

animals treated orally with 0, 10 µg/kg of EE on postnatal day (PND) 1, 5 or 7.

Administration of EE	N	Postnatal week 8-9	Postnatal week 12-13	Postnatal week 16-17	Postnatal week 20-21
PND 1					
0 µg/kg	4	3.8 ± 0.6	4.4 ± 0.5	4.4 ± 0.5	5.0 ± 0.7
10 µg/kg	4	3.6 ± 1.2	4.2 ± 3.3	3.2 ± 2.5	2.5 ± 1.5
PND 5					
0 µg/kg	9	3.9 ± 0.6	4.0 ± 0.9	4.1 ± 0.8	4.3 ± 0.2
10 µg/kg	9	3.5 ± 0.7	3.7 ± 1.5	3.9 ± 1.4	1.8 ± 0.6
PND 7					
10 µg/kg	4	2.3 ± 1.3	5.9 ± 2.2	5.0 ± 1.4	1.8 ± 1.6

Values indicate mean ± SEM.

Table 14

Organ weights at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals treated orally with 0 or 10 µg/kg of EE on postnatal day 1.

Administration of EE	N	Body weight (g)	Pituitary (mg)	Liver (g)	Adrenal glands (mg)
PND 1					
0 µg/kg	4	355 ± 8	18.1 ± 3.7	4.4 ± 0.5	64.3 ± 7.1
10 µg/kg	4	368 ± 41	23.0 ± 4.4	3.2 ± 2.5	81.0 ± 4.4
PND 5					
0 µg/kg	9	360 ± 10	18.3 ± 4.8	4.1 ± 0.8	69.1 ± 2.7
10 µg/kg	9	348 ± 7	20.5 ± 4.1	3.9 ± 1.4	71.1 ± 3.9
PND 7					
10 µg/kg	4	369 ± 18	23.5 ± 13.4	5.0 ± 1.4	64.0 ± 3.4

Values indicate mean ± SEM.

Table 15

Ovulation at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals treated orally with 0 or 10 µg/kg of EE on postnatal day 1.

Administration of EE	Ovulated /N	Body weight (g)	Ovaries (mg)	Uterus (mg)	Oocytes in the ampullae
PND 1					
0 µg/kg	3/4	351 ± 10	83.7 ± 2.6	500 ± 73	13.0 ± 1.0
10 µg/kg	0/4	---	---	---	---
PND 5					
0 µg/kg	7/9	363 ± 13	81.6 ± 4.8	507 ± 15	13.4 ± 0.7
10 µg/kg	3/9	336 ± 16	72.7 ± 1.3	477 ± 51	13.3 ± 0.9
PND 7					
10 µg/kg	0/4	---	---	---	---
Administration of EE	Not ovulated /N	Body weight (g)	Ovaries (mg)	Uterus (mg)	
PND 1					
0 µg/kg	1/4	368	47	560	
10 µg/kg	4/4	368 ± 41	55.0 ± 6.9	497 ± 52	
PND 5					
0 µg/kg	2/9	351	74	512	
10 µg/kg	6/9	355 ± 10	54.3 ± 4.1	517 ± 19	
PND 7					
10 µg/kg	4/4	369 ± 18	85.0 ± 16.5	448 ± 44	

Values indicate mean ± SEM.

Table 16

Incidence of macroscopic abnormality of the mammary gland at the terminal necropsy in the animals treated orally with 0, 10 or 20 µg/kg of EE on postnatal day 1.

Administration of EE	N	N of animals with a white spot
PND 1 0 µg/kg	4	0
10 µg/kg	4	0
PND 5 0 µg/kg	9	1
10 µg/kg	9	1
PND 7 10 µg/kg	4	1

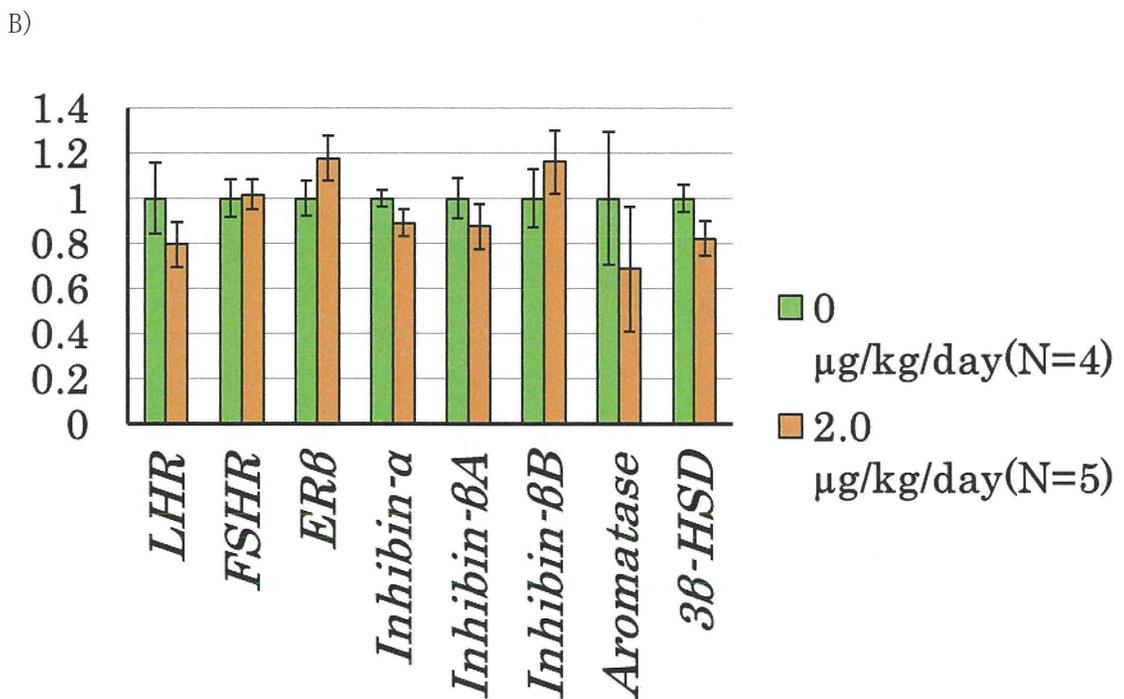
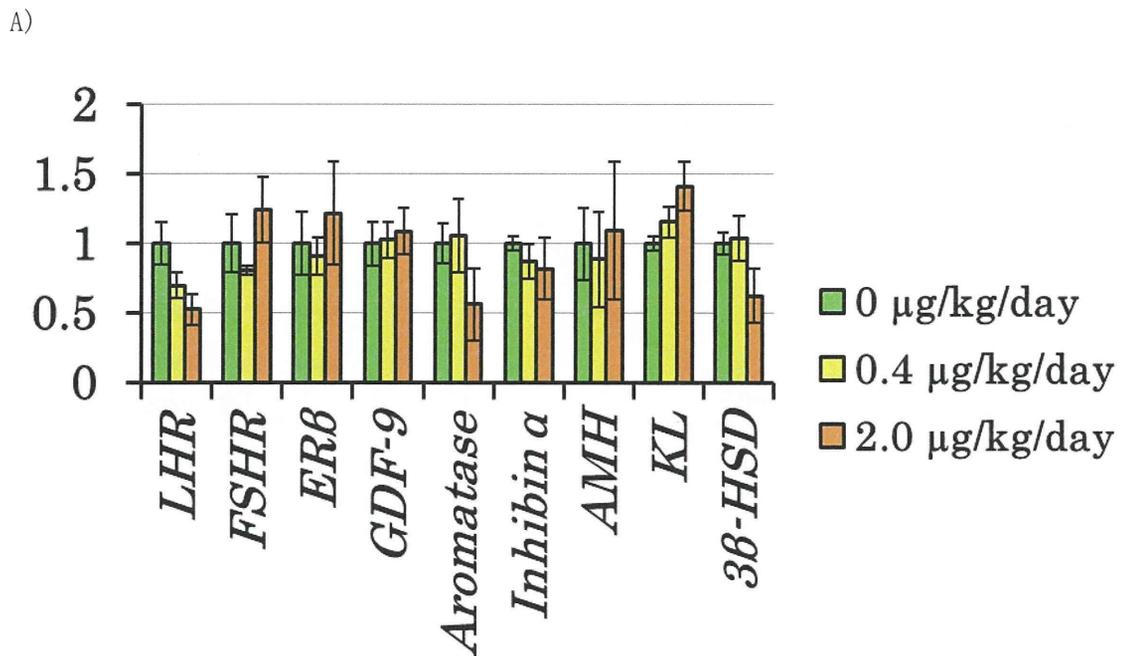


Fig. 1

The amounts of mRNAs encoding luteinizing hormone receptor (LHR), follicle-stimulating hormone receptor (FSR), estrogen β receptor (ER β), growth differentiation factor (GDF)-9, aromatase, inhibin α subunit, anti-mullerian hormone (AMH), kit ligand (KL) and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) ovary in the animals treated orally with 0-2 $\mu\text{g/kg}$ of EE from postnatal day 1 to day 5.

