

図 13 に末梢血液中 LH 濃度、図 14 に下垂体前葉中の LH 含有量の変化を示した。末梢血液中 LH 濃度はばらつきが大きく、一定の傾向を示さなかった。下垂体前葉中に含まれる LH は対照群に比較して EE 処置群で増加した。

図 15 に末梢血液中インヒピン濃度、図 16 に卵巣中インヒピン含有量の変化を示した。末梢血液中と卵巣中で変化の傾向は異なるものの、比較的高濃度の処置群である EE200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で対照群に比較して低値を示した。

実験 2

新生 1 日での EE 単回投与が膣開口時期に与える影響を調べたところ、対照群では生後平均 32.8 日で膣が開口したのに対し、EE200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では平均 31.2 日、EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では平均 29.5 日 (表 1 および図 9) と明らかに早期化した。

発情周期を膣スメア法によって調査したところ、3 ヶ月齢までの性成熟過程では休止像を示す割合が EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で増加した (図 10 および 11)。その後各群とも正常に発情周期を回帰し、群間に差は認められなかった。対照群では約 8 ヶ月の観察期間中発情周期に異常は認められなかったが、EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で約 6 ヶ月後には発情期像を示す動物の割合が他の 2 群に比べ増加した (図 12)。

D. 考察

本研究では、化学物質を臨界期に暴露し

た影響が遅れて現れてくる現象の機序を解明するため、エストロゲン作用を持つ化学物質の一つであるエチニル・エストロジェン (EE) をモデル薬物として用いた。投与時期としては、ラットで雄への脳の性分化における臨界期のほぼ中央と考えられる出生第 1 日に限定した。本研究では特に早期に現れる指標を明らかにすることを目的とし、雌雄で性腺刺激ホルモン分泌に差が現れる性成熟前の 10 日齢から 20 日齢における性腺刺激ホルモンの分泌変化に着目した。

出生第 1 日の EE 処置が性成熟後の発情周期に与える影響を膣スメア法にて約 10 ヶ月間調査したところ、200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下の群では発情期の頻度が対照群に比して増加しなかったが、2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では 7 ヶ月齢以降に発情期像が現れる頻度が増加した。通常雌ラットでは 12 か月齢程度から、排卵が不規則となり連続発情期あるいは連続費発情期となることから、少なくとも 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において早期に排卵が不規則になるという、遅発的影響が確認された。

膣の開口日を調査した結果は、EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において明らかに早期化した。この結果は、新生時期にアンドロジェンを投与して性中枢の雄化を誘起した報告と類似した結果であった。

雌ラットの新生時期にアンドロジェンあるいは大量のエストロジェンを投与して、性中枢を雄かした場合、膣の開口が小さく、早期化し、その後も膣スメアが連続的に発情期像を示すことが報告されている。本研究では、オクチルフェノールを性分化の臨

界期に投与した場合 (Katsuda et al., 2000b, Herath et al, 2001) と類似して、性中枢の部分的あるいは不完全な雄化が生じたものと推察された。

20 日齢で採取した卵巢を組織学的に観察したところ、2000 μ g/kg 投与群において卵胞の発育が抑制されており、重量も減少していた。また、1 つの卵胞内に 2 個の卵が認められた例もあり、出生第 1 日の EE 投与が卵巢に直接影響して卵胞発育を抑制している可能性が示唆された。20 日齢における子宮重量の結果が投与した EE の容量に依存した低下を示しており、卵巢からのエストラジオール分泌が、投与した EE の容量に依存して低下したことを強く示唆している。子宮の組織像においても 2000 μ g/kg 投与群で腔上皮の高さが対照群に比較して低く、卵巢からのエストラジオール分泌が減少していることを示していた。

末梢血液中インヒビン濃度および卵巢中インヒビン含有量は 2000 μ g/kg 投与群で対照群に比較して減少していた。インヒビンは主に卵胞の顆粒層細胞から分泌されることから、この結果も卵胞の発育が 2000 μ g/kg 投与群で抑制されていることを示している。

末梢血液中 LH 濃度については一定の傾向が認められなかった。LH の分泌はパルス状に変動していることが知られており、本研究の結果も変動が大きい故であると考えられた。一方、下垂体前葉中の LH 含有量は EE 投与群の 15 日齢、20 日齢で対照群に比べて明らかに増加しており、中枢からの性

腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌が増加しているものと推察された。本研究とは異なり、Goomer らは雌ラットで出生後脳の性分化が起きる臨界期に、アンドロジェンあるいはエストロジェンを投与すると、下垂体前葉中の LH 含有量が減少することを報告している (Goomer et al., 1977)。本研究では EE 投与によって卵巢における卵胞発育が抑制され、卵胞から分泌されるエストラジオールやインヒビンの分泌が減少し、それらによる視床下部、下垂体前葉前葉に対するネガティブフィードバックが低下した結果、視床下部からの GnRH 分泌が増加し、下垂体前葉中の LH 含有量が増加したと推察された。EE 処置群で膻開口が早期化したのは、ネガティブフィードバックが低下した結果、20 日以降急激に増加したゴナドトロピンによって卵胞発育が促進され、エストロジェン分泌が増加した結果と推察された。

E. 結論

本研究により、ラットで中枢の性分化の臨界期に含まれる出生第 1 日にエチニル・エストロジェン (EE) を 1 回投与することにより、性成熟後に性周期は正常に回帰するものの、早期に異常な性周期を示すようになるという「遅発的影響」が現れることが明らかとなった。このモデルを用いて、10 日齢から 20 日齢における性腺刺激ホルモンの分泌と卵巢、子宮の形態学的変化を解析したところ、EE 投与は卵巢の卵胞発育を抑制し、卵巢ホルモン分泌の減少によっ

てネガティブフィードバックが低下し、性腺刺激ホルモンの分泌は促進される傾向にあることが示唆された。

今後、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌量を確認すると共に、20 日齢における卵巢中卵胞数の調査を行う予定である。また、発情周期の早期異常が現れる機序として、EE 処置による卵胞数の減少が推察されることから、EE 投与直後の 2 日齢、3 日齢での卵細胞のアポトーシス、性成熟後早期の発情周期中における性ホルモン分泌についても解析を行う必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 該当無し

2. 学会発表

1) 該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

無し

参考文献

Goomer N, Saxena RN, Sheth AR. Effect of neonatal testosterone and oestradiol treatment on the development of the hypothalamo-hypophysial axis in the

female rat. *J Reprod Fertil.* 50, 239-43, 1977.

Gorski RA, Harlan RE, Christensen LW. Perinatal hormonal exposure and the development of neuroendocrine regulatory processes. *J Toxicol Environ Health* 3, 97-121, 1977.

Herath CB, Watanabe G, Katsuda S, Yoshida M, Suzuki AK, Taya K. Exposure of neonatal female rats to p-tert-octylphenol disrupts afternoon surges of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone and prolactin secretion, and interferes with sexual receptive behavior in adulthood. *Biol Reprod.* 64, 1216-24, 2001.

Katsuda S, Yoshida M, Isagawa S, Asagawa Y, Kuroda H, Watanabe T, Ando J, Takahashi M, Maekawa A. Dose- and treatment duration-related effects of p-tert-octylphenol on female rats. *Reproductive Toxicology.* 14, 119-126, 2000a.

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.* 165, 217-26, 2000b.

Legan SJ, Karsch FJ. A daily signal for the LH surge in the rat. *Endocrinology* 96, 57-62, 1975

McEwen BS, Plapinger L, Chaptal C, Gerlach J, Wallach G. Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the association of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res* 96, 400 -406, 1975.

Toppari J, Skakkebaek NE. Sexual differentiation and environmental endocrine disrupters. *Clin Endocrinol Metab* 12, 143-156, 1998.

