

図9: EE作用により雌POAの形態変化は起こらず
CB発現のみが増加する

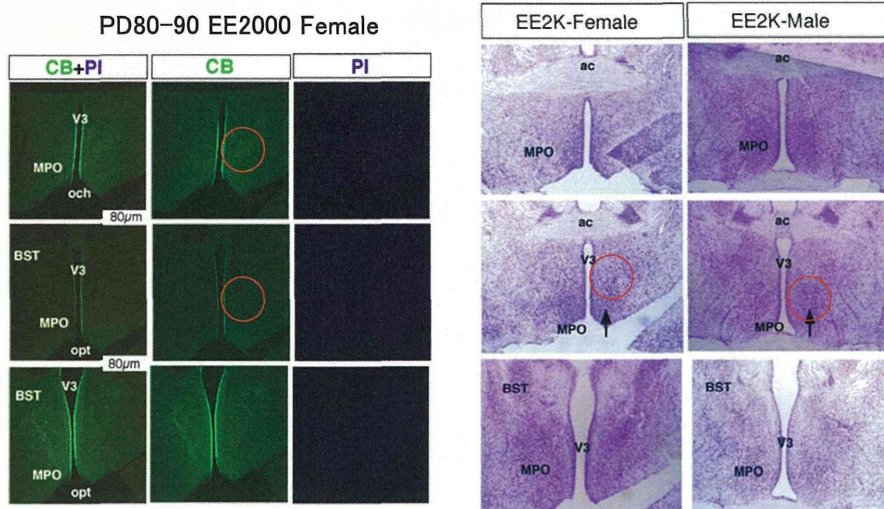
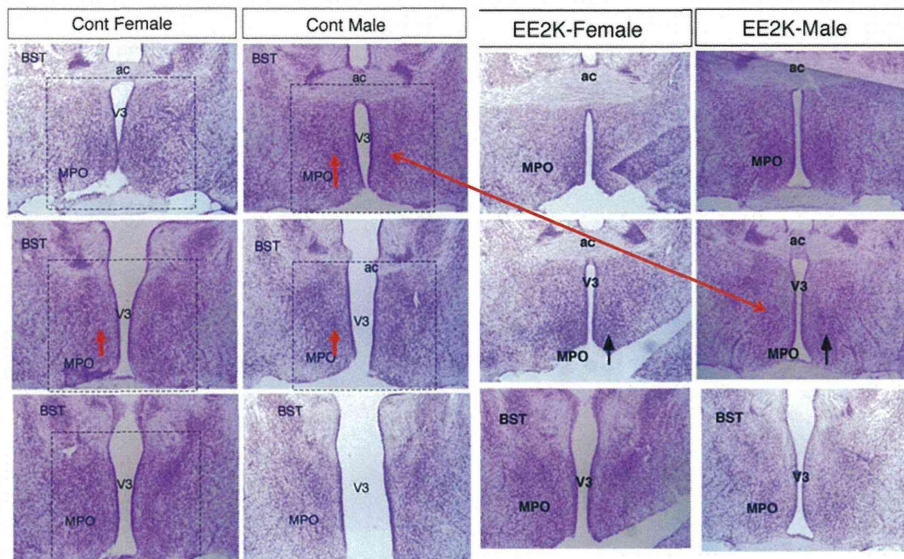


図10: EEによるCB細胞群の変化は脳の形態的変化
を反映した変化ではない



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による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部
キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

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： 堀井康行 学校法人明治大学 農学部農学科 動物環境学研究室
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
中村孝博 学校法人帝京平成大学 薬学部薬学科
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
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。本年度は全プロジェクトに引き続き、EDs のひとつである 17α -ethynylestradiol (EE) を生後 24 時間以内に曝露し、各種神経行動学的解析を行った。その結果、受動回避学習試験では、エストロゲン存在下でのみ低濃度である $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ EE 曝露により学習成績が低下する一方、高濃度である $2 \text{ mg}/\text{kg}$ EE 曝露では影響を及ぼさないことが示された。また、海馬ではエストロゲン存在下でのみ EE 曝露によるエストロゲン受容体 (ER) α 発現が低下する一方、大脳皮質ではエストロゲン非存在下でのみ EE 曝露による ER 発現が低下した。

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 (図 1)。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、ホルモンによって形成的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的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。また、どの時期のどのくらいの濃度がどのような行動に影響を及ぼすか不明瞭である。

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。本年度は学習・情動行動の遅発型影響評価と ER α 発現を含めた作用機序の検討、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 系雌ラットに、ごま油 (oil)、ごま油に溶解した 17α -ethynylestradiol (EE、Sigma Aldrich, USA) 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ あるいは 2 mg/kg 、陽性対照として 17β -estradiol (E2、Sigma Aldrich, USA) 20 mg/kg 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。さらに、卵巣への EE 曝露の影響を排除するために、10 週齢で卵巣摘出 (OVX) を行った。また、一部の実験では、EE 曝露による形成的作用の機能的な作用への影響についても検討するために、半数の OVX ラットに実験 24 時間前の EB 5 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 皮下投与した。これらのラットを行動神経内分泌学的解析のため、以下の実験に供した。

<オープンフィールド試験>OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ 投与した 11 週齢雌ラット：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 3) 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。

