

雌ラットの新生児期化学物質曝露による低用量影響 － 遺伝的要因の関与について －

大向英夫, 根倉 司, 立花滋博, 太田 亮

Genetic variation in low-dose effects of neonatal chemical exposure in female rats

Hideo OHMUKAI, Tsukasa NEGURA, Shigehiro TACHIBANA, Ryo OHTA

Neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure was performed using two inbred strains of rats, which have been selectively bred for high-active and low-active avoidance (HAA and LAA, respectively) in a shuttle-box task. Neonatal female rats of both strains were daily administered by oral gavage at doses of 0 (vehicle), 0.05 and 0.5 µg/kg for the first 5 days after birth. Sexual maturation (vaginal opening), body weight changes (1 to 52 weeks of age), estrous cycles (8 to 37 weeks of age), avoidance learning (49 or 50 weeks of age), and organ weights (52 weeks of age) were examined in the rats. As a result, accelerated puberty, increase in body weight, and conflicting effect on avoidance learning were observed in the 0.05 and 0.5 µg/kg groups of LAA rats. Early onset of abnormal estrous cycles, increase in weights of pituitary and adrenal glands was observed in the 0.5 µg/kg group of HAA and LAA rats. These results suggest that effects of neonatal chemical exposure on sexual maturation, body weight changes, and avoidance learning vary in rats depending on the strain used.

緒言

著者らは、新生児期に投与した低用量のジエチルスチルベストロール(DES)が、老化過程で起こる性周期異常に類似した変化を早期に発症させることをSprague-Dawley系ラット¹⁾とC57BL/6J系マウス²⁾を用いて報告した。また、低用量のエチニルエストラジオール(EE)でも同様の変化がSprague-Dawley系ラット³⁾とWistar系ラット⁴⁾で報告されている。ヒトにおいては、40歳未満で卵巣機能が停止する早発閉経が知られており、不妊の原因の一つとなっているが、早発閉経の原因はほとんどわかっていない。

近年、新生児期の内分泌かく乱化学物質曝露により成人の肥満が誘発される可能性が指摘されており⁵⁾、著者らがC57BL/6J系マウスを用いて実施した新生児期DES曝露の実験²⁾でも雌マウスに肥満傾向がみられたが、Sprague-Dawley系ラットを用いた実験¹⁾では体重増加はみられていない。Sprague-Dawley系ラットは毒性試験に汎用されているクローズドコロニーの系統で、他の

系統に比べて性周期の加齢性変化を早期に発症することが知られているが⁶⁾、成熟後の体重増加も他の系統に比べて大きく、個体差が生じやすい。このことから、新生児期の化学物質曝露による肥満への影響には系統差があるものと考えられる。さらに、新生児期の化学物質曝露は学習行動にも影響を与える可能性が指摘されていることから、今回は行動型と生殖機能に差のある2種類の近交系であるHatanoラットを実験に使用した。

Hatanoラットはシャトルボックス条件回避学習試験の成績によりSprague-Dawley系ラットから高回避系(HAA)と低回避系(LAA)に分離された亜系統⁷⁾であるが、LAAラットはHAAラットに比べて膣開口日が遅く⁸⁾、加齢に伴う性周期異常を早期に発症することが知られている⁹⁾。そこで本研究では、新生児期に低用量のDESを曝露したHAAとLAAの雌ラットについて性成熟、体重推移、性周期、学習能力および握力検査ならびに内分泌系の器官重量を測定し、新生児期化学物質曝露が及ぼす低用量影響に遺伝的要因が関与するか否かを調べた。

1 毒性部 毒性学研究室

材料と方法

実験には、妊娠雌ラット(HAA 14匹, LAA 16匹)を用い、各系統とも4匹以上/群の3群に分けた。動物は、床敷としてペパークリーン(日本エスエルシー、静岡)を入れたラット用繁殖ケージ(350W×400D×180H mm)に1匹ずつ収容し、温度21~25℃、湿度40~75%、照明12時間(7時~19時点灯)に調節された飼育室で、固型飼料(CE-2, 日本クレア, 東京)と水道水を自由摂取させて飼育した。これらの実験条件は、全て以前実施したSprague-Dawley系ラットを用いたもの¹⁾と同じとした。全ての実験操作は、「一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 動物実験に関する指針(機関内規程)」に基づいて実施した。

