

### 卵巣の組織学的変化

PND 20 の卵巣の組織像では、対照群で種々の大きさの胞状卵胞、特に 300 $\mu$ m、400 $\mu$ m 以上の大きさの胞状卵胞が認められるのに対し、EE200 $\mu$ g/kg 投与群では、1 匹のみ 300 $\mu$ m 以上の大きさの胞状卵胞を持つ個体があったが、他の個体は 300 $\mu$ m 未満の小さな胞状卵胞しか認められず、EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群では、ほとんど胞状卵胞が認められなかった (図 13)。

### 性成熟後の発情周期に与える新生子期 EE 処置の影響

#### 体重の変化

図 14 に対照群と各投与群の体重の変化を示した。対照群と比較して 2,000 $\mu$ g/kg 群で有意な低値が認められた。

#### 膣開口日齢

PND 0 での EE 単回投与が膣開口時期に与える影響の観察結果を、図 15、および表 1 に示した。膣開口日齢は、対照群、200 $\mu$ g/kg 群、2,000 $\mu$ g/kg 群でそれぞれ、32.8 $\pm$ 0.37 日、31.2 $\pm$ 1.02 日、29.5 $\pm$ 0.42 日 (Mean $\pm$ SEM) と、対照群と比較して 200 $\mu$ g/kg 群、2,000 $\mu$ g/kg 群で膣開口日齢が早期化した。対照群と比較して 2,000 $\mu$ g/kg 群は有意に早期化した。一方、200 $\mu$ g/kg 群の膣開口日齢は、対照群と 2,000 $\mu$ g/kg 群の両群にまたがる範囲の広さを示した。

#### 膣スメアの観察

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を図 16 に示した。膣開口後から 36 週齢まで、2 週間の観察期間中に認められた発情休止期の比率、発情期および発情前期の合計の比率を図 17 に示した。

対照群および 200 $\mu$ g/kg 群と比較し、2,000 $\mu$ g/kg 群は、膣開口後より発情周期の異常を示した。2000 $\mu$ g/kg 群は対照群と

比較し、連続発情期、連続休止期が多く認められた。対照群は 36 週齢まで各ステージの割合がほぼ一定に保たれており、発情周期の異常が認められなかった。一方、EE20、200 $\mu$ g/kg 群では 26 週齢以降、連続発情期など異常周期が観察された。個体数の内訳について、EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群で開口後まもなく連続発情期または連続休止期を示したものが 62.5% (5/8 匹)、30 週齢以降連続発情期を示したものが 87.5% (7/8 匹) だった。一方、EE200 $\mu$ g/kg 投与群では、40% (2/5 匹) が 26 週齢を過ぎて連続発情など異常発情周期となり、30 週齢以降に周期が乱れたものは 80% (4/5 匹) だった。

### 脳の性分化に対する影響

E2 投与による LH 分泌の反応を指標にして新生子期 EE 単回投与が、脳の性分化に与える影響について検討した結果を図 18 に示した。対照群にはバラツキはあるものの、E2 投与 2 日後の 17 時に LH 分泌の増加が見られた。新生子期 EE 投与群では低濃度では 17 時の LH 分泌増加が見られるものも認められたが、高濃度群 2000 $\mu$ g/kg では E2 投与による LH 分泌の抑制のみが認められた。

新生子期 EE 単回投与が脳の形態学的性分化に与える影響を視索前野の性的二型核 (SDN-POA) の大きさを検討した結果を図 19 に示した。SDN-POA の大きさは新生子期 EE 単回投与群で増大する傾向を示した。

## D. 考察

### 性成熟過程に認められる影響

体重 1g あたりの卵巣相対重量が、EE の用量に依存して有意に低下した。特に PND 20 で採取した EE200、EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群の卵巣を組織学的に観察したところ、EE の用量に依存して卵巣のサイズ減少、ならびに胞状卵胞の減少という影響が認められた。特に 2,000 $\mu$ g/kg 投与群にお

いて顕著に胞状卵胞が減少しており、卵巢重量も減少していた。EE 投与の用量により、原始卵胞が退行したか、卵胞発育の遅延が推察された。過去には、ビスフェノール A を新生子期投与すると、用量に依存して胞状卵胞の減少、卵巢重量が減少した報告がある (Adwale, et al., 2009)。

子宮においても卵胞の所見と一致した結果が認められた。体重 1g あたりの卵巢相対重量が、EE の用量に依存して低下傾向が認められた。特に対照群と比較して 2,000 $\mu$ g/kg 投与群では子宮相対重量が PND 15、20 において有意に減少した。子宮組織像を観察すると、EE の用量に依存して子宮内膜上皮細胞が発達していなかった。これは卵巢からのエストラジオール分泌が、投与した EE の用量に依存して低下したことを示唆している。

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も EE の用量に依存して減少傾向が見られた。インヒビンは、雌ラットでは主に卵胞の顆粒層細胞から分泌される。卵胞の発育が対照群と比較して遅れていることが推察された。卵胞発育と一致した変化を示す (Watanabe, et al., 1990)。

下垂体前葉中の FSH 含有量の結果を見ると、対照群と比較して EE200、2,000 $\mu$ g/kg 投与群において低い傾向が認められた。ラットの発情周期中では下垂体中 FSH 含有量が、FSH 分泌亢進時に低下する (Watanabe, et al. 1990) ことから、血中インヒビン濃度が低い点と考え合わせると、FSH 分泌が亢進している結果と推察された。

下垂体前葉中の LH 含有量は EE の用量に依存して高い傾向が見られ、特に PND 20 では対照群と比較して EE200、2,000 $\mu$ g/kg 投与群で有意に増加した。この結果は、視床下部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ことを示しており、前述の卵巢所見と合わせるとエストロジェンのネガティブ