<受動回避学習試験>OVX あるいは OVX して獲得試行の 24 時間前に EB 投与した個別飼育の 16~17 週齢雌ラット：受動回避学習試験装置 (実験箱 PAA-3001、コントロール装置 PA-2010A; 小原医科産業株式会社、図 4) を用い、嫌悪刺激の 24 時間後における学習成績について検討した。

<新奇物体認知試験>OVX した 12~13 週齢雌ラット：黒色塩化ビニル製ケージに予めテストラットを慣らし、弁別法による物体に対する探索行動を指標として、学習成績について検討した (図 5)。実験は 2 回行い、1 回目の実験では獲得試行で未知の物

体を一つだけ提示し、保持試行では同じ物体を新たな未知の物体と同時に提示した。2 回目の実験では獲得試行で同じ未知の物体を 2 つ提示し、保持試行ではそのうちの一つを新たな未知の物体と交換した。また、1 回目の実験で物体の選好性に化学物質曝露の影響が検出されたため、物体を変更して 2 回目を行った。

<社会性認知試験>OVX した 15~16 週齢雌ラット：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 チャンバーケージに予めテストラットを慣らし、未知の雌ラットを 1 匹入れ探索行動をさせ社会性の強度を検討した (獲得試行：図 6)。インターバルの後テストラットおよびさきほどの未知ラットを既知ラットとして、さらに別の未知雌ラットを新たな未知ラットとして入れ、既知・未知ラット各々へのテストラットの接近回数・接近時間を測定し、社会性認知を検討した (保持試行)。相手雌ラットは OVX した同週齢のラットを用いた。2 回実験を行い、1 回目は試験前に個別飼育を 3 週間行い、2 回目は個別飼育を 1 週間行った。

<ER α 発現量測定>学習・情動行動調節機構の一部である海馬と大脳皮質における ER α タンパク質発現量を Western blot 法にて検討した。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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 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, GAPDH 1:5000, Santa Cruz Biotechnology)、二次抗体 (Anti-rabbit 1:10000, Promega, Anti-mouse 1:10000, Promega) 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。

＜母子分離誘発啼鳴反応＞0 週齢雌ラット：母親および同腹仔から引き離されると発する、20 kHz～60 kHz の超音波領域に主成分を持つ啼鳴反応を指標に、啼鳴反応における 30 分前のジアゼパム 0.1 ml/kg および 0.3 ml/kg 投与の影響が、性差を有するか否かを検討し、早期指標の確立をめざした。

（倫理面への配慮）

動物実験は明治大学農学部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

＜オープンフィールド試験＞OVX11 週齢雌ラットにおいて、活動量の指標である総移動距離・平均移動速度および情動行動の指標である中央滞在時間にはエストロゲン様物質投与は影響を及ぼさなかった。また、実験 24 時間前 EB 投与の有無による影響も検出されなかった。

＜受動回避学習試験＞実験 24 時間前 EB 投与の条件下では、生後 24 時間以内の 20 μ g/kg EE 曝露で学習の低下が認められた。しかし実験 24 時間前に EB 投与を行わない場合は、学習への影響は検出されなかった。

＜新奇物体認知試験＞1 回目では生後 24 時間以内の 20 μ g/kg EE 曝露で、物体を変更して行った 2 回目では 20 μ g/kg EE および 2 mg/kg EE の両方で物体認知が低下した。しかし E2 曝露の影響は認められなかった。

＜社会性認知試験＞未知ラットへの接近行動には群間に有意差は認められなかったが、その後の保持試行では、1 回目の実験では oil と E2 曝露においてのみ未知ラットへの接近が既知ラットに比べ有意に増加する社会性認知が認められた。しかし 2 回目の実験では、化学物質曝露群のみならず oil 群における社会性認知も認められなかった。また、E2 曝露の影響も表れなかった。

＜ER α 発現量測定＞海馬では、実験 24 時間前の EB 投与をした場合に、生後 24 時間以内の EE 曝露で ER α 発現量が減少した。

しかし、実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合は生後 24 時間以内 EE 曝露の影響は認められなかった。大脳皮質では、実験 24 時間前 EB 投与をした場合の群間の差は検出されなかったが、実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合は生後 24 時間以内の EE 曝露で ER α 発現量が減少した。

＜母子分離誘発啼鳴反応＞母子分離誘発啼鳴反応 30 分前のジアゼパム投与は、用量依存性に母子分離誘発啼鳴反応を減弱させたが、その影響に性差は検出されなかった。

D. 考察

受動回避学習試験では、EB 投与条件下で 20 μ g/kg EE 曝露群における学習能力が低下した。受動回避学習試験では、活動量の低下が見せかけの学習能力向上として表れる危険性があるが、同じ EB 投与条件でオープンフィールド試験における活動量に変化がないことから、この結果は学習能力の変化が反映されている可能性が高い。

本実験では、受動回避学習試験と同じ EB 投与条件で主要な学習行動調節機構である海馬の ER α 発現が生後 24 時間以内の EE 曝露により低下している。従って、生後 24 時間以内の EE 曝露による受動回避学習試験の成績低下の少なくとも一部は、海馬における ER α 発現低下を反映している可能性がある。また、我々は前プロジェクトで、無処置動物における受動回避学習試験においても 20 μ g/kg EE 曝露が学習行動を低下させたことを明らかとしている。今回の結果は、その原因の一部が海馬の ER α 発現変化に起因している可能性も示した。

