

フローチャート サンプル採集手順

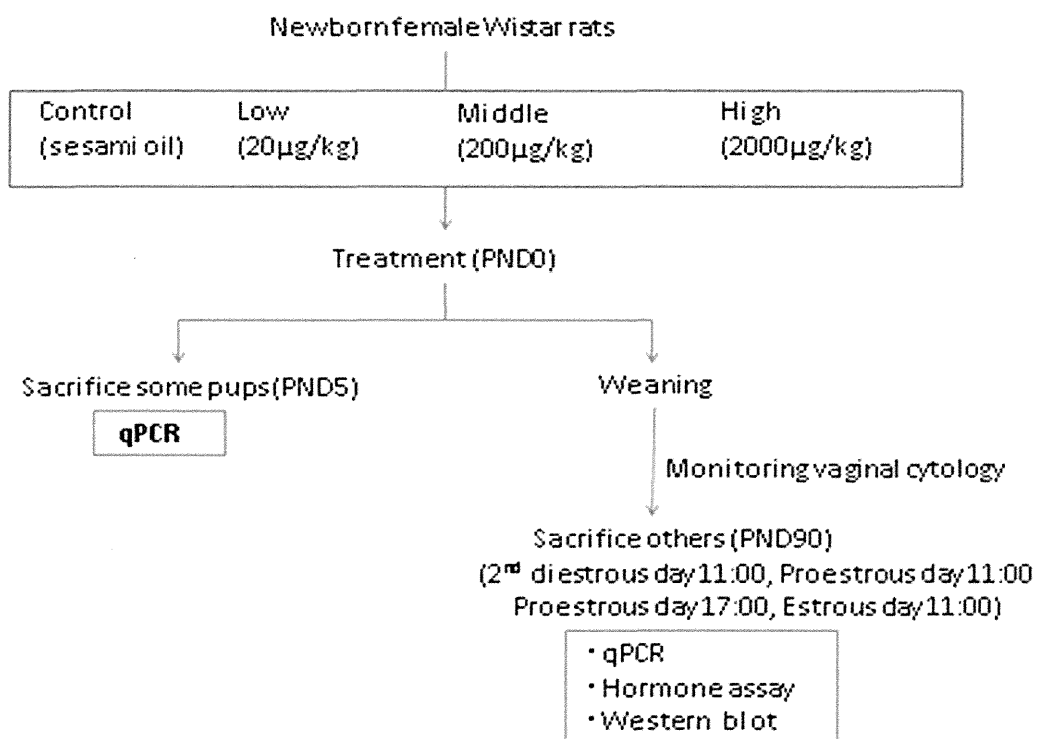
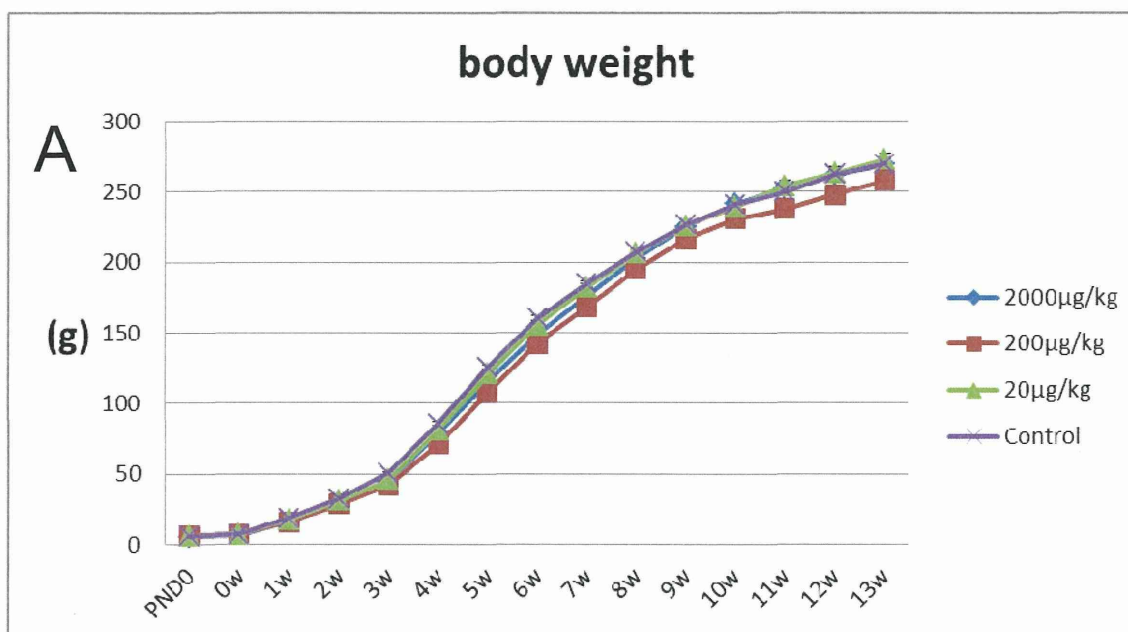


Table 1 The real-time PCR primer sequences.

Primer	Sequence 5'to 3'
LH-receptor 1 Forward	GCATTCAATGGGACGACTCT
LH-receptor 1 Reverse	GTAGGAAGACAGGGCGATGA
FSH-receptor Forward	TTTACTTGCTGGAAGCGACTAA
FSH-receptor Reverse	CCCAGGCTCCTCCACACA
Estrogen-receptor α Forward	CATCGATAAGAACCGGAGGA
Estrogen-receptor α Reverse	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
Estrogen-receptor β Forward	TATCTCCTCCAGCAGCAGT
Estrogen-receptor β Reverse	CTCCAGCAGCAGGTCATACA
Androgen-receptor Forward	CTAGCGCGTGCCTTCCTTTACA
Androgen receptor Reverse	CCCACCTGCGGGAAGCT
P450scc Forward	GGAGGAGATCGTGGACCCTGA
P450scc Reverse	TGGAGGCATGTTGAGCATGG
Inhibin α subunit Forward	GCTCTACCAGGGAGCATGAG
Inhibin α subunit Reverse	CACCTTCCTCCTAGCTGACG
Inhibin/Activin β_A subunit Forward	TTTCTGTTGGCAAGTTGCTG
Inhibin/Activin β_A subunit Reverse	CGGGTCTCTTCTTCAAGTGC
Inhibin/Activin β_B subunit Forward	GCCACGTATCCCTGACTTGT
Inhibin/Activin β_B subunit Reverse	CTGCTCCATGGTCTCTGTGA
GAPDH Forward	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
GAPDH Reverse	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA



B

EE		Con	Low	High
	Body weight (g)	272.10	282.88	272.74
Ovary (mg)	Absolute	42 ± 1.65	55 ± 2.39	48 ± 3.35
	Relative	0.15 ± 0.005	0.19 ± 0.009	0.18 ± 0.014
Uterus (mg)	Absolute	565 ± 12.36	630 ± 24.13	527 ± 30.02
	Relative	2.08 ± 0.057	2.24 ± 0.128	1.95 ± 0.133

Fig1. (A) Change in rat body weight from birth to 90 days in experiment 1. Values are expressed as means ± SEMs.

