

フローチャート サンプル採集手順

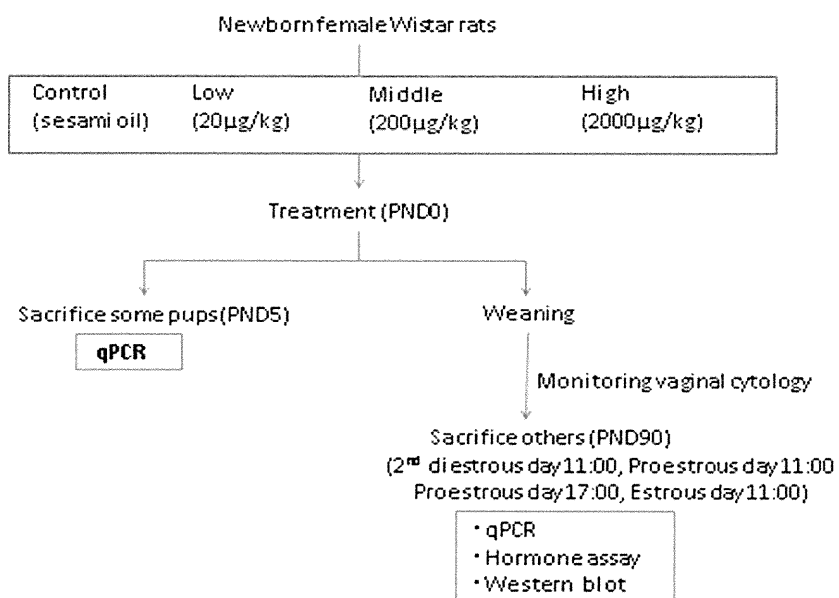


Table 1 The real-time PCR primer sequences.

Primer	Sequence 5'to 3'
LH-receptor 1 Forward	GCATTC AATGGGACGACTCT
LH-receptor 1 Reverse	GTAGGAAGACAGGGCGATGA
FSH-receptor Forward	TTTACTTGCCCTGGAAGCGACTAA
FSH-receptor Reverse	CCCAGGCTCCTCCACACA
Estrogen-receptor α Forward	CATCGATAAGAACCGGAGGA
Estrogen-receptor α Reverse	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
Estrogen-receptor β Forward	TATCTCCTCCCAGCAGCAGT
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

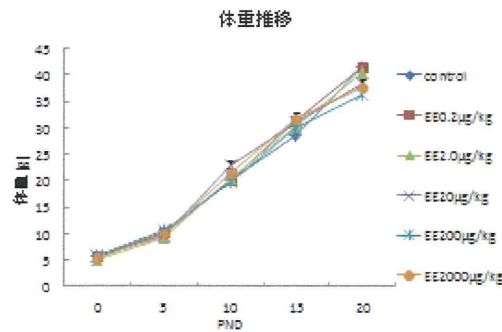


図 1 新生子期EE単回投与が3日齢、10日齢、15日齢、20日齢において体重増加に与える影響
 各群における体重の平均値 ± SEMを示す。
 0日齢においては投与前に既に対照群とEE0.2mg/kg投与群の間で、対照群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
 5日齢においてはEE0.2mg/kg投与群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
 10日齢においてはEE20mg/kg投与群とEE200mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
 20日齢においては対照群とEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

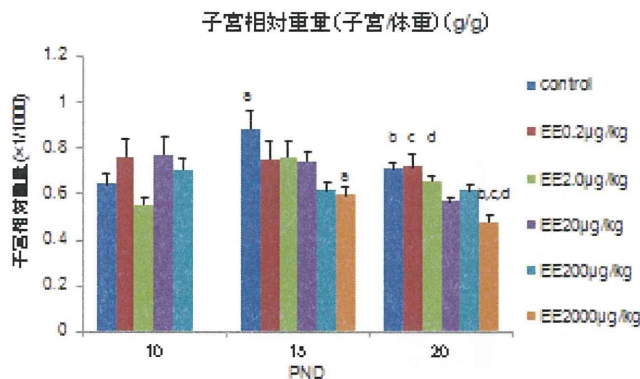


図 2 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する子宮相対重量に与える影響
 各群における体重1g当たりにおける子宮重量の平均値 ± SEMを示す。
 同じ記号が有意差を示す。
 15日齢においては対照群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
 20日齢においてはEE2000mg/kg投与群に対して、それぞれ対照群、EE0.2mg/kg投与群およびEE2.0mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

