

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 17α -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 μ 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) α 発現はエストロゲン存在下でのみ低下する一方、ER β 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 α 発現が低下した。幼若期の海馬では EE 曝露による ER α ・ER β 発現が低下した。また、28 日間の 15 μ 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 α -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) α ・ β 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 α ・ER β 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 α -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA) 20 μ g/kg (low EE) 2 mg/kg (high EE) 陽性対照として 17 β -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 μ g/0.1 ml および P 500 μ 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 μ g/0.1 ml および P 500 μ 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 回目を変えた。

<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 α ・ER β 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 α および ER β 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 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, Anti-ER β 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 α ・ER β 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 α ・ER β 発現量測定> と同様に ER α および ER β 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 μ 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 oil (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、卵巣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 μ g/0.1 ml、さらに 4 時間前に Progesterone を 500 μ 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 μ 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 α 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 β 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 α 発現量が減少した (図 11)。しかし ER β 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 α および ER β 発現量が減少した (図 13、14)。一方、大脳皮質では、ER α 発現量における群間の差は検出されなかったが (図 13)、ER β 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 α 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 α 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

が海馬のER α 発現量変化に起因している可能性も示した。また、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。

生後24時間のEE曝露により、ER α 発現量は、海馬ではエストロゲン存在下で、大脳皮質ではエストロゲン非存在下で減少した。一方ER β 発現量は、海馬ではエストロゲン非存在下で減少し、大脳皮質ではいずれの条件でも変化が認められなかった。さらに幼若期で認められた変化は必ずしも成熟期の変化と同様なものではなかった。従って、ER発現への生後24時間以内のEDs曝露の影響は脳領域、時期およびサブタイプにより異なり、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示された。

生後28日間EEを経口投与した成熟ラットの床敷に対する接近行動を解析し、雌雄どちらの床敷に対して性選好性を示すかを調査した結果、雌ラットへのEE曝露は、雄床敷よりも雌床敷へ強い性選好性を示す、すなわち雄型の性選好性を示すことを明らかにした。成熟雄ラットとの性行動試験では、雌特異的な性行動である雄受容姿勢、誘惑行動に着目し解析した結果、雌ラットへのEE曝露により雄受容姿勢、誘惑行動のいずれも示さなくなることが明らかになった。このEE曝露濃度の一日当たりの投与量は、前プロジェクトでは性選好性試験や性行動試験に影響を及ぼさなかった生後24時間以内の20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下投与より少なく、体内吸収も少ない経口投与であるが、反復して曝露することにより脳を雄型化する可能性が示唆された。

一方、生後28日間のTPhP経口投与は、雄ラットの性選好性スコアとの差を消失させることから、正常な雌型性選好性の成立を阻害する可能性が示唆された。雄との性行動試験においては、TPhP曝露は雄受容姿勢の発現に影響はないものの、高濃度のTPhP曝露では誘惑行動のうちHoppingの発現が減少する、すなわち曝露濃度により異なる影響があることが明らかになった。

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、雄子ラットのほうが雌仔ラットに比べ、ジアゼパムが引

き起こす影響が強く現れることを明らかとした。このことから、母子分離誘発啼鳴反応がEDsの早期指標となり得ることを示した。

E. 結論

受動回避学習試験において、EEの遅発影響誘発量曝露による学習能力の低下がエストロゲン存在下で表れ、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発現へのエストロゲン様物質曝露の影響は、部位、時期およびサブタイプ特異的であることが改めて示された。

生後28日間のEE連続経口投与は、生後24時間以内の皮下投与と比べると低い濃度でも脳の正常な性分化に影響を与え、成熟後の雌特異的な性行動を抑制する可能性が示された。またTPhPは、曝露濃度依存的に特定の雌特異的な行動の発現を抑制する可能性が見出された。

