

Figure.1 Schematic representation of experimental protocol. PND, postnatal day.

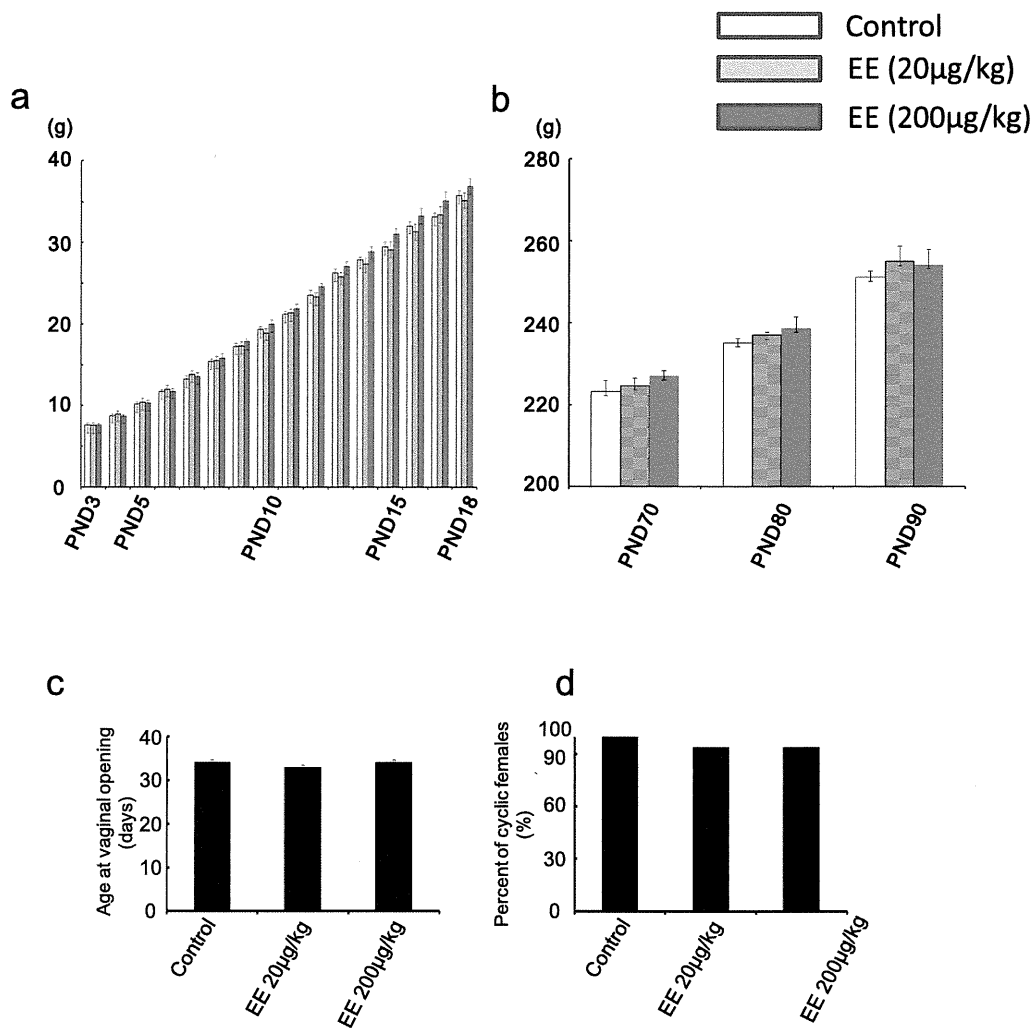


Figure.2 Effect of neonatal EE exposure on body weight and reproductive parameters. (a) Body weight from PND3 to PND18 (B) Body weight from PND70 to PND90. (c) Age at vaginal opening. (d) Percent of normal estrous cyclicity at PND90. PND, postnatal day.

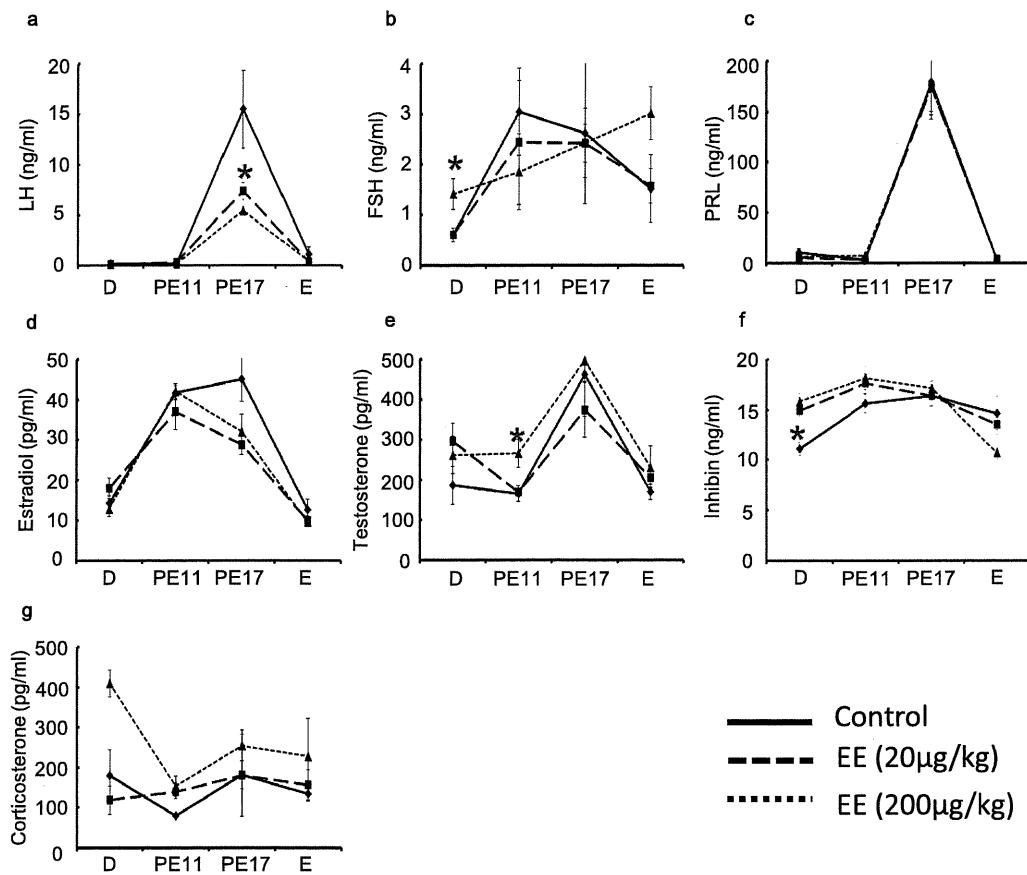


Figure.3 Changes in serum level of LH (a), FSH (b), prolactin (c), estradiol-17 $\beta$  (d), testosterone (e), inhibin (f) and corticosterone (g) in neonatal EE treated rats. Bloods were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20  $\mu$ g/kg and 200  $\mu$ g/kg). Hormone level was measured by RIA. Each point represents mean  $\pm$  SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

