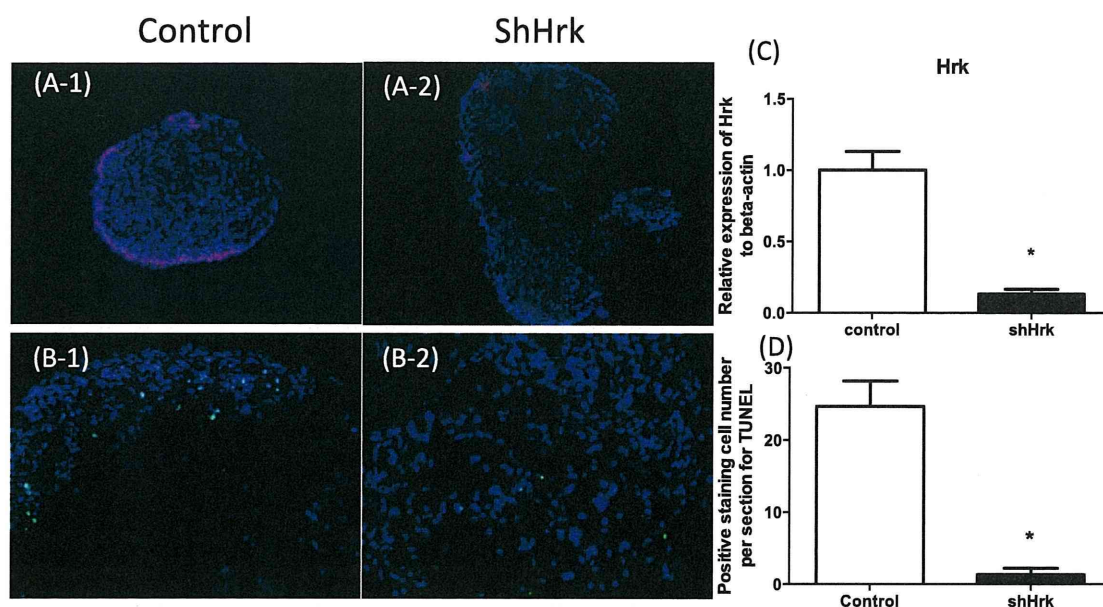
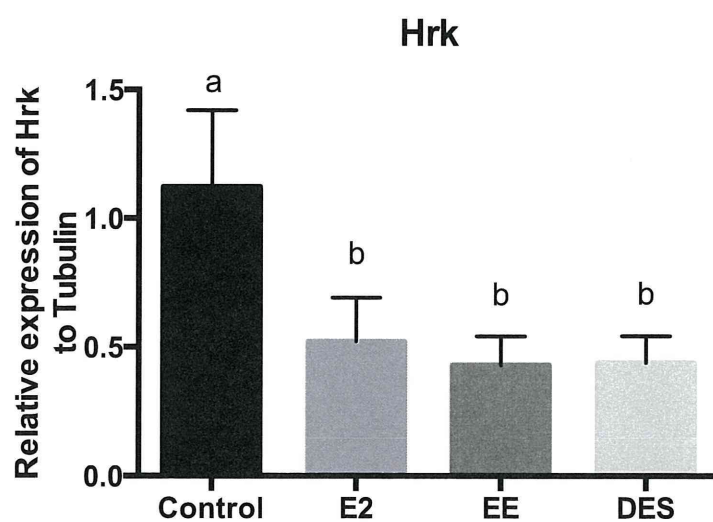


**Fig. II-5** 生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。  
\*は有意差有り(P<0.05)。



**Fig. II-6** (A)新生子の卵巣を採取し器官培養した培地に、*Hrk*遺伝子発現をノックダウンするために、ウイルスを含む培養上清を添加して1日培養後の卵巣における*Hrk*タンパク質の蛍光免疫組織化学染色 (ShHrk)。 (B) TUNELの蛍光免疫組織化学染色。 (C)real time PCRによる、対照群と*Hrk*遺伝子ノックダウン群 (ShHrk)の卵巣における*Hrk*遺伝子発現量。 (D) 対照群と*Hrk*遺伝子ノックダウン群 (ShHrk)の卵巣の切片中平均 TUNEL陽性細胞数。\*は有意差有り(P<0.05)



**Fig. II-7** 新生子の卵巣の器官培養系における *Hrk* 遺伝子発現に対する影響。10nM 17 $\beta$ -estradiol (E2)、EE(100ng/ml)、あるいは 10nm DES とともに1日培養した卵巣における *Hrk* 遺伝子発現を real-time PCR で解析した。

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 (H25-27 総合研究報告書)

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: 新生仔マウスへの Ethynylestradiol 投与が及ぼす発育期と性成熟後(遅発性)の影響  
～カルシウム結合タンパク質と GABA 受容体の性差、雌の膣開口と性周期ならび  
に雌雄の体重変化に及ぼす遅発型影響の観察と評価～

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]** エストロゲン様化学物質の発育期曝露が脳に及ぼす遅発型影響のそのリスクについて客観的評価基準の確立を目標に、出生 24 時間以内のマウスへの Ethynylestradiol (以下 EE) 投与モデルを用いて、その発育や性成熟後の脳の性差、さらには、行動学的パラメーターに及ぼす影響の評価を行った。これまでに、成体の海馬歯状回における神経細胞やグリア細胞の成体細胞新生頻度に影響しないこと、内側視束前野 (POA) における Calbindin D-28k(以下 CB)陽性細胞の分布パターンに認められる性的 2 型が不鮮明化することなどの所見を得ることに成功してきた。このプロジェクトの期間中に、CB 含有細胞の性的 2 型の不鮮明化の基盤を明らかにする検討に加え、全生涯を通じた発育への影響、成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声 (以下 USV) への影響なども評価して、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼすリスク評価をさらに検討した。さらに、生殖機能制御の中心システムである性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) の神経活動を制御するキスペプチンへの影響を検討するため、近年、キスペプチン分泌の重要な制御システムであることが示されている GABA-B 受容体の遺伝子発現への検討も試みた。

**[方法]** 生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J) に 0.2 µg/kg、20 µg/kg および 2,000 µg/kg の EE、対象群として EE の溶媒であるゴマ油を投与し、一般飼育環境 (室温 22°C から 25°C、湿度 40% から 60%) で飼育管理した。体重測定、膣開口、性周期の観察に加えて、超音波の記録解析装置による USV の記録解析も行った。解析を終了した個体は、(1) 免疫組織化学解析を行うために経心臓法にて灌流固定を施して固定脳標本を準備した。内側視束前野 (POA) を含む脳切片標本 (厚さ 40µm の連続した冠状断切片) に対して Neu-N、CB、GABA-B 受容体への一次抗体を用いた免疫組織化学を施して POA における CB 陽性細胞および GABA-B 受容体タンパク質の分布パターンを評価した。また、(2) RT-PCR によって CB および GABA-B 受容体の視床・視床下部における遺伝子発現量を相対比較した。

**[結果]** 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露は発育期でも次のような影響を及ぼすことが明らかとなった。1) 対照群と比べて雌マウスの膣開口時期を早めた。それは投与濃度が高いほど早期になった。2) 生後 2 週間から 3 週間の間でのみ、雌では EE 投与において一時的な体重増加の停滞期が認められた。しかしこの体重増加の停滞は離乳時には解消された。3) 発情雌に対する USV 発声は、雌対照群では認められ無いのに対し EE 投与群では USV 発声を認める雌が存在した。4) POA での CB 細胞の分布パターンを観察したところ、EE 投与による CB 陽性細胞数の変化は、脳の構造的な変化を反映したものでは無いことが明らかとなった。5) RT-PCR によって雌では EE 濃度依存的に脳内 CB 遺伝子の上昇が誘導されていることが明らかとなった。しかし、GABA-B 受容体遺伝子への有意な影響は確認されなかった。

**[考察]** 出生当日のマウスへの EE 曝露は、(1) 雌の膣開口を早める。(2) 授乳期の雌に一時的な発育遅延を誘導する。(3) 雌では早期に性周期異常を誘導される。(4) 雌では 5 週齢以降にさら

なる体重増加が誘導される。(4) 通常は USV 発声しない成体雌が発情雌に対して USV 発声を行うようになる。(5) POA の形態的变化が誘導されないまま、雌では CB 細胞数の増加が誘導される。一方の雄では CB 細胞数の減少が誘導する。(6) 雌では CB 遺伝子数の増加が濃度依存的に誘導される。(7) GABA-B 受容体遺伝子の出現には明瞭な影響は及ばない。

