

**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： 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 学校法人明治大学 農学部生命科学科  
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。本年度は前年度に引き続き、EDsのひとつである17 $\beta$ -ethynylestradiol (EE)を生後24時間以内に曝露し、幼若期の脳皮質と海馬におけるエストロゲン受容体(ER)発現量の測定ならびに成熟期の情動・学習試験、縄張り行動試験を行った。また、行動学的早期指標の確立をめざし、雌雄幼若ラットを用い母子分離誘発蹄鳴反応試験を行った。その結果、2週齢の海馬ではEE曝露によるER発現が低下した。一方、学習試験においては遅発影響誘発量で、縄張り行動試験においてはそれより高濃度のEE曝露量で影響を及ぼすことが明らかとなった。また、母子分離誘発蹄鳴反応試験において実験条件により性差が検出される可能性が示された。

**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、発達後に活性的作用が認められる。エストロゲンが形成的作用を及ぼす神経機構は、生殖、情動、学習など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。川口らの今までの研究において、性行動および性選好性といった生殖行動に関しては、性周期を早期に停止させる遅発影響誘発量では十分影響せず、それより100倍高い濃度で性行動の低下を引き起こすことが示されている。また、無処置6~8週齢における受

動回避学習試験において、遅発影響誘発量で学習成績が低下することも明らかとしている。一方、遅発影響誘発量で学習に重要な海馬の ER 発現が、卵巣摘出 (OVX) して estradiol benzoate (EB) 投与した条件で低下することから、生後 24 時間以内の EE 投与による学習への遅発影響は海馬の ER の変化を介している可能性を示唆している。

そこで本年度は早期指標の確立をめざし、生後 24 時間以内に EE を曝露し、幼若期の海馬および大脳皮質の ER 発現が成熟期と同様に変化しているか否か検討した。併せて今まで検討してきた情動・学習行動について遅発影響誘発量より 100 倍低い濃度でも検討した。また、生殖行動試験である縄張り行動試験を行った。一方、行動学的早期指標を確立するために、母子分離誘発蹄鳴反応試験にて性差が検出される条件について検討した。

## 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 17 $\beta$ -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA) 0.2  $\mu$ g/kg、20  $\mu$ g/kg あるいは 2 mg/kg、陽性対照として 17 $\beta$ -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た。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作用に対する影響についても検討するため、実験 24 時間前に半数の OVX ラットに EB 5  $\mu$ g/0.1 ml 皮下投与した。これらのラットをオープンフィールド試験、高架十字試験、縄張り行動試験および受動回避学習

試験に供した。それとは別に、早期指標の確立のために、生後 24 時間以内に oil、EE 20  $\mu$ g/kg あるいは 2 mg/kg を雌ラットに投与した 2 週齢雌ラットの脳を ER 発現量測定用に供した。また、行動学的早期指標の確立のために、なにも投与していない 1 週齢雌雄ラットを用いて母子分離誘発蹄鳴反応試験を行った。

<オープンフィールド試験> OVX あるいは OVX して実験 48 時間前に EB 5  $\mu$ g/0.1 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。

<高架十字試験> OVX あるいは OVX して実験 24 時間前に EB 5  $\mu$ 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 4) 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・不安様行動について測定した。

<縄張り行動試験> OVX し EB 5  $\mu$ g/0.1 ml および P 500  $\mu$ g/0.1 ml を投与して発情状態とした 14~15 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 チャンバーケージに予め動物を慣らした。縄張り行動である排尿を数値化するため、雄あるいは発情雌近傍でテストラットが行った尿をろ紙で吸収し、ニンヒドリン試薬により染色された面積を Image J を用いて解析した。相手雌雄ラットは同週齢の WI ラットを用いた。相手雌ラットは OVX し EB 5  $\mu$ g/0.1 ml および P 500  $\mu$ 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。

<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 12

～13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5）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。

＜ER 発現量測定＞無処置2週齢雌ラット：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 µg/µl 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 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＞なにも投与していない7日齢雄雌ラット：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分前の生理食塩水腹腔内投与およびジアゼパム投与の影響が性差を有するか否か検討し、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48時間前EB投与の有無による影響も検出されなかった。