加えて、母子分離誘発啼鳴反応がEDsの早期指標となり得ることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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) Horii, Y., Kawaguchi, M. Higher detection sensitivity of anxiolytic effects of diazepam by ledge-free open arm with opaque walled closed arm elevated plus maze in male rats. *Behav Brain Res.* 2015 Nov 1; 294:131-40
- 3) Shiga, T., Nakamura, T.J., Komine, C., Goto, Y., Mizoguchi, Y., Yoshida, M., Kondo, Y., Kawaguchi, M. A single neonatal injection of ethinyl estradiol impairs passive avoidance learning and reduces expression of estrogen receptor α in the hippocampus and cortex of adult female rats. *PLoS One.* 2016 Jan 7; 11(1):1-11
- 4) Komine, C., Kondo, Y., Horii, Y., Yoshida, M., Kawaguchi, M. Effects of neonatal ethinyl estradiol exposure on female paced mating behavior in rat. (*Journal of Applied Toxicology* へ投稿予定)

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 supression 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)
- 10) 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)
- 11) 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)
- 12) 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)
- 13) 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)
- 14) 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)
- 15) Shiga, T., Nakamura, T. J., Mizoguchi, Y., Kondo, Y., Kawaguchi, M.: Neonatal exposure to ethynyl estradiol decreased the the expression levels of ER α in adult female rats: 5th International NeuroMalaysia Symposium (2014年9月28日、Malaysia)
- 16) 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.)
- 17) 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 α in adult female rats: Neuroscience 2014 (2014年11月15日～19日、Washington DC,

- U.S.A.)
- 18) 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.)
- 19) 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)
- 20) 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)
- 21) 田邊郁也、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曝露が受動回避学習に及ぼす影響: 第62回日本実験動物学会総会(2015年5月28日～30日、京都)
- 22) 立川直之、志賀健臣、中村孝博、小峰千亜希、堀井康之、渡辺元、田谷一善、溝口康、吉田緑、川口真以子: 雌ラットへの生後24時間以内 ethynyl estradiol 曝露が脳皮質と海馬の estrogen receptor(ER) α 及びER β 発現に及ぼす影響: 第62回日本実験動物学会総会(2015年5月28日～30日、京都)
- 23) Nakajima, S., Horii, Y., Ohta, R., Takahashi, K., Sato, Y., Sato, K., Shiraiishi, Y., Kawaguchi, M.: Altered emotional reactivity of offspring induced by cross-fostering between Hatano high and low active avoidance rats, and its relationship with maternal care: 第38回日本神経科学大会(2015年7月28日～31日、神戸)
- 24) 中山愛里、服部達哉、大河原利、田辺郁也、磯部安菜、宍戸浩孝、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子: 幼若期雌ラットへのethynyl estradiolとtriphenyl phosphateの28日間曝露が成熟後の性行動に及ぼす影響: 第42回日本神経内分泌学会・第23回日本行動神経内分泌研究会合同学術集会(2015年9月17日～19日、宮城)
- 25) 中山愛里、服部達哉、宍戸浩孝、磯部安菜、鈴木剛、滝上英孝、川口真以子: 幼若期雌ラットへのethynyl estradiol (EE) とtriphenyl phosphate (TPhP) の28日間曝露が成熟後の臓器重量、情動行動、性選好性、性行動に及ぼす影響: 環境ホルモン学会第18回研究発表会(2015年12月10～11日、栃木)
- 26) 磯部安菜、川口真以子: 仔ラットの母子分離誘

発啼鳴反応の発声回数に対する抗不安薬ジアゼパムの抑制作用には性差がある: 第89回日本薬理学会年会(2016年3月9日～11日、神奈川)

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 α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J, Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, Epub ahead of print.
- (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) Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethinylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats., Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, et al. *Reprod Toxicol.* 2013, 40, 16-23.
- (8) Similarities in the endocrine-disrupting potencies of indoor dust and flame retardants by using human osteosarcoma (U2OS) cell-based reporter gene assays., Suzuki G, Tue NM, Malarvannan G, Sudaryanto A, Takahashi S, Tanabe S, Sakai S, Brouwer A, Uramaru N, Kitamura S, Takigami H. *Environ Sci Technol.* 2013, 19, 47(6), 2898-908.
- (9) 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),

図1 Estrogen (E2)が引き起こす作用



1923-1928.

