

可能性が高いと考えられる。

本研究では、雌型の視床下部をエストロゲンが雄型に分化させるとの仮説に基づき行ったが、雌ラットの性分化臨界期に少量のエストロゲンが必要であることを示唆する研究も報告されている。新生児期におけるEE投与の影響は、多角的に解析することが必要と考えられる。

E. 結論

化学物質の低用量臨界期曝露による遅延型影響の実験モデル構築、ならびに臨界期曝露の全般的な生体影響の把握を目的として、曝露量と卵巣機能を含む生体機能の変化との関係を、ラットを用いて、異なる曝露経路の間で比較した。その結果、膣開口を指標とした性成熟の時期あるいは身体的発達に影響は認められなかったが、通常は加齢動物で認められる性周期の変化が若齢で認められ、その発現時期は、用量増加に伴い短縮していた。影響は、性周期以外の指標にも認められ、肝臓および下垂体重量の増加ならびに乳腺の過形成が用量に依存して増加した。また、反復経口投与は単回皮下投与と比べて生体影響が顕著に現れることを認めた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 該当無し

2. 学会発表

1) 該当無し

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

無し

参考文献

Bandiera S and Dworschak C

Effects of Testosterone and Estrogen on Hepatic Levels of Cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the Rat.

Archives of Biochemistry and Biophysics 296, 286-295 (1992).

Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ.

A critical review of methods for comparing

estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula.

Environmental Health Perspectives. 111, 1020-1036 (2003).

Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA.

Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family.

Cell. 53, 69-77 (1988).

Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicoeur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells.

Molecular Endocrinology 3, 1455-1461 (1989).

Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins.

Molecular Endocrinology 11, 172-182 (1997).

Chakraborty TR, Gore AC

Aging-Related Changes in Ovarian Hormones, Their Receptors, and Neuroendocrine Function.

Experimental Biology and Medicine 229, 977-987 (2004).

Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME.

Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and *in Vivo*.

Endocrinology 148, 3580-3590 (2007)

Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG, Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS.

Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice.

Biology of Reproduction 83, 114-121 (2010).

- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.
Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*. 143, 1076-1084 (2002).
- Greenstein BD.
Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors. *Endocrinology* 130, 3184-3190 (1992).
- Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T
Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries. *Biology of Reproduction* 81, 1002-1009 (2009)
- Herath CB, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome NP, Suzuki AK, Taya K.
Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat. *Biology of Reproduction* 65, 1623-1633 (2001).
- Hutter HS, Gibson MJ.
Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice. *Biology of Reproduction* 38, 636-638 (1988).
- Hirshfield AH
Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 10-15 (1997).
- Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T.
The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biology of Reproduction* 45, 547-552 (1991).
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda M, AND Hayashi S
Increased Expression of Mullerian-Inhibiting Substance Correlates with Inhibition of Follicular Growth in the Developing Ovary of Rats Treated with E2 Benzoate. *Endocrinology* 143, 304-312 (2002)
- Ikeda Y, Tanaka H, and Esaki M
Effects of Gestational Diethylstilbestrol Treatment on Male and Female Gonads during Early Embryonic Development. *Endocrinology* 149:3970-3979 (2008).
- Jager W, Correia MA, Bornheim LM, Mahnke A, WALTER G, Hanstein WG, XUE L, and Benet LZ
Ethinylestradiol-mediated induction of hepatic *CYP3A9* in Female rats: implication for cyclosporine metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*, 27, 1505-1511 (1999)
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, and Pepling M.
Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival. *Biology of Reproduction* 74, 161-168 (2006)
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W
The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1. *Environmental Health Perspectives*. 109, 785-794 (2001)
- Kelly PA, Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Shirota M, Edery M, Dusanter-Fourt I, Djiane J.
Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biology of Reproduction* 40, 27-32 (1989).
- Kenny HA, Woodruff TK
Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 147, 51-60 (2006).

- Kezele P and Skinner MK.
Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly.
Endocrinology 144, 3329-3337 (2003).
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE.
Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology*. 148:1968-1976 (2007).
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA.
Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263 (1998).
- Lei L, Shiyong Jin, Kelly E. Mayo and Teresa K. Woodruff
The Interactions Between the Stimulatory Effect of Follicle-Stimulating Hormone and the Inhibitory Effect of Estrogen on Mouse Primordial Folliculogenesis.
Biology of Reproduction 82, 13-22 (2010)
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S.
Consequences of Fetal Irradiation on Follicle Histogenesis and Early Follicle Development in Rat Ovaries.
Biology of Reproduction 75, 749-759 (2006)
- Melinda E. Wilson and Robert J. Handa
Ontogeny of Gene Expression in the Gonadotroph of the Developing Female Rat.
Biology of Reproduction 56, 563-568 (1997)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN.
Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus.
Biology of Reproduction 46, 1080-1085 (1992).
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS.
Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats.
Biology of Reproduction 53, 1198-207 (1995).
- Murakami T, Sato A, Inatani M, Sakurai H, Yumoto R, Nagai J, Takano M.
Effect of neonatal exposure of 17beta-estradiol and tamoxifen on hepatic CYP3A activity at developmental periods in rats.
Drug Metabolism and Pharmacokinetics 19, 96-102 (2004).
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, Garcia-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M.
Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*. 150, 2359-2567 (2009).
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA.
Mechanisms of estrogen action.
Physiological Reviews 81, 1535-1565 (2001).
- Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K.
Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats.
Experimental Animals 58, 471-479 (2009).
- Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL.
Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain.
Molecular Brain Research 54, 175-180 (1998).
- Ramirez MC, Luque GM, Ornstein AM, Becu-Villalobos D.
Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice.
Journal of Endocrinology 207, 301-308 (2010).

- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP.
Early Maturation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion and Sexual Precocity after Exposure of Infant Female Rats to Estradiol or Dichlorodiphenyltrichloroethane.
Biology of Reproduction 77, 734-742 (2007)
- Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr.
In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats.
Toxicological Sciences. 114, 133-148 (2010).
- Sakuma Y
Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat.
Journal of Neuroendocrinology 21, 410-414 (2009).
- Schindler R, Nilsson E, Skinner MK.
Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF.
PLoS ONE 5, e12979 (2010)
- Schwarz JM, McCarthy MM.
The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat.
Horm and Behavior. 54, 662-668 (2008).
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A.
Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles.
Molecular Cellular Endocrinology 272, 22-37 (2007).
- Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K.
Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats.
Reproduction 125, 85-94 (2003).
- Shirota M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shirota K, Kelly PA.
Detection of in situ localization of long form prolactin receptor messenger RNA in lactating rats by biotin-labeled riboprobe.
Endocrine Journal. 42, 69-76 (1995).
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA.
Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver.
Molecular Endocrinology 4, 1136-1143 (1990).
- Sokka TA, Huhtaniemi IT.
Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat.
Biology of Reproduction 52, 1404-1409 (1995).
- Tena-Sempere M
Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function.
International Journal of Andrology 33, 360-368 (2010).
- Thomas FH, Vanderhyden BC.
Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth.
Reproductive Biology and Endocrinology 4, 19 (2006).
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK.
The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries.
Molecular Human Reproduction, 15, 795-803 (2009)
- Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L.
Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary.
Journal of Endocrinology 191, 549-558 (2006).
- Vannier B, Raynaud JP.
Long-term effects of prenatal oestrogen treatment on genital morphology and reproductive function in the rat.
Journal of Reproduction and Fertility 59, 43-49 (1980).

- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP.
Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian
function.
Reproduction 131, 1-9 (2006).
- Wang C and Roy SK.
Development of Primordial Follicles in the
Hamster: Role of Estradiol-17 . .
Endocrinology 148, 1707-1716 (2007)
- Watanabe C, Kuwagata M, Yoshimura S, Azegami J,
Kojima K, Ono H, Nagao T.
An improved technique for repeated gavage
administration to rat neonates.
Congenit Anom (Kyoto) 43, 177-179 (2003).
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N,
Shinoda K, Takatsuki M
Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals
and Hershberger assay of 30 chemicals.
Toxicology 183, 93-115 (2003)
- Yeh J, Kim B.
Increasing blunting of inhibin responses to
dynamic ovarian challenge is associated with
reproductive aging in the rat.
Reproductive Sciences 14, 10-19 (2007).
- Ying Chen, Wendy N. Jefferson, Retha R. Newbold,
Elizabeth Padilla-Banks, and Melissa E. Pepling
Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit
Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle
Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and
in Vivo.
Endocrinology 148, 3580-3590 (2007).
- Yoshida M, Watanabe G, Shirota M, Maekawa A, Taya
K.
Reduction of primordial follicles caused by
maternal treatment with busulfan promotes
endometrial adenocarcinoma development in donryu
rats.
Journal of Reproduction and Development. 51,
707-714 (2005).
- Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL.
Effects of genistein on ovarian follicular
development and ovarian life span in rats.
Fitoterapia. 81, 998-1002 (2010).

図1 単回皮下投与動物の体重推移(実験1)

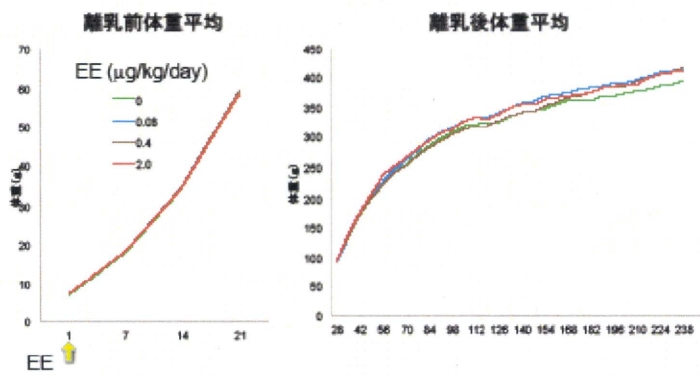


図2 反復経口投与動物の体重推移(実験2)

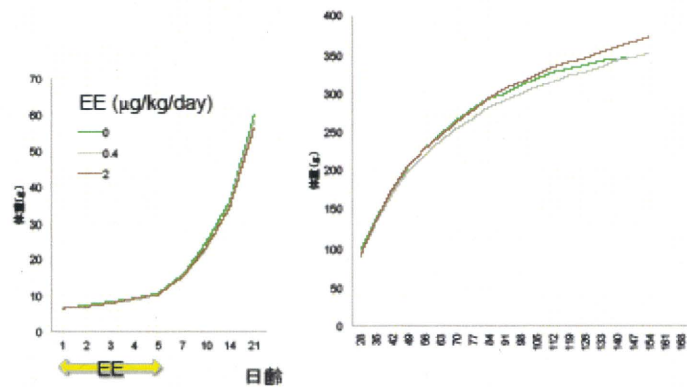


表1 開眼と腔開口の日齢と体重

単回皮下投与(実験1)