このように、EE のマウス新生仔への単回曝露は、特に雌に対して大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。その神経基盤の一つとして、雌脳における CB 含有神経細胞の「雄性化」が関与していることが示された。哺乳類の脳の基本形は雌である。脳の性分化の臨界期にある雌脳が生理条件以上のエストロゲン作用に曝露されると、それが単回（あるいは短時間）の曝露であっても、発育の一時的遅延、さらには生涯にわたっての生理機能異常が誘導されることが本研究で明らかとなった。

#### A. 研究目的

経口避妊薬として現在も使用されている Ethynylestradiol（以下 EE）の発育期マウスへの曝露が及ぼす影響とそのリスク評価を明らかにすることを目的とした。生後24時間以内の新生仔マウスに単回 EE 投与（皮下投与）を行って、（1）生涯に渡っての体重変化、膣開口時期、性周期に及ぼす影響（2）発情雌に出会った際に認められる100kHzを超える周波数帯発声（USV）への影響、（3）内側視束前野において性的二型が認められるカルシウム結合蛋白質カルビンジン（CB）の免疫陽性細胞分布パターンに及ぼす影響、（4）視床・視床下部における CB および GABA-B 受容体遺伝子の発現量への影響、を検討した。

#### B. 研究方法

新生仔期における化学物質曝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）にゴマ油（関東科学 N0.37036-02）に溶かした EE を、1 $\mu$ 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 0.2 $\mu$ g/kg 投与群（EE 0.2）、雌雄 20  $\mu$ g/kg 投与群（EE 20）、雌雄 2,000  $\mu$ g/kg 投与群（EE2000）の計 8 群の間で比較した。全ての動物は、生涯を通じて国内の基準

値として推奨される飼育環境で飼育した。生後21日目に離乳させ、雌雄別ケージに分別して継続飼育した。1ケージの飼育数は4～5匹とした。全ての動物は出生当日（Postnatal day 1 = PD1）より一定間隔で体重測定した。雌は PD10 から外部生殖器を観察して膣開口が認められるまで確認した。生後8週齢以上に達した動物は超音波測定装置（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）を記録した。

全ての計測を終えたのち、以下の処理を行った。（1）免疫組織化学染色用に 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。（2）CB、GABA-B 受容体遺伝子の発現量を比較するために、RT-PCR 解析脳標本を得るために断頭による安楽死を行った後、新鮮脳を採取した。

固定処理した脳標本は、内側視束前野（POA）の全領域が含まれる領域（The mouse brain, 3<sup>rd</sup> edition, Academic Press; Figure 26-38）について、凍結ミクロトーム（Yamato）を用いて厚さ 40 $\mu$ m の連続前頭断切片として作成した。Anti-Calbindin D-28k（Rabbit; Swant CB-28a, 2,000 倍希釈）、Anti-NeuN (mouse)、Anti-GABA-B receptor (Rabbit) による免疫組織化学（二次抗体として Alexa 488, Alexa594, 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）

動物への薬物投与、体重測定、膣開口確認、行動観察時の移動などは最低限の拘束になるように心がけた。灌流固定時には、ソムノペンチール（50mg/kg BW）の腹腔内投与で深麻酔して痛覚が無くなったことを確認した後に行った。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 13-69）

## C. 研究結果

### 1) EE 投与による体重変化への影響

体重を指標とした発育への影響として、雌では授乳期間における一時的な発育遅延が認められた（図 1）。その影響は EE 2000 群において最も顕著であった。この発育遅延は離乳期までには解消され、その後の成長には影響しなかった。一方、生後 5 週目までは雌雄とも体重の増加パターンの実験群間による差は観察されなかったが、雌では EE20 群と 2000 群において体重のさらなる増加が記録された（図 2）。

### 2) 雌の膣開口への影響

出生当日 EE 投与は、EE 濃度依存的に膣開口の時期が早まる影響が認められた。特に EE2000 群では顕著に認められ、早い個体では離乳前の 18 日齢で膣開口する個体が認められた（図 3A）。平均値で比べると、EE 投与群でも投与濃度の高いほど膣開口が早期になっていた。膣開口時の体重は高濃度 EE の方がより少ない傾向があることが示された（図 3B）。

### 3) 離乳後の雌の性周期への影響

8 週齢に達した雌個体全てを用いて膣スメア像による性周期への影響を観察した。その結果、対照群雌では生後 14 週においては正常な周期性、生後 18 週にやや周期性に乱れを生じる個体が出現するものの全ての

個体で周期性を維持していた。一方、EE 投与群では EE0.2 を含めて全ての群で生後 8 週目において性周期の異常が観察された（図 5）。

### 3) 成熟雌の USV 発声

超音波測定装置（Avisoft Ultrasound recorder, Model 116H, Avisoft Bioacoustics, Berlin, Germany）が設置された観察ケージを用いた。最初に、USV 測定する動物を導入し、装置に馴化させたのち、その後正常発情雌を導入し、対面時における USV 発声（100～150kHz）の有無を確認・記録した。その結果、対照群雌（Cont）では USV は認められないが、EE 投与群では 14%～43% の確率で USV が認められた。（図 4）。

### 4) 内側視束前野（POA）の Calbindin D-28k 免疫陽性細胞の分布について

マウスの POA における Calbindin D-28k（CB）免疫陽性細胞の分布は、雄では POA の中心に CB 陽性細胞の大きな塊が観察される。一方、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。これを基本形として、新生仔期 EE 投与による成熟後の雌雄マウス POA における CB 陽性細胞数の分泌パターンの変化を調べた。

まず、この CB 陽性細胞の塊は、すべて神経細胞によって構成されていることが判明した（図 6）。

出生当日における EE 単回皮下投与により、雄では POA における CB 陽性細胞の大きな塊のピークが EE 投与の濃度依存的に後方にシフトすることが判明した。一方、雌では EE 投与によって本来は CB 陽性細胞の塊が観察されない POA の後方に、雄型の CB 陽性細胞の塊として新しく発現することが判明した（図 7 から図 10）。一方、これら CB の変化に伴う脳の組織学変化は観察できなかった（図 8 から図 10）。

### 5) 成熟後の視床・視床下部領域の CB および GABA-B 受容体 mRNA 発現への影響

出生当日マウスへの EE 単回投与は、特に雌の CB 遺伝子の発現量に影響を与える

ことが明らかとなった。0.2 µg/kg、20 µg/kg、2000 µg/kg で比較したところ、濃度依存的に CB の mRNA の発現量の増加が認められた (図12)。一方、GABA-B 受容体の遺伝子に関しては1型と2型とも、EE 投与による影響は、雌雄ともに認められなかった (図8)。

#### D. 考察

出生当日マウスへの EE の単回曝露は、視床下部の CB 含有神経細胞の分布パターンの性差を攪乱するばかりでなく、授乳期の成長や成熟後の雌性周期にも影響を与えることが明らかとなった。授乳期における一過性の発育遅延は、投与した EE 濃度が高いほど影響が大きく現れた。これらの結果は、CB の性差と同様に、EE 作用容量が多いほど影響が大きくなることを示している。

これまでの多くの報告から示唆されるように、哺乳類の脳は原則的に雌であり、雄の脳は発育期にエストロゲンとアンドロゲンの作用を受けることで誘導される脳である。本来はエストロゲンの作用を受けないことが前提である発育期雌の脳が EE 曝露によって通常レベルを超えたエストロゲン作用を受けると、脳の CB 発現パターンが雄に近づき、生殖器の発達や性周期に大きな障害を誘導するリスクが存在することを意味している。発育期におけるエストロゲン様化学物質の曝露は、曝露される容量が多いほど一過性の発育遅延の誘導と生涯に渡る脳の性分化異常を誘導するリスクが高くなることを示している。

USVによる結果は、雌における影響は「雄的パターンへの接近」であることが挙げられる。この影響パターンはPOAにおけるCBを指標とした雌雄差への影響と同じ傾向である。これらの結果は、上述したように、哺乳類の脳の性は原則的に雌であり、雄は発育期のステロイドホルモンによって作られる性であることを指示しており、

それ故にエストロゲン作用を持つ EE の発育期曝露は避けなければならないことを意味している。

本研究の結果は、発育期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質への曝露は、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発達に悪影響を及ぼし、特に本来は発育期のエストロゲン曝露から免れているはずの雌がこの作用を受けてしまうと、大きな影響を受けてしまうことを示唆している。