(B) Organs weight of animals at PND90 sacrifice (absolute and relative,

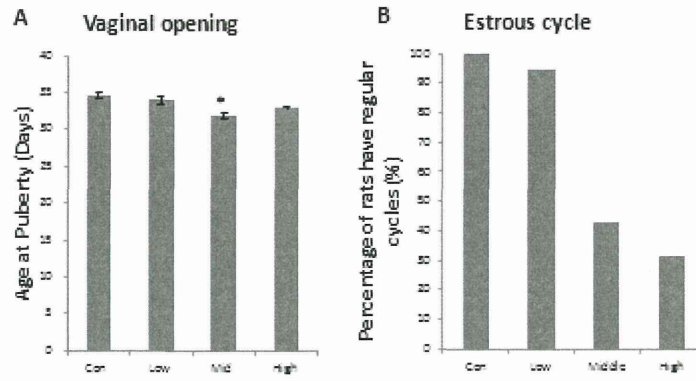


Fig.2. Effects of EE exposure on reproductive parameters in adult female rats.

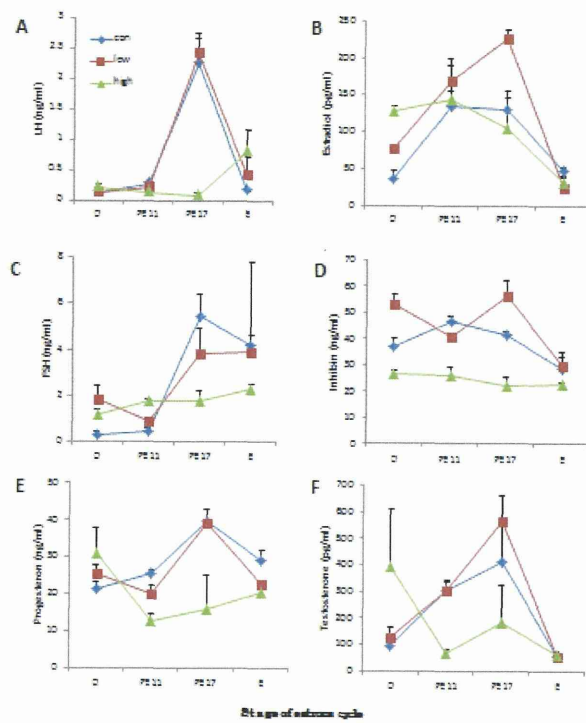


Fig.3 Changes in the circulating concentrations of (A)LH, (B)FSH, (C)estradiol-17 β , (D)inhibin, (E)progesterone and (F)testosterone during estrous cycle in (◆)control group,(■)low dose group and (▲)high dose group. The stages of the estrous cycle are shown as D for diestrus 1100 h, PE11 for proestrus 1100 h, PE17 for proestrus 1700 h and E for estrus 1100 h.

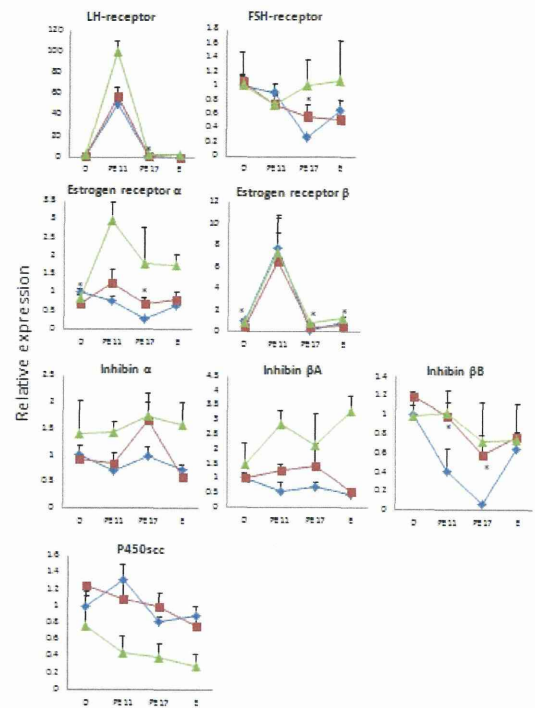


Fig.4 Changes in the mRNA expression of ovary in (◆)control group,(■)low dose group and (▲)high dose group. The stages of the estrous cycle are shown as D for diestrus 1100 h, PE11 for proestrus 1100 h, PE17 for proestrus 1700 h and E for estrus 1100 h. The expression of controls at diestrus were adjusted to 1 in each genes.

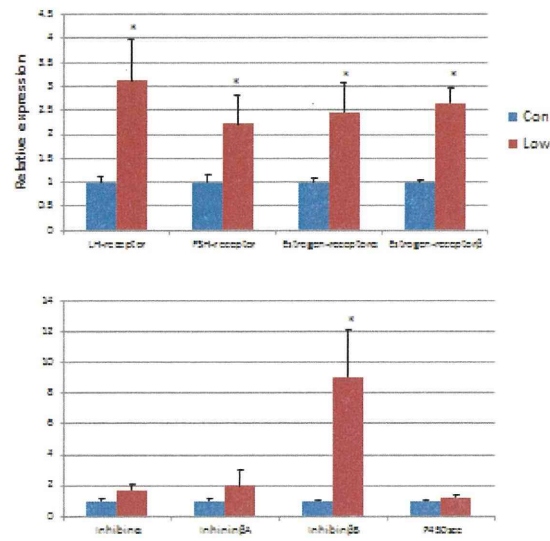


Fig.5 Changes in the mRNA expression of ovary in control group and low dose group at proestrous 1700 h on PND90. The expression of controls were adjusted to 1 in each genes.

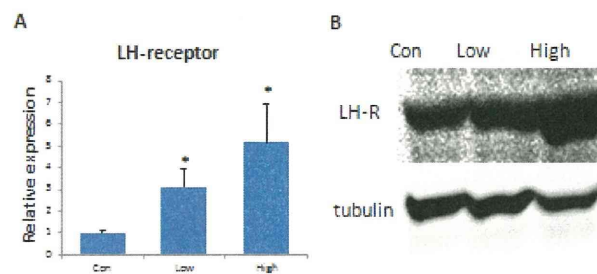


Fig.6 At proestrous 1700 h on PND90, LH-receptor expression pattern.

(A)The mRNA of LH-receptor expression of ovary at proestrous 1700 h. The expression of control was adjusted to 1.