EE (μg/kg)	0	0.08	0.4	2
開眼(日)	13.8	13.9	13.7	13.6
体重(g)	34.7	34.9	35.4	34.9
腔開口(日)	31.9	32.5	32.3	31.9
体重(g)	114	118	119	120

反復経口投与(実験2)

EE (μg/kg/day)	0	0.4	2
開眼(日)	13.5	13.8	13.7
体重(g)	34.8	34.2	33.4
腔開口(日)	33.0	33.1	31.9
体重(g)	125	121	115

図3 性周期のタイプ(実験1 単回皮下投与)

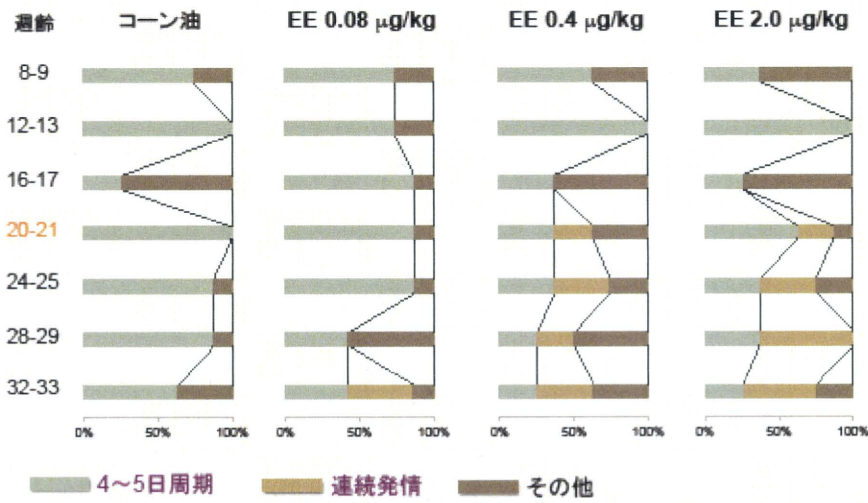


図4 性周期のタイプ(実験2、反復経口投与)

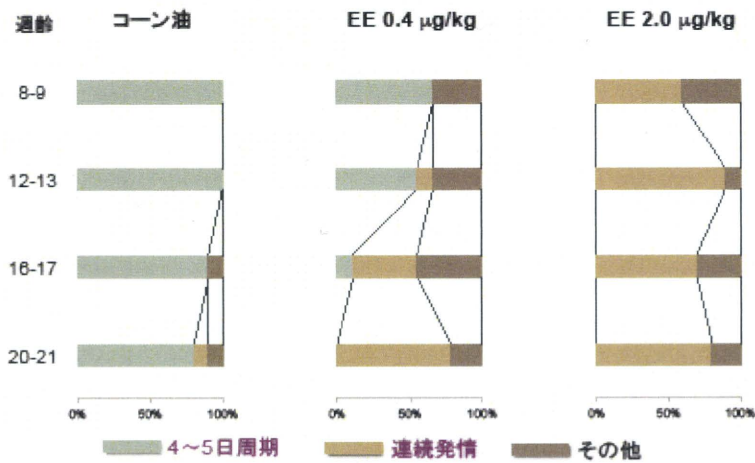


図5 発情前期と発情期日数の割合
(実験1、単回皮下投与)

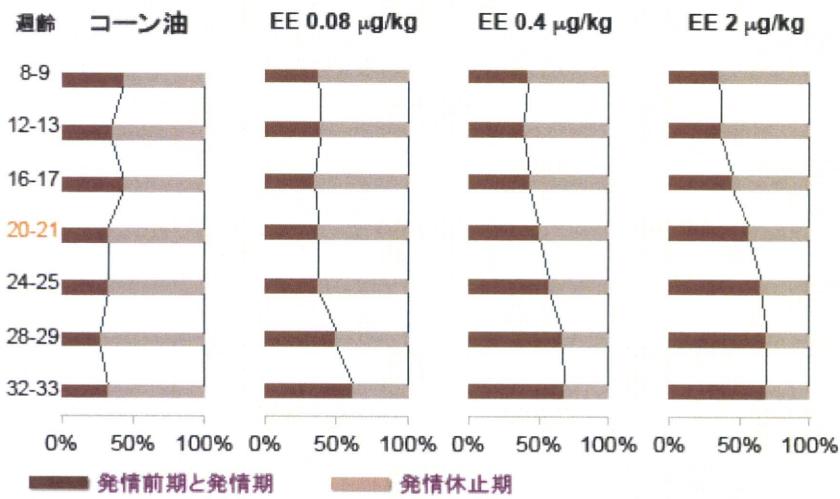


図6 発情前期と発情期日数の割合
(実験2、反復経口投与)

