

図3：生後24時間以内にEthinylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg) あるいは対象群（ゴマ油）を投与した雌雄マウス（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 $\mu$ m厚の連続切片を作製した。一次抗体の染色はENVISONキット（DAKO社）を用いたDAB発色によって行った。図1および図2で示した蛍光染色と同様に、対照群の雄では内側視束前核（MPN）を中心にCB-28k免疫陽性反応細胞が集中して分布する領域が認められる。一方、雌ではCB-28k陽性細胞の集中した分布は認められない。EE投与群の雌雄を比較してみると、雄では対照群と同様にMPNを中心としたCB-28k免疫陽性反応細胞の集中分布が認められた。雌においてはMPNにおける若干のCB-28k免疫陽性反応細胞の集中分布を認める個体もみられたが、顕著な変化としては認められなかった。

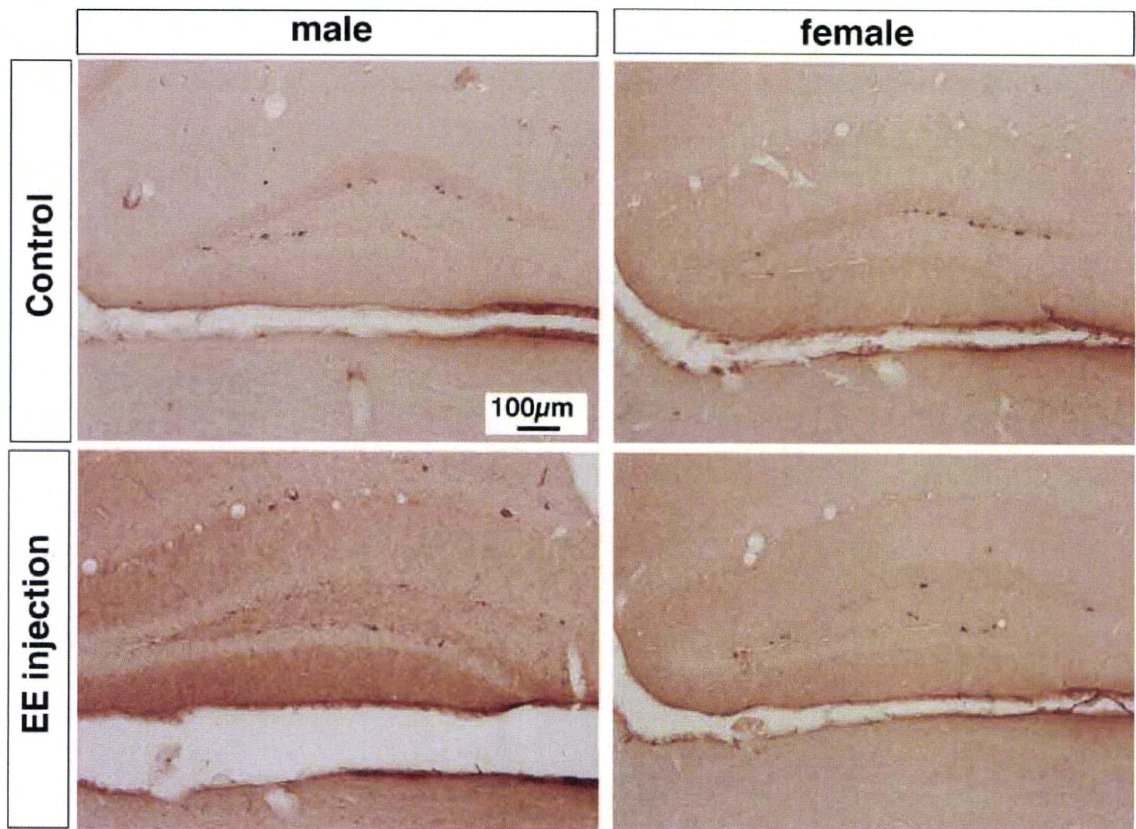


図4：生後24時間以内にEthinylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg)あるいは対象群(ゴマ油)を投与した雌雄マウス(生後180日齢)の海馬歯状回におけるBrdU取り込み細胞の分布。前頭断方向で50 $\mu$ m厚の連続切片を作製した。一次抗体の染色はVECTASTAINキット(Vecta社)を用いたDAB発色によって行った。