＜高架十字試験＞OVX12週齢雌ラットにおいて、情動行動の指標であるopen arm滞在時間・侵入回数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。

＜縄張り行動試験＞E2曝露で、雄近傍での排尿面積が有意に増加した。また、2 mg/kg EE曝露でも増加傾向が表れた。

＜受動回避学習試験＞4回試験を繰り返した結果を総合的に判断すると、実験24時間前にEBを投与した条件下では、生後24時間以内の20 µg/kg EE曝露で学習の低下傾向が認められた。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。

＜ER 発現量測定＞2週齢において、海馬では、生後24時間以内のEE曝露でER発現量が減少した。一方、大脳皮質では、群間の差は検出されなかった。

＜母子分離誘発啼鳴反応＞母子分離誘発啼鳴反応30分前の生理食塩水およびジアゼパム投与は、母子分離誘発啼鳴反応において性差を検出する可能性を示した。

## D．考察

一般活動量、情動行動を測定するオープンフィールド試験及び高架十字試験においては、今まで検討した濃度より低い濃度で試験を行ったが、いずれも影響は表れなかった。また、前プロジェクトで、高架十字試験において実験24時間前のEB投与によりoil群の不安様行動の減弱が見られたがEDs曝露群ではEB投与の影響は認められなかったという結果を報告したが、今回はその変化が認められなかったことから、生後24時間以内のEDs曝露は、一般活動量、情動行動へは大きな影響を及ぼさないことが示された。

前プロジェクトで報告した生殖行動試験

である性選好性試験、性行動試験結果と同様、縄張り行動試験においても高濃度のEDs曝露でのみ影響が示された。従って、生殖行動に対しては濃度依存的に高濃度で影響が表れるものと考えられる。

受動回避学習試験では、EB投与条件下で20 µg/kg EE曝露群における学習能力が低下傾向を示した。本年度の結果は昨年度までより影響が少ないことから、生後24時間以内のEE曝露の学習への影響は軽微であるかもしれない。一方、昨年度は、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発現が生後24時間以内のEE曝露により低下していることを報告したが、本年は2週齢において海馬のER発現が低下していることを示した。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発現量の低下を反映し、その海馬の変化は幼若期から表れていることが示された。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 µg/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、その原因の一部が幼若期からの海馬のER発現変化に起因している可能性も示した。

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結果、ジアゼパムとその溶媒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可能性が示されたため、引き続き検討する。

## E . 結論

本年度は前年度より低い0.2 µg/kg EE曝露の一般活動量、情動行動、学習行動への影響について検討したが、影響は表れなかった。一方、受動回避学習試験において、

20 µg/kg EE曝露による学習能力の低下傾向が改めて示された。また、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、作用機序として幼若期からの海馬のER発現量低下と関連する可能性が示された。また、ER発現量は、幼若期においても大脳皮質では海馬とは異なる変化が表れたことから、ER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が幼若期から部位特異的であることが改めて示された。また、縄張り行動も含めた生殖行動は、2 mg/kg EE以上の高濃度でなければ影響を及ぼさないことを示した。

## F . 研究発表

### 1. 論文発表

Kamata, S., Yamamoto, J., Kamijo, K., Ochiai, T., Morita, T., Yoshitomi, Y., Hagiya, Y., Kubota, M., Ohkubo, R., Kawaguchi, M., Himi, T., Kasahara, T., and Ishii, I.: Dietary deprivation of each essential amino acid induces differential systemic adaptive responses in mice. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2014;58(6):1309-21

### 2. 学会発表

1) 千本隆志、神島愛未、小峰千亜希、吉田緑、川口真以子  
生後24時間以内の雌ラットへのethynyl estradiol曝露が学習行動に及ぼす影響  
日本畜産学会第118回大会(2014年3月26~29日、つくば)

2) 植村英恵、神島愛未、堀井康行、渡辺元、田谷一善、滝上英孝、鈴木剛、近藤保彦、川口真以子  
幼若期及び成熟期のTDCIPP及びflutamide慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、血中ホルモン濃度に及ぼす影響  
日本畜産学会第118回大会(2014年3月26~29日、つくば)

3) 高橋光佑、堀井康行、佐藤祐司、(川口真以子)  
高架十字試験の構造変化に伴うラットの不

#### 安様行動の変化

日本畜産学会第118回大会 (2014年3月26 ~ 29日、つくば)

4) Horii, Y., Takahashi, K., Sato, Y., Nakajima, S., Sato, K., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M.