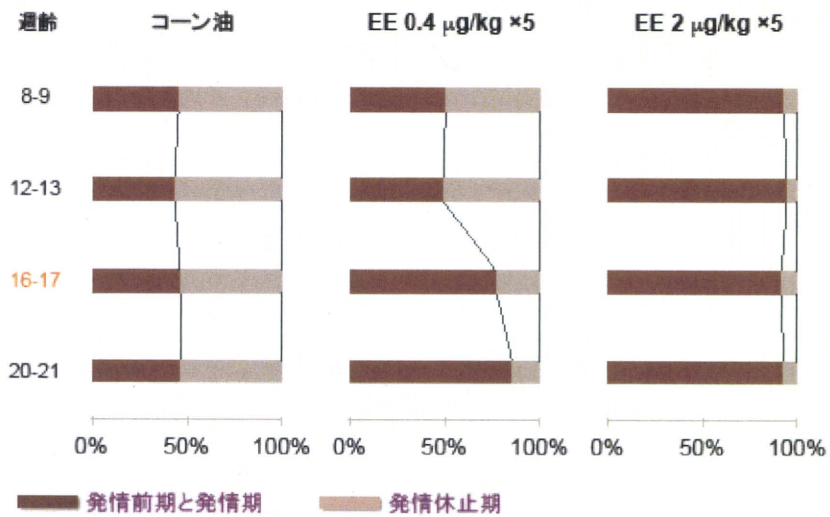


写真1 最終剖検で認められた乳汁の貯留

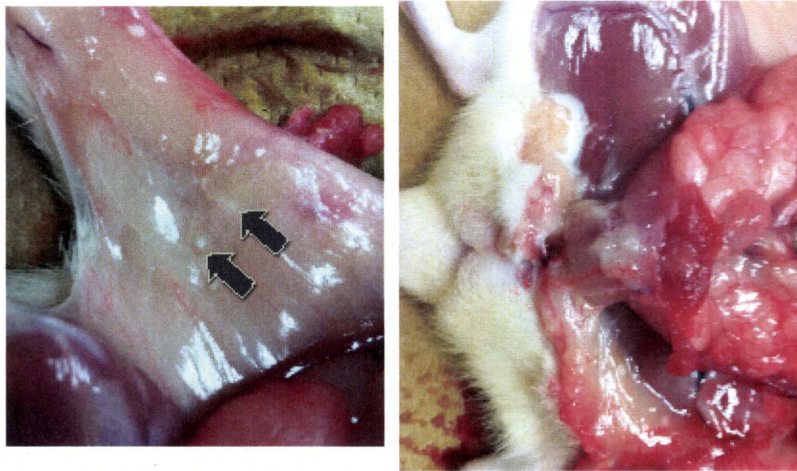


表5 最終剖検における乳汁貯留の頻度

実験1(単回皮下投与)

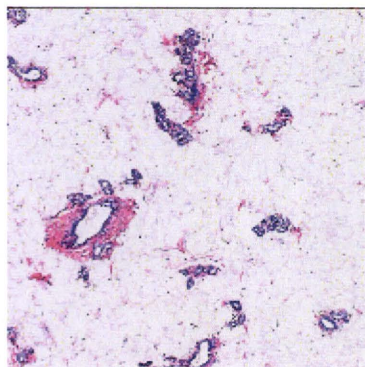
EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	0.08	0.4	2.0
頻度	0/8	1/8	4/8	3/8

実験2(反復経口投与)

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0 \times 5	0.4 \times 5	2.0 \times 5
頻度	0/10	2/10	6/10

写真2 代表的な乳腺組織
(実験2、反復経口投与、HE染色)

対照群



EE 2 $\mu\text{g}/\text{kg}\times 5$

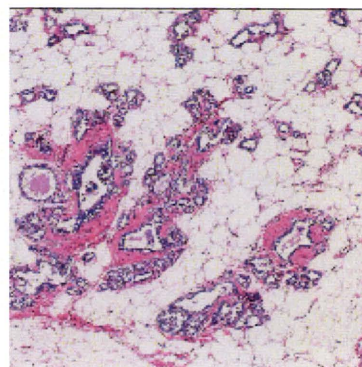
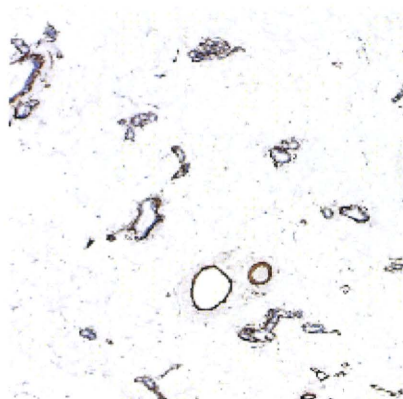


写真3 代表的な乳腺組織
(実験2、反復経口投与、 α -SMA免疫染色)

