

内分泌かく乱化学物質の胎生期および新生児期曝露による  
視床下部神経核の構造変化と生殖異常に関する研究

分担研究者 長尾哲二<sup>1</sup>, 吉村慎介<sup>2</sup>, 斉藤義明<sup>2</sup>  
食品薬品安全センター秦野研究所<sup>1</sup> 生殖生物学研究室,<sup>2</sup> 病理学研究室

研究要旨

内分泌かく乱化学物質の胎児期あるいは新生児期曝露による中枢神経系障害に起因した生殖機能障害のスクリーニングのための一つの指標として、神経細胞集団である視床下部の神経核の構造変化を取りあげた。ラットの脳の性分化臨界期である胎生末期あるいは新生児期初期に内分泌かく乱化学物質を曝露し、視床下部の細胞死（アポトーシス）と神経核、とくに性的二型核および前腹側脳室周囲核の構造変化を観察し、成熟後の生殖機能障害との関連性を明らかにする。その結果、数種の合成エストロゲンでは、視床下部神経細胞群の過剰細胞死が性的二型核の構造に変化を及ぼすことが示唆された。また、新生児期の神経核の構造変化が性行動を含む成熟後の生殖機能障害に関連することが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質による胎児あるいは新生児の視床下部神経細胞のアポトーシス過剰誘発および視床前野の性的二型核 SDN-POA ならびに前腹側脳室周囲核 AVPVN-POA の構造変化と、成熟後の性行動を含む生殖機能障害との関連性を明らかにし、ラットの脳の性分化臨界期である胎生末期から新生児期の視床下部神経細胞群のアポトーシス過剰誘発および SDN-POA あるいは AVPVN-POA の構造変化が、内分泌かく乱化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための鋭敏な指標の一つになり得るかを結論する。

B. 研究方法

視床下部神経核の構造変化は、一部の合成エストロゲンの新生児期曝露により誘発された移動神経核ニューロンの過剰細胞死（アポトーシス）に起因するという証拠が最近示された。そこで本年度は、新生児期の曝露が後に生殖機能障害を惹起することが確認された数種の内分泌かく乱性を有する化学物質（平成 10 年度本研究班報告）を用いて、まず性的二型核 SDN-POA における細胞死誘発について検討した。

妊娠ラット（Sprague-Dawley 系）を自然分娩させて得た雌雄新生児の生後 4 日（出生日＝生後 0 日）に内分泌かく乱化学物質を皮下注射（sc, 2μL/g）あるいは強制経口投与（po, 5μL/g）した。

用いた化学物質とその略号（製造元）ならびに投与経路を以下に示した。なお対照群にはコーン油を同様に投与した。

ブチルベンジルフタレート: BBP（東京化成）po

ノニルフェノール: NP（東京化成）po

エストラジオール: E<sub>2</sub>（Sigma）sc

エストリオール: E<sub>3</sub>（Sigma）sc

エチニルエストラジオール: EE（Sigma）po

エストラジオールベンゾエート: EB（Sigma）sc

ジエチルスチルベストロール: DES（Sigma）sc

タモキシフェン: TAM（Sigma）sc

投与 24 時間後（生後 5 日）に燐酸緩衝ホルマリンにて灌流固定して脳を摘出し、SDN-POA 部位を含む視床下部の細胞死を TUNEL 法により観察した。

次いで生後 1～5 日に上記化学物質を連日投与し、生後 21 日（離乳児）に燐酸緩衝ホルマリンにて灌流固定して脳を摘出した。視床下部を含む脳組織を凍結して、クリオスタットにて連続切片（約 20μm）とし、0.3%クレシルバイオレットで染色した。SDN-POA 部位の組織像を 3CCD デジタルカメラ（オリンパス HC-300）にてコンピュータに取り込み、画像処理（Photoshop 5.0）により SDN-POA を識別した後、画像解析ソフト（Mac Scope, Mitani Corp., Japan）を用いて SDN-POA の体積を求めた。