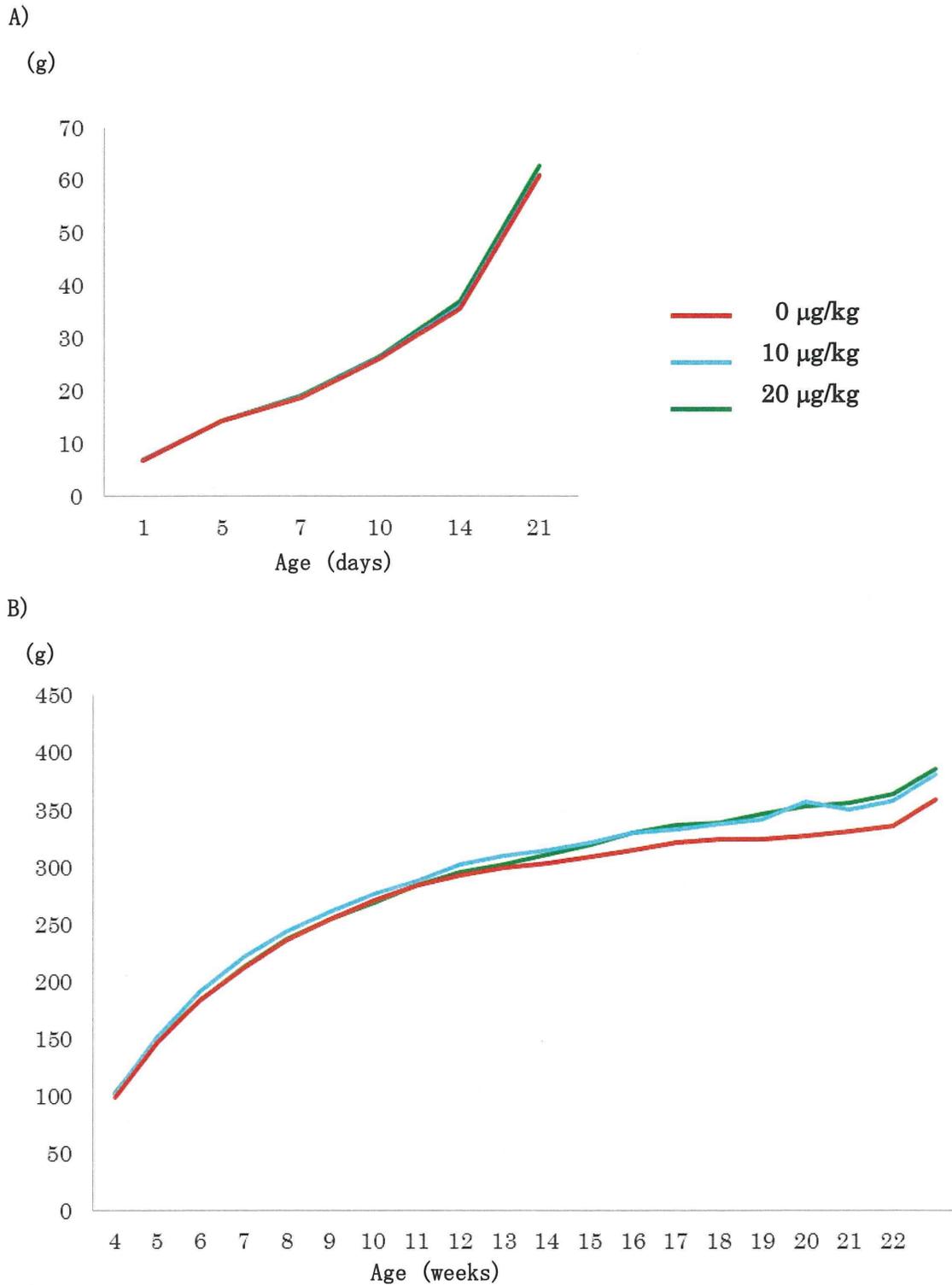
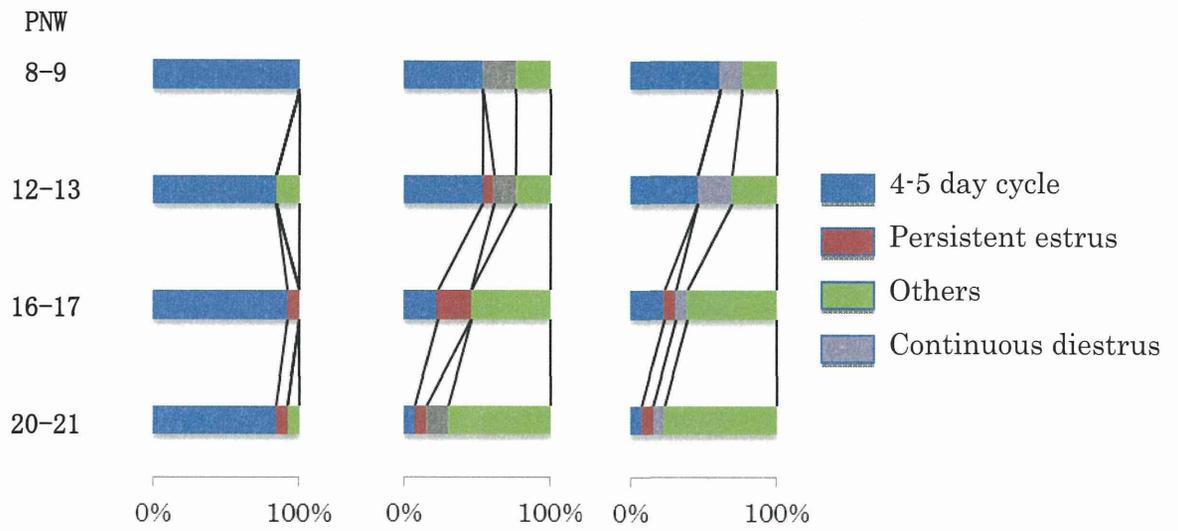


Fig. 2

Changes in body weights of animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1 during the pre- (A) and post weaning (B) periods. Each point represents average values of 13 animals.

A)



B)

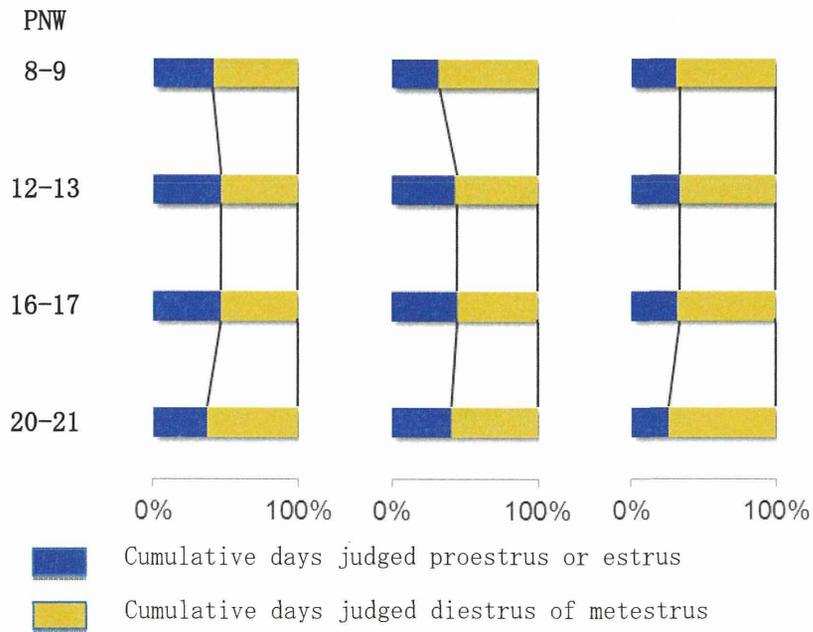


Fig. 4

Estrous cycle of female rats treated orally with 0 (corn oil), 10 or 20 µg/kg of EE on postnatal day 1. Each bar in panel A indicates ratio of animals showing 4-5 day cycle, persistent estrus, continuous diestrus or the other types. Each bar in panel B indicates ratio of cumulative days judged proestrus or estrus and those judged metestrus or diestrus in each observation period.