#### E. 結論

これまで我々は、新生仔期マウスへの 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、脳は短時間の EE 曝露を受けることを明らかとしてきた。この短時間の脳への EE 作用は、性ステロイド感受性の高い脳領域である内側視束前野に CB 神経細胞の分布を生涯に渡って異常を及ぼすことを示してきた。今回さらに、新生仔期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質の曝露は、低濃度・短時間であったとしても、特に雌の生殖機能に異常を誘導する高いリスクを持つことを明らかにした。

#### F. 研究発表

シンポジウム「生殖・発生・行動と化学物質」、新生仔マウスへの化学物質曝露が及ぼす性分化と生後神経新生への影響。第106回日本繁殖生物学会大会 (府中、東京)

新生仔マウスの内分泌攪乱物質投与がおよぼすカルシウム結合蛋白質含有細胞の性的型への影響。第157回日本獣医学会学術集会 講演要旨集、P331 (2014)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 該当無し



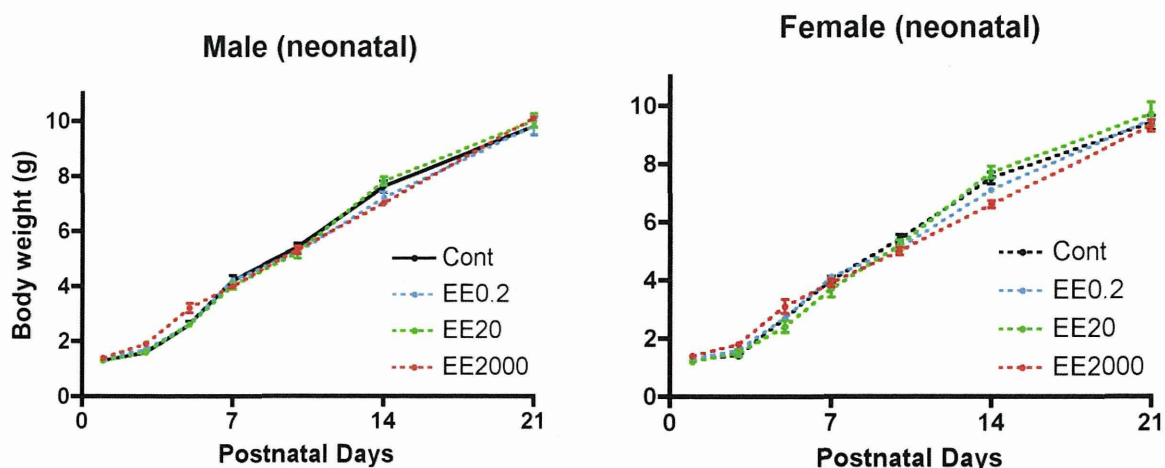


図 1 : 新生仔マウスへのEEによる授乳期の体重変化

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol (EE) 0.2 $\mu$ g/kg (EE0.2)、EE 20 $\mu$ g/kg (EE20)、EE 2,000 $\mu$ g/kg (EE2000) を投与した雄 (Male) と雌 (Female) の授乳期(誕生日:生後1日齢~生後21日齢)における体重の平均値の変化。離乳時(生後21日齢)では雌雄とも群間による差は観察されなかった。しかし、雌ではEE2000群において生後14日齢での一過性の発育遅延が記録された。

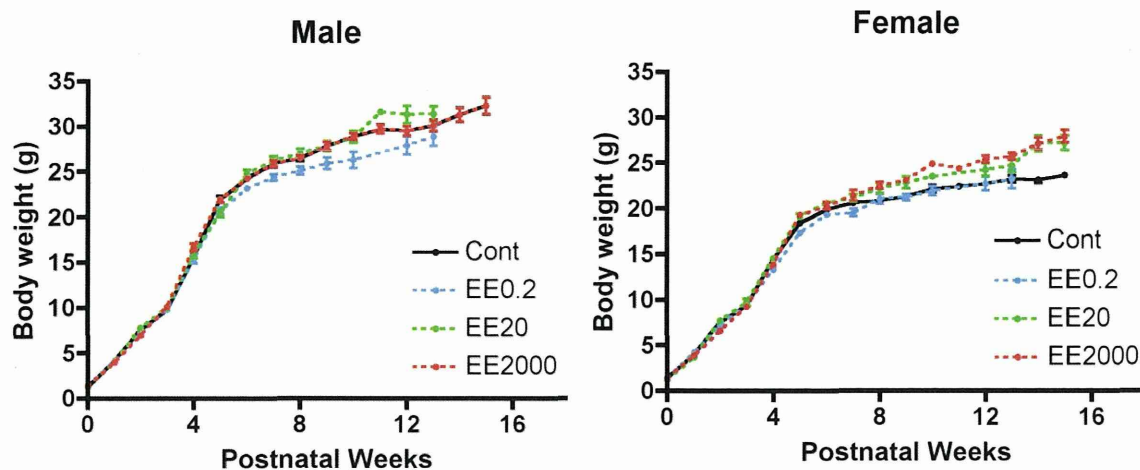
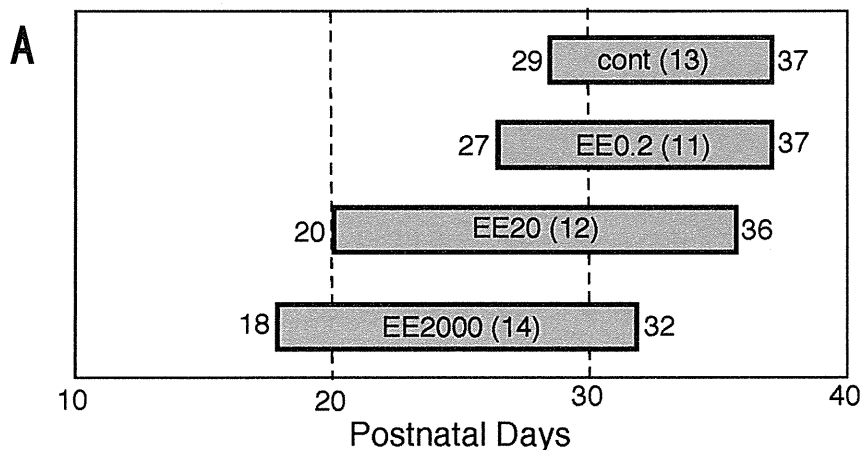


図 2 : EE投与が及ぼす生涯の体重変化への影響

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol (EE) 0.2 $\mu$ g/kg (EE0.2)、EE 20 $\mu$ g/kg (EE20)、EE 2,000 $\mu$ g/kg (EE2000) を投与した雄 (Male) と雌 (Female) の体重の平均値の変化。生後5週目までは雌雄とも群間による明らかな差は観察されなかった。しかし雌ではEE20群と2000群において体重の増加が記録された。



**B**

Dose of EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Cont	0.2	20	2000
Number of animals	13	11	12	14
Age at vaginal opening (day)	$33.0 \pm 0.8$	$32.3 \pm 1.0$	$29.6 \pm 1.3$	$25.0 \pm 1.3$
BW at vaginal opening (g)	$19.5 \pm 0.5$	$17.8 \pm 0.4$	$17.0 \pm 0.8$	$12.3 \pm 1.3$
Values represent mean $\pm$ standard error of the mean (S.E.M)				

図3：新生仔マウスへのEE投与が及ぼす膣開口への影響。

EE投与群 (EE20とEE2000) において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 (図A)。(図B) 平均値で比べると、EE投与群でも投与濃度の高いほど膣開口が早期になっていた。そのため、膣開口時の体重は高濃度EEの方がより低い傾向にあることが示された。

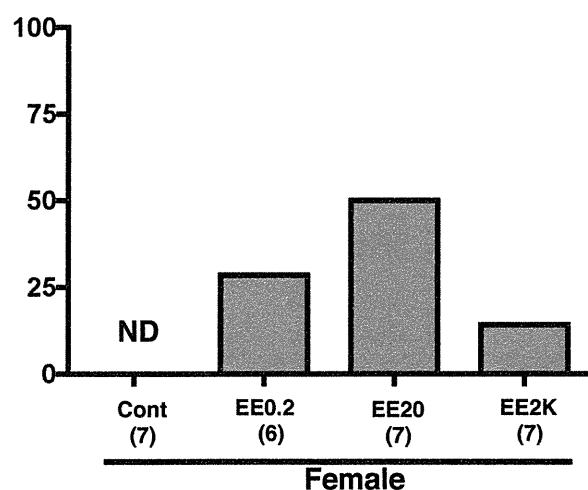


図4：発情雌との接触におけるEE処置雌マウスのUSV発声

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高周波数帯発声 (100~150kHz の発声。以下、USV) の測定。対照群雌 (Cont) ではUSVは認められないが、EE投与群では14%~43%の確率でUSVが認められた。