フィードバックが減少していることが推察された。

一方、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 (Gallo, 1988)、本研究の結果も変動が大きいゆえであると考えられた。

以上より、卵胞発育抑制の原因は、ゴナドトロピンの分泌過少によるものではなく、卵胞自身のゴナドトロピンに対する感受性低下が推察された。考えられる原因として、ゴナドトロピンに対するレセプターの発現減少が挙げられる。過去には、メトキシクロル (MXC) とその代謝物が、PND 50-60 における卵巢において、エストロゲンレセプター $\beta$  プロモータ領域のメチル化を増加させ、レセプター発現を抑制させることが報告されている (Zama and Uzumcu 2009)。ただし、EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群の観察結果と比較して、EE200 $\mu$ g/kg 投与群では、対照群と類似した観察結果の個体も認められたことから、用量に依存して影響の程度が異なるかもしれない。

以上より、本研究では、臨界期における EE 投与は末梢、特に卵巢と子宮に影響を与える可能性が推察された。すなわち、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分泌やインヒビンの分泌が減少し、それらによる視床下部、下垂体前葉に対するネガティブフィードバックが減少した結果、下垂体前葉からの LH 分泌、FSH 分泌が増加したことが推察された。これは、老化した生殖機能で認められる現象に非常に類似しており、生殖機能の早期老化とも考えられる。

#### 遅発性影響が引き起こされる用量条件、遅発性影響の指標

本研究において性成熟以後の発情周期の観察結果より、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群において遅発性影響が引き起こされるこ

とが明らかとなった。

膣の開口日齢が、対照群と比較して EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群において有意に早期化した。また EE200、2,000 $\mu$ g/kg 投与群において膣の開口が小さいピンホール型を示した。この結果は、新生子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下記の報告と類似した結果であった。雌ラットの新生児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、性中枢を雄化した場合、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 (Gorski, et al. 1977)。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, 2000, 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。

発情周期を調査した結果は EE の用量と関連した変化が認められた。すなわち EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群では膣開口直後から連続発情期または連続休止期を示した一方、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群では 6 ヶ月齢を過ぎた頃から発情周期の異常が認められた。しかし観察期間中、対照群では発情周期の異常が認められなかったことから、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群では EE2,000 $\mu$ g/kg 投与群とは異なる影響を受け、遅発性の影響が現れたと推察された。

臨界期における EE 投与が性中枢に与える影響として、性的二型核の形態的異常が知られている (近藤ら、2010)。性的二型核は、近年、ヒトやラットを含めて多くの動物において発見されている神経核の形態学的な性差である。発達期の脳における性的二型核の形成にはエストロジェンが関与することも明らかとなっている (本郷ら、2005)。本研究においても性中枢の性分化が部分的に雄型になっているのかもしれない。

## E. 結論

本研究では、化学物質を臨界期に投与した影響が、性成熟後に遅れて現れてくる「遅発性影響」の機序の一端を解明するため、エストロジェン作用を持つ化学物質の一つである EE をモデル薬物として用いた。投与時期としては、ラットの脳の性分化における臨界期のほぼ中央であると考えられる出生後第 1 日に限定し、単回皮下投与とした。本研究では特に性成熟過程に見られる影響を明らかにすることを目的とし、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、生殖器への影響も観察した。さらに遅発性影響の指標を検索すること、ならびに遅発性影響の用量反応性を検証することを目的とし、春機発動の指標として膣開口日の調査、雌性生殖機能の指標として発情周期の推移を膣スメア法を用いて観察した。

まず、15 日齢、20 日齢において、EE の用量に依存した卵巢重量、子宮重量の減少が認められた。卵巢組織観察像では、EE の用量に依存した卵巢のサイズ減少、ならびに胞状卵胞の減少が認められた。子宮組織観察像においても、EE の用量に依存した子宮内膜上皮細胞の発達不全が認められた。生殖関連ホルモンの結果では、卵巢中インヒビン含有量が EE の用量に依存して減少傾向を示した。その結果として FSH 分泌が EE の用量に比例して増加したことが示唆された。下垂体中 LH 含有量では、EE 用量に依存して増加傾向が認められ、卵巢所見および子宮所見より、エストロジェンによる負のフィードバック減少が示唆された。以上より、ラットの脳臨界期における EE 投与は、EE の用量に依存して卵巢および子宮発育を抑制することが明らかとなった。

性成熟以後の発情周期の観察結果より、EE20~200  $\mu$ g/kg の用量において遅発性影響が引き起こされることが明らかとなった。対照群と比較して、EE の用量に依存した春機発動の早期化ならびに早期発

情周期異常が認められ、性中枢の部分的、あるいは不完全な雄性化が生じたか、あるいは生殖機能の早期老化が推察された。

今後、EEの臨界期曝露が性成熟過程において、末梢と中枢にどのような機序で影響を及ぼすのか、検証する必要がある。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 該当無し

### 2. 学会発表

1) 岡崎祥子、渡辺元、永岡謙太郎、田谷一善 出生直後のエチニル・エストロジェ

ン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機構に与える影響：第16回日本生殖内分泌学会学術集会（2011, 11）

## 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

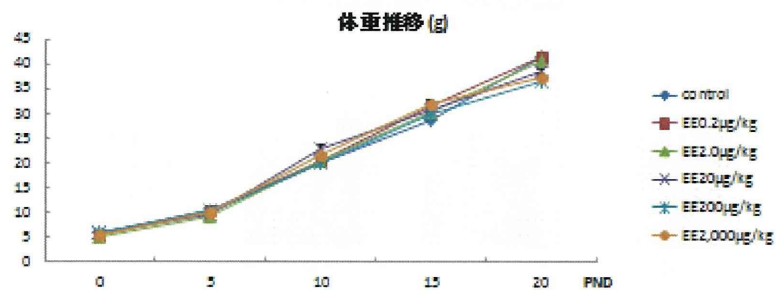


図1 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重増加に与える影響

各群における体重の平均値 ± SEMを示す。

0日齢においては投与前から対照群とEE0.2µg/kg投与群の間で、対照群とEE2,000µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