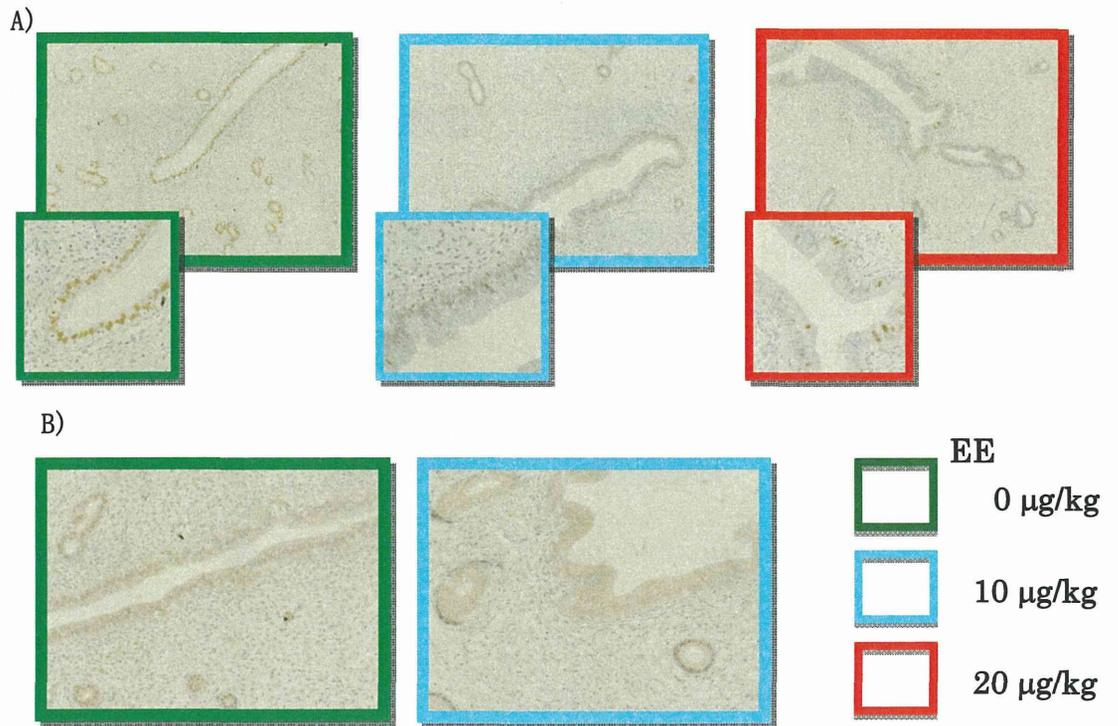


Fig. 5
Immunohistochemical localizations of PCNA (A) and estrogen α receptor (B) in the uterine tissue collected at postnatal week 22–23 from animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.

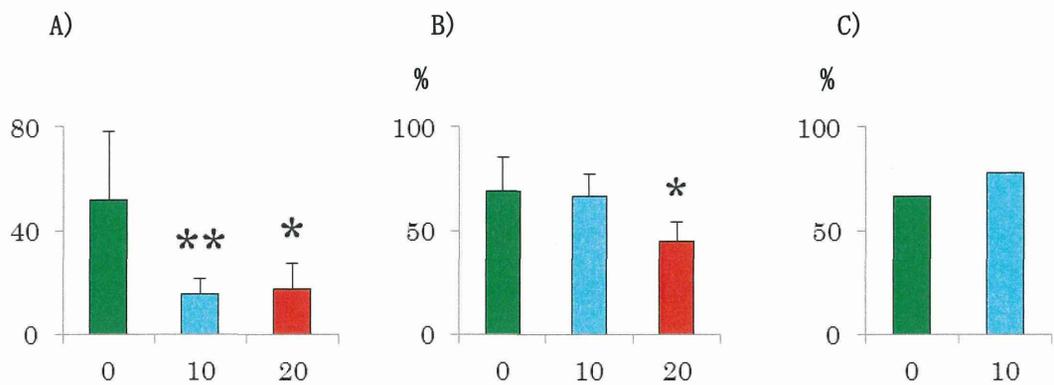


Fig. 6
Number uterine glands in a uterine section (A) and ratios of PCNA-positive (B) and estrogen α receptor-positive (C) cells to the luminal epithelial cells in the uterine tissue collected at postnatal week 22–23 from animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

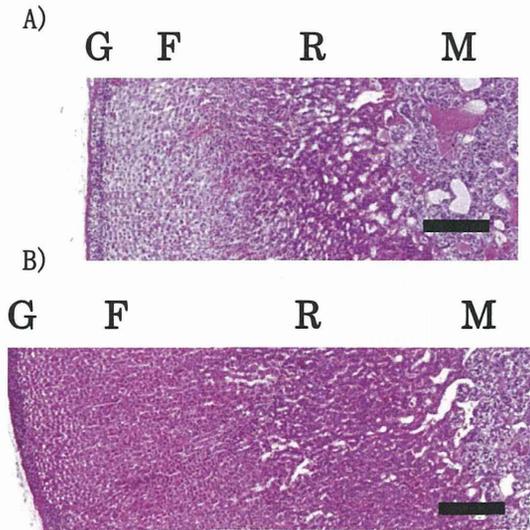


Fig. 7

Representative histology of adrenal glands collected at postnatal week 22-23 from animals treated orally with 0 (A) or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (B) of EE on postnatal day 1.

G, zona glomerulosa; F, zona fasciculata; R, zona reticularis; M, medulla. Hematoxyline and eosine staining; Bars indicate 200 μm .

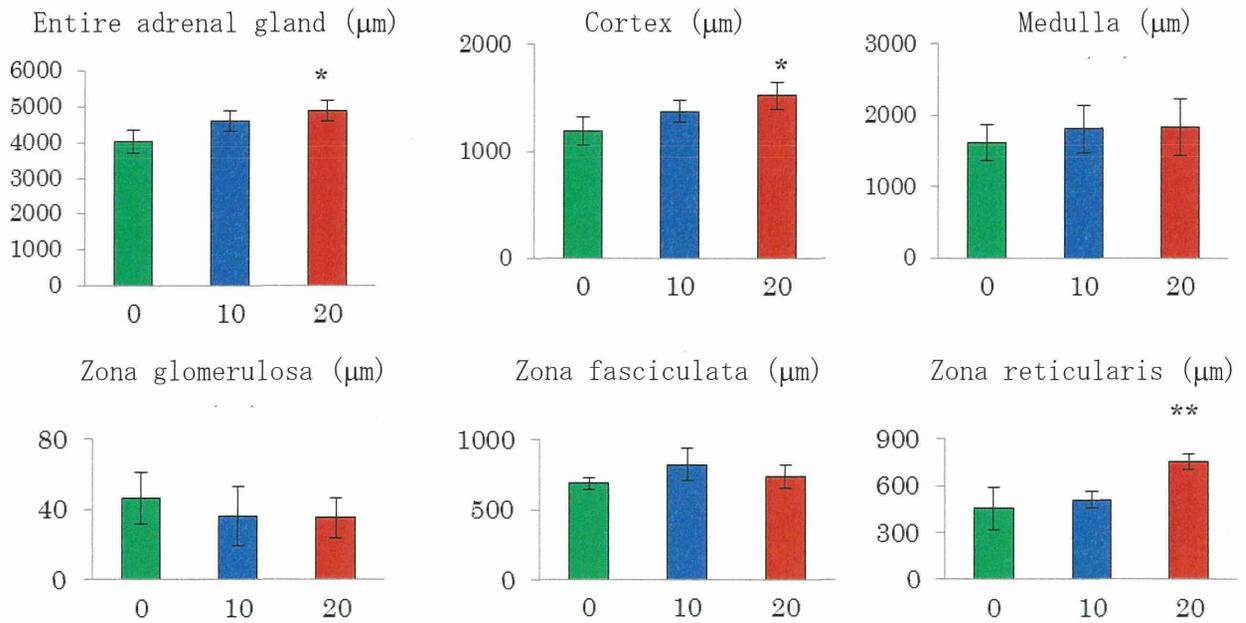


Fig. 8

Lengths of the entire and each part of adrenal glands collected at postnatal week 22-23 from the animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1. The lengths represent average for those of the longest and the shortest axes. Each column represents mean value for average length of the longest and the shortest axes from 3, 5 or 5 animals in the 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ treated group, respectively. Bars indicate standard deviation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