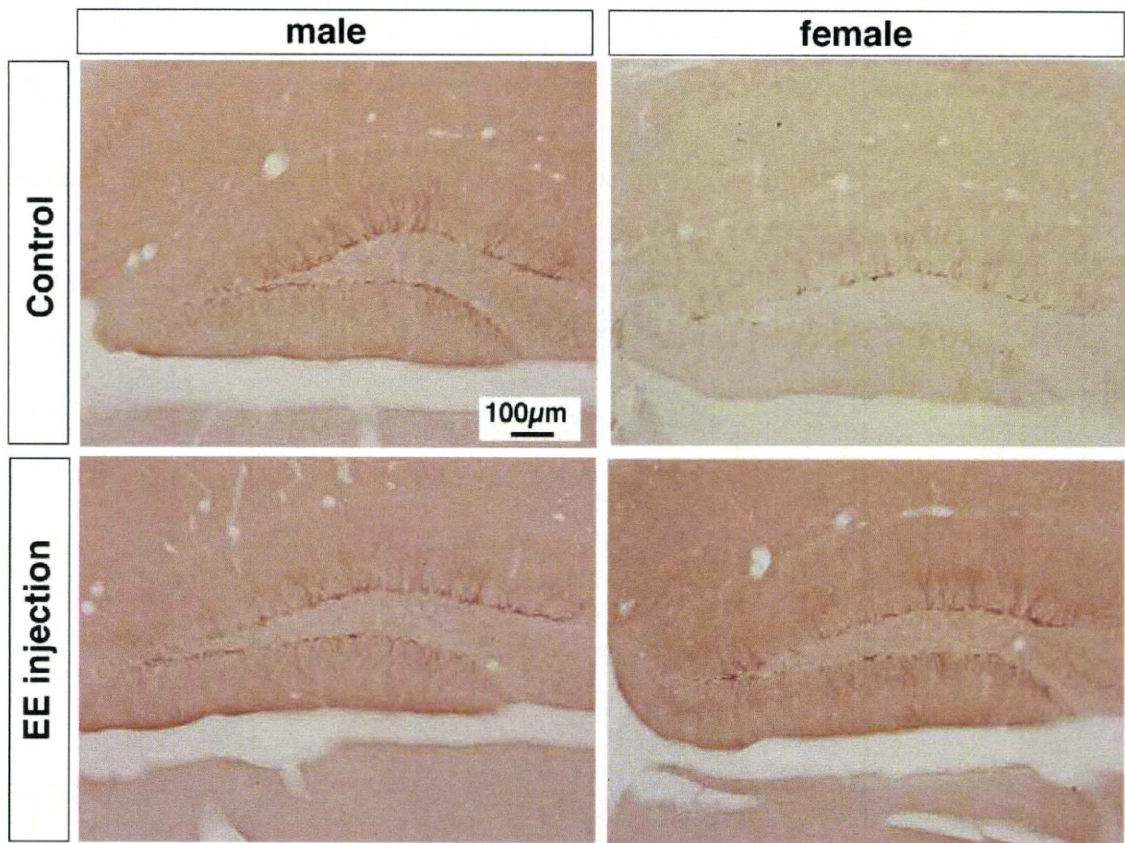


図5：生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000µg/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後180日齢) の海馬歯状回における Duplecortin 免疫陽性細胞の分布。前頭断方向で50µm厚の連続切片を作製した。一次抗体の染色は VECTASTAIN キット (Vecta社) を用いた DAB 発色によって行った。

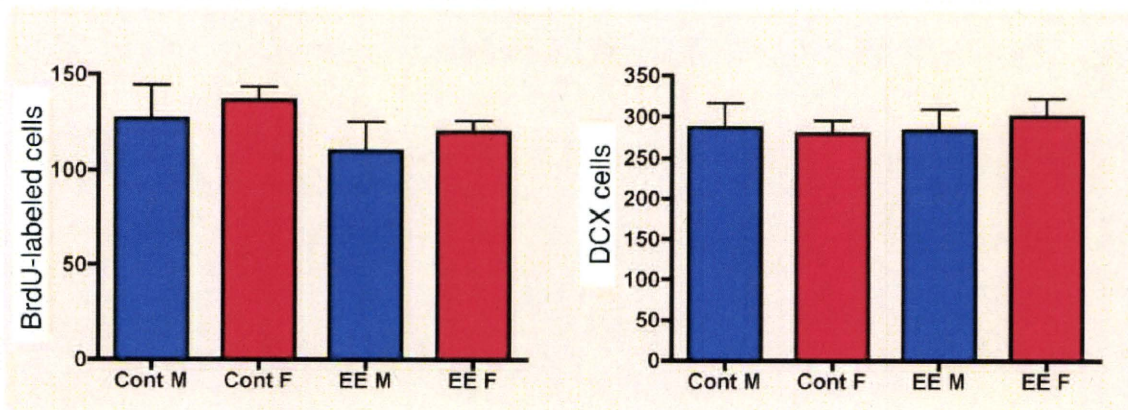


図6：生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000µg/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後180日齢) の海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞数と Duplecortin 免疫陽性細胞数。処理群の間に有意な差は認められなかった。Cont M: 対照