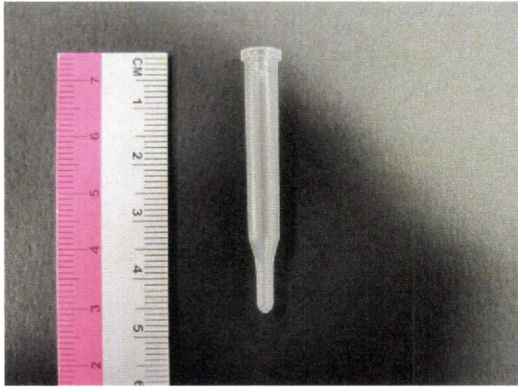


図1 ギナドトロピンの微量測定法に用いた試験管

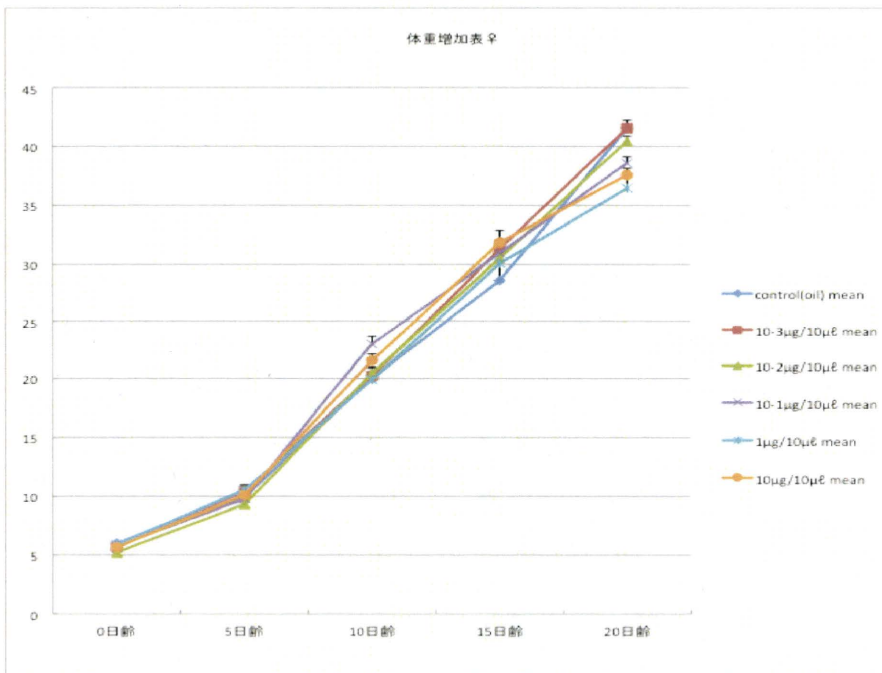


図2 新生子期 EE 単回投与が 5 日齢、10 日齢、15 日齢、20 日齢において体重に対する相対子宮重量に与える影響

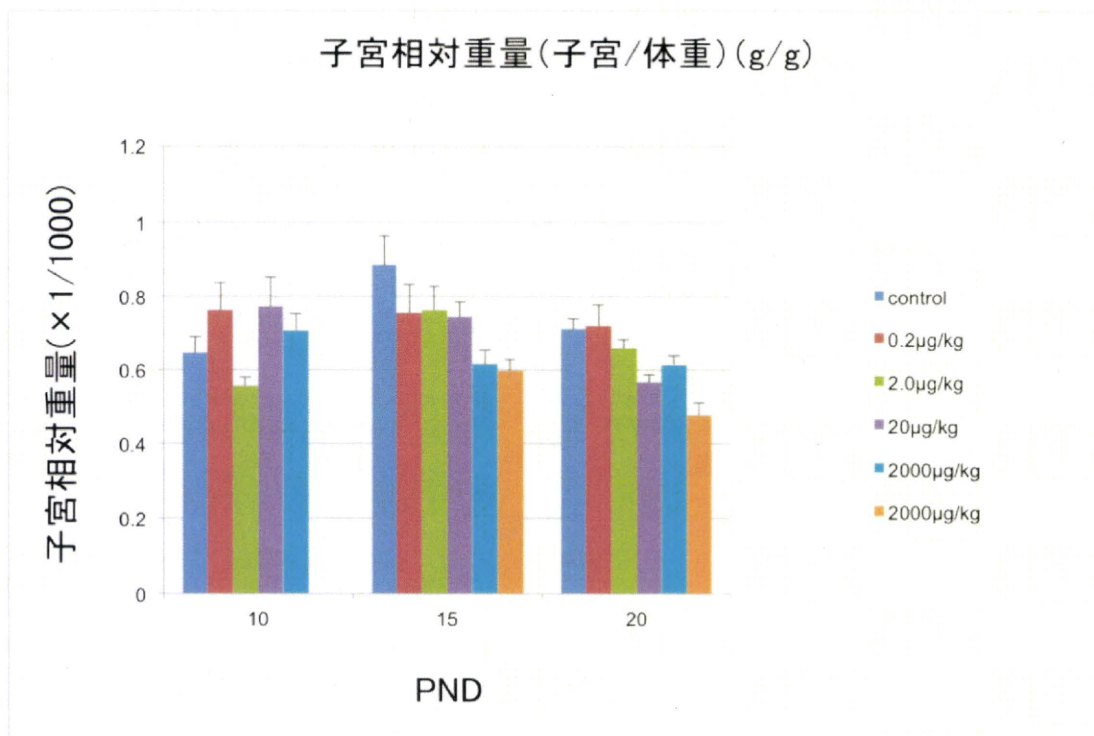


図3 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対子宮重量に与える影響

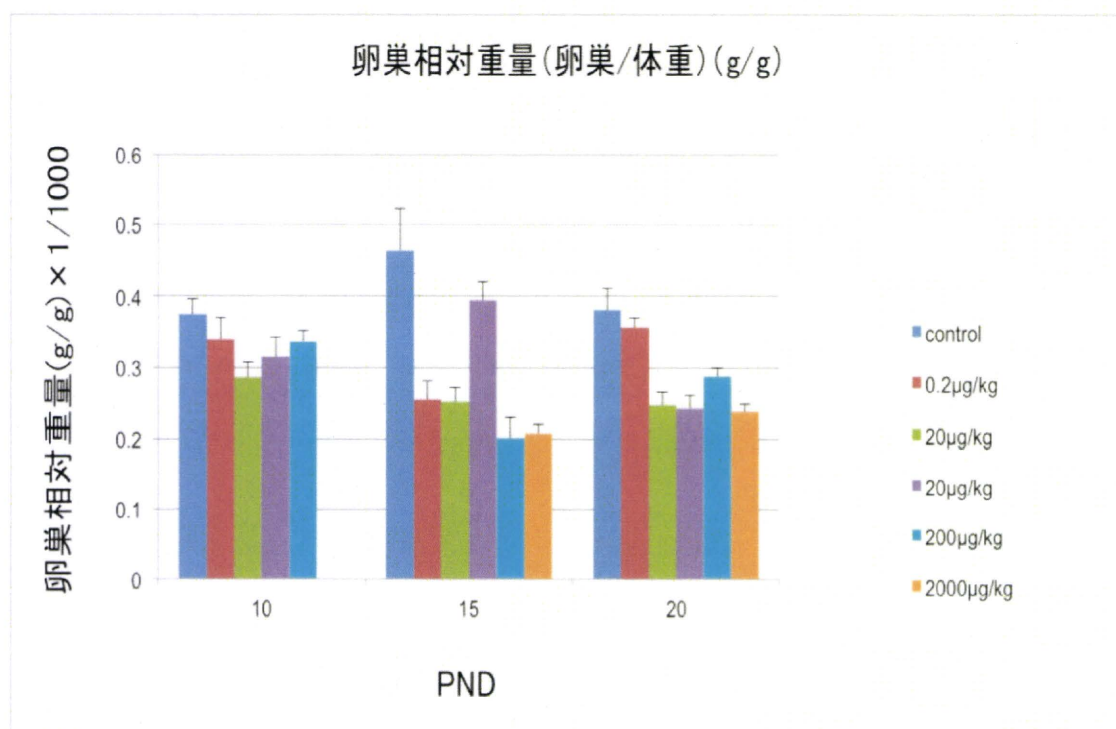


図4 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対卵巣重量に与える影響

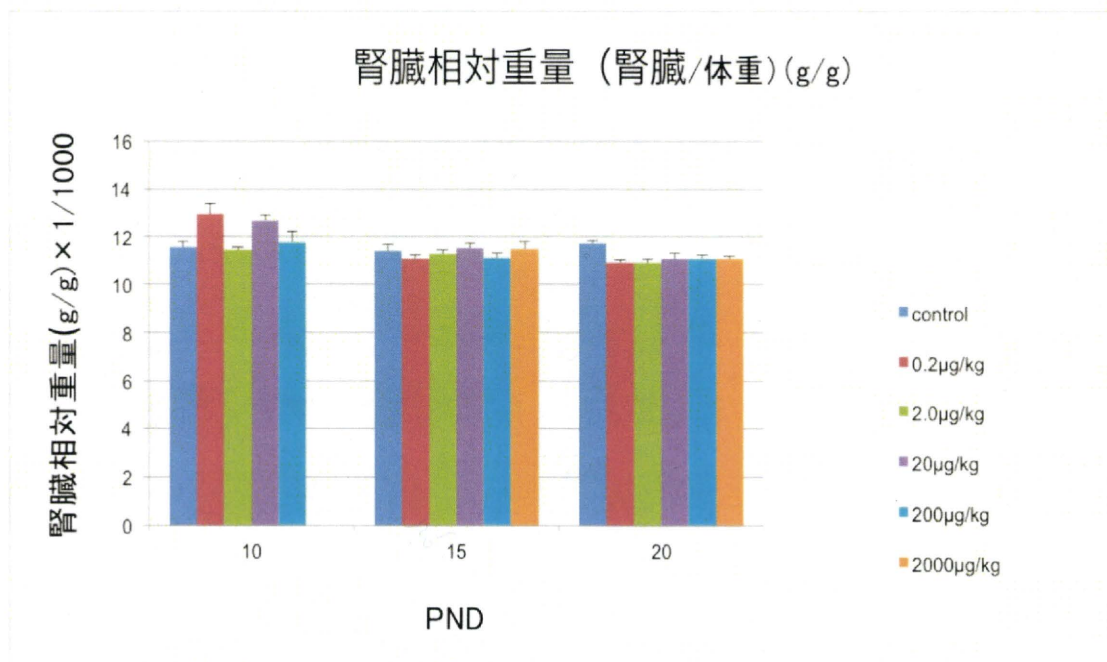


図5 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対腎重量に与える影響