新奇物体認知試験では、1 回目と 2 回目の両方で 20 μ g/kg EE 曝露が学習行動を低下させている。これは受動回避学習試験の結果と一部一致する。ただし、こちらは実験前の EB 投与は行っていないため、受動回避学習試験への影響とは作用機序が異なる可能性がある。また、方法を一部変更した 1 回目と 2 回目の間で結果が一致していない。今後方法を統一し、追試を行う。

社会性認知試験では、1回目、2回目の試験とも、未知ラット単体提示における接近行動には群間に有意差は検出されなかったため、社会性行動そのものには本実験の化学物質曝露は影響していない可能性が高い。また1回目の試験では、oil群とE2曝露群では、同種の個体識別、つまり社会性認知能力があることが示されたが、EE曝露群では既知・未知ラットへの接近に違いが認められなかったことから、社会性認知能力が低下している可能性が示唆された。従って本研究のEE曝露は、E2とは異なる独自の機序により社会性認知能力を低下させる、あるいは陽性対照より低濃度のEDsが社会性認知能力を低下させる可能性がある。しかし、2回目の試験においてoil群の社会性認知試験が成立しなかったため、今後方法を改良して追試を行う必要がある。

ER α 発現量は、どちらのEE曝露においても、海馬では実験24時間前EB投与をした場合に、大脳皮質では実験24時間前EB投与をしなかった場合に減少した。従って、ER α 発現への生後24時間以内のEDs曝露の影響は脳領域により異なり、さらにエストロゲンの機能的作用も部位特異的に変化させる可能性が改めて示された。

前プロジェクトで行った性行動・性選好性試験では、陽性対照であるE2曝露群はEE曝露群に対し、より強い抑制効果を示したが、本年度行ったほぼすべての行動実験において、陽性対照であるE2曝露群では大きな変化が表れなかった。これは、本年行った学習試験に影響を及ぼす生後24時間以内のエストロゲン様物質曝露の至適濃度が、SDN-POAの形成や性行動に影響する濃度より低い可能性を示している。あるいは、本試験で認められたEE曝露の影響が、エストロゲン様物質としての影響ではなく、EE独自の効果である可能性もあるかもしれない。

母子分離誘発啼鳴反応を用いた早期指標の確立を目指して、成熟動物の一部の行動において抑制影響に性差が見られるジアゼ

パムを投与することにより、母子分離誘発啼鳴反応の性差を検出できるのではないかと考え検討したが、明らかな影響は検出されなかった。

E. 結論

受動回避学習試験、新奇物体認知試験において、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ EE曝露による学習能力の低下が表れた。そのうち、受動回避学習試験はエストロゲン存在下で影響が表れること、作用機序として海馬のER α 発現量と関連する可能性が示された。また、ER α 発現量は、大脳皮質では海馬とは異なる変化が表れたことから、ER α 発現への生後24時間以内のエストロゲン様物質曝露の影響は部位特異的であることが改めて示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Harigaya, T., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Effects of antiandrogen on sexual behavior, organ weight and hormone levels of male rats.

The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)

2) Shiga, T., Kawaguchi, M., Harigaya, T., Mizoguchi, Y.

Ethynyl estradiol exposure within 24 hours of birth affects Estrogen receptor α expression levels in adult female rats.

The Endocrine Society's 95th Annual Meeting & Expo (2013年6月14日～18日、San Francisco, U.S.A.)

3) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on feeding, learning and sexual behavior.

第36回日本神経科学大会 (2013年6月22日、京都)

4) 川口真以子、小峰千亜希、神島愛未、近藤保彦

Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on sexual behavior.

第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013年9月12日~14日、東京)

5) Komine, C., Kamishima, M., Kobayashi, Y., Senbon, T., Uemura, H., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Effects of estrogenic compounds exposure within 24 h after birth on feeding, learning and sexual behavior in female rat.

4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)

6) Kamishima, M., Uemura, H., Horii, Y., Watanabe, G., Taya, K., Takigami, H., Suzuki, G., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Antiandrogen during juvenile induce hypoplasia of penis and suppression of sexual behavior of male rats.

4th International NeuroMalaysia Symposium (2013年9月28日、Malaysia)

7) Shiga, T., (Nakamura, T. J., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.)

Neonatal exposure to ethynyl estradiol influences the expression levels of estrogen receptor α in the adult brain of female rats.

Neuroscience 2013 (2013年11月8日~13日、San Diego、U.S.A.)

8) Komine, C., Kamishima, M., Odashima, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.(Kawaguchi, M.)

Effects of estrogenic compounds exposure

within 24 h after birth on partner preference and sexual behavior in female rats.

Neuroscience 2013 (2013年11月8日~13日、San Diego、U.S.A.)

9) Shiga, T., Nakamura, T. J., Chiaki, K., Kamishima, M., Goto, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Mizoguchi, Y., Kawaguchi, M. Exposure to ethynyl estradiol within 24 hours of birth decreases the expression levels of ER α in adult female rats.