DESの投与経路は、Sprague-Dawley系ラットを用いた実験¹⁾と同様に強制経口投与を選択した。投与量は、Sprague-Dawley系ラットを用いた実験¹⁾で性周期異常を早期に発症させた0.5 µg/kg/dayと、性周期異常の早期化を起こさなかった0.05 µg/kg/dayとした。投与には、シグマ・アルドリッチ社(St. Louis, MO)製のDESを20 mg秤量し、1 mLのエタノール(和光純薬, 大阪)に溶解後、トウモロコシ油(ナカライテスク, 京都)で段階希釈して調製した0.05および0.005 µg/mL液を使用した。なお、対照群の児動物には、トウモロコシ油のみを投与した。

新生児は、生後1日(分娩日を生後0日とした)に外表異常がなく、体重値にも顕著な差がない雌児を優先的に選び、雌児数は4~8匹/腹とし、残りは雄児で10匹/腹に調整した。投与液量は10 mL/kg体重とし、マイクロシリンジおよび栄養カテーテル(アトム栄養カテーテル, 外径1.0 mm, アトムメディカル, 東京)を応用して作製した新生児用胃管を用いて、生後1日から生後5日まで1日1回投与した。なお、同腹児は全て同じ投与量を投与した。投与した児動物は、生後10日に母動物とともに金属製金網床ケージ(220W×270D×190H mm)に収容し、生後22日に雌児のみ離乳させ、同ケージに2~3匹ずつ収容した。児動物の体重を、生後1~5日までは毎日測定し、以降10週齢までは週1回、10週齢以降は2週間に1回、28週齢以降は4週間に1回、52週齢まで測定した。

性成熟の指標として、生後25日から全例について膣開口の有無を毎日観察し、完成日に体重を測定した。さらに8週齢から37週齢まで2週間おきに毎日、全例について膣垢を採取し、性周期を観察した。膣垢像を発情前期、発情期、発情休止期に分類し、渡辺らの方法⁶⁾に従って性周期の型を分類した。すなわち、4日から5日の間隔で発情期の認められた動物を正常周期とみなし、それ以外のは異常周期と分類した。

各群とも4腹から10匹を無作為に選び、49または50週齢時にシャトルボックス条件回避反応装置(TK-401L, ユニコム, 神奈川)を用いて能動的回避学習試験(10試行を1セットとして連続6回, 1日6セットを連続3日間)を実施した。また、50週齢時にラット・マウス用握力測定装置(MK-380CM/R, 室町機器, 東京)を用いて握力測定を行った。

52週齢時に全例をペントバルビタールナトリウム麻酔下で安楽死させ、剖検した。その際、下垂体、副腎および卵巣の重量を測定した。

離乳前の児に関するデータは腹単位、離乳以降のデータは個体を標本単位として、系統ごとに一元配置型の分散分析あるいは繰り返しのある二元配置の分散分析を行い、群間に有意性が認められた場合はDunnett法による多重比較検定を行った。性周期異常の頻度と剖検時に認められた異常所見については、Fisherの直接確率検定を行った。有意水準はいずれも5%および1%とした。

結果

性成熟(図1): LAAラットでは膣開口日がDESの用量に依存して早まる傾向がみられ、0.5 µg/kg投与群の膣開口日(平均±標準偏差: 34.8±1.9)は同系統の対照群(37.0±1.5)と比較して有意に短縮した。一方、HAAラットでは、膣開口日にDES投与の影響は認められなかった。完成日の体重には、両系とも群間に有意差はみられなかった。なお、両系統の対照群を比較すると、LAAラットはHAAラット(33.4±1.0)に比べて膣開口日が4日ほど遅かった。

体重推移(図2): LAAラットでは0.05および0.5 µg/kg投与群の体重が4週齢以降、同系統の対照群と比較して有意に増加した。HAAラットでは0.05 µg/kg投与群の体重が3および4週齢で同系