5日齢においてはEE0.2µg/kg投与群とEE2,000µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

10日齢においてはEE20µg/kg投与群とEE200µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においては対照群とEE20µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

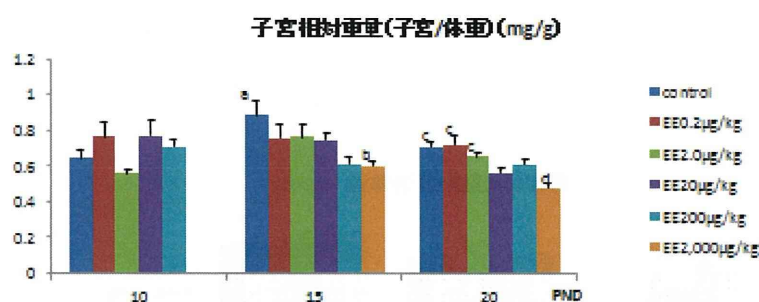


図2 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する子宮相対重量に与える影響

各群における体重1g当たりにおける子宮重量の平均値 ± SEMを示す。

a vs b:  $p < 0.05$ , c vs d:  $p < 0.05$

15日齢においては対照群とEE2,000µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においてはEE2,000µg/kg投与群に対して、それぞれ対照群、EE0.2および2.0µg/kg投与群で有意差が認められた。

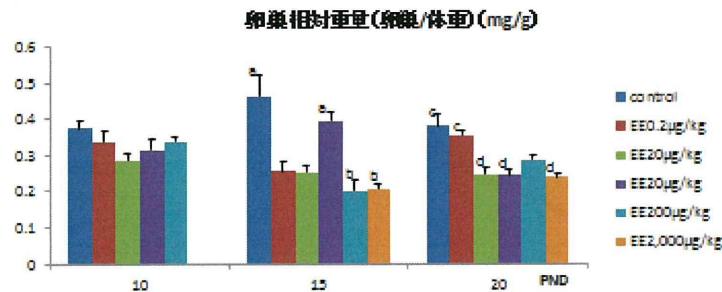


図3 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する卵巣相対重量に与える影響

各群における体重1g当たりにおける卵巣重量の平均値 ± SEMを示す。

a vs b:  $p < 0.05$ , c vs d:  $p < 0.05$

15日齢においては対照群とEE200µg/kg投与群の間、対照群とEE2,000µg/kg投与群の間、EE2.0µg/kg投与群とEE200µg/kg投与群の間、EE2.0µg/kg投与群とEE2,000µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においては対照群に対して、それぞれEE2.0、20および2,000µg/kg投与群で、ならびにEE0.2µg/kg投与群に対して、EE2.0、20および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。

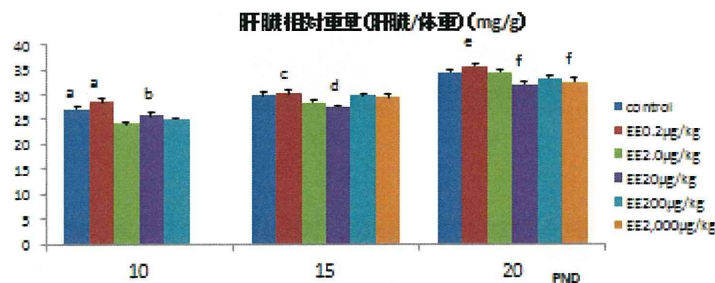


図4 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する肝臓相対重量に与える影響

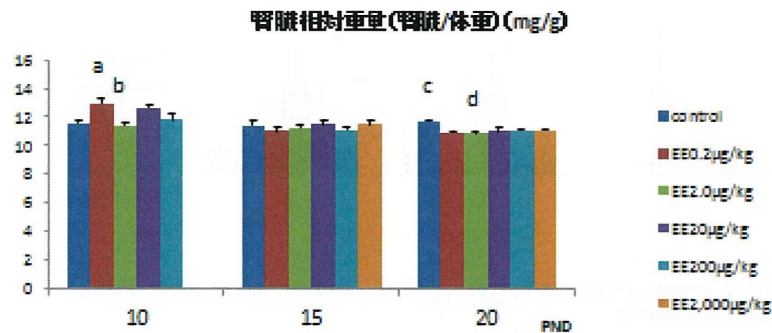
各群における体重1g当たりにおける肝臓重量の平均値 ± SEMを示す。

a vs b:  $p < 0.05$ , c vs d:  $p < 0.05$ , e vs f:  $p < 0.05$

10日齢においては対照群とEE2.0µg/kg投与群の間、EE0.2µg/kg投与群とEE2.0µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

15日齢においてはEE0.2µg/kg投与群とEE20µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においてはEE0.2µg/kg投与群に対してEE20および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。