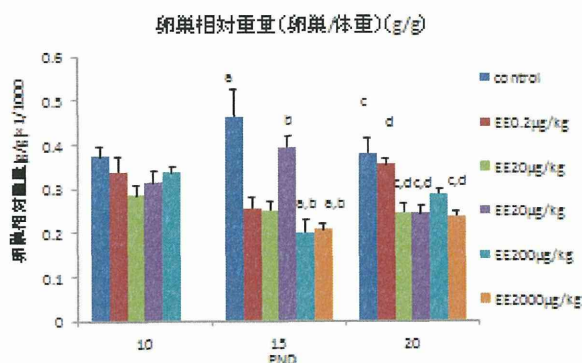


図3 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する卵巣相対重量に与える影響

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。

同じ記号が有意差を示す。

15日齢においては対照群とEE200mg/kg投与群の間、対照群とEE2000mg/kg投与群の間、EE2.0mg/kg投与群とEE200mg/kg投与群の間、EE2.0mg/kg投与群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においては対照群に対して、それぞれEE2.0mg/kg投与群、20mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で、ならびにEE0.2mg/kg投与群に対して、それぞれEE2.0mg/kg投与群、20mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

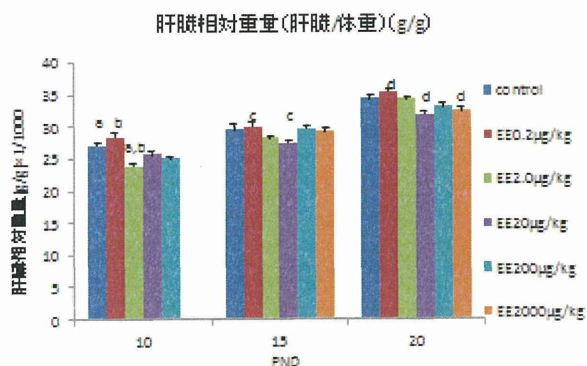


図4 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する肝臓相対重量に与える影響

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。

同じ記号が有意差を示す。

10日齢においては対照群とEE20mg/kg投与群の間、EE0.2mg/kg投与群とEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

15日齢においてはEE0.2mg/kg投与群とEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においてはEE0.2mg/kg投与群に対してEE20mg/kg投与群の間およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

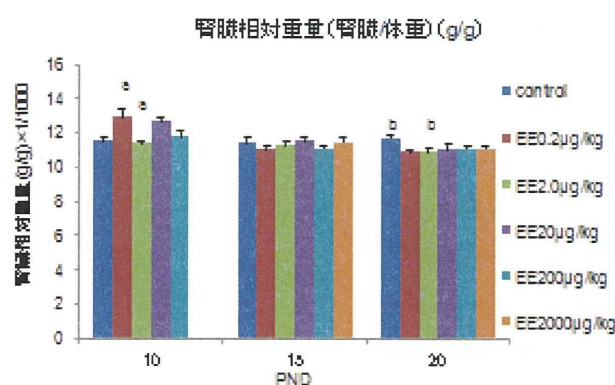


図 5 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する相対腎臓重量に与える影響
 各群における体重1g当たりにおける腎臓重量の平均値 ± SEMを示す。
 同じ記号が有意差を示す。
 10日齢においてはEE0.2mg/kg投与群とEE2.0mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
 20日齢においては対照群とEE2.0mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

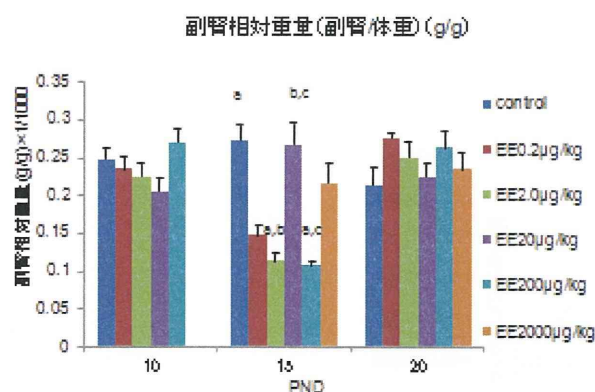


図 6 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において体重に対する副腎相対重量に与える影響
 各群における体重1g当たりにおける副腎重量の平均値 ± SEMを示す。
 同じ記号が有意差を示す。
 15日齢においては対照群に対してEE2.0mg/kg投与群の間およびEE200mg/kg投与群の間で、EE2.0mg/kg投与群とEE200mg/kg投与群の間で、ならびにEE20mg/kg投与群とEE200mg/kg投与群有意差が見られた。

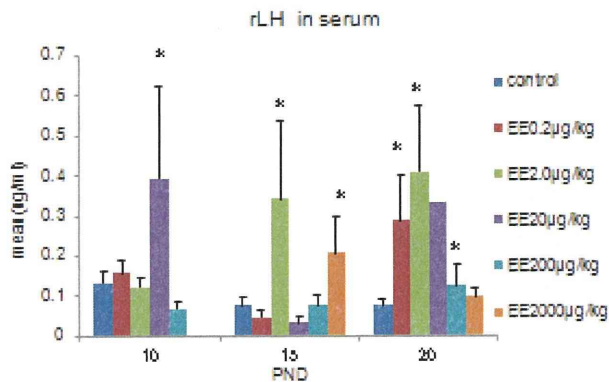


図7 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中LH濃度を与える影響

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。

10日齢において対照群とEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

15日齢においては対照群に対してEE2.0mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においては対照群に対してEE0.2mg/kg投与群、EE2.0mg/kg投与群およびEE200mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

