

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
～雌の膣開口、性周期ならびに雌雄の体重変化を中心とした観察と解析～

研究分担者： 氏名 横須賀誠 所属 日本獣医生命科学大学
研究協力者： 氏名 無し 所属 無し

[目的] 出生 24 時間以内の新生仔マウスへの Ethynylestradiol (以下 EE) 投与モデルを用いて、エストロゲン様作用をもつ化学物質の発育期脳への作用が及ぼす遅発型リスクとその評価基準確立を目的に研究を行っている。これまで、成体の海馬歯状回における成体細胞新生の頻度に影響しないこと、内側視束前野 (POA) の Calbindin D-28k (以下 CB) 免疫陽性細胞の分布パターンがもつ雌雄差が不鮮明になることなどの新所見を得てきた。今年度は、投与する EE 濃度をこれまでの 20 µg/kg (中濃度) および 2,000 µg/kg (高濃度) の他に、さらに 0.2 µg/kg (低濃度) 投与群を加えて、低濃度曝露リスクの可能性についても検討した。そして、EE 曝露を受けたマウス個体の体重変化、膣開口、性周期パターンへの影響も合わせて測定して、出生 24 時間以内の EE 単回投与が及ぼす CB の雌雄差に変化を誘導する EE 作用が、発育期や成熟後の生理機能や体重変化とも連動しているのかについて合わせた評価を試みた。さらに、今年度は CB に加えてエストロゲン受容体遺伝子の発現量の評価を RT-PCR によって試みた。

[方法] 生後 24 時間以内の雌雄マウス (C57BL/6J) に 0.2 µg/kg (低濃度)、20 µg/kg (中濃度) および 2,000 µg/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て一般飼育環境下 (室温 22 から 25、湿度 40% から 60%) で飼育した。生涯に渡っての体重変化、膣開口、膣スメア観察による性周期の確認を行った。その後、(1) 免疫組織化学染色による CB 陽性細胞の解析を行うための経心臓法による灌流固定、(2) RT-PCR による CB とエストロゲン受容体の視床下部・視床における遺伝子発現量の比較を試みた。

[結果] 生後 24 時間以内マウスへの EE 単回曝露は発育途上において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る。それは 0.2 µg/kg 群でも認められ濃度依存性に早期化した。2) 雌では生後 2 週目から 3 週目の間で高濃度 EE 投与群で一時的な体重増加の遅延が観察された。しかし、この遅延は離乳日までには解消された。成熟期における EE 投与の影響は認められなかった。3) 雌では 5 週齢以降、EE 単回曝露群における体重増加傾向が示された。4) 雌では、対照群では認められない性周期の乱れが 8 週齢ですでに認められた。5) エストロゲン受容体遺伝子発現量は現在解析中である。

[考察] マウス新生仔期 (脳の性分化の臨界期) における EE の単回曝露による影響として、(1) 雌の膣開口時期の早期化、(2) 授乳期の雌に一時的な発育遅延を誘導、(3) 8 週目には対照群には認められない性周期の異常が誘導される、などであった。昨年度までに得られた EE 投与がもたらす影響、すなわち、POA における CB 陽性細胞の雌雄差の誘導は、形態学的変化の他に雌発育や性周期にも影響を及ぼしていることが判明した。

EE の新生仔期曝露は雌に大きな影響を及ぼす。雌では、授乳期に一時的な発育遅延を及ぼし、引き続いて膣の早期開口、性周期の早期異常を誘発する。これは、脳の機能的な雌雄差とも関連しており、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ものと予想される。脳の生

殖機能は発育期の GABA 系の発達に加え、エストロゲン受容体とも関連することが知られている。新生仔期の EE 曝露は、早期には一過性の発育遅延を及ぼし、その後も視床下部の CB システムの変更などを通じて、生涯に渡って生殖機能の機能的な乱れを誘導することが示された。

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) の発育期曝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、発育期ならびに性成熟後における影響を検討した。

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させた) にゴマ油 (関東科学 N0.37036-02) に溶かした EE (0.2 μ g/kg, 20 μ g/kg, 2,000 μ g/kg) を 1 μ l のマイクロシリンジ (HAMILTON) を用いて皮下投与した。対象群には溶媒に用いたゴマ油 0.5 μ l (1 匹あたり) 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 0.2 μ g/kg 投与群 (EE 0.2 群) 雌雄の 20 μ g/kg 投与群 (EE 20 群) 雌雄の 2,000 μ g/kg 投与群 (EE 2000 群) の計 8 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、(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 およびエストロゲン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に脳を採取した。