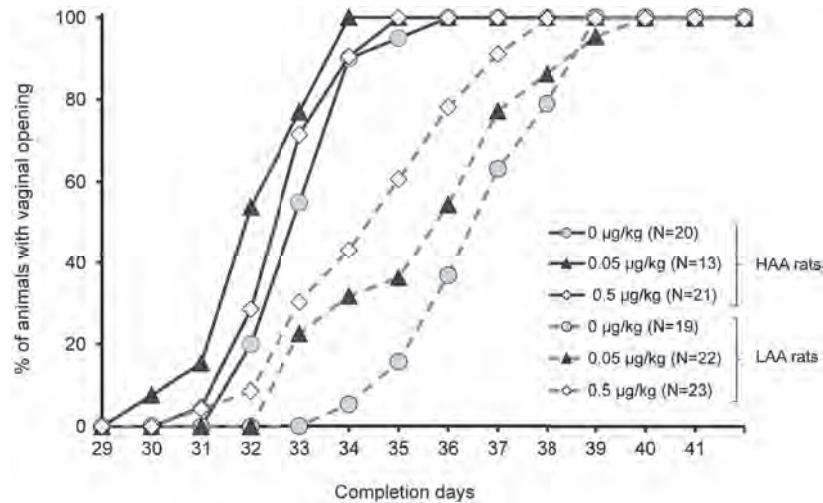


図1 新生児期にDESを投与したHAAおよびLAAラットの膣開口日 (各日齢における膣開口が完成した動物の割合)

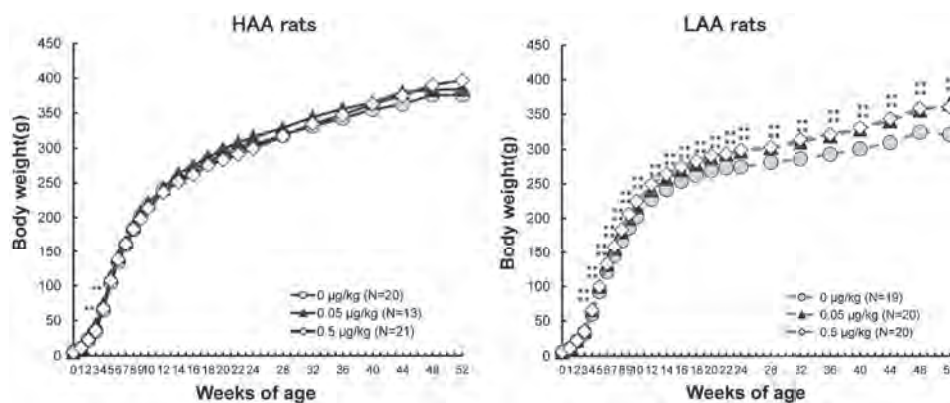


図2 新生児期にDESを投与したHAAおよびLAAラットの体重推移
** は対照群と比較して有意差(5%および1%)があることを示す。

統の対照群と比べて有意に増加したが、それ以降、DES投与群と対照群との間で有意差は認められなかった。なお、両系の対照群を比較すると、LAAラットの体重はHAAラットより低値で推移した。

性周期(図3)：0.5 µg/kg投与群では、HAAラット、LAAラットともに性周期異常が早期に観察され、20週齢までに90%以上の動物が性周期異常を示した。この間の主な異常周期の型は、両系とも前半は不規則周期であったが、HAAラットでは16週齢以降、LAAラットでは20週齢以降に連続発情となった。0.05 µg/kg投与群では、HAAラット、LAAラットともに性周期異常の割合はそれぞれの対照群と同様の推移を示した。なお、両系の

対照群を比較すると、LAAラットの方がHAAラットより性周期異常が早期に発現した。

シャトルボックス条件回避学習試験(図4)：LAAラットでは試行1日目の回避率が0.5 µg/kg投与群で上昇し、試行2日目以降の回避率が0.05 µg/kg投与群で低下した。一方、HAAラットでは回避率にDES投与の影響は認められなかった。両系の対照群を比較すると、HAAラットはLAAラットに比べて明らかに高い回避率を示した。