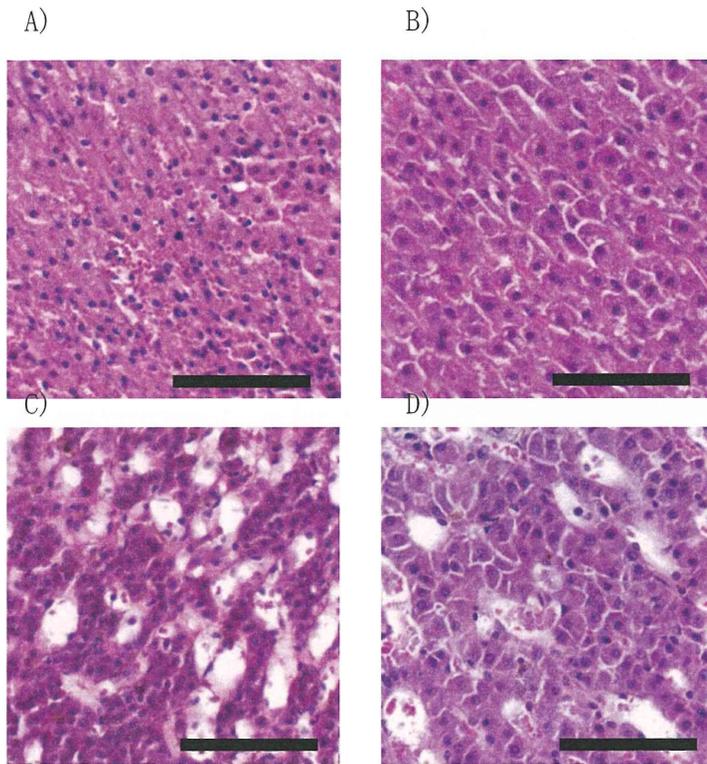


Fig. 9

Representative photographs of histology in zona fasciculata (A and C) and zona reticularis (B and D) of adrenal glands collected at postnatal week 22-23 from the animals treated orally with 0 (A and B) or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (C and D) of EE on postnatal day 1

Bars indicate 100 μm .

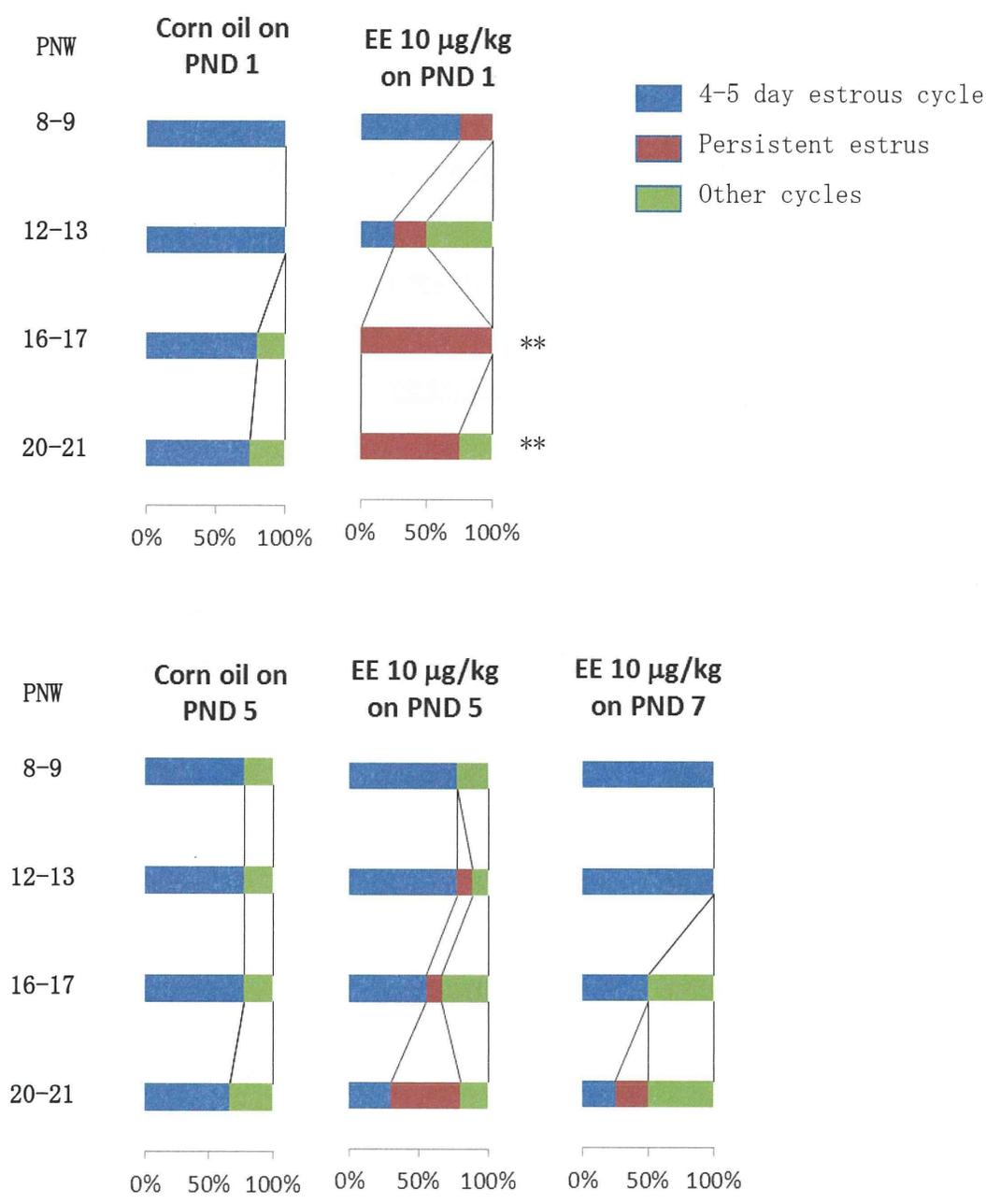


Fig. 10
 Estrous cycle of female rats treated orally with 0 (corn oil), 10 µg/kg of EE on postnatal day 1, 5 or 7. Each bar indicates ratio of animals showing 4-5 day cycle, persistent estrus, or the other types.