図2 E2が作用する中枢神経系の機能



図3 縄張り行動試験



- 格子越しに相手ラットに接近できる3チャンパーケージを用いた。
- テストラット、雌雄相手ラットを、各部屋へ入れ、5分間観察した。

格子前にろ紙を敷き、尿を吸収させた。ろ紙にニンヒドリン5%試薬を散布し、染色された面積をImage Jを用いて解析した。

図4 受動回避学習試験装置



図5 母子分離誘発啼鳴反応試験

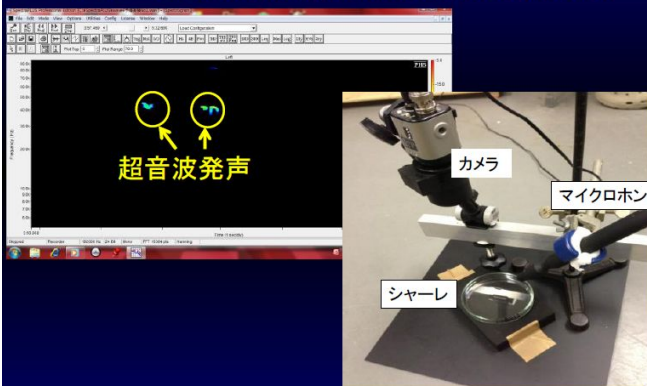


図6 縄張り行動試験結果

(Oil群における雄に対する尿面積=1)