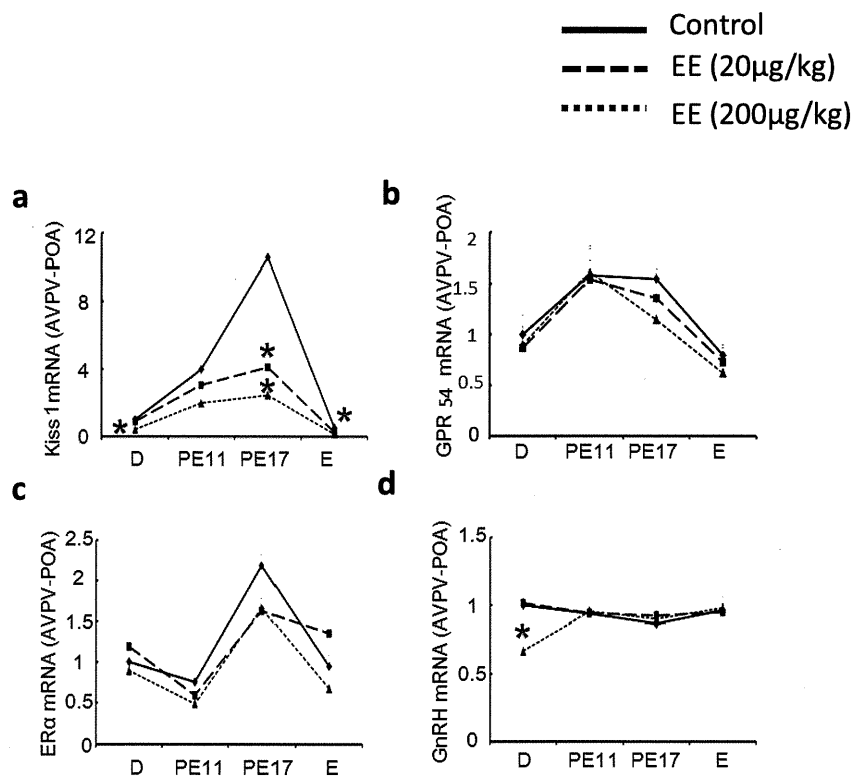


Figure.4 Changes in *kiss1* (a), *GPR54* (b), *ERα* (c) and *GnRH* (d) mRNA expression in AVPV/POA. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μg/kg and 200 μg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean ± SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05).

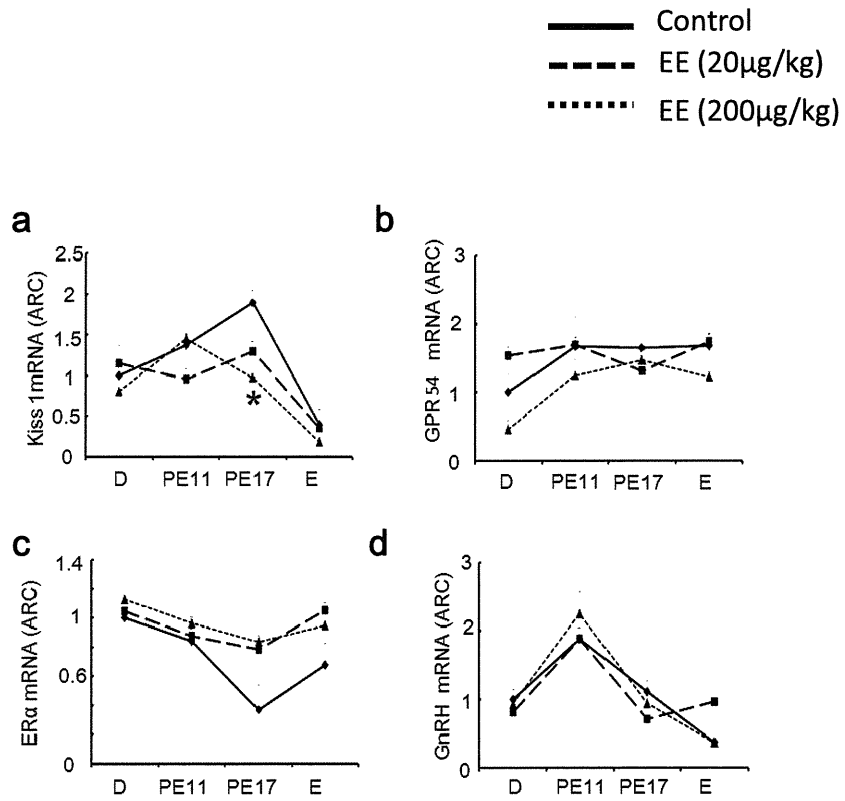


Figure.5 Changes in *kiss1* (a), *GPR54* (b), *ERα* (c) and *GnRH* (d) mRNA expression in ARC. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μg/kg and 200 μg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean  $\pm$ SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