対照群



EE 2 $\mu\text{g}/\text{kg}\times 5$

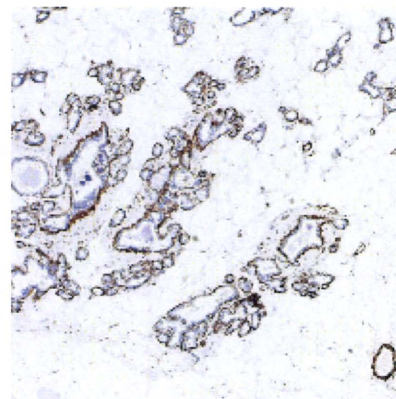


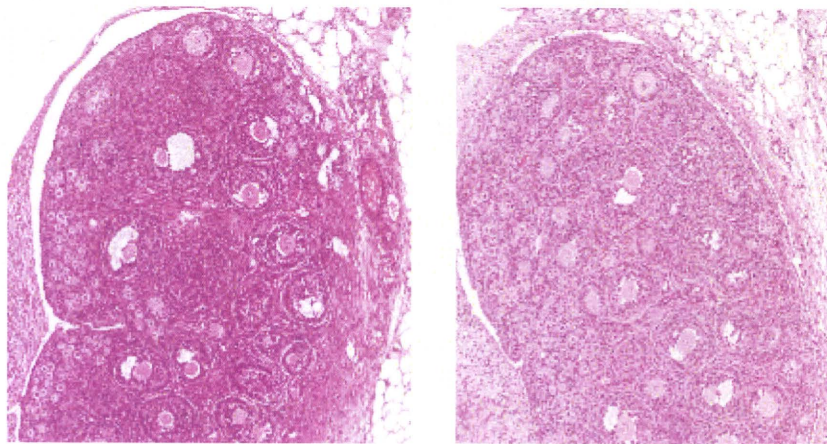
表6 最終剖検時器官重量(実験1、単回皮下投与)

EE (N)	0 µg/kg (8)	0.08 µg/kg (8)	0.4 µg/kg (8)	2.0 µg/kg (8)
体重 (g)	395	418	422	414
卵巢 (mg)	89	72	61	72
子宮 (mg)	621	749	664	691
下垂体 (mg)	19	22	26	24
肝臓 (g)	12.0	12.6	13.2	12.7
腎臓 (g)	2.2	2.2	2.3	2.4
脾臓 (mg)	610	647	633	641
副腎 (mg)	79	72	82	84
胸腺 (mg)	148	152	133	161

表7 最終剖検時器官重量(実験1、反復経口投与)

EE (N)	0 µg/kg (10)	0.4 µg/kg (9)	2 µg/kg (10)
体重 (g)	354	363	379
卵巢 (mg)	78	59↓	45↓
子宮 (mg)	619	584	465↓
下垂体 (mg)	15	23↑	22↑
肝臓 (g)	11.1	12.4	13.6↑
腎臓 (g)	2.4	2.2	2.4
脾臓 (mg)	603	638	708
副腎 (mg)	75	79	83
胸腺 (mg)	226	205	213

写真3 10日齢の卵巢(実験2、HE染色)

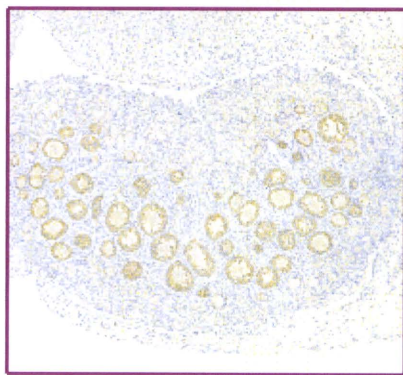


対照群

2.0 µg/kg/day投与群

写真4 6日齢の卵巢(実験2、免疫染色)
EE (2 µg/kg/day)

抗ミューラー管抑制因子抗体



抗ラミニン抗体

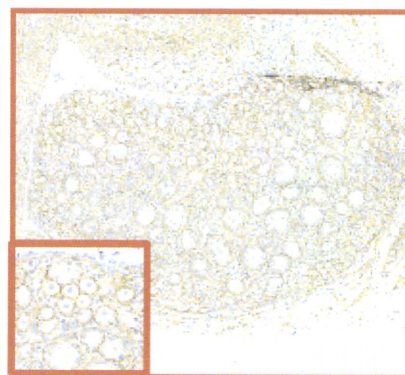
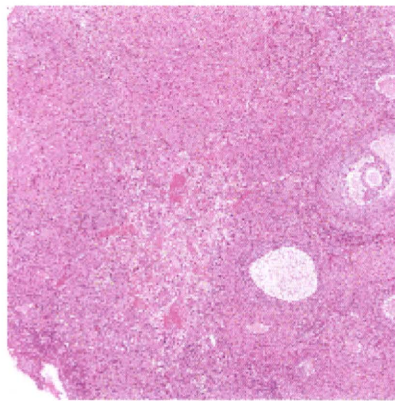


写真5 対照群の卵巣(最終剖検)

単回皮下投与群(実験1)



反復経口投与群(実験2)

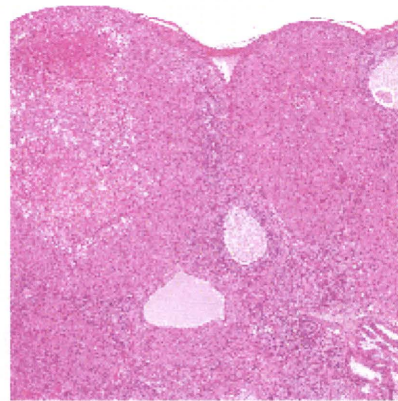


写真6 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の卵巣(実験1)