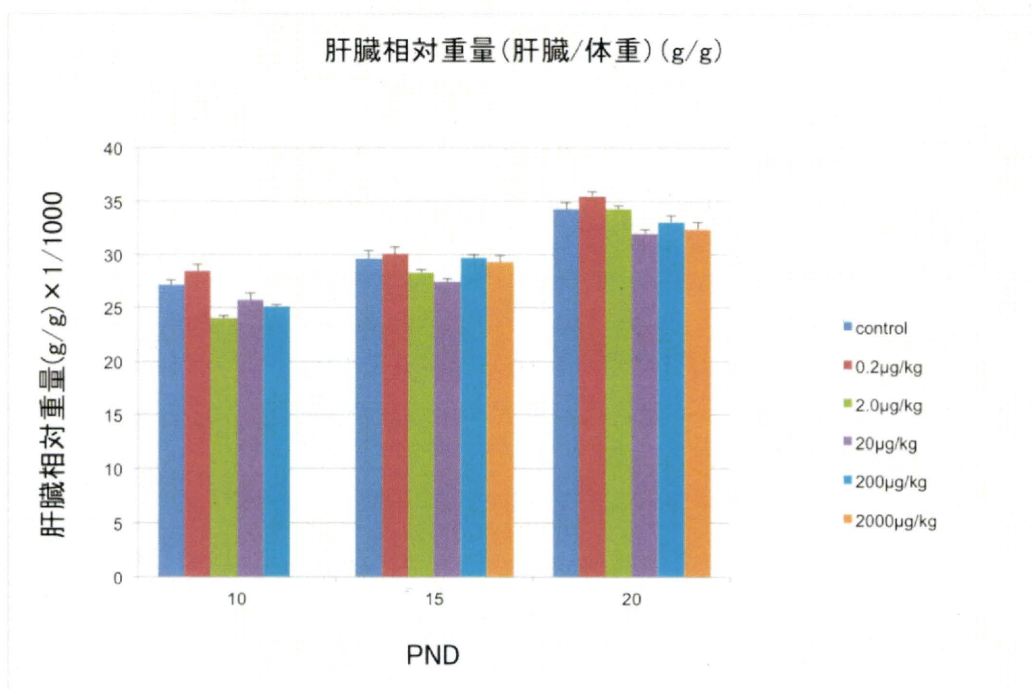


図6 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対肝重量に与える影響

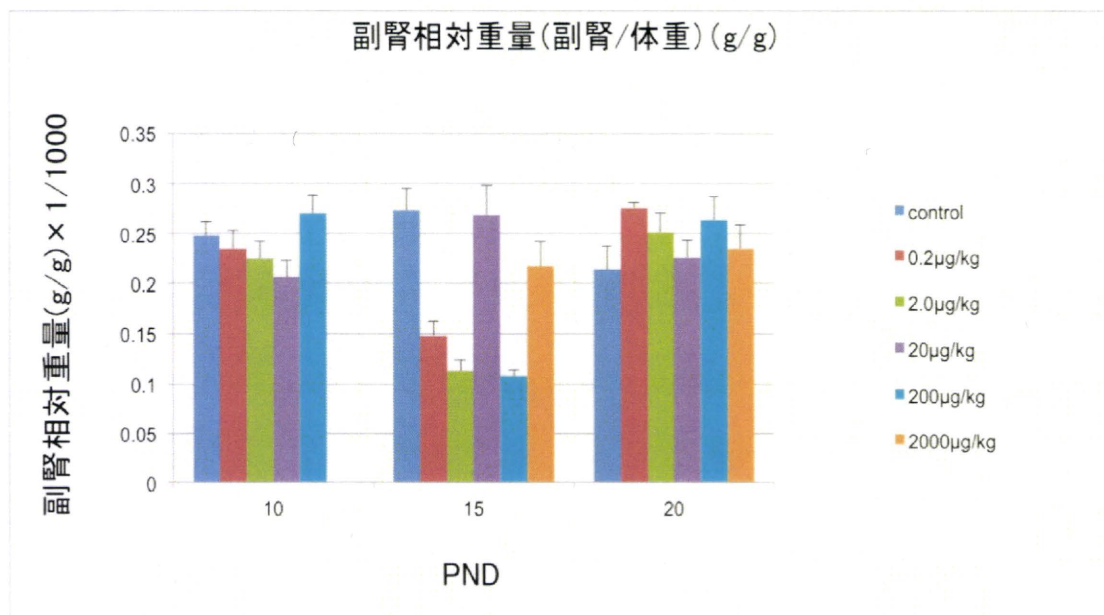


図7 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対副腎重量に与える影響

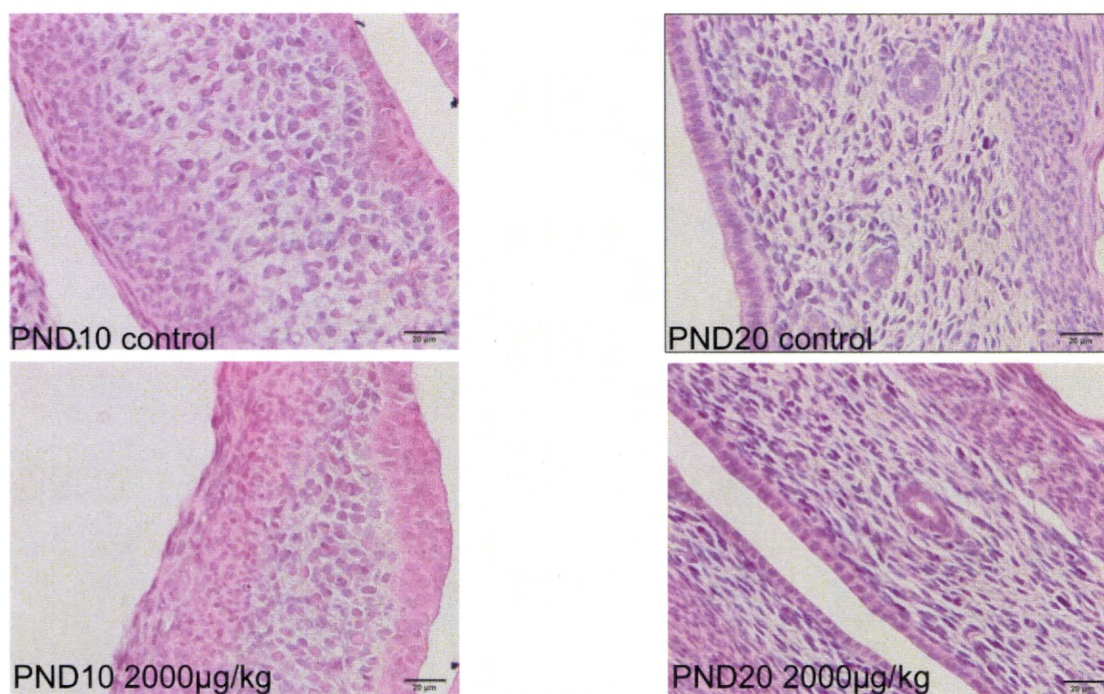


図8 新生子期 EE 単回投与が10日齢、20日齢において子宮組織像に与える影響

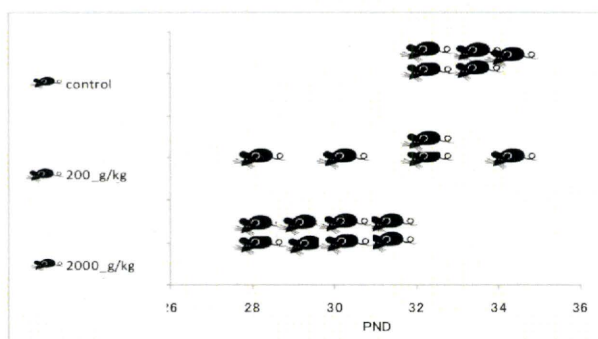


図9 新生子期 EE 単回投与が陰開口時期に与える影響

表1 新生子期 EE 単回投与が陰開口時期に与える影響

	mean (PND)	S.E.M.
Vehicle	32.8	0.374166
EE200 μ g/kg	31.2	1.019804
EE2000 μ g/kg	29.5	0.422577