（倫理面への配慮）

使用した動物の屠殺にあたっては、秦野研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した。

C. 研究結果

1. 細胞死

ビスフェノール A: BPA（東京化成）po  
ゲニステイン: GEN（Sigma）, sc

生後5日の対照群雄ラットの視床下部神経核 SDN-POA 部位における細胞死誘発頻度は  $1.16 \pm 0.24\%$  (28/2130 細胞) であった。内分泌かく乱化学物質投与24時間後の SDN-POA 部位における細胞死誘発頻度を Fig. 1 および 2 に示した。DES 投与では  $100 \mu\text{g/kg}$  群の頻度 ( $2.73\%$ , 28/1062 細胞) が対照群と比較して有意に増加したが、用量に依存した変化ではなかった。NP 投与では  $250 \text{ mg/kg}$  以上の群において誘発頻度は有意に増加し ( $2.53 \sim 5.89\%$ )、さらに NP の用量に依存した変化であった。

その他の合成エストロゲンおよび内分泌かく乱化学物質については、 $E_3$   $2 \text{ mg/kg}$  群 ( $4.0\%$ , 63/1560 細胞) および TAM  $40 \text{ mg/kg}$  群 ( $2.4\%$ , 24/1017 細胞) において細胞死が有意に増加した。

## 2. 神経核の構造変化

生後4日に TAM あるいは DES を曝露した雄出生児の生後21日の SDN-POA 体積を Fig. 3 に示した。TAM 群では用量に依存して体積は減少したが、DES 群では対照群との間に差はみられなかった。NP  $125 \text{ mg/kg}$  群においては減少傾向がみられた。その他の化学物質による SDN-POA の変化の有無については現在観察中である。

## D. 考察

Gorski ら(1978)はラットの内側視床前野(medial preoptic area)に雌雄差のある神経核を見出した。これは性的二型核(sexually dimorphic nucleus of the preoptic area: SDN-POA)と呼ばれる神経核で、雄のこの神経核の体積は雌より大きく、ニューロン数も雌に比べて多い。SDN-POA の機能は十分に解明されていないが、それは雄ラットの性行動を調節するという報告がある(De Jonge et al., 1989)。この神経核の大きさは周生期の精巣から分泌されるアンドロゲンの有無によって決まり、新生児期の雌ラットにアンドロゲンを投与すると神経核は雄とほぼ同じ大きさになる。最近、合成性ホルモンがアポトーシスによるニューロン死を引き起こし、その結果前述したニューロン群の大きさの異なる SDN-POA が生ずる可能性のあることがわかった(Arai et al., 1996; Nagao et al., 1999)。

本研究において、TAM および NP 曝露された雄出生児の SDN-POA 部位に過剰細胞死が起こり、SDN-POA の体積も減少することが明らかになった。また、DES 曝露では用量に依存した SDN-POA 部位の細胞死の増加はみられず、体積の

明瞭な減少もなかった。これまで TAM および NP の新生児期曝露が、成熟後の雄の性行動(mount, intromission, ejaculation など)にも影響を及ぼすことを報告した(平成10年度本研究班報告)。これらのことから、ラットの脳の性分化臨界期に生じた SDN-POA 部位の過剰細胞死が神経核の構造変化を惹起し、その結果として成熟後の性行動に変化を生じさせたと推察される。

一方、新生児期の雌ラットにエストロゲンまたはアンドロゲンを投与すると、終板器官の直後の第3脳室周囲層にある前腹側脳室周囲核(anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area: AVPvN-POA)ではアポトーシスが促進され、逆に SDN-POA ではそれが抑制されることが報告され(Davis et al., 1996)。異なったニューロン群の間でエストロゲンに対する遺伝子発現の反応性が異なることが推察される。したがって、内分泌かく乱化学物質の胎生期あるいは新生児期曝露による雌ラットの SDN-POA および AVPvN-POA の構造変化を併せて観察することも、神経核の構造変化が内分泌かく乱化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための指標の一つになり得るか結論するためには必須であると考えられる。

## E. 結論

新生児期に適用した合成性ホルモンあるいは内分泌かく乱化学物質がアポトーシスによるニューロン死を引き起こし、その結果ニューロン群の大きさの異なる性的二型核が生ずることが示唆された。

## 1. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagao T, Saito Y, Yoshimura S. Possible mechanism of congenital malformations induced by exposure of mouse preimplantation embryos to mitomycin C. *Teratology*, 2000 in press.