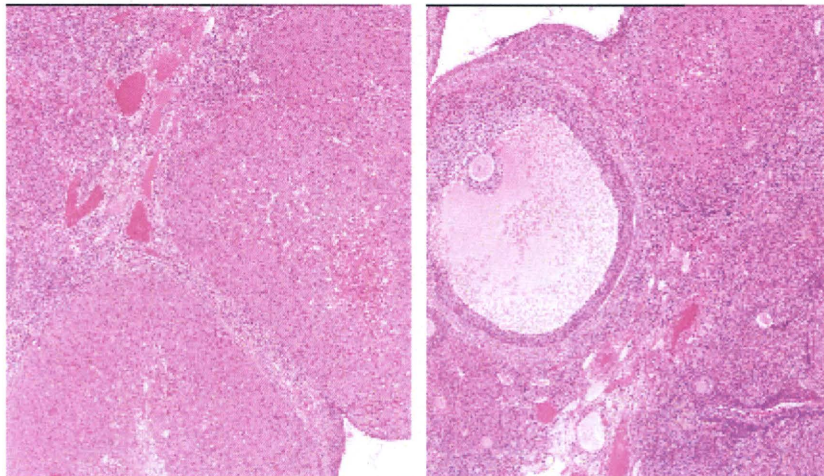


写真7 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群の卵巣(実験2)

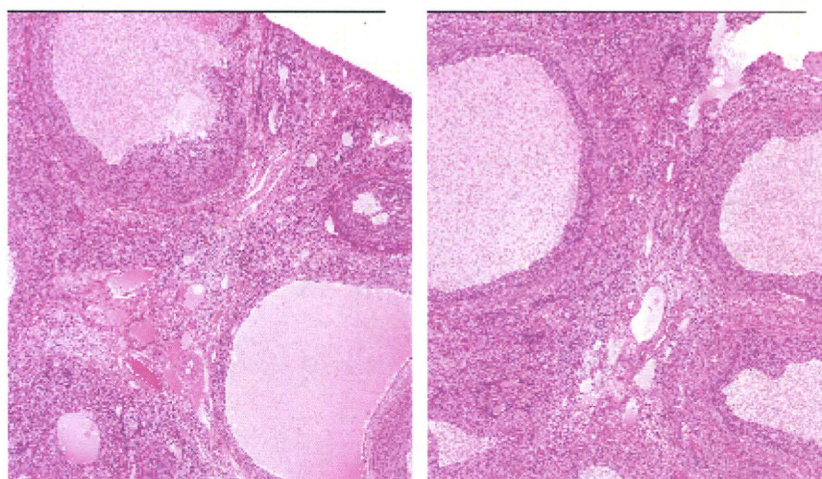


写真8 高用量曝露動物の卵巣(HE染色)

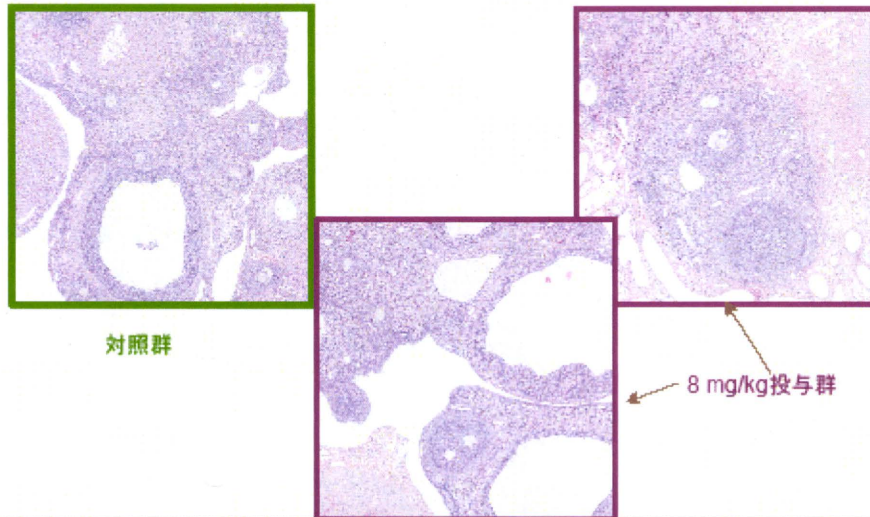


写真9 高用量曝露動物の卵巣
(抗ラミニン抗体による免疫染色)

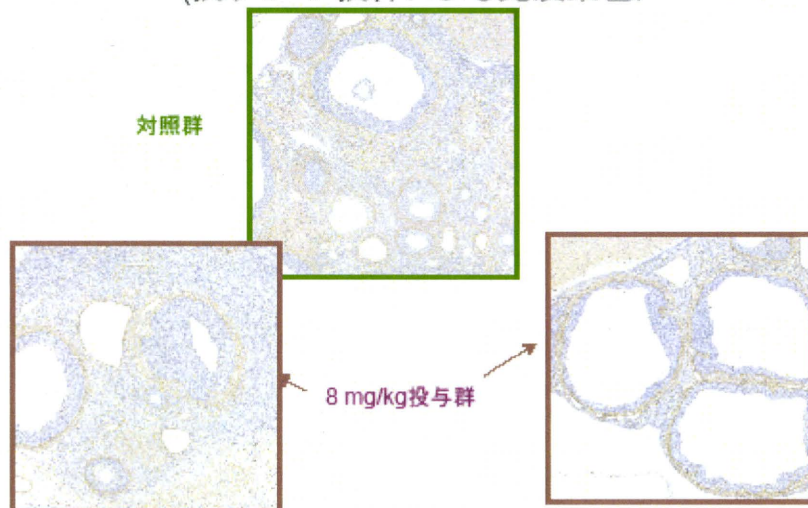


写真10 高用量曝露動物の卵巣
(抗MIS抗体による免疫染色)