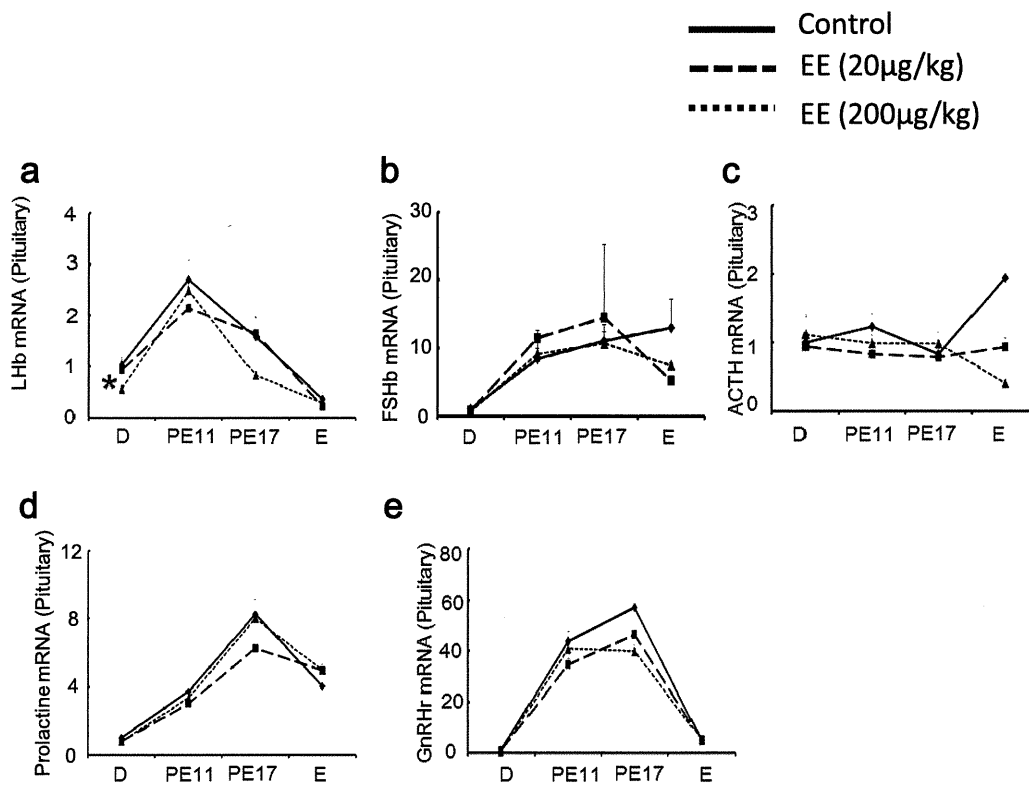


Figure.6 Changes in *LHb* (a), *FSHb* (b), *ACTH* (c), *proractin* (d) and *GnRHr* (e) mRNA expression in pituitary. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg and 200 µg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean  $\pm$ SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

Primer	Sequence 5' to 3'
kiss1 Forware	TCTCCTCTGTGGCC
kiss1 Reverse	AGGCTTGCTCTCTGCA
LH b Forward	CAAAGCCAGGTCAGGGATA
LH b Reverse	GCTGGCAGTACTCGAACCAT
FSH b Forward	CTCATCTTTCCCTCCATCCA
FSH b Reverse	GGACTCATGCATCCCTTTGT
Prolactin Forward	AGTCTGTTCTGGTGGCGACT
Prolactin Reverse	GAAGTGGGGCAGTCATTGAT
ACTH Forward	GAAGGTGTACCCCAATGTCG
ACTH Reverse	CTTCTCGGAGGTCATGAAGC
Estrogen-receptor $\alpha$ Forward	CATCGATAAGAACCGGAGGA
Estrogen-receptor $\alpha$ Reverse	AAGGTTGGCAGCTCTCATGT
GPR54 Forward	CGCTGGTACGTGACTG
GPR54 Reverse	AGGTATAGGGCCAGCA
GnRH-receptor Forward	CAGCCCTTAGCTGTCCAAAG
GnRH-receptor Reverse	GGCAGCTGAAGGTGAAAAAG
ACTH-receptor Forward	CCTTCTTAACCGCAAGCAAG
ACTH-receptor Reverse	GGACGATCAGGTTCTCCAAA
$\beta$ -Actin Forward	AGCCATGTACGTAGCC
$\beta$ -Actin Reverse	CTCTCAGCTGTGGTGG
GAPDH Forward	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG
GAPDH Reverse	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA