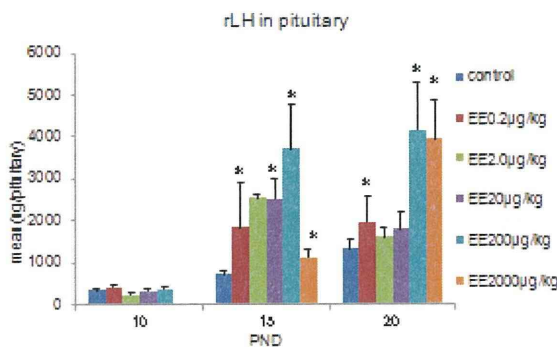


図8 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において下垂体中LH含有量を与える影響

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。

15日齢においては対照群に対してEE0.2mg/kg投与群、EE20mg/kg投与群、EE200mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においては対照群に対してEE0.2mg/kg投与群、EE200mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

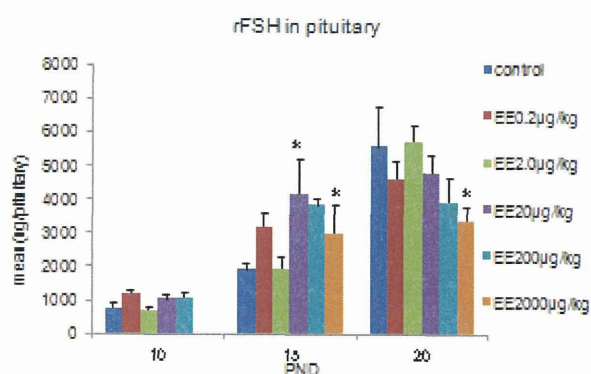


図 9 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において下垂体中FSH濃度を与える影響

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。

15日齢においては対照群に対してEE20mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においては対照群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

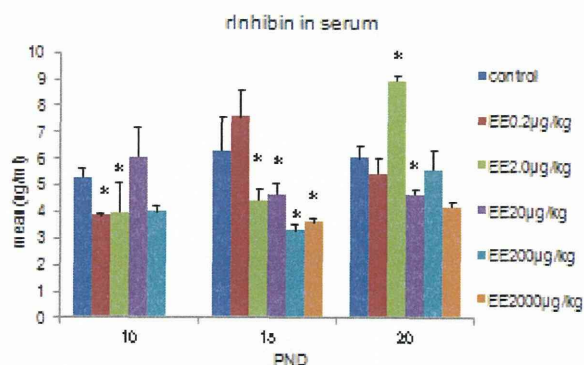


図 10 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において末梢血液中インヒビン濃度を与える影響

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。

10日齢においては対照群に対してEE0.2mg/kg投与群およびEE2.0mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

15日齢においては対照群に対してEE2.0mg/kg投与群、EE20mg/kg投与群、EE200mg/kg投与群およびEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

20日齢においては対照群とEE2.0mg/kg投与群およびEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

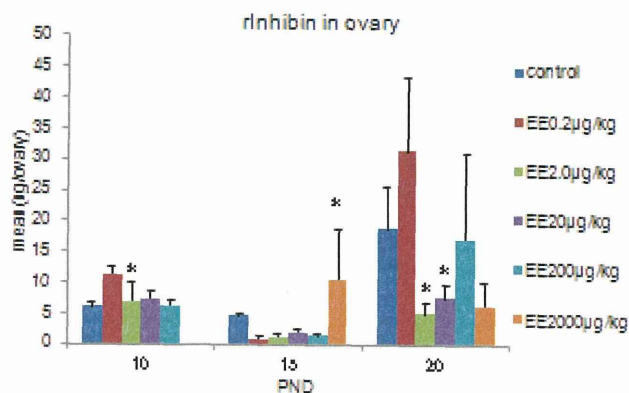


図 11 新生子期EE単回投与が10日齢、15日齢、20日齢において卵巣中インヒビン含有量に与える影響
各群における卵巣中インヒビン含有量の平均値 ± SEMを示す。
記号(*)は同じ日齢の対照群に対して有意差があることを示す。
10日齢においては対照群とEE2.0mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
15日齢においては対照群とEE2000mg/kg投与群の間で有意差が見られた。
20日齢においては対照群とEE2.0mg/kg投与群およびEE20mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