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, 3rd 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 μ 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) 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)

動物への EE 投与、体重測定、膣開口確認、行動観察時の移動は、最低限の保定になるように心がけた。灌流固定を施す際には、ソムノペンチール (50 mg/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。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、雌において、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 雌を参照)。その影響は EE2000 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 (図 2)。一方、生後 5 週目までは雌雄とも体重の増加パターンの群間による

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 の方がより軽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ミア像による性周期への影響を観察した。その結果、対照群雄では生後 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)。

4) 視床・視床下部における Calbindin D-28k (CB)およびエストロゲン受容体遺伝子発現量に対する影響

RT-PCR による成熟後脳の CB およびエストロゲン受容体遺伝子の発現量の比較は、2015 年 11 月現在計測中で、本報告書の提出期限内に結果を得ることが出来なかった。

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。

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仮に単回であったとしても、そしてそれが低濃度であっても、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、さらには、雌の生殖機能に大きな影響を及ぼすことを示唆している。

E. 結論

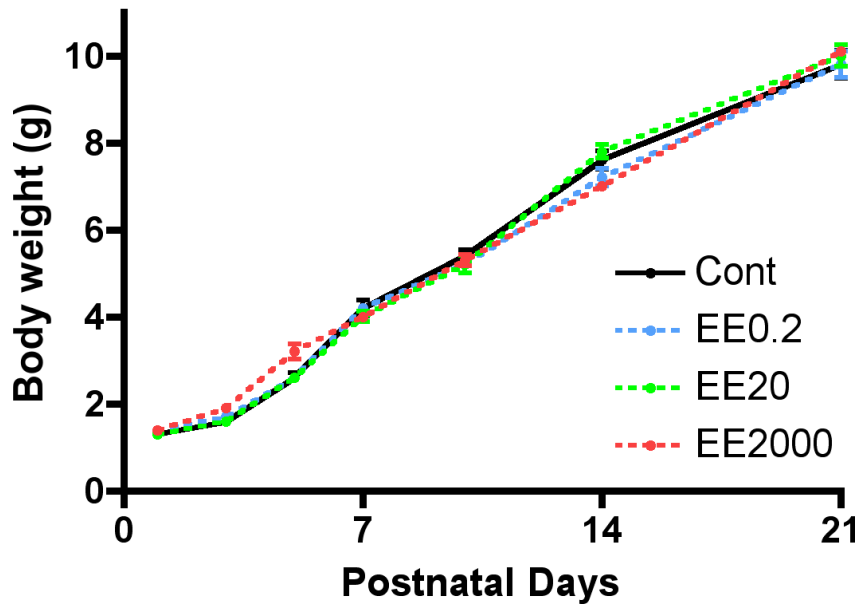
これまで我々は、新生仔期マウスへの EE 曝露は極めて短い時間で脳内への移動と濃度上昇を起こし、脳は短時間の EE 曝露を受けることを明らかとしてきた。この短時間の脳への EE 作用は、性ステロイド感受性の高い脳領域である内側視束前野に CB 神経細胞の分布を生涯に渡って異常を及ぼすことを示してきた。今回さらに、新生仔期におけるエストロゲン作用を持つ化学物質の曝露は、低濃度・短時間であったとしても、特に雌の生殖機能に異常を誘導する高いリスクを持つことを明らかにした。

F. 研究発表

Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha-Ethinylestradiol. Biol Reprod., 93, 32, 2015.

G. 知的財産権の出願・登録状況 該当無し

Male (neonatal)



Female (neonatal)

