accuracy	***	n. s.	n. s.	(3, 5)
	Bias	***	**	n. s.	3, 2, 5, 4
Mix FR DRO TO 4-20sec (C)	FR rate	***	n. s.	n. s.	(2, 3, 5, 4)
	DRO rate	***	n. s.	n. s.	(5, 3)
	Accuracy	***	n. s.	n. s.	(2, 4, 3, 5)
	Bias	***	n. s.	n. s.	(3, 5, 2, 4)

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

2 : 10 mg/kg 群、3 : 20 mg/kg 群、4 : 40 mg/kg 群 5 : 80 mg/kg 群

Dunnnett 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。

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 技術顧問

### 研究要旨

われわれはこれまでに、高用量のエストロジェン様作用物質をラット生後 1 日～5 日間連続皮下投与すると、性成熟後に性周期異常の誘発に先立ち、新生児期の視床下部前腹側室周囲核に ER $\alpha$  陽性細胞数の増加が認められることを見出した。

今回は、妊娠 7 日目～離乳時まで極めて低用量 (0.2～20ng/kg) の diethylstilbestrol (DES) を投与し、生後 29 週目に雌性ラットの視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核における ER $\alpha$  陽性細胞および GnRH 陽性神経線維の動態を免疫組織化学的手法を用いて検索した。その結果、ER $\alpha$  陽性細胞数は視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核ともに、対照群および DES 投与群の間で有意な差は認められなかった。しかし、一時的に性周期異常がみられたが正常な性周期に回帰した動物では、発情後期～発情休止期と比較すると、発情前期～発情期における ER $\alpha$  陽性細胞数が減少する傾向が認められた。さらに持続性に性周期異常が観察された動物では、一時的に性周期異常がみられたが正常な性周期に回帰した動物と比較すると、前腹側室周囲核において ER $\alpha$  陽性細胞が減少する傾向が認められ、性的二型核においては逆に増加する傾向にあった。一方 GnRH 陽性神経線維は、性的二型核と比較すると、前腹側室周囲核および弓状核においてより多くの陽性神経線維が認められたが、その数に性周期との相関は認められず、また各神経核において対照群と DES 投与群の間で差は認められなかった。これらのことから、遅発性の性周期異常の誘発は卵巣の異常に起因するのではなく、視床下部—下垂体—性腺系の上位、すなわち視床下部から下垂体に至る制御機構の何らかの異常が原因であることを明らかにした。

#### 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 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、特に性周期異常が誘発されること(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、雌と比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核すなわち内側視索前野(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、エストロゲン様作用物質の遅発影響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。すなわちエストロゲン受容体 $\alpha$  (ER $\alpha$ )陽性細胞が、雄と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認められたことから、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であると考えられた。さらに、エストロゲン活性を有する EE, DES, OP を生後 1 日～5 日間連続皮下投与した結果、性成熟後に起きる性周期異常の誘発に先立って、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。

そこで本研究において、昨年度は、極めて低用量(0.2, 2.0 あるいは 20 ng/kg)の DES をラットに経胎盤・経乳汁投与し、出生児雌性動物の中から性周期異常がみられたラットを中心に、下垂体の変化、とくに FSH 産生細胞および prolactin 産生細胞の変化を病理形態学的手法を用いて検討した。その結果、持続的に性周期異常が観察された動物では、前葉において I 型好塩基性細胞の減少、I 型好塩基性細胞、II 型好塩基性細胞ともに ER $\alpha$  および FSH の染色性が低下していることが明らかにされた。一方下垂体の病理組織学的検査において、DES 投与群で一過性に性周期異常が認められたが剖検時には正常の性周期に回帰した動物では、持続性の性周期異常を示した動物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、下垂体に観察された変化は回復性の変化であり、性周期異常の誘発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可能性が示唆された。従って、今年度は、下垂体を支配する上位中枢である視床下部の性分化に関連した神経核の ER $\alpha$  および性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の動向を免疫組織化学的に検索した。