Supplementary Table.1 The real-time PCR primer sequence

Figure.3 Change of vaginal cytology in control animal

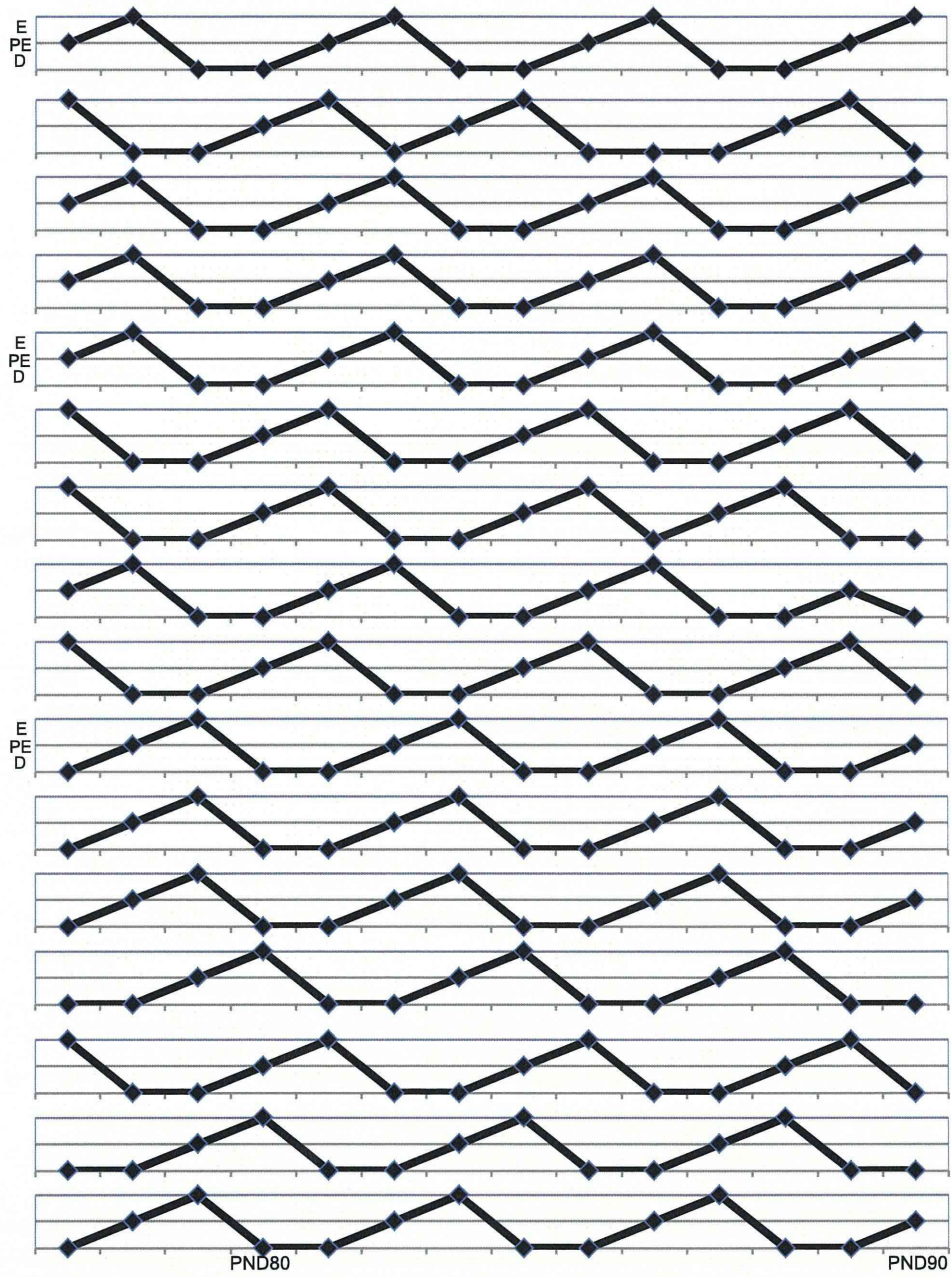




Figure.4 Change of vaginal cytology in EE (20 $\mu$ g/kg)

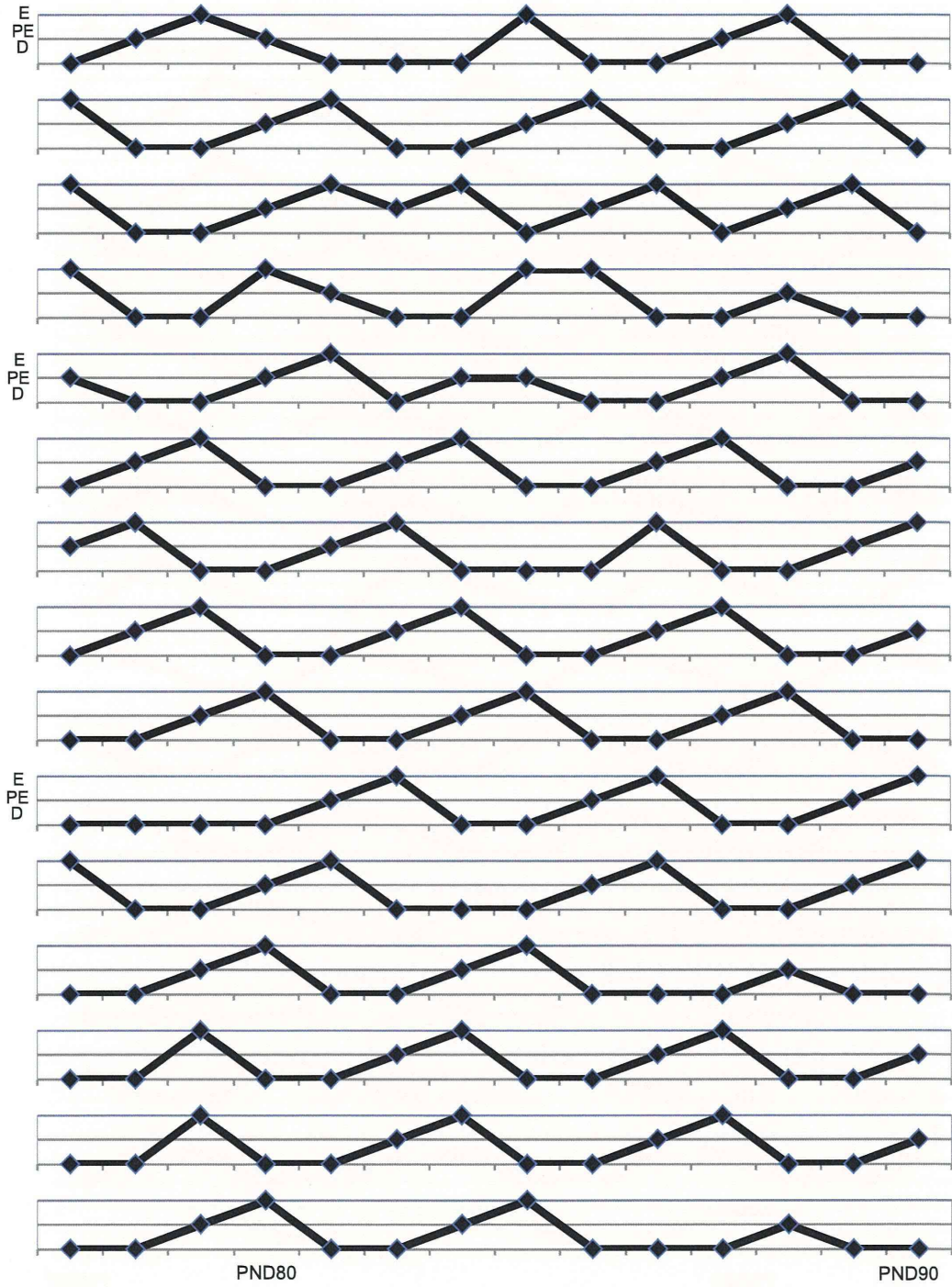
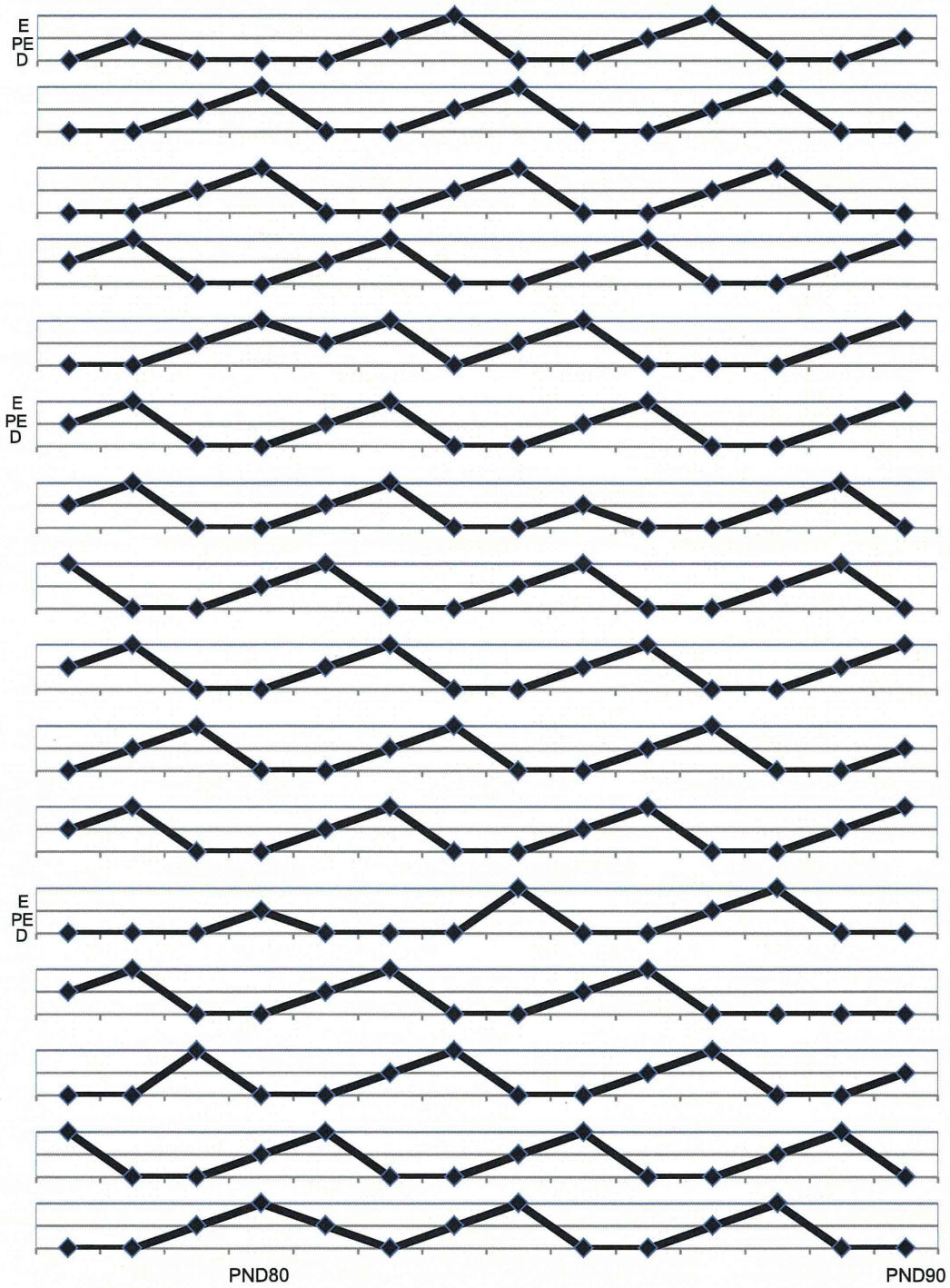