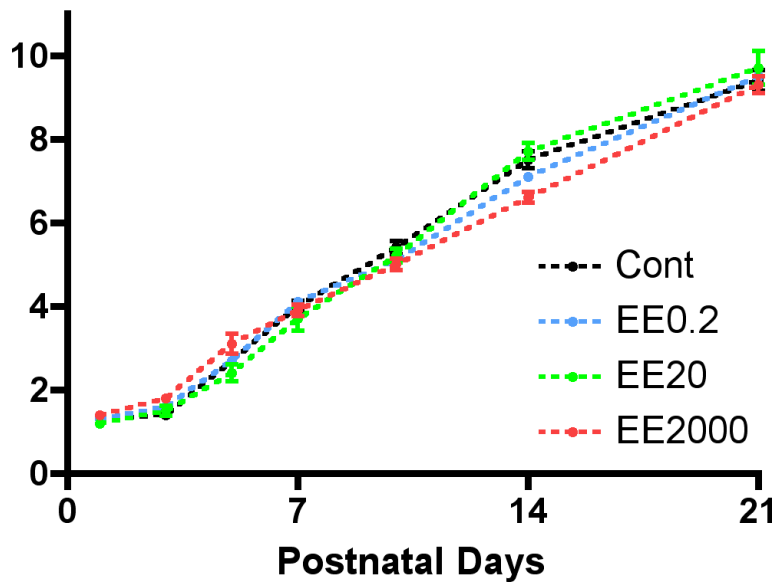


図 1 : 新生仔マウスへのEEによる授乳期の体重変化

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ（対象群：Cont）、Ethinylestradiol (EE) 0.2 μ g/kg (EE0.2)、EE 20 μ g/kg (EE20)、EE 2,000 μ 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。

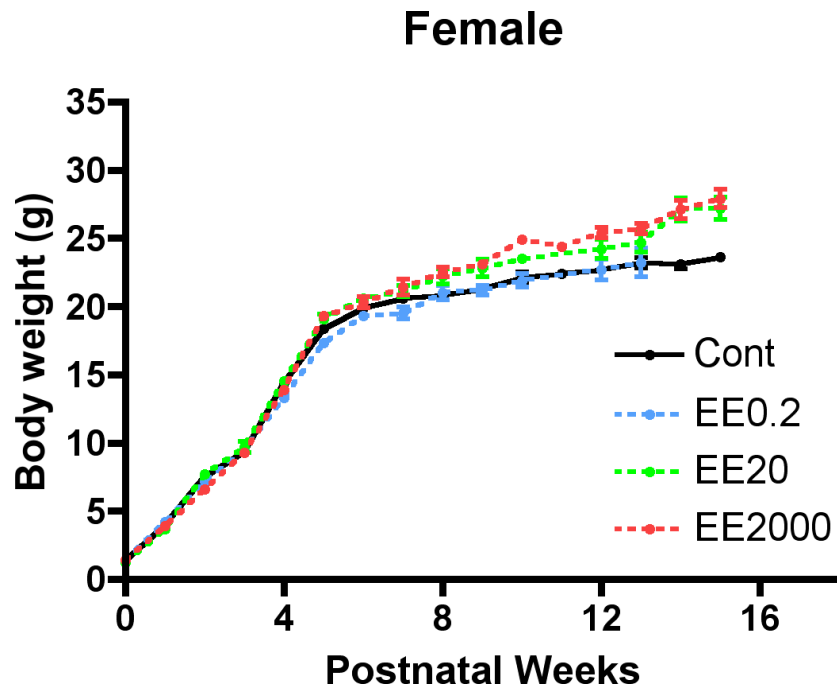
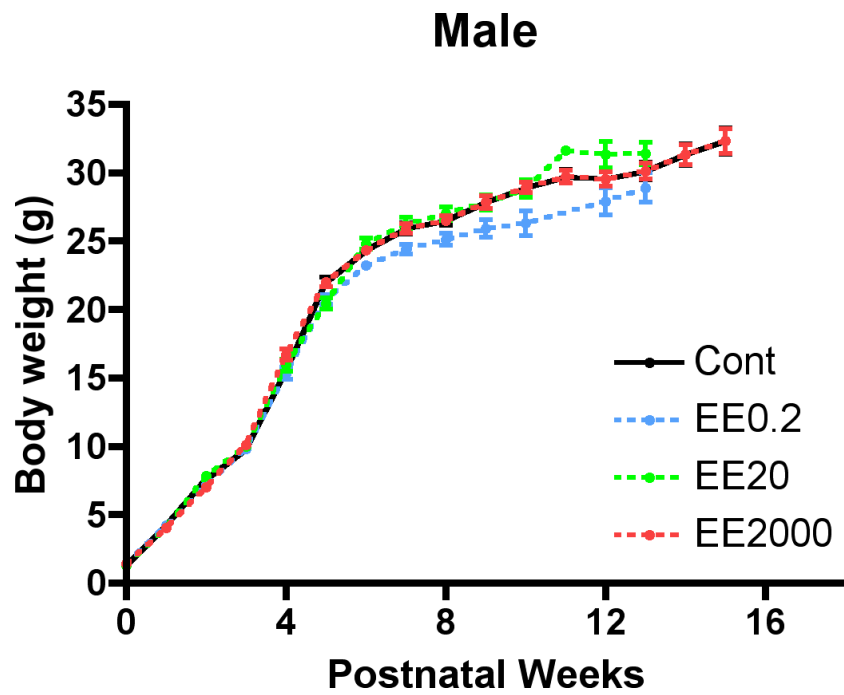
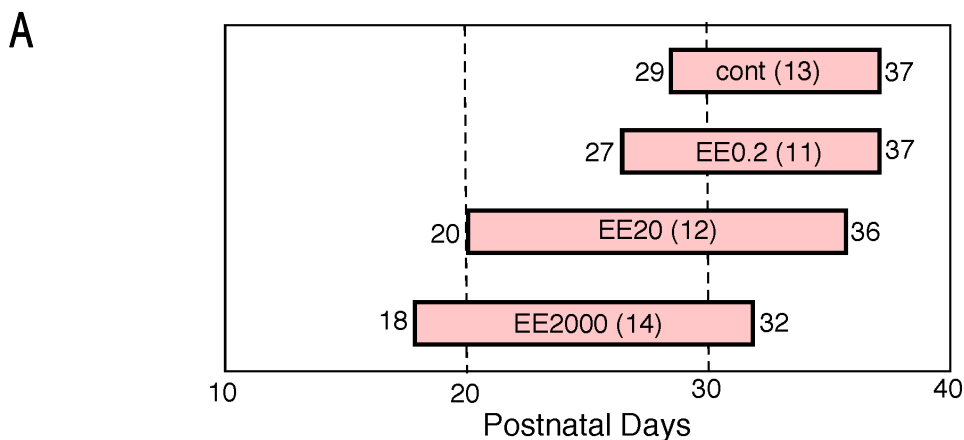