Nagao T. Male-mediated developmental toxicity: Enhanced susceptibility to induced teratogenesis in the offspring of male mice treated with ethylnitrosourea. *Cong. Anom.*, 2000 in press.

Nagao T, Saito Y, Usumi K, Nakagomi M, Kuwagata M, Yoshimura S, Ono H. Effect of early neonatal exposure to nonylphenol on reproduction in rats.

Human & Exp. Toxicol., 2000 *in press*.

Kuwagata M, Saito Y, Yoshimura S, Nagao T. Reproductive effects of early neonatal exposure to diethylstilbestrol or tamoxifen. Cong. Anom., 2000 *in press*.

Ohta R, Matsumoto A, Sato M, Shirota M, Nagao T, Tohei A, Taya K. Postnatal behavior in hatano high- and low-avoidance rats following prenatal exposure to low dose of methylazoxymethanol. Behav. Physiol., 2000 *in press*.

Nagao T, Saito Y, Usumi K, Kuwagata M, Imai K. Reproductive function in rats exposed neonatally to bisphenol A and estradiol benzoate. Reprod. Toxicol., 1999; **13**: 303-311.

Nagao T, Yoshimura S, Saito Y, Imai K. Developmental toxicity of the topoisomerase inhibitor, etoposide, in rabbits after intravenous administration. Teratogen. Carcinogen. Mutagen., 1999; **19**: 233-241.

Nagao T. Multigeneration effects of endocrine disrupting chemicals with paternal reference to teratogenesis by paternal exposure to synthetic hormones. Environ. Mutagen. Res., 1999; **21**: 267-272.

## 2. 学会発表

長尾哲二： スチレンダイマー・トリマーのラット妊娠期および授乳期経口投与による次世代児への影響，第2回内分泌攪乱化学物質問題に関する国際シンポジウム，1999 神戸

長尾哲二，斉藤義明，吉村慎介，桑形麻樹子，中込まどか，今井 清，小野 宏： ノニルフェノールのラット新生児期曝露による生殖機能障害 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

長尾哲二，吉村慎介，渋谷 徹，小野宏： 内分泌攪乱化学物質の精巣毒性と継世代催奇形性 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

長尾哲二： 内分泌攪乱化学物質の生殖，発生に及ぼす影響 環境変異原学会第10回公開シンポジウム 1999 東京

長尾哲二： 精巣毒性を介さない生殖毒性：化学物質による視床下部神経核の変化と生殖障害 第6回神経行動毒性研究会学術集会講演会 1999 東京

渋谷 徹，鹿嶋崇幸，須井 哉，原 巧，長尾哲二，斉藤義明，戸塚ゆかり，若林敬二： アミノフェニルノルハルマンのマウス始原生殖細胞に対する細胞毒性 第28回日本環境変異原学会 1999 岐阜

渋谷 徹，鹿嶋崇幸，須井 哉，原 巧，斉藤義明，長尾哲二，今井 清： 内分泌攪乱化学物質の始原生殖細胞に対する影響 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回研究発表会，1999 神戸

桑形麻樹子，斉藤義明，臼見憲司，吉村慎介，長尾哲二： 内分泌攪乱化学物質の新生児期投与による生殖機能障害 第39回日本先天異常学会 1999 鹿児島

Shibuya T，Kashima T，Saito Y，Nagao T，Imai K，Ono H. Induction of mutation and apoptosis in mouse primordial germ cells by ENU. Society of Toxicology, 39<sup>th</sup> Annual Meeting, 2000 Philadelphia (U.S.A.)