Figure.5 Change of vaginal cytology in EE (200µg/kg)



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

「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変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

研究分担者： 横須賀誠 日本獣医生命科学大学

研究要旨

**【目的】**化学物質の新生児期曝露が脳に及ぼす晩発型（遅発型）リスクとその客観的評価基準の確立を目的に、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの Ethynylestradiol（以下 EE）皮下投与モデルを用いて、性成熟後の脳の性差および行動学的性差に及ぼす影響の評価を行っている。これまで、成熟個体の海馬歯状回における神経細胞や支持細胞の成体細胞新生の頻度に影響は確認出来ないこと、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雌雄差が不鮮明化する、などの新所見を得ることに成功している。今年度は、CB 雌雄差変異に及ぼす神経解剖学的基盤の検討に加え、脳の性分化の臨界期および性成熟期までの雌雄発育への EE 投与の影響、雄マウスが成熟雌マウスに対して示す高周波数帯発声（以下 USV）への影響評価を加えて、出生 24 時間以内の新生仔マウスへの高濃度 EE 単回投与が及ぼす脳の性分化へのリスク評価指標の確立を試みた。さらに、生殖機能制御の中心システムである GnRH の活動コントローラーとされるキスペプチンニューロ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 受容体への遅発型影響の検討も試みた。

**【方法】**生後 24 時間以内の雌雄マウス（C57BL/6J）に 20 $\mu$ g/kg（中濃度）および 2,000 $\mu$ g/kg（高濃度）の EE、対象群として EE の溶媒として使用したゴマ油を投与し、一般飼育環境下（室温 22 $^{\circ}$ C から 25 $^{\circ}$ C、湿度 40% から 60%）で飼育管理した。性成熟に達するまで、雌雄の体重の変化、雌については膣開口時期も観察した。生後 8 週齢以上に達した個体は、超音波の記録解析装置によって USV 発声の記録解析を行った。行動学的解析を終了した個体（生後 75-90 日）は、（1）免疫組織化学染色による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とした。内側視束前野（POA）を含む脳切片標本（厚さ 40 $\mu$ m の連続した冠状断切片）に対して Anti-Calbindin D-28k（CB）、GABA-B 受容体への特異的一次抗体を用いた免疫組織化学染色を施して 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 による CB および GABA-B 受容体の視床下