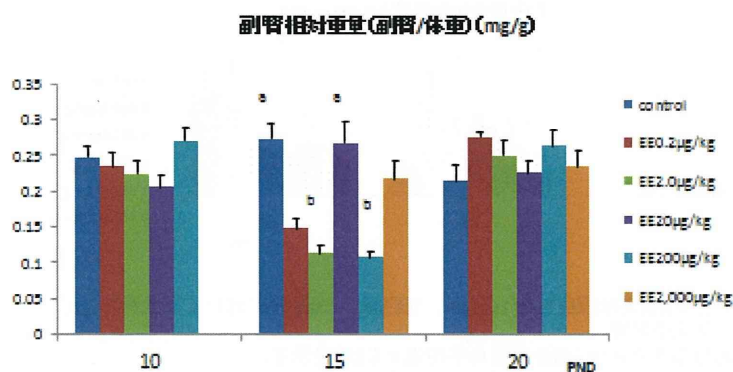
**図5 新生子期EE2単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対腎臓重量に与える影響**

各群における体重1g当たりにおける腎臓重量の平均値 ± SEMを示す。

a vs b:  $p < 0.05$ , c vs d:  $p < 0.05$

10日齢においてはEE0.2µg/kg投与群とEE2.0µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においては対照群とEE2.0µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

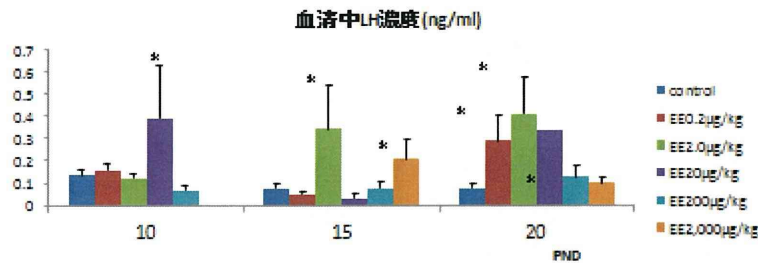


**図6 新生子期EE2単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する副腎相対重量に与える影響**

各群における体重1g当たりにおける副腎重量の平均値 ± SEMを示す。

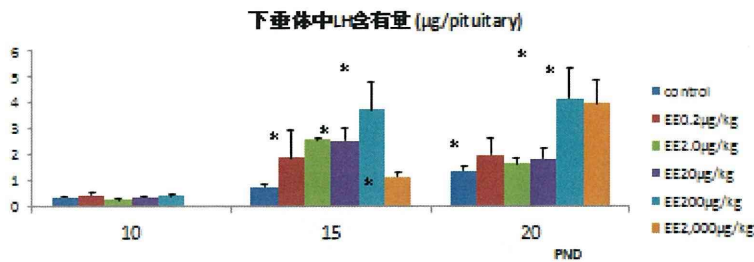
a vs b:  $p < 0.05$

15日齢においては対照群に対してEE2.0および200µg/kg投与群の間で、EE2.0µg/kg投与群とEE20µg/kg投与群の間で、ならびにEE20µg/kg投与群とEE200µg/kg投与群の間で有意差が認められた。



**図7 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中LH濃度に与える影響**

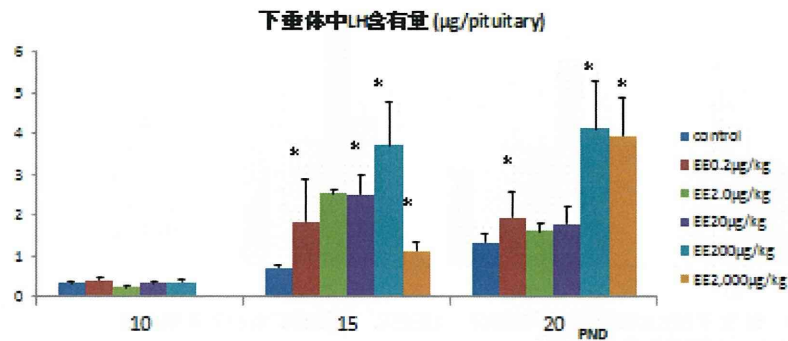
各群における血清中LH濃度の平均値 ± SEMを示す。  
 記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* :p<0.05)  
 10日齢において対照群とEE20µg/kg投与群の間で有意差が認められた。  
 15日齢においては対照群に対してEE2.0および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。  
 20日齢においては対照群に対してEE0.2、2.0および200µg/kg投与群で有意差が認められた。



**図8 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**

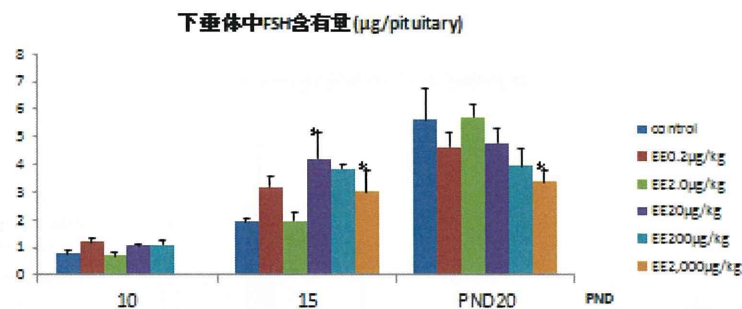
各群における下垂体中LH含有量の平均値 ± SEMを示す。  
 記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* :p<0.05)  
 15日齢においては対照群に対してEE0.2、20、200および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。  
 20日齢においては対照群に対してEE0.2、200および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。





**図 8 新生子期EE2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**

各群における下垂体中LH含有量の平均値 ± SEMを示す。  
 記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* :p<0.05)  
 15日齢においては対照群に対してEE0.2、20、200および2,000μg/kg投与群で有意差が認められた。  
 20日齢においては対照群に対してEE0.2、200および2,000μg/kg投与群で有意差が認められた。



**図 9 新生子期EE2単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において下垂体中FSH濃度に与える影響**

各群における下垂体中FSH含有量の平均値 ± SEMを示す。  
 記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* :p<0.05)  
 15日齢においては対照群に対してEE20および2,000μg/kg投与群で有意差が認められた。  
 20日齢においては対照群とEE2,000μg/kg投与群の間で有意差が認められた。