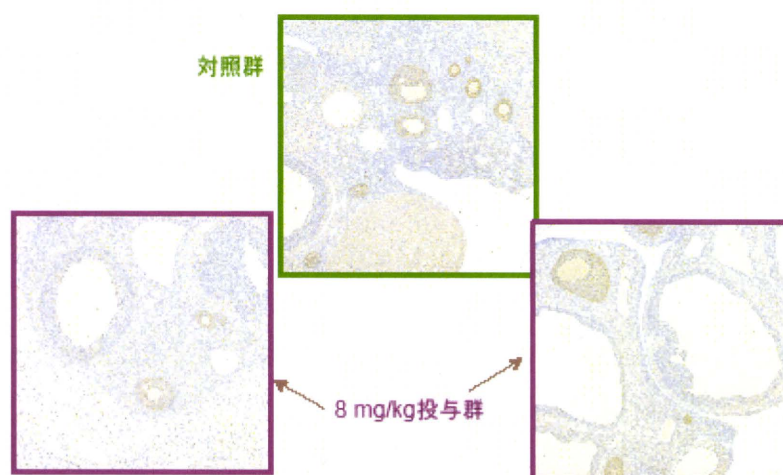
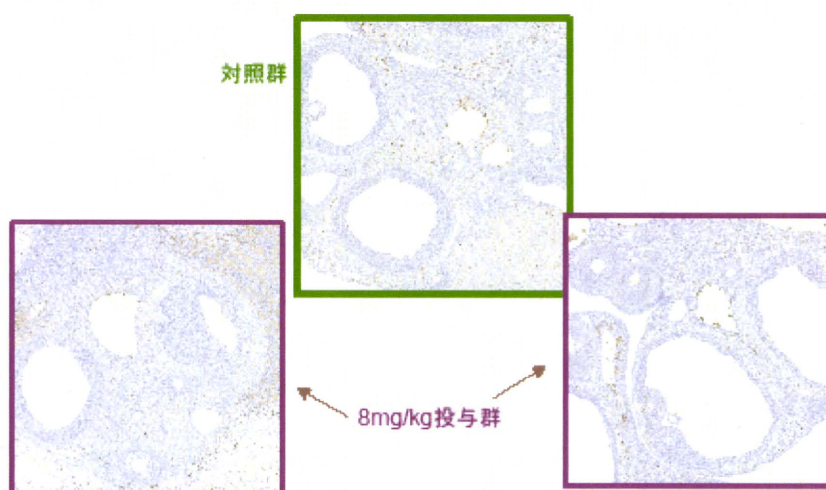


写真11 高用量曝露動物の卵巣
(抗ED1抗体によるマクロファージの免疫染色)



厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業

「化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の機序解明と指標の
確立に関する研究」

担当課題

化学物質およびホルモンの臨界期曝露による視床下部・下垂体・性腺軸の高次系に対する
遅発性影響に対する比較内分泌学的アプローチ

—出生直後のエチニールエストロゲン投与が、雌ラットの春機発動初期の生殖内分泌機
能に与える影響—

研究分担者 渡辺 元 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授
研究協力者 岡崎 祥子 東京農工大学大学

要旨

化学物質を臨界期に暴露した影響が遅れて出現する機序を解明するため、エチニール・エストロゲン (EE) を、雌ラットに、脳の雄への性分化臨界期に含まれる出生第 1 日に 1 回投与し、早期に現れる指標を明らかにするために、性成熟前の 10 日齢から 20 日齢における性腺刺激ホルモンおよびインヒビンの分泌変化と卵巣および子宮の発育を解析した。その結果、EE200 および 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では卵巣の卵胞発育を抑制し、卵巣ホルモン分泌の減少によってネガティブフィードバックが低下し、性腺刺激ホルモンの分泌は促進されることが示唆された。

A. 目的

人間が作り出した様々な化学物質は、人類社会の発展に大きく貢献している一方で、胎児に奇形を生じ、癌の発生を増加させるなどの負の側面を持つことが明らかにされて来た。また、ある種の化学物質は、エストロゲン作用を持ち、性分化に異常を来すことにより、生殖機能に大きな影響を及ぼし、種の存続に危険であるとの警鐘が鳴

らされた (Toppari et al., 1998)。エストロゲン作用を示すオクチルフェノールは、投与する量に応じて性成熟後の発情周期の継続期間が変化することが報告されている (Katsuda et al., 2000a)。