群の雄、Cont F: 対照群の雌、EE M: EE 投与の雄、EE F: EE 投与の雌

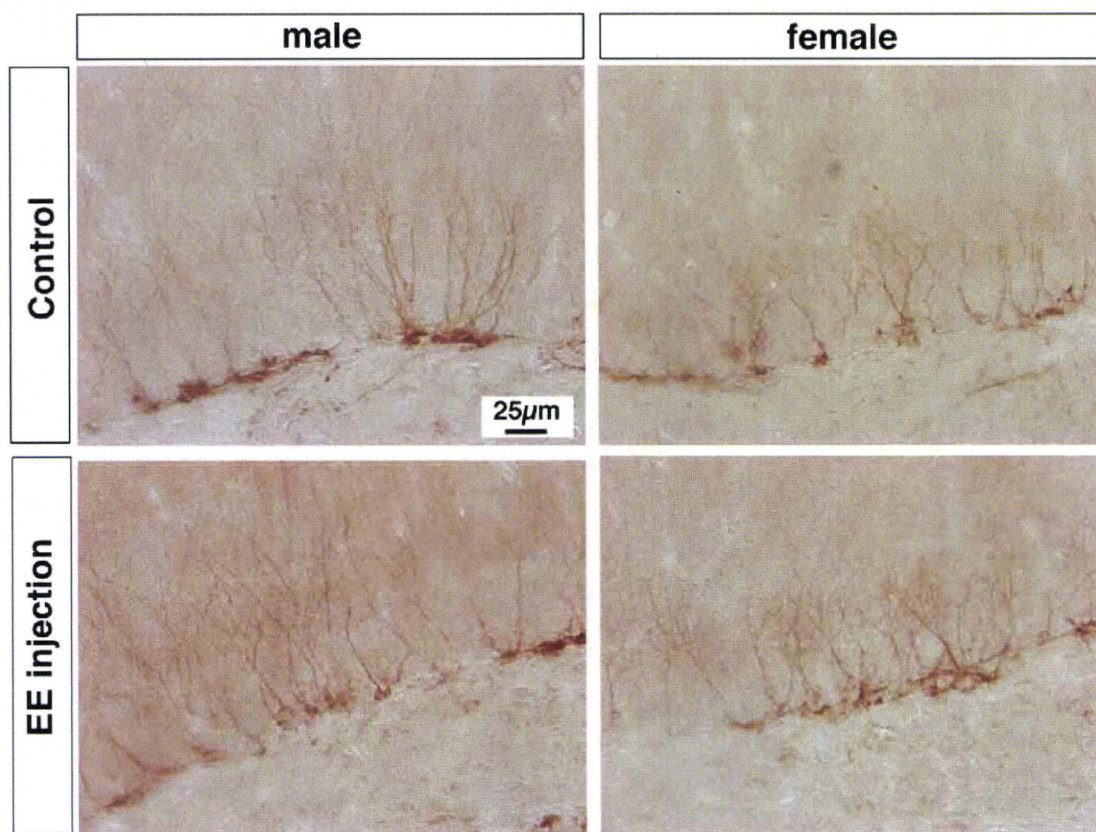


図7: 生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後180日齢) の海馬歯状回における Dube cortin 免疫陽性細胞の樹状突起の比較。一次抗体の染色は VECTASTAIN キット (Vecta 社) を用いた DAB 発色によって行った。樹状突起の形態は群間で顕著な差は認められなかった。

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内分泌系への遅発型影響に対する神経行動学的アプローチ

研究分担者： 氏名 川口真以子 所属 武蔵野大学薬学部

**研究要旨**

本研究は臨界期にエストロゲン様物質 (EDs) を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とする。本年度は行動学的解析により遅発型影響を明らかにすることを目指し、EDs のひとつである isobutyl-paraben の発達期を通じた曝露が不安行動促進、学習・社会性行動低下および摂食行動促進を示すこと、EDs である ethinylestradiol の臨界期における低濃度曝露は学習能力を低下させる一方不安行動には影響を及ぼさないこと、高濃度曝露では有意な影響が現れないことを明らかとした。

**A. 研究目的**

エストロゲンは脳に構造的、機能的な変化を引き起こすことが知られ、その作用は形成的作用と機能的作用とに分けられると考えられている。エストロゲンの形成的作用は出生前後の一時期におこる不可逆的なもので、未発達で可塑性に富んだ神経組織に作用して神経細胞の形態や神経回路を固定化する (1, 2)。従って、この時期にエストロゲン様作用をもつ化学物質 (EDs) に曝露されると、正常な脳の分化が阻害される場合がある (3, 4)。一方、機能的作用は神経細胞や神経回路の活動を賦活するもので、可逆的である。多くの場合、形成的作用がホルモンによって引き起こされる神経機構に対し、発達後に機能的作用が認められる。エストロゲンが作用する神経機構は、生殖、摂食、情動、高次機能と多岐にわたり、その多くは遅発型影響である (5, 6)。しかし発達期 EDs 曝露が引き起こす神経機構への遅発型影響の機序は一部しか解明されていない。

そこで本研究では発達期に EDs を曝露し、行動変化および神経内分泌系の変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とした。本年度は特に行動学的解析により遅発型影響を明らかにすることを目指した。

**B. 研究方法**

発達期 EDs 曝露の行動への遅発性影響の機序を解明するために、研究代表者が計画した臨界期 SD ラットへの ethinylestradiol (EE) の皮下投与、あるいは発達期全体を通じた母ラットへの isobutyl-paraben (IBP) 皮下投与を行い、成熟後の学習・不安行動の検討を各種行動実験により行った。

[1] IBP 曝露実験

食品、化粧品、医薬品などの保存料として使用される IBP をシリコンチューブに詰めて Sprague-Dawley (SD) 系メスラットの皮下に埋め込んで慢性曝露を行い、交配させた。生後 4 日目に一腹あたり雌雄 4 匹ず

つになるよう調整した。実験はすべて、一腹から一匹の仔ラットを用いて実験を行った。行動神経内分泌学的解析のため、5週齢でオープンフィールド試験、6週齢で高架十字試験、7~8週齢で摂食行動測定、9週齢で $\mu$ CTを用いた体組織測定、11週齢で受動回避学習テストと水迷路試験、12週齢で拘束ストレス負荷時のコルチコステロン濃度、16週齢で社会性認知テストを試行した。また、性周期の影響を排除するため、7週齢でメスの卵巣を除去し、cholesterolあるいは20%17 $\beta$ estradiolを充填したシリコンチューブを投与した。摂食行動測定は無処置と上記処置の両方を測定した。

#### [2] EE 曝露実験

医薬品や化粧品の成分として使用されるEEをごま油に溶解し、2  $\mu$ g/kg、8 mg/kgあるいはごま油を生後1日目のSD系仔ラットに皮下投与した。その際、一腹あたり雌雄4匹ずつになるよう調整した。実験はすべて、一腹から一匹の仔ラットを用いて実験を行った。行動神経内分泌学的解析のため、4週齢でオープンフィールドテスト、5週齢で高架十字テスト、7週齢でガラス玉覆い隠し試験、8週齢で受動回避学習試験、9週齢で強制水泳試験を試行した。メスラットは膣スメアを指標に、ガラス玉覆い隠し試験は発情前期および発情休止期に、受動回避学習試験は第一日目に発情期様細胞像を示した日に行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は武蔵野大学生命倫理規定に従い、薬学研究所動物実験委員会委員の許可の下で行った。行動実験はラットに対し堪え難い程の苦痛を与えないレベルで行った。

#### C. 研究結果

本年は発達期全体のIBP曝露が不安行動促進、学習・社会性行動低下および摂食行動促進を示すこと、臨界期の低濃度EE曝露は学習能力を低下させ、高濃度EE曝露は学習・不安行動に影響を及ぼさないことを明らかにした。