## B. 研究方法

Sprague-Dawley 系ラット Crl: CD(SD)妊娠 7 日目～分娩後 20 日に亘り DES 0.2, 2.0 あるいは 20 ng/kg を投与した。出生児動物のうち、7 か月の観察期間中に性周期異常が認められた対照群の 1 例、0.2 ng/kg 投与群の 5 例、2.0 ng/kg 投与群の 4 例、20 ng/kg 投与群の 3 例に加え、各群から正常な性周期を示す 5 例を追加して、組織学的な検索対象動物とした(表 1, 2)。これらの動物を安楽死させたのち剖検して、脳組織を採取した。脳はホルマリン固定後、主に視床下部(前腹側室周囲核および内側視索前野)を中心に組織片を切り出してパラフィン包埋し、いずれも HE 染色をしたほか、免疫組織化学的手法により GnRH および ER $\alpha$  を染色した。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。

### <GnRH>

- ・抗原賦活化:プレッシャークッカー、125°C 5min、Tris-EDTA buffer pH9.0
- ・1 次抗体:Mouse anti-GnRH mono-clonal antibody (HU11B)(SANTA CRUZ BIO-TECHNOLOGY 社 sc-32292) 、 dilution : 1/50
- ・洗浄:TBST
- ・EnVision™+ Dual Link (Dako 社)
- ・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.、Tris-EDTA buffer pH9.0
- ・1次抗体: Mouse anti-estrogen receptor、monoclonal antibody、(NOVOCASTRA 社 NCL-ER-6F11)、dilution : 1/80
- ・洗浄: TBST
- ・EnVision™+ Dual Link (Dako 社)
- ・発色: DAB Reagent Set (KPL 社)

使用した動物の群構成および発情周期の変化を図 1 に示した。

(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

ER  $\alpha$  陽性細胞数は、視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核ともに、対照群および DES 投与群の間で有意な差は認められなかった。しかし、ER  $\alpha$  陽性細胞数を神経核ごとにみると、一時的に性周期異常がみられたが正常な性周期に回帰した動物では、発情後期～発情休止期と比較すると発情前期～発情期において減少する傾向が認められた。また、剖検時に性周期異常を示した動物では、一時的に性周期異常が見られたが正常な性周期に回帰した動物と比較すると、前腹側室周囲核において ER  $\alpha$  陽性細胞が減少する傾向が認められた。一方性的二型核においては逆に ER  $\alpha$  陽性細胞

が増加する傾向にあった(表 3)。

GnRH 陽性神経線維は、性的二型核と比較すると、前腹側室周囲核および弓状核においてより多くの陽性神経線維が認められたが、その数に性周期との相関は認められず、また各神経核において対照群と DES 投与群の間で差は認められなかった。

なお扁桃体と視床下部の中間に存在し、その容積は雌より雄の方が大きく、ヒトでは性アイデンティティーを担当すること、またラットではアルギニンバゾプレッシンの性差の性分化と性ステロイドとの関連が指摘されている分界条床核に多数の ER  $\alpha$  陽性細胞が認められたが、その数に対照群と DES 投与群との間に明らかな差はなく、この部に GnRH 陽性線維は確認されなかった。

### D. 考察

われわれはこれまでに、ラットの新生児にエストロゲン活性を有する EE, DES, OP を生後 1 日から 5 日間連続皮下投与した結果、性成熟後に起きる性周期異常の誘発に先立って、特に新生児期では視床下部前腹側室周囲核において ER  $\alpha$  陽性細胞の持続性の増加が認められることを見出した。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)が発現するが、この結果が遅発効果の発現に重要な意味を持つ可能性を指摘してきた。

昨年度の本研究において、妊娠 7 日目から離乳時まで少量(0.2~20ng/kg)の DES を

投与を投与し、出生児雌性ラットの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、持続的に性周期異常が観察された動物では、主としてFSHを産生していると考えられている下垂体前葉のI型好塩基性細胞の減少に伴って、I型好塩基性細胞、II型好塩基性細胞ともにER $\alpha$ およびFSHの染色性が低下していることが明らかにされた。