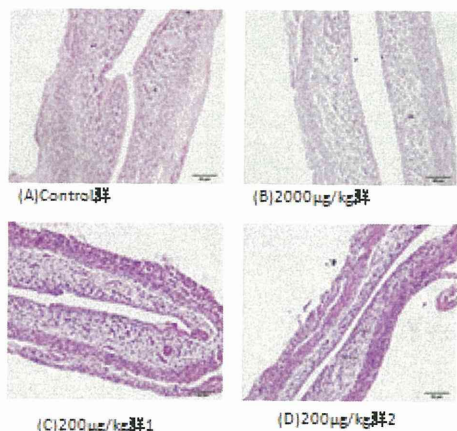


図 12 新生子期EE単回投与のPND20において子宮組織像に与える影響
子宮角断面。HE染色による光学顕微鏡像。(×20)
(A)対照群、(B)EE2000µg/kg投与群、(C)および(D)200µg/kg投与群。
子宮内膜上皮細胞が対照群では円柱状であるが、EE2000µg/kg投与群では立方状であった。200µg/kg投与群では子宮内膜上皮細胞が個体によって円柱状(C)のものと立方状(D)のものがあった。

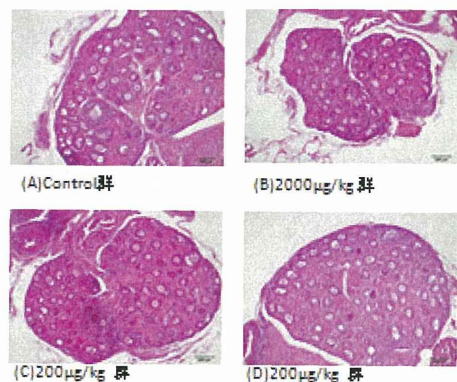


図 13 新生子期EE単回投与のPND20において卵巣組織像に与える影響
最大直径の卵胞を含む卵巣像。HE染色による光学顕微鏡像。(×4)
(A)対照群、(B)EE2000µg/kg投与群、(C)および(D)200µg/kg投与群を示す。
対照群では種々の大きさの胞状卵胞が見られるが、EE2000µg/kg投与群では発達した胞状卵胞が見られず、また卵巣のサイズも小さかった。200µg/kg投与群では個体によって対照群と同程度発達した胞状卵胞が見られるもの(C)と見られないもの(D)があった。

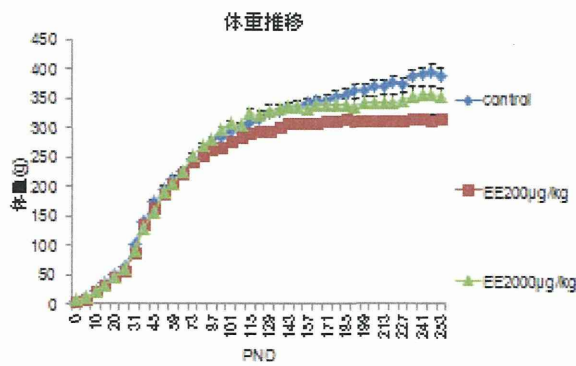


図 14 新生子期EE単回投与が体重増加に与える影響
各群における体重の平均値 ± SEMを示す。
28日齢において対照群とEE200mg/kg投与群の間で有意差が見られた。

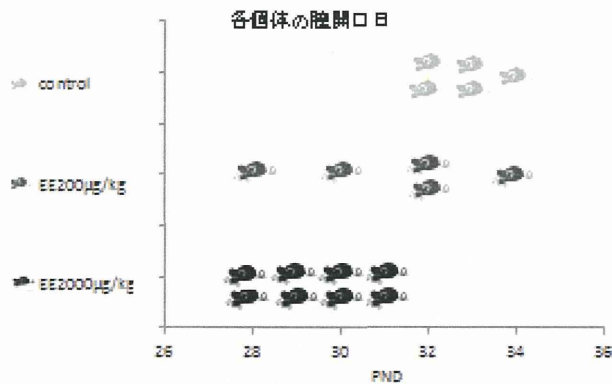


図 15 新生子期EE単回投与が臍開口時期に与える影響
各群における個体ごとの臍開口日を示す。
対照群では32-35日齢の間に臍開口日が観察されたが、EE2000mg/kg投与群では28-31日齢の間に臍開口日が観察された。EE200mg/kg投与群では28-35日齢と幅のある期間に臍開口日が観察された。

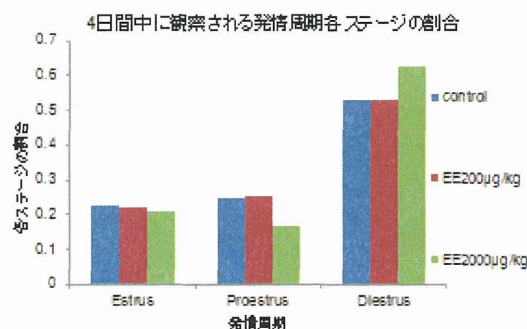


図 16 新生仔期 EE 単回投与が臍開口直後の腫スミア像の発情期、発情前期、休止期に与える影響
臍開口後2ヶ月間の発情周期追跡結果を示す。
対照群と EE200µg/kg 投与群では発情期および発情前期が