#### [1] IBP 曝露実験

発達期を通じたIBP曝露は、オスラットの高架十字試験における不安行動を促進し、受動回避学習試験の成績を低下させ、メスの社会性認知を低下させる一方、活動量及び空間学習には影響を与えなかった。また、卵巣除去あるいは性周期が停止したメスラットの摂食行動と体重増加を促進した。

#### [2] EE 曝露実験

臨界期の2  $\mu$ g/kg EE曝露は、メスラットの受動回避学習試験の成績を低下させる一方、一般・不安行動および体重には影響を与えなかった。また、8 mg/kg EE曝露では、メスラットの学習能力の低下傾向はあるものの、有意な影響は認められなかった。

#### D. 考察

曝露物質による不安行動への影響の違いは、各々のEDsのエストロゲン様作用以外の物質の特性が関与していることもあり得るが、曝露期間、曝露濃度および投与経路の違いが影響している可能性が高いと思われる。特に、IBPは母ラットへの慢性曝露をしており、その結果、離乳時の母ラットにおいて子宮重量が増大した一方、ストレス応答の要である血中コルチコステロンが半減したことが報告されている(7)。これらの変化は、IBPのエストロゲン様作用を反映していると考えられるが、妊娠期のコルチコステロン濃度の変化やストレス負荷は、仔の成熟後の行動やストレス応答に影響を及ぼすことが知られており(8, 9)、本実験のIBP曝露が引き起こした影響は母ラットのコルチコステロン濃度の変化が引き起こした間接作用を含んでいる可能性が高い。

EEの臨界期曝露においては、本実験では低濃度である2  $\mu$ g/kgでメスラットの受動回避学習能力の低下が示された一方、高い濃度である8 mg/kg曝露においては有意な影響が認められなかった。これは、過去の報告でも示されたように、EDsの影響が必ずしも濃度依存性に増加するわけではないことを示している(10, 11)。一方、8 mg/kg

では卵巣の病理学的変化は検出された（代田報告書参照）。したがって、臓器や機能により影響が検出される濃度には差異があることが本研究でも示された。

また、今回の実験では、膣スメア像を指標とした性周期に合わせて受動回避学習試験を試行したが、膣スメア像が不明瞭な個体もいたため、内因性ホルモンの濃度変化が学習試験に影響している可能性を除外できない。そこで今後、未成熟ラット等を用い、性周期の影響を除外した状態での受動回避学習試験の能力を検討する。また、受動回避学習試験は恐怖に基づく学習・記憶の試験であり、その結果には学習・記憶能力とともに、恐怖に対する感受性が反映される。そこで、恐怖に基づかない学習試験である新規物体認知試験および社会性認知試験について引き続き検討し、EE曝露が影響する脳機能を絞り込む。

発達期全体のIBP曝露は、無処置雌雄ラットの7週齢における摂食行動と体重には影響を及ぼさなかったが、卵巣除去あるいは性周期が停止したメスラットの摂食行動と体重増加を促進した。EE曝露の臨界期曝露は無処置ラットの体重には有意な影響を及ぼさなかったが、IBP曝露のようにホルモン環境の変化で影響が顕在化する可能性もある。今後、卵巣摘出時等の摂食行動・体重変化についても検討する。

## E. 結論

発達期全体のIBP曝露は、オスラットの不安行動を促進して学習能力を低下させ、メスラットの社会性認知を低下させた。一方同じEDsであるEEの臨界期曝露は、メスラットの学習能力を低下させる一方、雌雄ともに不安行動には影響を及ぼさなかった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Kawaguchi, M., Morohoshi, K., Imai H., Morita, M., Kato, N., and Himi, T. Maternal exposure to isobutyl-paraben

impairs social recognition in adult female rats. *Exp. Anim.*, 2010, 59(5), 631-5.

### 2. 学会発表

1) 川口真以子, 諸星佳織, 渡辺元, 堀井康行, 田谷一善, 森田昌敏, 今井秀樹, 加藤進昌, 氷見敏行

Maternal isobutyl-paraben induce obesity in female rats

第87回日本生理学会（2011年5月20日、盛岡）

2) 堀井康行, 川口真以子, 太田亮, 槇原弘子, 嶋田努, 油田正樹, 渡辺元, 氷見敏行, 田谷一善

雌 Hatano 高回避系 (HAA) および低回避系 (LAA) ラットの社会性・不安・学習行動に関する研究

第150回日本獣医学会学術集会（2010年9月16日、帯広）

3) 丹羽鈴夏, 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 橋倉千聖, 布目唯, 市川千穂, 小澤愛, 堀井康行, 渡辺元, 田谷一善, 氷見敏行

Hatano 高回避 (HAA) 系および低回避 (LAA) 系雄ラットの不安・社会性行動

第131回日本薬学会（2011年3月、静岡、東日本大震災により大会中止）

4) 橋倉千聖, 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 丹羽鈴夏, 遠藤萌, 篠原理美, 外川哲也, 嶋田努, 油田正樹, 氷見敏行

Hatano 高回避系 (HAA) および低回避系 (LAA) 雌ラットの一般・不安行動

第131回日本薬学会（2011年3月、静岡、東日本大震災により大会中止）

5) 川口真以子, 太田亮, 平野顕宏, 丹羽鈴夏, 橋倉千聖, 堀井康行, 渡辺元, 田谷一善, 氷見敏行

Social interaction and anxiety-related behaviors in intact Hatano High- and Low-Avoidance rats  
第 151 回日本獣医学会学術集会 (2011 年 3 月、東京、東日本大震災により大会中止)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

7. 特許取得  
なし
8. 実用新案登録  
なし
9. その他  
なし

(1) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J, Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, Epub ahead of print.

(2) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain., Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, et. al., *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21, 553-61.

(3) Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, et. al., *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010, 89, 441-66.

(4) Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences., Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, et. al., *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2008, 109, 294-9.

(5) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice., Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, et. al., *Environ Res*. 2008, 108, 150-7.

