

雌ラットにおける除草剤 atrazine の
生殖機能に対する影響に関する研究

2020 年 1 月

木 村 真 弥

雌ラットにおける除草剤 atrazine の
生殖機能に対する影響に関する研究

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
持続環境学専攻
博士（環境学）学位論文

木 村 真 弥

目次

1	序論 研究の背景.....	1
1.1	はじめに.....	1
1.2	Atrazine の除草剤活性.....	1
1.3	Atrazine による毒性発現.....	2
1.3.1	Atrazine による生殖機能低下に関する研究.....	2
1.3.2	Atrazine の曝露とヒト女性の生殖機能に関する研究.....	2
1.4	雌ラットの生殖機能.....	3
1.5	雌ラットの atrazine による生殖機能に対する影響.....	4
1.6	Kisspeptin.....	5
1.7	本研究の目的.....	6
2	実験の部.....	11
2.1	実験動物.....	11
2.2	試薬類.....	11
2.3	被験物質の調製.....	11
2.4	膣スメアの採取および性周期判定.....	12
2.5	群分け.....	13
2.6	OVX+E2 モデル動物の作製.....	13
2.6.1	OVX.....	13
2.6.2	E2 充填シリコンチューブの作成および雌ラット背部皮下への移植.....	13
2.7	一般状態観察、摂餌量および体重測定.....	14
2.8	Atrazine 投与.....	14
2.9	Kp-54 投与.....	14
2.10	血漿サンプル採取.....	14
2.11	脳サンプル採取.....	15
2.11.1	視床下部の採取.....	15
2.11.2	視床下部 AVPV および ARC 領域の採取.....	15

2.12	剖検.....	15
2.13	排卵数の測定.....	16
2.14	視床下部中 GnRH 含有量の測定.....	16
2.15	RIA 法による血漿中 LH、E2 および P4 濃度測定.....	16
2.16	視床下部 AVPV および ARC 中の <i>Kiss1</i> mRNA 量の定量.....	16
2.16.1	Total RNA 抽出および cDNA 合成.....	16
2.16.2	Realtime-PCR 法による mRNA 量の定量.....	17
2.17	統計処理.....	17
3	第 1 章 雌ラットの atrazine による性周期に対する影響.....	19
3.1	目的.....	19
3.2	無処置ラットにおける atrazine 反復投与の結果.....	19
3.2.1	生死および一般状態.....	19
3.2.2	体重.....	19
3.2.3	摂餌量.....	19
3.2.4	性周期変化.....	20
3.2.5	生殖関連ホルモンの分泌変化.....	20
3.2.6	GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する影響.....	20
3.2.7	各種臓器に対する影響.....	21
3.2.8	排卵に対する影響.....	21
3.3	考察.....	21
4	第 2 章 雌ラットの atrazine による GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に対する影響.....	34
4.1	目的.....	34
4.2	OVX+E2 モデルラットにおける atrazine の 5 日間反復投与の結果.....	34
4.2.1	一般状態、体重および LH サージに対する影響.....	34
4.2.2	GnRH 含有量に対する影響.....	34
4.2.3	GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性への影響.....	34

4.2.4	<i>Kiss1</i> 遺伝子発現に対する影響.....	35
4.3	考察.....	35
5	総合考察.....	47
	引用文献.....	50
	謝辞.....	55

参考論文

図の目次

図 1. Atrazine の構造式.....	8
図 2. 視床下部－下垂体－性腺軸の概要.....	9
図 3. 視床下部－下垂体－性腺軸の詳細.....	10
図 4. 第 1 章における実験概要.....	24
図 5. 無処置雌ラットの atrazine 投与による体重に対する影響.....	25
図 6. 無処置ラットの atrazine 投与による摂餌量に対する影響.....	26
図 7. 第 1 章考察の概要.....	27
図 8. 第 2 章における実験概要.....	40
図 9. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による体重および LH サージに対する影響.....	41
図 10. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による視床下部 GnRH 含量に対する影響.....	42
図 11. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による GnRH 神経細胞の Kp-54 に対する反応性への影響.....	43
図 12. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による視床下部 AVPV 及び ARC の <i>Kiss1</i> mRNA 発現に対する影響.....	44
図 13. 第 2 章考察の概要.....	45

表の目次

表 1. 無処置雌ラットの atrazine 投与による一般状態に対する影響.....	28
表 2. 無処置雌ラットの atrazine 投与による性周期に対する影響.....	29
表 3. 無処置雌ラットの atrazine 投与による卵巣ホルモンに対する影響	30
表 4. 無処置雌ラットの atrazine 投与による GnRH 神経細胞の Kp-54 に対する反応性 に対する影響	31
表 5. 無処置雌ラットの atrazine 投与による各種臓器に対する影響.....	32
表 6. 無処置雌ラットの atrazine 投与による排卵に対する影響.....	33
表 7. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による一般状態に対する影響.....	46

略語

ARC	arcuate nucleus
AUC	area under the curve
AVPV	anteroventral periventricular nucleus
DACT	diaminochlorotriazine
DW	distilled water
E2	17 β -estradiol
EB	estradiol benzoate
eCG	equine chorionic gonadotropin
eGFP	enhanced green fluorescent protein
ER α	Estrogen receptor α
FSH	follicle stimulating hormone
GnRH	gonadotropin releasing hormone
Kp-54	kisspeptin-54
LH	luteinizing hormone
MC	methylcellulose
ME	median eminence
NOAEL	no observable adverse effect level
OVX	ovariectomy
P4	progesterone
POA	preoptic area
RIA	radioimmuno assay

1 序論 研究の背景

1.1 はじめに

古来、人々は疾患を治す手段として、植物や鉱物等からそれぞれの疾患に効能があるものを探索していた。やがて、化学物質を合成する技術が生まれ今日では、多くの医薬品が製造・販売され、それぞれの疾患や症状に応じて各国の規定に則り処方されるようになった。それと同時に、本来環境中に存在する以上の化学物質が製造過程における非意図的な排出やヒトからの排泄により環境中に混在することも分析技術の向上に伴い判明してきた。現在判明している環境中、たとえば河川中に含まれる医薬品の濃度は、罹患者が摂取する濃度と比較してごく微量であることといわれており、ヒトの健康被害との因果関係を直接的に証明した報告は見当たらない。しかしながら、近年医薬品のモダリティがこれまでの主力であったいわゆる低分子化合物薬やペプチド薬だけでなく、抗体医薬や核酸医薬、遺伝子治療と多様な新薬が創出される中で、環境中における医薬品のリスク評価は、エネルギー資源や飲料、地球温暖化に対する意識の高まりと同様に、次世代の環境保全のために重要であると考えられる。こうした環境毒性に関する研究は、農薬で多く研究されている。本研究では、世界中で汎用され、環境中に広く分布していると考えられる除草剤 atrazine をモデルとして、医薬品の非臨床安全性研究で汎用されている雌ラットを使用して、次世代すなわち子孫を受け継ぐために必須である生殖機能の一つである排卵を中心とした生殖機能に対する影響を明らかにし、ヒト女性における生殖機能の影響の可能性について検討した。

1.2 Atrazine の除草剤活性

1950年頃からEUを除く世界各国で汎用されている atrazine は、simazine や prometryn 等と同様に s-トリアジン環を持つトリアジン系の非ホルモン型除草剤である (図 1)。一年生雑草の発芽前後に土壤に散布し、雑草選択的に光合成電子伝達系を阻害することによって枯殺する (Moreland et al., 1959)。その一方で、栽培目的であるとうもろこしは、グルタチオン抱合によって解毒される為、atrazine 曝露による影響はないといわれている (Shimabukuro et al., 1970)。土壤に散布された atrazine は、その後微生物によって分解される (Kaufman and Blake, 1970)。日本の土壤では、Korpraditskul らによってグラム陰性非発酵性菌である RK014 株が atrazine 分解細菌として単離されており、atrazine の初期密度や pH 条件によって分解速度が異なることが報告されている (Korpraditskul et al., 1993; 小林裕子, 2000)。

1.3 Atrazine による毒性発現

1.3.1 Atrazine による生殖機能低下に関する研究

現在までに、ヒトあるいは環境中の生物に対する atrazine 曝露による直接的な生殖機能低下に対する因果関係を証明した報告はない。しかしながら、2000 年頃から atrazine による生殖機能低下の議論が世間でも注目され始めた。例えば、Hayes らは幼生生育期のカエルを 0.01-200 ppb の atrazine に曝露させた結果、0.1 ppb 以上の atrazine 曝露により雌雄同体がみられ、成熟した雄カエルの血漿中 testosterone 濃度の低値が認められたことを報告している(Hayes et al., 2002)。Hayes らは、米国中西部の農業地域の降雨中の atrazine レベルは 40 ppb に達することから、atrazine 曝露による影響が認められた用量を生態学的低濃度領域と判断し、環境中の atrazine がカエルの生殖機能を低下させる可能性があると考えしている(Hayes et al., 2002)。その後、2004 年に EU においては、水道水中に規定値である 0.1 ppm 以上の atrazine が含まれているとして除草剤としての使用を禁止した(Official-journal-of-the-European-union, 2004; Sass and Colangelo, 2006)。

1.3.2 Atrazine の曝露とヒト女性の生殖機能に関する研究

前述の通り、ヒトの atrazine 曝露による直接的な健康被害との因果関係を証明した報告は見当たらない。2015 年の日本産業衛生学会の許容濃度等に関する委員会資料によると、ヒトでの中毒事例や吸入毒性、皮膚刺激性等の安全性が懸念される報告はないとされている(日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会, 2015)。ヒトおよびげっ歯類における研究では、atrazine は体内においてグルタチオンもしくは酸化系によって、メルカプツル代謝物もしくは脱アルキル化代謝物に変換されると報告されている(Abel et al., 2004)。Atrazine が多く使用される地域においては、土壌から河川に混入した atrazine が水道水中に含まれる場合がある。このような地域において、妊娠あるいは胎児に関する疫学調査が複数行われている。しかしながら、いずれも atrazine による有意なリスク上昇はみとめられない、あるいは atrazine 単独のリスクとは言い切れないと結論づけられている(Munger et al., 1997; Villanueva et al., 2005)。妊娠の最初の引き金となる、月経周期あるいはホルモン分泌に関連した疫学調査も報告されている。Cragin らは、atrazine を比較的多く使用する米国イリノイ州と使用が少ないバーモント州の 18-40 歳の農業に従事する女性を対象に、月経周期 (n = 67)と尿中の黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH)、エストラジオール (17 β -estradiol: E2)およびプロゲステロン (progesterone: P4)の代謝物の測定 (n = 35)を実施した。その結果、atrazine を多く使用するイリノイ州に住む女性は、使用の少ないバーモント州と比較して月経周期の延長がみられたが、尿中のホルモン分泌に関しては有意な差が認められなかった。

複数の雌ラットの研究から、atrazine 曝露による血漿中 LH、E2 および P4 濃度の異常を報告しているが、Cragin らはこれらの違いを動物実験に用いられる atrazine の用量と水道水中の atrazine 濃度の違い、あるいは種差による違いと考察している(Cragin et al., 2011)。

1.4 雌ラットの生殖機能

ラットを含む殆どのは乳類における卵巣からの排卵は一定の周期性を持ち、その間隔は種によって大きく異なる。例えば、ヒトは平均 28 日周期、ラットは 4—5 日周期で排卵が生じる。排卵の為には、卵巣内の卵母細胞を覆う卵胞が胞状卵胞へ成熟し、下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンである LH の一過性のピークを伴う大量の末梢血液中への分泌 (LH サージ)を必須とするが、LH サージの惹起に重要な役割を担うのもまた、排卵する卵胞自身である。卵胞が胞状卵胞へ発育するためには LH だけではなく、同様に下垂体前葉から分泌される卵胞刺激ホルモン (follicle stimulating hormone: FSH)も重要な役割を担う。卵胞発育初期には、顆粒膜細胞上に FSH 受容体の発現の上昇が重要であり、莖膜細胞から拡散された androgen を利用して E2 の合成が開始される。卵胞発育の後半には、FSH と estrogen の作用によって、卵胞発育初期には莖膜細胞のみ発現していた LH 受容体が、顆粒膜細胞において急激な発現の上昇がみられるようになる。発現した LH 受容体による卵胞は LH のパルス状の分泌下で更に成熟して、それに伴い E2 の分泌が上昇する。血中の E2 濃度が一定量を超えると、脳への E2 ポジティブフィードバックを介して LH サージを惹起すると考えられている。LH サージを受容した顆粒膜細胞では、黄体細胞への分化が一気に加速し、排卵後には胞状卵胞は黄体を形成し、顆粒膜細胞のステロイド分泌は E2 から P4 に移行する (LaPolt et al., 1990; Nakamura et al., 1991)。

以上のように、ラットにおいて卵胞発育から黄体形成の動向は、性腺刺激ホルモンあるいは steroid の周期的な血液中濃度の変動でモニターすることが可能である。また、腔粘膜上皮においては estrogen receptor α (ER α)が発現しており、estrogen 依存的に腔内膜上皮の形態が変動することが知られており、上皮細胞診いわゆる腔スメア観察により性周期の状態を観察することが可能である (Mowa and Iwanaga, 2000)。Estrogen の分泌増加に伴い、腔内膜上皮細胞は脱核・角化し、腔粘膜上皮への白血球遊走を抑制することが知られており、腔スメアは以下のように分類することができる。すなわち、1) 主に核が明瞭な有核細胞が大半を占める発情前期 (Proestrus)、2) 角化細胞が散在又は集塊状にみられる発情期 (Estrus)、3) 有核細胞とそのまわりに多数の白血球がみられる発情後期 (Metestrus)および 4) 白血球と粘液が認められる発情休止期 (Diestrus) である。性成熟した正常の雌動物では、この 4 つの周期が規則的に観察される。

前述のとおり、卵胞の成熟および排卵には下垂体前葉から分泌される性腺刺激ホルモンによって制御されており、下垂体からのホルモン分泌制御はさらに上位の視床下部からの作用によって制御されている。このような神経内分泌の概念の提唱は 1930-1940 年代にさかのぼる。その当時、Marshall らは交尾排卵動物である雌ウサギの脳に電気刺激を与えると、交尾刺激非存在下であっても排卵することを見出し(Marshall and Verney, 1936)、その門下の Harris は、雌ウサギの視床下部の局所電気刺激によっても排卵が誘発されることを突き止めた(Harris, 1948)。その後、同様に Critchlow が自然排卵動物であるラットでも、中枢神経系抑制作用を持つペントバルビタールを投与し排卵が抑制された条件下において、視床下部から下垂体に電気刺激することで排卵を確認した(Critchlow, 1958)。一方、下垂体を除去したラットでは電気刺激を与えても排卵しないことから、視床下部を介した作用が排卵には必須であることが証明された。さらに Harris らは、Pola や Green らとの共同研究によって、下垂体と視床下部と繋ぐ血管構造すなわち下垂体門脈を解剖学的に発見した (Charlton, 2008)。この下垂体門脈に各種ホルモンが放出され、視床下部から下垂体へ作用する。

性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) は、Shally や Guillemin らより発見された 10 アミノ酸から成るペプチドであり、これが LH や FSH の性腺刺激ホルモンを制御する因子であることを解明し、両者は 1977 年にノーベル医学生理学賞を受賞した。GnRH は、卵巣からのフィードバックを受けて GnRH 神経細胞が活性化し、下垂体門脈中に GnRH が放出され下垂体を刺激する。LH の分泌様式は、GnRH の分泌様式、すなわち GnRH パルスおよび GnRH サージによって制御されている。このように、ラットを含む哺乳類の性腺機能は GnRH を放出する視床下部と、GnRH 刺激により LH などのゴナドトロピンを放出する下垂体、およびゴナドトロピンの刺激を受け取る性腺 (卵巣や精巣)が密接に連携することで制御されており、視床下部－下垂体－性腺軸 (HPG 軸)と呼ばれている (図 2)。排卵の為には、下垂体門脈中に GnRH が大量に視床下部から放出され (GnRH サージ)、その GnRH 刺激により下垂体から LH が末梢血中にサージ状に放出されることが必須である。この LH サージは、卵巣からの E2 分泌による視床下部へのポジティブフィードバックによって制御されている(Strauss and Barbieri, 2013)。

1.5 雌ラットの atrazine による生殖機能に対する影響

雌ラットの atrazine 曝露による生殖機能に対する影響に関しては、複数の研究がなされている。Cooper らは、まず、雌ラットに 21 日間 75、150 および 300 mg/kg の atrazine を反復経口投与して性周期を観察した結果、75 mg/kg では異常性周期、150 および 300 mg/kg では性周期の延長が誘発されることを確認した。300 mg/kg 群では、21 日間投

与後には発達した黄体がみられ、さらには血漿中 P4 濃度の高値がみられたことから、卵胞発育阻害作用が示唆されている (Cooper et al., 1996)。さらに彼らは、50-300 mg/kg の atrazine を単回あるいは 3 日間投与すると LH サージが減弱することを確認し、その機作解明研究の結果、1) 下垂体中の LH 濃度は atrazine 投与によって低下していない、2) 卵巣摘出術 (ovariectomy: OVX) + estradiol benzoate (EB) 持続投与ラットに 50 ng/kg の GnRH を単回投与すると血漿中 LH 分泌が惹起されたことを報告している (Cooper et al., 2000)。Foradori らも同様に、OVX 雌ラットに atrazine を 4 日間投与した後に GnRH receptor agonist を投与すると、LH 放出が正常であったことから、atrazine 投与によって下垂体機能に影響はないと示唆している (Foradori et al., 2009b)。このことは、下垂体の GnRH に対する下垂体の反応性には影響を及ぼさず、atrazine の反復投与による下垂体-卵巣機能の低下は、視床下部を介した影響である可能性を示唆している。Atrazine による視床下部に対する影響に関する研究では、EB と P4 を投与した OVX 処置ラットに atrazine を 4 日間投与し、視床下部における enhanced green fluorescent protein (eGFP) で標識した GnRH 神経細胞および神経活性化マーカーである cFOS タンパクを染色すると、cFOS を発現する GnRH 神経細胞数の減少がみられたことから、atrazine 投与による GnRH 神経細胞の活性の低下が示唆されている (Foradori et al., 2009a)。LH サージ減弱に対する atrazine の代謝物の関与に関する報告もあり、McMullin らは、atrazine の主な代謝物である diaminochlorotriazine (DACT) を EB と P4 を投与した OVX 処置ラットに 5 日間投与すると [投与量: 77 mg/kg (300 mg/kg の atrazine を投与した場合の代謝される DACT 量相当)] LH サージが減弱することから、atrazine 代謝物においても LH サージ減弱に関与していることを示唆している (T. S. McMullin et al., 2004)。このように、atrazine 曝露による LH サージ減弱の機作に関する報告は複数存在するが、解明には至っていない。

1.6 Kisspeptin

1.4 項で述べた通り、GnRH パルスおよびサージ状分泌は estrogen のフィードバックによって制御されている。しかしながら、その詳細な機構は GnRH が発見されて以降長年の謎であった。GnRH 神経細胞には雌性動物のステロイド作用の受け手となる ER α が発現しないことが知られており、GnRH 神経自身はステロイドによって直接制御されないことが主な理由といえよう。そのため、ER α 等のステロイドホルモン受容体を発現し且つ GnRH 分泌を直接制御する神経細胞の存在が強く示唆されていた。この長年の疑問に対する答えとなる神経細胞が明らかになりつつある。それが kisspeptin 神経細胞である。

Kisspeptin は、ヒトでは *KISS-1* 遺伝子にコードされる 54 アミノ酸から成るペプチド

であり、1999年に武田薬品の大瀧らによって、Gタンパク質共役型受容体であるGPR54に対するリガンドとして胎盤抽出液から同定された(Ohtaki et al., 2001)。その当時、kisspeptinは既に転移抑制遺伝子として知られており、GPR54を強制発現させたメラノーマ細胞ではがんの転移抑制が確認されていたことから当時はメタスチン(metastin)とも呼ばれていたが、kisspeptinの生理的機能は不明であった。そのため、松井らは生理機能探索の一つとして、ラットを用いて排卵誘発試験を実施した結果、kisspeptinが古くから強力な排卵誘発剤として知られているequine chorionic gonadotropin (eCG)と同様の排卵誘発機能を有することが判明した(Matsui et al., 2004)。同時に彼らは、kisspeptinは下垂体への直接作用を示さないものの、kisspeptin投与後にGnRH神経細胞の活性化を認めた。このことは、本ペプチドは下垂体や卵巣には排卵に対する直接的な作用を示さず、GnRH神経細胞を介して排卵を誘発する可能性を示唆している。その後、kisspeptinがGnRH神経細胞に直接作用するか否かに迫るために、多くの研究者によってkisspeptinの視床下部における局在や生理機能に対する研究が行われた。マウスの遺伝子発現解析あるいは免疫組織学的研究においては、1) 前側脳室周囲核 (anteroventral perivascular nucleus: AVPV)および弓状核 (arcuate nucleus: ARC)領域にER α が共発現しているkisspeptin神経細胞の局在が示唆されること、2)AVPV、ARC共に発現レベルが、E2依存的であり、AVPV-kisspeptinはE2が高濃度存在下において、一方でARC-kisspeptinはE2が低濃度存在下において発現レベルが上昇することが報告された(Adachi et al., 2007; Smith et al., 2005)。前述のとおり、LH/GnRHサージの惹起にはE2のポジティブフィードバックが必要であるが、その時期にAVPV-kisspeptin神経細胞は活性化が認められると同時に、GnRH神経細胞が存在する視索前野 (preoptic area: POA)にkisspeptinに対する中和抗体を投与すると、LHサージの抑制が認められている(Adachi et al., 2007; Kinoshita et al., 2005)。以上より、AVPV-kisspeptin神経細胞は、LH/GnRHサージの上位の制御因子であると考えられており、kisspeptinの分泌機構等のさらなる解明が期待されている。

このようにkisspeptinは、GnRH/LHサージの制御因子であることが示唆されているが(図3)、雌ラットのatrazine誘発性LHサージ減弱作用におけるkisspeptin神経細胞-GnRH神経細胞の関与に関する研究は少ない。そこで本研究では、atrazine曝露によるLHサージ減弱の機作について、GnRH神経細胞あるいはkisspeptin神経細胞に対する影響に着目し、研究を実施した。

1.7 本研究の目的

本研究は、雌ラットのatrazine曝露による排卵を中心とした生殖機能に対する影響を明らかにすることを目的とした。まず、無処置の雌ラットにおける影響を性周期、

卵巣機能および GnRH 神経細胞の kisspeptin 反応性に着目した研究を行った。次に、LH サージに対する影響を明らかにするために、高濃度 E2 を持続投与させた OVX ラットモデル (OVX+E2 モデル)における GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に対する影響に着目した研究を行った。

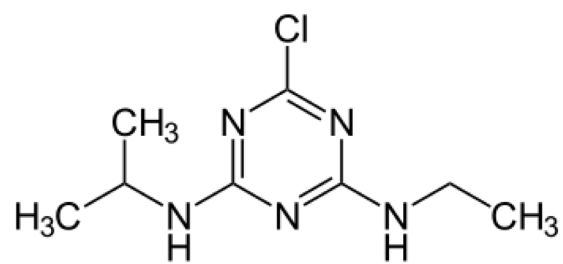


図 1. Atrazine の構造式

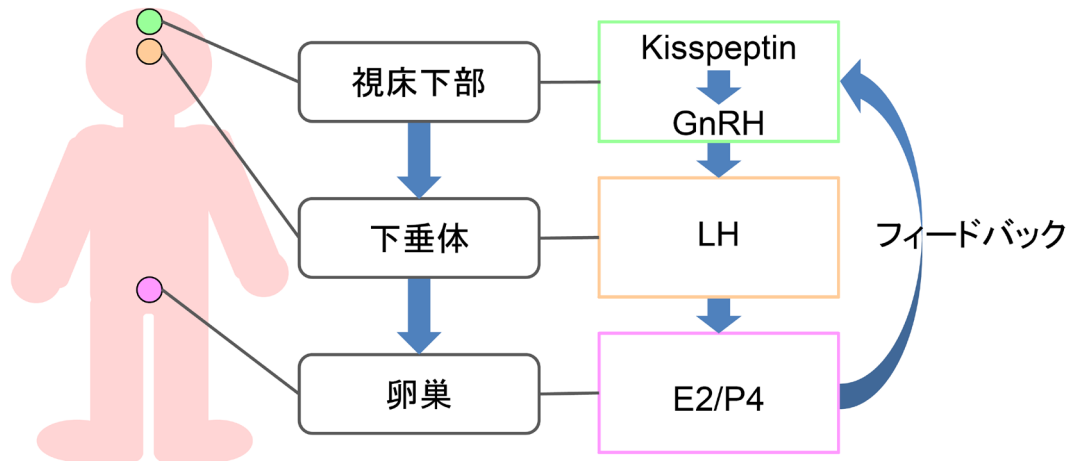


図 2. 視床下部－下垂体－性腺軸の概要

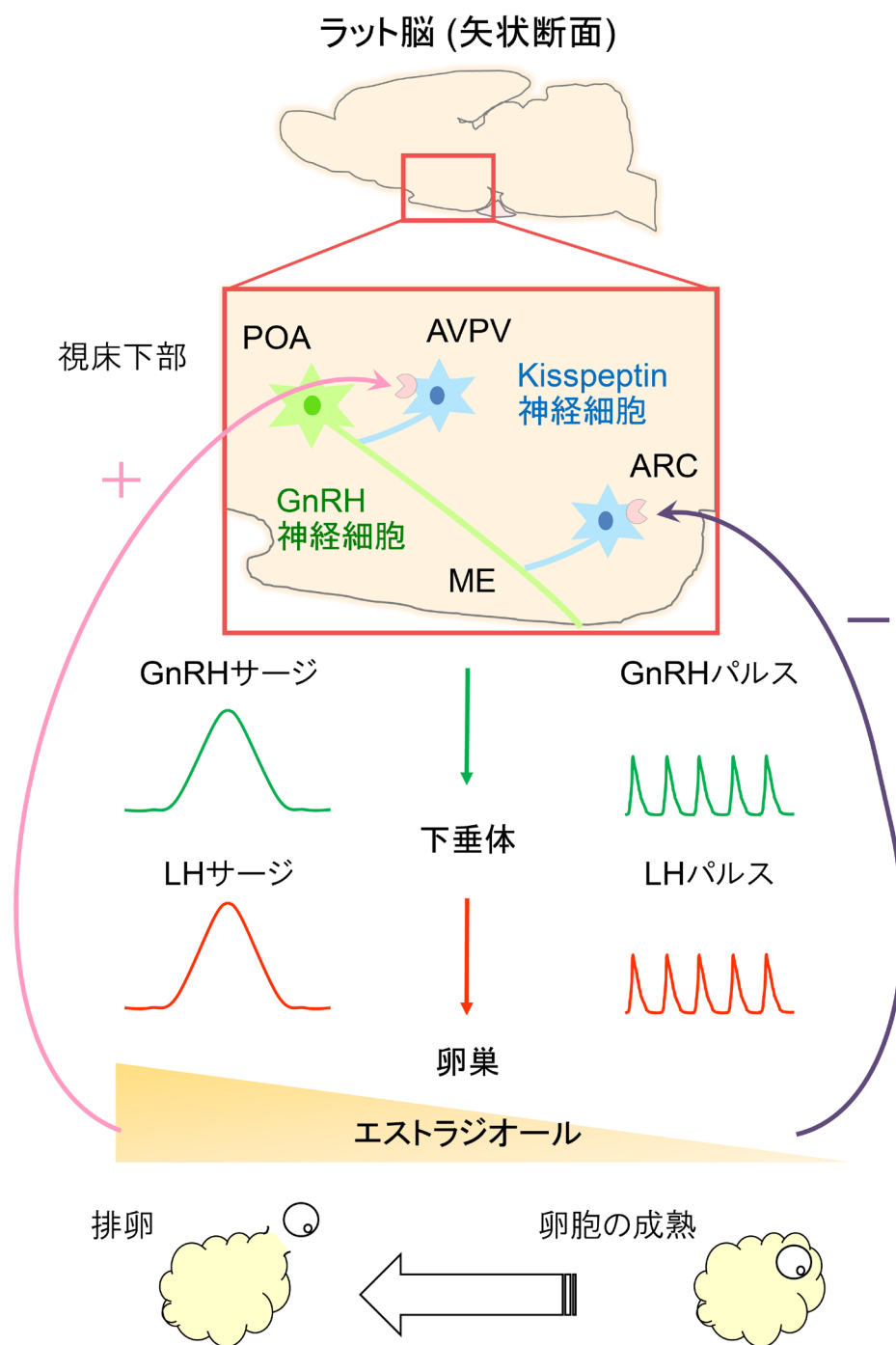


図 3. 視床下部—下垂体—性腺軸の詳細

2 実験の部

第一章および第二章の検査スケジュールは、それぞれ図 4 および図 8 に示した。

2.1 実験動物

雌 CrI:CD (SD) ラット (入荷時週齢 7 週齢) および雌 Jcl:Wistar ラット (入荷時週齢 7 週齢) は、それぞれ日本チャールスリバー株式会社および日本クレア株式会社より購入し、全ての動物は金網単飼ケージ [647.7 cm² (底面積) × 17.4 cm (高さ)] を用いて SPF 環境下で飼育した。動物飼育環境は下記とした。