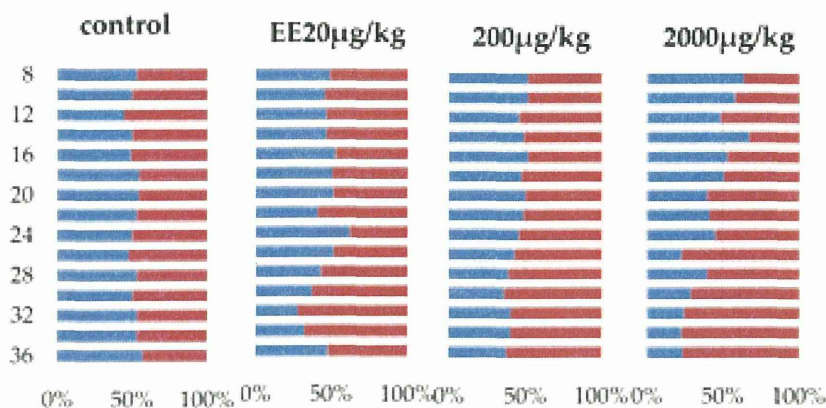


図 17 新生仔期 EE 単回投与が臍開口後から36週齢にわたって腫スミア像に与える影響
臍開口後36週齢の発情周期追跡調査結果を示す。
対照群では観察期間の間、赤で示す発情期および発情前期が各1日、青で示す休止期が2日の正常な4日サイクルが観察された。EE200µg/kg 投与群では26週齢以降発情期の日数が増加した。
EE2,000µg/kg 投与群では臍開口直後から発情周期の異常を示したが、26週齢以降発情期の日数が著しく増加した。

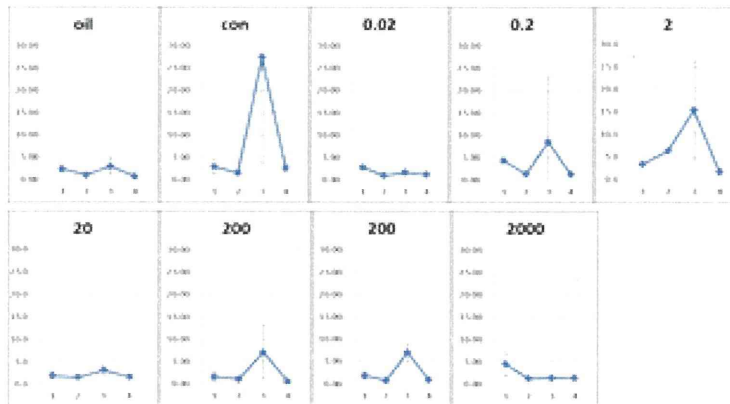


図18 卵巣除去後に発情前期レベルのE2を投与したときに見られたLH分泌の変化
各グラフの横軸の1はE2投与前、2は投与翌日Day1の11時、3はDay2の17時、4はDay3の11時のLH濃度を示す。

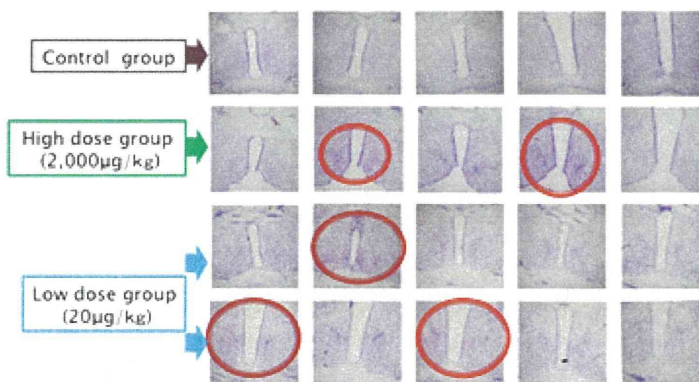


図19 新生仔期EE単回投与が脳の形態学的性分化に与える影響。視索前野性的二型核(SDN-POA)の代表例。まるで示した例でSDN-POAの大きさが対照群に比較して大きく明瞭になっている。