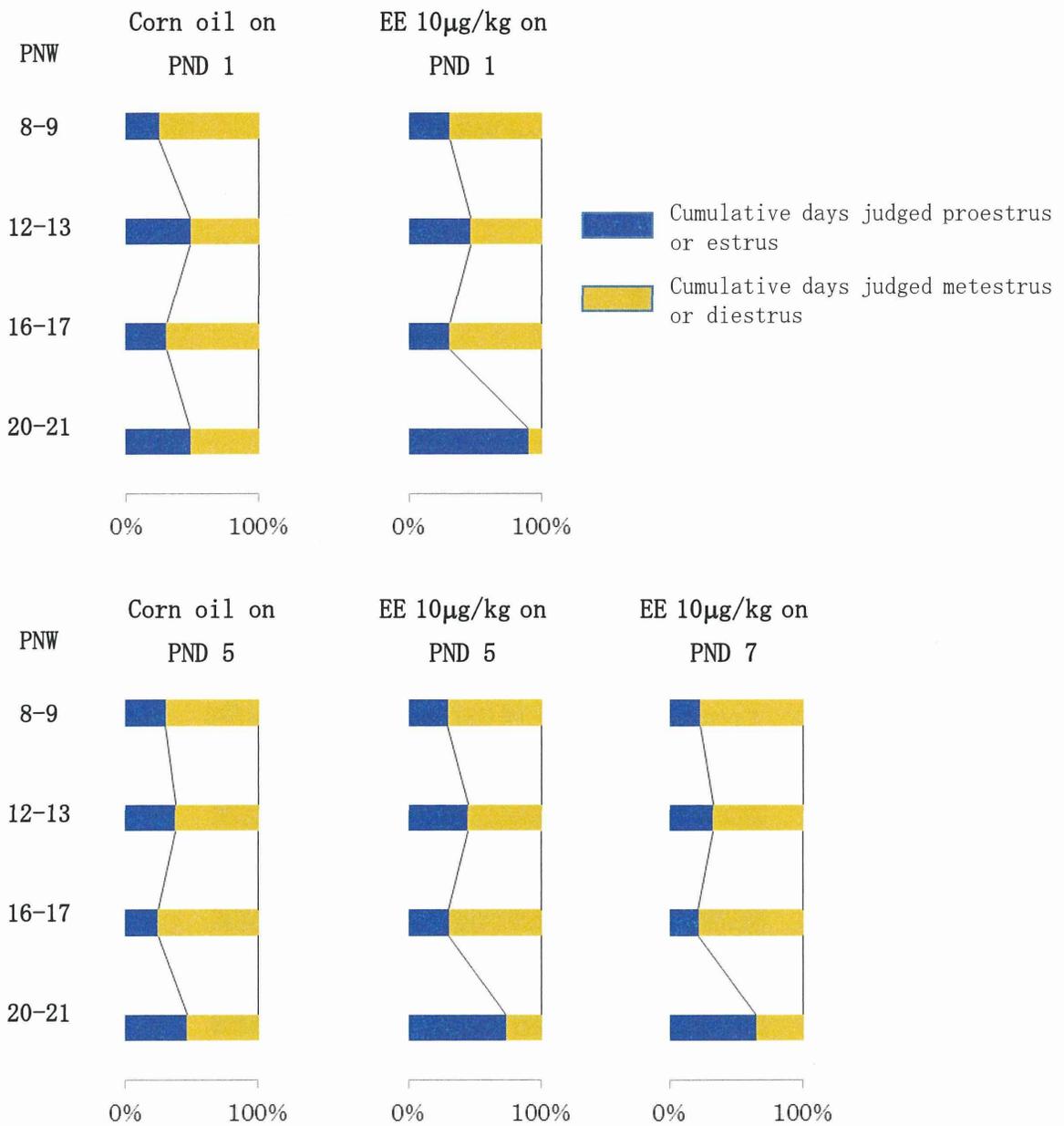


Fig. 11

Estrous cycle of female rats treated orally with 0 (corn oil) or 10 µg/kg of EE on postnatal day 1, 5 or 7. Each bar indicates ratio of cumulative days judged proestrus or estrus and those judged metestrus or diestrus in each observation period.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・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

分担研究課題： 出生直後のエチニールエストロジェン投与が、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：永岡 謙太郎 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門助教
研究協力者：野澤 香織 東京農工大学学

研究要旨

本研究は、化学物質の新生期曝露により性成熟後に起こる遅発性影響の機序を解明する一環として行われた。モデル物質として、エストロジェン作用を持つ化学物質であるエチニール・エストロジェン（EE）を用い、EEが雌ラットの生殖機能に及ぼす影響について、解析を行った。出生後24時間以内の雌ラットに、EE 20 μ g/kg（低濃度群・遅発影響誘発量）、200 μ g/kg（中濃度群・遅発影響誘発量）、あるいは2000 μ g/kg（高濃度群）を単回皮下投与した。性成熟後、発情周期を膻スメアの観察により毎日記録した。90日齢にて、発情前期（午前および午後）、発情期、休止期の各発情ステージでサンプルを採取し、各ステージにおける血中生殖関連ホルモン濃度の測定、卵巣における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。また、EE曝露による、性成熟以前の卵巣への影響を観察するため、5日齢の卵巣における生殖関連遺伝子の解析も行った。さらに、EEによる卵巣への直接的な影響を確認するため、出生24時間以内の雌ラットから摘出した卵巣を、EE添加培養液中にて培養したのち生殖関連遺伝子の発現解析を行った。対照群では、すべての個体で正常発情周期を示したが、EE投与群では、濃度依存的に正常発情周期を示す個体の割合が低下した。対照群、低濃度群の正常発情周期を示す個体では、発情前期の午前におけるエストラジオールおよびテストステロン濃度の上昇、黄体形成ホルモン（LH）と卵胞刺激ホルモンのサージ、発情前期午後から発情期にかけてのインヒビンの低下が観察された。一方、異常発情周期を示す個体では、このようなホルモン変動は見られなかった。90日齢の卵巣においては、EE投与量に応じていくつかの発情ステージにおいて、LH受容体、インヒビン α ・ β A・ β B、エストロジェン受容体 α のmRNA発現量が増加し、5日齢の卵巣でも、EE高濃度投与群でLH受容体mRNAの発現量が増加した。さらに、EE添加液中で培養を行った卵巣では、EE投与群におけるLH受容体の増加が顕著であった。EE投与により、遅発性影響の出現前には中枢の関与する生殖関連ホルモンの分泌異常は見られず、卵巣において、いくつかの生殖関連遺伝子の発現量変化が見られることがわかった。特にLH受容体は、EEの直接的影響により発現量の増加が引き起こされることから、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究では、17 β -エチニルエストラジオール (EE) をモデル物質として使用し、新生期雌ラットにおけるエストロゲン曝露が成熟後の生殖機能に及ぼす遅発性影響について検討を行った。EE は経口避妊薬の成分に含まれる人工エストロゲン剤であり、内分泌かく乱物質の一つとして知られている。EE は、ノニルフェノールなど他の内分泌攪乱物質に比べてエストロゲン作用が強いといわれている。また、骨粗しょう症、女性特有疾患等におけるさまざまなホルモン療法などにも使用されており、環境中への汚染が懸念されている。また、EE は環境水中で魚類の生殖機能に障害を与える主要な物質としても知られている。オスの性分化を阻害したり、精巣形成に異常を来たしたりすることで、繁殖能力の減弱や受精率の減少などの障害を与える。また、EE 暴露個体の子世代において、メスの割合が増加、オスの割合が減少するといった報告もされている。 [Jon P. Nash, 2004][Lange R. 2001]。

生殖機能老化の研究分野において、老化の指標として発情周期の乱れを観察する事が試みられている。雌の哺乳類の生殖年齢は、視床下部、下垂体、卵巣の相互作用により制御される。視床下部と下垂体は、性腺刺激ホルモンを放出し、卵巣の活動をコントロールしている。卵巣もまた、ステロイドホルモン産生や排卵といった重要な役割を担っている。通常、生殖機能の老化は、卵巣と生殖中枢のどちらか、もしくは両方に機能障害を来すことにより起こると考えられている。

マウスやラットにおける生殖機能の老化は、卵胞の減少、異常発情周期、ステロイドホルモンの不安定化、受精率の低下を特徴とし、なかでも、発情周期の不規則化は信頼性の高い、生殖機能の減退を示す指標である。マウスやラットなどのモデル動物を用いた、ヒトの生殖機能の老化に関する試験においても、規則的な発情周期から、

不規則な発情周期もしくは周期性のない状態に移行する現象が、一般的に老化の指標として用いられている[Brinton, 2012]。また、発情周期の不規則化は、明確に定義することができ、なおかつ追跡可能なことも加わって、利便性の高い生殖機能の加齢モデルとなっている。

以上より、EE による遅発性影響が、生殖機能の早期老化として観察されることが示唆された。これを受け、本研究では、化学物質の影響が発情周期の乱れる遅発性影響として出現する以前に、EE 曝露により体内に起きている異常があるかどうか、そして、異常があるとすればその原因が中枢か卵巣かもしくはその両者であるのか、およびその異常が遅発性影響にどう関わっているのか、ということに着目し、低濃度を中心にメカニズムの解明を進めた。