(B)Representative western blots of LH-receptor protein. Tubulin was used as a loading control

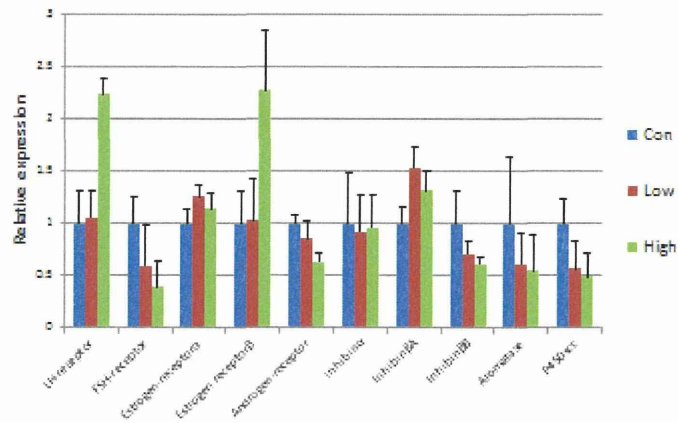


Fig.7 Changes in the mRNA expression of ovary in control group, low dose group and high dose group on PND5. The expression of controls were adjusted to 1 in each genes.

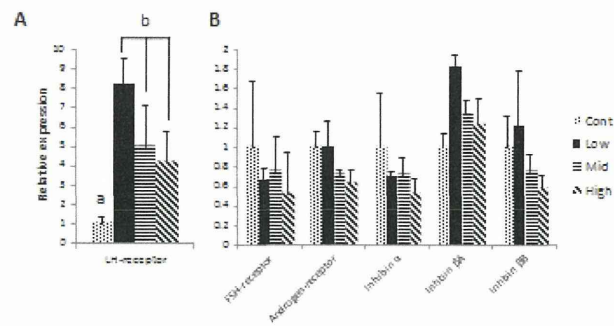


Fig.8 Changes in the mRNA expression of ovary in control group, low dose group, middle dose group and high dose group. The expression of controls were adjusted to 1 in each genes.

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では、化学物質の新生児期曝露が脳に及ぼす晩発型（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てきた。平成 22-23 年度にかけて、成熟個体の海馬歯状回における細胞新生頻度への明確なリスクは確認出来ないことを明らかとした。また、エストロゲン様作用をもつ EE 曝露による脳の性分化に及ぼすリスク評価を行う為に、内側視東前野（POA）を含む脳切片標本（厚さ 40 μ 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免疫組織化学染色（IHC）を施して、POA における CB の分布パターンへの影響の有無を評価した。その結果、POA における CB 免疫陽性細胞の分布パターンは、生後 24 時間以内における EE の 1 回投与によってその雌雄差が不鮮明化する可能性を新所見として得るに至った。

この所見を詳しく検討するために、24 年度は CB 陽性細胞の雌雄差の評価を詳細に調べるとともに、成熟雄マウスが成熟雌マウスに対して示す 100kHz~150kHz の性行動誘引發声（超音波発声：USV）への影響、甘味好選性への影響といった行動学的解析を加えることで、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの EE 皮下投与が及ぼす脳の性分化へのリスク評価解析を試みた。さらに、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの EE 皮下投与が及ぼす発育状態への影響、膣開口時期への影響も記録した。

【方法】 生後 24 時間以内の雌雄マウス（C57BL/6J）に 20 μ g/kg（中濃度）および 2,000 μ 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（室温 22 $^{\circ}$ C から 25 $^{\circ}$ C、湿度 40% から 60%）で飼育管理した。体重の変化を 1 週間おきに測定し、雌については膣開口の時期を観察した。

生後 10 週目（70 日齢）に達した個体は、超音波記録・解析装置を装着した観察ケージにおいて発情雌と同居させ、USV の発声の有無を観察した。また、生後 11 週目から 4 週間にわたって、EE20 μ g 投与雌雄、EE20,000 μ g 投与雌雄、対照群雌雄（計 6 群）の各ケージに水道水および水道水にサッカリンを 2.5% の割合で溶かした給水便を同時に与えて（2 ボトル法）甘味好選性試験を行った。

体重変化および行動学的解析を終了した個体（90-100日齢）は、経心臓法にて灌流固定を施し固定脳標本とした。内側視束前野（POA）を含む脳切片標本（厚さ40μmの連続冠状断切片）に対してAnti-Calbindin D-28kを一次抗体として用いたIHCを施して、MPAにおけるCBの分布パターンを評価した。

【結果】 生後24時間以内におけるEE単回暴露は、対照群と比べて雌マウスの膺開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。体重の変化に関しては、顕著な影響は認められなかった。しかしながら、雄においてはEE高濃度群（2,000μg）において、離乳期（生後21日）から春機発動期（生後42日）の間の体重が、他の比べて低い傾向が認められた。一方、雌においてはEE中濃度群（20μg）において、春機発動直前（生後35日）以降の体重が他の群に比べて高い傾向を示した。発情雌との接触によるUSV発声は、雄においてはEE高濃度群（2,000μg）において全個体でUSVの発声が認められず、EE中濃度群（20μg）ではUSV発声個体の割合が対照群に比較して半数以下に減少した。一方、雌においては、対照群およびEE中濃度群では10%以下の低い確立でしか発声しないが、EE高濃度群では45%の個体からUSV発声を記録した。EE投与による甘味（2.5% サッカリン）好選性への影響は雌雄とも観察されなかった。MPAにおけるCB陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE投与により雌のCB陽性細胞数が増加する一方、雄ではCB陽性細胞数が減少することが明らかとなった。

【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暴露による性分化に対する晩発型（遅発型）リスクについて、24年度の研究結果は次のような評価となった。生後24時間以内における新生仔マウス（C57BL/6J）へのEE単回投与は、(1)雌の膺開口時期を早める。(2)生後発達に顕著な影響は認められないが、雄では投与されるEE濃度が高いと一時的な発育遅延を誘発する可能性がある。一方、雌では中濃度EEの曝露は体重増加を誘発する可能性がある。性成熟後の雌雄表現型への影響として、(3)雄のUSV発声を抑制する一方、雌のUSV発声を促進している可能性がある。(4)POAにおけるCB陽性細胞の分化に関して、雌では増加を誘導し雄では現象を誘導することで、結果的に雌雄差が不明瞭になるリスクがある。これらの結果は、EEの新生仔期曝露が脳に及ぼす晩発型（遅発型）リスクとして、それがわずか1回の曝露経験であったとしても高濃度の曝露を受けた場合、脳内の内側視束前野のカルシウム結合タンパク質含有細胞の分布機構の雌雄差に影響を及ぼし、性成熟後の雌雄コミュニケーションパターンの異常を誘導する可能性があることを示唆している。

A. 研究目的

経口避妊薬として現在でも使用されているEthinylestradiol（以下EE）の発育期曝露が、脳神経および生殖機能に及ぼす晩発

型（遅発型）リスクとその機序解明の指標を確立することを目的に、生後24時間以内の新生仔マウスへの単回EE投与（皮下投与）モデルを用いて、(1)発育への影響、(2)膺開口への影響、(3)マウスの内側視束前野