飼料：γ線照射した固型飼料 (CR-LPF, オリエンタル酵母工業株式会社)

飲料水：水道水を自由摂取

温度：20–26°C

湿度：40–70% (相対湿度)

換気：12.6 回/時間

照明： 1)光源 蛍光灯

2)照度 50 lx 以上 (床上 85 cm)

3)照明周期 午前 7:00 点灯および午後 7:00 消灯 (12 時間周期)

全ての動物実験は、武田薬品工業株式会社が定める動物の取扱いに関するガイドラインに従った。

2.2 試薬類

主な試薬は下記より購入した。Atrazine は東京化成工業株式会社、E2 は Sigma 社、methylcellulose (MC, METOLOSE SM-100) は信越化学株式会社、注射用水および生理食塩水は大塚製薬工場、ギムザ染色液は富士フイルム和光純薬工業株式会社よりそれぞれ購入した。Kisspeptin-54 (Kp-54) は大瀧ら (Nishimura et al., 2001) の方法により合成した。

2.3 被験物質の調製

まず、atrazine 投与の分散媒として、0.5 w/v% MC 溶液を調製した。すなわち、200 mL を調製する場合、少量の温湯 [調製量に対して 1/10 量程度の蒸留水 (distilled water: DW) を 60–70°C に温める] に MC を 1 g 加えて攪拌し十分に分散させた後に、メスシリンダーに移し、素早く 4°C の DW で共洗いを数回繰り返しながら溶解させ、200 mL にメスアップした。本分散媒は、atrazine 投与群に対する対照群に同様に投与した。Atrazine 投与液は、2, 4 および 8 w/v% 懸濁液 (実験に応じて投与液濃度は変動) を調製

した。すなわち、4 および 8 w/v%懸濁液を 40 mL ずつ調製する場合、atrazine を電子天秤を用いてコンディショニングミキサー専用カップ内に 4.8 g 秤量した。カップに 2.4 mL の分散媒を加えた後、1 分間ミキサーで混合させた。その後、薬さじで分散媒とよく混ぜ合わせ、カップに 4.8 mL の分散媒で薬さじを共洗いしながら加えた後、再度ミキサーで 3 分間混合した。混合した懸濁液を分散媒でカップを共洗いしながらミスシリンダーに移し、60 mL にメスアップした。最後に、メスシリンダーの口をパラフィルムコートし、転倒混和した。調製した 8 w/v%懸濁液を 20 mL 採取し、そこに分散媒を 20 mL で 2 倍希釈して同様の方法で転倒混和し 4 w/v%懸濁液を調製した。これらを 5 mL/kg でラットに投与した。

2.4 膣スメアの採取および性周期判定

入荷後約 1 週間の馴化期間を経た後から、毎日 1 回午前中に膣スメアを採取した。予め動物匹数分の綿棒を少量の水道水の入った容器に浸し、動物に負担をかけないように保定した後、水に浸した綿棒を膣外口に当てて、周囲を濡らしながら数回拭き取った。拭き取った綿棒をスライドガラスと垂直の角度でスタンプし、十分に自然乾燥させた。膣スメア標本が十分に乾燥されていることを確認した後、99.5 vol%アルコールを用いて室温で約 2 分間固定し、十分に風乾した。その後、3 vol%ギムザ液を用いて室温で 25–30 分間染色した後、膣スメア標本が剥がれ落ちないようにゆっくりと 2–3 回水洗し、乾燥させた。染色した膣スメア標本を、光学顕微鏡下で観察し、性周期を判定した。

膣スメアの種類および判定基準

(1) 発情前期 (Proestrus)

核が明瞭な有核細胞が大半を占め、角化細胞が混在する場合もある。

(2) 発情期 (Estrus)

角化細胞が散在又は集塊状にみられ、有核細胞が混在する場合もある。

(3) 発情後期 (Metestrus)

有核細胞のまわりに多数の白血球がみられ、角化細胞が混在する場合もある。

(4) 発情休止期 (Diestrus)

白血球と粘液が認められ、これに有核細胞や角化細胞が混在する場合もある。

性周期の判定

- a. 正常性周期：4 日または 5 日に 1 回発情期が観察される。
- b. 異常性周期：5 日以上発情期がみられない。

- c. 性周期の回復：異常性周期がみられた後に、4日または5日に1回発情期が観察される。

2.5 群分け

Atrazine 投与開始もしくは OVX 実施の約 2 週間前から膣スメアを観察して性周期を判定し、正常性周期の動物を各群に任意に割り付けた。

2.6 OVX+E2 モデル動物の作製

2.6.1 OVX

予め、動物の腹部全体を電気バリカンで剃毛した。2.5%イソフルラン麻酔混合気を麻酔箱内で吸入させ麻酔下であることを確認した後、マウスピースからの麻酔混合気吸入に切り替え、再度深部麻酔下であることを確認した。鎮痛剤 [メロキシカム 1 日 1 回、2 日間 (1 mg/kg)] および抗生物質 [ペニシリン (2 万単位/body)] を投与し、0.5%ヒビテンアルコールで術野を消毒した後、動物を側臥位の状態で、第 12 肋骨より約 2–3 cm 尾側の位置で体軸に対して垂直に約 1–2 cm 切開した。切開後腹膜と皮膚の間を剥離し、腹膜を約 1–2 cm 切開し、卵巣周囲の脂肪組織をピンセットで挟み、卵巣および子宮の一部を体外に取り出した。卵管と子宮の間を縫合糸で結紮し、卵巣を摘出した。止血を十分に確認した後に、脂肪組織および子宮を体内に戻し、腹膜および皮膚を 3–4 針ずつ縫合した。以上の操作を反対にも同様に施し、手術終了後にエリザベスカラーを装着し、37°C に温めたケージ内で覚醒するまで観察した。覚醒後、一般状態に異常がないことを確認し、通常の単飼ケージ内で飼育を継続した。卵巣摘出後 2 日間は透明のラット用エリザベスカラーを装着し術野を保護し、施術後数日間は一日 2 回以上の一般状態観察を行った。

2.6.2 E2 充填シリコンチューブの作成および雌ラット背部皮下への移植

シリコンチューブ (シラスコンチューブ、Cat. # 100-2N、2.0-3.0、SH No.2) を約 2.5 cm に切断し、片端を歯科用接着剤 (EXAFINE, REGULATOR TYPE, GC Cooperation, Tokyo Japan) を用いて封をした。乾燥し、接着剤が脱落しないことを確認した後、粉末の E2 を用いてシリコンチューブに充填し、充填後、接着剤で封をし、乾燥後脱落しないことを確認し、50 mL の遠沈管に生理食塩水中に 37°C で一晩保管した。翌日、2.5%イソフルラン麻酔混合気をマウスピースから吸わせ深部麻酔下であることを確認した後、動物の腹部全体を電動バリカンで剃毛し、鎮痛剤 [メロキシカム 1 日 1 回、2 日間(1 mg/kg)] および抗生物質 [ペニシリン (2 万単位/body)] を投与し、0.5%ヒビテンアルコールで術野を消毒した後、動物を腹臥位の状態で、背部に体軸に対して垂直に

約1-2 cm切開し、皮膚と腹膜の間を剥離した後、E2入りシリコンチューブを体軸と水平になるように埋め込み縫合糸で2針程度縫合した。エリザベスカラーを装着し、37°Cに温めたケージ内で覚醒するまで観察した。覚醒後、異常がないことを確認し、通常の単飼ケージ内で飼育を継続した。E2入りシリコンチューブ持続投与開始3日目の血漿中E2濃度は、 332.26 ± 190.44 pg/ml [測定法：RIA法 (DPC E2キット 三菱化学メディエンス株式会社)]であった。

2.7 一般状態観察、摂餌量および体重測定

非投与日は1日1回、投与日は1日2回以上(投与前および投与後約1時間)一般状態観察を実施した。ケージサイドから糞便および尿の性状、形態、色調および量を観察した。ケージを引き出し、動物の生死を確認し、自発運動量等の変化を観察し、動物を保定して動物の耳翼内側、顔面、腹背部、四肢、尾の皮膚の状態を調べた。摂餌量は風袋込みの重量を測定し、その翌日も同様に測定しその差を1日の摂餌量として算出した。体重および摂餌量はメトラーの電子天秤を用いて測定した。

2.8 Atrazine 投与

1日1回、投与日の8:30-10:00の間に経口投与した。注射筒にディスポーザブルの経口ゾンデを接続し、攪拌機で十分に分散させながら吸入計量し、ゾンデの外側に付着した調製検体をペーパータオルで拭き取った。動物番号を確認後、口と食道が一直線になるように保定したあと、食道の方向にゾンデを抵抗感のないように胃内に挿入し、調製検体を注入した。

2.9 Kp-54 投与

Atrazine投与最終日に背部皮下投与した(投与時刻：11:00)。予め、背部を電気バリカンで剪毛した。投与部位を消毒用アルコール綿で消毒した後、動物を保定し、注射針を投与部位の皮下に刺入し、内筒を軽く引いて血液の流入がないことを確認した後、調製検体を静かに注入した。注射針を速やかに抜き、出血あるいは調製検体の漏出がないことを確認し、保定を外し、ケージに戻した。

2.10 血漿サンプル採取

無麻酔下で頸静脈から採血した。予め、頸部を電気バリカンで剪毛した。動物を保定し、消毒アルコール綿で頸下部から胸部にかけて拭いた後、予めヘパリンナトリウム溶液を含ませた25Gの注射針を鎖骨上の胸筋層を介して頸静脈に刺入させた後、ゆっくりと吸引し、所定量を採血した。採血後速やかにチューブに移し、遠心分離し血

漿を採取した。血漿は、各ホルモン濃度測定まで-70°Cで保存した。

2.11 脳サンプル採取

2.11.1 視床下部の採取

Atrazine 投与 5 日目の 11:30–13:00 の間に GnRH 含有量測定のために、視床下部を採取した。2–4%イソフルラン麻酔混合気を麻酔箱内で吸入させ麻酔下であることを確認した後、マウスピースからの麻酔混合気吸入に切り替え、再度深部麻酔下であることを確認した後、開腹し、腹部大動脈および大静脈を切断し、放血死させた。その後、頭頸部を剥皮後、筋肉を剥離し、頭蓋骨を露出させ、頭頂部の頭蓋骨を除去し、大脳および小脳を露出し、嗅球を切り離し大脳および小脳を一括して取り出した。頸髄を切断し、予め氷上に準備した生理食塩水で血液を除去した。次に、氷上に準備したブレインスライサー (株式会社ブレインサイエンス・イデア)に大脳および小脳を頭頂部が下になるようにセット、rat brain atlas を参考に(Paxinos and Watson, 2004)、Bregma 0.20–5.6 mm で切り出し、更にメス刃を用いて切り出した(Matsui et al., 2012)。その後、DW で 5 分間煮沸し氷上で冷却した。得られた脳サンプルは測定実施まで-80°C 以下で保存した。

2.11.2 視床下部 AVPV および ARC 領域の採取

Atrazine 投与 5 日目の 11:30-12:30 の間に *Kiss1* mRNA 測定のために、視床下部 AVPV および ARC を採取した。2-4 %イソフルラン麻酔混合気を麻酔箱内で吸入させ麻酔下であることを確認した後、マウスピースからの麻酔混合気吸入に切り替え、再度深部麻酔下であることを確認した後、開腹し、腹部大動脈および大静脈を切断し、放血死させた。その後、頭頸部を剥皮後、筋肉を剥離し、頭蓋骨を露出させ、頭頂部の頭蓋骨を除去し、大脳および小脳を露出し、嗅球を切り離し大脳および小脳を一括して取り出した。頸髄を切断し、予め氷上に準備した生理食塩水で血液を除去した。次に、氷上に準備したブレインスライサーに大脳および小脳を頭頂部が下になるようにセットし、rat brain atlas を参考に、AVPV 採取用には Bregma 0 から 2 mm の厚さで切り出し、ARC 用には Bregma 2.16 mm から 2 mm の厚さで切り出した。その後 AVPV は 1.5 mm の生検パンチ (KAI グループ)を用いて採取した。ARC はメス刃を用いて切り出した(Matsui et al., 2012)。得られた脳サンプルは測定実施まで-70°C 保存した。

2.12 剖検

2-4 %イソフルラン麻酔混合気を麻酔箱内で吸入させ麻酔下であることを確認した後、マウスピースからの麻酔混合気吸入に切り替え、再度深部麻酔下であることを確

認した後、開腹し、腹部大動脈および大静脈を切断し、放血死させた。その後、臓、肺、胸腺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、卵巣、卵管、子宮および投与部位、又 OVX + E2 モデル動物は術野について肉眼的に観察した。

2.13 排卵数の測定

放血死させた後 (方法は、剖検の項を参照)、卵管を摘出後、生理食塩液内で卵管膨大部を切開し、卵丘細胞卵に覆われた卵子の塊 (卵塊)を取り出し、卵塊内の卵子を実体顕微鏡下で計数した。

2.14 視床下部中 GnRH 含有量の測定

サンプルをソニケーターで組織粉碎後、6.25 vol%になるように氷酢酸を添加し、4°C で1時間転倒混和した。遠心分離により上清を回収し、SepPak C18 を用いて 80% アセトニトリル/1% トリフルオロ酢酸 1 mL で GnRH を抽出して、一晩かけて凍結乾燥した。凍結乾燥品を 0.1%BSA-0.05%CHAPS-PBS で再懸濁して、GnRH 濃度は、RIA kit (BACHEM Peninsula, USA)を用いて測定し (測定範囲: 10-1280 pg/mL)、タンパク濃度は、Bradford-Protein Assay Kit (OZ BIOSCIENCE)を用いて測定した。

2.15 RIA 法による血漿中 LH、E2 および P4 濃度測定

血漿中 LH 濃度は、NHPP (National Hormone and Peptide Program)からの購入品を使用して測定し (標準ペプチド: NIDDK rLH-RP-3、検出感度 0.16 ng/mL)、血漿中 E2 濃度は、DPC・エストラジオールキット (三菱化学メディエンス (株)、検出感度 10 pg/mL) を使用して測定した。

2.16 視床下部 AVPV および ARC 中の *Kiss1* mRNA 量の定量

2.16.1 Total RNA 抽出および cDNA 合成

採取した凍結脳サンプルを RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。まず、凍結脳サンプルを速やかに 40 mM dithiothreitol 含有 Buffer RLT を添加 (AVPV: 350 µL/tube, ARC: 600 µL/tube)し、ホモジネーターを用いて脳組織を粉碎した。12000 rpm で2分間遠心分離した後、上清を回収した。回収した上清に等量の 70% ethanol を添加しピペティングにて混和した後、最大 700 µL の混合液をスピンカラムに移し、12000 rpm で1分遠心操作をした。ろ液を廃棄した後に、残りの混和液をスピンカラムに移し、再度 12000 rpm で1分遠心操作した。次に、カラム上での DNase 分解のために、350 µL の Buffer RW1 を添加し 12000 rpm で1分遠心操作し、ろ液を廃棄した。次に、80 µL の DNase (10 µL: DNase+70 µL: Buffer RDD/tube)を添加し、室温で 15 分静

置した後に 12000 rpm で 1 分遠心操作し、ろ液を廃棄した。その後、350 μ L の Buffer RW1 をスピncラムに添加し、12000 rpm で 1 分遠心操作した後、ろ液を廃棄した。そして、500 μ L の Buffer RPE をカラムに添加し、12000 rpm で 1 分遠心操作した後、ろ液を廃棄した。その後再度、500 μ L の Buffer RPE をカラムに添加し、12000 rpm で 2 分間遠心操作した後、ろ液を廃棄した。カラムを新しいコレクションチューブに移し、完全に Buffer を除去するために 10000 rpm で 1 分間遠心操作した。その後、カラムを新しいコレクションチューブに移し、30 μ L RNase フリー水を添加し、10000 rpm で 1 分間遠心することで total RNA を抽出した。ここまでの操作は全て室温で実施した。RNA 濃度は、NanoDrop ND-100 (NanoDrop Technologies)を用いて定量した。cDNA 合成は、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific)を用いて行った。すなわち、1 条件あたり 2 μ L の 10X RT Buffer、0.8 μ L の 25X dNTP Mix、2 μ L の 10X RT Random Primers、1 μ L の MultiScribe™ Reverse Transcriptase、1 μ L の RNase Inhibitor、3.2 μ L の Nuclease-free 水および 1 μ g total RNA 含有 Nuclease-free 水を 10 μ L の合計 20 μ L の反応液を調製し、サーマルサイクラーを用いて、25°C で 10 分、37°C で 120 分、85°C で 5 分反応させた。

2.16.2 Realtime-PCR 法による mRNA 量の定量

上記で合成した cDNA を鋳型として、リアルタイム PCR を実施し、*Kiss1* mRNA 発現量を測定した。Taqman Gene Expression Assay (Thermo Fisher Scientific)を用いて、*Kiss1*:Rn 00710914 および *Actb*:Rn 00667869 を用いた。0.5 μ L の Taqman Gene Expression Assay、5 μ L の TaqMan Universal Master Mix II, with UNG (Thermo Fisher Scientific)および 0.5 μ L の DW に、合成し 10 ng/ μ L in DW に調製した cDNA を 4 μ L 加えて、合計 10 μ L で反応させた。反応時間は、95°C で 10 分反応させた後、95°C で 15 秒および 60°C で 1 分を 1 サイクルとして合計 40 サイクル反応させた。*Actb* を内部標準とし、mRNA 発現解析は Δ Ct 法を用いた。

2.17 統計処理

2 群の場合、F 検定により 2 群の分散の一樣性の検定を行い、等分散の場合には Student の t 検定、不等分散の場合は Aspin-Welch の t 検定により平均値の差の検定を行った。検定の有意水準は、F 検定は 20%、t 検定は両側 5%および 1%とした。用量反応性試験の場合、Bartlett 検定により各群の分散の一樣性の検定を行った。その結果、等分散の場合には、単調な用量反応関係を前提とした Williams 検定を行った。Williams 検定で有意でない場合には、Dunnett 検定を用いて対照群と各投薬群との平均値の差の検定を行った。Bartlett 検定の結果、不等分散の場合は、単調な用量反応関係を前提

とした Shirley-Williams 検定を行った。Shirley-Williams 検定で有意でない場合には、対照群と各投薬群との平均順位の差について、順位に基づく Steel 検定を行った。検定の有意水準は、Bartlett 検定は 5%、Williams 検定および Shirley-Williams 検定は両側 5%、その他の検定は両側 5%および 1%とした。ホルモン測定については、ANOVA 検定により各群の分散を用いて、多群の平均値を分析する検定を行った。その結果、有意なものについてのみ群構成に伴い検定を実施した。各測定項目における ANOVA 検定を下記に示した。

- ・経時毎の血漿中 LH 濃度 : repeated measures ANOVA

- ・血漿中 LH ピーク濃度および曲線下面積 (area under the curve: AUC)値 : one way ANOVA

解析には、SAS System Version8.2 を使用した。

3 第1章 雌ラットの atrazine による性周期に対する影響

3.1 目的

雌ラットに atrazine を一定量反復投与すると、性周期の異常が観察されることが知られているが、その原因は未だ明らかとなっていない。そこで、atrazine 曝露による生殖機能に対する影響を調べるために、最初は無処置の雌ラットに atrazine を1日1回反復投与し、性周期に影響を及ぼす用量およびその発現までの日数を調べるとともに、atrazine の卵巣機能に対する影響を調べるために、反復投与後の血漿中 E2 濃度および P4 濃度の測定をした。さらに、GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性を調べるために、atrazine 反復投与後に Kp-54 を単回皮下投与して血漿中 LH 濃度を測定した(図4)。

3.2 無処置ラットにおける atrazine 反復投与の結果

3.2.1 生死および一般状態

400 mg/kg 群では、1例で投与3-5日に糞量の減少、投与4日に自発運動の低下および眼瞼下垂ならびに投与5日に外陰部の被毛の汚れがみられ、投与6日に死亡した。その他の生存動物では、投与1-8日に全例で糞量の減少がみられ、投与8日に1例で消瘦がみられた。さらに、初回投与後から体重増加量および摂餌量の減少が続き、回復が見込まれなかったことから投与8日に全例を安楽死させ、同群の kisspeptin 投与、採血、ホルモン測定および排卵確認は実施しなかった。

200 mg/kg 群では投与3-5日に4例で糞量の減少がみられたがその後回復がみられた(表1)。

3.2.2 体重

体重は、400 mg/kg 群では投与開始後に減少し、対照群と比較して投与2-8日で統計学的に有意な低値を示した。200 mg/kg 群では投与開始後に減少したが、投与3日以後は回復傾向を示した。しかし、同群では対照群と比較して投与9-10および20-23日で統計学的に有意な低値を示した(図5)。

体重増加量は、400 mg/kg 群では対照群と比較して、投与0-1日で統計学的に有意な低値、投与3-8日では低値傾向を示した。200 mg/kg 群では対照群と比較して、投与0-1および13-16日で統計学的に有意な低値を示した。

3.2.3 摂餌量

400 mg/kg 群では対照群と比較して投与0、1、2および7日で統計学的に有意な低

値を示し、投与 6 日では低値傾向がみられた。200 mg/kg 群では対照群と比較して投与 0、1 および 2 日で統計学的に有意な低値を示し、投与 9 日で高値を示した (図 6)。

3.2.4 性周期変化

400 mg/kg 群の 3 例で投与 6 日頃から発情期が消失し、発情休止期の像が持続的にみられる異常性周期が観察された。200 mg/kg 群においても全例で投与 6 日頃から 400 mg/kg 群と同様の異常性周期が観察された。そのうちの 4 例では投与 17 日頃から正常性周期への回復がみられたが、他の 1 例は回復がみられなかった (表 2)。

3.2.5 生殖関連ホルモンの分泌変化

血漿中 E2 濃度: 200 mg/kg 群は対照群と比較して、差は認められなかった。200 mg/kg 群のうち、性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)において著しい低値を示した。200 mg/kg 群の性周期回復の 4 例のうちの 3 例 (2F02、03 および 05)では差はみられなかったが、他の 1 例 (2F01)では著しい低値を示した。その 1 例の値は性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)と同等であった (表 3)。

血漿中 P4 濃度: 200 mg/kg 群は対照群と比較して、統計学的に有意な高値を示した。200 mg/kg 群のうち性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)は、著しい高値を示した。200 mg/kg 群のうち性周期の回復がみられた 4 例のうちの 3 例 (2F02、03 および 05) ではやや高値を示し、1 例 (2F01)では著しい高値を示した。その 1 例の値は性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)と同等であった (表 3)。