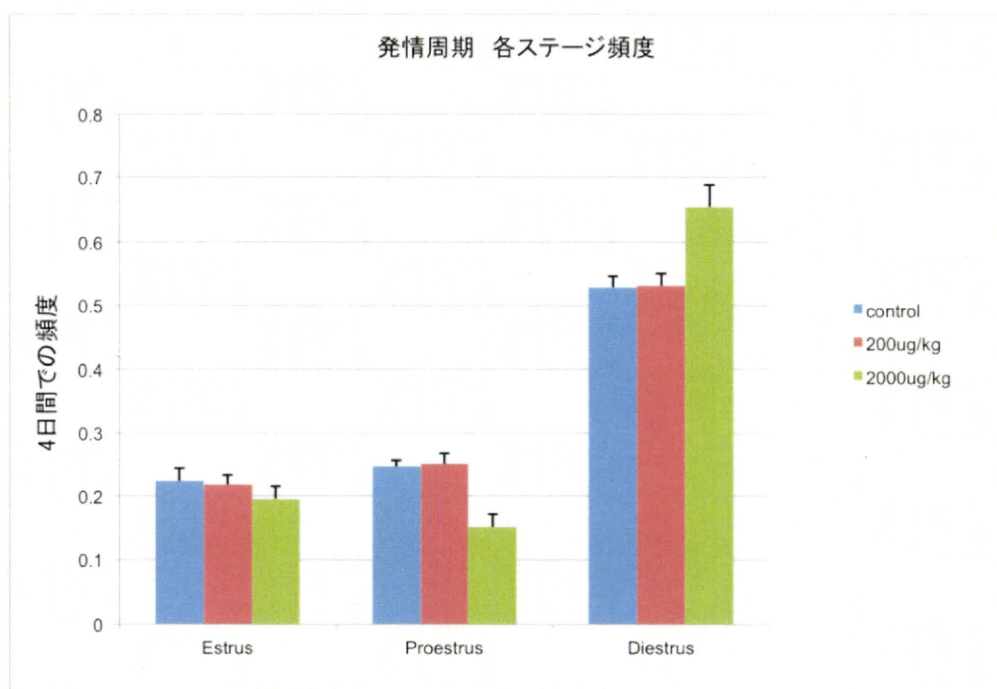


図10 新生子期 EE 単回投与が陰開口後の膣スメア像に与える影響

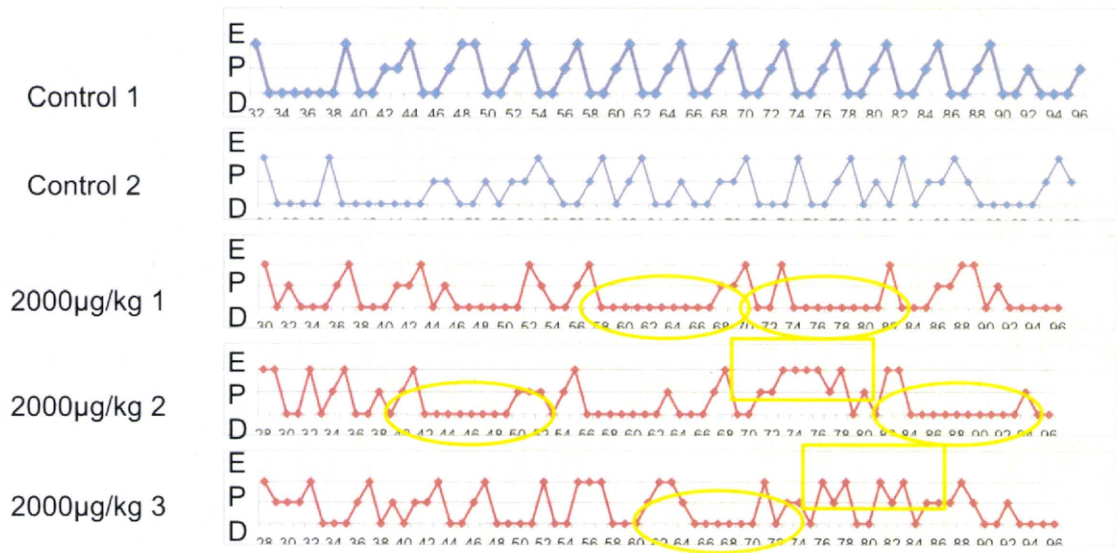


図 1.1 新生子期 EE 単回投与が膣開口後の膣スメア像に与える影響

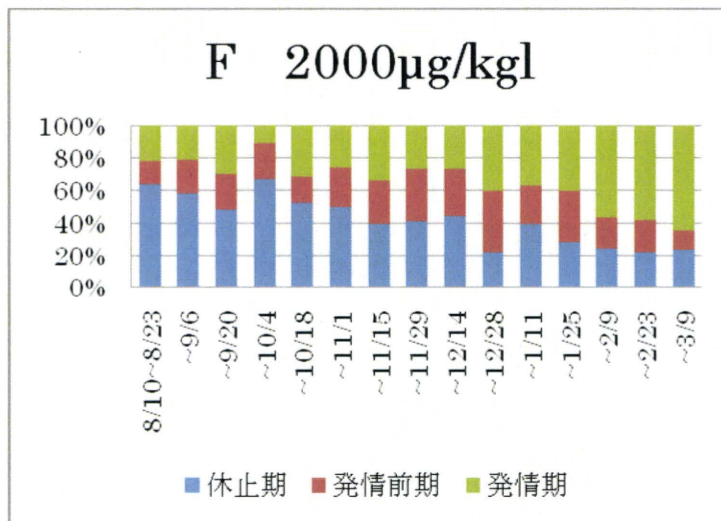
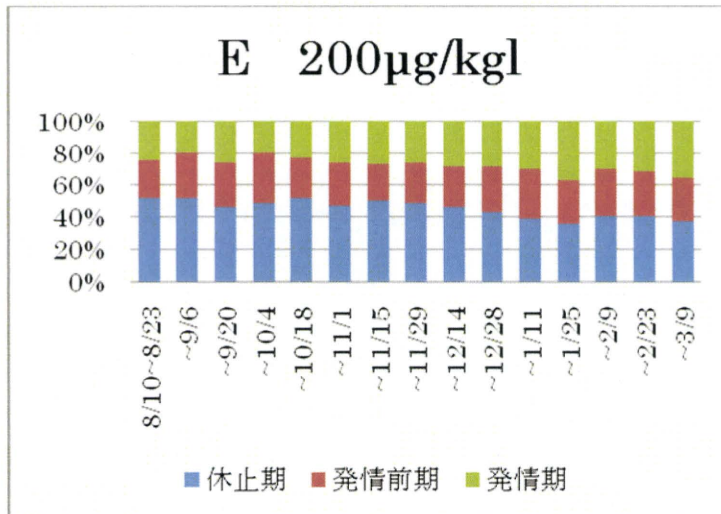
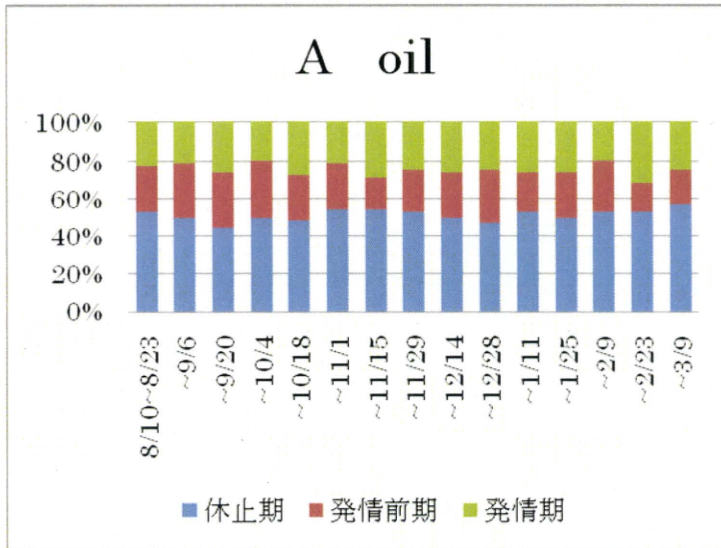