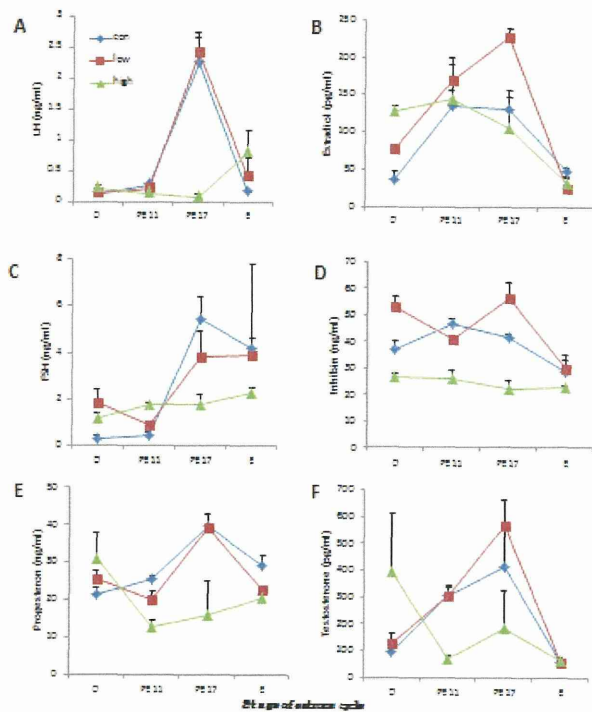


図20 新生子期EE薬回投与動物の5ヶ月齢における発情周期中の生体ホルモンの分泌変化。EE20 μ g/kg(■)low dose groupとEE2,000 μ g/kg(▲)high dose groupの(A)LH, (B)Estradiol-17 β , (C)FSH, (D)inhibin, (E)progesterone and (F)testosterone。◆は対照群。横軸のDは発情休止期11時, PE11は発情前期11時, PE17は発情前期17時, Eは発情期11時を示す。

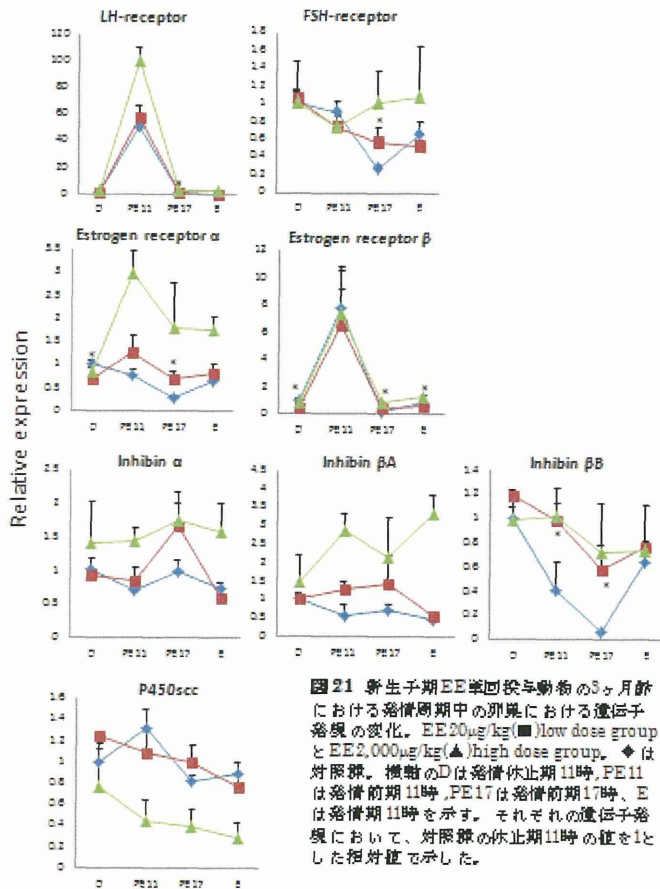


図21 新生子期EE薬回投与動物の5ヶ月齢における発情周期中の卵巣における遺伝子発現の変化。EE20 μ g/kg(■)low dose groupとEE2,000 μ g/kg(▲)high dose group, ◆は対照群。横軸のDは発情休止期11時, PE11は発情前期11時, PE17は発情前期17時, Eは発情期11時を示す。それぞれの遺伝子発現において、対照群の休止期11時の値を1とした相対値で示した。

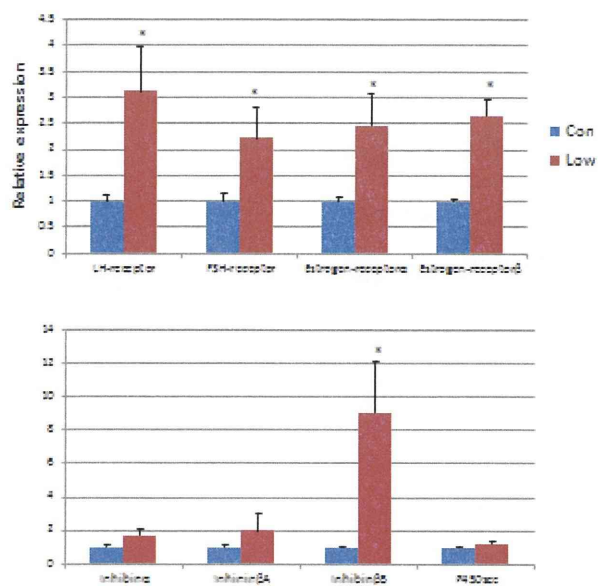


図 22 生後 90 日齢における発情前期 17 時の卵巢遺伝子の発現比較。
青の対照群の値を 1 とし、赤の EE20 μ g/kg (■) low dose group の相対値を示した。