に認められるカルビンジン（カルシウム結合蛋白質）陽性細胞分布の性的二型に及ぼす影響、(4)成熟マウスの社会行動時に認められる 100kHz 超周波数の発声（超音波発声：USV）の性的二型への影響、(5)齧歯類の行動学的性差として報告がある甘味好選性の性差への影響を評価した。

B. 研究方法

新生仔期における化学物質暴露が発達期と成熟後の性的二型に及ぼすリスク評価を念頭に研究を行った。生後 24 時間以内の新生仔雌雄マウス（C57BL/6J：日本クレアより妊娠動物を購入して日本獣医生命科学大学の実験動物施設にて出産させた）にゴマ油（関東科学 NO. 37036-02）に溶かした EE（0.02 μ g/10 μ l sesame oil/g BW：最終濃度 20 μ g/kg、20 μ g/10 μ l sesame oil/g BW：最終濃度 2,000 μ g/kg）を 10 μ l マイクロシリンジ（HAMILTON）を用いて皮下投与した。対象群として、溶媒に用いたゴマ油 10 μ l/g BW を投与した。したがって、実験は雌雄のゴマ油投与群（対照群）、雌雄の 20 μ g/kg 投与群（EE20 群）、雌雄の 2,000 μ g/kg 投与群（EE2000 群）の計 6 群の間で比較した。

全ての動物は通常飼育環境下で飼育管理し、生後 21 日目に離乳させると同時に、雌雄を別のケージに分別して継続飼育した。1 ケージの匹数は 4～5 匹とした。全ての動物は、出生当日（1 日齢）より 7 日間隔で 9 週齢（63 日齢）まで体重を測定した。また、雌は PD10 から毎日外部生殖器を観察し、同一ケージの全ての雌動物が膈開口する日までの割合を確認した

10 週齢（70 日齢）に達した動物は、雌雄共に、超音波測定装置（Avisoft Ultrasound

recorder, Model 116H. Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany）を用いて、発情雌との接触時における発声（100～150kHz の超音波：以下、USV）の有無を測定した。

また、ラットで報告されている甘味好選性の性的二型の有無と、性的二型への EE 投与による影響を観察するために、水道水と水道水に 2.5% サッカリン（サッカリンナトリウム 2 水和物、和光純薬）を溶解した給水便を同時に提示する「2 ボトル法」によって、群飼育ケージにおける甘味好選性検査を行った。3 日間における給水便の総重量のその期間の飲水量とし、水道水とサッカリン水の合計飲水量に対するサッカリン水重量の割合で比較を行った。飲水量測定は 3 日間隔で計 5 回行い、実験群間におけるサッカリン量の割合の平均重量を比較することで、甘味好選性の評価とした。

USV 記録と飲水量試験の終了後、90 日齢-100 日齢の間に 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、内側視束前野（POA）の全領域が含まれる領域（The mouse brain, 3rd edition, Academic Press; Figure 26-38）について、凍結マイクローム（Yamato）を用いて厚さ 40 μ m の連続前頭断切片として作成した。各個体とも作製した連続切片に対して 1 枚置きに Anti-Calbindin D-28k（Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈）による免疫組織化学染色（二次抗体として Alexa 488; Molecular Probes-invitrogen を使用）と 0.5% クレシル紫（MERCK 1.0693.0100）によるニッスル染色を施した。

標本の観察は、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM810) および光学顕微鏡 (Zeiss Axiovision) にて行った。

(倫理面への配慮)

使用動物への EE 投与、体重測定、膈開口確認、行動観察時の移動に関しては、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) の腹腔内投与による深麻酔を施し、痛覚が無くなったことを確認した後に行った。また、本実験は「日本獣医生命科学大学実験動物委員会」の審査の承認を受けて実施された (承認番号 12-94)

C. 研究結果

1) EE 投与による成長への影響

雌雄とも、体重増加を指標とした出生当日 EE 投与による発育への顕著な影響は認められなかった。しかし、雄では E2000 群において、離乳から春機発動期 (21 日齢-42 日齢) の期間において一時的に他の群 (対照群および EE20 群) よりも体重が低いという現象が観察された (図 1 Male)。一方雌では、春機発動期 (35 日齢) 以降において、他の群 (対照群および EE2000 群) よりも体重が高くなるという現象が観察された (図 1 Female)。いずれも統計学的には有意差は認められなかったが、出生当日 EE 投与がマウスの成長に雌雄で異なる影響を及ぼす可能性がある。

2) 雌の膈開口への影響

出生当日 EE 投与は、明瞭に膈開口の時期を早める効果が認められた。EE2000 群で顕著に認められ、離乳時にはすでに半数の雌

が膈開口状態にあった (図 2)。

3) 成熟雌との接触における USV 発声への影響

10 週齢 (70 日齢) に達した動物を、観察用ケージに移動させ、超音波測定装置 (Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) を用いて、発情雌導入時における接触時における発声 (100~150kHz の超音波: 以下、USV) を測定した。

その結果、対照群雄では 92% (12 例中 11 匹) の割合で 100-150kHz の USV が認められた。しかし、EE2000 群雄では全例 (6 匹中 0 匹) で USV が認められなかった。EE20 群雄では 44% (9 匹中 4 匹) で弱い USV が認められた。一方、雌では、対照群では 10% (10 例中 1 例) であったのに対し、EE20 群では 40% (2 例中 5 例)、EE2000 群でも 40% (10 例中 4 例) で 100-150kHz の USV が認められた (図 3; USV)。

4) 甘味好選性に対する影響の解析

成長期における体重測定を終了した 9 週齢 (63 日齢) 以降の動物を用いて、甘味好選性の性的二型の有無と、性的二型への EE 投与による影響を評価した。水道水と水道水に 2.5% サッカリン (サッカリンナトリウム 2 水和物、和光純薬) を溶解した給水便を同時に提示する「2 ボトル法」により、群飼育ケージ (1 ケージ 4 ないし 5 匹) における甘味好選性の計測を行った。連続 3 日間における給水便の総重量を期間中の飲水量として、水道水とサッカリン水の合計飲水量に対するサッカリン水重量の割合で比較を行った。飲水量測定は 3 日間隔で計

5 回行い、実験群間におけるサッカリン量の割合の平均重量を比較することで、甘味好選性の評価とした。その結果、全群間における有意な差は認められなかった (図 4 : Saccharin choice)。

5) 内側視束前野 (POA) における Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布

通常、マウスの POA 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 POA 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 5)、雌の同領域ではこのような CB 陽性細胞の集合は観察できない (図 6)。これを基本形として、新生仔期 EE 投与による雌雄マウスの MPA における CB 免疫陽性細胞の分布パターンへの影響を調べた。その結果、出生当日における EE 単回皮下投与によって、雄では POA における CB 陽性細胞の分布が縮小すること (図 7)、雌では逆に CB 陽性細胞の分布が増加すること (図 8) が確認された。また、これら雄における CB の減少、雌における CB の増加は、EE20 群に比べて EE2000 群の方が顕著であることも示された (図 9)。