一方、本年度の研究では、下垂体の機能、特に性分化および性腺刺激ホルモンの分泌・統御に関与する、より上位の中樞神経系、特に視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核におけるER $\alpha$ 陽性細胞は、一時的に性周期異常がみられたものの正常な性周期を回帰する動物では、各神経核においていずれも統計学的な有意の差は認められなかったが、発情前期～発情期と比較すると発情後期～発情休止期においてその数が増加する傾向にあった。このことは、正常な性周期を回帰するに当たりこれら神経核のER $\alpha$ 陽性細胞の数的変化が密接に関与していることを示唆するものである。さらに、剖検時に性周期異常が観察された動物においては、正常な性周期を回帰した動物と比較すると、前腹側室周囲核においてER $\alpha$ 陽性細胞が減少する傾向が認められたが、性的二型核においては逆に増加する傾向にあった。前腹側室周囲核の容積は雄より雌が大きく、性的二型核は雌と比較すると雄の方がその容積は大であることが明らかにされているが、性周期異常を示す動物で観察された各神経核におけるER $\alpha$ 陽性細胞数の変動は、性分化に関わる神経核の雄化を示す

所見であり、遅発性の発情周期異常の発現機序を考える上で興味ある結果と思われる。しかし、今回の検索においては、これら神経核における性腺刺激ホルモン分泌ホルモン陽性神経線維の数に発情周期の変動に関連して明らかな変化が認められなかったことから、視床下部から下垂体に至る内分泌統御機構の詳細を明らかにするためには、遺伝子解析等の分子生物学的な手法を導入した更なる検討が必要である。

今回の研究において、視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核におけるER $\alpha$ 陽性細胞およびGnRH陽性線維数は、正常な性周期を回帰した動物と比較すると、性周期異常が観察された動物において、前腹側室周囲核および弓状核においてER $\alpha$ 陽性細胞が減少する傾向が認められ、性的二型核においては逆に増加する傾向が認められた。吉田らは遅発性の性周期異常が観察された雌ラットの卵巣を正常な性周期をしめす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、遅発性の性周期異常は卵巣の異常に起因するのではなく、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、今回の結果からも、視床下部から下垂体に至る制御機構に、性分化に関与する視床下部の2つの神経核すなわち前腹側室周囲核および性的二型核の雄化を含む何らかの異常が生じた可能性が示唆された。

## E. 結論

今回、妊娠7日目から離乳時まで少量(0.2~20ng/kg)のDESを投与し、出生児雌ラットの脳、特に視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核におけるER $\alpha$ 陽

性細胞および GnRH 陽性神経線維の動態を、免疫組織化学的手法を用いて検索した。その結果、視床下部前腹側室周囲核、性的二型核および弓状核ともに、対照群および DES 投与群の間で ER $\alpha$  陽性細胞数に有意な差は認められなかった。しかし、一時的に性周期異常がみられたが正常な性周期に回帰した動物では、発情後期～発情休止期と比較すると、発情前期～発情期における ER $\alpha$  陽性細胞数が減少する傾向が認められ、さらに、持続性に性周期異常が観察された動物においては、一時的に性周期異常がみられたが正常な性周期に回帰した動物と比較すると、前腹側室周囲核において ER $\alpha$  陽性細胞が減少する傾向が認められた。一方性的二型核においては逆に増加する傾向にあった。GnRH 陽性神経線維は、性的二型核と比較すると、前腹側室周囲核および弓状核においてより多くの陽性神経線維が認められたが、その数に性周期との相関は認められず、また各神経核において対照群と DES 投与群の間で差は認められなかった。これらのことから、遅発性の性周期異常は、卵巣の異常に起因するのではなく、視床下部一下垂体一性腺系の上位、すなわち視床下部から下垂体に至る制御機構に何らかの異常が原因である可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