部における発現量を定量して比較するために、成熟マウスを断頭によって安楽死させて、PCR 解析用脳標本の採取を行った。

**【結果】** 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露は発育途上において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、EE 投与において一時的な体重増加の停滞時期があることが明らかとなった。しかし、この体重増加の停滞は離乳期前後には解消され、成熟期における EE 投与の影響は認められなかった。すなわち、生後 24 時間以内マウスへの EE 単回暴露が及ぼす体重変化への影響は授乳期における一過性の現象であることが示された。3) 発情雌認知に対する USV 発声は、雄では対照群では 90%以上の確立で雌への USV 発声が生が認められるのに対し、EE 高濃度 (2,000 $\mu$ g) 群および中濃度群 (20 $\mu$ g) では USV 発声は認められない個体が多数認められた。一方の雌においては、対照群および EE 中濃度群では 10%以下の確率でしか USV 発声は認められないのに対し、EE 高濃度群では 50% の確率で USV 発声は認められた。4) POA における CB 陽性細胞の分布パターンを詳細に観察したところ、EE 投与により認められる雌の CB 陽性細胞数の増加は POA における CB 陽性細胞数の増加を反映したものであり、脳の構造的 (組織的) な雌雄差の発現を誘導した結果では無いことがほぼ明らかとなった。5) 免疫組織化学染色および RT-PCR による GABA-B 受容体タンパク質および遺伝子の発現数への影響については、本報告書作成までに有意な解析を終えることが出来なかった。

**【考察】** 本年度におけるマウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における高濃度 EE の単回暴露によるリスクは次のような評価となった。(1)雌の膣開口時期を早める。(2)雌雄に関係なく授乳期における一時的な発育遅延を誘導する。晩発性のリスク評価として、(3)雄の USV 発声を抑制する一方、雌の USV 発声を促進している。(4)POA における CB 陽性細胞の雌雄差への影響は、脳の形態学的な変化を誘導した結果ではなく、成熟脳における CB を発現する細胞の増減を晩発性に変えた結果であることがほぼ判明した。(5)キスペプチンの動態に関与する GABA-B への影響についての評価は 26 年度に持ち越しである。

EE の新生仔期暴露は、全体的には一時的な発育遅延を及ぼしながらも、生殖器に関してはむしろ発育促進に作用していることが示唆される。このことが、脳の機能的な雌雄差に影響を及ぼし、成熟後の雌雄コミュニケーションにも影響を誘導していることが明らかとなった。脳の生殖機能の発達には発育期の GABA が関与している報告がある。新生仔期の EE が一時的な発育遅延と GABA システムへの影響を介して、脳の性分化やキスペプチンシステムの性差にリスクを及ぼしている可能性を確認する必要がある。

## A. 研究目的

経口避妊薬として現在でも使用されている Ethynylestradiol (以下 EE) の発育期暴

露が及ぼすリスク指標と評価方法を確立することを目的に、生後 24 時間以内の新生仔マウスへの単回 EE 投与 (皮下投与) モデルを用いて、(1)発育期における影響 (2)内側

視束前野に認められるカルビンジン（カルシウム結合蛋白質）陽性細胞分布の性的二型に及ぼす影響、(3)発情雌に出会った際に認められる 100kHz を超える周波数帯の発声（USV 発声）への影響、(4)GABA-B 受容体の脳内発現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暴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させた）にゴマ油（関東科学 N0. 37036-02）に溶かした EE（0.02 $\mu$ g/10 $\mu$ l sesame oil/g BW：最終濃度 20 $\mu$ g/kg、20 $\mu$ g/10 $\mu$ l sesame oil/g BW：最終濃度 2,000 $\mu$ g/kg）を 10 $\mu$ l マイクロシリンジ（HAMILTON）を用いて皮下投与した。対象群として、溶媒に用いたゴマ油 10 $\mu$ l/g BW 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）、雌雄の 20 $\mu$ g/kg 投与群（EE20 群）、雌雄の 2,000 $\mu$ g/kg 投与群（EE2000 群）の計 6 群の間で比較した。

全ての動物は生涯を通じて推奨される一般飼育環境下で飼育した。生後 21 日目に離乳させ、雌雄別の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）より一定の間隔で体重測定した。さらに雌は PD10 から毎日外部生殖器を観察し、全ての雌動物が膣開口する日で確認を続けた。

生後 8 週齢以上に達した動物は、雌雄共に、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。

体重測定と USV 記録の終了後、生後 100 日に至る前までに、(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) GABA-B 受容体遺伝子の発現量を比較する RT-PCR 解析用に、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、凍結マイクロトーム（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<sub>B</sub> receptor（Rabbit）による免疫組織化学染色（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）

使用動物への EE 投与、体重測定、膣開口確認、行動観察時の移動に関しては、最低限の保定時間になるように心がけた。また、灌流固定を施す際には、ソムノペンチール（50mg/kg BW）の腹腔内投与による深麻酔を施し痛覚が無くなったことを確認した後に行った。また、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 投与による成長への影響

体重を指標とした出生当日 EE 投与による発育への影響として授乳期間の中期における一時的な発育遅延が認められた（図 1 の B）。その影響は EE2000 群が EE20 群よりも大きいことが観察された。しかし、いずれの濃度群においても EE 投与による発育遅延は離乳期までに解消され、その後の成長には影響しなかった（図 2 の A）。

### 2) 雌の膺開口への影響

出生当日 EE 投与は、投与濃度に関わらず、膺開口の時期を早める効果が認められた。特に EE2000 群では顕著に認められ、離乳時にはすでに約 50%の雌が膺開口に達していた（図 2）。

### 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

通常マウス雄の POA において Calbindin D-28k (CB) 細胞の大きな塊が観察されるが（図 4 の上段）、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（図 4 の下段）。新生仔期 EE 投与によって、雄 POA における CB 陽性細胞の分布が縮小し（図 5 の上段）、雌では逆に CB 陽性細胞の分布が増加すること（図 5 の下段）を確認してきたが、今回、この CB の雌雄差の組織学的基盤を観察したところ、雄における CB の減少と雌における CB の増加は、脳の組織学的性差の変化ではなく（図 6, 7, 8, 9）、POA における CB 細胞数の反映であることが示唆

された（図 10）。

### 5) 脳内 GABA-B 受容体の発現に対する影響

免疫組織化学染色および RT-PCR による成熟後脳における GABA-B 受容体タンパク質および遺伝子の発現量に関する解析については、意義のある十分な解析結果を得ることが出来なかった。

GABA-B 受容体の免疫陽性反応は、大脳皮質において POA よりも強く認められている。一方、注意深く観察すると、POA においては細胞体レベルでの陽性反応が認められる。次年度、この反応性を指標にして EE 投与による影響を解析できる可能性がある。