D. 考察

出生当日マウスに対する皮下からの稿の濃度 (20,000 μ g/kg) EE の単回暴露は、暴露後極めて短時間 (1 時間以内) で脳内へ移行が始まり、投与後 4 時間前後にピークに最高濃度に到達し、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を昨年度 (23 年度) の研究成果として明らかとしている

が、今年度は、この短期間の EE 暴露が、発育期と性成熟後に及ぼす影響を評価した。

新生仔期の高濃度 (2,000 μ g/kg) ならびに中濃度 (20 μ g/kg) EE 単回暴露は、POA における CB の免疫陽性細胞分布の性的二型パターンに明瞭な影響を及ぼすリスクがあることが示された。また、性成熟後の雄の性行動コミュニケーションの特徴である USV 発声にも影響を及ぼすことが明らかとなった。すなわち、出生当日におけるわずか 1 回の EE 大量暴露は、脳内の CB 分布の性的二型パターンに異常を誘発するばかりでなく、行動学的にも性的異常を誘導するリスクがあることを示している。本研究の結果は、発育期におけるあの濃度以上の EE 暴露は、それがたとえ単回であったとしても、脳内のエストロゲン感受性の高い脳領域の正常発達に悪影響を及ぼし、通常の性的コミュニケーションパターンの成立に影響を及ぼすことを示唆している。

E. 結論

昨年までの研究により、新生仔期の EE 暴露は、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 の暴露を受けることを明らかとしている。この短時間の脳における EE 暴露は、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し、正常な性的コミュニケーションに障害を及ぼすことを示している。

本研究の結果は、新生仔期における EE 暴露は短時間であったとしても、その濃度が高い場合は、性行動や生殖内分泌制御に関

与する領域に対して生涯にわたって影響は、性ステロイドホルモンへの感受性が高い領域を中心に及ぼされ、リスクが高いことを示している。

F. 研究発表

Yokosuka. M., Adachi H., Nakada T., Saito TR. and Yoshida M. Neonatal exposure to 17 alfa-ethinylestradiol alters the calbindin-immunoreactive cell aggregates in the preoptic area of the mice. *Neuroscience 2012 41th Annual Meeting Society for Neuroscience*, NewOrleans, 2012年10月15日

G. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

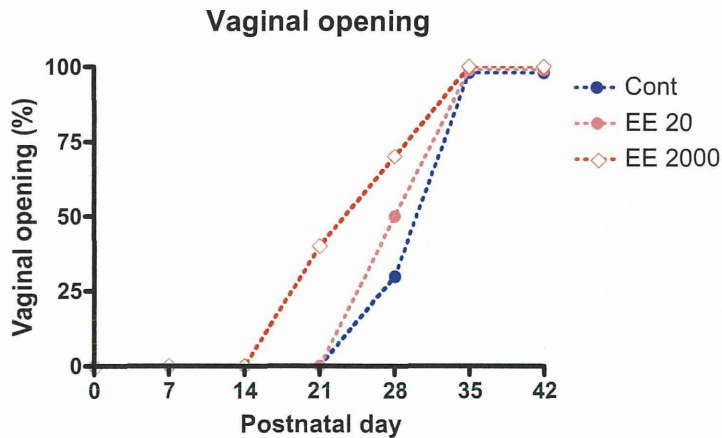
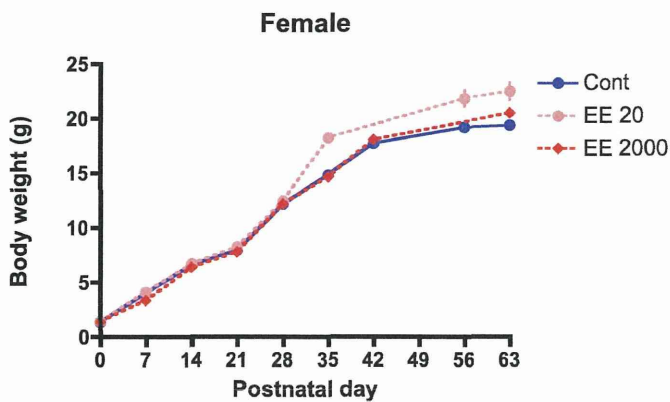
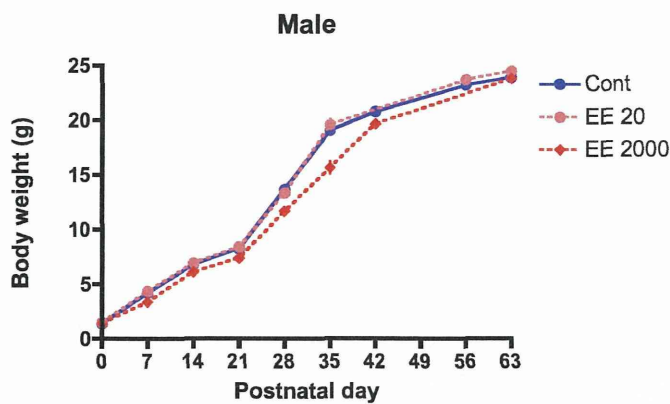


図1：新生仔マウスへのEE (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与が及ぼす成長への影響。

雌雄とも体重増加に対するEE投与による顕著な影響は認められなかった。しかし、雄ではEE2000群において、21日齢から42日齢の期間において一時的に他の群（対照群およびEE20群）よりも体重が低い現象が観察された。雌では、春機発動期（35日齢）以降において、他の群（対照群およびEE2000群）よりも体重が高くなる現象が観察された。

図2：新生仔マウスへのEE (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 投与が及ぼす膣開口への影響。

EE2,000 μg 投与群では対照群に比べて膣開口を早期に示す個体が多く認められた。また、EE20 μg の投与群でも対照群よりも膣開口を早期に示す個体の割合が多く認められた。

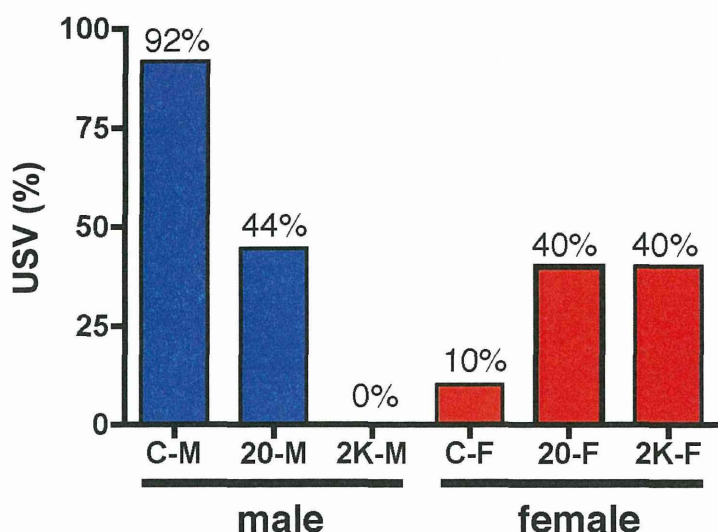


図3：成熟雌との接触におけるUSV発声への影響

超音波測定装置 (Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany) を用いて、発情雌導入時における接触時における発声(100~150kHzの超音波：以下、USV)を測定した。対照群雄(C-M)では92% (12例中11匹)の割合で