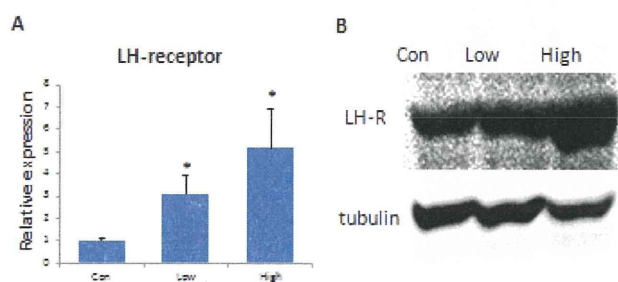


図 23 生後 90 日齢における発情前期 17 時の卵巢 LH レセプター遺伝子発現量の比較。(A) 対照群を 1 とした相対値で示した。(B) LH レセプタータンパクの Western Blotting. Tubulin を対照に用いた。Low: EE20 μ g/kg 投与群、High: EE2,000 μ g/kg 投与群。

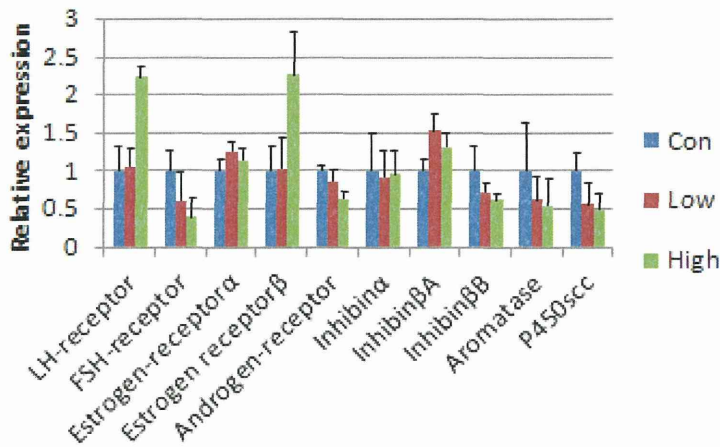


図 24 5日齢における卵巣の遺伝子発現量の比較。Low:EE20 μ g/kg投与群、High:EE2,000 μ g/kg投与群。各遺伝子の対照群の値を1とした相対値で示した。

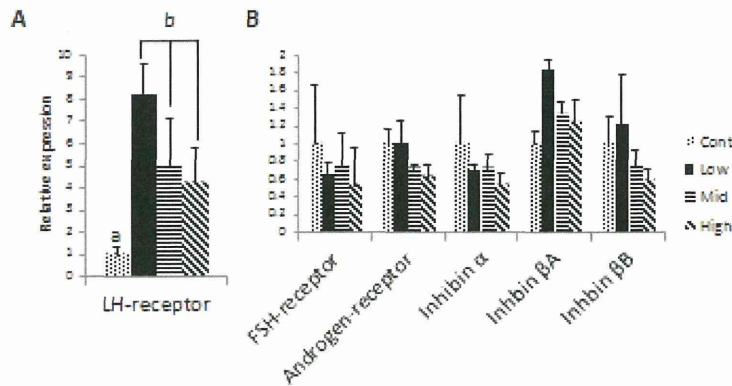


図 25 新生子ラットの卵巣に培養下でEEを作用させたときの遺伝子発現の変化。各遺伝子の対照群の値を1として表現した。1)対照群 (Control) : 培養液のみ、n=4。2)低濃度群 (Low) : EE 1ng/ml、n=4。3)中濃度群 (Middle) : EE 10ng/ml、n=4。4)高濃度群 (High) : EE 100ng/ml、n=4

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】 化学物質の発育期初期にける曝露が、脳に及ぼす晩発型（遅発型）リスクとその評価指標の検索を目的に、経口避妊薬である Ethynylestradiol（以下 EE）の出生 24 時間以内の新生仔マウス皮下投与を実験モデルとして、生後神経新生と脳の性分化へのリスク評価を行った。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仔期曝露による内分泌機能に与えるリスク評価が複数報告されている。しかし、多くの評価系は卵巣および子宮など内部生殖器官あるいは外部生殖器の発達を指標にした研究である。海馬の神経細胞やグリア細胞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・亜急性作用を指標にしたものであった。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としてはあまり例のない成体神経新生へのリスク評価を試みた。また、エストロゲン様作用をもつ EE の新生仔曝露による脳の性分化に及ぼすリスク評価として、内側視束前野（POA）における Calbindin D-28k (CB) 陽性細胞の性的二型への影響評価を試みた。これに合わせて、成熟雄マウスが成熟雌マウスと接触した際に発する 100kHz～150kHz の性行動誘発声（超音波発声：USV）への影響、さらには甘味物質好選性への影響といった行動学的性差への影響も解析に加え、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行った。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、並びに膣開口時期への影響も合わせて観察した。