図 1 2 新生子期 EE 単回投与が膣開口後の膣スメア像に与える影響

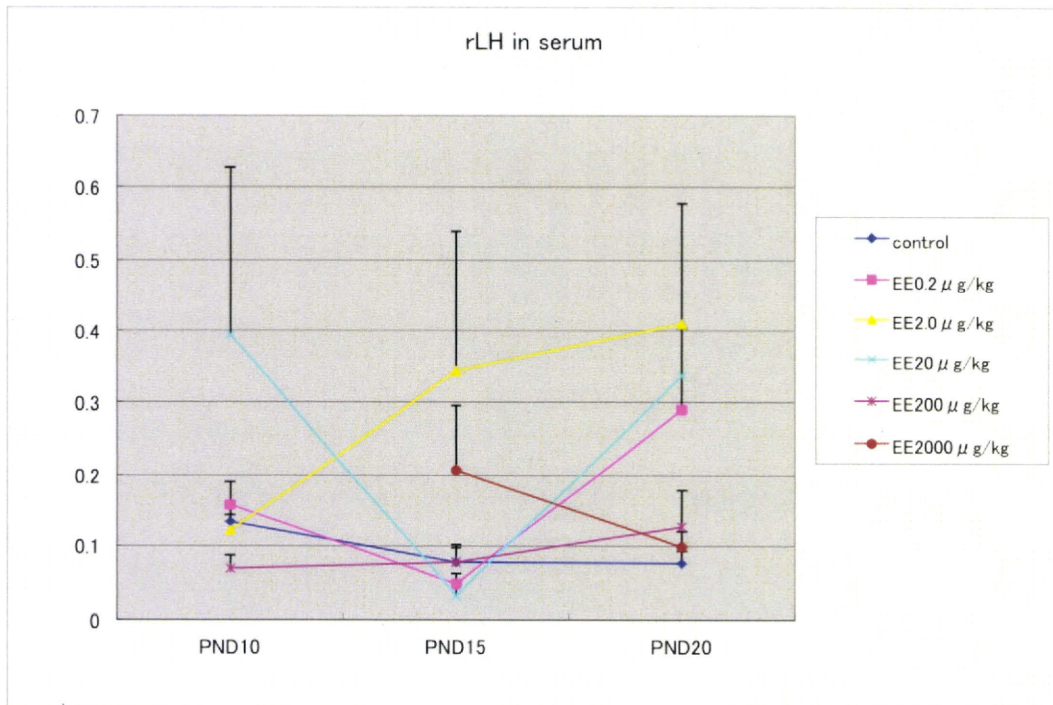


図13 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中 LH 濃度に与える影響

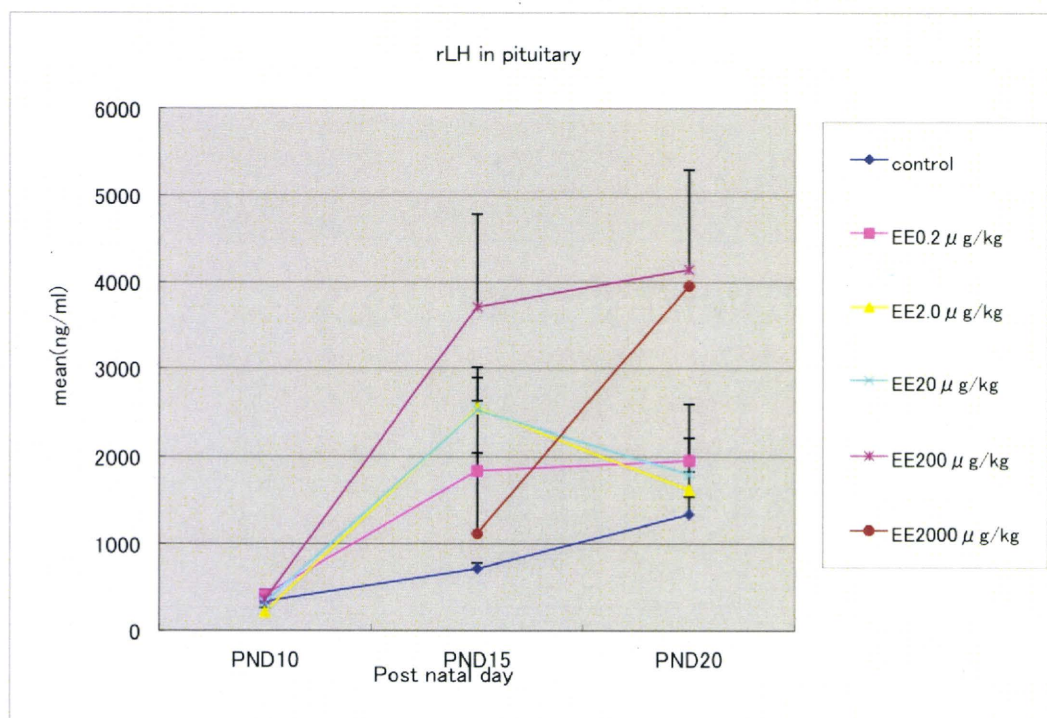


図14 新生子期 EE 単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において下垂体中 LH 含有量に与える影響