握力測定(表1)：両系統とも前肢、後肢ともにDES投与の影響は認められなかった。また、両系の対照群を比較しても握力に系統差は認められなかった。

器官重量(図5)：0.5 µg/kg投与群では、下垂体

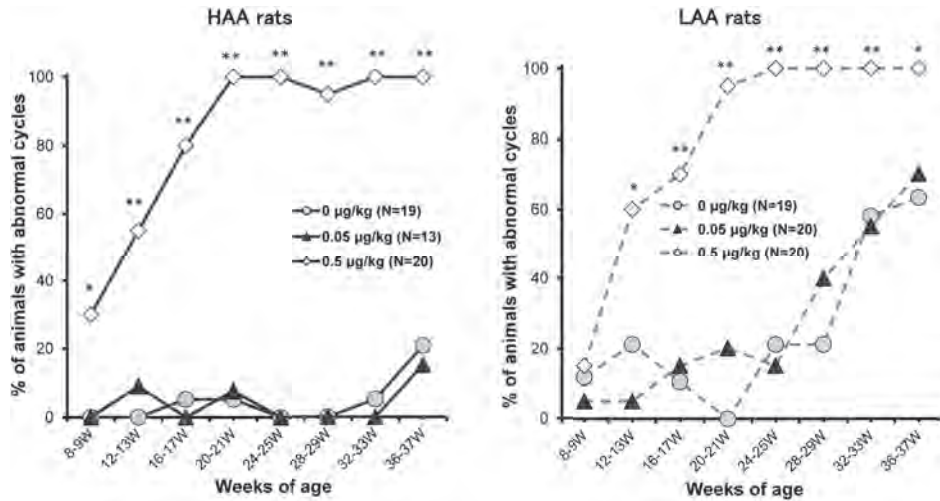


図3 新生児期にDESを投与したHAAおよびLAAラットの性周期 (各週齢における性周期異常を示す動物の割合)

*, ** は対照群と比較して有意差(5%および1%)があることを示す。

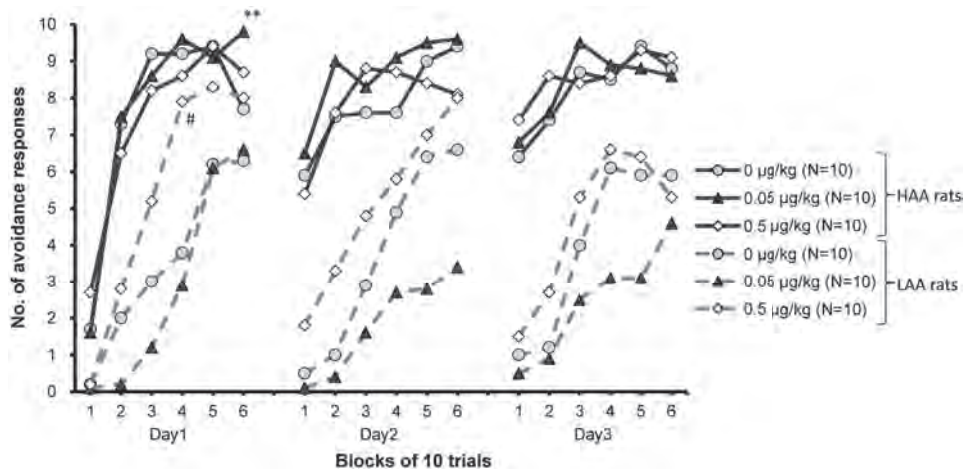


図4 新生児期にDESを投与したHAAおよびLAAラットの シャトルボックス条件回避学習試験

** はHAAラットの対照群と比較して有意差(1%)があることを示す。
はLAAラットの対照群と比較して有意差(5%)があることを示す。

表1 新生児にDESを投与したHAAおよびLAAラットの握力測定

Group	0 µg/kg	0.05 µg/kg	0.5 µg/kg
Number of animals	10	10	10
HAA rats			
Forelimb	0.919 ± 0.094	0.945 ± 0.090	1.008 ± 0.108
Hindlimb	0.418 ± 0.086	0.411 ± 0.088	0.414 ± 0.082
LAA rats			
Forelimb	1.009 ± 0.110	1.039 ± 0.094	1.043 ± 0.099
Hindlimb	0.391 ± 0.079	0.462 ± 0.086	0.392 ± 0.075

Each value shows mean (kg) ± S.D.