第 26 回日本毒性病理学会, 2010, 2, 2~3 (金沢)、低用量のエストロゲン様作用物質による遅発効果におけるラット下垂体の病理学的検討

○植田 芳英, 今井 清

#### 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

表1 群構成および検索動物数

Group	Age at autopsy			
	Initial	13W	29W	49W
Control	55	19	16( 6)	19
DES 0.2 ng/kg	52	17	16(10)	19
DES 2.0 ng/kg	53	18	15( 9)	19
DES 20 ng/kg	47	17	12( 8)	18

( ) 内は検索対象数：各群正常な性周期が認められた動物 5 匹を含む  
 DES は妊娠 7 日から分娩ご 20 日まで投与 (DES の投与量は、Bisphenol A の 0.5, 5 および 50  $\mu$ g/kg/day のラット経胎盤・経乳汁暴露により、全ての投与群に出生児の遅発性の性周期異常が認められていること、および DES は BPA の約 2,500~5,000 倍のエストロゲン活性を持つと考えられていること根拠に DES の投与量を設定)

表2 生後 3~7 カ月齢までの F<sub>1</sub> 雌ラットの性周期の変化

Group	Estrous Cycle					
	Cyclicity					
	Normal	Abnormal cycle	Constant <sup>1)</sup> estrus	Persistent <sup>2)</sup> estrus	Constant <sup>3)</sup> diestrus	Persistent <sup>4)</sup> diestrus
Control	33/36	3/36	0/3	1/3	0/3	2/3
DES 0.2 ng/kg	25/35	10/35*	0/10	2/10	3/10	7/10
DES 2.0 ng/kg	24/35	11/35*	1/11	3/11	6/11	3/11
DES 20 ng/kg	24/30	6/30	0/6	4/6	1/6	1/6

\*: Statistical Significance; P<0.05 (Fisher's exact test)

- 1) Constant estrus: prolonged estrus period lasting 8 days or more
- 2) Persistent estrus: prolonged estrus period lasting 3-7 days
- 3) Constant diestrus: prolonged diestrus period lasting 10 days or more
- 4) Persistent diestrus: prolonged diestrus period lasting 5-9 days



表 3 生後 7 か月齢の F1 雌ラット前腹側室周囲核における ER $\alpha$  陽性細胞

Cycle	AVPvN-SDA		SDN-POA		ARH/ME	
	P-E1)	M-D	P-E	M-D	P-E	M-D
Normal	47.0 $\pm$ 46.1(8)	56.4 $\pm$ 36.3(9)	77.4 $\pm$ 34.4(7)	98.7 $\pm$ 40.6(11)	41.4 $\pm$ 9.6(8)	49.8 $\pm$ 16.6(12)
Abnormal	32.7 $\pm$ 22.1(6)	35.0 $\pm$ 19.3(5)	102.3 $\pm$ 53.6(6)	121.6 $\pm$ 65.6(5)	35.9 $\pm$ 12.5(8)	41.0 $\pm$ 12.3(5)

1)P-E: proestrus-estrus

2) M-D: metestrus-diestrus

F-test(5%)  $\rightarrow$  Student/Aspin-Welch(2-tailed:5%)

AVPvN-SDA: 前腹側側室周囲核

SDN-POA: 性的二型核

ARH/ME: 弓状核 ( ) 内は検索動物数

## 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 教授  
研究協力者 石丸直澄 徳島大学大学院 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、内分泌かく乱化学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。

昨年度までに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投与により唾液腺に限局した炎症性病変が観察されたことから、今年度は、妊娠期に低下するエストロゲンに着目し、卵巣摘出NFS/*sld*ミュータントマウスにTCDDを暴露することによる免疫系への影響を検討したところ、唾液腺組織に激しい炎症性病変が観察され、その機序として胸腺でのT細胞分化の異常及び末梢のT細胞のIFN- $\gamma$ 産生が大きく変動していたことから、周産期における女性ホルモンの変動する時期のダイオキシンの暴露は免疫不全を引き起こすリスクファクターとなる可能性が示された。