第16回日本内分泌攪乱化学物質学会 (2013年12月12日~13日、東京)

G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

参考文献

- (1) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J, Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, 519, 2954-2977.
- (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) Estrogen Receptor Gene Promoter O/B Usage in the Rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area., Hamada T and Sakuma Y, *Endocrinology*, 2010, 151(4), 1923-1928.

図1 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

周生期EE投与



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

成熟期EB投与



図2 E2が作用する中枢神経系の機能

摂食

生殖

情動

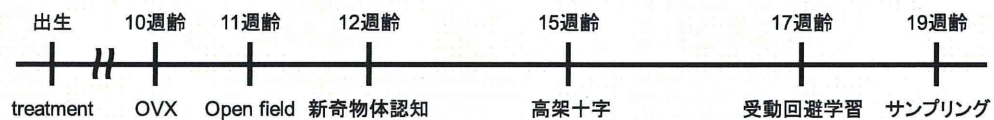
高次機能
学習・記憶



2013年度

Wistar-Imamichi系雌ラットにsesame oil (Oil)、20 ug/kg EE (low EE)、2 mg/kg EE (high EE)および20 mg/kg E2を生後24時間以内に投与し以下の試験を行った。

実験4



実験5



不安行動
一般活動量

Open field試験

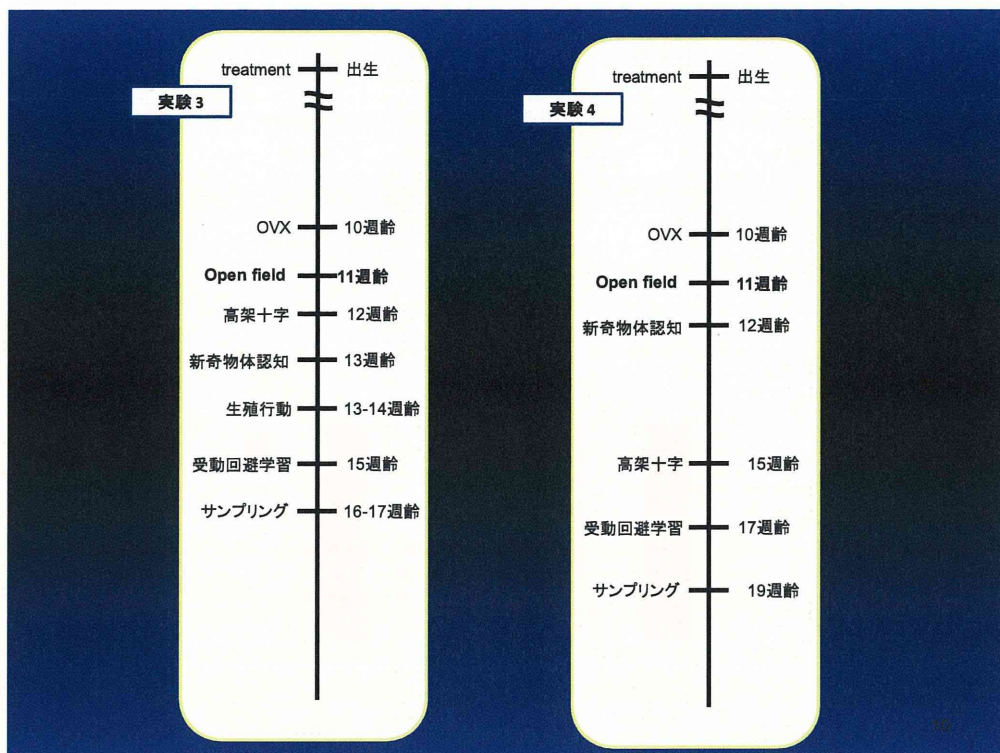
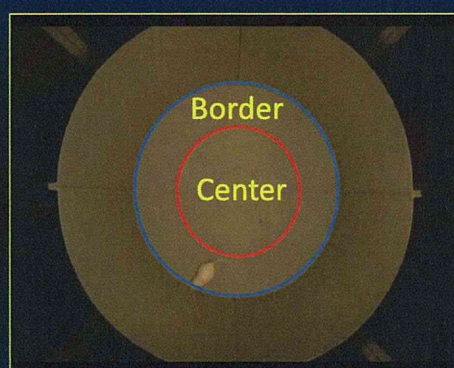
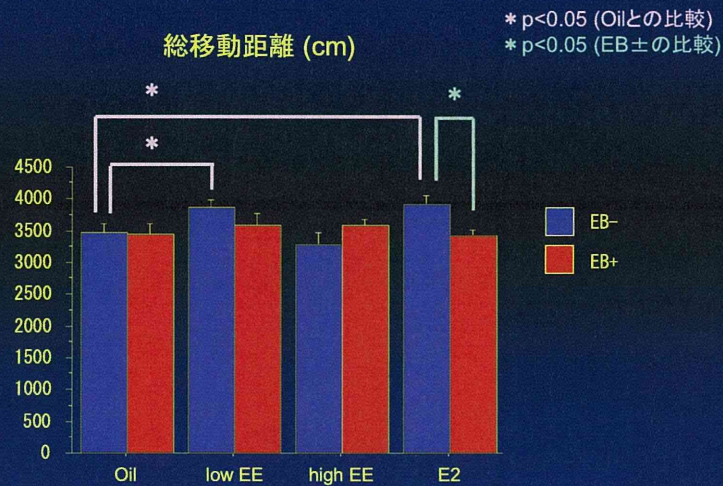