3.2.6 GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する影響

Kp-54 投与前ならびに投与後 1、2 および 4 時間における血漿中 LH 濃度、LH ピーク濃度および AUC_{0-4h} を算出した結果、200 mg/kg 群の各採血時間における血漿中 LH 濃度は、対照群と比較して Kp-54 投与 2 および 4 時間後で統計学的に有意な低値を示した。また、血漿中 LH ピーク濃度および AUC_{0-4h} は 200 mg/kg 群では対照群と比較して統計学的に有意な低値を示した。200 mg/kg 群のうち性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)の各採血時間における血漿中 LH 濃度、血漿中 LH ピーク濃度および AUC_{0-4h} は対照群と比較して著しく低値を示した。200 mg/kg 群のうち性周期の回復がみられた 4 例のうちの 3 例 (2F02、03 および 05)の各採血時間における血漿中 LH 濃度、血漿中 LH ピーク濃度および AUC_{0-4h} に差はみられなかったが、他の 1 例 (2F01)では著しい低値を示した。その 1 例の値は性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04)と同程度であった (表 4)。

3.2.7 各種臓器に対する影響

400 mg/kg 群では3例に子宮の萎縮、副腎肥大および胃粘膜に黒色点がみられ、2例に脾臓の萎縮、1例に胸腺の萎縮および肺の変色(褐色)がみられた。一方、200 mg/kg 群では異常所見はみられなかった(表5)。

3.2.8 排卵に対する影響

対照群と投薬群の間に差はなかった。200 mg/kg 群のうち性周期の回復がみられた4例のうちの3例(2F02、03 および 05) は対照群と比較し差がみられなかったが、1例(2F01) で著しい低値を示した。200 mg/kg 投薬群のうち性周期の回復がみられなかった1例(2F04) の排卵は確認されなかった(表6)。

3.3 考察

雌ラットに200 および 400 mg/kg/日の atrazine を反復投与すると、400 mg/kg 群の3例に投与6日頃から持続的な発情休止期がみられ異常性周期の誘発が示された(表2)。また、1例に自発運動の低下、外陰部の被毛の汚れ、眼瞼下垂および糞量減少が観察され、投与6日に死亡した(表1)。その他の生存例においても全例に糞量減少および1例に消瘦がみられた(表1)。同群ではさらに非回復性の体重増加抑制および摂餌量の減少がみられたことが(図5 および 6)、性周期の変化、副腎、胃粘膜および胸腺の変化などの一因と推測された。ところが200 mg/kg 群では、5例全例で投与6日頃から400 mg/kg 群と同様に持続的な発情休止期がみられたものの、そのうち4例で投与17日頃から性周期の回復がみられた(2F01、02、03 および 05)(表2)。同群では atrazine 投与初期に糞量減少、体重増加抑制および摂餌量の減少がみられたが、その後回復がみられた(図5 および 6)。これらの変化は既に報告されている結果(Cooper et al., 1996; Eldridge et al., 1999; Shibayama et al., 2009)と概ね一致した。200 mg/kg では糞便量の減少などの一般状態変化や体重増加抑制は回復がみられたことから、持続的な性周期の変化は状態悪化による二次的な影響ではなく、atrazine が直接的に性周期に影響を及ぼした結果と考えられた。

200 mg/kg 群では atrazine 投与22-29日のいずれか1日の11:00に血漿中E2 および P4 濃度を測定した。性周期の回復がみられた3例(2F02、03 および 05) では血漿中E2 濃度に投薬の影響はみられず、血漿中 P4 濃度はやや高値であった(表3)。性周期の回復がみられた他の1例(2F01)および性周期の回復がみられなかった1例(2F04) では血漿中E2 濃度の低値および P4 濃度の高値であった(表3)。これらの動物では剖検時に、発達した黄体(多数であり、正確な計数が不可であったためデータ示さず)および排卵数減少がみられた。Cooperらの報告では、ラットにおいて300 mg/kg の atrazine

を 21 日間投与すると発達した黄体および血漿中 P4 濃度の上昇がみられ、atrazine の卵胞発育阻害作用が示唆されている (Cooper et al., 1996)。従って、本実験の 2 例 (2F01 および 04) でみられた血漿中の高濃度の P4 は発達した黄体からの分泌に起因し、また、排卵数の低下は atrazine 投与によって卵胞発育が阻害され E2 の分泌および排卵が抑制されたため生じたと考えられた。

Atrazine 投与 22-29 日目のいずれか 1 日の 11:00 に 100 nmol/kg の Kp-54 を単回皮下投与し、Kp-54 投与前ならびに投与 1、2 および 4 時間後に血漿中 LH 濃度を測定した結果、200 mg/kg 群では対照群と比較して一過性の LH サージ様分泌の減弱がみられた (表 4)。そのうち、性周期の回復がみられた他の 1 例 (2F01) および性周期の回復がみられなかった 1 例 (2F04) では LH サージ様分泌はほぼ認められなかった (表 4)。生理的な LH サージは図 3 に示した通り、視床下部の kisspeptin 神経細胞から放出される kisspeptin が GnRH 神経細胞を刺激し、そこから放出される GnRH が下垂体を刺激することで誘発される。また、このような LH サージは、卵巣より分泌されるステロイドホルモンが正のフィードバックを視床下部に送ることで誘発される。Atrazine 曝露と LH サージ減弱との関連を調べた先行研究では、OVX ラットに EB と P4 を同時に持続投与し atrazine を 5 日間投与すると、血漿中 LH 濃度が低値を示したことから、EB および P4 に対する視床下部の反応性の低下が示唆されている (Tami S McMullin et al., 2004)。また、雌ラットに atrazine を 4 日間投与し、視床下部における eGFP-GnRH および神経細胞の活性化マーカーである FOS のタンパクを測定すると共発現するタンパクの減少がみられたことから、atrazine 投与による GnRH 神経細胞の活性の低下が示唆されている (Foradori et al., 2009a)。さらに、OVX ラットに EB を持続投与し、atrazine を 3 日間投与した後に GnRH を投与すると、LH が一過性に上昇したことから、atrazine を投与しても下垂体の GnRH に対する感受性は維持されていると考えられる (Cooper et al., 2000)。Kisspeptin は GnRH 神経細胞の生理機能を評価可能なペプチドであり、雌ラットに kisspeptin の 100 nmol/kg を単回皮下投与すると、投与 2 時間後をピークとした一過性の LH サージ様の分泌が生じることが報告されている (Ishii et al., 2013)。一方で、kisspeptin による LH の分泌には高濃度の E2 が必要であることが示唆されており (Pielecka-Fortuna et al., 2007)、本研究での異常性周期を示した個体における kisspeptin を単回投与後の一過性の LH の上昇が誘発されなかった原因として、E2 低下を介した影響および/あるいは GnRH 神経細胞自身の活性低下が考えられた。1 例 (2F01) については血漿中ホルモン濃度の変化がみられたが、性周期は正常であった (表 2 および 4)。しかしながら、その原因は特定できなかったため、今後検討が必要である。

以上の結果より、雌ラットに 200 mg/kg/日の atrazine を反復経口投与すると性周期

に異常を来すことが確認された。また、これらの動物では卵胞発育の抑制や卵巣からの E2 分泌の低下、過剰な黄体形成および kisspeptin 依存的なサージ様 LH 放出の低下などが引き起こされることが明らかとなった。このような atrazine 曝露による影響は、卵巣に対する作用起因、もしくは視床下部 (kisspeptin 神経細胞および GnRH 神経細胞) に対する作用が考えられるが、前述の通り HPG 軸は視床下部、下垂体および卵巣が密接に関連して機能することから、上記可能性のいずれか、あるいはその両方なのかについては本研究では明らかにすることは出来なかった。視床下部機能、卵巣機能、それぞれに焦点を当てた研究を行うことで、atrazine の影響に関する詳細な解析が可能になると考えられる。

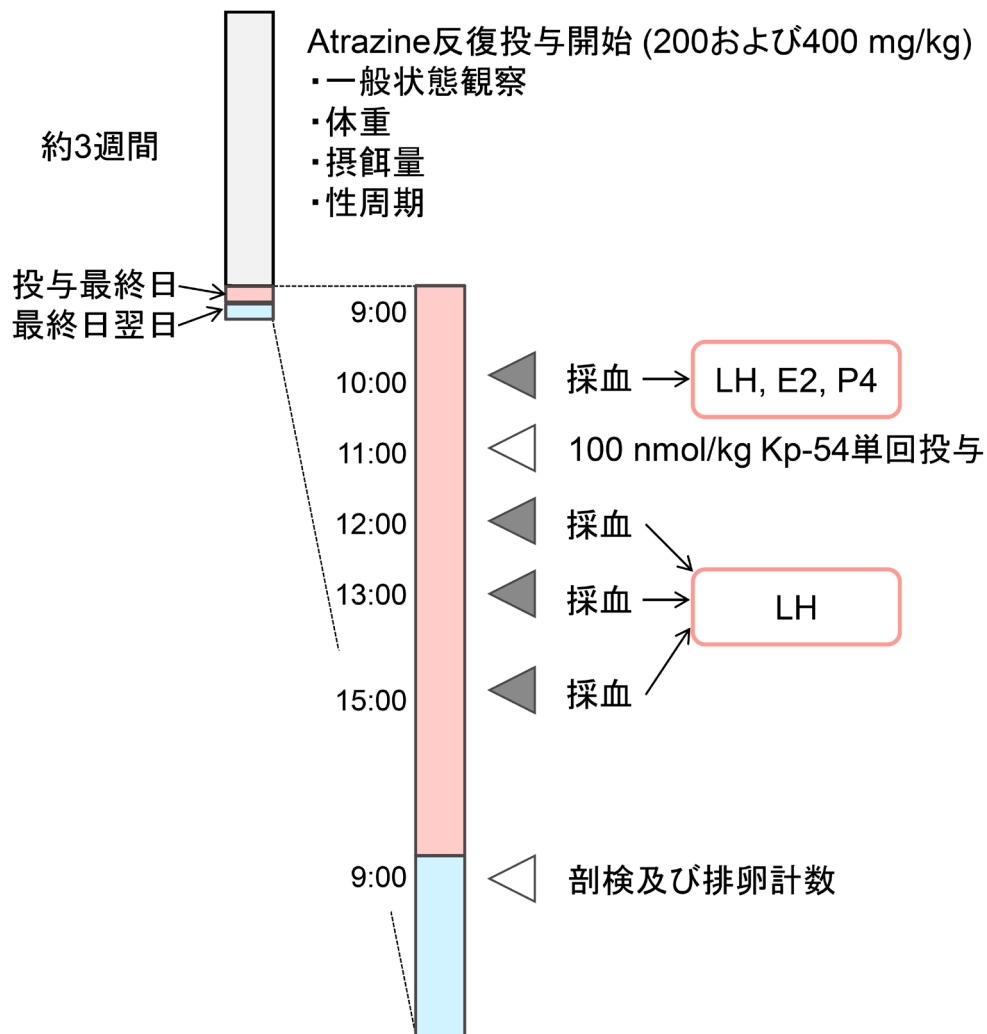


図 4. 第 1 章における実験概要

正常性周期が確認された雌ラットに 200 および 400 mg/kg の atrazine の 5 日間反復経口投与を開始した。400 mg 群では、非回復性の体重増加抑制がみられたことから投与 8 日に全例安楽死させた。200 mg/kg 群は、投与 22-29 日の間に（最終投与時点で正常性周期：P 期、異常性周期：D 期）100 nmol/kg の Kp-54 を単回皮下投与し、投与前ならびに投与 1, 2 および 4 時間後の血漿中ホルモン濃度を測定した。さらに、atrazine 最終投与翌日に剖検および排卵計数を実施した。

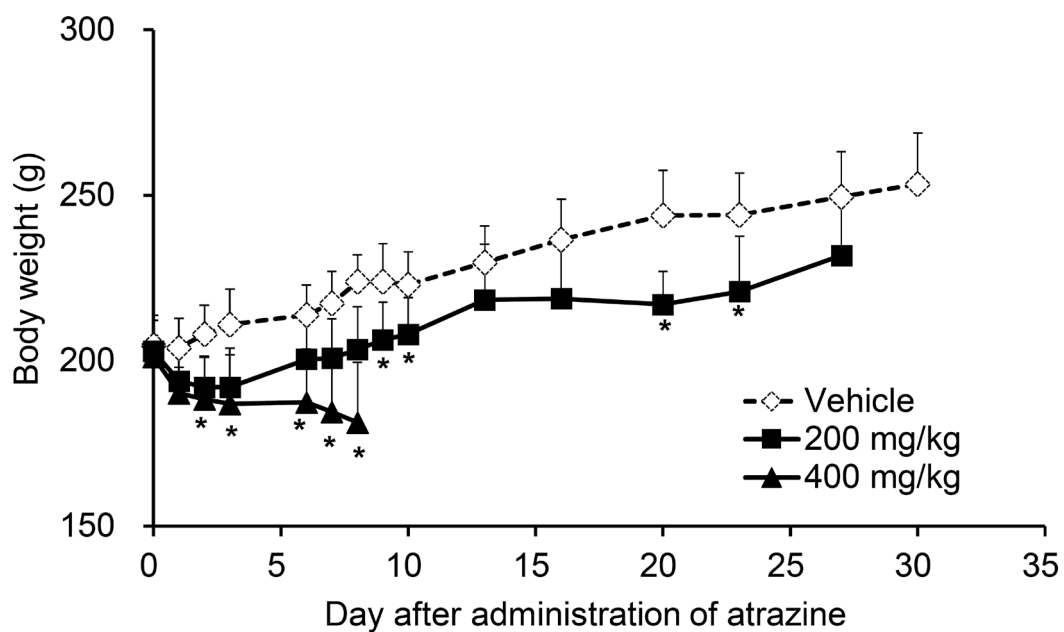


図 5. 無処置雌ラットの atrazine 投与による体重に対する影響

無処置の雌ラットに 200 および 400 mg/kg の atrazine を 1 回/日反復投与し、体重を測定した。各群 5 匹の平均値±標準偏差 (SD)として示した。*; $p < 0.05$ vs. vehicle control. (two-tailed Williams' or the Shirley-Williams test)

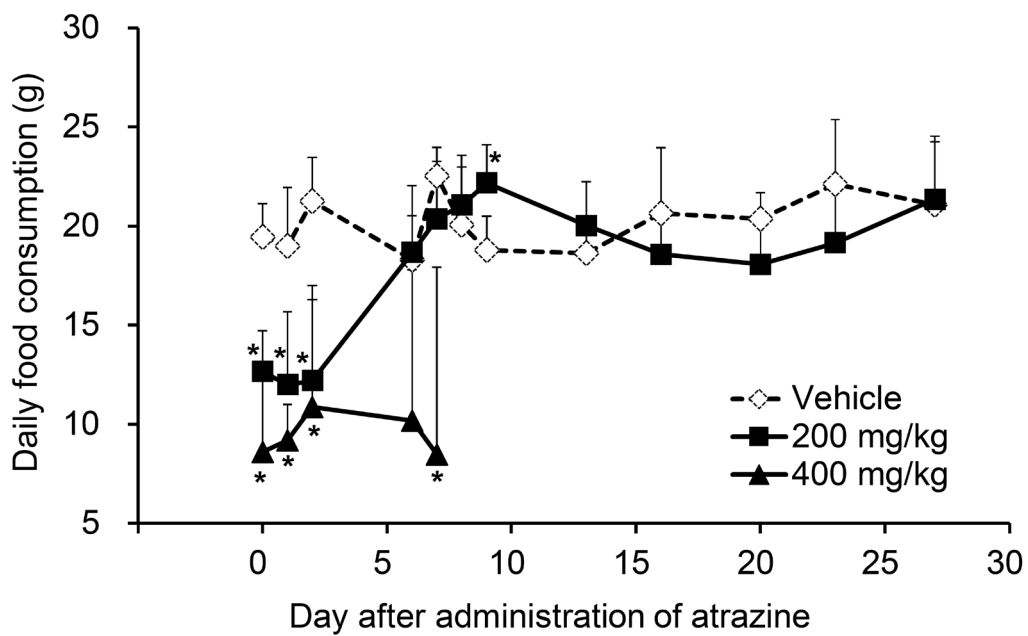


図 6. 無処置ラットの atrazine 投与による摂餌量に対する影響

無処置の雌ラットに 200 および 400 mg/kg の atrazine を 1 回/日反復投与し、摂餌量を測定した。各群 5 匹の平均値±標準偏差 (SD)として示した。*; $p < 0.05$ vs. vehicle control. (two-tailed Williams' or the Shirley-Williams test)

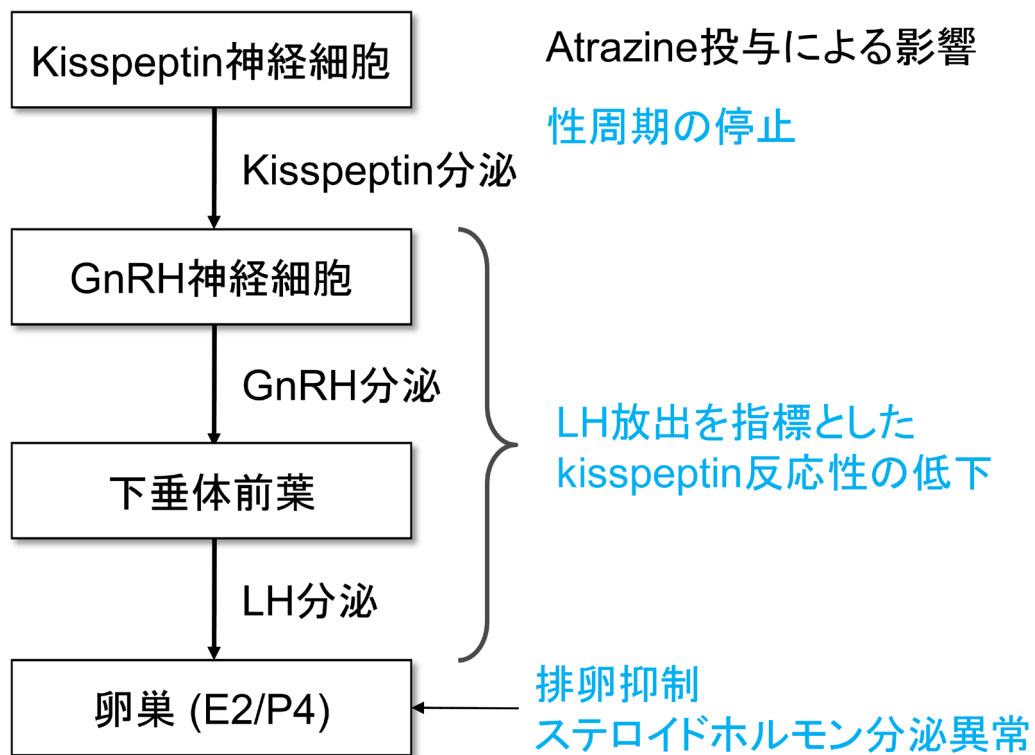


図 7. 第 1 章考察の概要

無処置の雌ラットに 200 mg/kg の atrazine を 1 回/日反復投与した結果、性周期が停止し、その原因として、atrazine が卵巣機能に作用し E2 低下を介して HPG 軸が異常となった可能性、および atrazine が GnRH 神経細胞に作用して kisspeptin に対する反応性が低下した可能性が示唆された。

表 1. 無処置雌ラットの atrazine 投与による一般状態に対する影響

Test article	Vehicle	Atrazine	Atrazine
Dose (mg/kg/day)	0	200	400
No. of animals	5	5	5
Pretreatment period			
Normal	5	5	5
Treatment period			
Normal	5	1	0
Emaciation	0	0	1 (day8)
Decrease in locomotor activity	0	0	1 (day4)
Soiled fur	0	0	1 (day5)
Ptosis	0	0	1 (day4)
Decrease in feces	0	4 (day3-5)	5 (day1-5)

無処置の雌ラットに 200 mg/kg の atrazine を 1 回/日 反復投与し、非投与日は 1 日 1 回、投与日は 1 日 2 回以上 (投与前および投与後約 1 時間) 一般状態観察を実施した。数値は、それぞれ観察された個体を示した。

表 2. 無処置雌ラットの atrazine 投与による性周期に対する影響

Test article	Vehicle	Atrazine	Atrazine
Dose (mg/kg/day)	0	200	400
No. of animals	5	5	5
No. of females with regular estrous cycles (%)	5 (100.0)	0 (0.0)	2 (40.0)
No. of females with irregular estrous phase (%)	0 (0.0)	5 (100.0)	3 (60.0)
First day of irregular estrous phase		6.4±0.9 ^{a)}	6.3±0.6 ^{a)}
No. of recovered females from irregular estrous phase (%)		4 (80.0)	0 (0.0)
First day of recovery		17±2.8 ^{b)}	

無処置の雌ラットに 200 および 400 mg/kg の atrazine を 1 回/日反復投与し、膣スミア観察によって性周期を判定した。

a: 異常性周期が確認された個体の平均値±標準偏差 (SD)

b: 異常性周期からの回復が確認された個体の平均値±標準偏差 (SD)

表 3. 無処置雌ラットの atrazine 投与による卵巣ホルモンに対する影響

Test article	Dose (mg/kg/day)	Animal number	E2 (ng/mL)	P4 (ng/mL)
Vehicle	-	1F01	41.861	3.231
		1F02	19.985	5.218
		1F03	38.087	1.641
		1F04	44.351	4.850
		1F05	57.727	3.440
		Mean	40.402	3.676
		SD	13.602	1.427
Atrazine	200	2F01	12.617	58.056
		2F02	67.649	14.865
		2F03	34.459	10.076
		2F04	14.018	54.719
		2F05	75.463	7.402
		Mean	40.841	29.024 **
		SD	29.471	25.150

無処置雌ラットに 200 mg/kg の atrazine を 1 回/日投与し、投与 22~29 日目のいずれか 1 日の 10:00 の血漿中 E2 濃度および P4 濃度。各群 5 匹の平均値±標準偏差 (SD)として示した。*; $p \leq 0.05$ (t test) vs. the vehicle control.

表 4. 無処置雌ラットの atrazine 投与による GnRH 神経細胞の Kp-54 に対する反応性に対する影響

Test article	Dose (mg/kg/day)	Animal number	Time after dosing of Kp-54				Peak (ng/mL)	AUC _{0-4hr} (ng·hr/mL)
			Pre	1h	2h	4h		
Vehicle	-	1F01	0.258	80.280	56.718	6.228	80.280	171.714
		1F02	0.852	9.332	52.394	8.718	52.394	97.067
		1F03	0.192	12.750	73.994	12.910	73.994	136.747
		1F04	0.222	66.954	74.976	11.856	74.976	191.385
		1F05	0.352	45.012	58.518	10.874	58.518	143.839
		Mean	0.375	42.866	63.320	10.117	68.032	148.150
		SD	0.273	31.687	10.438	2.668	11.925	35.995
Atrazine	200	2F01	0.078	4.104	6.816	0.266	6.816	14.633
		2F02	0.386	51.410	35.632	1.736	51.410	106.787
		2F03	0.540	20.206	41.522	2.978	41.522	85.737
		2F04	0.026	2.306	8.916	0.136	8.916	15.829
		2F05	0.458	16.246	42.514	4.770	42.514	85.016
		Mean	0.298	18.854	27.080*	1.977*	30.236*	61.600*
		SD	0.231	19.748	17.752	1.948	20.794	43.225

無処置雌ラットに 200 mg/kg の atrazine を 1 回/日投与し、投与 22~29 日目のいずれか 1 日の 11:00 に 100 nmol/kg の Kp-54 を単回皮下投与した後の血漿中 LH 濃度、LH ピーク濃度および AUC_{0-4hr}。各群 5 匹の平均値±標準偏差 (SD)として示した。 * indicates $P \leq 0.05$ (ANOVA and t test) vs. the vehicle control.