G. 知的所有権の取得状況

なし

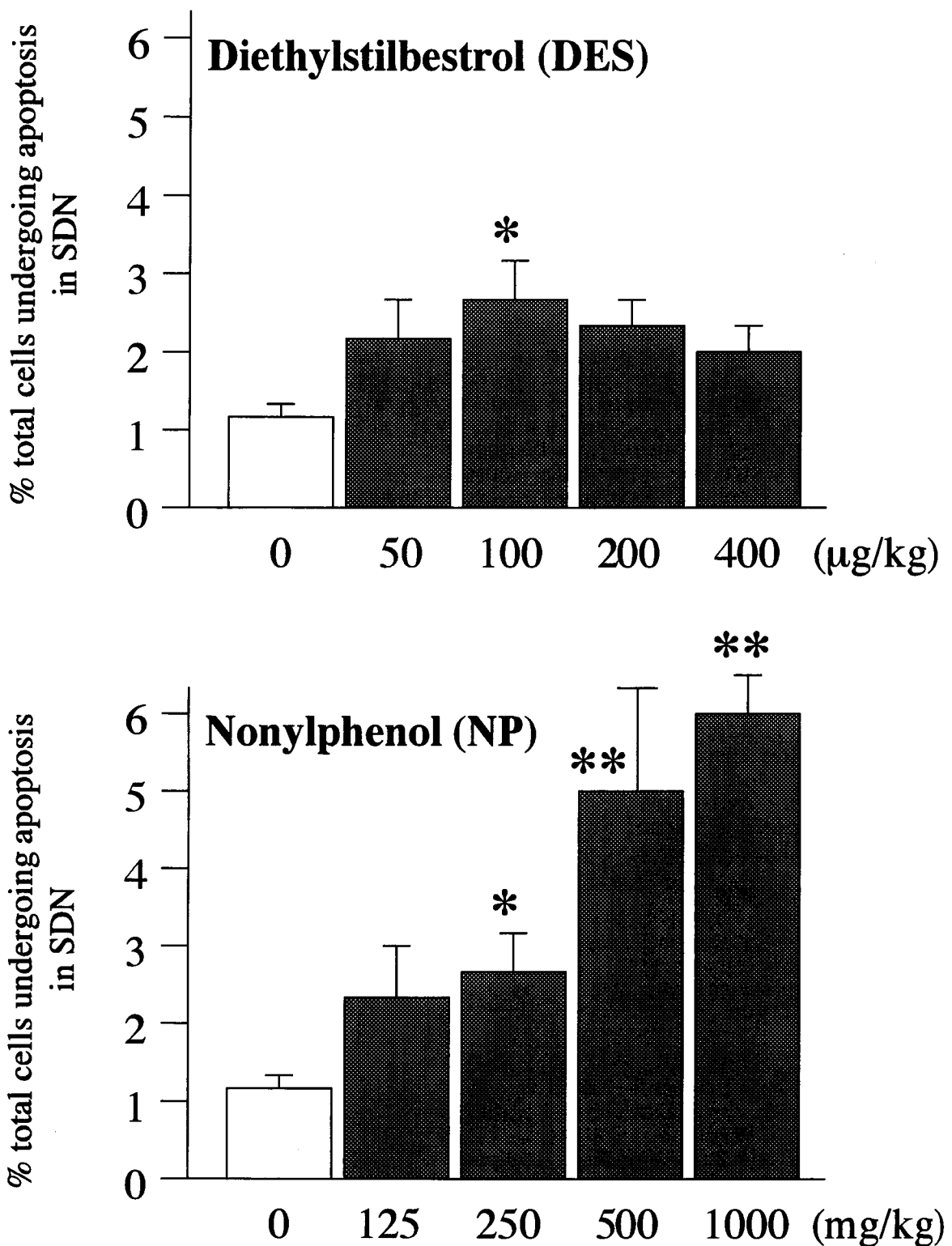


Fig. 1. The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus of male rats after exposure to DES or NP on postnatal day 4. Error bars represent standard error of the mean.