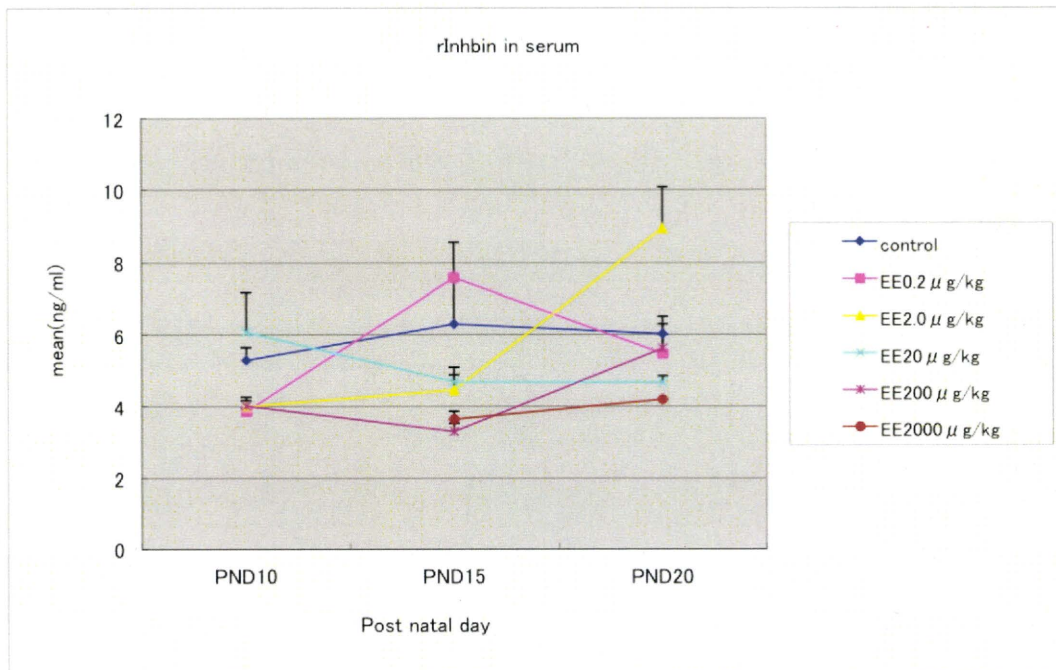


図15 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中インヒビン濃度に与える影響

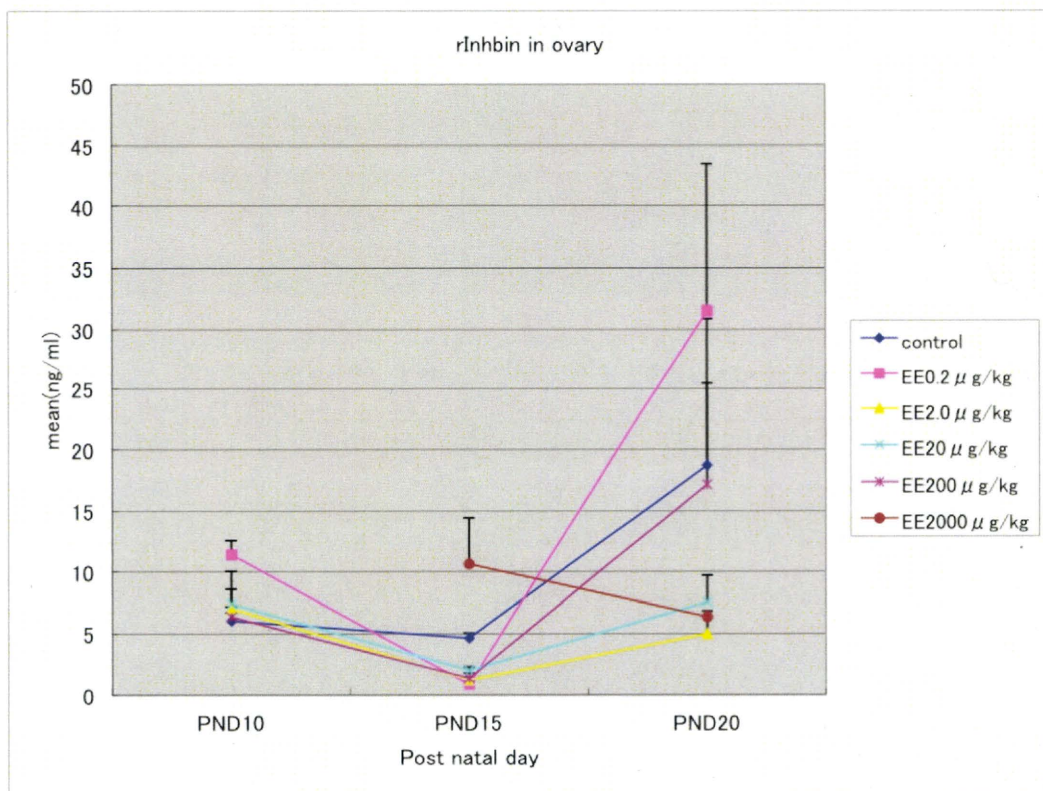


図16 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において卵巣中インヒビン濃度に与える影響

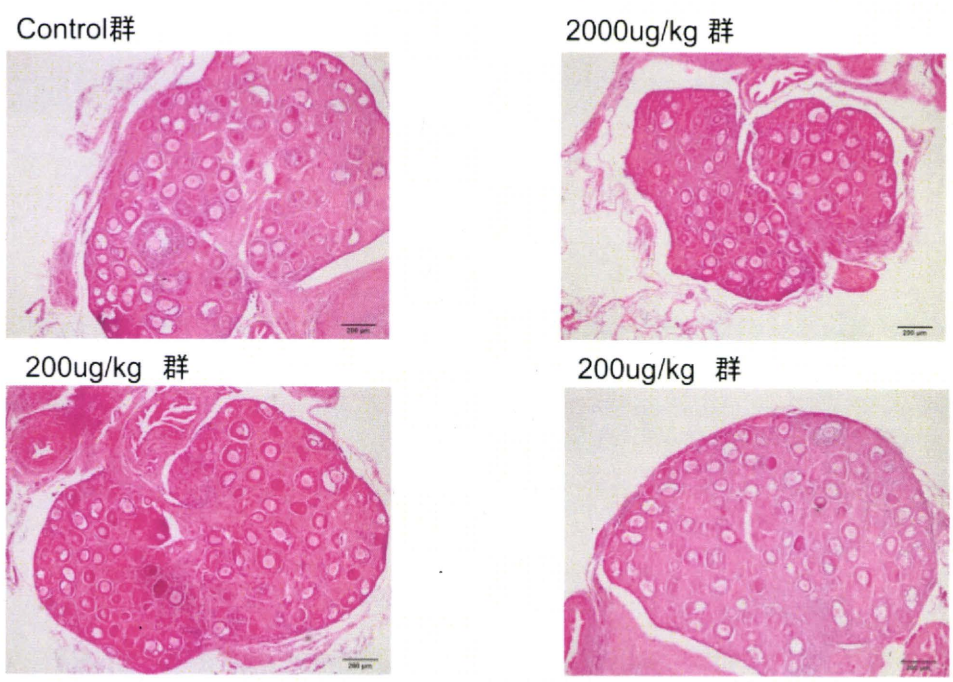


図 1 7 新生子期 EE 単回投与が 20 日齢において卵巢組織像に与える影響

PND20 卵巢異常所見



図 1 8 新生子期の EE2000 μg/kg 単回投与で 20 日齢において見られた異常卵胞

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の
機序解明と指標の確立に関する研究

分担研究課題：化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経系への遅発性影響に対す
る *in vivo* および *in vitro* 系を用いたアプローチ
－新生仔期における化学物質曝露が生後神経新生と感覚系へ及ぼす遅発型影響の検討－

研究分担者： 氏名 横須賀誠 所属 日本獣医生命科学大学

研究要旨

経口避妊薬の主成分として使用されている Ethynylestradiol（以下 EE）の新生児期曝露が、脳神経および生殖機能に及ぼす遅発型（遅発型）リスクとその機序解明の指標を確立することを目的として、生後 24 時間以内の新生仔ラットおよびマウスへの EE 投与モデルを用いて、成熟後の神経新生に及ぼす影響の評価に着手した。平成 22 年度は、マウス新生仔期における EE 曝露が海馬歯状回における神経新生に及ぼす影響を検討した。

これまでも内分泌攪乱化学物質（以下 EDC）の胎生期ならびに新生時期曝露による内分泌機能に与える影響のリスク評価が複数報告されてきた。その多くの評価系は、性成熟後の卵巣および子宮といった生殖器官あるいは脳内のエストロゲン受容体分布領域を用いたものであった。その他、海馬ニューロンやアストロサイトなど支持細胞を評価系として用いた研究も認められるが、いずれも EDC 曝露直後から 2 週間以内の急性ないし亜急性の影響を指標にしたものである。