B. 研究方法

供試動物

供試動物には、Wistar-Imamichi ラットを用いた。成熟雌ラット (10 頭) 用意し、毎日スメアの確認を行い、発情前期にて雄ラットと同居交配を行った。薬物の投与は、出生後 24 時間以内の新生子雌ラットに行った。飼育環境は、14 時間明期 (5:00h-19:00h)、10 時間暗期の照明条件、室温 25 \pm 3 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 20% の条件下で飼育した。出生後 21 日目 (PND 21) で離乳後、餌 (日本農産工業アニマル、神奈川、日本) と水は自由摂取とした。

実験 1

試薬作製方法

EE 200 μ g/kg および 2,000 μ g/kg 投与群用の試薬は、それぞれ EE 10.0mg に対し 10ml と 100ml のゴマ油 (非焙煎、和光純薬工業、大阪) で、一晚 60 $^{\circ}$ C にて加温溶解した。EE 20 μ g/kg 投与群用の試薬は EE 200 μ g/kg をゴマ油で 10 倍希釈を行い、作製した。供試動物への投与方法および実験概要

出生後 24 時間以内の新生子雌ラットに、2-2-1 で記述した EE 溶液を、ハミルトンシリンジを用いて、腰部皮下に 1 回投与し、母ラットに戻した。対照群にはゴマ油のみ投与した。EE の投与量により下記 4 群を設定した。

- 1) 対照群 (Control) : ゴマ油のみ : 2ml/kg, n=46
- 2) 低濃度群 (Low) : EE 20 μ g/kg (EE 濃度 : 0.1 μ g/10 μ l, n=45)
- 3) 中濃度群 (Middle) : EE 200 μ g/kg (EE 濃度 : 1 μ g/10 μ l, n=7)
- 4) 高濃度群 (High) : EE 2,000 μ g/kg (EE 濃度 : 10 μ g/10 μ l, n=46, 計 4 グループ)

性成熟以前に現れる影響を検索するため、対照群、低濃度群、高濃度群のうち、各 10 頭を出生後 5 日目 (PND5) において解剖を行った。

残りの動物は、PND21 に離乳させ、上述の環境下にて 3 か月齢 (PND90) まで飼育した。毎朝、膣スメアの観察を行い、解剖に際しては、その日の朝に確認したスメア像にて、1) 発情休止期 2 日目の 11:00(D)、2) 発情前期の 11:00(PE11)、3) 発情前期の 17:00 (PE17)、および 4) 発情期の 11:00(E) のグループに分けて順次解剖を行った。

サンプル採集手順(フローチャート参照)

PND5 で体重測定後、断頭により各ラットの末梢血を採取した。採取した血液を 3000rpm、15 分間、4 $^{\circ}$ C で遠心し、血清を分離して -20 $^{\circ}$ C で保存した。遺伝子解析に用いるため、卵巣を速やかに採取後、液体窒素にて瞬時に凍結し、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

PND90 でも体重測定後、PND 5 と同様に血清を分離、-20 $^{\circ}$ C で保存した。また、卵巣と子宮重量の測定を行った。卵巣は片側を遺伝子解析用のため液体窒素にて凍結、もう片側は組織観察用として、リン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。

実験 2

EE の卵巣に対する直接的な影響を観察するため、出生後 24 時間以内の雌ラットより卵巣を採取し、速やかに EE を添加した培養液内で培養を行った。使用した培養液は DMEM 高グルコースにインスリン、トランスフェリン、セレンウムおよび抗生物質を混合したもので、対照群には培養液のみを用意した。EE の添加量により下記 4 群を設定した。

- 1) 対照群 (Control) : 培養液のみ、n=4
- 2) 低濃度群 (Low) : EE 1ng/ml、n=4
- 3) 中濃度群 (Middle) : EE 10ng/ml、n=4
- 4) 高濃度群 (High) : EE 100ng/ml、n=4

37 $^{\circ}$ C で 40 時間培養したのち、遺伝子解析に用いた。

発情周期の判定

実験に用いた動物の発情周期を追跡した。膣開口日から 3 か月齢まで、約 2000 倍に希釈したオスバン液を用いて膣スメアを採取し、光学顕微鏡下で白血球および有核細胞、角化細胞の存在を観察して発情ステージの判定を行った。ステージの分類は、休止期は、上皮細胞の数が減り白血球があるもの、発情前期は、有核で円形の上皮細胞と角化細胞が存在し白血球がないもの、発情期は、不整で核がない角化上皮細胞が多くあるものとした (Everett's (1989) methods)。雌の Wistar-Imamichi ラットは、高確率で一貫性のある 4 日周期の発情周期をとる系統であるため、正常周期は、発情休止期および発情前期、発情期含む 4 日間で周期が回帰するものと定義した。

各種ホルモン濃度の測定

PND90 において採取した雌ラットの血中黄体形成ホルモン (LH) および卵胞刺激ホ

ルモン (FSH)、インヒビン (INH)、プロジェステロン (P4)、エストロジェン (E2)、テストステロン (T) の濃度を測定した。LH、FSH、INH はラジオイムノアッセイ (RIA) 法で、P4、E2、T は DELFIA 法を用いて測定した。

1) インヒビン (INH) 測定

血清中の INH 測定には、当研究室で開発した bovine inhibin のラジオイムノアッセイ系 (Hamada et al., 1996) を用いて検討した。標準物質として、ウシ卵胞液を抗ウシインヒビンモノクローナル抗体カラムを用いて部分精製したウシ 32kDa インヒビン、標識抗原に、クロラミン T 法によって 125I で標識したウシインヒビン (32kDa)、第一抗体に、ウサギに免疫して得られた抗ウシインヒビン血清 (TNDH-1) を使用した。

第二抗体として、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギγグロブリンヤギ血清 (#42-99318 1:40) を使用した。

アッセイ内変動およびアッセイ間変動は、それぞれ 5.2 および 13.0% であった。

2) LH および FSH 測定

血清中の LH、FSH 濃度は、アメリカ National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット FSH および LH の RIA キットを用いて測定した。第一抗体は、anti-rat FSH S-11 および anti-rat LH S-10 を用いた。標識抗原には rat FSH-I-7 および LH-I-7 を用い、クロラミン T 法により 125I で標識して使用した。標準物質には rat FSH-RP-2 および rat LH-RP-3 を用いた。第二抗体については、ラット FSH および LH とともに東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギγグ

ロブリン・ヤギ血清 (#42-99318 1:40) を使用した。

アッセイ内変動およびアッセイ間変動は、LH はそれぞれ 8.6 および 15.6%、FSH は 8.3 および 16.1% であった。

3) E2、P4、T 測定

血清中の E2、P4、T 濃度は、免疫蛍光分析キット (Delfia, Turku, Finland) を用い、添付の取り扱い説明書に従って行った。E2、P4、T の抗体は、それぞれウサギ由来のポリクローナル抗エストラジオール、プロジェステロン、テストステロン抗体であった。すべてのサンプルは、同一のアッセイにて比較された。

RNA の回収

凍結卵巣組織を、ISOGEN (Nippon Gene, Toyama, Japan) 中にてホモジナイズを行った。PND90 のサンプルに関しては、カッター型破砕機 (ヒストコロン、日音医理科機械、千葉、日本) を用いて、氷冷下で組織を破砕し、PND5 および培養サンプルに関しては、ピペッティングおよび攪拌機 (PresentMixer, TAITEC、埼玉、日本) を用いて均質化した。その後、ISOGEN の取り扱い説明書に従って RNA を単離した。RNA 濃度は分光光度計 GeneQuant100 (GE Healthcare Japan、東京、日本) により測定した。

リアルタイム PCR

PrimeScriptTMRTase 逆転写酵素 (Takara bio, Shiga, Japan) を用い、取扱い説明書に従い、採取したトータル RNA より 1 本鎖 cDNA を合成した。Chromo4 システム (Bio-Rad, Hercules, CA) を用いて、リアルタイム PCR を行い、標的 cDNA を定量化した。オリゴヌクレオチドプライマーは、

Web-based Primer3 のソフトウェアを用いて、Table 1 のように設計した。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) は、SYBR Premix Ex(Takara)を使用し、それぞれの標的 mRNA の発現レベルは GAPDH mRNA と比較した 2- Δ CT 法を用いて算出した。