#### A. 研究目的

ダイオキシシン(TCDD)を代表とする内分泌かく乱化学物質の免疫系への影響に関して様々な報告が成されているが、実際の免疫疾患との関わりやその分子機序に関しては不明な点が多い。平成16-18年度において、TCDDが免疫機能に及ぼす影響を検討するために、涙腺、唾液腺を標的とする自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の疾患モデルNFS/*sld*ミュータントマウスを用いて、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。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ことが判明した(*J. Immunol.* 182:6576-6586, 2009)。さらに、平成19、20年度には妊娠期のNFS/*sld*ミュータントマウスに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。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型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た可能性が示さ

れた。本年度は性ホルモンとダイオキシシン暴露との関係をさらに詳細に検討するために、NFS/*sld*マウスの卵巣を摘出することによってエストロゲン欠乏状態となった生体にダイオキシシンを投与することによる免疫系に及ぼす影響を評価した。

#### 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26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。卵巣摘出は、6週齢の雌マウスを用い、麻酔下にて背部より切開することにより両側の卵巣を摘出後、腹膜および皮膚を適切に縫合した。対照マウスには切開縫合のみを施した。ダイオキシシン投与に関しては、2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Cambridge Isotope Lab. Ins.)を各濃度(100及び1000 ng/kg体重)にて卵巣摘出マウス及び対照マウスに腹腔内投与後、2、4ヶ月にて末梢血を採取し、6ヶ月後(8ヶ月齢)にて屠殺、解析を行った。基剤としてコーンオイルが用いられた。

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、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 $\mu$ m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 らの分類及び Kohashi らの報告した分類に従って評価した。

## 3) フローサイトメリー解析

501mlの末梢血を採取し、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血後、T細胞分画あるいは活性化マーカー(CD44、CD25、CD69、CD62L)に対する抗体を反応させ、固定、有機溶媒処理、洗浄後にフローサイトメーターにて解析した。また、各群における全てのマウスから胸腺および脾臓を摘出し、ホモジナイズ、溶血、洗浄後、各種抗体と反応させ、3%パラホルムアルデヒドにて固定、有機溶媒に浸染した後に、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イムノグロブリン分画、各種サイトカインの濃度を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)でブロッキングし、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

各組織に関して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 Engin Cyclor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。

<AhR>

F:5'-CAA AGG GCA GCA GCT TAT TAT TCT GGG-3',

R:5'-AAG CGT GCA TTG GAC TGG AC-3',

<CYP1A1>

F:5'-CCA TGA CCG GGA ACT GTG G-3',

R:5'-TCT GGT GAG CAT CCT GGA CA-3',

<T-bet>

F:5'-CCT GTT GTG GTC CAA GTT CAAC-3',

R:5'-CAC AAA CAT CCT GTA ATG GCT TGT-3',

<GATA-3>

F:5'-GAC TTG CCA GAA AGG CAG AC-3',

R:5'-AAA GAG GTC ACC ACC CAC AG-3',

<RORrt>

F:5'-GCG GAG CAG ACA CAC TTA CA-3',

R:5'-TTG GCA AAC TCC ACC ACA TA-3',

<NF- $\kappa$ B>

F:5'-ATGGCAGACGATGATCCCTA-3',

R:5'-TAGGCAAGGTCAGAATGCAC-3',

<SP-1>

F:5'-GGC TCT GAA ACT CAG GCA GA-3',

R:5'-TGC AAA CTC ATC CAC GTT GT-3',

<AIRE>

F:5'-TCT GCT AGT CAC GAC CCT GTT C-3',

R:5'-GGC GTG ACA TGC TCT GGA T-3',

<SP-1>

F:5'-GGC TCT GAA ACT CAG GCA GA-3',

R:5'-TGC AAA CTC ATC CAC GTT GT-3',

<GAD67>

F:5'-TGC AAC CTC CTC GAA CGC GG-3',

R:5'-CCA GGA TCT GCT CCA GAGAC-3',

<b-actin>

F:5'-GTG GGC CGC TCT AGG CA-3',

R:5'-CGG TTG GCC TTA GGG TTC AGG GGG G-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学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