	ID	8 week						10 week						14 week					
Cont	1	P	E	M	M	P	E	M	P	E	M	M	P	E	M	M	P	E	
	2	P	E	M	M	P	E	E	M	M	M	M	P	E	E	M	M	E	
	3	M	P	E	M	M	M	M	E	M	M	P	M	M	E	M	M	M	
	4	M	P	E	M	M	M	M	E	M	M	P	M	M	M	P	E	M	
	5	E	M	M	P	E	M	E	M	M	P	E	E	M	M	P	E	M	
	6	P	E	E	M	M	M	E	M	M	P	E	P	E	M	P	E	M	
EE0.2	1	E	E	M	M	M	E	M	M	M	E	E	E	E	M	M	E	E	
	2	M	E	E	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	E	M	
	3	E	M	E	E	E	E	E	P	E	E	M	M	M	M	M	M	M	
	4	E	P	E	P	M	E	M	E	E	M	M	E	E	M	E	E	M	
	5	M	E	E	E	E	M	M	E	E	E	M	E	E	M	M	E	E	
EE20	1	E	E	P	E	E	E	E	E	M	M	E	M	M	M	M	M	M	
	2	E	E	E	M	P	P	P	P	P	P	M	M	M	M	M	M	M	
	3	E	M	P	P	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	M	
	4	E	E	P	M	M	E	E	E	M	M	E	E	E	M	M	E	E	
	5	M	P	E	E	M	M	M	M	E	M	E	E	E	M	E	E	M	
	6	M	P	E	E	M	M	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	M	
EE2000	1	E	M	P	E	P	P	P	P	P	P	P	P	P	E	M	M	M	
	2	E	E	E	E	P	P	P	P	P	P	E	P	E	E	M	M	P	
	3	E	E	P	P	P	P	P	E	M	P	P	M	P	E	E	E	P	
	4	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	M	M	E	E	M	M	
	5	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	M	M	M	M	M	M	
	6	E	E	E	E	E	P	P	M	M	M	M	E	E	E	M	P	P	

図5：生後8週目以降の膣スメア像（性周期）への影響

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ(対象群:Cont)、Ethinylestradiol (EE) 0.2µg/kg (EE0.2)、EE 20µg/kg (EE20)、EE 2,000µg/kg (EE2000) を投与した生後8週、10週、14週の雌の膣スメア像を指標とした性周期の観察。図中のPは発情前期、Eは発情期、Mはそれ以外（発情後期、発情前期）を示す。発情前期（P）はオレンジ色、発情期（E）は赤色で示してある。対照群（Cont）はいずれの週齢においても周期性を示していた。しかし、EE投与群では生後8週目において性周期に大きな乱れが観察された。特に、EE2000群では8週目で連続発情を示す個体が複数観察された。

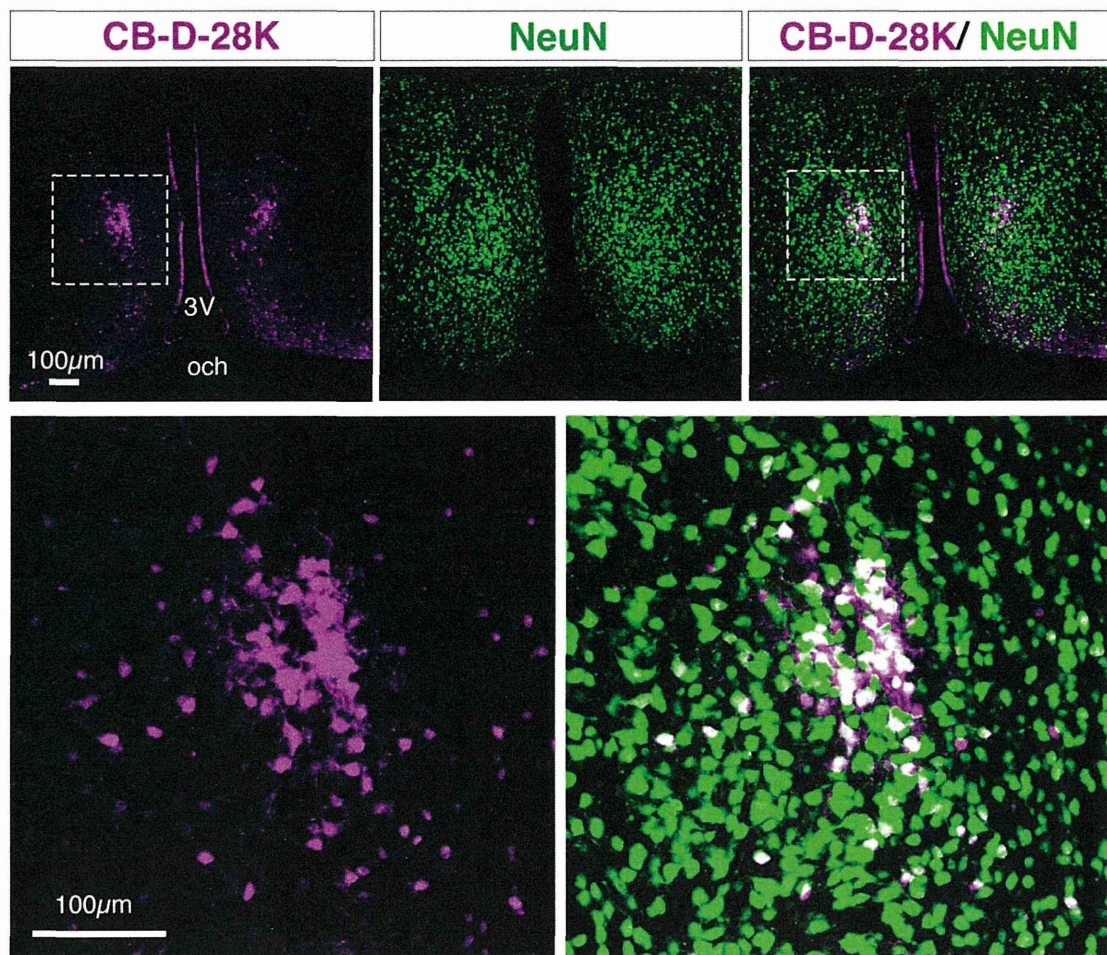


図6：内側視束前野にみられる Calbindin 免疫陽性細胞の塊は神経細胞である。  
 対照群マウスの内側視束前野 (POA) における Calbindin (CB) とニューロンマーカである NeuN の二重免疫組織化学の結果を示す。CB 免疫陽性細胞 (紫色) のすべてが NeuN 免疫陽性細胞 (緑色) であることを判る。このことは、POA に認められる CB 免疫陽性細胞の塊は神経細胞であることを示している。