図3 円形オープンフィールド



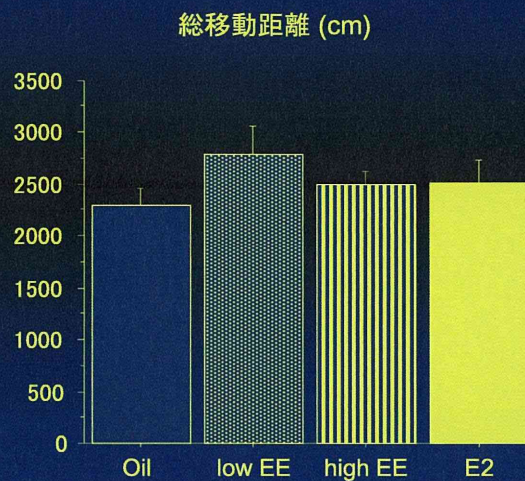
- 各群の約半数にEB 5 $\mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ を、実験3は24時間前、実験4は48時間前に投与し、感受性についても検討した。
- ラットをBorderの壁向きにセットし、5分間ビデオで撮影した。
Border:不安行動の指標
Center:探索行動の指標
- 撮影した映像は画像解析ソフト Ethovision XT8を使って解析した。

実験3における総移動距離では、
EB非投与の20 ug/kg low EEとE2で増加した。



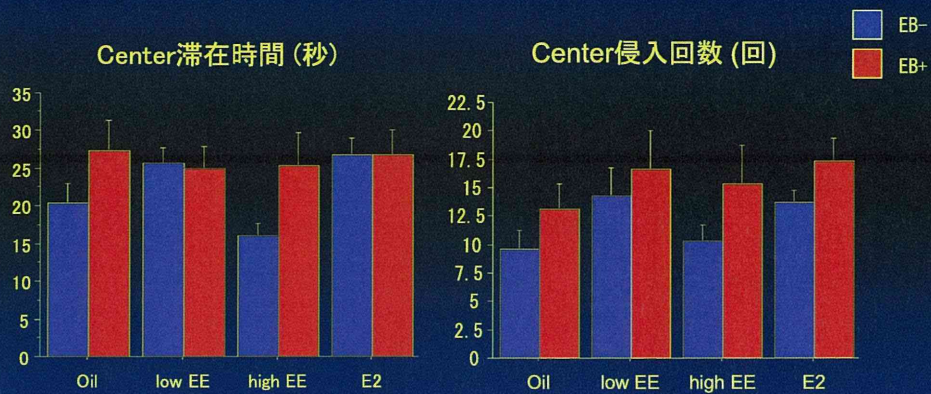