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

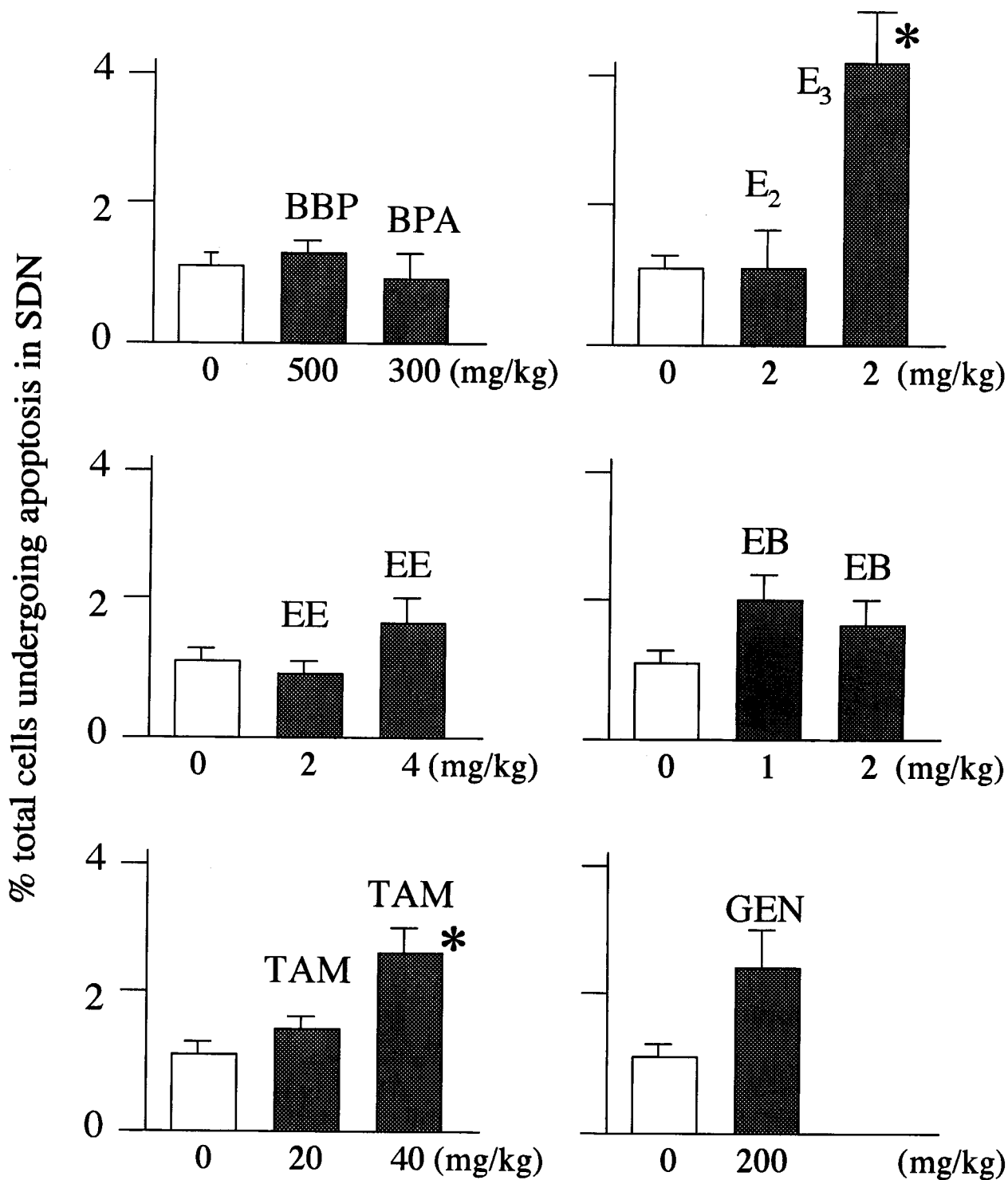


Fig. 2 The incidence of apoptosis in the developing hypothalamus of male rats after exposure to EDCs on postnatal day 4.

Error bars represent standard error of the mean.