【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皮下投与し、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。全個体とも 1 週齢毎に体重を測定し、雌については膣開口時期を観察した。

生後 10 週目（70 日齢）に達した個体は、超音波記録装置を装着した観察ケージにおいて発情雌と同居させて 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、EE2,000 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 2.5% サッカリン液を給水便で同時に提示（2 ボトル法）して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して脳標本とした。引き続き、内側視東前野（POA）を含む脳切片標本を作製して、Anti-Calbindin D-28k (CB) を一次抗体として免疫組織化学染色（IHC）を施して、POA における CB の分布パターンを評価した。

海馬観察の動物は一般飼育環境下で 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 IHC 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。さらに、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。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。

【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膻開口時期を早めた。体重変化には顕著な影響は認められなかった。しかし、雄では EE 高濃度群（2,000 μ g; EE2000）において離乳期から春機発動期間の体重が他群に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（20 μ g; EE20）において、春機発動期以降の体重が他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 EE2000 群において全個体で USV の発声が認められず、EE20 μ g 群では 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 EE20 群では発声は認められないが、EE 高濃度群では 40% 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。POA における CB 陽性細胞の分布パターンは、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。その結果として、POA における CB 陽性細胞の分布パターンは EE 投与によって雌雄差が不鮮明化する事が明らかとなった。一方、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は顕著な影響は認められなかった。さらに、OBRR に対する影響も認められなかった。

【考察】 生後 24 時間以内におけるマウス新生仔期（脳の性分化の臨界期）への高濃度 EE 暴露による晩発型（遅発型）影響は、(1) 海馬の成体神経新生ならびにプログラム神経死に対しては顕著な影響は及ばない。しかし、(2) 雌の膻開口時期を早め、(3) 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と雌では中濃度 EE の曝露は体重増加を誘発する可能性が示された。雌雄差への影響として、(4) 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こと、

(5) 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ため、結果的に雌雄差が不明瞭になることが認められた。

EE の新生仔期暴露が脳に及ぼす晩発型（遅発型）リスクは、海馬の成体神経新生ならびにプログラム神経死に対しては顕著な影響は及ばない（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）一方、わずか1回の曝露であったとしても高濃度の曝露を受けた場合は、脳内 POA 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。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、たとえ短時間であったとしても、高濃度曝露を受けた場合は生殖機能を司る部分を中心に生涯に渡る障害を及ぼすことに注意が必要である。

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 皮下投与モデルを用いて、(1) 発育への影響、(2) 膣開口への影響、(3) 成熟後の海馬歯状回における神経細胞新生、脳室下帯生後神経新生され嗅球に移動する細胞への影響、(4) マウスの内側視束前野（POA）に認められるカルシウム結合蛋白質の 1 種である Calbindin D-28k (CB) の性的二型分布に及ぼす影響、(5) 成体の社会行動として認められる 100kHz~150kHz 周波数の発声（超音波発声：USV）の性的二型への影響、(6) 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、の評価を目的とした。

B. 研究方法

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。対象群は溶媒に用いたゴマ油 10 μ l/g BW を投与した。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。

最初に皮下投与した EE（20,000 μ g 群）が脳へ移行していることを確認するために、EE 投与後の 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）。

その他の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 からは外部生殖器を観察し、同一ケージの全ての雌動物が膣開口する日までを確認した

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、90-100 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 (MPA) 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-Calbindon 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。

さらに、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、凍結マイクローム (Yamato) により厚さ 50 μ m の連続前頭断切片を作成した。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 (POA) 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、体重測定、膣開口確認、BrdU 投与、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 投与による脳内 EE 濃度の変化

EE 20,000 μ 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) 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 (21-42 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 2 Male)。一方雌は、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 2 Female)。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) 雌の膣開口への影響

出生当日 EE 投与は、明瞭に膣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膣開口状態にあった (図 3)。

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 0% (10 例中 0 例)、EE20 群では 0% (6 例中 0 例) であったのに対し EE2000 群では 40% (10 例中 4 例) で 100-150kHz の USV が認められた (図 4; 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 (PD63) 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5: Saccharin choice)。

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6)。

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

通常、マウスのPOA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。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7)、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8)。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POA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9)、雌では逆にCB陽性細胞の分布が増加すること(図10)が確認された。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。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11)。

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EE暴露(EE2000群)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の大領域にわたって認められた(図12)。

5) 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EE暴露(EE2000群)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。この傾向は海馬歯状回の大領域にわたって認められた(図13)。

6) 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EE暴露(EE2000群)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