12

実験4における総移動距離では
有意差は検出されなかった。



13

実験3、4におけるCenter滞在時間・侵入回数では有意差は検出されなかった。

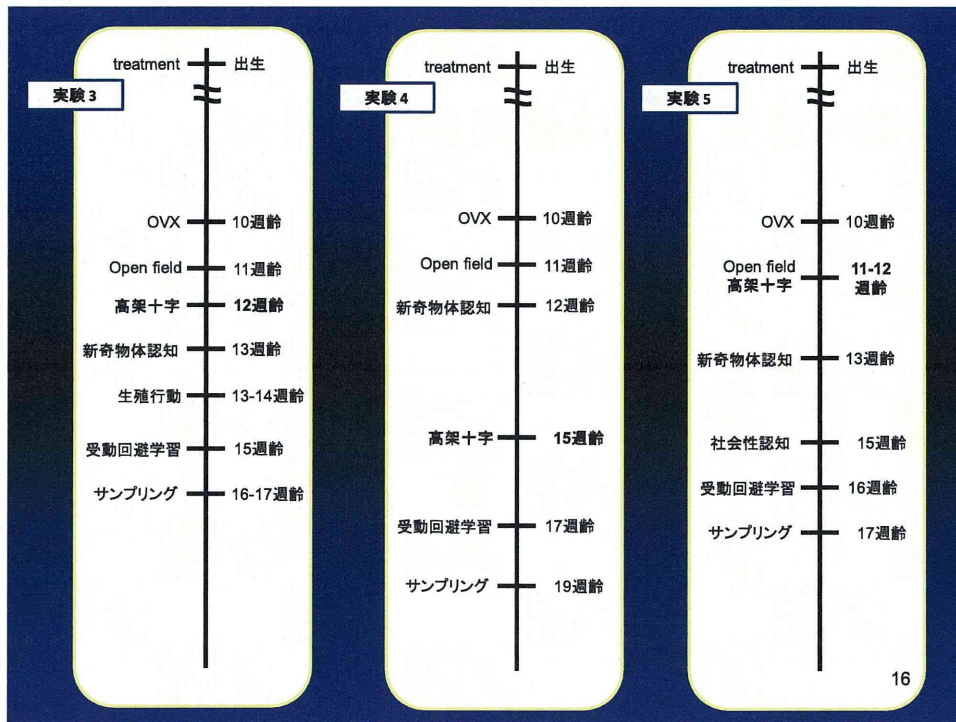


14

不安行動

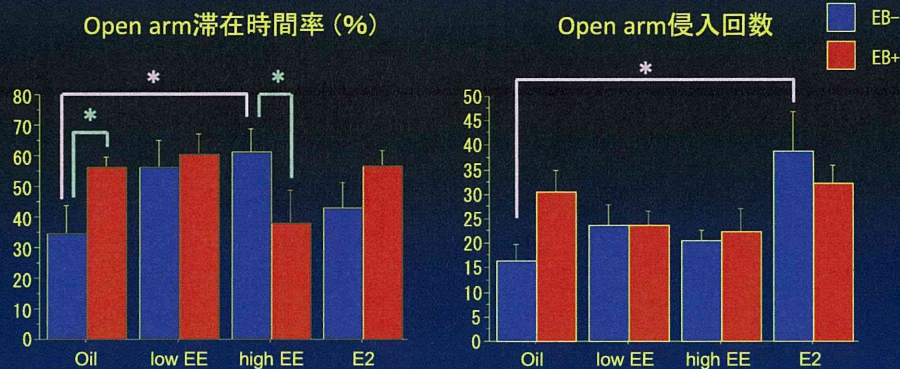
高架十字試験

15



実験3におけるOpen arm滞在時間率は、EB非投与の2 mg/kg high EEで増加し、侵入回数はEB非投与のE2で増加した。

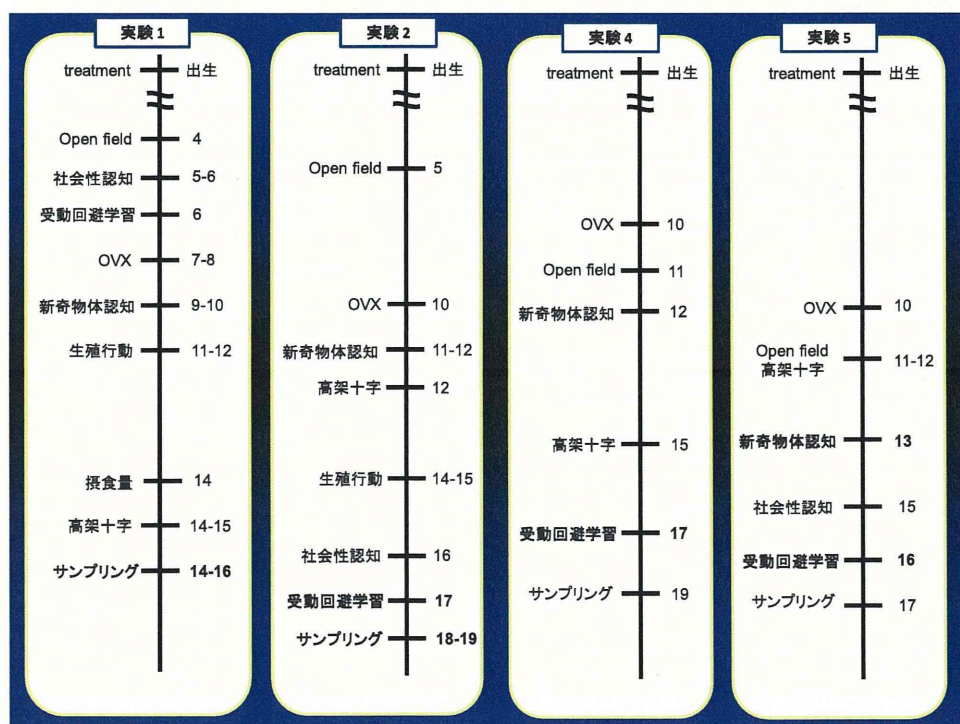
* p<0.05 (Oilとの比較)
* p<0.05 (EB±の比較)