(6) Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data., Rasier G, Toppari J, Parent AS, et. al., *Mol Cell Endocrinol*. 2006, 254-255, 187-201.

(7) Maternal isobutyl-paraben exposure decreases the plasma corticosterone level in dams and sensitivity to estrogen in female offspring rats., Kawaguchi M, Morohoshi K, Masuda J, et. al., *J Vet Med Sc.*, 2009, 71, 1027-33.

(8) Maternal glucocorticoid deficit affects hypothalamic-pituitary-adrenal function and behavior of rat offspring., Wilcoxon JS, Redei EE, *Horm Behav*, 2007, 51, 321-7.,

(9) Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy., Mueller BR, Bale TL, *J Neurosci*. 2008, 28, 9055-65.

(10) Neonatal bisphenol-A exposure alters rat reproductive development and ovarian morphology without impairing activation of gonadotropin-releasing hormone neurons., Adewale HB, Jefferson WN, Newbold RR, et. al., *Biol Reprod*, 2009, 81, 690-9.

(11) Perinatal bisphenol A affects the behavior and SRC-1 expression of male pups but does not influence on the thyroid hormone receptors and its responsive gene. Xu X, Liu Y, Sadamatsu M, et. al., *Neurosci Res*, 2007, 58, 149-55.

厚生労働科学研究費

「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」

エストロゲン様物質の周生期曝露が引き起こす行動学的影響評価

明治大学農学部農学科  
動物環境学研究室  
川口真以子

Estrogen (E2) が引き起こす作用

形成的作用

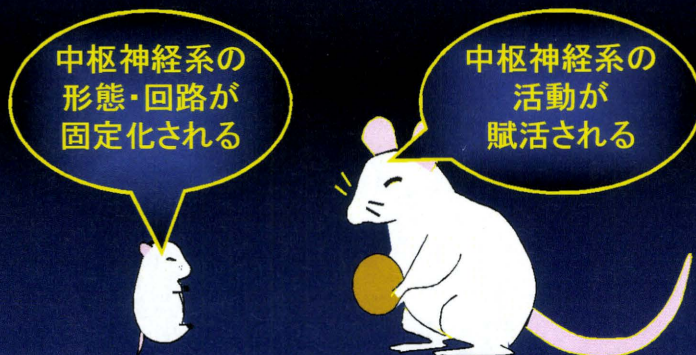
不可逆的  
出生前後の一時期

中枢神経系の  
形態・回路が  
固定化される

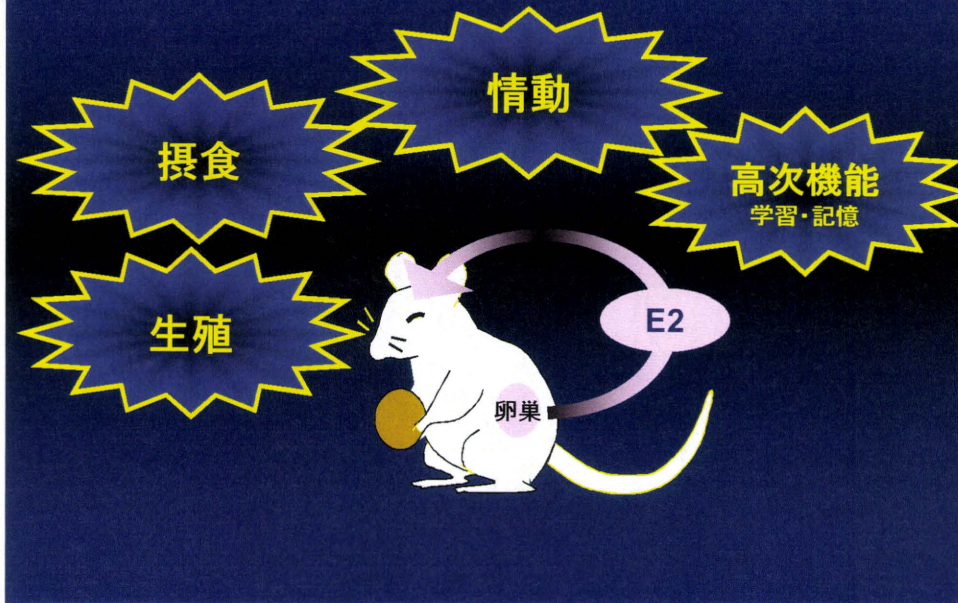
機能的作用

可逆的  
主に成熟後

中枢神経系の  
活動が  
賦活される



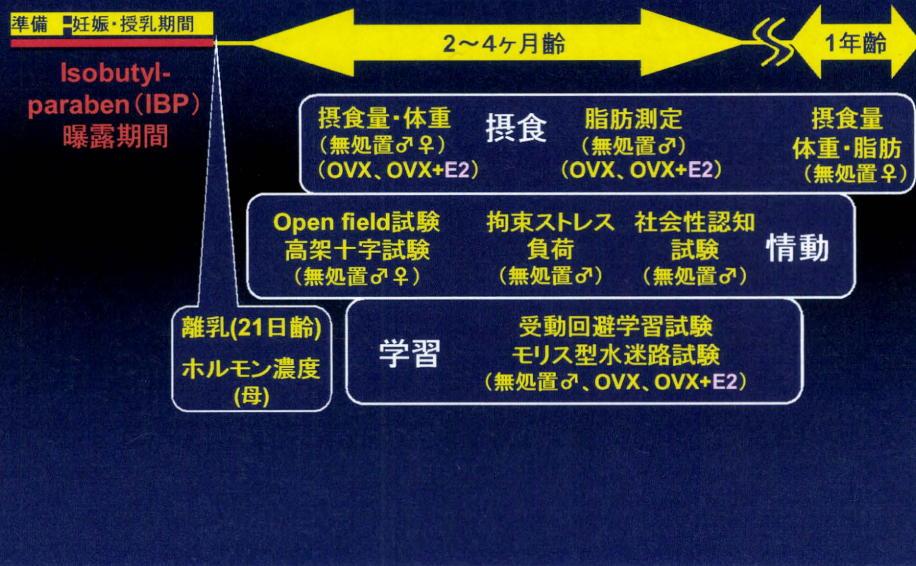
## E2が作用する中枢神経系の機能



## Isobutyl-parabenは どのようなものに含まれているか



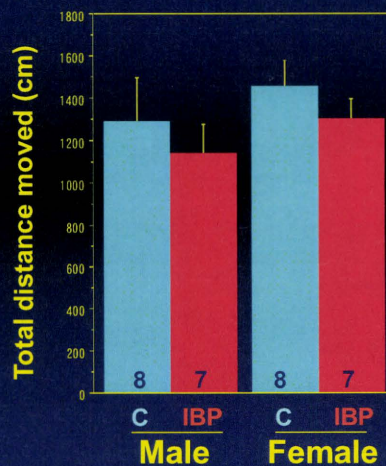
母経由で曝露されたIsobutyl-parabenは  
オスの不安行動と受動回避学習成績、  
メスの社会性認知と摂食行動を変化させる



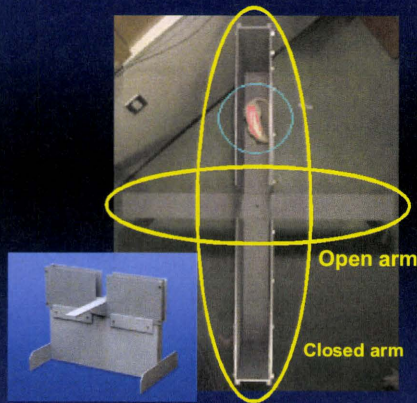
オープンフィールド試験において対照群(C)と  
Isobutyl-paraben曝露群(IBP)の間には  
有意差はなかった



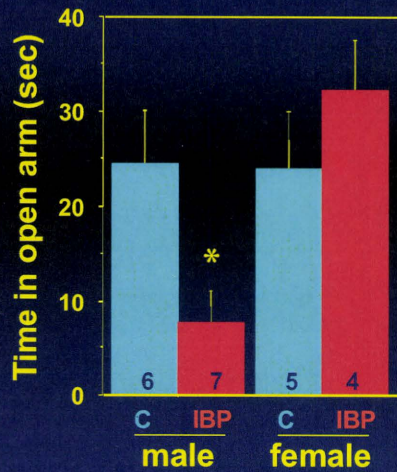
オープンフィールド



高架十字試験において  
雄ではIBP曝露群の不安行動が  
対照群に対して有意に増加した



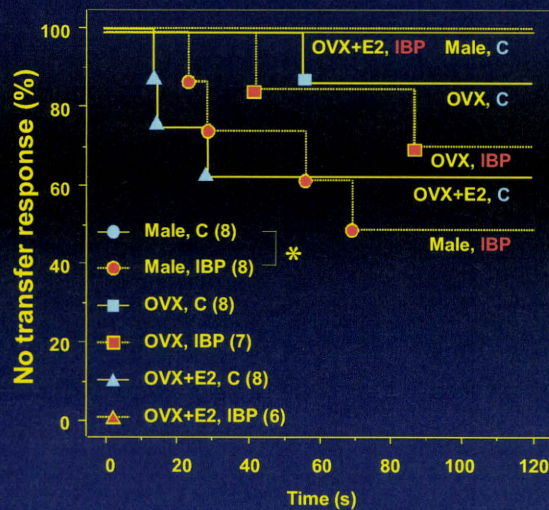
高架十字



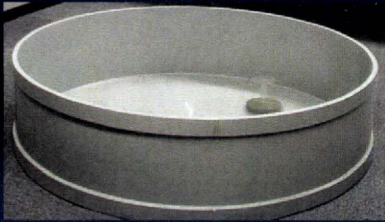
受動回避学習試験において  
雄ではIBP曝露群の学習成績が  
対照群に対して有意に低下した



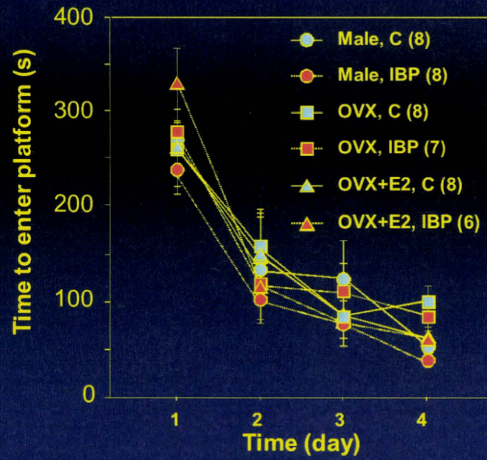
受動回避学習装置  
(明暗箱)