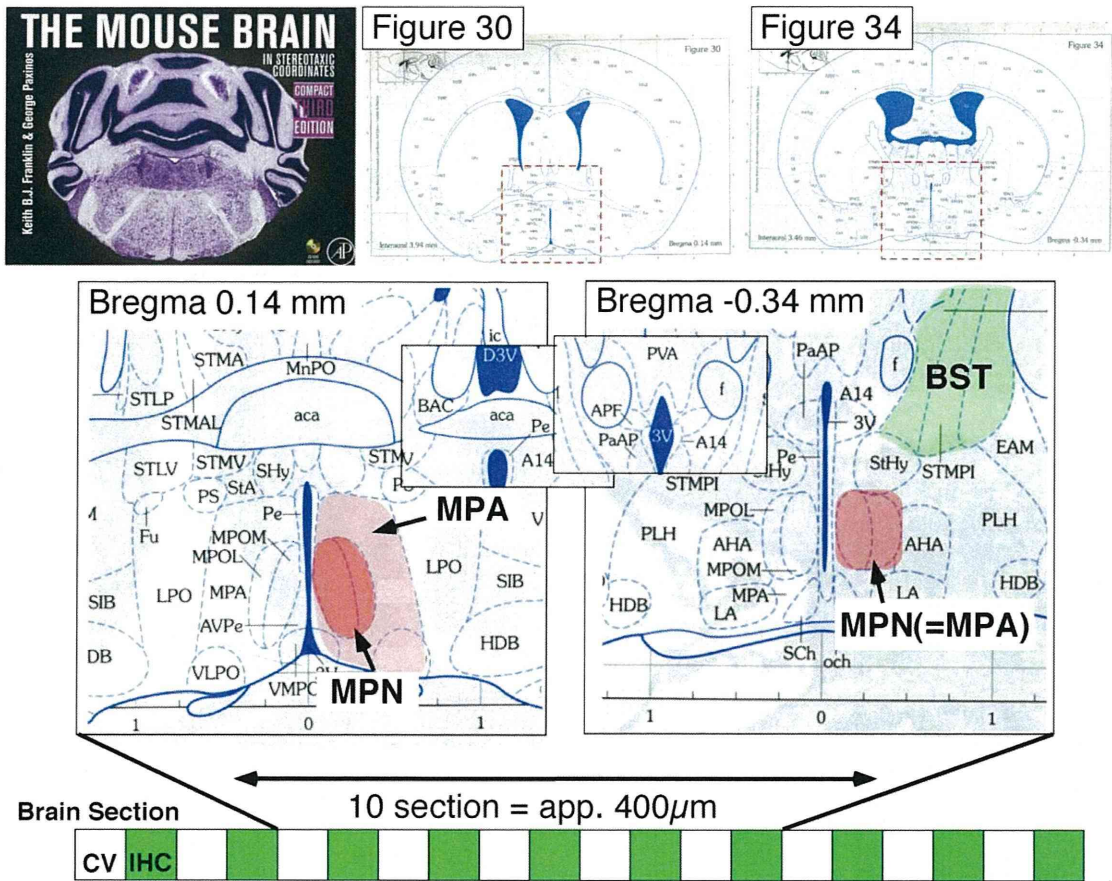


図 7 : 内側視東前野に Calbindin 免疫陽性細胞の分布パターンの解析。

EE 投与が誘導する成熟後マウス内側視東前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布パターンを解析するために、1 枚間隔 (40 $\mu$ m 間隔) で免疫組織化学を施した切片とニッスル染色した切片を用いた。緑色が CB の免疫組織化学、白抜きがニッスル染色した隣接切片。前公連 (MnPO) の位置 (Bregma +0.14mm) から分界状床核 (BST) が現れる位置 (Bregma -0.34mm) の間に含まれる全ての切片を解析した。

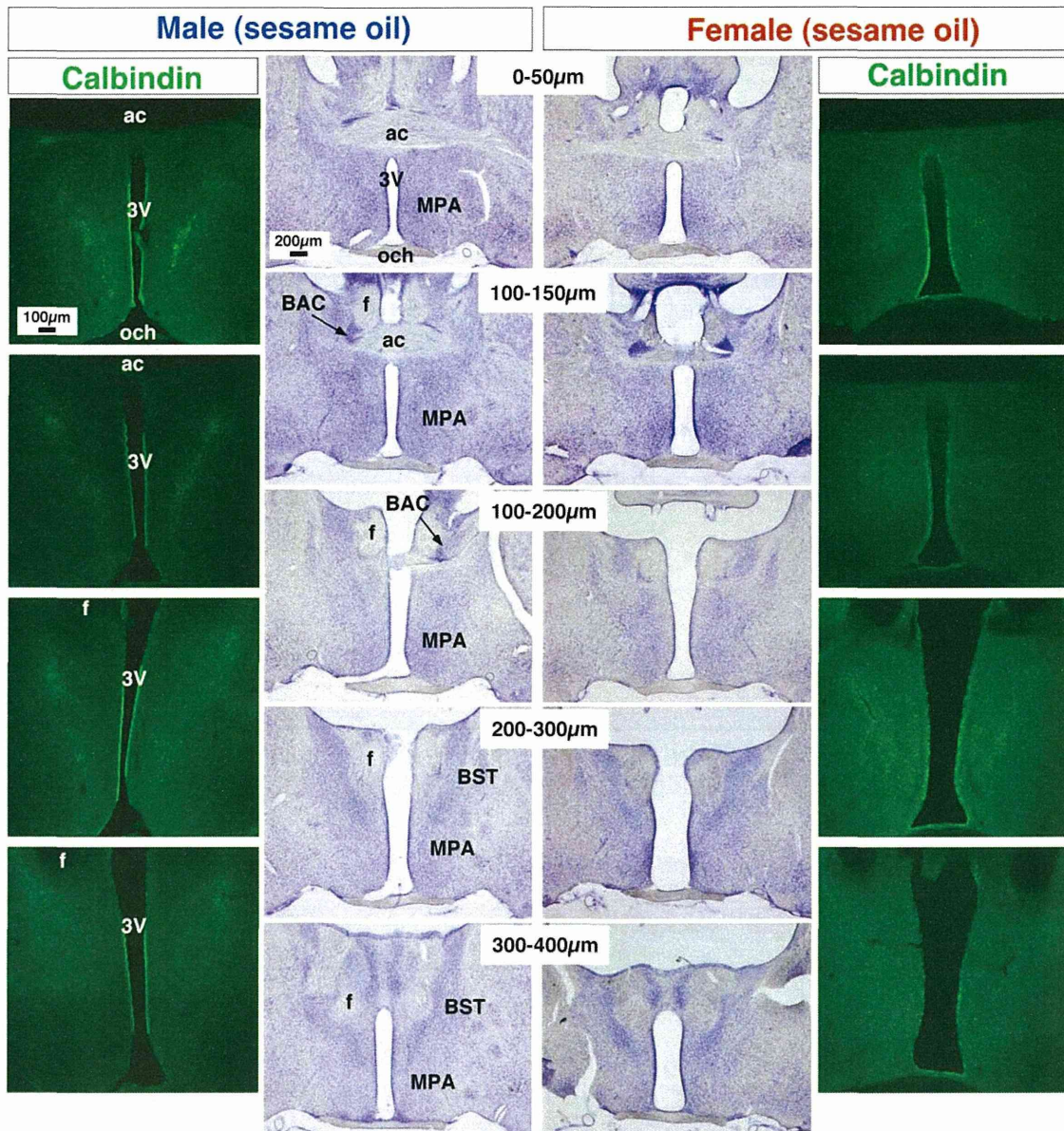


図8：対照群の内側視束前野（POA）における Calbindin（CB）免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図7に基づいて内側視束前野（POA）の連続切片を示す。雄では、POA の前方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊が確認できる。一方、雌ではそのような塊は確認できない。Calbindin シリーズ（緑色写真）は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真は、ニッスル染色による POA の組織構造。雌雄間で POA における脳の構造的性差（性的二型）は認められないことがわかる。