* : p<0.05

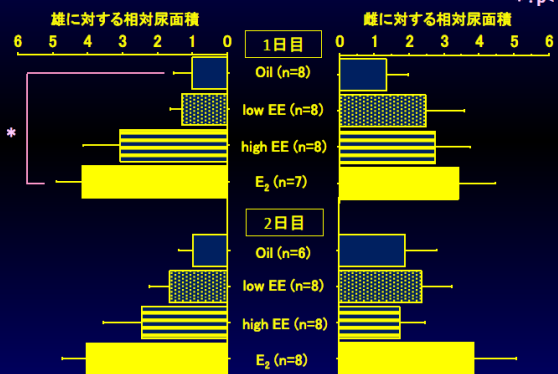


図7 EB投与時の受動回避学習試験結果

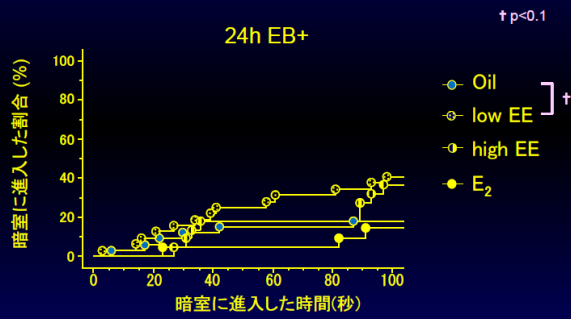


図8 EB非投与時の受動回避学習試験結果

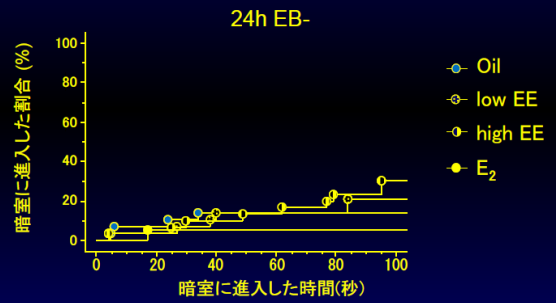


図9 海馬における成熟期ERα発現量

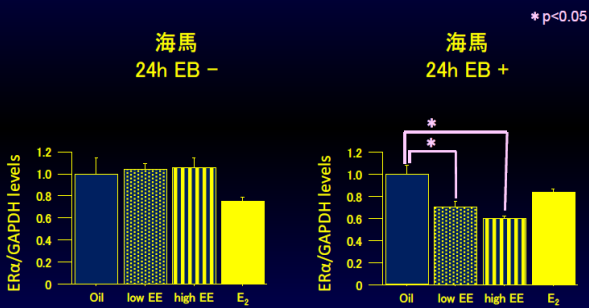


図10 海馬における成熟期ERβ発現量

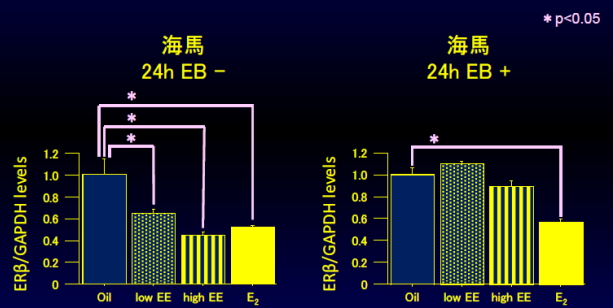