ウェスタンブロット

凍結卵巣組織を、タンパク分解酵素阻害剤が添加された RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% SDS, 1 mM NaVO₄, and 50 mM NaF) 中にてホモジナイズを行い、卵巣タンパクを用意した。タンパク濃度は the Bradford protein assay (Thermo Scientific, Waltham, MA) により測定した。タンパクサンプルは、12.5% SDS-PAGE ゲルにて変性・分離させたのち、ニトロセルロース膜に転写した。非特異的結合を防ぐため、膜は 5% スキムミルクで室温、1 時間処理した。その後、抗 LH 抗体もしくは抗チユブリン抗体で、4°C、12 時間インキュベートした。インキュベート後、膜を PBS-Tween 20 を用いて 4 回洗浄し、2 次抗体で室温、1 時間処理した。タンパクスグナルは ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いて検出した。

統計処理

臓器相対重量の群間平均値、体重の群間平均値および膣開口日の群間平均値の有意差検定には一元配置分散分析を使用し、膣開口日および各ホルモン濃度平均値、リアルタイム PCR の有意差検定には t tests を用いた。全ての統計処理に関して、有意水準

5%以下で有意と判定した。

C. 研究結果

実験 1

体重ならびに臓器重量の変化

Figure 1 に、3 ヶ月齢にて解剖したラットの、(A) 出生日より解剖までの 1 週間おきの体重測定の結果を示した。(B) には解剖時の体重、および卵巣と子宮の各臓器重量、体重比の臓器相対重量を示した。

体重および各臓器重量変化に、各処置群で有意差が認められなかった(Figure 1)。

生殖指標

1) 膣開口日齢

EE 投与が性成熟スピードに与える影響を調べるため、膣開口日の観察を行った (Figure 2-A)。膣開口日齢は、対照群、低濃度群、中濃度群、高濃度群でそれぞれ、34.6 \pm 0.32 日、34.0 \pm 0.47 日、31.8 \pm 0.42 日、32.9 \pm 0.30 (Mean \pm SEM) であった。全体として、対照群に比べ EE 投与群で膣開口日齢が早期化した。中濃度群においては有意差が見られた。

2) 発情周期

Figure 2-B に EE 投与後 90 日 (PND90) において約 2 週間正常発情周期を維持した個体の割合を示す。対照群では全ての個体が正常周期を示し、低濃度群で 94%、中濃度群で 43%、高濃度群で 31%と EE 濃度依存的に正常発情周期を示す個体の割合が低下した。

内分泌学的変化

PND90 における末梢血中生殖関連ホルモン濃度変化を Figure 3 に示す。

発情周期の乱れている高濃度群に関しては、概して変動性を欠いており、LH および

FSH サージの消失が確認された。インヒビンは全ての発情ステージにおいて、対照群に対して低値を示した。また、エストラジオールおよびプロゲステロン、テストステロンにおいては、ホルモン濃度のピークをとる時期に対照群とのずれが生じていた。以下、対照群と低濃度群について述べる。

1) 血中 LH 濃度

Figure 3-A に各発情ステージにおける LH 濃度を示した。PE17 において、対照群および低濃度群のいずれにおいても LH サージが認められ、E では基底値を示した。

2) 血中 FSH 濃度

Figure 3-C に FSH 濃度を示した。FSH においても、対照群および低濃度群の両方で PE17 でのサージ状の上昇が認められた。

3) 血中 INH 濃度

Figure 3-D に INH 濃度を示した。対照群および低濃度群の両方で、PE17 から E にかけての減少が見られた。これは正常な排卵に伴った変化と推察される。

4) 血中 E2 濃度

Figure 3-B に E2 濃度を示した。対照群および低濃度群で、PE11 から 17 にかけてピークに達していた。また、低濃度群において、対照群と比較して高い E2 量が分泌されていることが示された。

5) 血中 P4 濃度および T 濃度

Figure 3-E に P4 濃度、Figure 3-F に T 濃度を示した。いずれのホルモンも、PE17 において、対照群および低濃度群で明確なピークが観察された。

以上より、低濃度における異常発情周期の出現以前には、血中ホルモン変動に異常はないことが確認された。

分子生物学的変化

1) EE 投与 90 日後の卵巣内における遺伝子変化

PND90 の卵巣内における各生殖関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を対照群の発情休止期を 1 とした相対値で示した (Figure 4)。

発情周期の乱れている高濃度群に関して、ほとんどの遺伝子および発情ステージにおいて、発現量が増加傾向にあった。また、発現量のピークの時期が対照群と一致しているのは、LH 受容体およびエストロゲン受容体 β のみであった。

Figure 5 に、発情前期 17 時の時点の、対照群と低濃度群の各生殖関連遺伝子の mRNA 発現量の相対値を示した。各遺伝子における対照群の発現量を 1 とした。

LH 受容体および FSH 受容体、エストロゲン受容体 α 、エストロゲン受容体 β 、インヒビン βB において、低濃度群で有意に上昇していた。ほか、インヒビン α 、インヒビン βA 、P450_{scc} についても、有意差は見られないものの、低濃度群において発現量の増加傾向を示した。

2) 3 ヶ月齢における LH 受容体タンパク発現量

Figure 6-A に、PE17 における LH 受容体 mRNA の発現量を、6-B に同発情ステージにおける LH 受容体タンパクのウエスタンブロットの結果を示した。

EE 処置群から採取した卵巣は対照群と比較して、多くの LH 受容体を含むことが認められた。この結果は、遺伝子発現の結果を支持している

以上 1)、2) より発情周期の異常が起きる以前の PND90 の時点ですでに、低濃度群において、EE 投与による影響が遺伝子発現に現れていることが確認された。

3) 5日齢における mRNA 発現量

5日齢における各生殖関連遺伝子の mRNA 発現量の対照群を1とした相対値を、Figure7に示した。

高濃度群の LH 受容体およびアンドロゲン受容体において、対照群に比較して有意に増加、および低下した。低濃度群のインヒビン β A においては、有意に増加した。

実験 2

組織培養後の卵巣における各生殖関連遺伝子の mRNA 発現量の変化を、対照群を1とした相対値で、Figure7に示した。

LH 受容体において、すべての処置群で対照群に比較して、顕著に上昇していた。他の生殖関連遺伝子では、有意差は認められなかった。

D. 考察

本研究において注目した点は、低濃度 EE 投与群の卵巣内における遺伝子発現変化である。高濃度 EE 投与群においては投与後 90日までに、血中ホルモン動態の異常と共に発情周期の乱れが観察され、卵巣における遺伝子発現パターンも既に大きく変化していた。つまり、高濃度 EE 投与群では、薬物暴露による基質的变化から、2次的3次的変化へ既に移行していると推察された。一方、過去の予備試験において、低濃度 EE 投与により投与後 180日までに発情周期の乱れが起きる事を確認しているが、本実験において、投与後 90日の時点では、発情周期の乱れやホルモン動態の異常は観察されなかった。しかし、残り3ヶ月以内に発情周期の乱れが現れ始めるという事は、時限爆弾的な何かが既に、特に卵巣内で生

じていると私は考え、生殖関連遺伝子に関する発現解析を行った。

EE 暴露による卵巣内遺伝子発現の変化

リアルタイム PCR の結果より、低濃度 EE 投与後 90日の卵巣内でコントロール処置群に比べ、発現量に変化が見られるいくつかの遺伝子が得られた。さらに絞り込みを行うために、EE 投与後 5日の卵巣においても同様の解析を行った。最終的に、生後 1日以内の卵巣を培養し EE の直接暴露を行い、遺伝子解析に供した。その結果、すべての実験群において、EE 投与による黄体形成ホルモン受容体 (LH 受容体) mRNA の発現増加が認められた。さらに、ウエスタンブロット法においても EE 投与 90日後の卵巣で LH 受容体タンパクの発現増加が確認された。以上の結果から、EE 暴露により卵巣内 LH 受容体発現亢進が誘起され、これがその後現れる発情周期の乱れやホルモン動態の異常に何らかの影響を与えていると推察した。

この仮説は、顆粒膜細胞においてエストロゲン濃度依存的に LH 受容体の発現量増加が起きるという報告[Ikeda.S, 2008]にも支持される。また、過去の予備試験において EE 投与の濃度依存的に生殖機能の老化が早まること、および今回の実験において、EE の濃度依存的に PND90 における正常発情周期を示す個体の割合が減少したという結果と合わせて、LH 受容体亢進のレベルが、時限爆弾の時間を決める役割を担うことが示唆される。