## D. 考察

出生当日マウスへの EE の単回暴露は、脳の性差や成熟後の雌雄の雌認知機能に影響を与えることが改めて明らかとなった。合わせて、授乳期における一過性の発育遅延も誘導していることが明らかとなった。いずれの現象も、投与された EE 濃度が高いほど影響が大きく現れていた。これらの結果は、発育期における一時的な化学物質の大量暴露は、作用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へのリスクが高くなることを示している。

今回これに併せて、性成熟後のマウス雄の性行動コミュニケーションの特徴である USV 発声も EE 暴露容量依存性に影響が及ぼすことが明らかとなった。興味ある点として、雄における影響は「雄的パターンの減衰」であるのに対し、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、これまで多くの報告が示唆しているように、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の発育期暴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暴露は、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、成熟後の性的コミュニケーションパターンの成立にも大きな影響を及ぼす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暴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、脳は半日わたってEEの暴露を受けることを明らかとしている。この短時間の脳におけるEE暴露は、性ステロイド感受性の高い脳領域(POA)に生涯にわたる影響を及ぼし、性的コミュニケーションの発現に障害を及ぼすことが示された。本研究の結果は、新生仔期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質の暴露はその濃度が高い場合は、仮に短時間であったとしても、高い確率で脳の性分化と行動に異常を誘導することを示している。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fungfuang W, Nakada T, Nakao N, Terada M, Yokosuka M, Gizurason S, Hau J, Moon C, Saito TR. Serum leptin concentrations, leptin mRNA expression, and food intake du

ring the estrous cycle in rats. *Lab Anim Res*. 2013 Mar;29(1):1-6. doi: 10.5625/lar.2013.29.1.1.

Fungfuang W, Nakao N, Nakada T, Yokosuka M, Saito TR. 2. Early onset of reproductive function in female rats treated with a high-fat diet. *J Vet Med Sci*. 2013 May 2;75(4):523-6.

##### 2. 学会発表

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)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