表 5. 無処置雌ラットの atrazine 投与による各種臓器に対する影響

Test article	Vehicle	Atrazine	Atrazine
Dose (mg/kg/day)	0	200	400
No. of animals	5	5	5
Normal	5	5	1
Stomach (focus, black)	0	0	3
Adrenal gland (large, bilateral)	0	0	3
Uterus (small)	0	0	3
Spleen (small)	0	0	2
Thymus (small)	0	0	1
Lung (discoloration)	0	0	1

雌ラットに 200 および 400 mg/kg の atrazine を反復投与し、投与最終日に剖検し、各種臓器の肉眼観察を実施した。数値は、それぞれ観察された個体を示した。

表 6. 無処置雌ラットの atrazine 投与による排卵に対する影響

Test article	Dose (mg/kg/day)	Animal number	No. of oocytes		
			Right	Left	Total
Vehicle	-	1F01	7	2	9
		1F02	7	6	13
		1F03	5	8	13
		1F04	7	3	10
		1F05	3	5	8
		Mean	5.8	4.8	10.6
		SD	1.8	2.4	2.3
Atrazine	200	2F01	0	1	1
		2F02	5	7	12
		2F03	6	12	18
		2F04	0	0	0
		2F05	10	3	13
		Mean	4.2	4.6	8.8
		SD	4.3	4.9	7.9

雌ラットに 200 mg/kg の atrazine 反復投与し、最終日の剖検時に卵管中の卵母細胞を实体顕微鏡下で計測した。統計学的有意差は認められなかった。

4 第2章 雌ラットの atrazine による GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に対する影響

4.1 目的

第1章の結果より、雌ラットに 200 mg/kg/日の atrazine を反復投与することによって卵巣機能が低下し、E2 分泌が低下、および/あるいは GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性が低下した結果、LH 分泌が抑制され、HPG 軸の異常を介して性周期が変化したと考えられた。GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性は卵巣機能の影響を大きく受けることが知られている。そこで本章では atrazine の卵巣機能に対する影響を排除するために LH サージ研究に汎用されている OVX+E2 モデルを用いて、GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に対する影響を調べた (図 8)。

4.2 OVX+E2 モデルラットにおける atrazine の 5 日間反復投与の結果

4.2.1 一般状態、体重および LH サージに対する影響

OVX+E2 動物に 100 および 200 mg/kg の atrazine を 5 日間投与した結果、200 mg/kg 群では、下痢および糞便量の減少がそれぞれ 1 例でみられた (表 7)。また、体重は対照群と比較して、100 および 200 mg/kg 群でそれぞれ 7.5% および 12.1% と有意に減少した (図 9A)。また、atrazine 投与 5 日目 (E2 持続投与開始 2 日目) に LH サージを観察した結果、100 および 200 mg/kg 群で LH サージ抑制が確認され、その程度は同等であることが示された (図 9B-D)。雌ラットでは、10% までの体重増加抑制では生殖機能に対する影響はごく軽度もしくはみられないと報告されている (Tropp and Markus, 2001)。したがって、以降の実験の投与量は毒性学的影响の少ない且つ十分な LH サージ抑制を誘発する 100 mg/kg に設定した。

4.2.2 GnRH 含有量に対する影響

視床下部中の GnRH 含有量は、内因性の GnRH/LH サージ依存的に変動すると報告されていることから (Barr and Barraclough, 1978)、日内変動を避けるために 11:00-13:00 の GnRH 含有量を測定した。Atrazine 投与 5 日目の視床下部中の GnRH 含有量は、対照群と atrazine 群の間に差はみられなかった (図 10)。

4.2.3 GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性への影響

Atrazine 投与 5 日目 (E2 持続投与開始 2 日目) に Kp-54 に対する反応性を評価した。E2 投与前の個体の膣スメア像は全て発情休止期の像が観察されており、E2 持続投与開始 2 日目の個体の膣スメア像は全て発情期の像が観察された。対照群と atrazine 群

との間に膾炙メア像の差はみられなかった。E2 投与 2 日目の 11:00 に Kp-54 の 0、0.1、1 または 10 nmol/kg を単回皮下投与した。投与後 1、2 および 3 時間後の血漿中 LH 濃度を測定した結果、対照群と atrazine 群のいずれも Kp-54 の用量依存的な血漿中 LH 濃度の一過性の増加を示した。血漿中 LH ピーク濃度は、Kp-54 の 10 nmol/kg 投与群で、対照群と比較して atrazine 群において統計学的に有意な増加を示した (図 11A)。また、AUC は対照群と比較して差はみられなかった (図 11B)。

4.2.4 *Kiss1* 遺伝子発現に対する影響

Atrazine 投与 5 日目の AVPV の *Kiss1* mRNA 発現量を定量的 PCR で測定した結果、atrazine 群において、統計学的に有意な発現量の低下を示した (図 12A)。一方で、ARC の *Kiss1* mRNA 発現量は対照群と atrazine 投与の間に統計学的に有意な差はみられなかった(図 12B)。

4.3 考察

第一章では、無処理雌ラットの atrazine 曝露によって LH 放出能を指標とした kisspeptin に対する GnRH 神経に対する反応性の低下が認められた。しかしながら、GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性は卵巣機能の影響を大きく受けるため、atrazine 投与による kisspeptin 反応性低下の原因が、卵巣機能異常に起因するのか、atrazine の作用によるものなのかが区別し辛い結果となった。そこで第二章では、LH サージ研究に汎用されている OVX+E2 モデルを用いて、GnRH および kisspeptin に対する影響を調べた。まず、atrazine 投与による LH サージ減弱モデルを作製するため、OVX ラットに 100 および 200 mg/kg の atrazine を 1 日 1 回経口投与し、atrazine 投与 3 日目から E2 投与を開始して、atrazine 投与 5 日目 (E2 投与 2 日目)における LH サージを観察したところ、100 および 200 mg/kg では同等の LH サージの減弱が認められた (図 9B-D)。一方で、体重は対照群と比較して 100 および 200 mg/kg で、それぞれ 7.5% および 12.1% 減少した (図 9A)。200 mg/kg でみられた 10% を超える体重増加抑制などのストレス負荷は、雌ラットの生殖機能に影響を及ぼすことが知られている (Tropp and Markus, 2001)。さらに同用量では、下痢などの一般状態の悪化が認められていることから (表 7)、状態悪化によって LH サージ減弱が惹起された可能性が考えられた。100 mg/kg は 200 mg/kg と同等の LH サージ減弱が認められたが、体重増加抑制は対照群と比較して 10% 未満であり、体重増加抑制による二次的な生殖機能に対する影響が少ないと考えられ (Tropp and Markus, 2001)、且つ一般状態に変化がみられなかったことから、毒性学的影響の少ない且つ十分な LH サージの減弱がみられた 100 mg/kg を本研究の atrazine による LH サージ減弱モデルとして用いた。既報告では、OVX 処置

ラットでは atrazine 投与によって GnRH に対する反応性は正常であることが示唆されており (Foradori et al., 2009a)、さらに、OVX+E2+P4 処置ラットの atrazine による GnRH 神経細胞の活性の低下が示唆されている (Foradori et al., 2009b)。これらのことから、atrazine 投与による LH サージ減弱の原因には 1) GnRH 神経細胞の GnRH 放出能低下、あるいは 2) GnRH 神経を制御する上位のシグナル伝達系、すなわち kisspeptin 神経細胞に影響を及ぼしている可能性が考えられた。

第二章の研究では、まず 1) GnRH 神経細胞における GnRH 放出能評価を目的に、atrazine 投与 5 日目の 11:00 に Kp-54 を単回皮下投与して、その後の血漿中 LH 濃度を GnRH 放出のサロゲートマーカーとして経時的に測定した。Kisspeptin は GnRH 神経細胞を刺激して GnRH を放出させ (Seminara, 2005)、雌ラットの AVPV における kisspeptin は、GnRH をサージ状に分泌させる (Maeda et al., 2007)。ラットに kisspeptin を皮下投与すると、GnRH 神経細胞の活性がみられ (Matsui et al., 2004)、無処置の雌ラットに Kp-54 を皮下投与すると血漿中 LH 濃度が一過性に上昇することから (Ishii et al., 2013)、kisspeptin の皮下投与による血漿中 LH 濃度の上昇は、本ペプチドが GnRH 神経細胞を刺激した結果を反映していると考えられる。Atrazine 投与後の kisspeptin 投与による一過性の LH 放出能は、Kp-54 の用量依存的に上昇し (図 11A-B)、さらに Kp-54 の 10 nmol/kg では、対照群と比較して有意な上昇を示した (図 11A)。atrazine 投与は GnRH mRNA の発現量には影響を及ぼさず、一方で GnRH 神経細胞の活性を低下させることが示唆されている (Foradori et al., 2009a)。高濃度の kisspeptin に対する反応性が上昇した原因として、GnRH 放出低下によって視床下部中の GnRH 含有量が増加していることに起因する可能性が考えられたが、本研究では視床下部の GnRH 含有量には影響がみられなかった。過去の報告では、無処置の雌ラットに atrazine を 4 日間投与した後の正中隆起 (median eminence : ME)における GnRH 含有量が増加することが示されている (Cooper et al., 2007)。ME には GnRH 神経の末梢部分が局在していることから (Herbison, 1998)、atrazine によって GnRH 分泌能が低下し放出できていない GnRH が貯留した状態である可能性が考えられる。本研究では、視床下部全体での GnRH 含有量を測定したため、わずかなあるいは局所的な GnRH 放出能低下に対する変化を捉え切れていないのかもしれない。

ここまでの結果から、atrazine 投与によって GnRH の合成/放出から LH 分泌までの機能に影響はみられないことが示唆され、また過去の知見とも矛盾しない結果であった。そこで次に、2) GnRH の上位のシグナル系、すなわち kisspeptin への影響を検討した。

ラット視床下部には二種類の kisspeptin 神経細胞が存在することが知られている。一つは ARC に雌雄共に存在してステロイドホルモンのネガティブフィードバックを

受けて GnRH/LH のパルス状分泌に寄与する。もう一つは AVPV に雌のみに存在する kisspeptin 神経細胞である。雌ラットの AVPV における kisspeptin 神経細胞は、E2 のポジティブフィードバックを kisspeptin 神経細胞上に発現する ER α を介して受けた後、*Kiss1* 遺伝子発現量を増加し、それに引き続き GnRH をサージ状分泌させることが知られている (Maeda et al., 2007)。Atrazine 投与による視床下部 AVPV 中の kisspeptin に対する影響を明らかにするために、*Kiss1* mRNA の発現量を調べたところ、atrazine 投与による *Kiss1* mRNA 発現量の有意な低下が認められた (図 12A)。*Kiss1* mRNA の発現量と kisspeptin ペプチド産生量や kisspeptin 神経細胞からの kisspeptin 放出量との関係についてはほとんど調べられていないが、Hu らは AAV ウイルスを用いて *Kiss1* に対するアンチセンスオリゴ核酸を AVPV に局所投与することで、LH サージが消失することを示しており (Hu et al., 2015)、atrazine 投与による *Kiss1* mRNA 発現量の低下が kisspeptin 産生量の低下につながり、結果的に LH サージ状分泌の減弱につながったと考えることは妥当である。もっとも、kisspeptin 神経細胞自体の活性化については本研究では検討出来ておらず、kisspeptin 神経細胞からの GnRH 神経細胞への kisspeptin 放出低下についても検討できていない。これらの点については今後詳細な検討が必要である。Goldman らの報告では、本実験結果とは異なり、OVX+E2 ラットに atrazine を 4 日間投与後の視床下部 AVPV 中の *Kiss1* mRNA 発現量は影響がないことが示唆されている (Goldman et al., 2013)。本研究では atrazine により *Kiss1* mRNA 発現が低下しており、結果の相違の理由は不明である。一つの可能性として、LH サージ減弱モデルの作製方法および採材時期の違いが考えられる。Goldman らの研究では、OVX および E2 の持続投与実施と同時に atrazine 投与を開始しており、さらに E2 の持続投与は 4 日間実施されている (Goldman et al., 2013)。一方、本研究では OVX 施術し回復期間を設けた後に、まず atrazine のみの反復投与を開始し、atrazine 投与 3 日目 (採材の 2 日前) から E2 の持続投与を開始し、E2 持続投与 2 日目採材した。雌ラットは通常 4–5 日のサイクルで発情するが、OVX ラットに高濃度の E2 を持続投与することで連続発情および毎日のサージ様 LH 放出を引き起こすことが可能である。しかしながら、そのサージ様 LH 放出は E2 持続投与開始 3 日目から急激に減少することが報告されていることから (Tsukamura et al., 1988)、OVX+E2 ラットにおける LH サージ様放出能が実験条件により異なる可能性が考えられ、これらが Goldman らの報告との相違の原因であるかもしれない。

Kiss1 mRNA 発現は、E2 のポジティブフィードバックを ER α が受け取ることで制御されている。本実験では、OVX+E2 条件下における血漿中 E2 濃度は対照群と比較して差がないことから、ER α への結合を atrazine が阻害する可能性もしくは E2 の ER α 結合後の作用に対する atrazine の抑制的作用が考えられた。McMullin らによるラット

視床下部を用いた *in vitro* 受容体結合試験では、125 mg/kg の atrazine を投与した場合の脳内 atrazine の C_{max} が約 0.3 μM (64.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 相当)に対して、結合阻害定数 (K_i 値)は 0.2 mM (43.2 mg/mL)と atrazine 脳内濃度の 660 倍以上の濃度であったことから (Albanito et al., 2015; T. S. McMullin et al., 2004)、生体内における atrazine の $\text{ER}\alpha$ への阻害活性は無視できると示唆される。一方で、 $\text{ER}\alpha$ とは別の G タンパク質共役型エストロゲン受容体である GPR30 を atrazine が阻害することが示唆されている (Albanito et al., 2015)。しかしながら、Treen らは、AVPV の *Kiss1* 発現は GPR30 非依存的であると報告していることから (Treen et al., 2016)、本研究における *Kiss1* 発現低下は、atrazine による $\text{ER}\alpha$ 阻害もしくは GPR30 シグナル阻害には起因しないと考えられた。今後、E2- $\text{ER}\alpha$ 結合後の下流のシグナルに対する干渉や *Kiss1* の $\text{ER}\alpha$ 領域のエピジェネティックな影響などの検討が、atrazine による LH サージ減弱の機作解明に繋がると考えられた。さらに本研究では、ARC の *Kiss1* 発現には影響はみられなかった (図 12B)。Foradori らは、OVX ラットにおいて atrazine 曝露によって LH パルスが減弱することを報告している (Foradori et al., 2009b)。ARC の *Kiss1* 発現は、エストロゲンの負のフィードバックによって制御されると考えられている (Oakley et al., 2009)。よって、本研究における高濃度の E2 存在下、すなわち少なくとも基礎レベルでの ARC の *Kiss1* 発現およびそれに伴う LH 分泌には影響を及ぼさない可能性が示唆された。今後、AVPV および ARC 領域の kisspeptin 神経細胞における E2- $\text{ER}\alpha$ 結合領域に着目した分子メカニズムの解明が期待される。

前述の通り、ヒトの atrazine 曝露による直接的な健康被害との因果関係を証明した報告は見当たらない。化学物質のヒトに対する安全性評価には、非臨床安全性試験から求められる NOAEL (No observable adverse effect level)からヒトにおける一日許容量が算出される。2015 年の日本産業衛生学会の許容濃度等に関する委員会資料によると、2 年間の atrazine の混餌投与試験で雌ラットの NOAEL は 70 ppm (3.5 mg/kg 相当)であったことから、ラットとヒトの種差に関する不確実係数を 10 と仮定して、ヒトの一日許容摂取量を 0.35 mg/kg と算出されている (日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会, 2015)。実際に atrazine を扱う工場における職業性曝露は、10 – 700 $\mu\text{M}/\text{workshift}$ (8h) (体重 50kg で換算した場合、最大 0.0004 mg/kg/day 相当)と報告されているが (Catenacci et al., 1993)、ヒト女性が職業性曝露することによる生殖機能に対する影響に関する報告は見当たらない。本研究では、atrazine の短期間曝露における生殖機能に対する毒性発現の機作解明を GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に着目し研究するために atrazine を高用量で曝露させたが、今後、さらにヒト女性における生殖機能の影響の可能性を評価する上ではヒトにおける職業性曝露量付近の用量を含め、さらに長期間曝露における毒性発現の有無および機作解明が重要であると考えられた。

以上の結果から、atrazine 投与による LH サージの減弱には kisspeptin 神経が関与し、特に *Kiss1* 遺伝子の転写レベルでの抑制が起こったことによる kisspeptin の分泌量低下が GnRH/LH サージの減弱を引き起こした可能性が示唆された。今後、atrazine による *Kiss1* 発現抑制の作用機序および kisspeptin ペプチドの産生・分泌能についてより詳細に検討することで、atrazine 投与による影響をより明らかにすることができると考えられた。

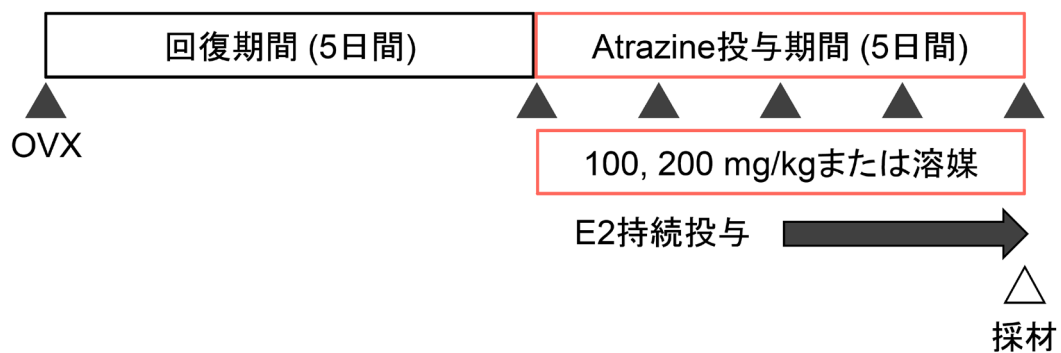


図 8. 第 2 章における実験概要

正常性周期が確認された雌ラットに OVX を施し、5 日間の回復期間を設けた。その後、100 および 200 mg/kg の atrazine の 5 日間反復経口投与を開始した。Atrazine 投与 3 日目に背部皮下に E2 充填チューブを埋め込み、その後 atrazine 投与 5 日目 (E2 持続投与 2 日目)に各実験に用いた。

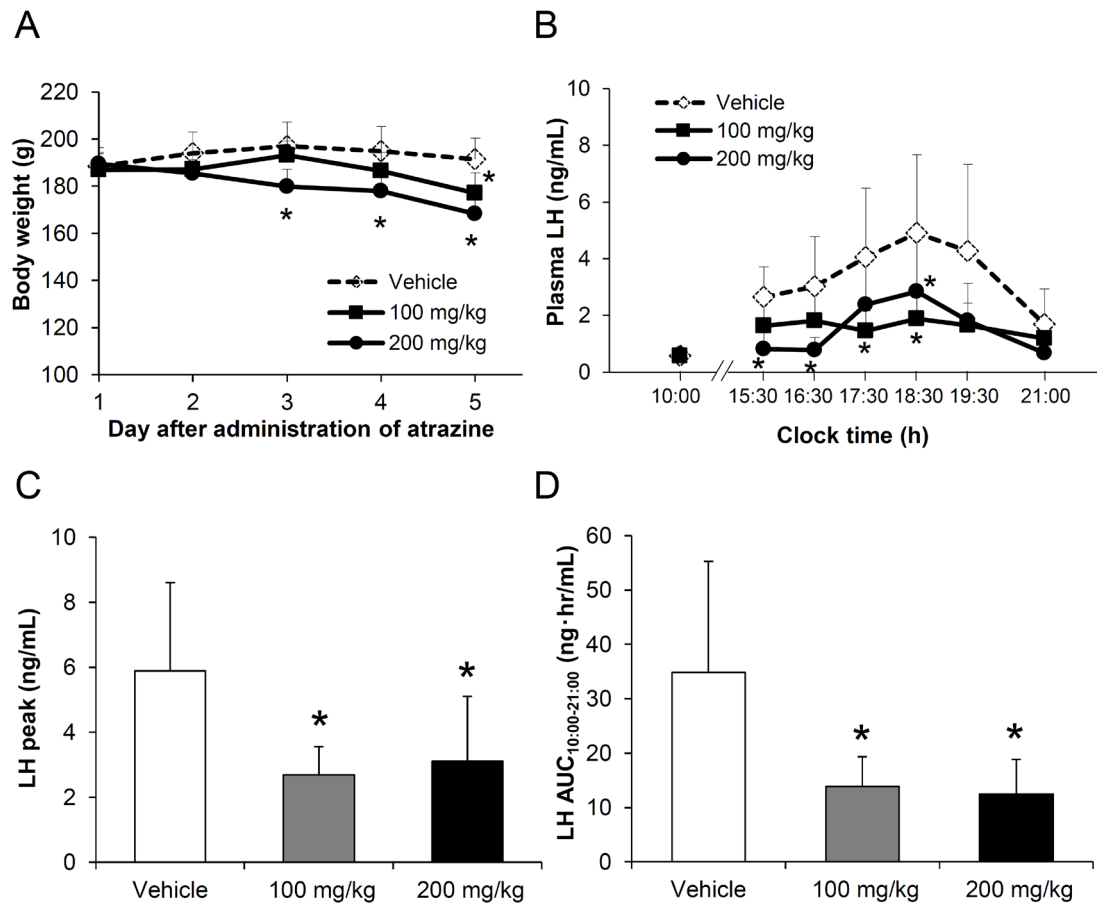


図 9. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による体重および LH サージに対する影響

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日、5 日間反復投与期間の体重 (A) *; $p < 0.05$ vs. vehicle control. (two-tailed Williams' or the Shirley-Williams test)。Atrazine 投与 5 日目の血漿中 LH 濃度 (B)、LH ピーク濃度 (C) および LHAUC_{10:00-21:00} (D)。Two-way repeated measures 2-way analysis of variance (AVOVA) (B) もしくは one-way ANOVA test (C, D) において $p < 0.05$ を示した差について two-tailed Williams' or the Shirley-Williams test を実施した。*; $p < 0.05$ vs. vehicle control. 各群 6 匹の平均値 ± 標準偏差 (SD) として示した。

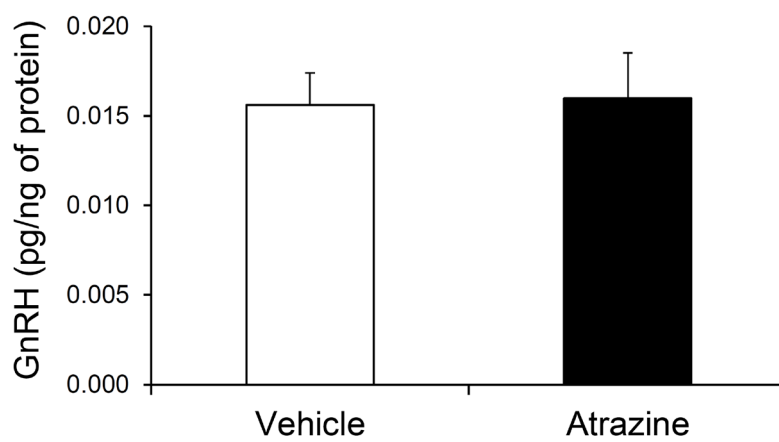


図 10. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による視床下部 GnRH 含量に対する影響

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日、5 日間反復投与した後の視床下部中 GnRH 含量。各群 6 匹の平均値±標準偏差 (SD)として示した。統計学的有意差はみられなかった。

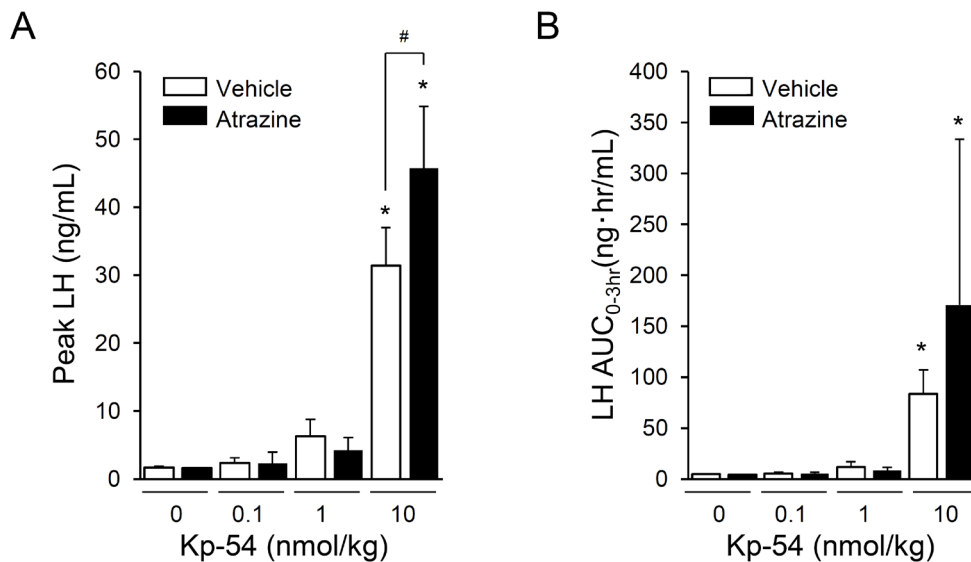


図 11. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による GnRH 神経細胞の Kp-54 に対する反応性への影響

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日、5 日間反復投与後の 11:00 に Kp-54 を単回皮下投与した。Kp-54 投与前ならびに投与後 1, 2 および 3 時間後の血漿中 LH ピーク濃度 (A) 及び LHAUC_{0-3hr} (B)。各群 5-6 匹の平均値±標準偏差 (SD) として示した [Dose of Kp-54: 0 nmol/kg (n = 5 in each group), 0.1 nmol/kg (vehicle: n = 5, atrazine: n = 6), 1 nmol/kg (n = 6 in each group)]。*; $p \leq 0.05$ (Williams' or Shirley-Williams test) vs. the 0 nmol/kg group. #; $p \leq 0.05$ (t test) vs. the vehicle control.

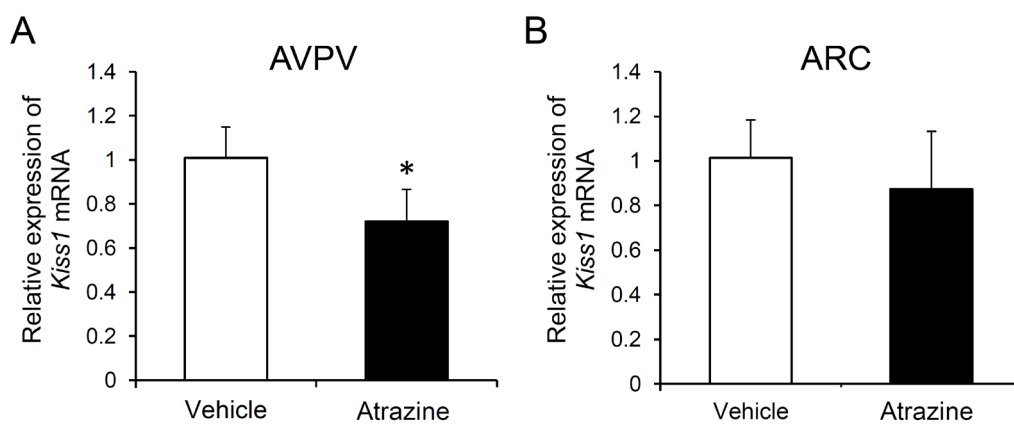


図 12. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による視床下部 AVPV 及び ARC の *Kiss1* mRNA 発現に対する影響

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日、5 日間反復投与後の視床下部 AVPV (A)および ARC (B)における *Kiss1* mRNA 発現量。各群 6-7 匹 (vehicle: n = 6, ATR: n = 7) の平均値±標準偏差 (SD)として示した。* indicates $p \leq 0.05$ (t test) vs. the vehicle control.