100-150kHzのUSVが認められた。EE2000群雄では全例(6匹中0匹)でUSVが認められなかった。EE20群雄では44%(9匹中4匹)で弱いUSVが認められた。一方、雌では対照群では10%(10例中1例)であるのに対し、EE20群(2例中5例)とEE2000群(10例中4例)では何れも40%の個体で100-150kHzのUSVが認められた。

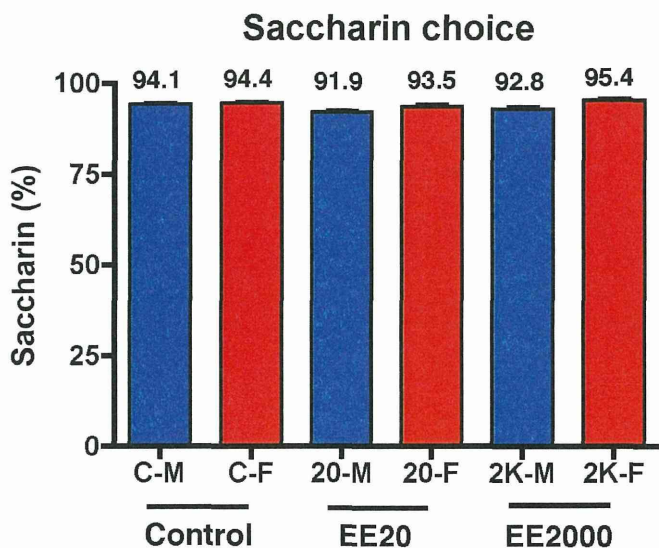


図4：甘味好選性に対する影響。

水道水と水道水に2.5%サッカリン(サッカリンナトリウム2水和物、和光純薬)を溶解した給水便を同時に提示する「2ボトル法」により、群飼育ケージ(1ケージ4ないし5匹)における甘味好選性の計測を行った。連続3日間における給水便の総重量を期間中の飲水量として、水道水とサッカリン水の合計飲水量に対

するサッカリン水重量の割合(%)での比較。飲水量測定は3日間隔で計5回行い、実験群間におけるサッカリン量の割合の平均重量で比較した。群間における有意な差は認められなかった。C-M: 対照群雄、C-F: 対照群雌、20-M: EE20 μ g/kg投与雄、20-F: EE20 μ g/kg投与雌、2K-M: EE2,000 μ g/kg投与雄、2K-F: EE2,000 μ g/kg投与雌。

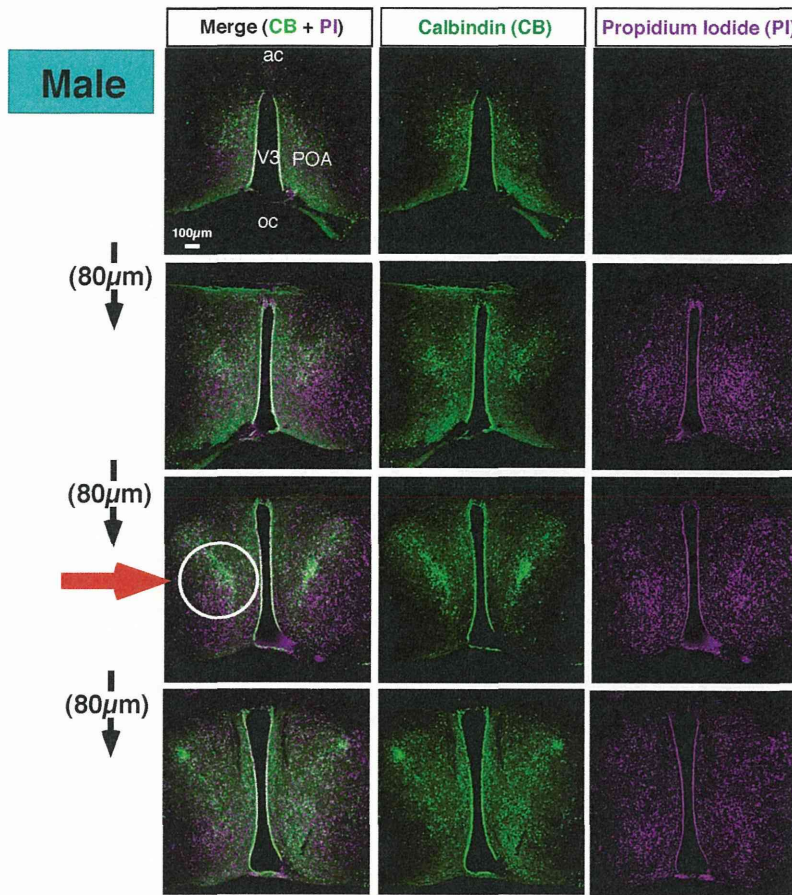


図5:対照群雄(90日齢)の内側視索前野(POA)における、Calbindin D-28k免疫陽性細胞の分布。

POAの中心部を含む80µm間隔の連続切片。雄ではPOAの中心領域(赤の矢印)にCB免疫陽性細胞の大きな塊が観察される。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI:紫色)染色によって組織構造を示している。