図1: EE投与が及ぼす体重への影響

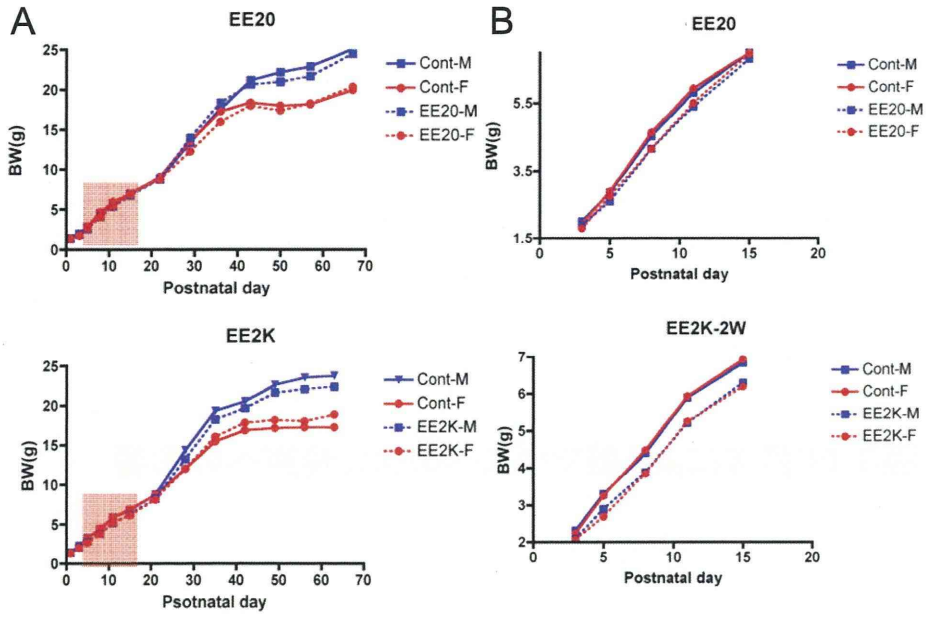


図2: EE投与による膣開口時期

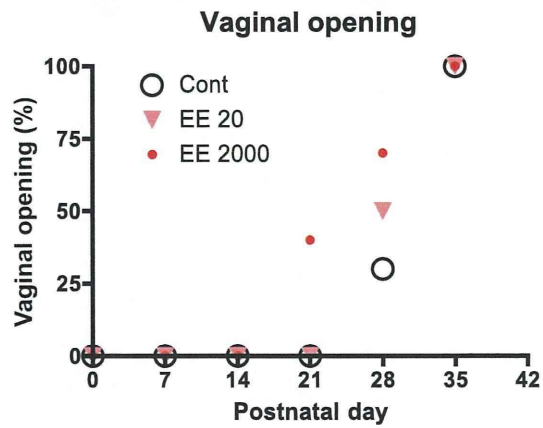




図3:EE投与による雌マウスへのUSV発声への影響

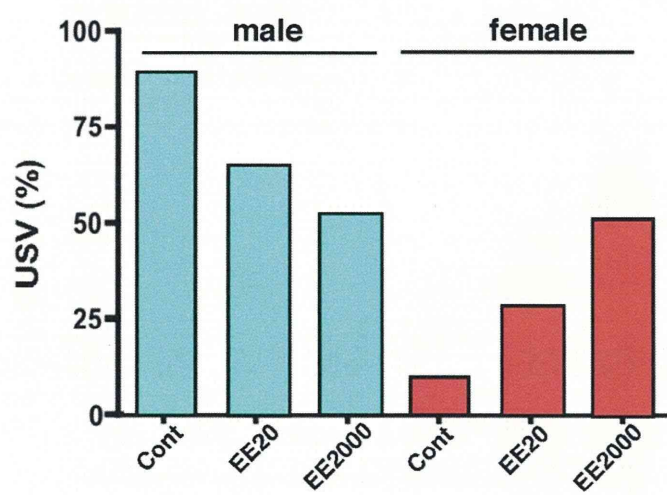


図4: POAのCB陽性細胞の集塊には性差がある

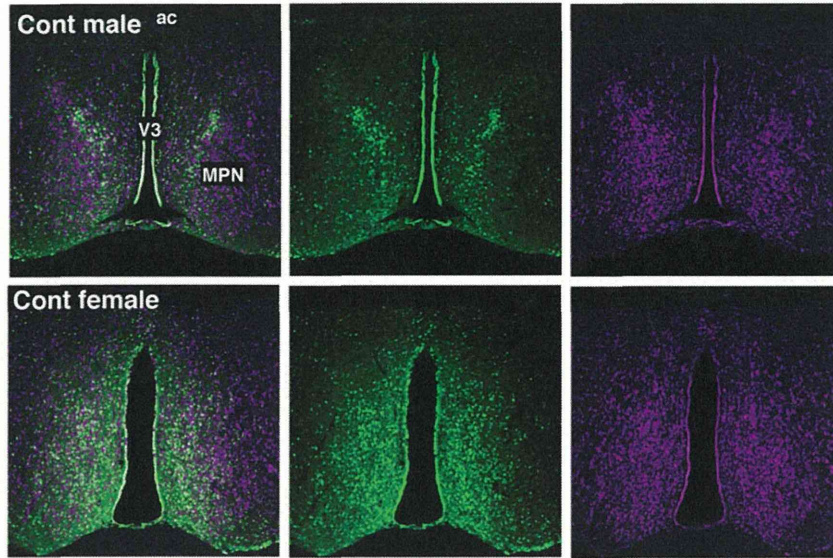


図5: POAのCB陽性細胞の雌雄差はEE投与で変化

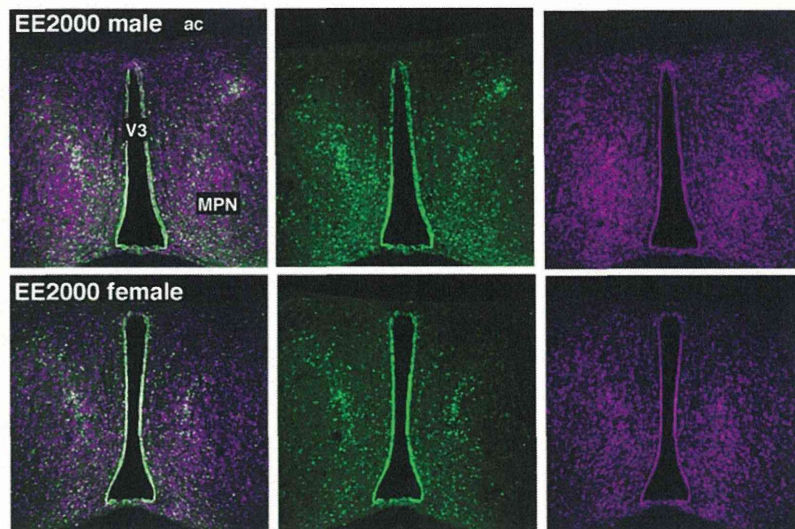


図6:POAにおけるCB陽性群は雌雄で形が異なる

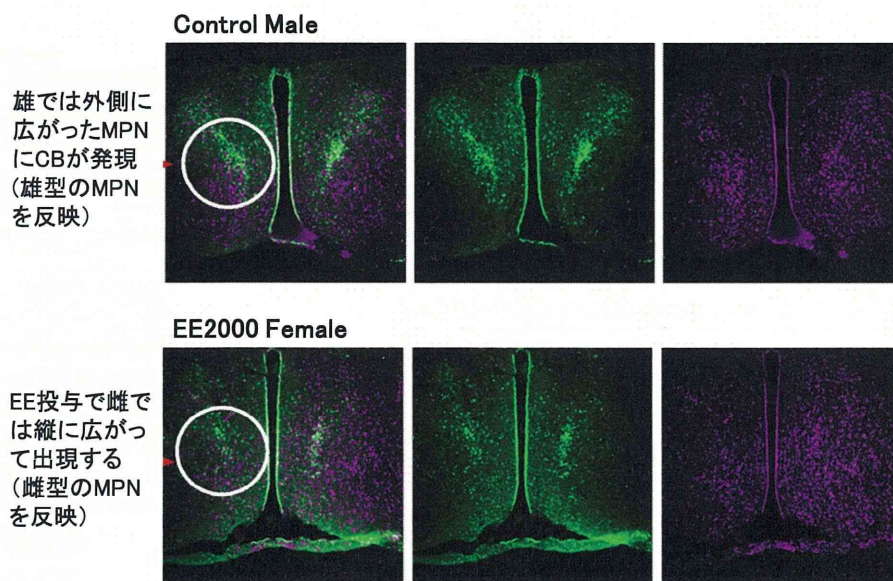


図7: マウスPOAの形態には雌雄差がある

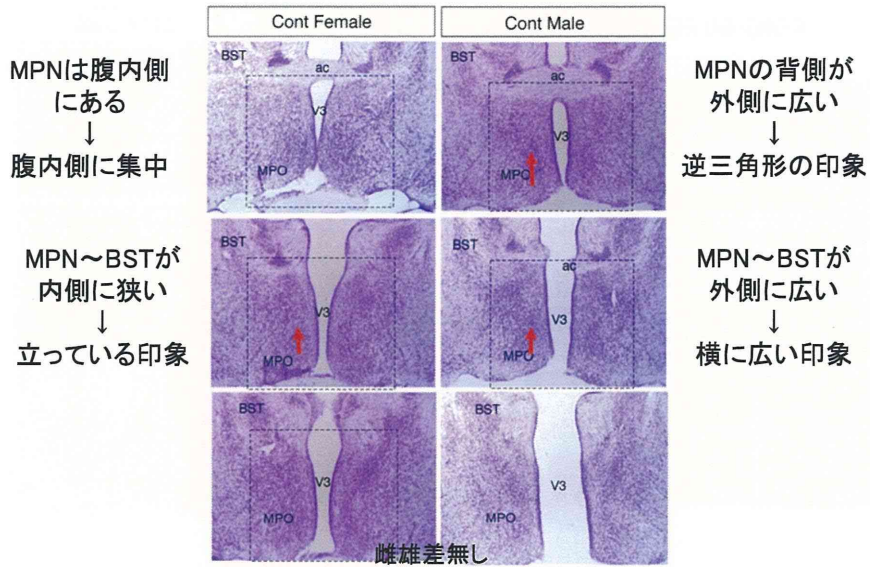


図8: EE作用により雄POAの形態変化は起こらず  
CB発現のみが減少する