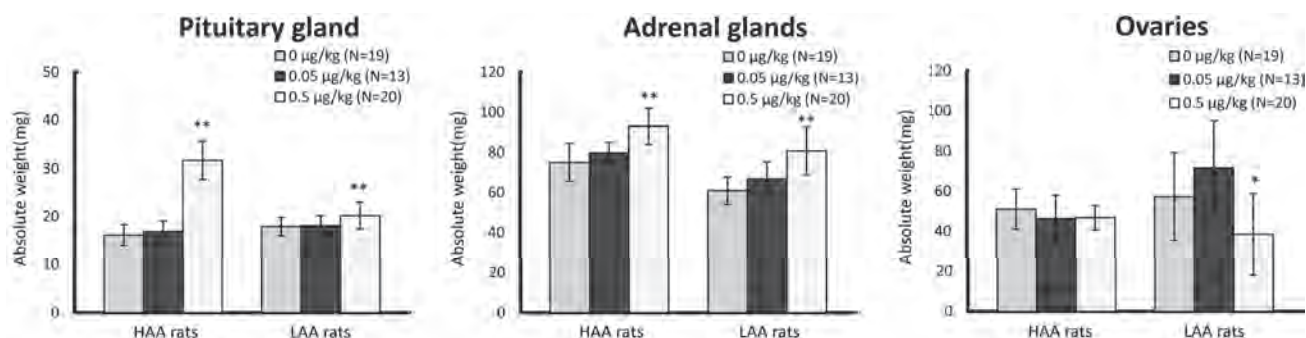


図5 新生児期にDESを投与したHAAおよびLAAラットの52週齢における内分泌系器官の重量

各群の平均±標準偏差を表す。

*, **は対照群と比較して有意差(5%および1%)があることを示す。

表2 新生児にDESを投与したHAAおよびLAAラットの52週齢における剖検所見

HAA rats	Group	0 µg/kg		0.05 µg/kg		0.5 µg/kg	
Findings	Grade	-	P	-	P	-	P
Pituitary gland							
Dark reddish spot		19	0	13	1	20	11**
Mass		19	1	13	0	20	0
Mammary gland							
Galactocele		19	0	13	0	20	10**
LAA rats							
Group	0 µg/kg		0.05 µg/kg		0.5 µg/kg		
Findings	Grade	-	P	-	P	-	P
Pituitary gland							
Dark reddish spot		19	0	20	1	19	1
Mass		19	0	20	0	19	0
Mammary gland							
Galactocele		19	0	20	0	19	2

Notes) - : No abnormal changes P : Non-graded change

Numerals represent the number of animals.

Significantly different from the respective 0 µg/kg group (**: P<0.01).

および副腎の重量がHAAラット、LAAラットともに、それぞれの対照群と比較して有意に増加した。さらにLAAラットでは、0.5 µg/kg投与群の卵巣重量が対照群と比較して有意に低下した。

剖検所見(表2) : HAAラットでは、0.5 µg/kg投与群の下垂体の腫大および暗赤色点と乳腺における乳汁貯留がそれぞれ約半数に認められた。これに対しLAAラットでは、0.5 µg/kg投与群の下垂体の暗赤色点が1例、乳腺における乳汁貯留が2例のみであった。

考察

HAAラットとLAAラットを用いた新生児期DES曝露の実験においても、Sprague-Dawley系ラット¹⁾とC57BL/6J系マウス²⁾を用いた新生児期DES曝露の実験と同様に、0.5 µg/kg投与群で性周期異常が早期に発症した。このことから、新生児期DES曝露により誘発される性周期異常は、遺伝的要因に関係なく発現する変化と推察された。

一方、LAAラットの0.05 µg/kg以上の投与群では、対照群に比べて体重が有意に増加した。HAAラットではいずれのDES投与群も対照群

と同様の体重推移を示したことから、新生児期DES曝露の体重への影響には遺伝的要因が関与するものと推察された。両系の対照群を比較するとLAAラットの体重はHAAラットより低値を示したことから、新生児期DES曝露の体重への影響は、成熟後の体重増加が少ない系統にて検出されやすいと考えられる。