本分担研究では、新生仔期における化学物質曝露の生涯に渡ってのリスク評価を念頭において研究を行った。生後 24 時間以内の雌雄マウス(C57BL/6J)に高濃度の EE(20,000 μ g/kg)あるいは対象群としてゴマ油を投与し、一般的な飼育環境下で 179 日齢まで飼育管理し、180 日齢に BrdU を腹腔内に投与、その 24 時間後に灌流固定して脳標本とした。海馬を含んだ脳切片標本に Anti-Dublecortin、Anti-BrdU を用いた免疫組織化学染色を施し、新生仔期に EE の投与を受けたことによる海馬歯状回における新生細胞と発生後 2 週間以内の新生ニューロンの分布パターンとその数を計測した。また、内分泌攪乱化学物質としての EE 作用が脳の性分化に及ぼすリスクを評価するために、内側視束前野（MPA）における Anti-Calbindon D-28k 免疫陽性細胞の分布パターンを観察した。

研究の結果、生後 24 時間以内における高濃度 EE 曝露による、海馬歯状回における生後の新生ニューロンの発生に顕著な影響は認められなかった。また、MPA における Anti-Calbindon D-28k の分布パターンにも顕著な影響は認められなかった。これらの結果

は、臨界期における高濃度 EE 暴露は海馬の生後神経新生ならびに MPA における albindon D-28 の雌雄差に関しては、少なくとも形態的に評価できる表現型としての影響は及ぼさないことを示している。平成 23 年度は、垂急性作用 (EE 投与後 7 日以内) ならびに離乳期直後における評価を併せて行い、EE の新生児期暴露が、脳神経および生殖機能に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクの可能性とその推移についての考察を加える計画である。

A. 研究目的

経口避妊薬の主成分として使用されている Ethynylestradiol (以下 EE) の新生児期暴露が、脳神経および生殖機能に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクの可能性とその機序解明の指標を確立することを目的として、生後 2 4 時間以内の新生仔マウスへの EE 投与モデルを用いて、成熟後の海馬歯状回の神経新生に及ぼす影響の評価に着手した。

B. 研究方法

新生仔期における化学物質暴露の生涯に渡ってのリスク評価を念頭において研究を行った。生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J: 日本クレアより購入) にゴマ油に溶かした EE (20 μ g/10 μ l sesame oil/g BW: 最終濃度 20,000 μ g/kg) あるいは対象群としてゴマ油 10 μ l/g BW を投与した。通常飼育環境下で 179 日齢まで飼育管理し、180 日齢に BrdU (50mg/kg; 生理食塩水で溶解) を腹腔内に投与、24 時間後に 0.1M リン酸緩衝液 (pH. 7.2) で調整した 4% パラフォルムアルデヒドを用いて経心臓法で灌流固定し脳標本を得た。脳標本は、凍結ミクロトーム (Yamato) により厚さ 50 μ m の連続前頭断切片を作成した。

免疫組織化学染色は浮遊法で行った。海馬を含む脳切片標本に、Anti-Doublecortin (Rabbit; Lifespan Biosciences,

LS-C36204, 1,000 倍希釈)、Anti-BrdU (Rat;

abcam ab6326, 500 倍希釈) を用いた免疫組織化学染色を施した。

また、内分泌攪乱化学物質としての EE 作用が脳の性分化に及ぼすリスクを評価するために、内側視束前野 (MPA) における Anti-Calbindon D-28k (Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈) の免疫陽性細胞の分布を観察した。発色は ENVISON キット (DAKO 社) および VECTASTAIN キット (Vecta 社) を用いた ABC 法による DAB 発色、ならびに、二次抗体として Alexa Fluor Dye 488 (Molecular Probes) を用いた蛍光免疫組織化学染色で行った。

(倫理面への配慮)

使用動物への EE 投与ならびに BrdU 投与に関して、最低限の保定時間になるように心がけた。また、灌流固定を施す際には、ソムノペンチール (50mg/kg BW) による深麻酔を施した後に行った。

C. 研究結果

1) 内側視束前野 (MPA) における Calbindon D-28k 分布の性差

対照群の MPA における Calbindon D-28k (以下 CB) 免疫陽性細胞の分布には雌雄差が認められる (図 1、図 2)。すなわち、雄では MPA の中心領域に CB 免疫陽性細胞の大

きな塊が観察されるが(図2)、雌の同領域ではこのような集合は観察できない(図1)。この所見を指標にして、新生仔期 EE 投与を受けた雌雄マウスの MPA における CB 陽性細胞の分布パターンを調べた。

その結果、EE 投与による MPA における CB 陽性細胞の分布への明瞭な影響は認められなかった(図3)。

2) 海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞の分布

生後 24 時間以内における高濃度 EE 暴露が海馬歯状回における細胞新生への影響を検討した。その結果、対照群の雌雄と比較しても EE 暴露による顕著な影響は認められなかった(図4)。この傾向は海馬歯状回全領域にわたって認められた(図6: BrdU + cells)。

3) 海馬歯状回における Duplecortin 免疫陽性細胞の分布

生後 24 時間以内における高濃度 EE 暴露が海馬歯状回における神経新生への影響を Duplecortin 免疫陽性細胞数によって検討した。その結果、BrdU 取り込み細胞と同様に、対照群の雌雄と比較しても EE 暴露による顕著な影響は認められなかった(図5)。この傾向は海馬歯状回全領域にわたって認められた(図6: DCX cells)。

4) 海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞および Duplecortin 免疫陽性細胞数

生後 24 時間以内における高濃度 EE 暴露が海馬歯状回における神経新生への影響を BrdU 取り込みおよび Duplecortin 免疫陽性細胞数によって検討した。解析は、市販の

マウス脳地図(Mouse Brains, Hof et al., 2000; Elsevier)に従って、海馬歯状回を含む全ての切片を用いて行った。統計解析は PRISM version 4 (GraphPad) を用いて行った。その結果、海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞数と Duplecortin 免疫陽性細胞数は、いずれも、対照群の雌雄と比較して EE 暴露による顕著な影響は認められなかった(図6)。

5) 海馬における Duplecortin 免疫陽性細胞の樹状突起の形態

生後 24 時間以内における高濃度 EE 暴露が海馬歯状回における神経新生への影響を Duplecortin 免疫陽性細胞の樹状突起の形態への影響が認められるか否かを検討した。しかし、EE 投与群と対照群の間で樹状突起の形態に有意な差は認めなかった(図7)。

D. 考察

以上の結果は、臨界期における高濃度 EE 暴露は海馬の生後神経新生ならびに MPA における calbindin D-28 の雌雄差に形態的に評価できる表現型としての影響は及ぼさないことを示唆している。内分泌攪乱物質の新生仔暴露は、脳の性分化に若干の影響が及ぶ可能性はあるが、生後神経新生に及ぼすリスクは少ないと考えられる。

E. 結論

EE の新生児期暴露が生後神経新生に及ぼす晩発型(遅発型)リスクの可能性とその機序解明の指標を確立することを目的として、生後 180 日の海馬歯状回における BrdU の取り込みならびに新生ニューロンマーカーである Duplecortin の免疫染色性を指標

に検討した。その結果、成体における新生細胞数には有意な影響は確認できなかった。しかし、発育期（生後 21 日以内）や繁殖期（生後 90 日前後）における影響は検討していないため、今回の結果のみから必ずしも晩発性リスクが無いとは断言できない。

近年、性ステロイド作用を受けた海馬新生神経細胞の増殖が、ストレス負荷に対する脳の機能的脆弱性と関連している可能性が示されている。23 年度は発育期ならびに繁殖期における海馬神経新生への影響を検討に加え、さらに形態的には影響が認められなかった生後 180 日の海馬神経新生がストレス負荷によって細胞増殖性に変化が認められるようになるかの解析をする必要性がある。