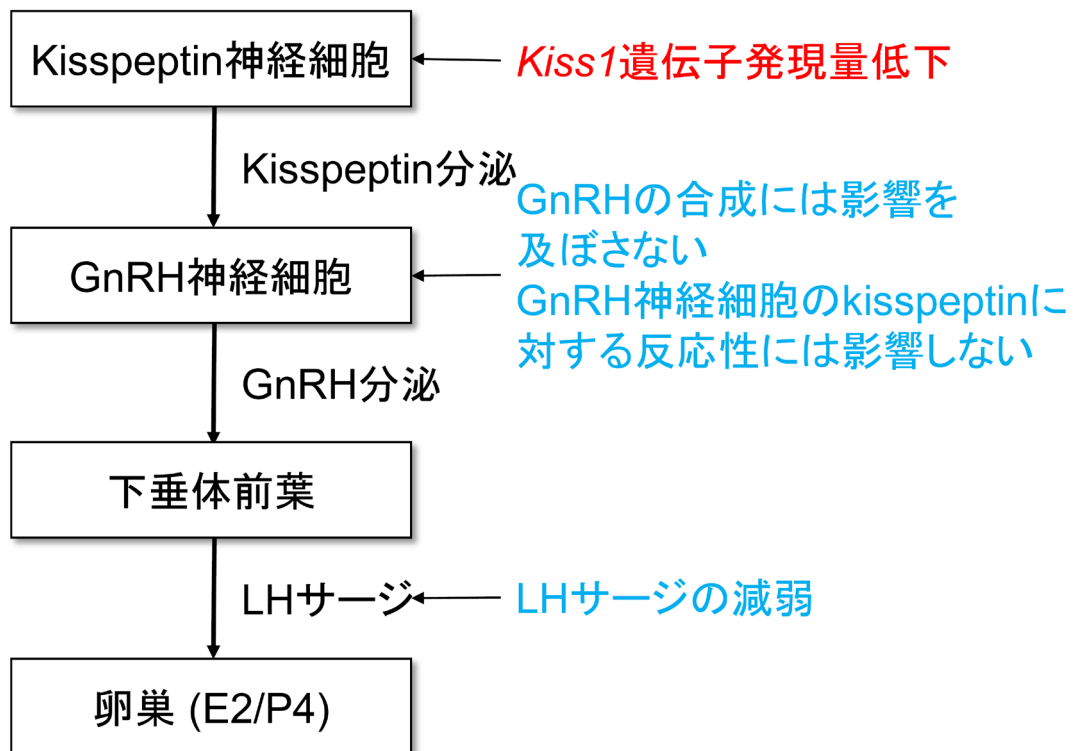


図 13. 第2章考察の概要

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日 反復投与した結果、GnRH 神経 Kp-54 に対する反応性には影響を及ぼさず、LH サージの減弱には atrazine による AVPV の *Kiss1* 遺伝子発現量の低下が関与している可能性が示唆された。

表 7. OVX+E2 ラットの atrazine 投与による一般状態に対する影響

Test article	Vehicle	Atrazine	Atrazine
Dose (mg/kg/day)	0	200	400
No. of animals	5	5	5
Pretreatment period			
Normal	5	5	5
Treatment period			
Normal	5	1	0
Emaciation	0	0	1 (day8)
Decrease in locomotor activity	0	0	1 (day4)
Soiled fur	0	0	1 (day5)
Ptosis	0	0	1 (day4)
Decrease in feces	0	4 (day3-5)	5 (day1-5)

OVX+E2 ラットに 100 mg/kg の atrazine を 1 回/日反復投与し、非投与日は 1 日 1 回、投与日は 1 日 2 回以上 (投与前および投与後約 1 時間)一般状態観察を実施した。数値は、それぞれ観察された個体を示した。

5 総合考察

本研究は、雌ラットの atrazine 曝露による生殖機能に対する影響を明らかにすることを目的とした。まず、無処置の雌ラットにおける影響を性周期、卵巢機能及び LH 分泌を指標とした視床下部の kisspeptin 反応性に着目した研究を行った（第 1 章）。次に、GnRH/LH サージに対する影響を明らかにするために、高濃度 E2 を持続投与させた OVX ラットモデルにおける GnRH 神経細胞及び kisspeptin 神経細胞に対する影響に着目した研究を行った（第 2 章）。

第一章では、まず、雌ラットに 200 mg/kg/日の atrazine を反復投与した結果、投与 6 日頃から性周期の停止等の異常性周期がみられた。Atrazine 投与約 3 週間後の卵巢ホルモンは、対照群と比較して、血漿中 E2 濃度には差がみられず、一方で血漿中 P4 濃度は統計学的有意な上昇を示したことから、atrazine 投与による卵巢機能の低下が示唆された。また、投与約 3 週間後まで持続して異常性周期がみられた個体では、黄体数の増加および排卵数の低下がみられた。次に GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性を調べるために、atrazine 反復投与後に Kp-54 を単回皮下投与し、その後の血漿中 LH 濃度を測定した。その結果、血漿中 LH 濃度は atrazine 投与群では対照群と比較して低値であり、kisspeptin 反応性の低下が認められた。生理的な LH サージは図 3 に示した通り、視床下部の kisspeptin 神経細胞から放出される kisspeptin が GnRH 神経細胞を刺激し、そこから放出される GnRH が下垂体を刺激することで誘発される。また、このような LH サージは、卵巢より分泌されるステロイドホルモンが正のフィードバックを視床下部に送ることで誘発される。Kisspeptin は GnRH 神経細胞の生理機能を評価可能なペプチドであり、雌ラットに kisspeptin の 100 nmol/kg を単回皮下投与すると、投与 2 時間後をピークとした一過性の LH サージ様の分泌が生じることが報告されている (Ishii et al., 2013)。一方で、kisspeptin による LH の分泌には高濃度の E2 が必要であることが示唆されており (Pielecka-Fortuna et al., 2007)、本研究での異常性周期を示した個体における kisspeptin を単回投与後の一過性の LH の上昇が誘発されなかった原因として、E2 低下を介した影響およびあるいは GnRH 神経細胞自身の活性低下が考えられた。すなわち、atrazine 投与が雌ラット GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性低下につながることを示唆されたものの、atrazine 投与の卵巢機能に対する作用と、GnRH 神経細胞に対する作用とを区別して検討するには限界があった。

HPG 軸に対する atrazine の影響を検討した先行研究では、序論にも記述したように卵巢機能に対する知見は多い (Cooper et al., 1996)。そこで第二章では、atrazine の卵巢機能に対する影響を排除するために LH サージ研究に汎用されている OVX+E2 モデルを用いて、GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に対する影響を調べた。まず、OVX+E2 モデルラットに 100 及び 200 mg/kg/日の atrazine を 5 日間反復経口投与した結果、対照群と比較して有意な LH サージ放出の抑制を示した。次に、同モデルに

atrazine の 100 mg/kg/日を 5 日間反復経口投与した後に視床下部中 GnRH 含量を調べたところ、対照群と比較して差は認められなかった。同様に、atrazine を 5 日間投与したモデルラットに kisspeptin を単回皮下投与し、kisspeptin 投与後の血漿中 LH 濃度を測定した結果、atrazine 群は対照群と同等の LH 放出能を示したことから、GnRH 神経細胞の kisspeptin に対する反応性には影響を及ぼさないことが示唆された。一方で、視床下部 AVPV における Kiss1 mRNA の発現量は、対照群と比較して atrazine 群で有意な低下がみられた。雌ラットの AVPV における kisspeptin 神経細胞は、E2 のポジティブフィードバックを kisspeptin 神経細胞上に発現する ER α を介して受けた後、Kiss1 遺伝子発現量を増加し、それに引き続き GnRH をサージ状分泌させることが知られている (Maeda et al., 2007)。Kiss1 mRNA の発現量と kisspeptin ペプチド産生量や kisspeptin 神経細胞からの kisspeptin 放出量との関係についてはほとんど調べられていないが、Hu らは AAV ウイルスを用いて Kiss1 に対するアンチセンスオリゴ核酸を AVPV に局所投与することで、LH サージが消失することを示しており (Hu et al., 2015)、atrazine 投与による Kiss1 mRNA 発現量の低下が kisspeptin 産生量の低下につながり、結果的に LH サージ状分泌の減弱につながったと考えることは妥当である。Kiss1 mRNA 発現は、E2 のポジティブフィードバックを ER α が受け取ることで制御されている。本研究では、OVX+E2 条件下における血漿中 E2 濃度は対照群と比較して差がないことから、ER α への結合を atrazine が阻害する可能性もしくは E2 の ER α 結合後の作用に対する atrazine の抑制的作用が考えられた。McMullin らによるラット視床下部を用いた in vitro 受容体結合試験では、125 mg/kg の atrazine を投与した場合の脳内 atrazine の Cmax が約 0.3 μ M (64.8 μ g/mL 相当)に対して、結合阻害定数 (Ki 値)は 0.2 mM (43.2 mg/mL)と atrazine 脳内濃度の 660 倍以上の濃度であったことから (Albanito et al., 2015; T. S. McMullin et al., 2004)、生体内における atrazine の ER α への阻害活性は無視できると示唆される。一方で、ER α とは別の G タンパク質共役型エストロゲン受容体である GPR30 を atrazine が阻害することが示唆されている (Albanito et al., 2015)。しかしながら、Treen らは、AVPV の Kiss1 発現は GPR30 非依存的であると報告していることから (Treen et al., 2016)、本研究における Kiss1 発現低下は、atrazine による ER α 阻害もしくは GPR30 シグナル阻害には起因しないと考えられた。今後、E2-ER α 結合後の下流のシグナルに対する干渉や Kiss1 の ER α 領域のエピジェネティックな影響などの検討が、atrazine による LH サージ減弱の機作解明に繋がると考えられた。さらに本研究では、ARC の Kiss1 発現には影響はみられなかった。Foradori らは、OVX ラットにおいて atrazine 曝露によって LH パルスが減弱することを報告している (Foradori et al., 2009b)。ARC の Kiss1 発現は、エストロゲンの負のフィードバックによって制御されると考えられている (Oakley et al., 2009)。よって、本研究における高濃度の E2 存在下、すなわ

ち少なくとも基礎レベルでの ARC の *Kiss1* 発現およびそれに伴う LH 分泌には影響を及ぼさない可能性が示唆された。今後、AVPV および ARC 領域の kisspeptin 神経細胞における E2-ER α 結合領域に着目した分子メカニズムの解明が期待される。

前述の通り、ヒトの atrazine 曝露による直接的な健康被害との因果関係を証明した報告は見当たらない。化学物質のヒトに対する安全性評価には、非臨床安全性試験から求められる NOAEL からヒトにおける一日許容量が算出される。2015 年の日本産業衛生学会の許容濃度等に関する委員会資料によると、2 年間の atrazine の混餌投与試験で雌ラットの NOAEL は 70 ppm (3.5 mg/kg 相当)であったことから、ラットとヒトの種差に関する不確実係数を 10 と仮定して、ヒトの一日許容摂取量を 0.35 mg/kg と算出されている (日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会, 2015)。実際に atrazine を扱う工場における職業性曝露は、10 – 700 μ M/workshift (8h) (体重 50kg で換算した場合、最大 0.0004 mg/kg/day 相当)と報告されているが (Catenacci et al., 1993)、ヒト女性が職業性曝露することによる生殖機能に対する影響に関する報告は見当たらない。本研究では、atrazine の短期間曝露における生殖機能に対する毒性発現の機作解明を GnRH 神経細胞および kisspeptin 神経細胞に着目し研究するために atrazine を高用量で曝露させたが、今後、さらにヒト女性における生殖機能の影響の可能性を評価する上ではヒトにおける職業性曝露量付近の用量を含め、さらに長期間曝露における毒性発現の有無および機作解明が重要であると考えられた。

以上の結果から、atrazine 投与による LH サージの減弱には kisspeptin 神経が関与し、特に *Kiss1* 遺伝子の転写レベルでの抑制が起こったことによる kisspeptin の分泌量低下が GnRH/LH サージの減弱を引き起こした可能性が示唆された。今後、atrazine による *Kiss1* 発現抑制の作用機序および kisspeptin ペプチドの産生・分泌能についてより詳細に検討することで、atrazine 投与による影響をより明らかにすることができると考えられた。

本研究により、atrazine 投与による異常性周期の誘発には、卵巣機能低下を介した GnRH 神経細胞の kisspeptin 反応性低下による HPG 軸の異常の関与が示唆され、さらに LH サージの減弱には AVPV における *Kiss1* 遺伝子発現量の低下が関与している可能性が示唆された。

引用文献

- Abel, E. L., Opp, S. M., Verlinde, C. L., Bammler, T. K., and Eaton, D. L. (2004). Characterization of atrazine biotransformation by human and murine glutathione S-transferases. *Toxicol Sci*, *80*(2), 230-238. doi:10.1093/toxsci/kfh152
- Adachi, S., Yamada, S., Takatsu, Y., Matsui, H., Kinoshita, M., Takase, K., Sugiura, H., Ohtaki, T., Matsumoto, H., Uenoyama, Y., Tsukamura, H., Inoue, K., and Maeda, K. (2007). Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev*, *53*(2), 367-378.
- Albanito, L., Lappano, R., Madeo, A., Chimento, A., Prossnitz, E. R., Cappello, A. R., Dolce, V., Abonante, S., Pezzi, V., and Maggiolini, M. (2015). Effects of atrazine on estrogen receptor alpha- and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ Health Perspect*, *123*(5), 493-499. doi:10.1289/ehp.1408586
- Barr, G. D., and Barraclough, C. A. (1978). Temporal changes in medial basal hypothalamic LH-RH correlated with plasma LH during the rat estrous cycle and following electrochemical stimulation of the medial preoptic area in pentobarbital-treated proestrous rats. *Brain Res*, *148*(2), 413-423.
- Catenacci, G., Barbieri, F., Bersani, M., Ferioli, A., Cottica, D., and Maroni, M. (1993). Biological monitoring of human exposure to atrazine. *Toxicol Lett*, *69*(2), 217-222. doi:10.1016/0378-4274(93)90107-9
- Charlton, H. (2008). Hypothalamic control of anterior pituitary function: a history. *J Neuroendocrinol*, *20*(6), 641-646.
- Cooper, R. L., Laws, S. C., Das, P. C., Narotsky, M. G., Goldman, J. M., Lee Tyrey, E., and Stoker, T. E. (2007). Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, *80*(2), 98-112. doi:10.1002/bdrb.20110
- Cooper, R. L., Stoker, T. E., Goldman, J. M., Parrish, M. B., and Tyrey, L. (1996). Effect of atrazine on ovarian function in the rat. *Reprod Toxicol*, *10*(4), 257-264.
- Cooper, R. L., Stoker, T. E., Tyrey, L., Goldman, J. M., and McElroy, W. K. (2000). Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci*, *53*(2), 297-307.
- Cragin, L. A., Kesner, J. S., Bachand, A. M., Barr, D. B., Meadows, J. W., Krieg, E. F., and Reif, J. S. (2011). Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environ Res*, *111*(8), 1293-1301.

doi:10.1016/j.envres.2011.09.009

- Critchlow, V. (1958). Ovulation induced by hypothalamic stimulation in the anesthetized rat. *Am J Physiol*, 195(1), 171-174. doi:10.1152/ajplegacy.1958.195.1.171
- Eldridgea, J. C., Wetzel, L. T., and Tyrey, L. (1999). Estrous cycle patterns of Sprague-Dawley rats during acute and chronic atrazine administration. *Reprod Toxicol*, 13(6), 491-499.
- Foradori, C. D., Hinds, L. R., Hanneman, W. H., and Handa, R. J. (2009a). Effects of atrazine and its withdrawal on gonadotropin-releasing hormone neuroendocrine function in the adult female Wistar rat. *Biol Reprod*, 81(6), 1099-1105.
doi:10.1095/biolreprod.109.077453
- Foradori, C. D., Hinds, L. R., Hanneman, W. H., Legare, M. E., Clay, C. M., and Handa, R. J. (2009b). Atrazine inhibits pulsatile luteinizing hormone release without altering pituitary sensitivity to a gonadotropin-releasing hormone receptor agonist in female Wistar rats. *Biol Reprod*, 81(1), 40-45. doi:10.1095/biolreprod.108.075713
- Goldman, J. M., Davis, L. K., Murr, A. S., and Cooper, R. L. (2013). Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat: role of adrenal progesterone. *Reproduction*, 146(4), 305-314. doi:10.1530/REP-13-0011
- Harris, G. W. (1948). Electrical stimulation of the hypothalamus and the mechanism of neural control of the adenohypophysis. *J Physiol*, 107(4), 418-429.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., and Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8), 5476-5480.
doi:10.1073/pnas.082121499
- Herbison, A. E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev*, 19(3), 302-330. doi:10.1210/edrv.19.3.0332
- Hu, M. H., Li, X. F., McCausland, B., Li, S. Y., Gresham, R., Kinsey-Jones, J. S., Gardiner, J. V., Sam, A. H., Bloom, S. R., Poston, L., Lightman, S. L., Murphy, K. G., and OByrne, K. T. (2015). Relative Importance of the Arcuate and Anteroventral Periventricular Kisspeptin Neurons in Control of Puberty and Reproductive Function in Female Rats. *Endocrinology*, 156(7), 2619-2631. doi:10.1210/en.2014-1655
- Ishii, M. N., Matsumoto, K., Matsui, H., Seki, N., Matsumoto, H., Ishikawa, K., Chatani, F., Watanabe, G., and Taya, K. (2013). Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-related disappearance of LH surge in middle-age female rats. *Gen Comp Endocrinol*, 193, 121-129.
doi:10.1016/j.ygcen.2013.06.024
- Kaufman, D., and Blake, J. (1970). Degradation of atrazine by soil fungi. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(2), 73-80.

- Kinoshita, M., Tsukamura, H., Adachi, S., Matsui, H., Uenoyama, Y., Iwata, K., Yamada, S., Inoue, K., Ohtaki, T., Matsumoto, H., and Maeda, K. (2005). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology*, *146*(10), 4431-4436. doi:10.1210/en.2005-0195
- Korpraditskul, R., 片山, 新., and 鋤塚, 昭. (1993). 定常期にある土壤細菌によるアトラジンの分解. *日本農薬学会誌 (Journal of Pesticide Science)*, *18*(4), 293-298. doi:10.1584/jpestics.18.4_293
- LaPolt, P. S., Oikawa, M., Jia, X. C., Dargan, C., and Hsueh, A. J. (1990). Gonadotropin-induced up-and down-regulation of rat ovarian LH receptor message levels during follicular growth, ovulation and luteinization. *Endocrinology*, *126*(6), 3277-3279.
- Maeda, K., Adachi, S., Inoue, K., Ohkura, S., and Tsukamura, H. (2007). Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. *Rev Endocr Metab Disord*, *8*(1), 21-29. doi:10.1007/s11154-007-9032-6
- Marshall, F., and Verney, E. (1936). The occurrence of ovulation and pseudo - pregnancy in the rabbit as a result of central nervous stimulation. *J Physiol*, *86*(3), 327-336.
- Matsui, H., Takatsu, Y., Kumano, S., Matsumoto, H., and Ohtaki, T. (2004). Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, *320*(2), 383-388. doi:10.1016/j.bbrc.2004.05.185
- Matsui, H., Tanaka, A., Yokoyama, K., Takatsu, Y., Ishikawa, K., Asami, T., Nishizawa, N., Suzuki, A., Kumano, S., Terada, M., Kusaka, M., Kitada, C., and Ohtaki, T. (2012). Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KISS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology*, *153*(11), 5297-5308. doi:10.1210/en.2012-1388
- McMullin, T. S., Andersen, M. E., Nagahara, A., Lund, T. D., Pak, T., Handa, R. J., and Hanneman, W. H. (2004). Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague-Dawley rats without changing estrogen receptor action. *Toxicological Sciences*, *79*(2), 278-286.
- McMullin, T. S., Andersen, M. E., Nagahara, A., Lund, T. D., Pak, T., Handa, R. J., and Hanneman, W. H. (2004). Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague-Dawley rats without changing estrogen receptor action. *Toxicol Sci*, *79*(2), 278-286. doi:10.1093/toxsci/kfh127
- Moreland, D. E., Gentner, W. A., Hilton, J. L., and Hill, K. L. (1959). Studies on the Mechanism of Herbicidal Action of 2-Chloro-4,6-Bis(Ethylamino)-S-Triazine. *Plant Physiol*, *34*(4), 432-435.

- Mowa, C. N., and Iwanaga, T. (2000). Differential distribution of oestrogen receptor-alpha and -beta mRNAs in the female reproductive organ of rats as revealed by in situ hybridization. *J Endocrinol*, 165(1), 59-66.
- Munger, R., Isacson, P., Hu, S., Burns, T., Hanson, J., Lynch, C. F., Cherryholmes, K., Van Dorpe, P., and Hausler, W. J., Jr. (1997). Intrauterine growth retardation in Iowa communities with herbicide-contaminated drinking water supplies. *Environ Health Perspect*, 105(3), 308-314. doi:10.1289/ehp.97105308
- Nakamura, K., Minegishi, T., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y., and Igarashi, M. (1991). Hormonal regulation of gonadotropin receptor mRNA in rat ovary during follicular growth and luteinization. *Mol Cell Endocrinol*, 82(2-3), 259-263.
- Nishimura, O., Suenaga, M., Yamada, T., Itoh, T., Koyama, N., Wakimasu, M., Ohtaki, T., Kitada, C., and Fujino, M. (2001). Bio-organic synthesis of a newly isolated peptide metastin, metastasis suppressor gene KiSS-1 processing product. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*(15), 1748-1750. doi:10.1039/B104948H
- Oakley, A. E., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2009). Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev*, 30(6), 713-743. doi:10.1210/er.2009-0005
- Official-journal-of-the-European-union. (2004). COMMISSION DECISION of 10 March 2004 concerning the non-inclusion of atrazine in Annex I to Council Directive 91/414/EEC and the withdrawal of authorisations for plant protection products containing this active substance.
- Ohtaki, T., Shintani, Y., Honda, S., Matsumoto, H., Hori, A., Kanehashi, K., Terao, Y., Kumano, S., Takatsu, Y., Masuda, Y., Ishibashi, Y., Watanabe, T., Asada, M., Yamada, T., Suenaga, M., Kitada, C., Usuki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001). Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, 411(6837), 613-617. doi:10.1038/35079135
- Paxinos, G., and Watson, C. (2004). *The rat brain in stereotaxic coordinates-the new coronal set*: Academic press.
- Pielecka-Fortuna, J., Chu, Z., and Moenter, S. M. (2007). Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology*, 149(4), 1979-1986.
- Sass, J. B., and Colangelo, A. (2006). European Union bans atrazine, while the United States negotiates continued use. *Int J Occup Environ Health*, 12(3), 260-267. doi:10.1179/oeht.2006.12.3.260
- Seminara, S. B. (2005). Metastin and its G protein-coupled receptor, GPR54: critical pathway modulating GnRH secretion. *Front Neuroendocrinol*, 26(3-4), 131-138. doi:10.1016/j.yfrne.2005.10.001

- Shibayama, H., Kotera, T., Shinoda, Y., Hanada, T., Kajihara, T., Ueda, M., Tamura, H., Ishibashi, S., Yamashita, Y., and Ochi, S. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 14) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of atrazine in female rats. *J Toxicol Sci*, 34 Suppl 1, SP147-155.
- Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R., and Walsh, W. C. (1970). Glutathione conjugation: atrazine detoxication mechanism in corn. *Plant Physiol*, 46(1), 103-107.
- Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K., and Steiner, R. A. (2005). Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology*, 146(9), 3686-3692. doi:10.1210/en.2005-0488
- Strauss, J. F., and Barbieri, R. L. (2013). *Yen & Jaffes reproductive endocrinology E-book: physiology, pathophysiology, and clinical management (Expert Consult-Online and Print)*: Elsevier Health Sciences.
- Treen, A. K., Luo, V., Chalmers, J. A., Dalvi, P. S., Tran, D., Ye, W., Kim, G. L., Friedman, Z., and Belsham, D. D. (2016). Divergent Regulation of ER and Kiss Genes by 17beta-Estradiol in Hypothalamic ARC Versus AVPV Models. *Mol Endocrinol*, 30(2), 217-233. doi:10.1210/me.2015-1189
- Tropp, J., and Markus, E. J. (2001). Effects of mild food deprivation on the estrous cycle of rats. *Physiol Behav*, 73(4), 553-559.
- Tsukamura, H., Maeda, K. I., and Yokoyama, A. (1988). Effect of the suckling stimulus on daily LH surges induced by chronic oestrogen treatment in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol*, 118(2), 311-316.
- Villanueva, C. M., Durand, G., Coutte, M. B., Chevrier, C., and Cordier, S. (2005). Atrazine in municipal drinking water and risk of low birth weight, preterm delivery, and small-for-gestational-age status. *Occup Environ Med*, 62(6), 400-405. doi:10.1136/oem.2004.016469
- 小林裕子. (2000). 農薬の残留性と残効性. *マテリアルライフ*, 12(3), 120-125.
- 日本産業衛生学会 許容濃度等に関する委員会. (2015). 許容濃度の暫定値 (2015) の提案理由. *産業衛生学雑誌*, 57(4), 173-217. doi:10.1539/sangyoeisei.S15002

謝辞

本研究は沢山の方々の支えにより遂行されました。筑波大学生命環境科学研究科の熊谷嘉人教授には、私を社会人大学院生として迎え入れて下さり、研究の可視化や理論構築など懇切なるご指導ご鞭撻を賜り、心より感謝申し上げます。同研究科の新開泰弘准教授にもご指導ご鞭撻を賜り、また実務の面でも大変お世話になりました。心より感謝申し上げます。本論文の審査過程におきまして、多くのご助言ご指導を賜りました、小池英子教授、Tin-Tin Win-Shwe 教授に心より感謝申し上げます。

本研究のほぼすべては、武田薬品工業株式会社薬剤安全性研究所で実施されたものであり、また多くの動物の命の犠牲の上に遂行されました。心から感謝いたします。そして遂行にあたり、多くの研究者の協力を頂きました。本研究を開始するにあたり、石井美沢博士には多くのことをご指導とご助言と頂き、各検査、施術、脳サンプル抽出を含め多大なるご指導を頂き、本当に心から感謝しております。また、動物飼育、各検査、モデル動物作製に関して関将章氏、山下輝芳氏、各検査全般のみならず実務の面、そして精神的なサポートも頂いた左海友美氏、調製検体全般に関して神田一男氏、調製検体分析に関して栗辻啓文氏に大変お世話になりました。心から感謝申し上げます。また旧生殖毒性グループ員である杉本武志氏、山内俊明氏、和泉祐子氏、市川あおい博士、城塚康毅氏には各種実験をサポート頂きました。旧生殖毒性グループリーダーである松本清博士には、入社当時から多くの研究の機会を与えて頂き、本研究全般に渡りご指導とご協力をして頂きましたことを心から感謝申し上げます。現在所属するグループの奥田照明博士、篠澤忠紘博士、宮本実博士、穴山久志博士には、仕事と学業の両立をサポートして頂き、本研究全般に渡りご指導とご協力をして頂きましたことを心から感謝申し上げます。松井久典博士には、研究全般に渡りまして惜しみないご指導を頂き、心から感謝申し上げます。ホルモン測定全般に関して、TNT株式会社の加藤寿子氏、実務全般につきまして筑波大学生命環境科学研究科秘書の広瀬玲子氏に心から感謝しております。

最後に、常に精神的なサポートしてくれた家族に心から感謝いたします。

入社以来、非常に恵まれた環境で長年に渡り、本研究の遂行を支えてくださった研究員の皆さん、また入学以来ご指導いただきました先生方、すべての方に心より深く感謝申し上げます。本当にありがとうございました。次は、少しでも私が支えとなれますよう今後とも努力する所存です。

参 考 论 文

Research Article

Reduction of *Kiss1* expression in the anteroventral periventricular nucleus is associated with atrazine-induced attenuation of the luteinizing hormone surge in female rats

Maya Kimura¹, Misawa Niki Ishii¹, Nobuyuki Seki¹, Yumi Sakai¹,
Teruyoshi Yamashita¹, Hirofumi Awatsuji¹, Kazuo Kanda¹,
Kiyoshi Matsumoto¹ and Hisanori Matsui^{2,*}

¹Drug Safety Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Ltd, Fujisawa, Kanagawa, Japan and ²Extra Value Generation Drug Discovery Unit, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Ltd, Fujisawa, Kanagawa, Japan

***Correspondence:** Extra Value Generation Drug Discovery Unit, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Ltd, 2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa, Kanagawa 251–8555, Japan. Tel: +81-466-32-1913; E-mail: hisanori.matsui@takeda.com

Edited by Dr. T. Rajendra Kumar, PhD, University of Colorado Anschutz Medical Campus

Received 13 March 2018; Revised 1 July 2018; Accepted 11 July 2018

Abstract

Atrazine, a commonly used herbicide, suppresses the luteinizing hormone (LH) surge in female rats, although the underlying mechanism remains unclear. Kisspeptin, encoded by the *Kiss1* gene, is a hypothalamic peptide that controls gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release from the GnRH neurons. Kisspeptin neurons in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) are involved in regulating pre-ovulatory GnRH and LH surge. To clarify the effect of atrazine on the LH surge in female rats, we investigated its effects on hypothalamic GnRH and kisspeptin. Ovariectomized female rats in a high-dose estradiol supplementation model were orally administered vehicle or 100 mg/kg of atrazine once daily for 5 days. This attenuated the LH surge but did not affect baseline LH levels, with no difference in hypothalamic GnRH levels between the vehicle-treated and atrazine-treated animals. After the fifth treatment, subcutaneous administration of kisspeptin (at 0, 0.1, 1, and 10 nmol/kg) induced a dose-dependent LH release almost equivalent in the vehicle- and atrazine-treated animals, suggesting that GnRH neurons maintain normal responsiveness to kisspeptin. However, *Kiss1* mRNA expression levels in the AVPV were significantly reduced in the atrazine-treated animals. Given the normal response of GnRH neurons to exogenously administered kisspeptin, the suppressive effect of atrazine may be explained by suppression of *Kiss1* expression in the AVPV leading to the attenuation of kisspeptin release from kisspeptin neurons in the AVPV. Further studies are warranted to elucidate more precisely the mechanism of atrazine's involvement in the suppression of *Kiss1* mRNA expression in the AVPV.