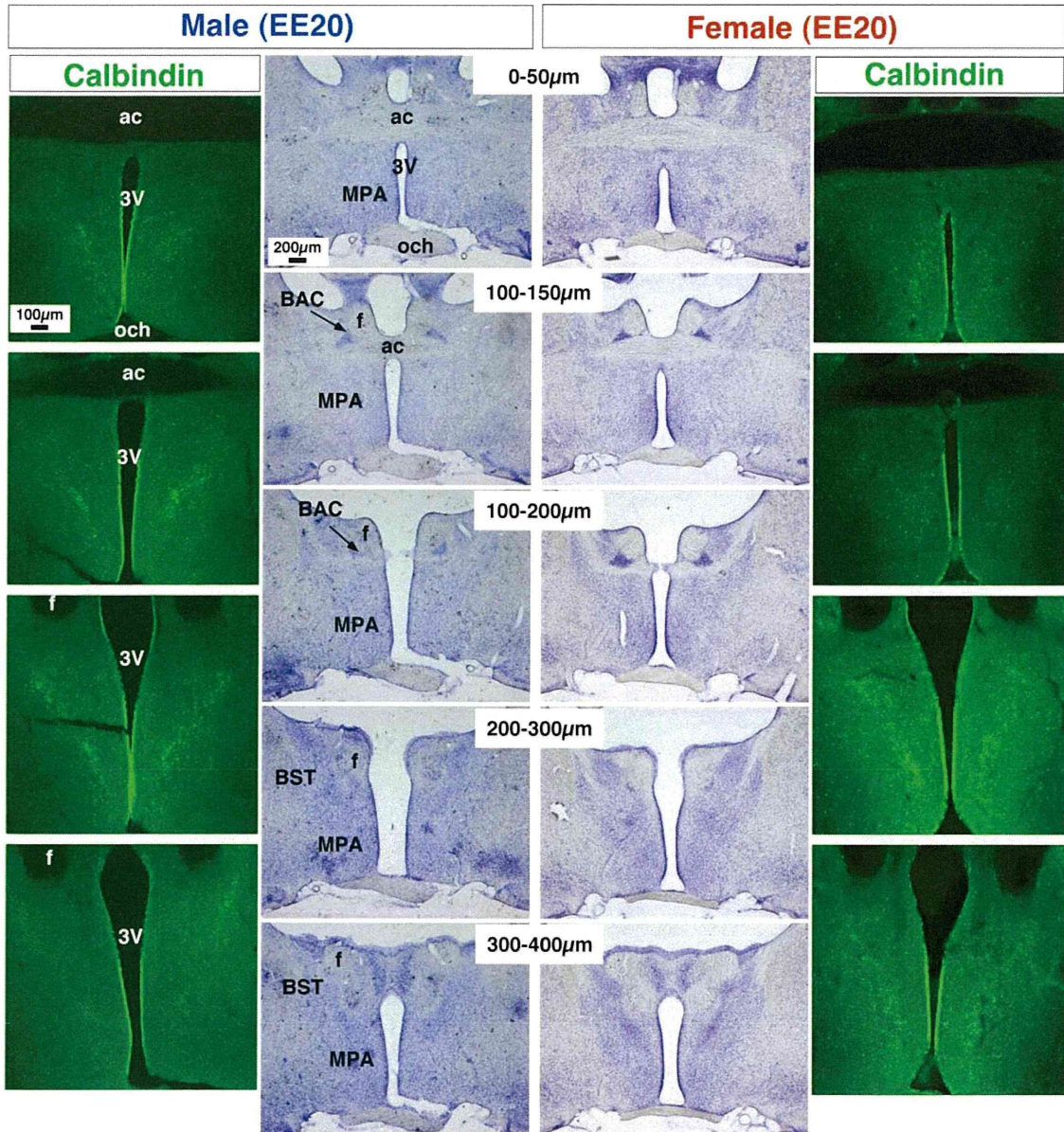


図9：新生仔 EE20 $\mu$ g/kg 投与の内側視東前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図7に基づいて内側視東前野 (POA) の連続切片を示す。

EE20 $\mu$ g 投与によって、雄では POA の前方からやや後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊がシフトしていることが確認できる。一方、雌では本来は確認できない POA の後方に CB の塊が確認できる。対照群と同様、雌雄間で POA における脳の構造的性差 (性的二型) は認められない。Calbindin シリーズ (緑色写真) は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真はニッスル染色による POA の組織構造。



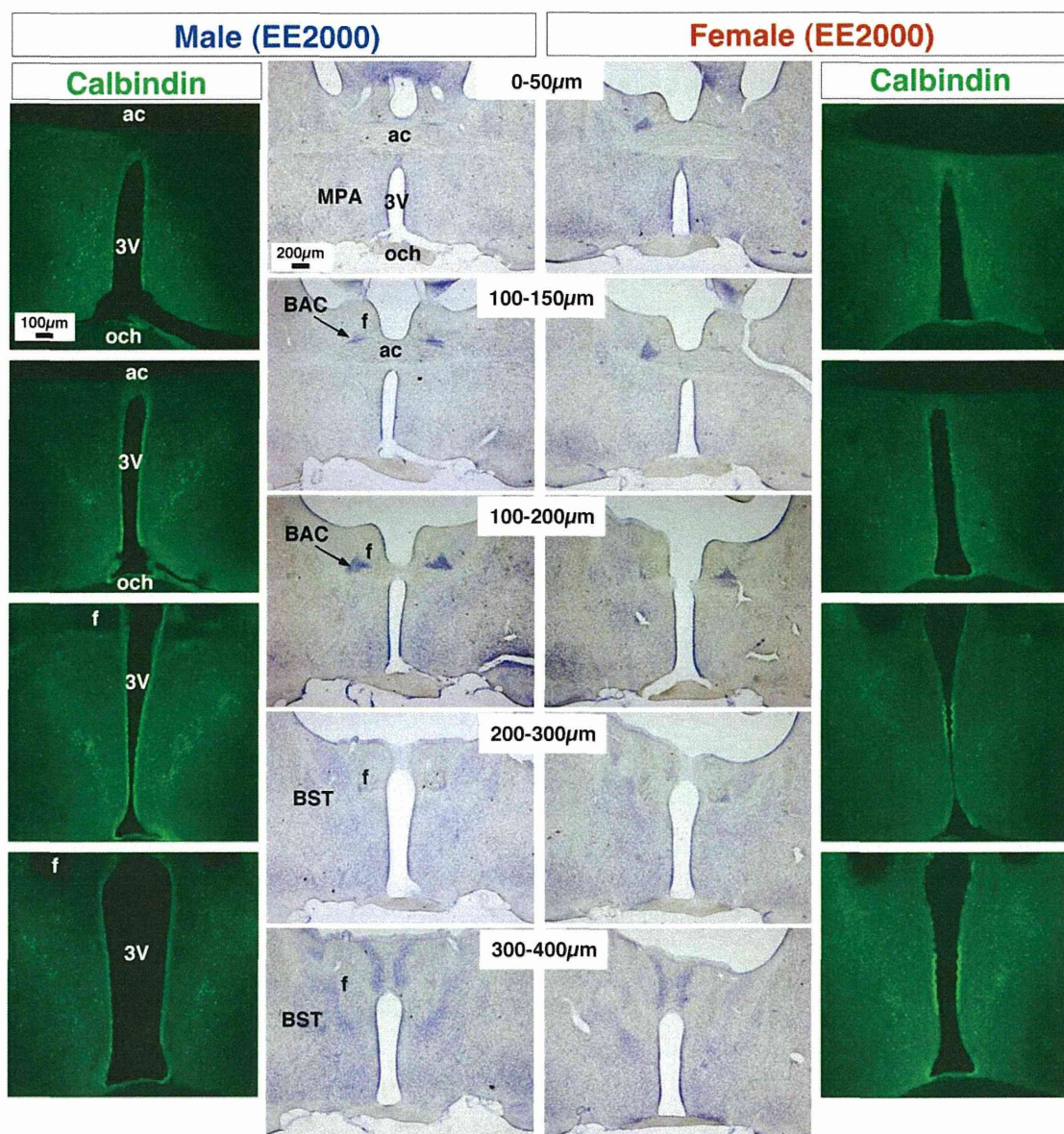


図 10：新生仔 EE2000 $\mu$ g/kg 投与の内側視束前野 (POA) における Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の分布とニッスル染色による脳組織構造。図 7 に基づいて内側視束前野 (POA) の連続切片を示す。

EE2000 $\mu$ g 投与によって、雄では対照群と比較して (図 8) POA の前方から後方に CB 免疫陽性細胞の大きな塊がシフトしていることが確認できる。一方、雌では本来は確認できない POA の後方に CB の塊が確認できる。対照群と同様、雌雄間で POA における脳の構造的性差 (性的二型) は認められない。Calbindin シリーズ (緑色写真) は Alexa488 を二次抗体に用いた免疫組織化学の結果である。中心の紫色の写真はニッスル染色による POA の組織構造。



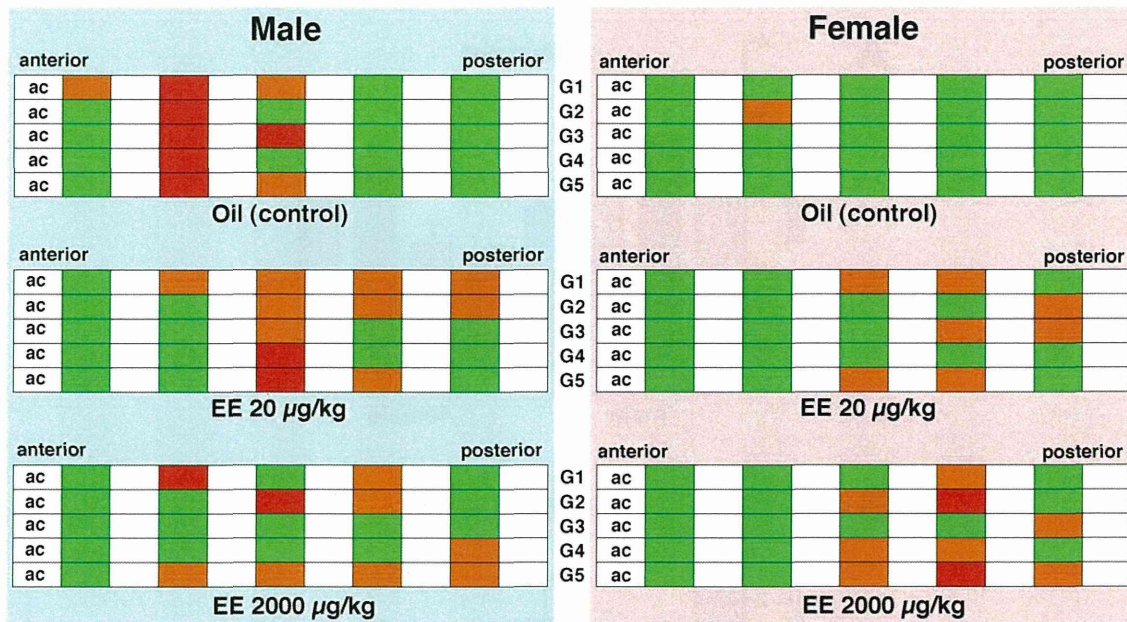


図 11: EE 単回投与によって誘導される内側視床前野の Calbindin (CB) 免疫陽性細胞の塊のピークの後方シフトを示す解析。

赤の四角は CB 免疫陽性細胞の塊が最もよく観察された切片 (CB 細胞の塊のピーク)、オレンジの四角はやや弱い CB 免疫陽性細胞の塊が観察された切片。緑色の四角は CB 細胞の塊が観察されない切片。EE 投与によって、雄では CB 陽性細胞の塊のピークが EE 投与濃度依存的に消失している。一方雌では、CB 陽性細胞の塊が EE 投与濃度依存的に POA の後方に出現している。