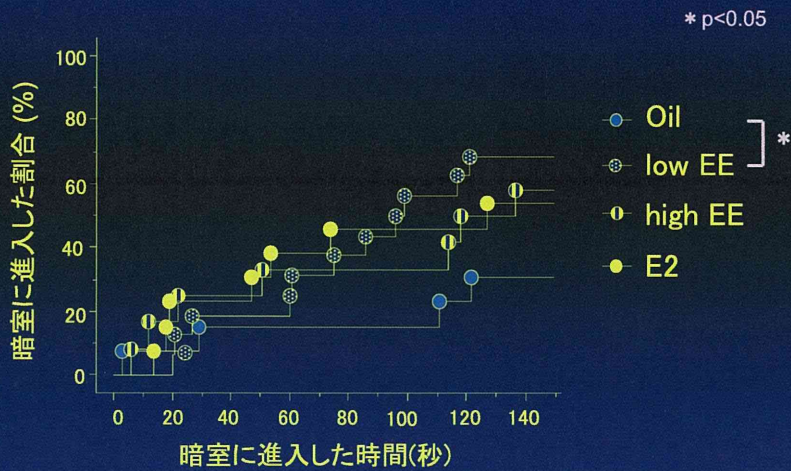
学習行動

受動回避学習試験

18

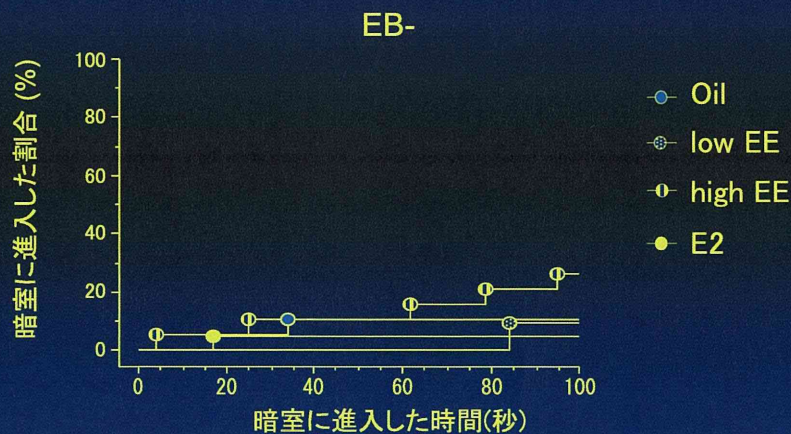


実験1における無処置雌の受動回避学習
は20 ug/kg low EEで低下した。

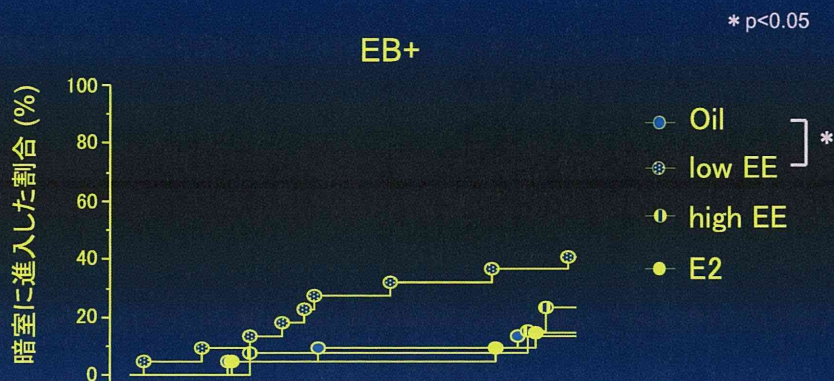


20

実験2、4、5における受動回避学習では、
EB非投与では有意差は検出されなかった。



実験2、4、5における受動回避学習では、EB投与では20 ug/kg low EEで低下した。



低用量EEはエストロゲン存在下で回避学習が低下する可能性がある

学習行動

新奇物体認知試験

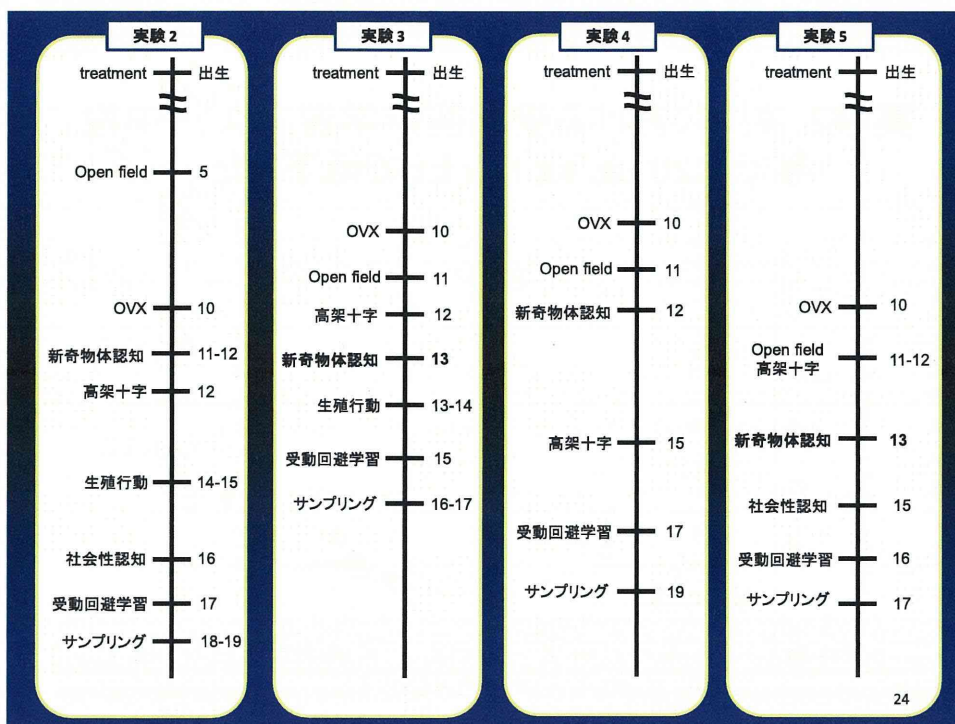
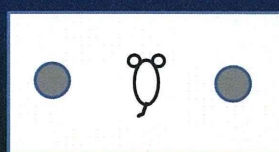
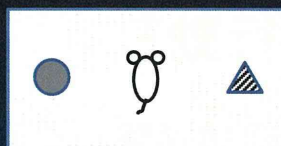


図5 新奇物体認知試験(弁別法)



獲得試行
(探索行動測定)