Summary Sentence

The reduction of *Kiss1* expression in the AVPV causes the atrazine-induced attenuation of the LH surge in female rats.

Key words: atrazine, kisspeptin, *Kiss1*, anteroventral periventricular nucleus, luteinizing hormone, gonadotropin-releasing hormone.

Introduction

Atrazine (ATR), a commonly used herbicide, is known to affect reproductive function in female animals. For example, it has been reported to suppress the pre-ovulatory luteinizing hormone (LH) surge in female rats [1, 2]. These animal studies begin to provide insights into the epidemiological observations such as the relationship between chronic exposure to ATR in drinking water and reproductive function (e.g. menstrual cycles and LH release) in women [3]. For ovulation, hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons secrete GnRH in a surge, which stimulates the pituitary gonadotroph and leads to the surge release of LH, which eventually triggers ovulation. This surge is induced by the positive feedback action of estrogens released from the ovaries [4]. Thus, the GnRH/LH surge requires coordinated action by the hypothalamus, pituitary, and ovaries. Several lines of evidence suggest that the site of action of ATR is the hypothalamus. Studies have shown that ATR does not attenuate the pituitary responsiveness to GnRH agonists in ovariectomized (OVX) female rats [1, 5], but that ATR suppressed GnRH neuronal activation in OVX female rats in an estradiol benzoate and progesterone supplementation model [6]. Thus, a plausible explanation is that the suppression of LH surge by ATR is mediated by the GnRH neurons themselves and/or their upper stream components in the hypothalamus. However, the underlying mechanism has not been fully elucidated.

Kisspeptin, a hypothalamic peptide hormone encoded by the *Kiss1* gene, is the cognate ligand for the G protein-coupled receptor KISS1R (also known as GPR54) [7]. Kisspeptin plays a pivotal role in controlling the release of GnRH from GnRH neurons [8]. Rodents have two populations of kisspeptin neurons in the hypothalamus: in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) and in the arcuate nucleus (ARC). The kisspeptin neurons express estrogen receptor alpha ($ER\alpha$), and the expression of *Kiss1* mRNA in AVPV kisspeptin neurons is positively regulated by estrogens [9–13]. In addition, the AVPV kisspeptin neurons are activated during the GnRH/LH surge in both intact and estradiol (E2)-supplemented OVX rats [9, 14]. Thus, it has been proposed that AVPV kisspeptin neurons are the critical regulator for generating the GnRH/LH surge.

In this study, we sought to clarify the effect of ATR on LH surge by specifically focusing on the responsiveness of GnRH neurons to kisspeptin and the expression of AVPV *Kiss1* mRNA levels in OVX female rats with a high-dose E2 supplementation model.

Materials and methods

Animals

Female Jcl:Wistar rats were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) and were group-housed in cages and maintained on a 12-h light, 12-h dark cycle with lights on at 7:00. All had free access to solid food (CR-LPF, Oriental Yeast Co., Ltd, Tokyo, Japan) and tap water. Two weeks before the start of the experiments, the rats were moved to individual cages and vaginal smears were taken daily to monitor the estrous cycles. The rats that exhibited 4- or 5-day normal estrus cycles were then classified into three (Experiment 1) or two (Experiments 2–4) groups. All procedures were performed in accordance with the institutional guidelines for animal care at Takeda Pharmaceutical Company Ltd.

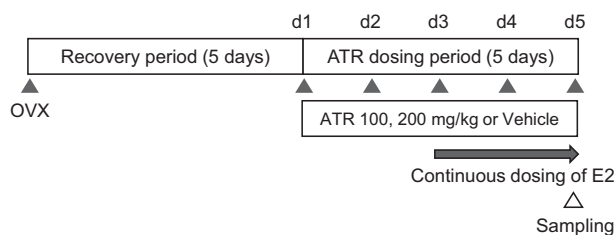


Figure 1. Schematic representation of the experimental protocol. The animals were ovariectomized bilaterally; 5 days later atrazine (ATR) or vehicle was administered orally by gavage once daily for five consecutive days. Seven days after ovariectomy (i.e. 3 days after the first administration of ATR), a silastic tube filled with crystalline E2 was implanted subcutaneously in the back of each rat. Two days after this (5 days after the first administration of ATR), bloods or brain samples were taken for the various experiments.

Materials

ATR was obtained from Tokyo Chemical Industry Company Ltd (Tokyo, Japan). Dosing suspensions of ATR were prepared in a vehicle of 0.5% w/v methylcellulose (MC) in distilled water. The control animals were gavaged daily with 0.5% w/v MC vehicle (5 ml/kg body weight). Kisspeptin-54 (Kp-54) was synthesized by Takeda Pharmaceutical Company Ltd (Osaka, Japan). Dosing solutions of Kp-54 were prepared in saline, and the control animals were subcutaneously injected with saline. β -Estradiol was obtained from Sigma-Aldrich, Japan (Tokyo, Japan).

Administration of ATR, and the OVX with high-dose E2 supplementation model

This study comprised four experiments, detailed in the following sections. For all the experiments, the OVX with high-dose E2 supplementation model (OVX + E2) was implemented as follows (Figure 1). The animals were ovariectomized bilaterally and, 5 days later, ATR or vehicle was administered orally by gavage once daily for five consecutive days. Seven days after ovariectomy (i.e. 3 days after the first administration of ATR), a silastic tube filled with crystalline β -estradiol was implanted subcutaneously in the back of each rat, as previously described [15]. Briefly, the silastic tubes (total length 25 mm, inner diameter 2.0 mm, outer diameter 3.0 mm; Kaneka Medix Corp., Osaka, Japan) were plugged with silicone adhesive at each end to leave a 2 cm length to be filled with E2 powder. All operations were performed under 2.5%–3% isoflurane inhalation anesthesia. Two days after the implantation of the E2 tubes (i.e. 5 days after the first administration of ATR), blood or brain samples were taken, as described for each experiment.

Observation of animals

All animals were observed for survival and obvious pharmacotoxic signs twice a day (before and 1 h after dosing) on the ATR dosing days and once a day on the nondosing days. Fecal abnormalities, feces quantity, and animal behavior in the cage were observed. The animals were then taken out of the cage, and clinical signs were observed by visual inspection and palpation, which were assessed in all groups. All animals were weighed on the ATR dosing days using an electronic balance (XS4002S, Mettler-Toledo K.K., Tokyo, Japan).

Experiment 1: Effect of ATR on body weight and the LH surge

In the first experiment, three groups of animals ($n = 6$ in each group) were administered vehicle or 100 or 200 mg/kg of ATR orally by gavage once daily for five consecutive days to create the OVX + E2 model. In several studies in female rats, the suppression of LH release was observed at 50, 100, and 200 mg/kg of ATR orally by gavage for 3–4 days [1, 2, 5, 6]. Moreover, in our preliminary experiment, the abnormal estrus cycle was observed at 200 mg/kg from around the day of the fifth treatment of ATR (data not shown). Therefore, in this study, the dosage levels of ATR for the initial experiments were set at 100 and 200 mg/kg orally by gavage for 5 days. The animals were weighed daily during the ATR dosing period. Blood samples for determination of the LH surge were collected at 10:00, 15:30, 16:30, 17:30, 18:30, 19:30, and 21:00 on the day of the fifth treatment of ATR, as previously described [15]. Blood was collected without anesthesia from the jugular vein, using heparinized syringes. Plasma was obtained by centrifugation and kept at -80°C until the radioimmunoassay. LH concentrations were determined using a National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney (NIDDK) rat LH RIA kit (Dr Parlow, Harbor-UCLA Medical Center, CA). The detection limit of these RIA kits was 0.08 ng/ml (LH). An increase in plasma LH level to greater than double the basal level was considered to be an LH surge. Based on the results of this experiment (described later), the subsequent experiments used 100 mg/kg of ATR and not 200 mg/kg.

Experiment 2: Effect of ATR on GnRH levels in the hypothalamus

The hypothalami were dissected, as previously described [16], from the brains of euthanized OVX + E2 animals between 11:30 and 13:00 on the fifth day of treatment with 100 mg/kg ATR or vehicle ($n = 6$ in each group), and weighed immediately after tissue collection. The samples were boiled for 5 min in 1 ml distilled water (DW), and then chilled on ice until sample homogenization. After homogenization in DW, a 1:16 volume of glacial acetic acid (WakoPure Chemical Industries, Tokyo, Japan) was added to the homogenate, which was gently rotated for 1 h at 4°C , followed by centrifugation. The supernatant from the hypothalamic homogenate was then applied to a Sep-Pak C18 column (Waters, Milford, MA), washed once with 1 M acetic acid in DW, and eluted with 60% acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid in DW. The elution was then lyophilized and stored at 30°C until the analysis. The level of GnRH and protein content were determined by using RIA (Bachem Peninsula, CA) and a Bradford-Protein Assay Kit (OZ Bioscience, CA), respectively. The detection limit of RIA kits for GnRH was 10 pg/ml. The GnRH level was normalized to the protein content.

Experiment 3: Effect of ATR on LH release in response to exogenous Kp-54 treatment

On the fifth day of treatment with 100 mg/kg ATR or vehicle, OVX + E2 animals were administered Kp-54 subcutaneously at 0.1, 1, or 10 nmol/kg at 11:00, as previously described [15]. Control group rats received saline in the same manner. In total, there were eight groups, each with either five or six animals, as follows: vehicle + Kp-54 at 0 ($n = 5$), 0.1 ($n = 5$), 1 ($n = 6$), and 10 ($n = 5$) nmol/kg; ATR + Kp-54 at 0 ($n = 5$), 0.1 ($n = 6$), 1 ($n = 6$), and 10 ($n = 6$) nmol/kg.

Blood was collected before administering the Kp-54 or saline and at 1, 2, and 3 h after administration. Plasma LH concentrations were

determined using a rLH[125I]RIA kit (Institute of Isotopes Company Ltd, Budapest, Hungary). The detection limit of this RIA kit was 0.8 ng/ml.

Experiment 4: Effect of ATR on the expression of *Kiss1* mRNA in the AVPV and ARC

The expression of *Kiss1* mRNA in the AVPV and ARC were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR), as previously described [15]. On the fifth day of ATR treatment, at 11:30–12:30, the animals (vehicle, $n = 6$; ATR, $n = 7$) were sacrificed by exsanguination under 2.5%–3% isoflurane inhalation anesthesia. The brains were removed and sliced using a rat brain slicer (BrainScience Idea Co., Ltd, Osaka, Japan). Tissue samples containing the AVPV were sliced with a thickness of 2 mm, starting at a point 0 mm anterior to the bregma and punched out with a 1.5 mm-diameter biopsy needle (Kai Industries Co., Ltd, Gifu, Japan). The tissue samples containing the ARC (2-mm thickness) were dissected with a microknife; the anterior end of the ARC tissues was approximately 2.16 mm posterior to the bregma according to the rat brain atlas [17]. These samples were stored at -80°C . The total RNA was purified using RNeasy Minikits (QIAGEN, Valencia, CA), followed by first-strand cDNA synthesis using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Thermo Fisher Scientific, Waltham). The expression of rat mRNA for *Kiss1* and β -actin was determined by quantitative PCR (qPCR; 7900HT Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems, Foster, CA) using TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) for β -actin (Actb: Rn00667869_m1) and *Kiss1* (Rn00710914_m1). The mRNA expression levels were analyzed by the comparative cycle threshold method using β -actin as the internal control, and were expressed as relative expression levels in comparison to the vehicle controls.

Statistical analysis

Statistical significance was analyzed using SAS version 8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC). Data were presented as mean and standard deviation (SD) unless otherwise stated. The homogeneity of variance for multiple groups was analyzed by the F test (for two groups) or Bartlett's test (for multiple groups), and the differences were then analyzed by the Williams' test (parametric test), the Shirley-Williams test (nonparametric test) for dose-proportional data sets, or the t test (comparison between two groups), as described in the individual figure legends. The results demonstrated in Figure 2 were also initially analyzed using one- or two-way analysis of variance. Differences were considered statistically significant when P values were ≤ 0.05 .

Results

Experiment 1: Effect of ATR on clinical signs, body weight, and the LH surge

Three groups of OVX animals were administered with vehicle or 100 or 200 mg/kg of ATR for five consecutive days, with E2 supplementation starting on the third day. Diarrhea and a decrease in feces were observed transiently each in one animal at 200 mg/kg of ATR (Table 1). The body weights were significantly decreased by 7.5% and 12.1% at 100 and 200 mg/kg of ATR, respectively, compared to vehicle on day 5 (Figure 2A). Plasma LH levels were determined from samples taken at 10:00 and then intervals between 15:30 and 21:00 on day 5. This showed an E2-induced surge-like LH release in the control group, which was significantly attenuated in the 100

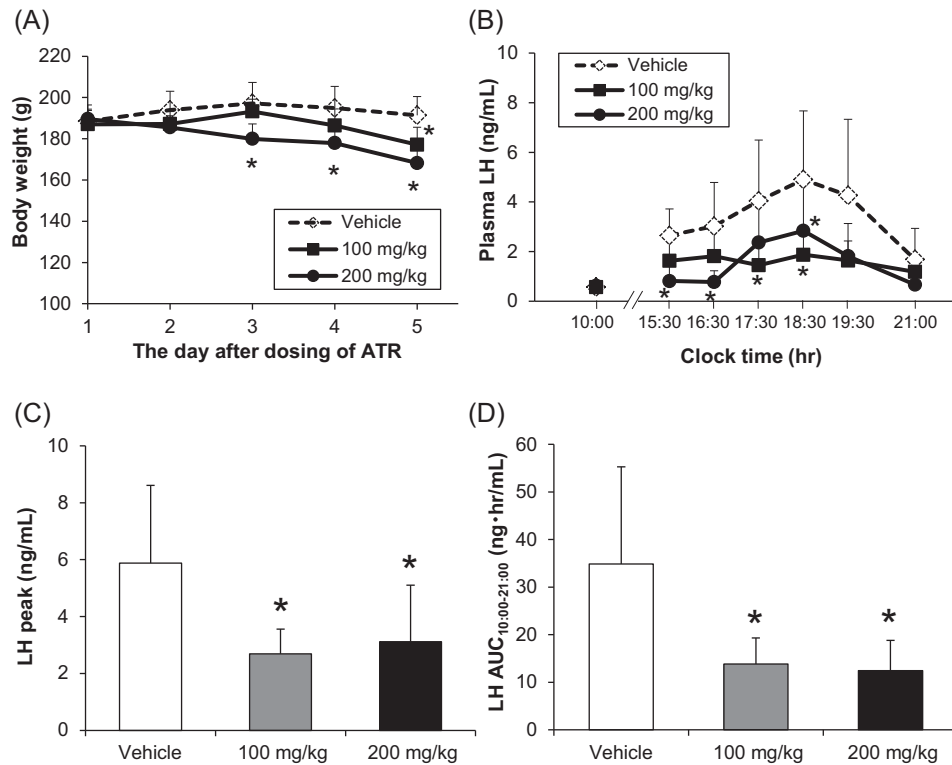


Figure 2. Effect of atrazine on body weight and the luteinizing hormone surge. The body weight after the administration of atrazine (ATR) (A). * indicates $P \leq 0.05$ (Williams' test or the Shirley-Williams test) vs. vehicle control. Plasma luteinizing hormone (LH) levels (B), LH peak level (C), and the area under the curve of the LH levels (D) at 10:00 as baseline and from 15:30 to 21:00 on the fifth day of ATR treatment. The hormone profiles were first analyzed by repeated measures 2-way analysis of variance (AVOVA) (A) or one-way ANOVA (B–D), and the main effect of dose and main effect of time were found to be significant ($P \leq 0.05$). The data were then analyzed by two-tailed Williams' test or the Shirley-Williams test. * indicates $P \leq 0.05$ vs. vehicle control. Data are presented as mean \pm SD ($n = 6$).

Table 1. Effect of atrazine on clinical signs.

Test article	Vehicle	Atrazine	Atrazine
Dose (mg/kg/day)	–	100	200
No. of animals	6	6	6
Pre-treatment period			
No. of animals	6	6	6
Normal	6	6	6
Treatment period			
No. of animals	6	6	6
Normal	6	6	4
Diarrhea	0	0	1 (day 2)
Decrease in feces	0	0	1 (days 2–3)

and 200 mg/kg ATR groups, with no significant difference between these two groups (Figure 2B–D). In female rats, the body weight reduction less than 10% was mild and not considered to affect the female reproductive cycles in multiple rat strains [18]. Based on these results, the dose level of ATR for the subsequent experiments was set at 100 mg/kg; this dose provided no abnormal clinical findings and sufficient attenuation of the E2-induced LH release in our rat model while minimizing any possible toxic effect.

Experiment 2: Effect of ATR on GnRH levels in the hypothalamus

To determine the hypothalamic GnRH levels, we evaluated GnRH contents in the hypothalamic samples collected between 11:30 and 13:00 with the intention of avoiding any endogenous GnRH/LH surge-dependent fluctuation of the GnRH contents [19]. No statistically significant difference in hypothalamic GnRH levels was observed between the vehicle-treated and ATR-treated animals (Figure 3).

Experiment 3: Effect of ATR on LH release in response to exogenous Kp-54 treatment

To investigate the dose responsiveness to exogenous Kp-54 treatment, we determined plasma LH levels in the vehicle-treated or the ATR-treated animals at 0, 1, 2, and 3 h after challenging 0, 0.1, 1, or 10 nmol/kg of Kp-54. Both the vehicle-treated and the ATR-treated animals showed a dose-dependent elevation of plasma LH concentration in a similar way following the subcutaneous administration of Kp-54 at 0.1, 1, and 10 nmol/kg. The peak plasma LH concentration at 10 nmol/kg for the ATR-treated animals was significantly higher than that for the vehicle-treated animals (Figure 4A). No statistically significant difference was observed between the vehicle-treated and ATR-treated animals in the area under the plasma LH concentration curve at any dose (Figure 4B).

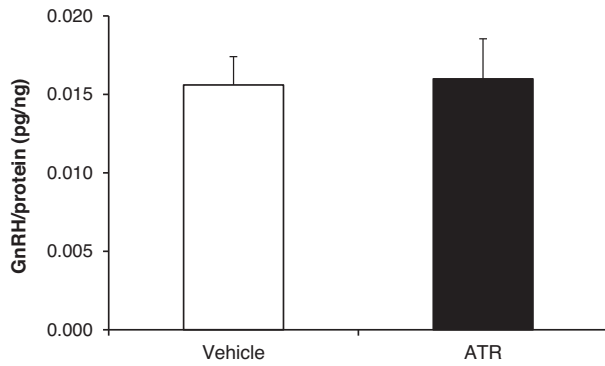


Figure 3. Effect of atrazine on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) levels in the hypothalamus. The level of GnRH in the hypothalamus on the fifth day of treatment with atrazine (ATR). Data are presented as mean \pm SD ($n = 6$). There was no significant difference from the vehicle control.

Experiment 4: Effect of ATR on the expression of *Kiss1* mRNA in the AVPV and ARC

Kiss1 mRNA levels in the punched-out brain tissue from the area containing the AVPV were significantly lower in the ATR-treated group than in the vehicle-treated group (Figure 5A). In addition, we also determined *Kiss1* mRNA levels in the ARC because there is another kisspeptin neural population, which has been suggested to regulate pulsatile GnRH/LH release under negative regulation by steroid hormones [8]. No statistically significant difference of *Kiss1* expression levels in ARC was observed between the vehicle-treated and ATR-treated animals (Figure 5B), suggesting that ATR preferentially affect *Kiss1* mRNA levels in AVPV than those in ARC in our experimental condition.

Discussion

In this study, we sought to clarify the effect of ATR on the LH surge in female rats by focusing on the hypothalamic kisspeptin-GnRH system in OVX + E2 model rats. In the initial experiment, we confirmed that E2 induced a surge-like release of LH and that a daily 5-day oral administration of ATR at 100 and 200 mg/kg attenuated this release. At 200 mg/kg of ATR, animals showed slight toxic effect as evidenced by diarrhea. The 5-day treatment with ATR reduced body weights by 7.5% or 12.1% at 100 or 200 mg/kg of ATR, respectively, compared with the vehicle control. Metabolic effect or stress has been known to affect female reproductive functions, including LH surge [18]. ATR (200 mg/kg) might cause stress on the animals with excessive body weight reduction. In contrast, the body weight reduction by 7.5% at 100 mg/kg of ATR was considered to be acceptable as previously demonstrated [18]. Given no abnormal clinical sign was observed at 100 mg/kg of ATR as well, it was most plausible that the attenuation of surge-like LH release observed at 100 mg/kg of ATR was attributed to the direct effect of ATR and not to secondary effect. In addition, the dose of ATR, which we selected in this study, was in line with the previous observations [20]. While the relevancies of doses between animals and human need to be addressed, results from animal studies begin to provide insight into the findings from the epidemiological observations [3, 20]. Using this model, we found that ATR treatment suppressed *Kiss1* mRNA levels in the AVPV without attenuating the responsiveness to exogenous kisspeptin, suggesting that the cause of the attenuation of the LH surge by ATR could be attributed to the suppression of kisspeptin expression in the AVPV and the subsequent kisspeptin input to the GnRH neurons.

Based on the results of previous studies, we hypothesized that ATR affected either the neural responsiveness of GnRH neurons to kisspeptin or the kisspeptin system in the AVPV. In the present study, we found that ATR did not reduce hypothalamic GnRH contents in the morning, suggesting that ATR treatment did not abrogate

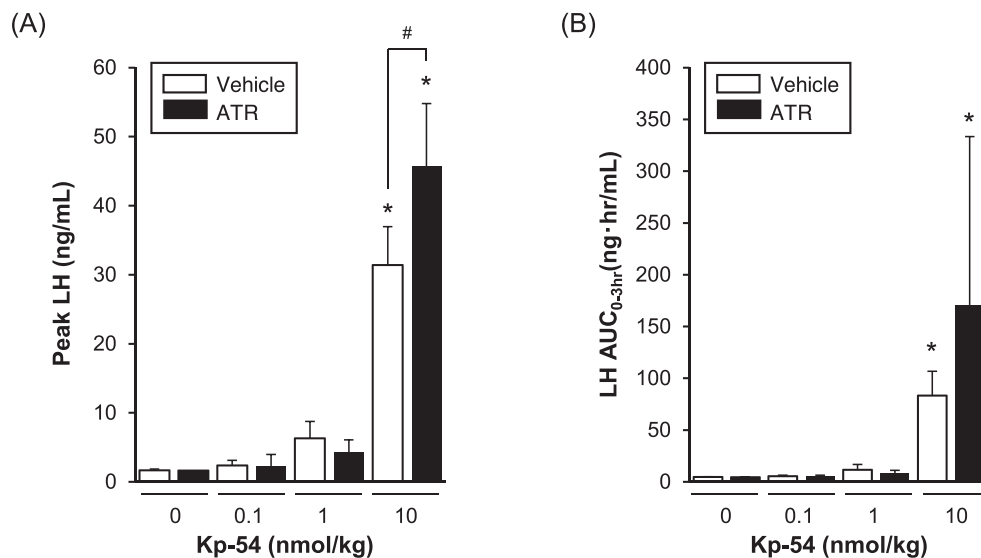


Figure 4. Effect of atrazine on luteinizing hormone release in response to exogenous Kp-54. The peak (A) and area under the curve (AUC_{0-3h}) (B) for the plasma luteinizing hormone (LH) level after the administration of Kp-54. The animals were administered Kp-54 at 11:00 on the fifth day of treatment with atrazine (ATR), and plasma LH levels were determined before the administration and at 1, 2, and 3 h after this. Dose of Kp-54: 0 nmol/kg ($n = 5$ in both the vehicle and the ATR group), 0.1 nmol/kg (vehicle: $n = 5$, ATR: $n = 6$), 1 nmol/kg ($n = 6$ in each group), 10 nmol/kg (vehicle: $n = 5$, ATR: $n = 6$). Data are presented as the mean \pm SD. * indicates $P \leq 0.05$ (Williams' or Shirley-Williams test) vs. the 0 nmol/kg group. # indicates $P \leq 0.05$ (t test) vs. the vehicle control.