哺乳動物は性染色体 X をホモに持つ雌が基本形であり、雄は Y 染色体の短腕にある性決定遺伝子によって精巣が誘導される。動物種によって異なるが、妊娠期あるいは

新生子期の特定の時期（臨界期）に精巣から分泌されるアンドロジェンによって脳が雄型へと性分化する。アンドロジェンは血流を介して脳に届き、エストロジェンに返還されて性中枢を雄化する。成熟した雌では、卵巣の卵胞から分泌されるエストロジェンによって性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）および黄体形成ホルモン（LH）のサージ状分泌が誘起される結果、成熟した卵胞が排卵する（Legan et al., 1975）。雄化した性中枢を持つ動物では、たとえエストロジェンが十分量有ったとしても黄体形成ホルモンのサージ状分泌は起きず、周期的な性ホルモンの分泌は生じない。

ラットでは中枢の性分化は出生前後の1週間に起きることが知られている。アンドロジェンを出生後1週間に投与すると陰の開口が早まり、開いた陰はピンホール状で、開口後の陰スメア像は角化細胞のみの発情期像を連続して示す（Gorski et al., 1977）。

本研究では、エチニル・エストロジェンを用いて、臨界期の暴露が遅発的影響を生じるメカニズムについて明らかにすることを目的とした。胎子および新生子血中でエストロジェンは α フェトプロテインに結合し、脳内には入らない（McEwen et al., 1975）。今回使用したエチニルエストラジオールは経口避妊薬に使用されており、 α フェトプロテインに結合しないことが知られている。

B. 材料と方法

実験1：春機発動期初期の性腺刺激ホルモ

ン分泌と性腺の発育に与える新生子期 EE 処置の影響

雌雄の成熟 Wistar-Imamichi ラットを交配し、得られた雌産子に出生後24時間以内にごま油に溶解した 17α Ethynylestradiol (EE, Sigma E4876) を、ハミルトンシリンジを用いて腰部皮下に1回投与した。対照群にはごま油のみ投与した。EEの投与量により6群（対照群, 0.2, 2.0, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）を設けた。

投与後、体重を毎日測定した。各群の出生後10日、15日、20日に、断頭によりヘパリンを添加したカップに末梢血を採取した。採取した血液を遠心し、血漿を分離して -20°C で測定まで保存した。下垂体前葉を採取し、生理的食塩水0.5 mlに浸漬して -20°C で保存した。子宮、卵巣、副腎、腎臓、肝臓を採取し重量を測定した。また、子宮をリン酸緩衝4%パラフォルムアルデヒドで固定し、パラフィン包埋後組織切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色後観察した。

採取した血漿中のゴナドトロピンおよび性ステロイド濃度を、ラジオイムノアッセイ法を用いて測定した。

下垂体前葉は、超音波ホモジナイザーを用いて破碎し、ゴナドトロピン含有量を測定した。

実験2：性成熟後の発情周期に与える新生子期 EE 処置の影響

出生後24時間以内のEEの単回投与が、陰の開口時期および性成熟後の雌の発情周

期を調べるために、溶媒(ごま油)投与対照群、200 μ g/kg投与群、2000 μ g/kg投与群の3群を設けた。膣開口後毎日膣スメアを観察し、発情周期を判定した。

微量ホルモン測定法

10日齢から20日齢の雌ラットの抹消血液中黄体型性ホルモン(LH)を測定するために、図1に示した試験管(Micro tube for micro sedimentation, SARSTEDT, Nümbrecht, Germany)を用いて、微量測定が可能なラジオイムノアッセイ法を以下のように設定した。

微量ホルモン測定法手順

- ①標準品(ratLH-RP3)またはサンプル(25 μ l以下)に1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む0.05M PBSを加えて50 μ l+第一抗体(ratLH抗体)25 μ l。
- ②4℃で48時間インキュベート。
- ③標識抗原にはクロラミンT法によって¹²⁵Iで標識したratLH-I10 25 μ l(1%BSA)を全ての試験管に添加。
- ④4℃で48時間インキュベート。
- ⑤第二抗体として抗ウサギ γ グロブリンヤギ血清25 μ l(5%Polyethylene glycol)を使用。
- ⑥4℃で一晩インキュベート。
- ⑦4℃で1,700 \times gで30分間遠心。
- ⑧チューブ先端を切断し、上清を除去。
- ⑨切断した先端を別のチューブに移し、 γ カウンタで沈殿の放射能を測定。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、東京農工大学動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

C. 結果

実験1

各処置群で体重増加には差が見られなかった(図2)。

また、腎(図5)、肝(図6)および副腎(図7)の体重1gあたりの相対重量はEEの投与によって変化しなかった。

子宮の体重1gあたりの相対重量は、EEの投与量が多いほど低下した(図3)。卵巢の体重1gあたりの相対重量はEEの投与量が多いほど低下した(図4)。それらの影響は20日齢で顕著であった。

子宮の組織像をHE染色でして観察したところ、10日齢では顕著な差が認められないものの、20日齢では子宮腔上皮がEE2000 μ g/kg投与群で対照群に比較して低かった(図8)。

20日齢の卵巢の組織像では、対照群で種々の大きさの胞状卵胞が認められるのに対し、EE200 μ g/kg投与群では200 μ m以下の小さな胞状卵胞しか認められず、EE2000 μ g/kg投与群では殆ど胞状卵胞が認められなかった(図17)。さらにEE2000 μ g/kg投与群では1つの卵胞内に2つの卵を持つ異常卵胞が認められた(図18)。

内分泌学的変化