モリス型水迷路試験において対照群とIBP曝露群の間には有意差はなかった



モリス型水迷路

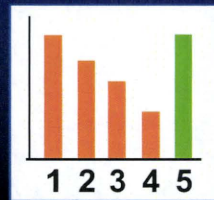


社会性認知試験とは

個別飼育10日間  
ハンドリング、フィールドへの馴化3日間



10 min interval

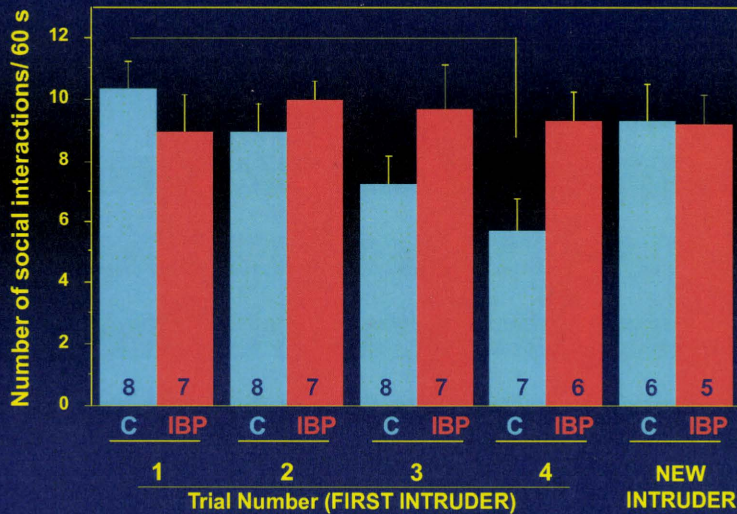


FIRST INTRUDER

NEW INTRUDER

Videotaped  
for 60 s each

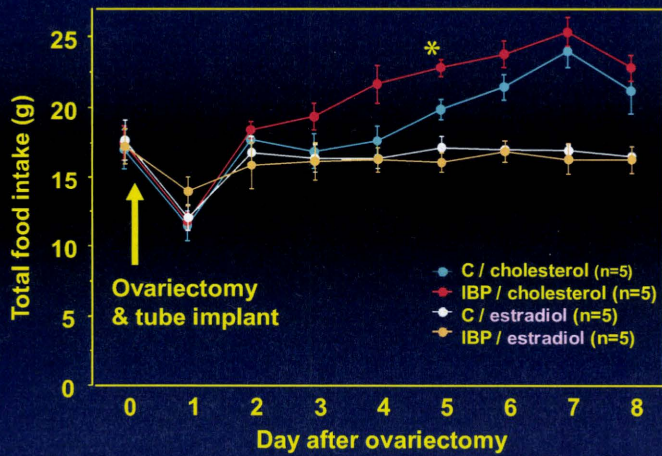
卵巣除去したメスにおいて、対照群ではintruderとの  
繰り返し接触により社会性行動が有意に下がったが、  
IBP曝露群では下がらなかった



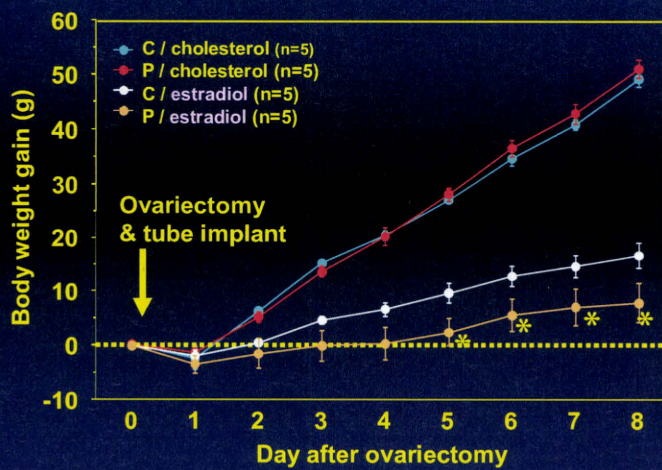
### 周生期Isobutyl-paraben曝露の 情動・学習への影響

- ・ オスの高架十字テストにおける不安行動を促進する
- ・ オスの空間学習には影響を与えないが、受動回避学習テストの成績を低下させる
- ・ 少なくともメスの社会性認知を低下させる