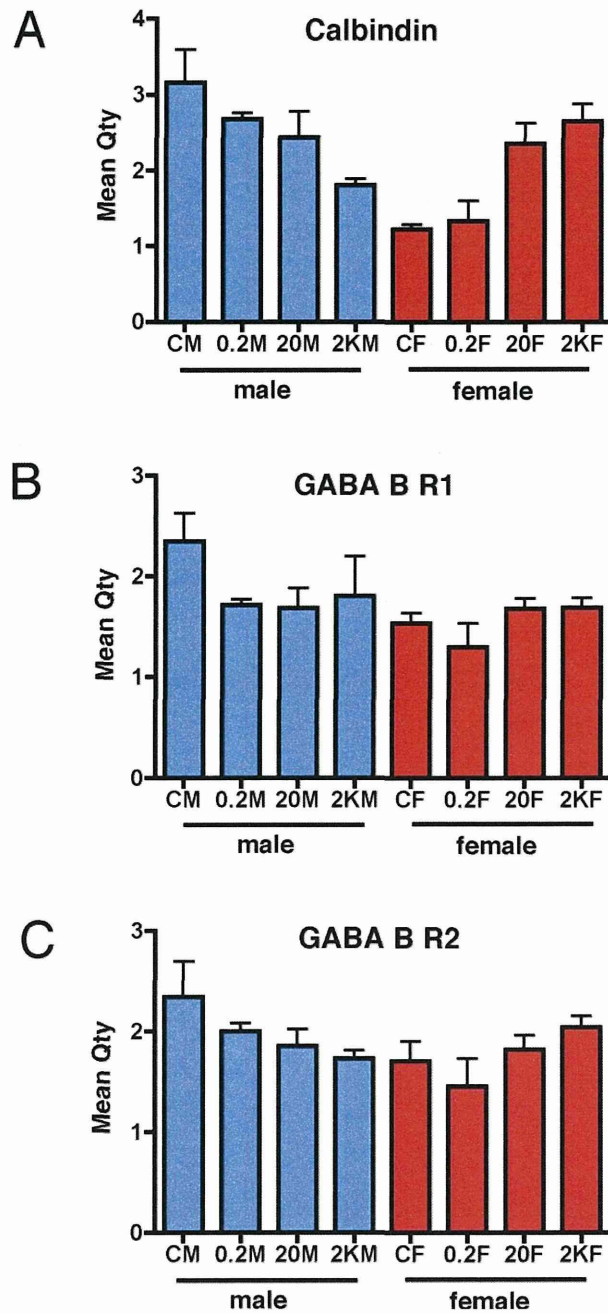


図 12 : EE 単回投与による成熟後の視床・視床下部領域における Calbindin と GABA-B 受容体 (1 型、2 型) の遺伝子の発現量への影響。

(A) : Calbindin の mRNA は、雌において、EE の投与濃度依存的に遺伝子の発現量の増加が認められる。しかし、雄ではやや減少傾向はみられるが、統計学的には変化は認められない。(B) GABA-B 1 型受容体遺伝子は、雌雄差と EE 濃度群による影響は認められない。(C) GABA-B 2 型受容体遺伝子についても、1 型同様に雌雄差と EE 濃度群による影響は認められない。

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 (H25-27 総合研究報告書)

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：	服部達哉	学校法人明治大学	研究・知財戦略機構	
	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
	中村孝博	学校法人明治大学	農学部生命科学科	動物生理学研究室
	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
	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。具体的にはエストロゲン様物質である17 $\alpha$ -ethynyl estradiol (EE) を生後24時間以内あるいは生後28日間、ならびにTriphenyl phosphate (TPhP) を生後28日間曝露し、各種神経行動学的解析を行った。その結果、雌ラットへの生後24時間以内のEE曝露は、縄張り行動試験においては高濃度の2 mg/kg EE曝露量で影響を及ぼすこと、受動回避学習試験では、エストロゲン存在下でのみ遅発影響誘発量である20  $\mu$ g/kg EE曝露により学習成績が低下する一方、高濃度EE曝露では影響を及ぼさないことが示された。また、成熟雌の海馬においてEE曝露によりエストロゲン受容体(ER)  $\alpha$ 発現はエストロゲン存在下でのみ低下する一方、ER $\beta$ 発現はエストロゲン非存在下でのみ低下し、大脳皮質ではEE曝露によりエストロゲン非存在下でのみER $\alpha$ 発現が低下した。幼若期の海馬ではEE曝露によるER $\alpha$ ・ER $\beta$ 発現が低下した。また、28日間の15  $\mu$ g/kg EE曝露は卵巣の発達を抑制し、成熟後の性行動中の雌特異的な性行動を抑制することを明らかにした。さらに、TPhPは、曝露濃度依存的に成熟後の性行動をEEと同様に抑制する作用を持つことを示した。加えて、早期指標を目指した母子分離誘発蹄鳴反応試験において抗不安薬の投与により性差が検出される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、学習と多岐にわたり(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、生後24時

間以内の 17 $\alpha$ -ethynyl estradiol (EE) 投与では、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 (7) 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。一方、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。

そこで本研究では、今まで生後 24 時間以内の EE 皮下投与により確立した実験系を進展させ、卵巣へのエストロゲン様物質曝露の影響を排除するために卵巣摘出 (OVX) してエストロゲン量をコントロールしたラットを用い、受動回避学習試験、学習行動調節機構の一部である海馬および大脳皮質におけるエストロゲン受容体 (ER)  $\alpha$ ・ $\beta$  発現、縄張り行動試験、床敷きのみを刺激とした性選好性試験、雄ラットとの性行動試験および雌ラットとの性行動試験を、生後 24 時間以内の EE 曝露〔実験 1-1〕、あるいは生後 1 日から 28 日間の EE 曝露〔実験 2〕で検討した。さらに、実際にハウスダストなど環境中に存在する難燃剤の一つで *in vitro* でエストロゲン様作用を示している triphenyl phosphate (TPhP) (8) の生後 1 日からの 28 日間曝露の影響〔実験 2〕についても検討した。

加えて本研究では早期指標の確立をめざし、生後 24 時間以内に EE を皮下投与し、幼若期の海馬および大脳皮質の ER $\alpha$ ・ER $\beta$  発現が成熟期と同様に変化しているか否か検討した〔実験 1-2〕。また、行動学的早期指標の確立を目指し、幼若期の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〔実験 3〕。

## B. 研究方法

〔実験 1: 生後 24 時間以内単回 EE 曝露試験〕

生後 24 時間以内の Wistar-Imamichi 系雌ラットに Sesame oil に溶解した 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA) 20  $\mu$ g/kg (low EE)、2 mg/kg (high EE)、陽性対照として 17 $\beta$ -estradiol (E2, Sigma Aldrich, USA) 20 mg/kg、あるいは Sesame oil (oil) を各々皮下投与した。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、雄と同じくらしいの大きさにすることが報告されている濃度を用いた(9)。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。

〔実験 1-1: 成熟期への影響〕

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) を行い、以下の実験に供した。

<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 を投与して発情誘起した 14~15 週齢雌ラットを用いた。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 チャンバーケージを実験に用い(図 3)、試験前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、相手雄あるいは相手発情雌近傍でテストラットが排出し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 ImageJ にて解析した。相手雌雄ラットは同週齢の Wistar-Imamichi 系ラットを用いた。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 を投与して発情誘起した。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 estradiol benzoate (EB) 投与した 16~17 週齢雌ラットを用い、受動回避学習試験装置 (実験箱 PAA-3001、コントロール装置 PA-2010 A、小原医科産業株式会社、図 4) にて嫌悪刺激の 24 時間後における学習成績について検討した。