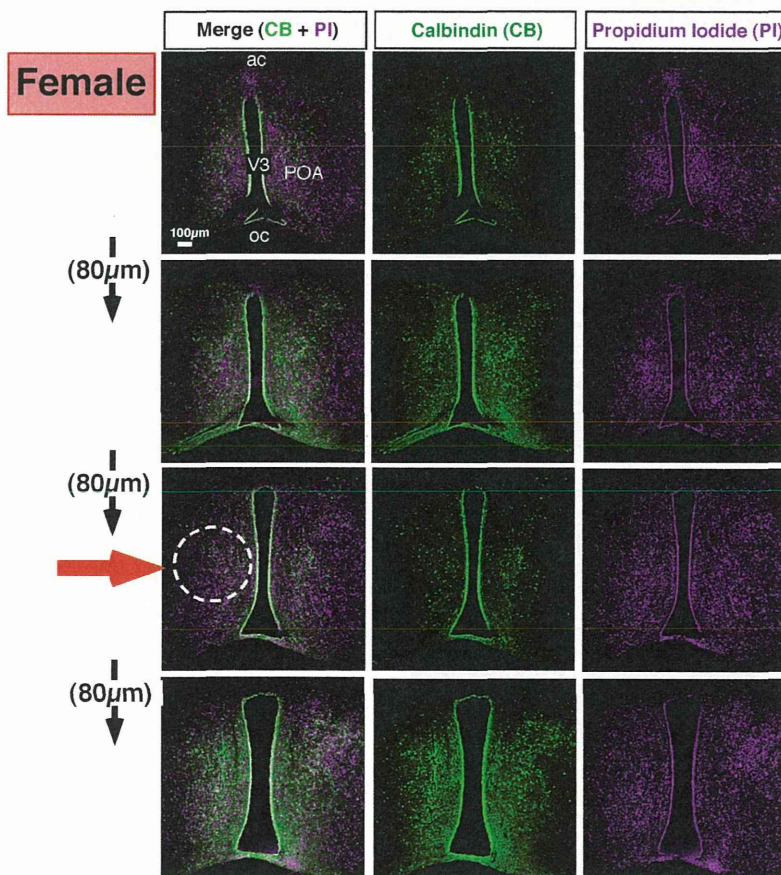


図6:対照群雌(90日齢)の内側視索前野(POA)における、Calbindin D-28k免疫陽性細胞の分布。

POAの中心部を含む80µm間隔の連続切片。雌では雄のようにPOAの中心領域(赤の矢印)においてもCB免疫陽性細胞の大きな塊は観察されない。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI:紫色)染色によって組織構造を示している。

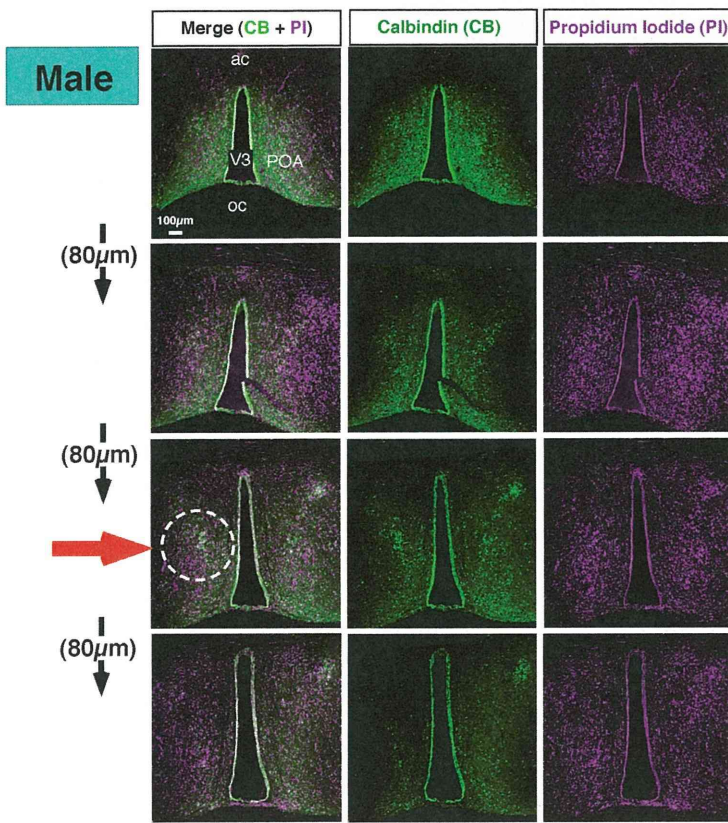


図7：生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された90日齢雄のPOAにおけるCB陽性細胞の分布。

EE投与により、雄では明確であったCBの塊(図5の赤矢印の指すところを参照)の領域が縮小している(赤矢印)。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI：紫色)染色によって組織構造を示している。

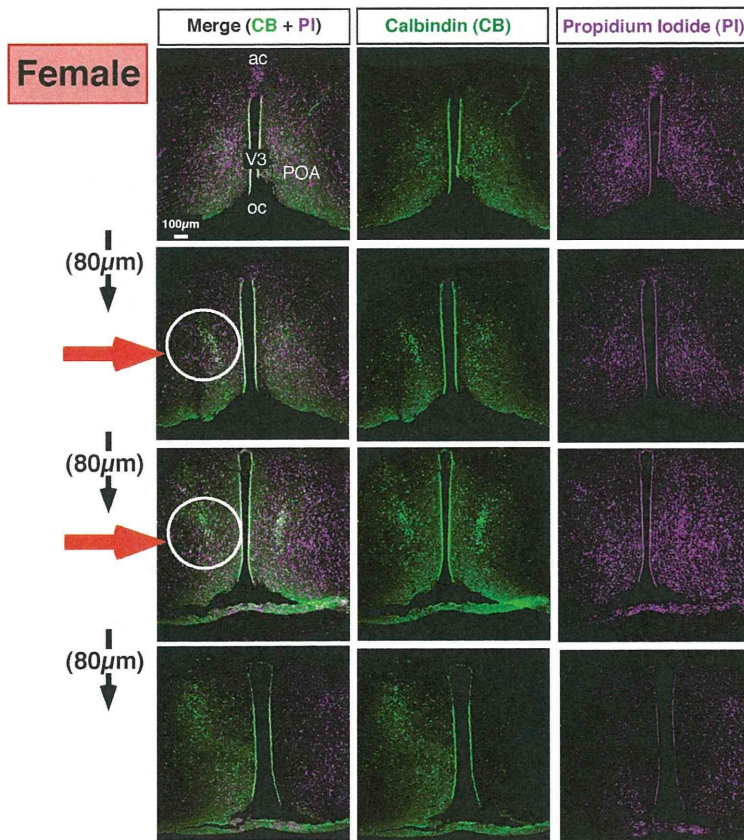
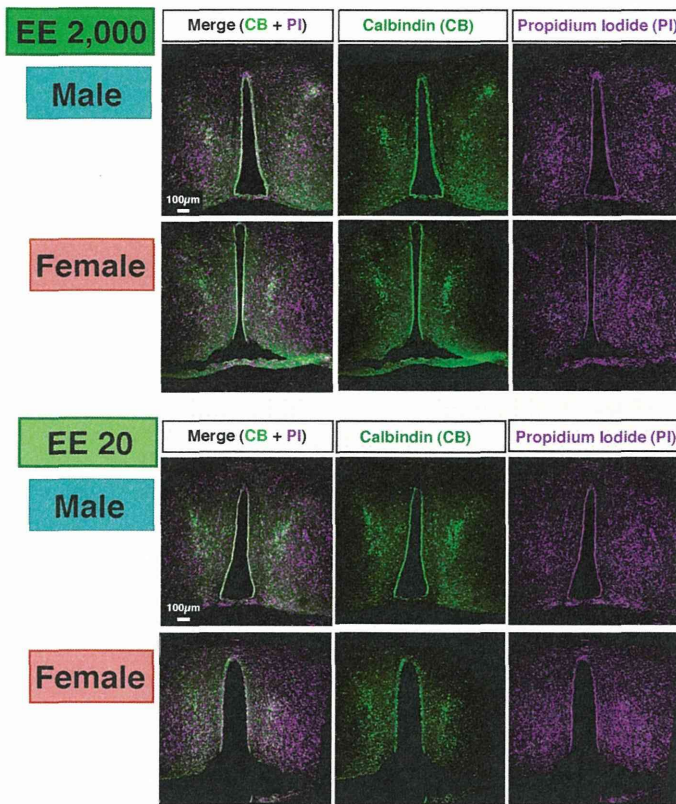