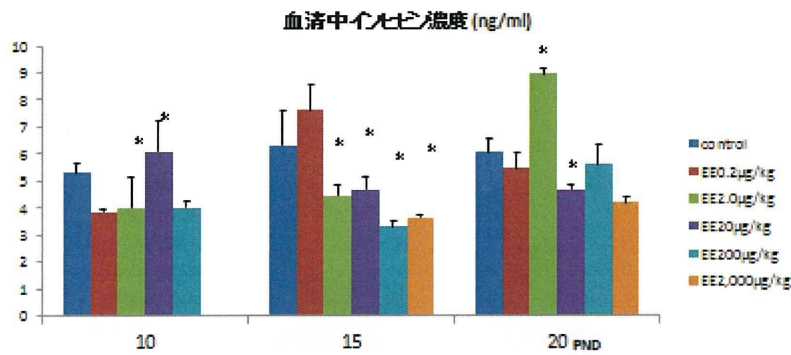


図 10 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中インヒビン濃度を与える影響

各群における血清中インヒビン濃度の平均値 ± SEMを示す。

記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* : $p < 0.05$ )

10日齢においては対照群に対して、EE0.2およびEE2.0µg/kg投与群で有意差が認められた。

15日齢においては対照群に対して、EE2.0、20、200および2,000µg/kg投与群で有意差が認められた。

20日齢においては対照群に対して、EE2.0および20µg/kg投与群で有意差が認められた。

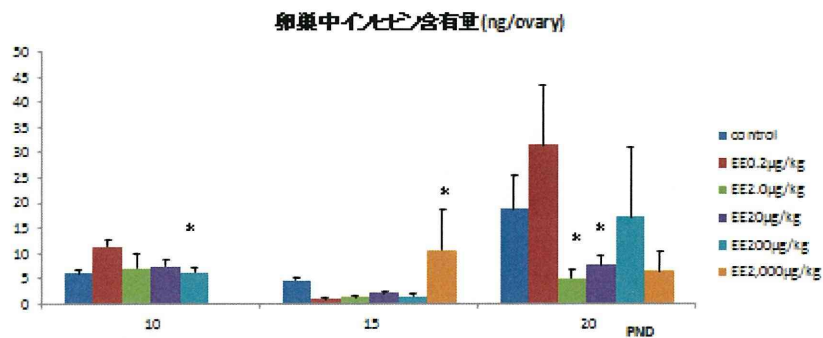


図 11 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において卵巣中インヒビン含有量を与える影響

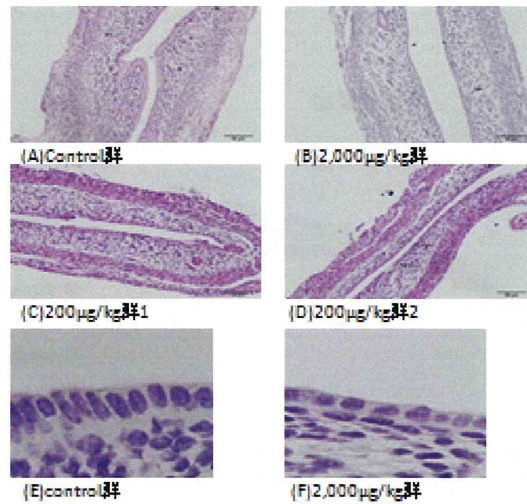
各群における卵巣中インヒビン含有量の平均値 ± SEMを示す。

記号(\*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。(\* : $p < 0.05$ )

10日齢においては対照群とEE2.0µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

15日齢においては対照群とEE2,000µg/kg投与群の間で有意差が認められた。

20日齢においては対照群に対して、EE2.0および20µg/kg投与群で有意差が認められた。

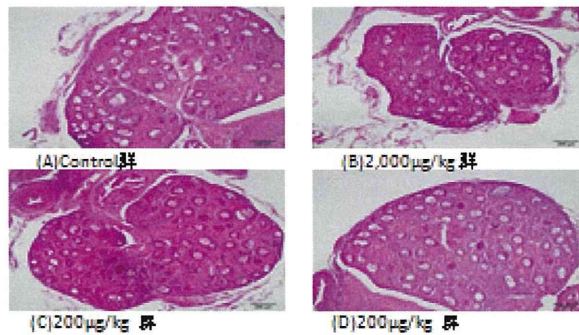


**図12 新生子期EE単回投与のPMD20において子宮組織像に与える影響**

子宮角断面。HE染色による光学顕微鏡像。(A-D:  $\times 20$ , E-F:  $\times 40$ )

(A, E)対照群、(B, F)EE2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、(C)および(D)200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群。

子宮内膜上皮細胞が対照群では円柱状 (E) であるが、EE2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では立方状 (F) であった。200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では子宮内膜上皮細胞が個体によって円柱状 (C) のものと立方状 (D) のものがあった。