図 2 : EE投与が及ぼす生涯の体重変化への影響

誕生後24時間以内に、ゴマ油のみ（対象群：Cont）、Ethinylestradiol（EE）0.2 μ g/kg（EE0.2）、EE 20 μ g/kg（EE20）、EE 2,000 μ 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 ± 0.8	32.3 ± 1.0	29.6 ± 1.3	25.0 ± 1.3
BW at vaginal opening (g)	19.5 ± 0.5	17.8 ± 0.4	17.0 ± 0.8	12.3 ± 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。

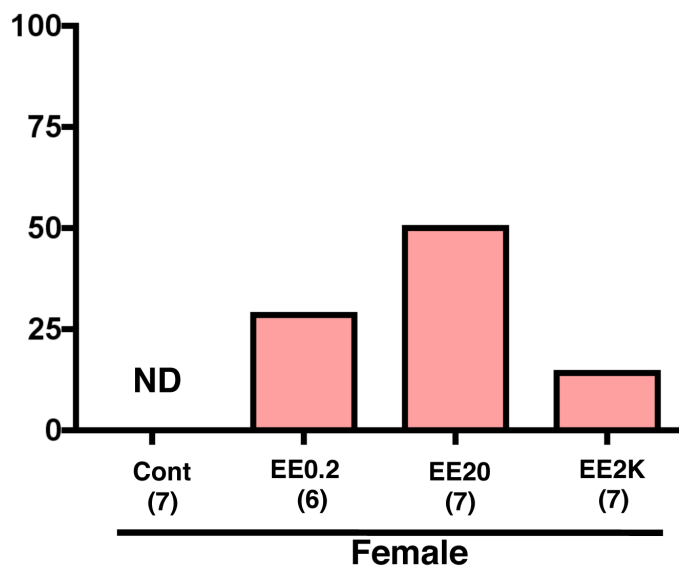


図4：発情雌との接触におけるEE処置雌マウスのUSV発声

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週目以降の膣スミア像（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)0.2 μ g/kg(EE0.2)、EE20 μ g/kg(EE20)、EE2,000 μ g/kg(EE2000)を投与した生後8週、10週、14週の雌の膣スミ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。