図11 大脳皮質における成熟期ERα発現量

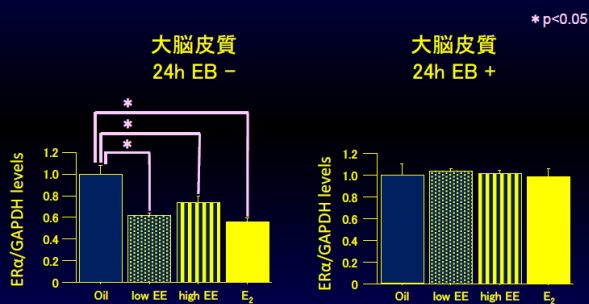


図12 大脳皮質における成熟期ERβ発現量

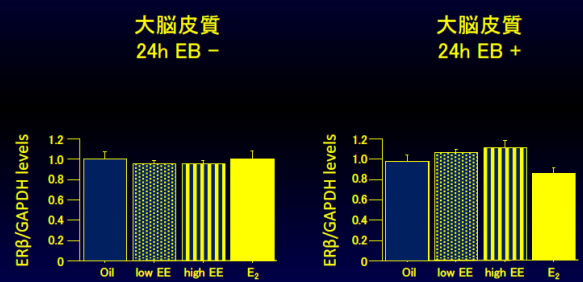


図13 大脳皮質・海馬における幼若期ERα発現量

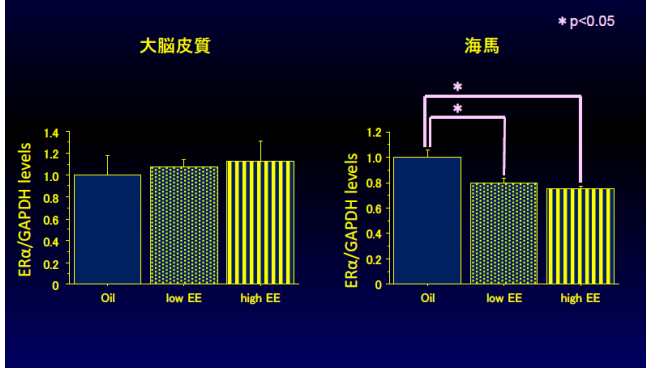


図14 大脳皮質・海馬における幼若期ERβ発現量

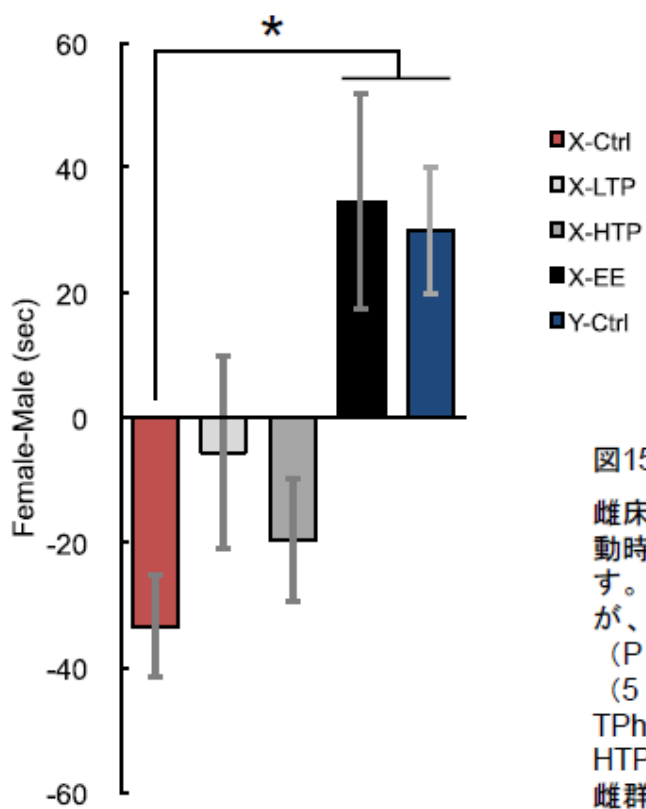
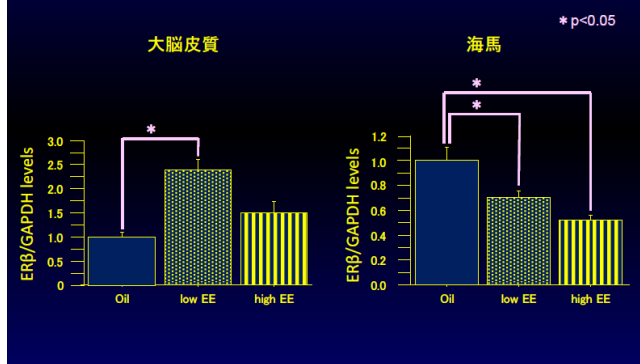