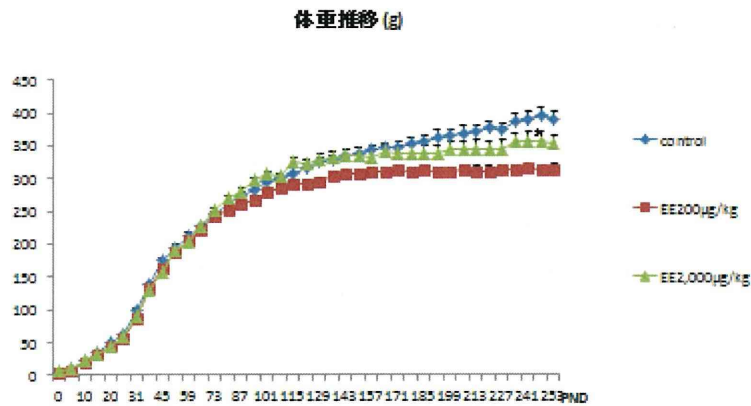


**図13 新生子期EE単回投与のPMD20において卵巣組織像に与える影響**

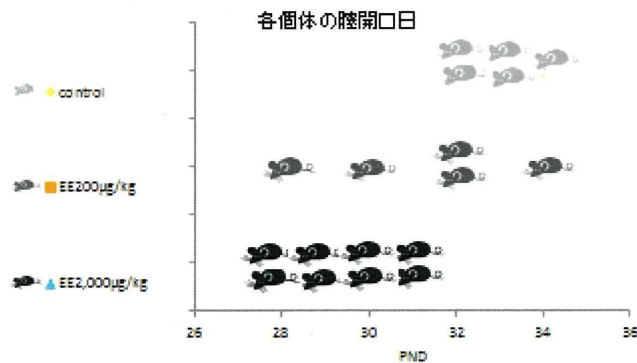
最大直径の卵胞を含む卵巣像。HE染色による光学顕微鏡像。(  $\times 4$  )

(A)対照群、(B)EE2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、(C)および(D)200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群を示す。

対照群では種々の大きさの胞状卵胞が認められるが、EE2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では発達した胞状卵胞が認められず、また卵巣のサイズも小さかった。200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では個体によって対照群と同程度発達した胞状卵胞が見られるもの (C) が2個体、見られないもの (D) が3個体認められた。



**図 14 新生子期 EE 単回投与が体重増加に与える影響**  
 各群における体重の平均値 ± SEM を示す。  
 253 日齢において対照群と EE200µg/kg 投与群の間で有意差が認められた。  
 (\* : p < 0.05)



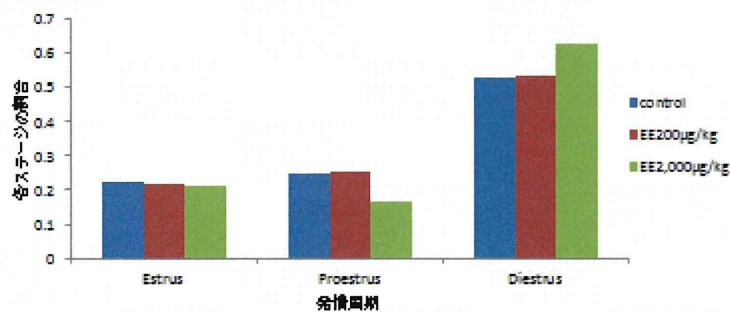
**図 15 新生子期 EE 単回投与が眼開口時期に与える影響**  
 各群における個体ごとの眼開口日を示す。  
 対照群では 32-35 日齢の間に眼開口が認められた。EE2,000µg/kg 投与群では 28-31 日齢の間に眼開口が認められた。EE200µg/kg 投与群では 28-31 日齢と幅のある期間に眼開口が認められた。

	mean (日齢)	S.E.M.
Vehicle	32.8	0.4
EE200 $\mu$ g/kg	31.2	1.0
EE2,000 $\mu$ g/kg	29.5*	0.4

**表 1 新生子期EE単回投与が腔開口時期に与える影響**

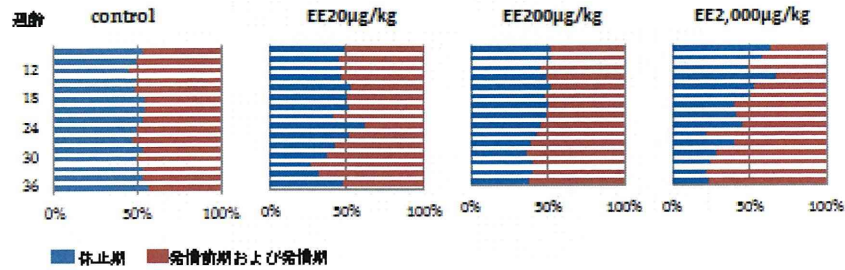
各群における腔開口日の平均値 $\pm$ SEMを示す。  
 (\*:  $p < 0.05$ )  
 対照群とEE2,000 $\mu$ g/kg投与群の間で有意差が認められた。