<ER $\alpha$ ・ER $\beta$  発現量測定>OVX あるいは OVX してサンプリング 24 時間前に EB 投与した 14~19 週齢雌ラットの海馬と大脳皮質における ER $\alpha$  および ER $\beta$  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  $\mu$ g/ $\mu$ 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 $\alpha$  1:500, Santa Cruz Biotechnology, Anti-ER $\beta$  1:2000, Abcam, 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。

〔実験 1-2: 幼若期への影響〕

〈ER $\alpha$ ・ER $\beta$  発現量測定〉早期指標の確立をめざし、2 週齢雌ラットの海馬および大脳皮質をサンプリングし、〔実験 1-1〕〈ER $\alpha$ ・ER $\beta$  発現量測定〉と同様に ER $\alpha$  および ER $\beta$  タンパク質発現量を Western blot 法にて検討した。

〔実験 2: 生後 28 日間 EE・TPhP 曝露試験〕

Wistar-Imamichi 系雌ラットに対して、Sesame oil、Sesame oil に溶解した EE あるいは TPhP (和光純薬工業株式会社) を生後 24 時間以内から 28 日間連続で経口投与した。それぞれの物質の 1 日あたり投与量は、Sesame oil は 5 ml/kg (X-Ctrl 群)、TPhP は 25 mg/kg (X-LTP 群) あるいは 250 mg/kg (X-HTP 群)、EE は 15  $\mu$ g/kg (X-EE 群) とし、4 群を作出した。また、周生期雄ラットに対して Sesame oi (5 mg/kg/day) を 28 日間連続で経口投与した群 (Y-Ctrl 群) を同時に作出した。これらの雌雄ラットは一腹あたり 8 匹ずつになるよう里子操作を行い、生後 21 日齢で離乳した。離乳した雌雄ラットは各ケージ 4 匹ずつ、同性で群飼育した。8 週齢時に OVX を行い、卵巢由来の性ホルモンによる影響を排除した。これらの OVX 雌ラットを行動試験に用いる場合は、試験開始 48 時間前に EB を 0.5  $\mu$ g/0.1 ml、さらに 4 時間前に Progesterone を 500  $\mu$ g/0.1 ml、それぞれ皮下投与し、発情誘起を行った。

〈床敷きを刺激とした性選好性試験〉黒色塩化ビニル製ケージへ成熟雌ラットおよび雄ラット床敷を左右それぞれへ設置した。その後、試験開始前に発情誘起処置を行った 12 週齢の各群雌ラットおよび雄ラットを単独で導入し、5 分間の行動を上部から撮影し録画した。これらの動画を解析し、雌雄床敷領域への接近行動時間を測定した。

〈雄ラットとの性行動試験〉性選好性試験終了後、雌ラットは透明アクリル製ケージへ移動し、60 分の馴化後、同週齢の性経験済み相手雄ラットを導入し、60 分間の行動を正面から撮影し録画した。これらの動画を解析し、

相手雄ラットのマウント行動発現回数、試験雌ラットの誘惑行動 (Ear wiggling、Hopping)、拒否行動、そして雄受容姿勢 (Lordosis) の発現回数を測定した。さらに、雄受容姿勢発現回数は、雄ラットのマウント行動発現回数に対する割合を示す Lordosis 商に用いた。

〈雌ラットとの性行動試験〉雄ラットとの性行動試験終了から 1 週間後、再び試験雌ラットへ発情誘起処置を行い、雄ラットとの性行動試験と同様の透明アクリル製ケージへ移動し、60 分の馴化後、同週齢の発情誘起処置済み OVX 相手雌ラットを導入し、60 分間の行動を正面から撮影し録画した。これらの動画を解析し、試験雌ラットのマウント行動発現回数、誘惑行動 (Ear wiggling、Hopping)、攻撃行動を測定した。

〔実験 3: 母子分離誘発啼鳴反応試験における性差の検出〕

〈母子分離誘発啼鳴反応試験〉0 週齢 Wistar-Imamichi 系雌ラットにおいて、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 3 時間前のジアゼパム経口投与の影響が、性差を有するか否か検討した。仔ラットを母獣から分離後、すぐに防音箱内のシャーレに入れ 5 分間測定した (図 5)。鳴き声はマイクロホン (CO-100K、三研マイクロホン株式会社) で集音してアンプ (OCTA-CAPTURE、ローランド株式会社) で増幅し、Spectra PLUS 5.0 (Pioneer Hill Software、Poulsbo) にて解析した。

〔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

〔実験 1: 生後 24 時間以内単回 EE 曝露試験〕

〔実験 1-1: 成熟期への影響〕

縄張り行動試験において、E2 曝露で雄近傍での排尿面積が有意に増加した (図 6)。また、2 mg/kg EE 曝露でも増加傾向が表れた。

受動回避学習試験においては、実験 24 時間前に EB を投与した条件下では、20  $\mu$ g/kg EE 曝露で学習が低下傾向を示した (図 7)。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 (図 8)。

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 $\alpha$  発現量が減少した (図 9)。しかし、実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合は生後 24 時間以内の EE 曝露の影響は認められなかった (図 9)。一方、ER $\beta$  発現量は実験 24 時間前 EB 投与をしなかった場合にのみ EE 曝露により減少し、EB 投与した場合は E2 曝露でのみ減少した (図 10)。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 (図 11)、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 $\alpha$  発現量が減少した (図 11)。しかし ER $\beta$  発現量には EE あるいは E2 曝露の影響は表れなかった (図 12)。

[実験 1-2: 幼若期への影響]

2 週齢において、海馬では、生後 24 時間以内の EE 曝露で ER $\alpha$  および ER $\beta$  発現量が減少した (図 13、14)。一方、大脳皮質では、ER $\alpha$  発現量における群間の差は検出されなかったが (図 13)、ER $\beta$  発現量は高濃度 EE 曝露により増加した (図 14)。

[実験 2: 生後 28 日間 EE・TPHP 曝露試験]

性選好性試験では、各群について雌床敷への接近行動時間と雄床敷への接近行動時間の差 (性選好性スコア) について比較したところ、群間に差が認められ、X-EE 群と Y-Ctrl 群の性選好性スコアが、X-Ctrl 群のそれと比較して高いことが明らかになった (図 15)。一方で、X-LTP 群あるいは X-HTP 群の性選好性スコアは、いずれの群とも差がなかった (図 15)。

雄ラットとの性行動試験では、各群に対する相手雄ラットのマウント行動発現回数に群間で差が認められ、X-EE 群へのマウント行動発現回数が、X-LTP 群と比較して少ないことが明らかになった (図 16A)。また、試験雌ラットの Lordosis 商に群間で差が認められ、X-EE 群の Lordosis 商が、他の全ての群と比較して低いことが明らかになった (図 16B)。試験雌ラットの誘惑行動の 1 つである Ear wiggling の発現回数にも群間で差が認められ、X-EE 群の Ear wiggling 発現回数が、他の全ての群と比較して少ないことが明らかになった

(図 16C)。さらに Hopping 発現回数に群間で差が認められ、X-HTP 群と X-EE 群の Hopping 発現回数が、X-Ctrl 群と比較して少ないことが明らかになった (図 16D)。一方で、X-LTP 群の Hopping 発現回数は、他のすべての群と比較して差は認められなかった (図 16D)。そして雄のマウント行動に対する拒否行動の発現回数は群間で差は認められなかった (図 16E)。

雌ラットとの性行動試験では、雌ラットに対する各試験雌ラットマウント行動発現回数に群間の差は認められなかった (図 17A)。また、試験雌ラットの誘惑行動のいずれの発現回数にも群間の差は認められなかった (図 17C, D)。そして雌ラットに対する攻撃行動の発現回数も群間の差は認められなかった (図 17B)。

[実験 3: 母子分離誘発蹄鳴反応試験における性差の検出]

0 週齢 WI 雌ラットにおいて、ジアゼパム 1 ml/kg 投与による母子分離誘発蹄鳴反応の低下が雄で有意に表れる一方、雌では表れにくいという性差を検出した。

#### D. 考察

前プロジェクトで報告した生後 24 時間以内の EE 曝露において、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、エストロゲン存在下で遅発影響誘発量曝露群における学習能力が低下傾向を示した。本実験では、受動回避学習試験と同じエストロゲン存在下で主要な学習行動調節機構である海馬の ER $\alpha$  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示している。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 $\alpha$  発現量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遅発影響誘発量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