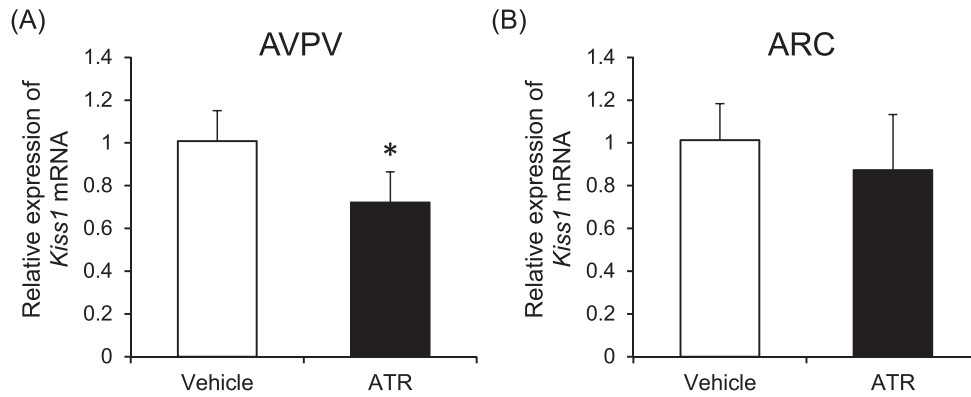


Figure 5. Effect of atrazine on the expression of *Kiss1* mRNA in the anteroventral periventricular nucleus and arcuate nucleus of the hypothalamus. The expression of *Kiss1* mRNA in the anteroventral periventricular nucleus (AVPV) (A) and arcuate nucleus (ARC) (B) of the hypothalamus on the fifth day of atrazine (ATR) treatment. Data are presented as the mean \pm SD (vehicle: n = 6, ATR: n = 7). * indicates $P \leq 0.05$ (t test) vs. the vehicle control.

fundamental GnRH production. We then used Kp-54 as a physiological tool to evaluate the responsiveness of GnRH neurons to kisspeptin stimuli [21]. In our preliminary experiment, we compared the Kp-54-dependent LH release both at 12:00 and 16:00 and found no difference between the vehicle-treated and ATR-treated animals (Supplementary Figure S1). Because we aimed to evaluate the dose-proportional LH release in response to Kp-54, including low dose range, we administered Kp-54 at 11:00 to avoid endogenous increase in LH levels during the blood sampling period. In our study, we found that the LH release in response to Kp-54 administration after the treatment with ATR was not attenuated compared to the vehicle control, suggesting that the GnRH neurons in the ATR-treated animals maintained responsiveness to kisspeptin at least comparable to that of the vehicle-treated animals. At 10 nmol/kg of Kp-54, the LH peak levels in the ATR-treated animals were slightly but significantly higher than those of the vehicle-treated animals. A previous study showed that in the median eminence, where GnRH neural terminals locate, the GnRH level increased after intact female rats were administered ATR for four consecutive days [2]. d'Anglemont de Tassigny et al. showed that, after the administration of Kp-10, *Kiss1* knockout female mice exhibited a higher LH release responses compared with that exhibited by *Kiss1* intact mice, with a trend (not statistically significant) of an increase in the GnRH levels in the whole hypothalamus [22]. These studies suggested that suppression of the release of GnRH, such as by abrogating kisspeptin input, led to an increase in GnRH level and LH release in response to exogenous kisspeptin. The slight increase in LH levels in response to exogenous Kp-10 in our study might also be explained by the reduction of kisspeptin input to GnRH neurons; however, no increase in hypothalamic GnRH level was observed in the ATR-treated animals in our study. This may be because we used the whole hypothalamic tissue to determine the GnRH level; a slight increase of GnRH in the median eminence may not be distinguishable in whole hypothalamus extracts, similar to the observation by d'Anglemont de Tassigny described earlier [22], while this point needs to be confirmed by further study. Thus, our results suggested that ATR did not abrogate GnRH neuronal responses to kisspeptin.

We found that *Kiss1* mRNA expression levels in the AVPV were significantly reduced in the ATR-treated animals. The kisspeptin neurons and the expression of *Kiss1* mRNA in the AVPV are responsible for GnRH/LH surge generation, and it has been demonstrated, for instance, that the bilateral microinjection of antisense *Kiss1* cDNA

in a recombinant AAV-associated virus in the AVPV region abolished LH surge in rats [23]. Therefore, our results suggested that the reduction of LH surge in ATR-treated animals could be attributed to the reduction of *Kiss1* mRNA expression, possibly leading to a subsequent decrease in kisspeptin production. Several studies have suggested that the *Kiss1* expression levels are further elevated in the late afternoon of the day of LH surge in parallel to the elevation of LH release [11, 24, 25]. We investigated the AVPV *Kiss1* mRNA levels in the morning (11:00 h); therefore, *Kiss1* mRNA levels around the time of LH surge would provide more precise insights about the role of kisspeptin neurons in explaining the effect of ATR in LH surge, and our results should be interpreted that the ATR reduced baseline AVPV *Kiss1* mRNA levels in OVX-E2 animals. Well-constructed experiments including a relatively large number of animals and multiple sampling points would be required to precisely address the temporal changes in AVPV *Kiss1* mRNA levels with sufficient statistical power. Goldman et al. reported contrasting results to our study; the administration of ATR for four consecutive days did not reduce *Kiss1* mRNA expression in the AVPV in OVX + E2 rats [26]. The reason for this differential result is unknown, but one explanation may be attributed to the differences in the experimental protocol. In the study by Goldman et al., the E2 capsule was implanted and the ATR treatment started on the same day as the OVX [26]. Thus, the animals had been continuously exposed to E2 for 4 days on the day of the LH surge evaluation. It has been demonstrated that the daily LH surge peaked on the second day after the initiation of continuous E2 administration and that the surge rapidly decreased from the third day [27, 28]. Therefore, the amplitude of the E2-induced LH release and related neural functions might have been attenuated at the time of sampling in the experimental protocol according to Goldman et al. In our study, in contrast, the E2 supplementation was started on the third day of the ATR treatment to observe the LH surge and *Kiss1* expression levels at 2 days after the initiation of E2 supplementation, the optimal timing for the greatest LH surge. However, further studies can elucidate the underlying mechanisms related to kisspeptin. For instance, in our study we could not determine kisspeptin peptide content in the AVPV, probably because the AVPV samples were too small to be analyzed by kisspeptin EIA method. It would be also valuable to include immunohistochemical approaches to evaluate the neural activation of the AVPV kisspeptin neurons by observing c-Fos protein expressions or the kisspeptin-GnRH neural contact because it has

been suggested that the neural contact is flexibly changed by steroid hormones [29].

Kiss1 mRNA expression in the kisspeptin neurons in the AVPV is positively regulated by ER α [9, 10]. Thus, the antagonistic effect of ATR on ER α could be a possible explanation for the suppression of *Kiss1* mRNA expression levels by ATR. However, ATR has been shown not to inhibit ER signals in the hypothalamus in vivo, even though it binds weakly to ER α [30, 31], suggesting that ATR did not act as an ER α antagonist. A second possible explanation is that ATR inhibited another estrogen receptor, such as GPR30. In a previous study, Albanito et al. suggested that ATR activated GPR30, which has been suggested as a G protein-coupled receptor for estradiol [30]. However, Treen et al. reported that *Kiss1* mRNA expression in the AVPV was not dependent on GPR30 [32]. It is therefore most plausible that, under the experimental conditions of the present study, ATR does not antagonize ER α or inhibit GPR30 signals, but it might indirectly inhibit ER α signaling such as by interfering the downstream events of E2-ER α binding event or the epigenetic modification of the ER α responsive region of the *Kiss1* locus [33–35]. In our study, ATR had no effect on *Kiss1* mRNA expression levels in the ARC, which is suggested to play a critical role in pulsatile GnRH/LH release [8]. This result corroborated our findings that ATR did not affect morning baseline LH levels (Figure 2B). Previously Foradori et al. investigated the effect of ATR on pulsatile LH release in OVX female rats, and demonstrated that ATR reduced LH pulses in rats [5]. Given *Kiss1* expression levels in the ARC is suppressed when E2 levels are elevated, the most plausible explanation is that ATR has little impact on fundamental *Kiss1* expression in the ARC and the subsequent LH-releasing mechanism in the ARC. Further studies focusing on the molecular mechanism of E2-ER α in relation to the effect of ATR on AVPV/ARC *Kiss1* expression should shed light on this regulatory mechanism.

In conclusion, our study revealed that ATR inhibited *Kiss1* expression in the AVPV. The ATR-treated animals maintained or exhibited slightly enhanced responsiveness to exogenous Kp-54, suggesting that the suppressive effect of ATR is produced by the suppression of *Kiss1* expression and subsequent kisspeptin release from the kisspeptin neurons in the AVPV. Further studies are warranted to elucidate the mechanism of ATR more precisely.

Supplementary data

Supplementary data are available at [BIOLRE](https://doi.org/10.1007/s12008-019-00117-2) online.

Supplementary Figure S1. Effect of ATR on LH release in response to exogenous Kp-54 treatment in the morning or the afternoon. Plasma luteinizing hormone (LH) levels (A and D), peak level (B and E), and area under the curve (C and F) for the LH level after the administration of Kp-54 treatment in the morning (A–C) or the afternoon (D–F). The animals were administered 100 nmol/kg of Kp-54 at 11:00 (morning session) or 16:00 (afternoon session) on the fifth day of treatment with atrazine (ATR) and plasma LH levels were determined before the administration and at every 30 min after 12:30 until 16:00 in the morning session, and at every 30 min after 17:00 until 20:30 in the afternoon session (n = 8 in each group). There was no significant difference from the vehicle control.

Acknowledgments

We are grateful to the National Hormone & Peptide Program, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK), and

Dr A.F. Parlow (Harbor-UCLA Medical Center, Los Angeles, CA) for providing us with the rat LH RIA materials. We are also grateful to Drs. Hirofumi Nagai (Axcelad Drug Discovery Partners, Kanagawa, Japan), Keiji Yamamoto, Hirokazu Matsumoto (Takeda Pharmaceutical Company) and Fumio Chatani (Shin Nippon Biomedical Laboratories, Kagoshima, Japan) for insightful discussion and advice; Takeshi Sugimoto, Yasuki Shiratsuka (Axcelad Drug Discovery Partners, Kanagawa, Japan), Aoi Ichikawa (Rabics, Kanagawa, Japan) Toshiaki Yamauchi, Yuko Izumi (Takeda Pharmaceutical Company), and Toshiko Kato (T. N. Technos, Kanagawa, Japan) for their technical assistance. We thank Enago for the English language review.

References

- Cooper RL, Stoker TE, Tyrey L, Goldman JM, McElroy WK. Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function. *Toxicol Sci* 2000; 53:297–307.
- Cooper RL, Laws SC, Das PC, Narotsky MG, Goldman JM, Lee Tyrey E, Stoker TE. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. *Birth Defect Res B* 2007; 80:98–112.
- Cragin LA, Kesner JS, Bachand AM, Barr DB, Meadows JW, Krieg EF, Reif JS. Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. *Environ Res* 2011; 111:1293–1301.
- Plant TM. 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J Endocrinol* 2015; 226:T41–T54.
- Foradori CD, Hinds LR, Hanneman WH, Legare ME, Clay CM, Handa RJ. Atrazine inhibits pulsatile luteinizing hormone release without altering pituitary sensitivity to a gonadotropin-releasing hormone receptor agonist in female Wistar rats. *Biol Reprod* 2009; 81:40–45.
- Foradori CD, Hinds LR, Hanneman WH, Handa RJ. Effects of atrazine and its withdrawal on gonadotropin-releasing hormone neuroendocrine function in the adult female Wistar rat. *Biol Reprod* 2009; 81:1099–1105.
- Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, Matsumoto H, Hori A, Kanehashi K, Terao Y, Kumano S, Takatsu Y, Masuda Y, Ishibashi Y, Watanabe T et al. Metastasis suppressor gene *KISS-1* encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature* 2001; 411:613–617.
- Oakley AE, Clifton DK, Steiner RA. Kisspeptin signaling in the brain. *Endocr Rev* 2009; 30:713–743.
- Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiyama H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K et al. Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev* 2007; 53:367–378.
- Smith JT, Popa SM, Clifton DK, Hoffman GE, Steiner RA. Kiss1 neurons in the forebrain as central processors for generating the preovulatory luteinizing hormone surge. *J Neurosci* 2006; 26:6687–6694.
- Poling MC, Luo EY, Kauffman AS. Sex differences in steroid receptor coexpression and Circadian-Timed activation of kisspeptin and RFRP-3 neurons may contribute to the sexually dimorphic basis of the LH surge. *Endocrinology* 2017; 158:3565–3578.
- Stephens SBZ, Rouse ML, Tolson KP, Liaw RB, Parra RA, Chahal N, Kauffman AS. Effects of selective deletion of tyrosine hydroxylase from kisspeptin cells on puberty and reproduction in male and female mice. *eNeuro* 2017; 4:ENEURO.0150–0117.2017.
- Williams WP, 3rd, Jarjirian SG, Mikkelsen JD, Kriegsfeld LJ. Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2011; 152:595–606.
- Kinoshita M, Tsukamura H, Adachi S, Matsui H, Uenoyama Y, Iwata K, Yamada S, Inoue K, Ohtaki T, Matsumoto H, Maeda K. Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 2005; 146:4431–4436.
- Ishii MN, Matsumoto K, Matsui H, Seki N, Matsumoto H, Ishikawa K, Chatani F, Watanabe G, Taya K. Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-related

- disappearance of LH surge in middle-age female rats. *Gen Comp Endocrinol* 2013; **193**:121–129.
16. Matsui H, Tanaka A, Yokoyama K, Takatsu Y, Ishikawa K, Asami T, Nishizawa N, Suzuki A, Kumano S, Terada M, Kusaka M, Kitada C et al. Chronic administration of the metastin/kisspeptin analog KISS1-305 or the investigational agent TAK-448 suppresses hypothalamic pituitary gonadal function and depletes plasma testosterone in adult male rats. *Endocrinology* 2012; **153**:5297–5308.
 17. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates—the New Coronal Set*. 5th Ed. Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press; 2005.
 18. Tropp J, Markus EJ. Effects of mild food deprivation on the estrous cycle of rats. *Physiol Behav* 2001; **73**:553–559.
 19. Barr GD, Barraclough CA. Temporal changes in medial basal hypothalamic LH-RH correlated with plasma LH during the rat estrous cycle and following electrochemical stimulation of the medial preoptic area in pentobarbital-treated proestrous rats. *Brain Res* 1978; **148**:413–423.
 20. Wirbisky SE, Freeman JL. Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HPG) axis. *Toxics* 2015; **3**:414–450.
 21. Matsui H, Takatsu Y, Kumano S, Matsumoto H, Ohtaki T. Peripheral administration of metastin induces marked gonadotropin release and ovulation in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **320**:383–388.
 22. d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:10714–10719.
 23. Hu MH, Li XF, McCausland B, Li SY, Gresham R, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Sam AH, Bloom SR, Poston L, Lightman SL, Murphy KG et al. Relative importance of the arcuate and anteroventral periventricular kisspeptin neurons in control of puberty and reproductive function in female rats. *Endocrinology* 2015; **156**:2619–2631.
 24. Smarr BL, Gile JJ, de la Iglesia HO. Oestrogen-independent circadian clock gene expression in the anteroventral periventricular nucleus in female rats: possible role as an integrator for circadian and ovarian signals timing the luteinising hormone surge. *J Neuroendocrinol* 2013; **25**:1273–1279.
 25. Robertson JL, Clifton DK, de la Iglesia HO, Steiner RA, Kauffman AS. Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge. *Endocrinology* 2009; **150**:3664–3671.
 26. Goldman JM, Davis LK, Murr AS, Cooper RL. Atrazine-induced elevation or attenuation of the LH surge in the ovariectomized, estrogen-primed female rat: role of adrenal progesterone. *Reproduction* 2013; **146**:305–314.
 27. Legan SJ, Coon GA, Karsch FJ. Role of estrogen as initiator of daily LH surges in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 1975; **96**:50–56.
 28. Tsukamura H, Maeda KI, Yokoyama A. Effect of the suckling stimulus on daily LH surges induced by chronic oestrogen treatment in ovariectomized lactating rats. *J Endocrinol* 1988; **118**:311–316.
 29. Pielecka-Fortuna J, Chu Z, Moenter SM. Kisspeptin acts directly and indirectly to increase gonadotropin-releasing hormone neuron activity and its effects are modulated by estradiol. *Endocrinology* 2008; **149**:1979–1986.
 30. Albanito L, Lappano R, Madeo A, Chimento A, Prossnitz ER, Cappello AR, Dolce V, Abonante S, Pezzi V, Maggiolini M. Effects of atrazine on estrogen receptor alpha- and G protein-coupled receptor 30-mediated signaling and proliferation in cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ Health Perspect* 2015; **123**:493–499.
 31. McMullin TS, Andersen ME, Nagahara A, Lund TD, Pak T, Handa RJ, Hanneman WH. Evidence that atrazine and diaminochlorotriazine inhibit the estrogen/progesterone induced surge of luteinizing hormone in female Sprague-Dawley rats without changing estrogen receptor action. *Toxicol Sci* 2004; **79**:278–286.
 32. Treen AK, Luo V, Chalmers JA, Dalvi PS, Tran D, Ye W, Kim GL, Friedman Z, Belsham DD. Divergent regulation of ER and kiss genes by 17beta-Estradiol in hypothalamic ARC versus AVPV models. *Mol Endocrinol* 2016; **30**:217–233.
 33. Eldridge JC, Stevens JT, Breckenridge CB. Atrazine interaction with estrogen expression systems. *Rev Environ Contam Toxicol* 2008; **196**:147–160.
 34. Uenoyama Y, Tomikawa J, Inoue N, Goto T, Minabe S, Ieda N, Nakamura S, Watanabe Y, Ikegami K, Matsuda F, Ohkura S, Maeda K et al. Molecular and epigenetic mechanism regulating hypothalamic Kiss1 gene expression in mammals. *Neuroendocrinology* 2016; **103**:640–649.
 35. McBirney M, King SE, Pappalardo M, Houser E, Unkefer M, Nilsson E, Sadler-Riggelman I, Beck D, Winchester P, Skinner MK. Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers. *PLoS One* 2017; **12**: e0184306.

Increased mesodermal and mesendodermal populations by BMP4 treatment facilitates human iPSC line differentiation into a cardiac lineage

Kimura M¹, Furukawa H¹, Shoji M², Shinozawa T¹

Abstract

Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) have attracted attention as a novel tool for drug safety screening and several differentiation protocols of hiPSC lines into cardiomyocytes have been reported; the standardization of these protocols will expand their applications for safety assessments such as “clinical safety trial-on-dish”. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is an important factor in promoting mesoderm differentiation and BMP4 treatment has been used at the early stage of cardiac differentiation into different hiPSCs. In the present study, we evaluated the effects of BMP4 treatment at the early stage of cardiac differentiation. We performed gene expression profiling of the germ layer during mesoderm differentiation of hiPSCs derived from three different donors. The expression of *T* (a mesoderm marker) and *GATA6* (an endoderm marker) increased and that of *PAX6* (a neuroectoderm marker) decreased in pooled embryoid bodies (EBs) after BMP4 treatment. Single-cell gene expression analysis revealed that mesodermal and mesendodermal populations increased in EBs derived from 253G1. Finally, BMP4 treatment increased mesodermal and mesendodermal populations compared with that without BMP4 in two other hiPSC lines, confirming the reproducibility of multiple hiPSC lines. Thus, our results suggest that BMP4 treatment increases mesodermal and mesendodermal populations at the early stage of cardiac differentiation in different hiPSC lines.

Key Words: BMP4; iPSC cell line; Mesoderm; Mesendoderm; Single-cell analysis

Introduction

Cardiotoxicity is a leading cause of failure in the clinical development of new drugs or withdrawal of approved drugs from the market^[1]. In drug development, immortalized cell lines and animal models have provided useful information for predicting the risk of serious adverse events such as QT-prolongation and arrhythmia^[2, 3]. However, only a few models recapitulate human cardiac physiology; this can be attributed to the lack of native functions of human cell lines and differences between animals and humans. To overcome this issue, human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPS-CMs) have attracted attention as a novel system for drug safety screening, especially cardiotoxicity, because these cells possess contractile ability and express cardiac-specific genes similar to those of normal heart tissue^[4-7]. hiPS-CMs are useful in assessing and predicting drug-induced arrhythmia or abnormal contractility^[8-10]. Moreover, several teams, including ours, have recently demonstrated that hiPS-CMs from different donors can recapitulate the difference in susceptibility among individuals to a drug-induced QT-prolongation response^[11, 12], facilitating a potential application of “clinical safety trial-on-dish” using hiPSC lines derived from individuals with different drug susceptibilities. To meet the expectations of drug safety regulations using hiPS-CMs, cardiomyocytes must be reliably and effectively derived from multiple hiPSC lines. Several protocols have been reported for differentiation of different iPSC lines into cardiomyocytes; however, each protocol is different based on the treatment with different growth factors involved in major embryonic developmental processes^[13, 14]. However, the

contribution of each growth factor during cardiac differentiation has not been completely investigated.

Cardiomyocytes are derived from the mesoderm^[15, 16] and for cardiac differentiation of hiPSCs, it is important to produce mesodermal cells at an early stage of the differentiation process^[16]. Bone morphogenetic protein 4 (BMP4) is an important factor that promotes mesoderm differentiation^[17, 18], and has been used in several previous protocols^[19-23]. However, the treatment period, concentration, and/or cardiac differentiation rate were different in each protocol for differentiation of iPSC lines into cardiomyocytes. For instance, Kattman *et al.* demonstrated cardiac differentiation of four hiPSCs using BMP4 at 0.5–10 ng/mL concentrations in days 2–5 (without supplementing additional growth factors for 48 h after dissociation) of differentiation and the differentiation rate into cardiomyocytes was different among the cell lines (range: 10%–60%)^[19]. In addition, Ren *et al.*, demonstrated cardiac differentiation using BMP4 at 25 ng/mL concentrations in days 0–4 of differentiation, and the cardiac differentiation rate was approximately 40%^[20]. Therefore, it is important to understand the contribution of BMP4 to the differentiation of multi hiPSC lines with different susceptibility and to provide insights on differentiation into mesoderm or cardiomyocytes.

Single cell analyses have attracted considerable attention because of their potential in identifying differences between individual cells in a seemingly homogeneous population^[24, 25]. During mesoderm formation in mouse, the endoderm is also derived from the epiblast

Author Names in full: Maya Kimura¹, Hatsue Furukawa¹, Masanobu Shoji², Tadahiro Shinozawa¹

¹Drug Safety Research Laboratories; ²Integrated Technology Research Laboratories, Pharmaceutical Research Division, Takeda Pharmaceutical Company Limited, 26-1 Muraoka-Higashi 2-chome, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan

via gastrulation. After the formation of primitive streak (PS), it can be divided into the mesoderm and endoderm^[18], suggesting that individual hiPSCs induce the formation of mesoderm and endoderm in a heterogeneous population during a process recapitulating PS formation. Thus, to understand the effect of BMP4 on differentiation into mesoderm, it is important to investigate the population of cells, which differentiate into a cardiac lineage.

In the present study, we focused on the relationship between BMP4 and early differentiation of iPSCs into the three germ layers and investigated the expression of three germ layer marker genes in single cells to identify the type of cell population increased in the three germ layers of EBs treated with BMP4.