4日間に観察された発情周期各ステージの割合

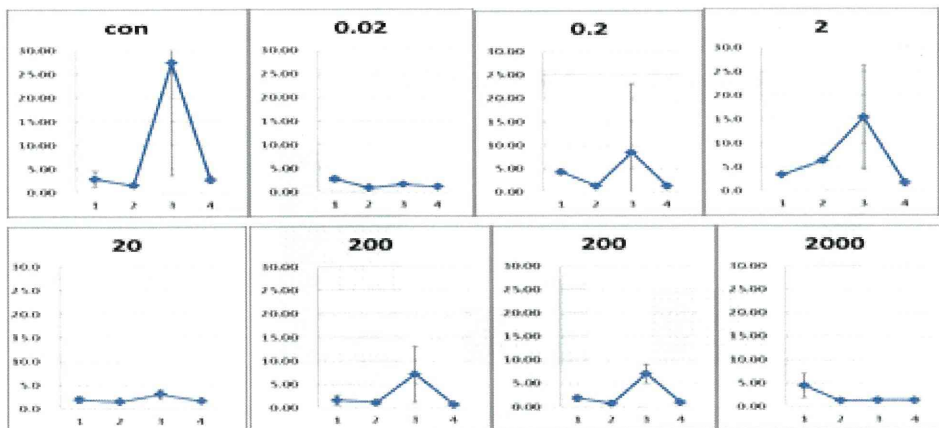


**図 16 新生子期EE単回投与が腔開口直後の腔スミア像の発情期、発情前期、休止期に与える影響**

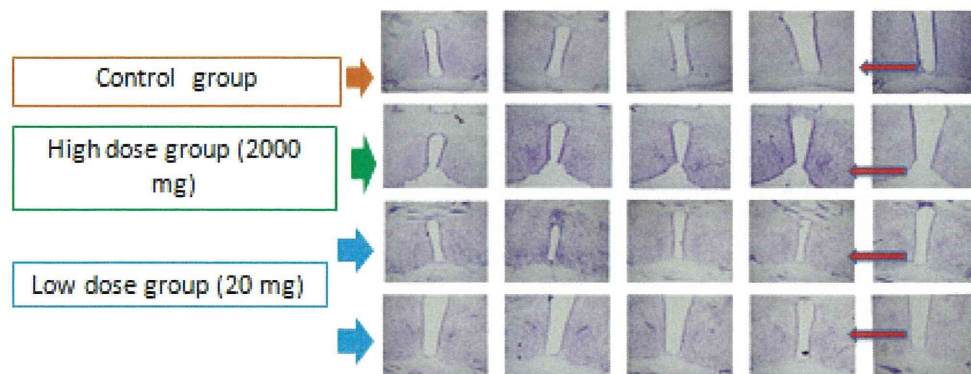
腔開口後2ヶ月間の発情周期追跡結果を示す。  
 対照群とEE200 $\mu$ g/kg投与群では発情期および発情前期が1日、休止期が2日の正常な4日サイクルが観察されたが、EE2,000 $\mu$ g/kg投与群では他の群と比較して休止期が多い異常発情が観察された。



**図 17 新生子期EE2単回投与が陰開口後から36週齢にわたって陰スメア像に与える影響**  
 陰開口後36週齢の発情周期追跡結果を示す。  
 対照群では観察期間の間、発情期および発情前期が1日、休止期が2日の正常な4日サイクルが観察された。EE200µg/kg投与群では26週齢以降発情期の日数が増加した。  
 EE2,000µg/kg投与群では陰開口直後から発情周期の異常を示したが、26週齢以降発情期の日数が著しく増加した。



**図 18 卵巣除去後に発情前期レベルのE2を投与した時に見られたLH分泌の変化。**各グラフ横軸の1はE2投与前、2は投与翌日Day1の午前11時、3はDay2の午後17時、4はDay3の午前11時の濃度を示す。



**図 19 新生子期EE単回投与が脳の形態学的性分化に与える影響。視索前野性的二型核の代表例。**  
 矢印は性的二型核を位置を示す。

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：新生仔期における化学物質曝露が脳の性差と生後神経新生に及ぼす遅発型  
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

【目的】 日本獣医生命科学大学の班（日獣大班）は、化学物質の新生児期曝露が脳に及ぼす遅発型（遅発型）リスクとその評価方法の確立を目的に、経口避妊薬の主成分である Ethynylestradiol（以下 EE）の出生 24 時間以内の新生仔マウスへの皮下投与モデルを用いて、脳の性分化と生後神経新生に及ぼす影響の評価を行った。これまでにも内分泌攪乱化学物質（以下 EDC）の胎生期ならびに新生仔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いる。しかし、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指標とした研究であった。海馬の神経細胞や支持細胞（アストロサイト）を評価対象とした研究も報告されているが、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作用を指標にしたものである。我々は、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入れて、そのリスク評価を行った。

【方法】 生後 24 時間以内の雌雄マウス（C57BL/6J）に 20 $\mu$ g/kg（中濃度）および 20,000 $\mu$ g/kg（高濃度）の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下で 29 日および 179 日齢まで飼育管理し、30 日および 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（厚さ 40 $\mu$ m の連続した冠状断切片）を作成し、新生細胞（BrdU 取り込み細胞）マーカーとして Anti-BrdU、新生神経細胞マーカーとして Anti-Doublecortin を一次抗体として用いた免疫組織化学染色（IHC）を施して、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細胞分化開始後 2 週間以内の新生神経細胞の発現数を計測した。また、神経細胞死（含、プログラム神経細胞死）のマーカーとして銀染色キットによる銀染色を行った。さらに、海馬と同様に成体神経新生が認められる脳室周囲下帯（SVZ）への影響を確認するために、SVZ で生後発生した神経細胞の主な移動先の一つである嗅球の大きさについて、大脳-嗅球比率（OBRR）を指標にして評価した。



一方、エストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質としての EE 暴露による脳の性分化に及ぼすリスク評価を行う為に、内側視束前野 (MPA) を含む脳切片標本 (厚さ 40 $\mu$ m の連続した冠状断切片) に対して Anti-Calbindin D-28k (CB) を一次抗体として用いた IHC を施して、MPA における CB の分布パターンへの影響の有無を評価した。

**[結果]** 生後 24 時間以内における EE 暴露による海馬歯状回における BrdU 陽性細胞 (細胞新生)、DCX 陽性細胞 (生体新生ニューロン)、銀染色陽性細胞 (プログラム神経細胞死) の分布および発現数に顕著な影響は認められなかった。さらに、OBBR に対する影響も認められなかった。一方、MPA における CB 陽性細胞の分布パターンは、EE 投与群の雌雄における雌雄差が不鮮明化するという、新生仔期 EE 投与による影響と思われる所見が得られつつある。