図8：生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 2,000µg/kg) を単回皮下投与された90日齢雌のPOAにおけるCB陽性細胞の分布。

EE投与により、雌では不明確であったCBの塊(図5の赤矢印の指すところを参照)の領域が雄のように拡大していることがわかる(赤矢印)。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI：紫色)染色によって組織構造を示している。

図9：生後24時間以内に Ethynylestradiolを2,000µg/kgあ



るいは20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回皮下投与された90日齢雌雄のPOA中心部におけるCB陽性細胞の分布。雄におけるCBの減少と雌におけるCBの増加は、EE20群に比べてEE2000群の方が顕著であることがわかる示された。緑はAlexa 488によるCB陽性反応。Propidium Iodide (PI: 紫色) 染色によって組織構造を示している。

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：	川口真以子	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
研究協力者：	溝口康	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室
	平野顕宏	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	小峰千亜希	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	神島愛未	学校法人明治大学	農学部農学科	動物環境学研究室
	志賀健臣	学校法人明治大学	農学部農学科	動物遺伝資源学研究室

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る遅発型影響とそのメカニズムの解明及び早期指標の確立を目指し、EDs のひとつである 17 α -ethynylestradiol (EE) を臨界期に曝露し、各種神経行動学的解析を行った。その結果、雌ラットへの EE 曝露は、性選好性では用量依存的に、性行動では高濃度である 2 mg/kg でのみ減弱を引き起こすことを示した。また、不安・学習行動では、生後 24 時間以内の 20 μ g/kg EE 曝露により成熟後のエストロゲン感受性が変化する可能性を示した。エストロゲン受容体 α 発現量解析においても、部位特異的な発現変化が認められた。また、活動量へは本研究の曝露条件では影響を及ぼさ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、その作用は形成作用と活性作用とに分けられると考えられている(図 1)。エストロゲンの形成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、活性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、ホルモンによって形成作用が引き起こされる神経機構に対し、

発達後に活性作用が認められる。エストロゲンが形成作用を及ぼす神経機構は、生殖、摂食、情動、高次機能と多岐にわたり(図 2)、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。最終年度である本年度はデータの堅牢性を確保し、作用機序を解明するため、昨年度まで明らかとした行動学的解析による遅発型影響の再認と行動におけるエストロゲン感受性の

検討、及び、早期指標の確立を目指した。

B. 研究方法

生後 24 時間以内の Wistar-Imamichi (WI) 系雌ラットに、ごま油に溶解した 17 α -ethynylestradiol (EE、Sigma Aldrich, USA) 20 μ g/kg (lowEE)、2 mg/kg (highEE)、陽性対照として 17 β -estradiol (E2、Sigma Aldrich, USA) 20 mg/kg、あるいはごま油 (oil) を皮下投与した。陽性対照である E2 は、繁殖行動の一部を司る視床下部の性的二型核 SDN-POA の雌における大きさを、雄と同じくらいの大きさにすることが報告されている濃度を用いた(7)。これらの動物は、一腹あたり 8 匹ずつになるよう調整し、生後 21 日齢で離乳させた後、行動神経内分泌学的解析のため、以下の実験に供した。

<性選好性試験>OVX し EB 5 μ g/0.1 ml および P 500 μ g/0.1 ml を投与して発情状態とした 13~14 週齢 WI 雌ラット：ステンレス製格子等で 3 部屋に区切られた黒色塩化ビニル製 3 チャンバーケージ (図 3) に予め動物を慣らし、雄あるいは発情雌への接近回数・接近時間を 5 分間測定した。相手雄ラットは 13~14 週齢の WI ラットを用い、事前に性行動を 3 回練習させた。相手雌ラットは OVX し EB 5 μ g/0.1 ml および P 500 μ g/0.1 ml を投与して発情状態とした。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手ラットの組み合わせは 1 回目と 2 回目で変えた。本試験終了後に引き続き性行動試験を行っているため、1 回目は性行動未経験、2 回目は性行動経験後の条件である。

<性行動試験>卵巣摘出 (OVX) し Estradiol Benzoate (EB) 5 μ g/0.1 ml および Progesterone (P) 500 μ g/0.1 ml を投与して発情状態とした 13~14 週齢 WI 雌ラット：予め動物を慣らした透明アクリル製装置内で、性選好性試験を行ったテスト雌ラットと相手雄ラットを 20 分間同居させ、雄の交尾行動であるマウントの回数に対する雌の受容性を示すロードーシス反応の割合であるロードーシス商を測定した。実験は 1 週間間

隔で 2 回検討し、相手雄との組み合わせは 1 回目と 2 回目で変えた。

<エストロゲン受容体 α 発現量測定>性行動に関与していると考えられる視床下部内側基底部・内側視索前野の組織における ER α タンパク質発現量を検討した。凍結組織より Mammalian Protein Extraction Buffer (GH Healthcare) と Inhibitor Cocktail kit (Thermo Scientific) を混和した抽出 Buffer で抽出し、2-D Quant Kit (GE Healthcare) のプロトコルに従い定量を行った。40 μ g/ μ l のタンパク質を SDS-PAGE を用いて分離した。免疫染色には一次抗体 (Anti-ER α 1:500, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体 (Anti-rabbit 1:1000, R&D systems) を用いて反応させた。検出には LAS-4000 IR multi color (Fujifilm) を用い、バンドの濃さからタンパク量を比較した。

<オープンフィールド試験>5 週齢 WI 雌ラット及び、OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 μ g/0.1 ml 投与した 11 週齢 WI 雌ラット：塩化ビニル製円形オープンフィールド (直径 75 cm、高さ 41 cm、図 4) にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 (Noldus) を用いて総移動距離、平均移動速度、中央滞在時間を測定した。

<高架十字試験>OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 μ g/0.1 ml 投与した 12 週齢 WI 雌ラット：壁のないオープンアームと壁のあるクローズドアームからなる高架十字 (図 5) の中央部にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 を用いてオープンアームへの侵入回数・滞在時間を指標に探索・不安行動について測定した。

<受動回避学習試験>2 回実験を行い、1 回目は OVX あるいは OVX して獲得試行の 24 時間前に EB 5 μ g/0.1 ml 投与した個別飼育の 17 週齢 WI 雌ラット、2 回目は OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 μ g/0.1 ml 投与した集団飼育の 15 週齢 WI 雌ラット：受動回避学習試験装置 (実験箱