Relationship between elevated plus maze arm structure and anxiety-like behavior in rats: the presence or absence of open arm ledges vs opaqueness of closed arm structure walls.

第37回日本神経科学大会 (2014年9月11日 ~ 13日、横浜)

5) 小峰千亜希、近藤保彦、吉田緑、川口真以子

生後24時間以内のethynyl estradiol曝露が雌ラットの縄張り行動と社会性行動へ及ぼす影響

第20回日本行動神経内分泌研究会 (2014年9月3日 ~ 5日、秩父)

6) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the the expression levels of ER $\alpha$  in adult female rats

5th International NeuroMalaysia Symposium, Malaysia, 28th Sept 2014

7) Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Yuji SATO, Sato, K., Nakajima, S., Shiraishi, Y., Kawaguchi, M.

Cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats altered emotional reactivity of male offspring.

Neuroscience 2014 (2014年11月15日 ~ 19日、Washington DC、U.S.A.)

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

Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the learning performance and the expression levels of ER $\alpha$  in adult female rats

Neuroscience 2014 (2014年11月15日 ~ 19

日、Washington DC、U.S.A.)

9) Komine, C., Kamishima, M., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M.

Effects of neonatal ethynyl estradiol exposure to female rats on partner preference, territorial and sexual behavior

Neuroscience 2014 (2014年11月15日 ~ 19日、Washington DC、U.S.A.)

10) 神島 愛未, 鈴木 剛, 滝上 英孝, 堀井 康行, 渡辺 元, 田谷 一善, 近藤 保彦, 川口 真以子

幼若期のtris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) とflutamide (FI) の慢性曝露が雄ラットの性行動、副生殖腺重量、生殖器重量および血中testosterone濃度に及ぼす影響

第17回日本内分泌攪乱化学物質学会 (2014年12月9日 ~ 10日、東京)

11) 小峰千亜希、吉田緑、近藤保彦、川口真以子

生後24時間以内のethynyl estradiol曝露が雌ラットの性選好性、縄張り行動、性行動へ及ぼす影響

第17回日本内分泌攪乱化学物質学会 (2014年12月9日 ~ 10日、東京)

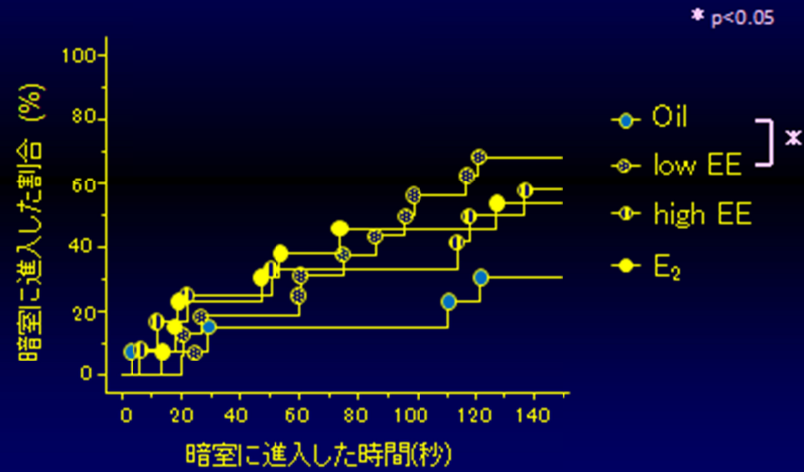
#### G . 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

(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, 519, 2954-2977.