**[考察]** マウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における高濃度 EE 暴露による晩発型 (遅発型) リスクについて、日獣大は現段階で次のような結論に至っている。(1) 海馬の成体神経新生ならびにプログラム神経死、間接的ではあるが SVZ の成体神経新生に対しては顕著な影響は及ばない。しかし、(2) 周産期エストロゲン作用依存性で出現する MPA における脳の性分化に対しては何らかの影響を及ぼしている可能性がある。すなわち、化学物質の新生仔期暴露が脳に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクは、記憶や学習など高次脳機能を司る領域への顕著な影響は認められないが、内側視束前野といった内分泌調節 (特に GnRH の分泌パターン) に関わる脳領域への影響は十分に考えられるという結論である。化学物質の新生仔期暴露が脳に及ぼす晩発型 (遅発型) リスクは、生殖機能を司る部分を中心に及ぼす事を十分に考慮する必要があることを示唆している。

## 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 24 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における細胞および神経新生、脳室下帯で生後神経新生され嗅球に移動する細胞、および内側視束前野の組織学的性差に及ぼす影響を評価した。

## B. 研究方法

新生仔期における化学物質暴露の生涯に

渡つ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 (0.02 $\mu$ g/10 $\mu$ l sesame oil/g BW: 最終濃度 20 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/10 $\mu$ l sesame oil/g BW: 最終濃度 20,000 $\mu$ g/kg)、対象群としてゴマ油 10 $\mu$ l/g BW を投与した。

最初に、皮下投与した EE (20,000 $\mu$ g 群) が脳へ移行していることを確認するために、EE 投与後、30 分以内、1 時間、4 時間、12 時間、24 時間に新生仔脳を採取し、脳内 EE 濃度の変化を測定した。分析は、財団法人日本食品分析センター (大阪) に測定依頼した (LC-MS/MS 法、検出限界: 0.002ppm)。

実験群動物は、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、大脳-嗅球比率 (OBRR) を算出するために、左右大脳の最大幅と左右嗅球の最大幅を計測した。計測後、凍結マイクロトーム (Yamato) により厚さ 50 $\mu$ m の連続前頭断切片を作成した。

組織化学染色ならびに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は、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。さらに、銀染色は FD NeuroSilver KitII (FD NeuroTechnologies) を用いて行った。

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-Calbindin 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科学染色で行った。

(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) EE 投与による脳内 EE 濃度の変化

EE 20,000 $\mu$ g/kg 1 回皮下投与後における脳内 EE 濃度は、投与後 1 時間以内に急激に上昇し、4 時間後をピークとして、12 時間後にはピーク時の 30%前後にまで減少し、24 時間後には検出限界以下のレベルであった (図 1)。

### 2) 大脳-嗅球比率 (OBRR)

生後の神経新生が認められる脳室周囲下帯 (SVZ) への影響を確認するために、SVZ で生後発生した神経細胞の移動先である嗅球の大きさについて、大脳-嗅球比率 (OBRR) を算出した。その結果、対照群の雌雄と比較して EE 暴露による影響は認められなかった (図 2)。

### 3) 内側視束前野 (MPA) における Calbindin D-28k 分布の性差

対照群の MPA における Calbindin 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。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影響として、雌雄差が不明瞭になる傾向が観察された。これは、雌の CB パターンが雄のパターンに近づいたと予想される (図 3)。

#### 4) 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。この傾向は海馬歯状回的全領域にわたって認められた (図 4、図 6 A)。

#### 5) 海馬歯状回における Dublicortin 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 Dublicortin 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。この傾向は海馬歯状回的全領域にわたって認められた (図 5、図 6 B)。

#### 6) 海馬歯状回における BrdU 取り込み細胞および Dublicortin 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 Dublicortin 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 Dublicortin 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 B)。

#### 7) 海馬における Dublicortin 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 Dublicortin 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)。

#### 8) 海馬歯状回における銀染色陽性細胞の分布

神経細胞死 (含、プログラム神経細胞死) のマーカーとして銀染色キットによる銀染色を行った。その結果、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。この傾向は海馬歯状回的全領域にわたって認められた (図 8)。

### D. 考察

臨界期における皮下からの高濃度 EE の単回暴露は、曝露後の極めて短時間 (1 時間以内) で脳内への移行および濃度上昇が起こり、濃度は 4 時間前後にピークに到達し、半日後にはピーク時の約 30% にまで減少、24 時間後には検出限界以下になる推移をとることが明らかとなった。このことは、新生仔期の EE 皮下投与曝露による脳への EE 移動は、曝露後極めて短時間の間にピークに達し、脳自体が高濃度に曝露される時間は 12 時間以内であることを示している。

新生仔期の高濃度 EE の単回暴露は、海馬の生後神経新生ならびに脳室下帯の生後神経新生の指標とした OBBR への影響は認められなかった。その一方、MPA における calbindin D-28 の分布パターン雌雄差には軽度ながらも影響が認められた。

本研究の結果は、新生仔期における高濃度 EE 暴露は、生後神経新生に及ぼすリスクは少ないと考えられるものの、内側視束前野などエストロゲン感受性の高い内分泌機構に関与する脳領域への影響は十分に考えられることを示している。

該当無し

## E. 結論

EE の新生仔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。

新生仔期の EE 曝露は、極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を起こし、脳は約 12 時間にわたって EE の曝露を受けることが明らかとなった。この短時間の脳における EE 曝露は、成熟後において、海馬などの高次脳機能を司る領域の新生細胞数には有意な影響は及ぼさない一方、性ステロイド感受性の高い脳領域（内側視束前野）には生涯にわたる影響を及ぼすことが示唆された。

本研究の結果は、新生仔期における EE 曝露の脳への晩発的な影響は、影響を受けやすい領域と受けにくい領域があることを示している。中でも、性ホルモン感受性の高い領域への高リスクがあることを考慮する必要があることを示している。

## F. 研究発表

該当無し

## G. 知的財産権の出願・登録状況