Materials and Methods

Human iPSC culture, cardiac differentiation, and isolation of simultaneously beating embryonic bodies

Three hiPSCs lines were used in this study. One hiPSC line (253G1) from the Kyoto University was maintained as described previously^[26, 27]. The other hiPSCs (K20 and A3N) were generated from human blood, as described previously^[11]. All donors provided written informed consent before participating in this study, and the study protocol was approved by the institutional review board of the Takeda Pharmaceutical Company Limited. All hiPSCs were maintained in Essential 8™ medium (E8, Invitrogen, CA). hiPSCs were induced into cardiomyocytes as previously described with slight modifications (Figure 1A)^[28]. Briefly, hiPSCs were isolated in 0.5 M EDTA (WAKO, Kanagawa, Japan) and they formed EBs during suspension culture in prime surface 90-mm dishes (Sumitomo Bakelite, Japan) with E8 containing 10 μmol/L Y-27632 (WAKO, JP) and 0–100 ng/mL BMP4, depending on the experiment (R&D systems, MN, USA) on day 0. After two days, the culture medium was changed to StemPro34 (Invitrogen, CA) containing 2 mM glutamine, 0.4 mM monothioglycerol (MTG) and 50 μg/mL ascorbic acid (Sigma, MO, USA). The following cytokines were also used at each differentiation stage in the same StemPro34 basic medium described above: days 2–3, 0–100 ng/mL BMP4, 5 ng/mL basic FGF (bFGF; ReproCell) and 3 ng/mL activin A (Peprotech); days 4–6, 150 ng/mL CKI-7 dihydrochloride (CKI-7; Sigma) and 10 ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF; Humanzyme, IL, USA); day 7 onwards, 10 ng/mL VEGF, 150 ng/mL CKI-7 and 5 ng/mL bFGF. During differentiation, the medium was replaced every 3–4 days. Cultures were maintained in a 5% CO₂/95% air environment, and on day 30, beating EBs were counted under a microscope on a stage warmed to 37°C. This experiment was conducted repeatedly with three independent experiments for each hiPSC line.

mRNA expression in pooled EBs after BMP4 treatment in 253G1

RNA was isolated from EBs on day 2 using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. The concentration of RNA was determined by measuring the absorbance at 260 nm using a NanoDrop ND-8000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), and the RNA samples were stored at -80°C until further assay. Reverse transcription (RT) into complementary DNA and the subsequent PCR were performed using 50 ng of total RNA from each sample using a high capacity cDNA RT kit (Life Technologies, Japan). Real-time PCR was performed using the Applied Biosystems 7900 fast real-time PCR (RT-PCR) system and Taqman gene expression assay kits (Applied Biosystems) for *β-actin* (ACTB: Hs99999903_m1),

T (Hs00610080_m1), GATA binding protein 6 (*GATA6*: Hs00232018_m1), and paired box 6 (*PAX6*: Hs00240871_m1).

The RT-PCR cycling conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C for 40 cycles. mRNA expression level was analyzed using the comparative cycle threshold method with *β-actin* as the internal control and expressed as expression levels relative to those of the controls. This experiment was conducted repeatedly with three independent experiments for each hiPSC line.

mRNA expression in single cells after BMP4 treatment in 253G1, K20, and A3N

On day 2, EBs were dissociated using trypsin EDTA. Single cells were isolated using the C1 Single-Cell Auto Prep System (Fluidigm, South San Francisco, CA, USA) followed by RT and pre-amplification, according to the manufacturer's instructions. The cells were loaded onto C1 Single-Cell Auto Prep IFC, and single-cell gene expression experiments were performed using the Applied Biosystems 7900 fast real-time RT-PCR system and Taqman gene expression assay kit, as described above. The results of cells not expressing ACTB were removed from the analysis. Genes that were not expressed were assigned a Ct of 40. Data were plotted as a heatmap of the Ct values without normalization. It is known that the expression of genes including that of the internal control gene in individual cells varies by 1000-fold. Therefore, in the present study, we used the Ct value without normalization to avoid misleading. These experiments were conducted repeatedly with three independent experiments for each hiPSC line.

Statistical analysis

The data were analyzed using Dunnett or Tukey test. The results with p values of < 0.05 were considered statistically significant. All statistical analyses were performed using SAS system version 8.2 (SAS Institute, Cary, NC)

Results and Discussion

Gene expression profile of hiPSCs differentiated into the three germ layers by BMP4 treatment in 253G1

Mesodermal cells are produced during cardiac differentiation of hiPSCs at the early stage of differentiation^[16] and in the present study, BMP4 treatment was performed at the early stage of differentiation. To evaluate the effect of BMP4 treatment on differentiation of hiPSCs into mesoderm, we first investigated the expression level of germ layer marker genes in EBs at day 2 of differentiation from 253G1. BMP4 at 10 ng/mL concentration produced the highest percentage, 51.0 % ± 10.4 %, of spontaneously beating EBs (Figure 1B). The size and shape of EBs were comparable between treatments with and without BMP4 (Figure 1C). Next, we investigated the expression of the marker genes for the three germ layers. The gene expression of *T*, a transcription factor transiently expressed in early mesoderm, and *GATA6*, an early endodermal lineage marker, was the highest in the 10 ng/mL group, which was the optimal concentration for differentiation into beating EBs as described above (Figure 1D and E). In contrast, the gene expression of *PAX6*, an ectoderm marker, was lower in the 0–1 ng/mL BMP4 treatment group than that in the 10–100 ng/mL BMP4 treatment group (Figure 1F). These results suggest that BMP4 induces the differentiation into both mesodermal and endodermal cells and inhibits the differentiation into ectodermal cells.

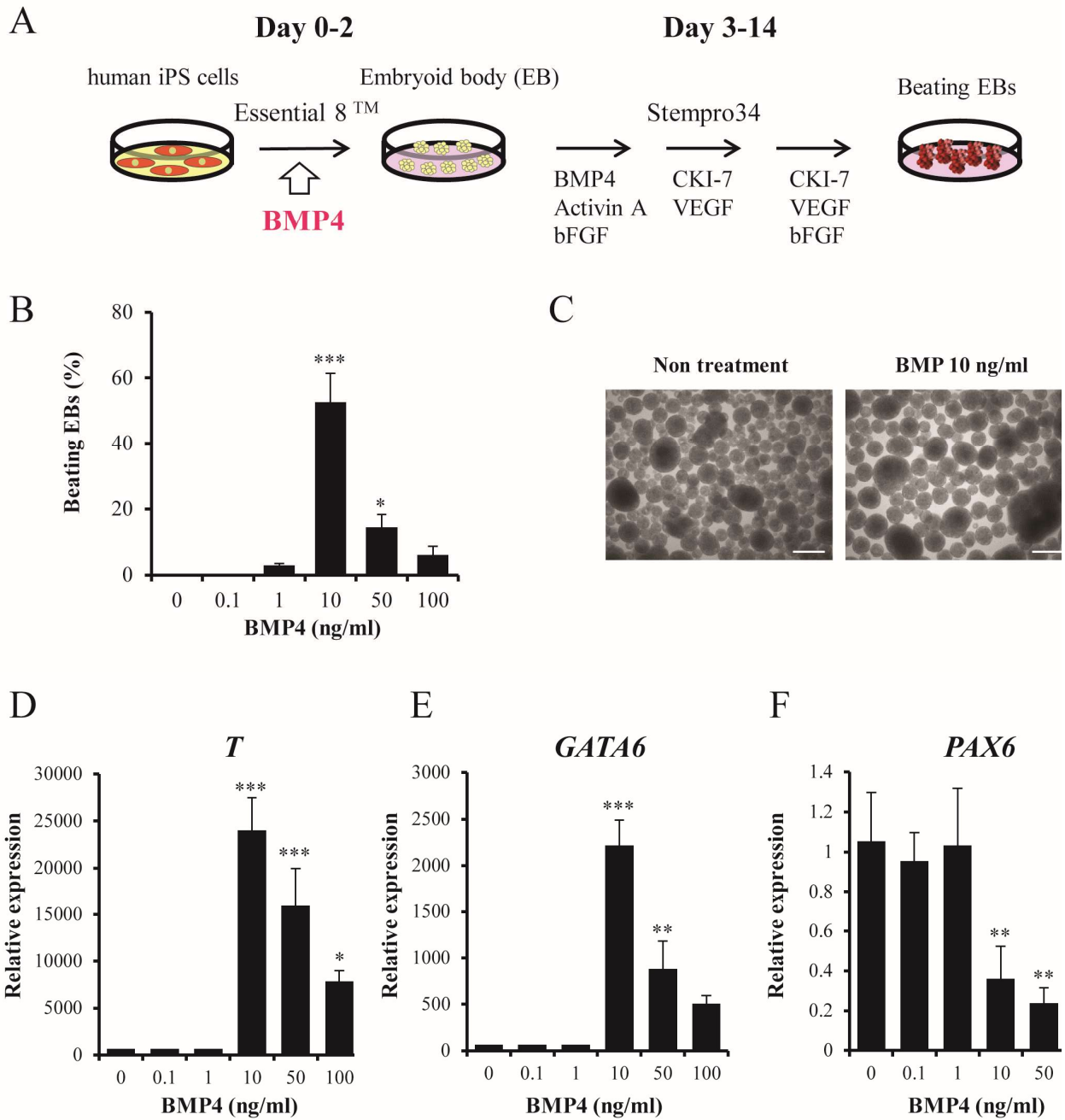


Figure 1 : Mesodermal differentiation after BMP4 treatment of 253G1. (A) The differentiation protocol for cardiomyocytes. (B) EB beating rate at 30 days after the initialization of differentiation with BMP4 treatment. (C) Phase contrast image of embryoid bodies (EBs) at 2 days after the initial BMP4 treatment. Bars = 500 μ m. Gene expression levels of *T* (D), *GATA6* (E), and *PAX6* (F) at 2 days after BMP4 treatment. Gene expression data were normalized relative to 0 ng/mL. Data were then analyzed using Dunnett's test. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, and *** $P \leq 0.001$ vs. 0 ng/mL. Data are presented as mean \pm SD of independent experiments ($n = 3$).

Cell population in the three germ layers of EBs formed with BMP4 in 253G1

Next, to investigate whether T and GATA6 are expressed in a single cell or in a population of cells expressing T or GATA6, single-cell analyses were conducted. Interestingly, cell populations expressing T and/or GATA6 were observed in the BMP4 treatment group (Figure 2A). The number of cells expressing both T and GATA6 increased on day 2 of differentiation, whereas the population expressing PAX6 was comparable with that in the population not treated with BMP4 (Figure 2B). We calculated the proportion of the populations representing mesoderm, endoderm, mesendoderm, and ectoderm based on the expression of the germ layer markers. The mesodermal and mesendodermal populations were 31.1% and 35.8%, respectively, after BMP4 treatment, whereas no such population was detected without BMP4 treatment (Figure 2C). During the differentiation of human ES cells into mesoderm and definitive endoderm, an intermediate stage called mesendoderm appears recapitulating PS formation^[16]. Moreover, in mouse development, mesodermal cells in PS co-express T and GATA6 on embryonic day 6.5^[29]. Therefore, BMP4 treatment at early differentiation from hiPSCs increases the mesendodermal population, which co-expresses T and GATA6 and is important for efficiently inducing cardiac differentiation. Conversely, the differentiation into other cell types in BMP4 treatment was not clear.

Contribution to management of mesendoderm differentiation after BMP4 treatment in two hiPSC lines (K20 and A3N)

To evaluate the applicability of BMP4 as a key factor in increasing

mesendodermal population for cardiac differentiation from hiPSCs, we investigated the relationship between effective differentiation and increasing mesendodermal population in two other iPSC lines. BMP4 treatment promoted efficient differentiation into spontaneously beating EBs in both lines. The optimal BMP4 concentrations for efficient cardiac differentiation were 2 and 7 ng/mL for K20 (66.8% ± 4.9%) and A3N (55.5% ± 28.8%) lines, respectively, and bell-shaped responses to BMP4 concentration were observed in both lines (Figure 3A). Each experiment to investigate the sensitivity to BMP4-induced cardiac differentiation was performed in replicates, and the results revealed that the reproducibility of efficient differentiation by optimal BMP4 was observed for each hiPSC line. Therefore, these results suggest that the BMP4 concentrations at the initial cardiac differentiation phase need to be optimized for each hiPSC cell line. Cell populations from both lines also expressed T and GATA6 as single or double positively with optimal BMP4 treatment (Figure 3B). Single-cell analysis demonstrated that the number of cells expressing T and GATA6 increased with BMP4 treatment at the optimal concentrations of 2 and 7 ng/mL in K20 and A3N lines, respectively, whereas the expression of PAX6 was comparable with that in cells without BMP4 treatment (Figure 3C). The proportion of BMP4-treated cell populations from K20 and A3N lines was 19.6% and 22.4% mesoderm and 32.1% and 53.4% mesendoderm, respectively (Figure 3D).

These results suggested that BMP4 contributed to key initial molecular events for differentiation into cardiomyocytes in each hiPSC line. Therefore, the concept could be employed for the differentiation of multiple hiPSC lines into cardiomyocytes.

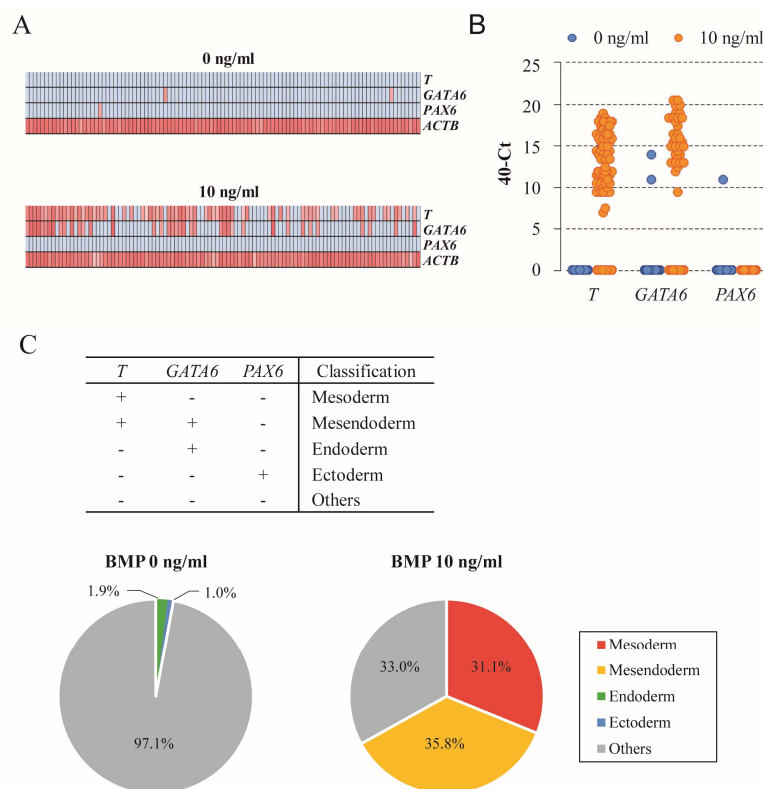


Figure 2: Mesodermal and mesendodermal population changes after BMP4 treatment of 253G1. (A) Heat map of single-cell gene expression patterns after BMP4 treatment. (B) Density dot plot of single-cell gene expression in embryoid bodies (EBs) at 2 days after BMP4 treatment. (C) Classification of populations after BMP4 treatment. Data are presented as three independent experiments. The total cell number in the 0 and 10 ng/mL treatment groups was 103 and 106 cells, respectively.

BMP4 facilitates human iPSC line differentiation into a cardiac lineage via increasing mesodermal/mesendodermal populations

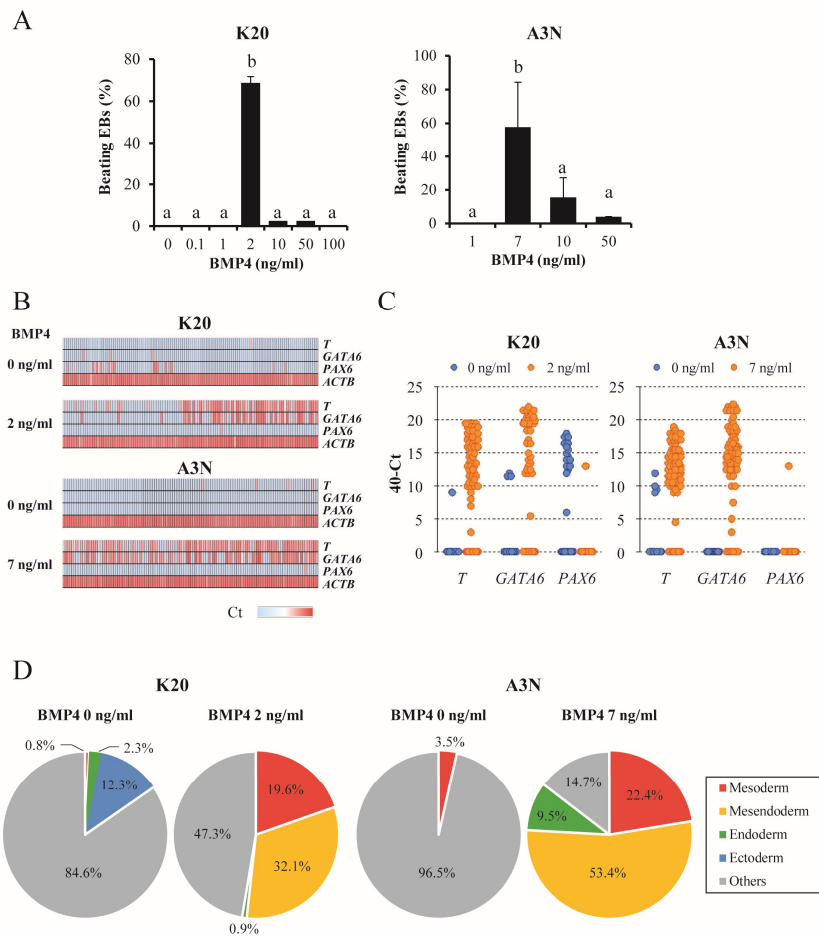


Figure 3: Differences under optimal BMP4 conditions for cardiac differentiation using two hiPSC lines (K20 and A3K). (A) Embryoid body (EB) beating rates at 30 days after differentiation with BMP4 treatment. Data were analyzed using Tukey's test. a vs. b indicates $P \leq 0.05$. Data are presented as mean \pm SD of independent experiments ($n = 3$). (B) Heat map of single-cell gene expression patterns after BMP4 treatment. (C) Density dot plot of single-cell gene expression of EBs at 2 days after BMP4 treatment. (D) Classification of populations with or without BMP4 treatment. Data are presented as the mean of three independent experiments. The total cell number was as follows: K20, 130 and 112 cells with 0 and 2 ng/mL BMP4 treatments, respectively. A3N, 114 and 116 cells with 0 and 7 ng/mL, respectively.

Moreover, this finding might help efficiently define optimal BMP4 concentrations; an initial short-term screening of BMP4 can be completed in a 48-h protocol and used to initiate a full-scale (i.e., 10 days) differentiation protocol using the identified optimal BMP4 concentration. On the contrary, it was not clear whether the differentiation of cells not expressing any genes was induced, and it has been reported that native differentiation propensity is different for each pluripotent stem cell^[30]. Further studies to explain the differences in optimal BMP4 concentrations are required to elucidate the mechanism of cardiac differentiation using a large number of hiPSC lines.

Conclusion

We demonstrated that increasing mesodermal and mesendodermal populations with BMP4 treatment could contribute to early cardiac differentiation of different iPSC lines by single-cell gene expression profiling. An in-depth evaluation with other approaches such as single-cell RNA sequencing might provide a deeper understanding of the mechanism for different differentiation propensities of individual cells.

References

- Hay M, Thomas DW, Craighead JL, Economides C, Rosenthal J. Clinical development success rates for investigational drugs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(1):40-51.
- Pollard CE, Abi Gerges N, Bridgland-Taylor MH, Easter A, Hammond TG, Valentin JP. An introduction to QT interval prolongation and non-clinical approaches to assessing and reducing risk. *Br J Pharmacol.* 2010;159(1):12-21.
- Guth BD. Preclinical cardiovascular risk assessment in modern drug development. *Toxicol Sci.* 2007;97(1):4-20.
- Shinozawa T, Imahashi K, Sawada H, Furukawa H, Takami K. Determination of appropriate stage of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug screening and pharmacological evaluation in vitro. *J Biomol Screen.* 2012;17(9):1192-203.
- Tanaka T, Tohyama S, Murata M, Nomura F, Kaneko T, Chen H, Hattori F, Egashira T, Seki T, Ohno Y, Koshimizu U, Yuasa S, Ogawa S, Yamanaka S, Yasuda K, Fukuda K. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(4):497-502.

6. Yokoo N, Baba S, Kaichi S, Niwa A, Mima T, Doi H, Yamanaka S, Nakahata T, Heike T. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;387(3):482-8.
7. Mehta A, Chung YY, Ng A, Iskandar F, Atan S, Wei H, Dusting G, Sun W, Wong P, Shim W. Pharmacological response of human cardiomyocytes derived from virus-free induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res*. 2011;91(4):577-86.
8. Huebsch N, Loskill P, Mandegar MA, Marks NC, Sheehan AS, Ma Z, Mathur A, Nguyen TN, Yoo JC, Judge LM, Spencer CI, Chukka AC, Russell CR, So PL, Conklin BR, Healy KE. Automated Video-Based Analysis of Contractility and Calcium Flux in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Cultured over Different Spatial Scales. *Tissue Eng Part C Methods*. 2015;21(5):467-79.
9. Kitaguchi T, Moriyama Y, Taniguchi T, Ojima A, Ando H, Uda T, Otabe K, Oguchi M, Shimizu S, Saito H, Morita M, Toratani A, Asayama M, Yamamoto W, Matsumoto E, Saji D, Ohnaka H, Tanaka K, Washio I, Miyamoto N. CSAHI study: Evaluation of multi-electrode array in combination with human iPS cell-derived cardiomyocytes to predict drug-induced QT prolongation and arrhythmia--effects of 7 reference compounds at 10 facilities. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016;78:93-102.
10. Hayakawa T, Kunihiro T, Ando T, Kobayashi S, Matsui E, Yada H, Kanda Y, Kurokawa J, Furukawa T. Image-based evaluation of contraction-relaxation kinetics of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Correlation and complementarity with extracellular electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;77:178-91.
11. Shinozawa T, Nakamura K, Shoji M, Morita M, Kimura M, Furukawa H, Ueda H, Shiramoto M, Matsuguma K, Kaji Y, Ikushima I, Yono M, Liou SY, Nagai H, Nakanishi A, Yamamoto K, Izumo S. Recapitulation of Clinical Individual Susceptibility to Drug-Induced QT Prolongation in Healthy Subjects Using iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*. 2017;8(2):226-34.
12. Stillitano F, Hansen J, Kong CW, Karakikes I, Funck-Brentano C, Geng L, Scott S, Reynier S, Wu M, Valogne Y, Desseaux C, Salem JE, Jeziorowska D, Zahr N, Li R, Iyengar R, Hajjar RJ, Hulot JS. Modeling susceptibility to drug-induced long QT with a panel of subject-specific induced pluripotent stem cells. *Elife*. 2017;6.
13. Talkhabi M, Aghdami N, Baharvand H. Human cardiomyocyte generation from pluripotent stem cells: A state-of-art. *Life Sci*. 2016;145:98-113.
14. Kolanowski TJ, Antos CL, Guan K. Making human cardiomyocytes up to date: Derivation, maturation state and perspectives. *Int J Cardiol*. 2017;241:379-86.
15. Tada S, Era T, Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, Nakao K, Chiba T, Nishikawa S. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development*. 2005;132(19):4363-74.
16. Wang L, Chen YG. Signaling Control of Differentiation of Embryonic Stem Cells toward Mesendoderm. *J Mol Biol*. 2016;428(7):1409-22.
17. Winnier G, Blessing M, Labosky PA, Hogan BL. Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes & Development*. 1995;9(17):2105-16.
18. Arnold SJ, Robertson EJ. Making a commitment: cell lineage allocation and axis patterning in the early mouse embryo. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009;10(2):91-103.
19. Kattman SJ, Witty AD, Gagliardi M, Dubois NC, Niapour M, Hotta A, Ellis J, Keller G. Stage-specific optimization of activin/nodal and BMP signaling promotes cardiac differentiation of mouse and human pluripotent stem cell lines. *Cell Stem Cell*. 2011;8(2):228-40.
20. Ren Y, Lee MY, Schliffke S, Paavola J, Amos PJ, Ge X, Ye M, Zhu S, Senyei G, Lum L, Ehrlich BE, Qyang Y. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(3):280-7.
21. Cagavi E, Bartulos O, Suh CY, Sun B, Yue Z, Jiang Z, Yue L, Qyang Y. Functional cardiomyocytes derived from Isl1 cardiac progenitors via Bmp4 stimulation. *PLoS One*. 2014;9(12):e110752.
22. Burridge PW, Thompson S, Millrod MA, Weinberg S, Yuan X, Peters A, Mahairaki V, Koliatsos VE, Tung L, Zambidis ET. A universal system for highly efficient cardiac differentiation of human induced pluripotent stem cells that eliminates interline variability. *PLoS One*. 2011;6(4):e18293.
23. Fuerstenau-Sharp M, Zimmermann ME, Stark K, Jentsch N, Klingenstein M, Drzymalski M, Wagner S, Maier LS, Hehr U, Baessler A, Fischer M, Hengstenberg C. Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2015;10(5):e0126596.
24. Stahlberg A, Kubista M, Aman P. Single-cell gene-expression profiling and its potential diagnostic applications. *Expert Rev Mol Diagn*. 2011;11(7):735-40.
25. Heath JR, Ribas A, Mischel PS. Single-cell analysis tools for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(3):204-16.
26. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72.
27. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*. 2008;26(1):101-6.
28. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 2008;453(7194):524-8.
29. Wen J, Zeng Y, Fang Z, Gu J, Ge L, Tang F, Qu Z, Hu J, Cui Y, Zhang K, Wang J, Li S, Sun Y, Jin Y. Single-cell analysis reveals lineage segregation in early post-implantation mouse embryos. *J Biol Chem*. 2017;292(23):9840-54.
30. Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2008;26(3):313-5.

Abbreviations

- BMP4 : Bone morphogenetic protein 4
 EB : Embryoid body
 hiPS-CM : Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocyte

Conflicts of Interests

All authors are full-time employees of Takeda Pharmaceutical Company Limited and this study was fully sponsored by Takeda.

Acknowledgments

The hiPS cell line (253G1 line) was provided by Kyoto University. We thank Dr. Hirofumi Nagai (Axcelead Drug Discovery Partners, Kanagawa, Japan) for the insightful discussion and advice; Hiroko Akiyama (Takeda Pharmaceutical Company) and Maya Morita (Axcelead Drug Discovery Partners) for their excellent technical assistance; and Dr. Hideto Hara (Takeda Pharmaceutical Company) for editorial support.

Sponsors/Grants

This study was fully sponsored by Takeda Pharmaceutical Company Limited (2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan).

Additional Information

Supplementary Information accompanies this article. Supplementary information and figures are linked to the online version of the article.

Corresponding Author

Tadahiro Shinozawa, Research, Takeda Pharmaceutical Company Ltd; 2-26-1 Muraoka-Higashi, Fujisawa, Kanagawa 251-8555, Japan; Email: tadahiro.shinozawa@takeda.com