性成熟観察結果から、LAAラットでは、膣開口日の早期化が0.5 µg/kg投与群でみられたのに対し、HAAラットではDES投与の影響が認められなかった。これまでの新生児期DES曝露の実験においては、C57BL/6J系マウス²⁾で膣開口日の遅れが、Sprague-Dawley系ラット¹⁾で膣開口日の早期化がいずれも5 µg/kg投与群で認められているが、今回の実験でLAAラットにおいてより低用量の0.5 µg/kg投与群で膣開口日に明らかな影響が認められたことは大変興味深い。すなわち、新生児期DES曝露の性成熟への影響も遺伝的要因に左右され、膣開口日の遅い系統にて早熟が検出されやすいと考えられた。

条件回避学習試験については、LAAラットの0.5 µg/kg投与群で回避率が上昇し、試行2日目以降の0.05 µg/kg投与群の回避率が抑制された。HAAラットではDES投与の影響が認められなかったことから、新生児期DES曝露の学習行動への影響にも遺伝的要因が関与しているものと推察された。なお、握力測定については、両系統ともにDES投与の影響は認められなかったことから、今回実施したDESの投与量では、握力への影響はないものと考えられた。

52週齢の剖検時に乳汁の貯留および下垂体の腫大に伴う暗赤色点が、HAAラットの半数にみられたが、LAAラットではほとんど観察されなかった。したがって、これらの所見にも遺伝的要因が関与しているものと推察される。なお、Sprague-Dawley系ラットを用いた新生児期DES曝露の実験¹⁾においても用量に依存して乳汁の貯留が観察されている。しかし、下垂体および副腎の重量がHAAおよびLAAラットともに0.5 µg/kg投与群において有意に増加し、Sprague-Dawley系ラットを用いた生涯試験⁴⁾においても下垂体と副腎の重量増加が0.5 µg/kg以上の投与群において認められていることから、内分泌系の器官重量

は、内分泌かく乱物質の低用量影響を評価する上で遺伝的要因に左右されにくい有用な指標の一つとなると考えられた。

結論

本研究ではエストロゲン活性を有するDESを行動型と生殖機能に差のある2種類の近交系ラットであるHatanoラットの雌の新生児期に投与し、発達から老化に至る段階において、生殖器系および学習行動への影響に対する遺伝的要因の関与について検索した。その結果、性周期異常と内分泌系の器官重量の増加は系統に関係なく発現するが、体重、性成熟および学習行動への影響は使用する系統によって異なることが示された。

謝辞

本研究は、平成23年度厚生労働省厚生労働科学研究費の補助事業(化学物質リスク研究事業、H23-化学-一般-002)により実施した。

文献

- 1) 太田 亮, 宮原 敬, 又吉 健ら: 内分泌攪乱性確定試験としてのラット一生涯試験の試み. 秦野研究所年報, 2007; **30**: 17-24
- 2) 大向英夫, 太田 亮, 豊泉友康ら: マウス新生児期の化学物質曝露による生殖器系の発達および老化に及ぼす影響の研究. 秦野研究所年報, 2010; **33**: 9-15
- 3) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, et al.: Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *J Toxicol Sci.* 2012; **37**: 681-690
- 4) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, et al.: Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.* 2013; **40**: 16-23
- 5) Newbold RR: Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones.* 2010; **9**: 206-17
- 6) 渡辺千朗, 代田真理子, 長尾哲二: SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究. 秦野研究所年報, 1994; **17**: 37-40
- 7) Ohta R, Matsumoto A, Hashimoto Y, et al.: Behavioral characteristics of rats selectively bred for high and low avoidance shuttlebox response.

Congenital Anomaiesl. 1995; 35: 223-229

- 8) Shirota M, Sato M, Kojima K, et al.: Minor involvement of somatic growth in the onset of puberty of Hatano high- and low-avoidance rats. *Reproduction.* 2004; 127: 389-395
- 9) 太田 亮, 熊谷文明, 白見憲司ら：ストレス高感受性(高回避系)ラットは低感受性(低回避系)ラットより寿命が短い. 秦野研究所年報, 2012; 35: 9-13