↓ インターバル

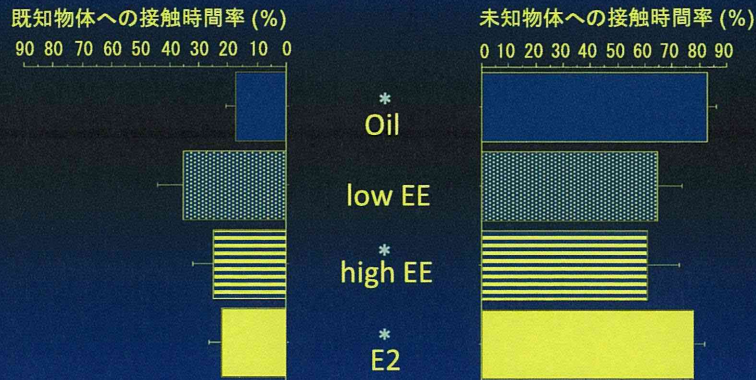


保持試行
(物体認知測定)

行動を録画し、動物の鼻が物体へ接近する回数と時間を解析

実験2において、物体認知は20 ug/kg low EEで低下した。

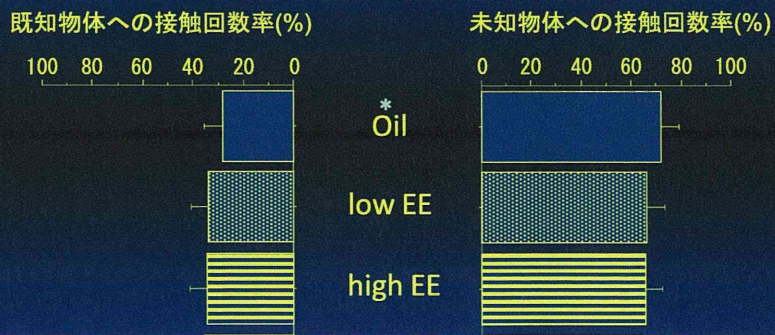
* p<0.05 (既知・未知の比較)



26

実験4における物体認知は、20 ug/kg low EEと2 mg/kg high EEで低下した。

* p<0.05 (既知・未知の比較)

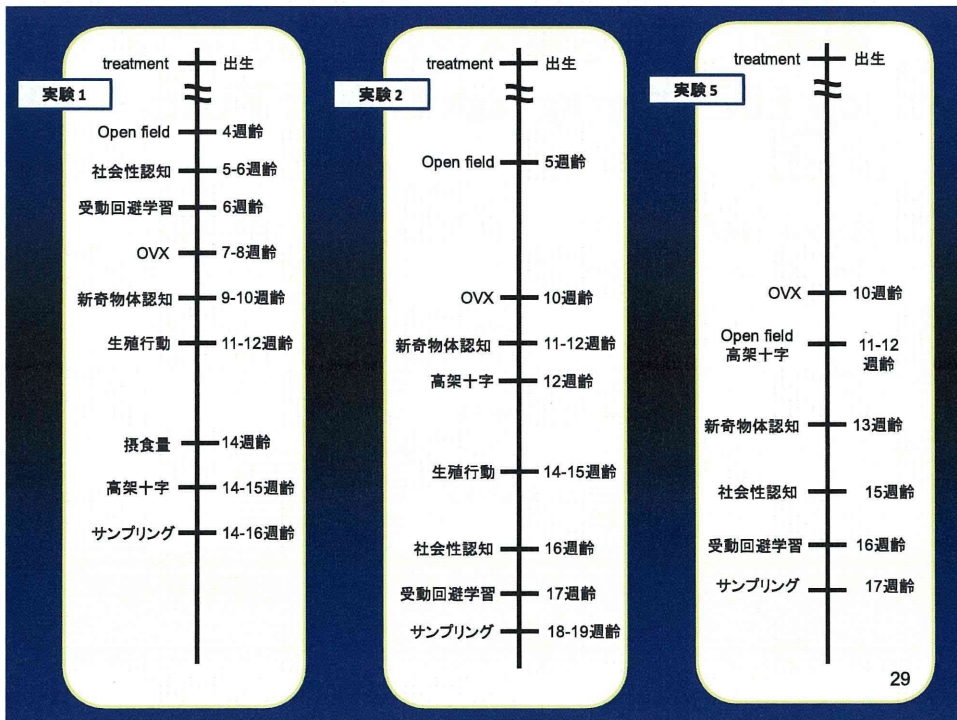


低用量EEはエストロゲン非存在下で物体認知を低下させる可能性がある

社会性行動 学習行動

社会性認知試験

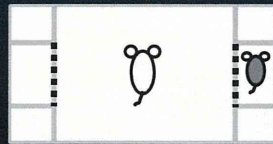
28



29

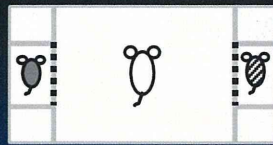
図6 社会性認知試験

個別飼育



獲得試行
(社会性行動測定)

↓ インターバル



保持試行
(社会性認知測定)

行動を録画し、動物の鼻が相手ケージへ接触する回数と時間を解析

実験2における社会性認知は、20 ug/kg low EEと2 mg/kg high EEで低下した。

* p<0.05 (既知・未知の比較)