## C. 研究結果

図-1に実験プロトコルを示す(図-1上段)。6週齢にて卵巣摘出術(Ovx)、TCDD投与を行い、8ヶ月齢にて屠殺後、全身臓器の病理組織学的解析、免疫関連遺伝子 mRNA 発現、胸腺および脾臓細胞のフローサイトメーター解析などを行った。Ovx、TCDD投与後4ヶ月での末梢血単核球におけるCD4及びCD8の陽性細胞数(%)はOvx群、Sham群にて著変は認められない(図-1下段)。

### 1) 病理組織学的変化

全身諸臓器について固定後、有機溶媒に浸染した後、組織切片を作成して病理組織学的検討を実施した。その結果、8ヶ月齢での唾液腺(顎下腺)では、卵巣摘出(Ovx)群及び対照(Sham)群でそれぞれ軽度の加齢的变化と考えられる炎症性病変が認められるものの、両者に組織学的な差は確認されなかった。TCDD 100 ng/kg投与ではOvx群で激しい炎症性病変を認める個体が観察され、Sham群でも中等度の炎症性変化が見られたが、両者に統計学的な有意差が認められなかった。TCDD 1000 ng/kg投与では、Ovx群では80%のマウスで組織破壊を伴う激しい炎症性病変が観察され、Sham群で

は25%程度のマウスで強い炎症性病変が認められた。組織学的スコアを用いた解析ではTCDD 1000 ng/kg投与によってOvx群とSham群で有意な差が確認された( $p=0.045$ ) (図-2)。また、涙腺ではOvx、Sham群ともにTCDD投与によって中等度までの炎症性病変が確認されたが、両者に統計学的な有意差は認められなかった。他の臓器に関してはそれぞれの群で肺、腎、肝にごく軽度のリンパ球の浸潤像が認められたがTCDD投与による有意な所見ではなかった。

### 2) 末梢T細胞へのTCDD投与による影響

TCDDの投与によるT細胞への影響について明らかにするため、脾細胞、胸腺細胞を分散し、フローサイトメリーによる解析を実施した。脾臓において、Ovx群、Sham群ともにCD4及びCD8陽性T細胞の分画に関してTCDD 1000 ng/kg投与により非投与群に比較して軽度の細胞数の減少が見られるものの、有意な変化ではなかった(図-3)。さらに、CD4陽性T細胞の活性化状態をCD44<sup>high</sup>CD62L<sup>+</sup>分画を用いて検討すると、Ovx、Sham群でTCDD投与による変化は認められなかった(図-4)。また、T細胞のサイトカイン産生を確認するために、脾細胞を固層化抗CD3抗体にて刺激した培養上清を用いてELISAにて各サイトカイン濃度を定量すると、IFN-gの産生がOvx群においてTCDD投与により、Sham群に比較して有意に上昇していることが確認された(図-5)。IL-2、IL-4、IL-10に関してはOvx、Sham群で有意な差は観察されなかった。さらに、末梢での調節性T細胞分画として知られているFoxp3陽性CD4陽性T細胞をフローサイトメーターで確認すると、Ovx、Sham群ともにTCDD投与によって炎症性病変が誘導されたことに反して、その分画は増加する傾向にあり、TCDD 1000 ng/kg投与のOvx群ではShamに比較して有意に増加していることが明らかになった(図-6)。

### 3) TCDD投与によるB細胞への影響

TCDD投与による末梢B細胞への影響を確認したところ、Ovx、Sham群ともに脾臓でのB220陽性B細胞数に変化は見られなかった(図-7)。また、本疾患モデルですでに確認されている自己抗体の産生