さらに、卵巣の顆粒膜細胞において細胞周期の進行と LH 受容体の発現には強い相関関係があることも報告されている。細胞

周期は、G0 期（分裂の見られない休止期）、G1 期（細胞の成長期）、S 期（DNA の複製期）、G2 期（細胞の成長期）、M 期（有糸分裂および細胞分裂）に分類され、この過程を経て、細胞分裂すなわち細胞増殖が行われる。顆粒膜細胞の LH 受容体発現は、特に S 期に関係している [Cannon, J, 2008]。本実験で見られた LH 受容体の発現亢進により、卵胞の細胞分裂が誘発されている可能性が考えられる。通常、出生直後の卵巣中には原始卵胞のみが存在し、その多くはこの状態に留まっており、休眠状態にある。1 日齢のマウスの卵巣中において、LH 受容体の発現量はほとんど見られない。その後、LH 受容体の発現は 7 日齢までにかけて徐々に増加し、10 日齢でピークを迎えたのち、15 日齢では減少する [Shaughnessy, 1997]。また、原始卵胞の活性化は不可逆的であり、いったん活性化のスイッチが入ると、その卵胞は、後戻りや、発達過程のある段階で留まり続けることができず、排卵か退行の運命をたどる。

本実験において、本来適切な時期まで休眠状態で維持されていたはずの原始卵胞が、LH 受容体の発現亢進により、活性化のスイッチが入ったとすれば、その卵胞は、卵胞発達の過程を進めてしまう。しかし、新生児に「想定外」に誘発されてしまったため、排卵に至ることなく退行し、消失の運命をたどることになる。つまり、EE 投与の影響により、原始卵胞の「浪費」が起きたと考えられる。

現在までには、卵巣における生殖細胞の増殖は胎生期に限定されているため、出生後に増加することなく、出生時に生涯の卵胞の数は決定している、とされている。

また、卵巣は原始卵胞のプールを保持しておく場であり、この原始卵胞が加齢により、減少もしくは枯渇することで卵巣の老化が起きると考えられる。

卵巣において、原始卵胞の生存や活性化、死滅などの発育過程を決定するシグナル伝達系として、PTEN/PI3K シグナリングが報告されている。PTEN は、脱リン酸化反応を触媒する腫瘍抑制因子であり、PI3K は、リン酸化を触媒する酵素である。PTEN の活性を維持することにより、卵母細胞の細胞増殖抑制が維持、つまり休眠状態が維持されることが分かっている。また、PTEN の不活性化により、PI3K を起点とする経路が活性化し、この経路は、細胞増殖に正に働く。また、細胞増殖に促進的に作用するリン酸化酵素として、mTOR が知られている。卵母細胞において、この mTOR が起点となるシグナル伝達系と、上述の PI3K 系のシグナル伝達が相乗効果によって、卵胞発育の開始を制御している。このシグナル伝達系を過剰に活性化させることにより、過剰に卵胞の発育が進み、結果的に卵巣の早期老化を招くという研究結果が出ている [Adhikari, 2010]。この結果でも、休眠状態で維持されるはずの原始卵胞が「想定外」に活性化してしまったことが卵巣の原始卵胞プールが早期に枯渇し、卵巣の早期老化につながったことが示唆され、機序は異なるが、本研究の仮説を支持する。

正常な生殖寿命を維持、すなわち適切な日齢まで卵胞数を保持するためには、原始卵胞の休眠を維持することも必要である。卵巣が発育する出生から春機発動期以前にも、卵巣中の原始卵胞のいくつかは胞状卵胞にまで達するが、この卵胞は排卵される

ことなく、退行し、卵巣中の卵胞数が減少する。本研究では、このような生理的な原始卵胞の消失が起きることに加え、繰り返しになるが、EE 暴露において LH 受容体の発現亢進、原始卵胞が活性化し、原始卵胞のプールから濃度依存的に原始卵胞が消失してしまったと考える。

出生期における卵巣中の原始卵胞の数が、時限爆弾で言うところの残り時間であり、EE 投与により「時限爆弾の爆発」すなわち卵巣機能の老化へのカウントダウンの時間が短縮された状態といえる。しかしながら今回、卵胞数に関する直接的なデータは得られていないため、今後、卵巣組織像など、卵胞数に関する解析や EE 曝露後の卵胞の退行に関する解析の進行が望まれる。

現代社会の大きな流れとして、女性の社会進出があるが、これに伴い出産年齢の高齢化が進んでいる [厚生労働省報告]。しかし、高齢になるほど不妊率が高まっているのが現状である。高齢における不妊の原因のひとつとして、最近注目されているのが、卵子の老化である。今回の実験において、卵巣が早期に老化したが、これは、卵子の老化と何らかの関わりがあるかもしれない。もし、卵巣の老化と卵子の老化のメカニズムにおいて、一致する部分が見つかれば、EE 投与実験が、卵子老化のメカニズムを解明するためのよいモデルとなり得るだろう。今回得られた結果が現代における高齢不妊の原因の一つを解明する手がかりとなるよう、これからの応用が期待される。

E. 結論

本研究では、新生児期に一回だけ化学物質に暴露された個体が、性成熟以降に性周

期の乱れや血中ホルモン変化に異常を来す「遅発性影響」のメカニズム解明を目的とした。エストロゲン作用を有し、経口避妊薬に用いられる EE をモデル薬物として用いた。予備実験において、EE 投与量依存的に、卵巣機能の老化の指標とされる異常発情周期を示す個体の出現日齢が早まる事を確認した。本実験では、遅発性影響である異常発情周期が出現する前に、どのような変化が特に卵巣内で生じているかを明らかにするため研究を行った。

PND90 における低濃度群について、発情周期の乱れおよび生殖関連ホルモン分泌に、大きな異常はなく、卵胞の発育および生殖中枢のフィードバック機構に異常はないことが明らかとなった。一方、卵巣内における生殖関連遺伝子発現解析の結果から、いくつかの遺伝子において、すでに対照群と違いが生じていることが確認された。

本研究で注目した遺伝子変化は、LH 受容体の発現増加である。卵巣の培養実験において、EE の作用により、直接的に LH 受容体の発現亢進が起きることが確認された。過去の研究においても、エストロゲンによる LH 受容体の発現増加が報告されている。また、LH 受容体の発現亢進と原始卵胞の細胞周期の進行に強い相関関係があることが示唆されており、EE 暴露による LH 受容体の発現亢進が、原始卵胞の活性化に関与すると推察される。一旦、活性化した原始卵胞は、排卵もしくは退行して消費されることから、新生児期の EE 暴露によって、性成熟後に利用可能な原始卵胞数が減少してしまう事が考えられる。さらに卵巣機能の老化、異常性周期の出現は、卵巣中の原始卵胞の枯渇により起こると仮定すると、EE 暴

露による遅発性影響を一つの流れとして説明する事が可能となる。今後、EE 曝露が卵巣の卵胞数に対して実際に及ぼす影響について、組織学的な方面から検証する必要があるだろう。

今回の結果が、現代社会における高齢不妊の原因の一つを解明する手がかりとなることを期待する。

E. 結論

本年度の研究より、EE 投与により、遅発性影響の出現前には中枢の関与する生殖関連ホルモンの分泌異常は見られず、卵巣において、いくつかの生殖関連遺伝子の発現量変化が見られることがわかった。特に LH 受容体は、EE の直接的影響により発現量の増加が引き起こされる事から、遅発性影響に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文

- 1) Y. Horii, M. Kawaguchi (corresponding), R. Ohta, A. Hirano, G. Watanabe, N. Kato, T. Himi, and K. Taya. Male hatano high-avoidance rats show high avoidance and high anxiety-like behaviors as compared with male low-avoidance rats. *Exp. Anim.*, 2012 Sep;61(5): 517-524

2. 学会発表

- 1) 野澤香織、永岡謙太郎、吉田緑、田谷一善、渡辺元 雌ラットの脳性分化臨界期におけるエストロゲン投与が成熟後の生殖機能に及ぼす遅発性影響：第 154 回日本獣医学会(2012, 9)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
無し