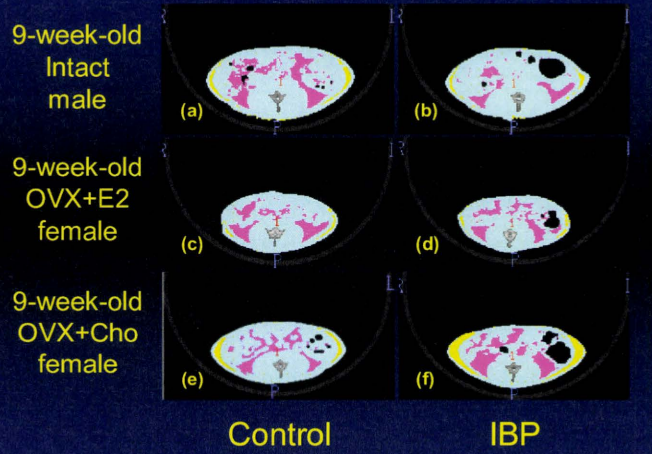
卵巣除去後の摂食量は  
化学物質曝露群で有意に増加した



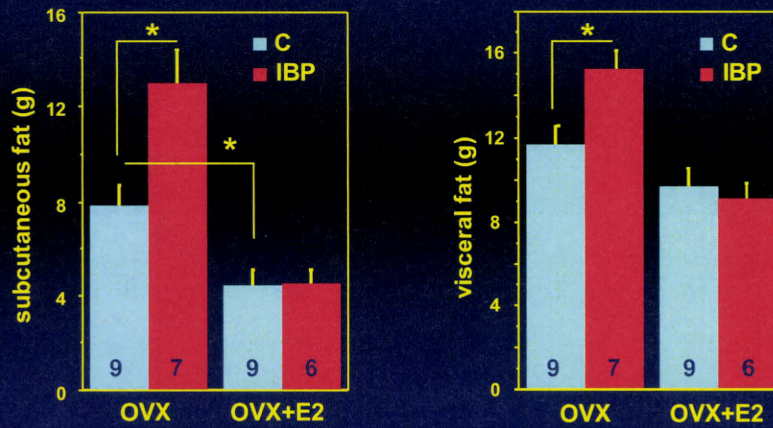
Estrogen投与による体重増加抑制は  
化学物質曝露群で有意に大きかった



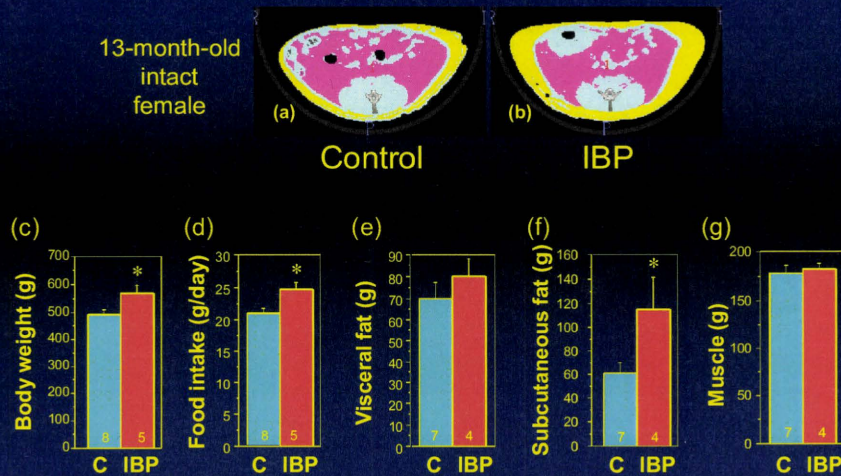
## 卵巣除去後の皮下脂肪・内臓脂肪



## 卵巣除去後の皮下脂肪・内臓脂肪は IBP曝露群で有意に増加した



1年齢メスラットの摂食量、体重および皮下脂肪量は  
IBP曝露群で有意に増加した



周生期Isobutyl-paraben曝露の  
摂食・代謝への影響

- ・ Estrogen投与によるOVXラットの体重減少が促進される
- ・ OVXおよび性周期が停止したメスラットにおいて摂食量増加が亢進し、体重が増加する
- ・ 内臓脂肪蓄積はOVX時のみ、体重増加は性周期が停止したラットでのみ、IBP曝露により促進される

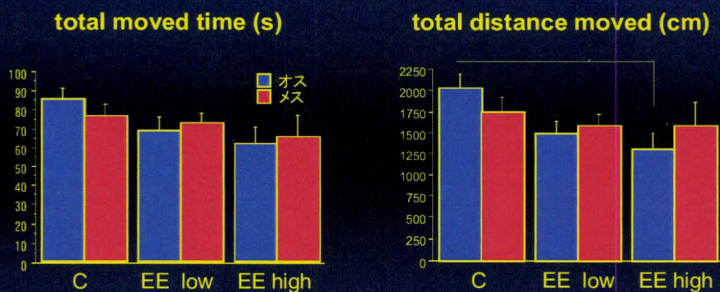
## 本研究の目的

- エチニールエストラジオール(EE)が作用する中枢神経系機能への遅発性影響評価の確立
- 遅発性影響が引き起こされる機序の解明
- 早期指標の確立

SD系PD1仔ラットにごま油(C)、2ug/kgEE(EE low)、  
8mg/kgEE(EE high)を投与し、  
以下の試験を行った

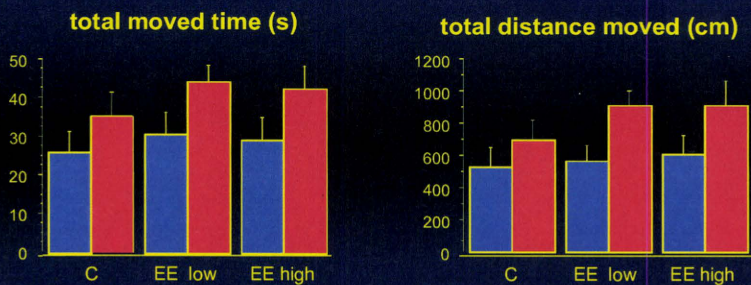
- オープンフィールド試験(一般・不安行動): 4週齢
- 高架十字試験(不安行動): 5週齢
- ガラス玉覆い隠し試験(不安行動): 7~8週齢
- 受動回避学習試験(学習行動): 8週齢
- 強制水泳試験(うつ様行動): 9週齢
- 体重測定: 4・5・8・11週齢

4週齢のオープンフィールド試験においてオスの総移動距離が対照群に対し、8mg/kgEE(EE high)で有意に低下した



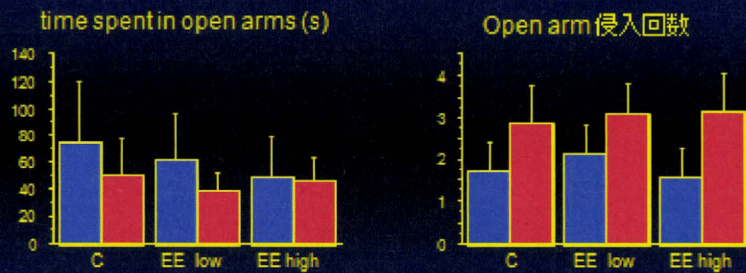
ただし、実験場所に移動した翌日に実験を行ったため、ストレスがかかっている可能性がある

高架十字試験の活動量においては有意な影響は検出されなかった



基本的な活動量はこちらのほうが信頼性がある

## 高架十字試験においては有意な影響は検出されなかった



もっと投与期間を延ばさないと影響を検出できないのかもしれない

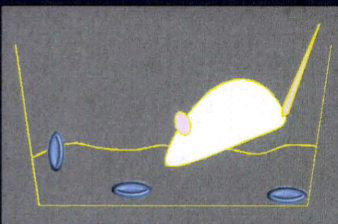
## ガラス玉覆い隠し試験とは



ホームケージに床敷きを2cm厚に敷き、ガラス玉を9個配置



10分間暗室にいれ、床敷きで隠したガラス玉の数を測定する



ガラス玉を隠す行動は不安を反映していると考えられている

メスの性周期によって差が生じることが報告されている