Abbreviations: BBP, buthyl benzyl phthalate; BPA, bisphenol A; E<sub>2</sub>, 17 $\beta$ -estradiol; E<sub>3</sub>, estriol; EE, ethinyl estradiol, EB, estradiol benzoate; TAM, tamoxifen; GEN, genistein \*  $P < 0.05$

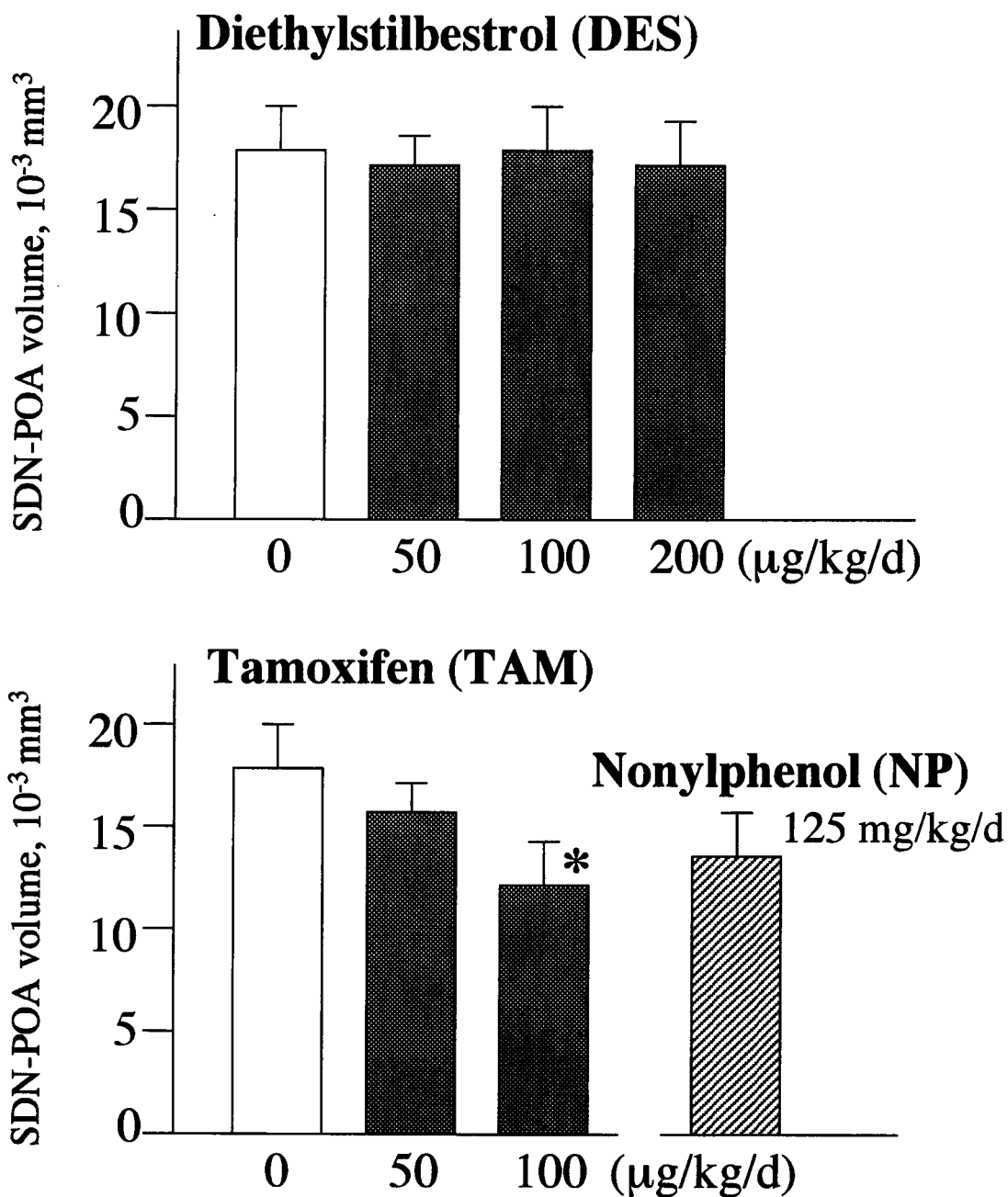


Fig. 3. Mean volumes of the SDN-POA in male weanlings exposed to DES, TAM or NP on postnatal days 1 to 5. Error bars represent standard error of the mean. \*  $P < 0.05$