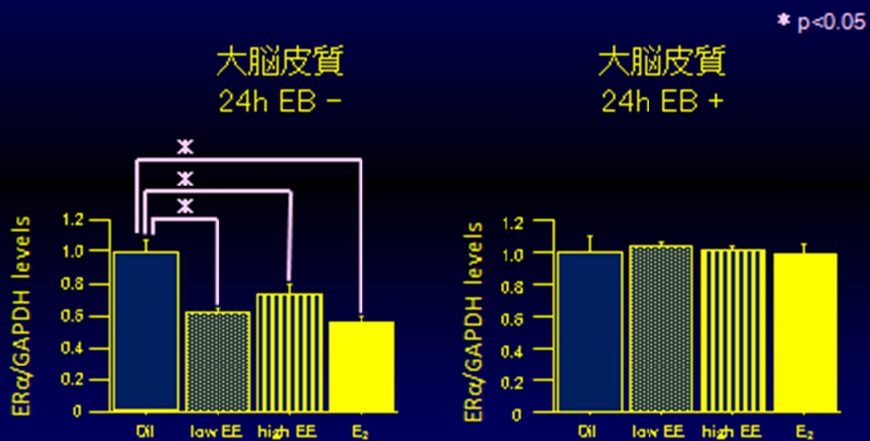
- (2) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain., Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, et. al., *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21, 553-61.
- (3) Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, et. al., *Birth Defects Res 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 0/B Usage in the Rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area., Hamada T and Sakuma Y, *Endocrinology*, 2010, 151(4), 1923-1928.

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。

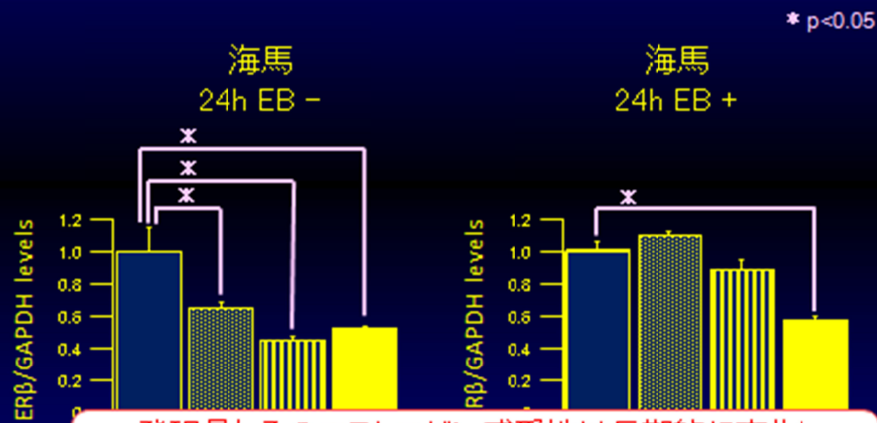


40

16-17週齢のERα発現量は大脳皮質では  
EB非投与の20 ug/kg low EE、2 mg/kg high EE、  
E<sub>2</sub>で低下した。

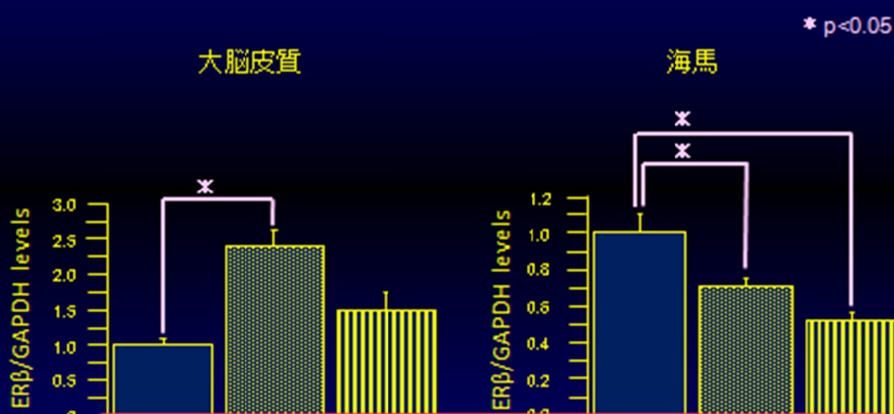


16-17週齢のERβ発現量は海馬では  
EB非投与の20 ug/kg low EE、2 mg/kg high EE、E<sub>2</sub>、  
EB投与のE<sub>2</sub>で低下した。



ER発現量とそのエストロゲン感受性は長期的に変化し、  
その変化は脳部位により異なる可能性がある

2週齢のERβ発現量は  
大脳皮質において20 ug/kg low EEで増加し  
海馬において20 ug/kg low EE、2 mg/kg high EEで低下した。



ER発現量は幼若期でも変化し  
その変化は脳部位により異なる可能性がある