図15 12週齢時の性選好性試験の結果

雌床敷への接近行動時間と雄床敷接近行動時間への差を性選好性スコアとして示す。X-EE群とY-Ctrl群の性選好性スコアが、X-Ctrl群のスコアと比較して高い ($P < 0.05$)。図のX-CtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雌群、X-LTPは低TPhP (25 mg /kg /day) 曝露雌群、X-HTPは高TPhP (250 mg /kg /day) 曝露雌群、X-EEはEE (15 μ g /kg /day) 曝露雌群、Y-CtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雄群を示す。*: $P < 0.05$

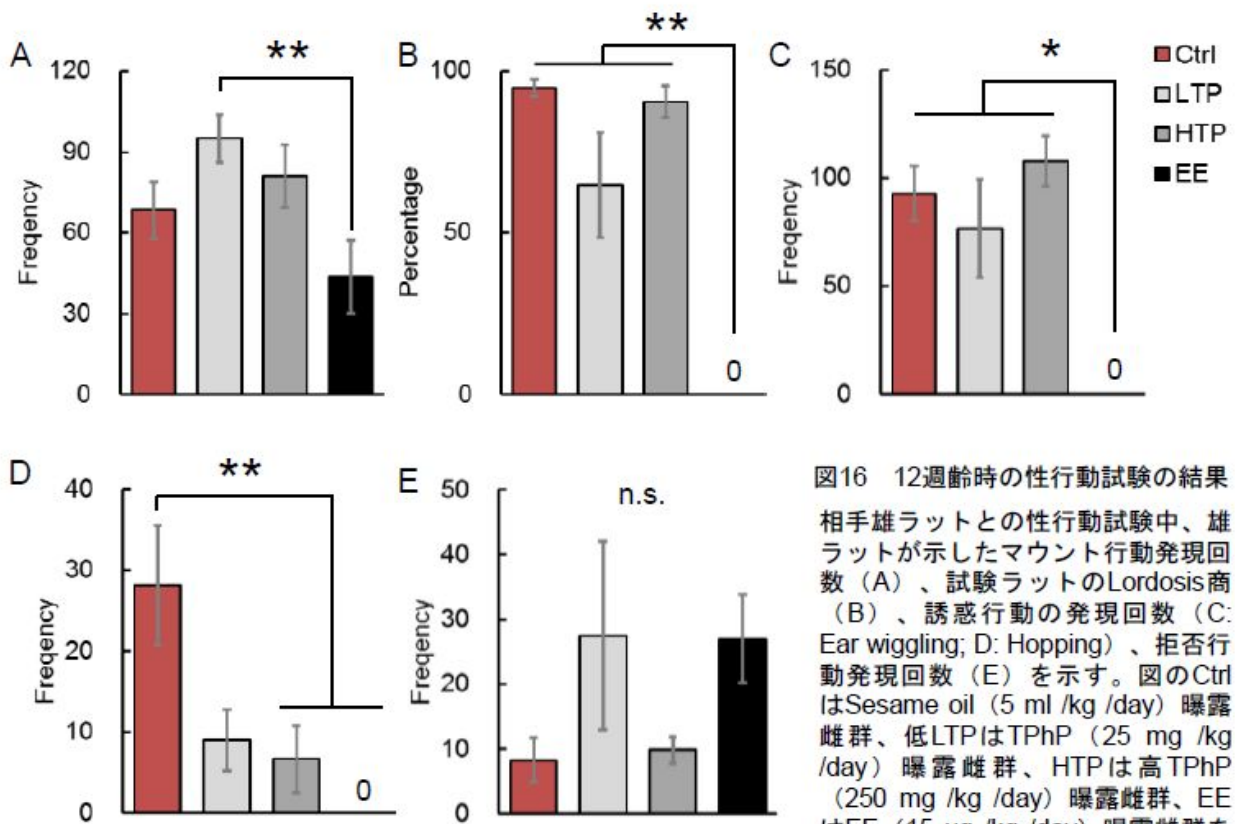


図16 12週齢時の性行動試験の結果

相手雄ラットとの性行動試験中、雄ラットが示したマウント行動発現回数 (A)、試験ラットのLordosis商 (B)、誘惑行動の発現回数 (C: Ear wiggling; D: Hopping)、拒否行動発現回数 (E) を示す。図のCtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雌群、低LTPはTPhP (25 mg /kg /day) 曝露雌群、HTPは高TPhP (250 mg /kg /day) 曝露雌群、EEはEE (15 μ g /kg /day) 曝露雌群を示す。*: P < 0.05, **: P < 0.01

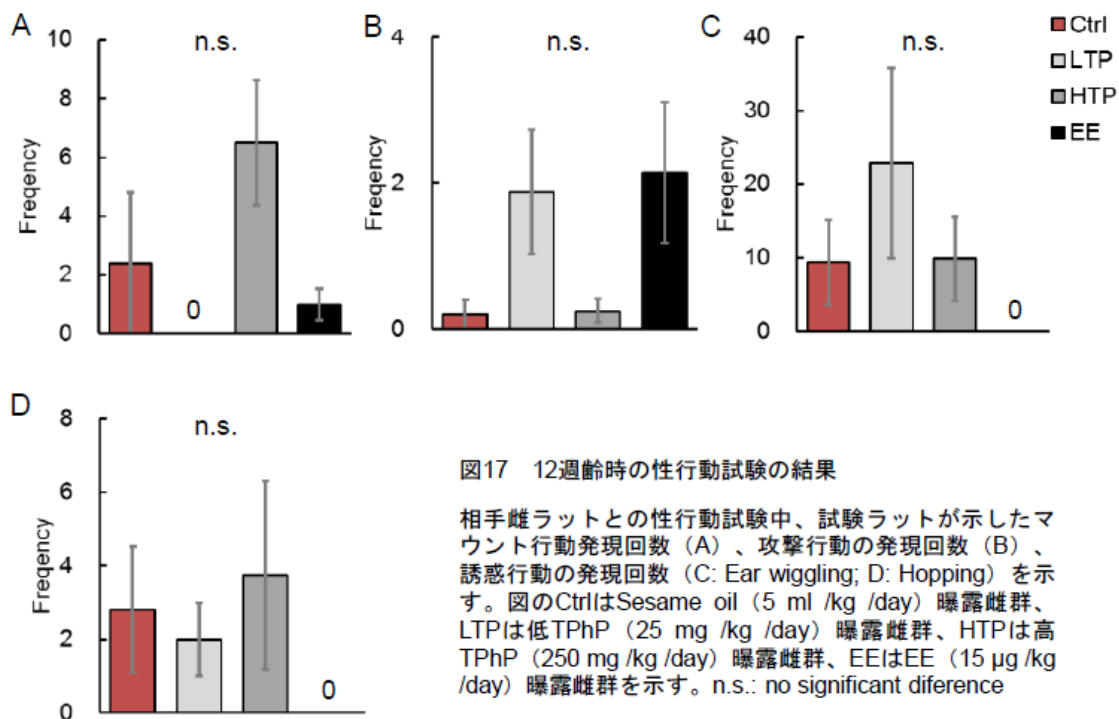


図17 12週齢時の性行動試験の結果

相手雌ラットとの性行動試験中、試験ラットが示したマウント行動発現回数 (A)、攻撃行動の発現回数 (B)、誘惑行動の発現回数 (C: Ear wiggling; D: Hopping) を示す。図のCtrlはSesame oil (5 ml /kg /day) 曝露雌群、LTPは低TPhP (25 mg /kg /day) 曝露雌群、HTPは高TPhP (250 mg /kg /day) 曝露雌群、EEはEE (15 μ g /kg /day) 曝露雌群を示す。n.s.: no significant difference