F. 研究発表

該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

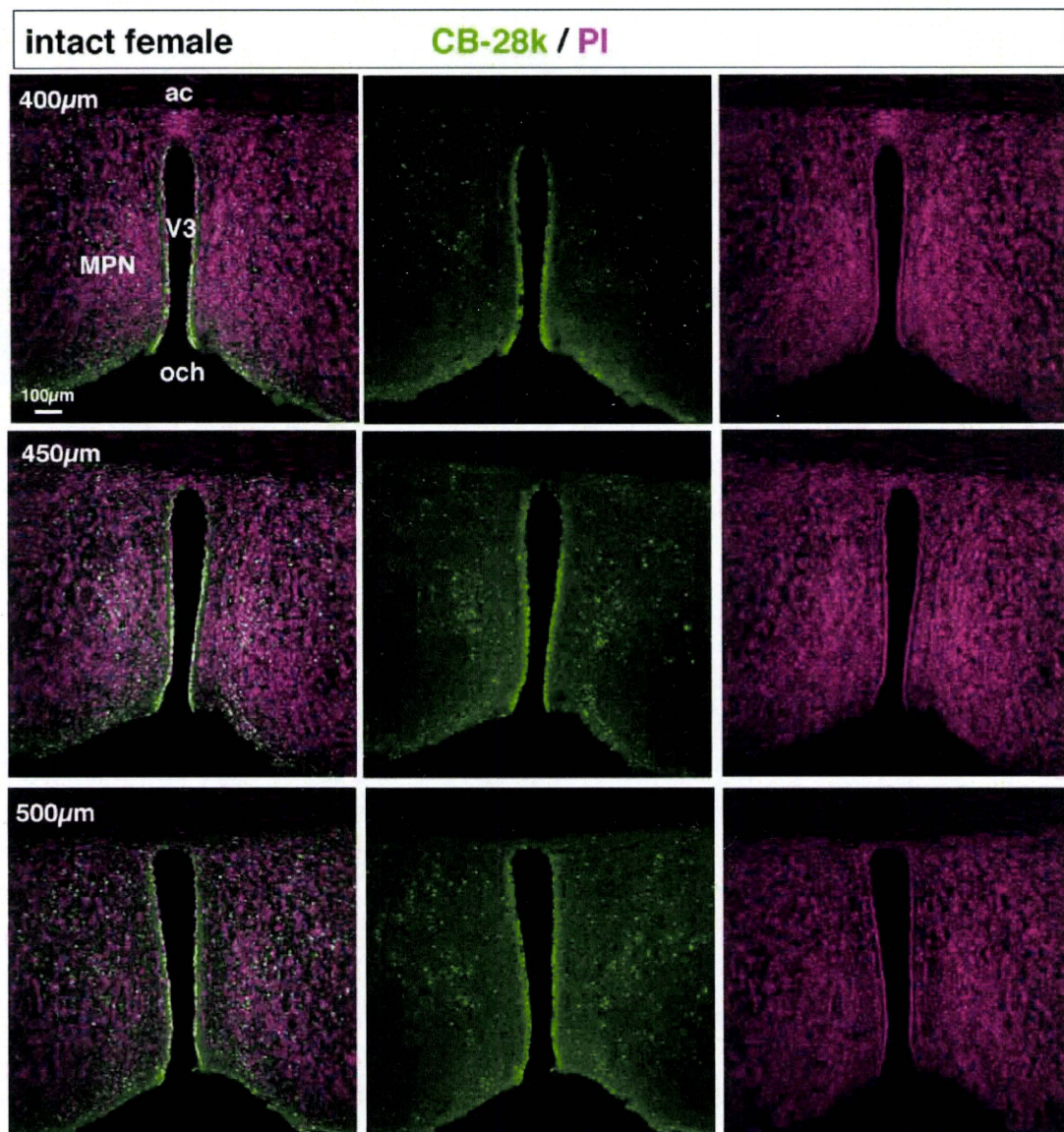


図1：雌マウス（生後180日齢）の内側視束前野におけるCalbindin D-28k（CB-28k）免疫陽性細胞の分布。前頭断の方向で厚さ50 μ mの連続切片を作製した。内側視束前核（MPN）を含む3枚の連続切片。二次抗体としてAlexa Fluor Dye 488 を用いた蛍光免疫組織化学染色による画像。MPNを中心にしてCB-28k免疫陽性反応を示す細胞の分布が認められる。

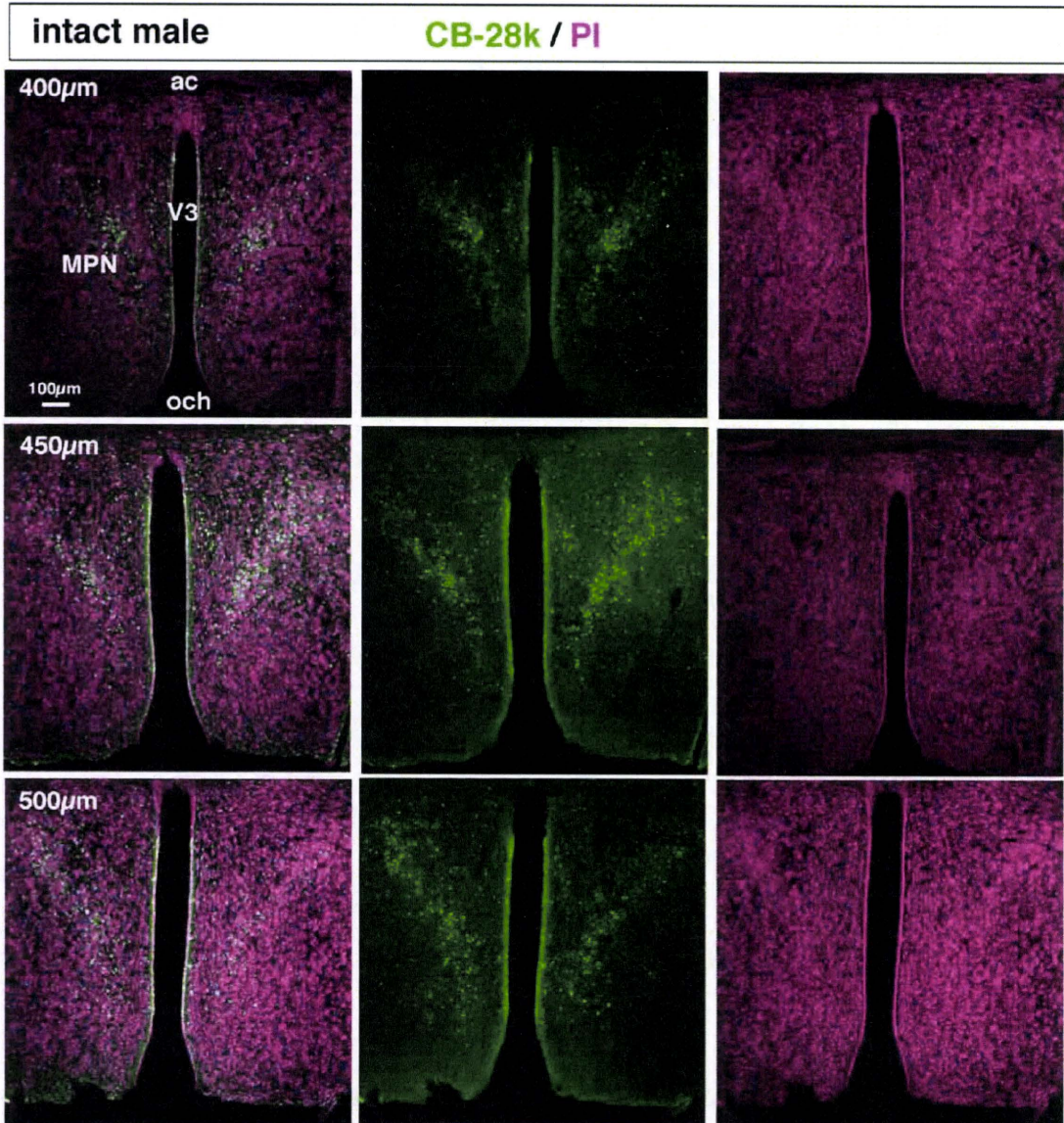


図2：雄マウス（生後180日齢）の内側視束前野におけるCalbindon D-28k（CB-28k）免疫陽性細胞の分布。前頭断方向で50 μ m厚の連続切片を作製した。内側視束前核（MPN）を含む3枚の連続切片。二次抗体としてAlexa Fluor Dye 488 を用いた蛍光免疫組織科学染色による画像。MPNを中心にしてCB-28k免疫陽性反応を示す細胞の分布が認められる。同領域の雌マウス（図1）に比べて、MPNを中心としたCB-28k免疫陽性細胞の分布密度が高いことが分かる。