

Fig. 15  
 Ovulation on the day of vaginal opening or by 1 week after the vaginal opening in the animals treated orally with 0, 0.4 or 2 mg/kg from postnatal day 1 to 5. Incidence of ovulation (A) and the number of corpus luteum in the ovary (B).  
 \* and \*\*, Significantly different from control at  $p<0.05$  and  $p<0.01$ , respectively.

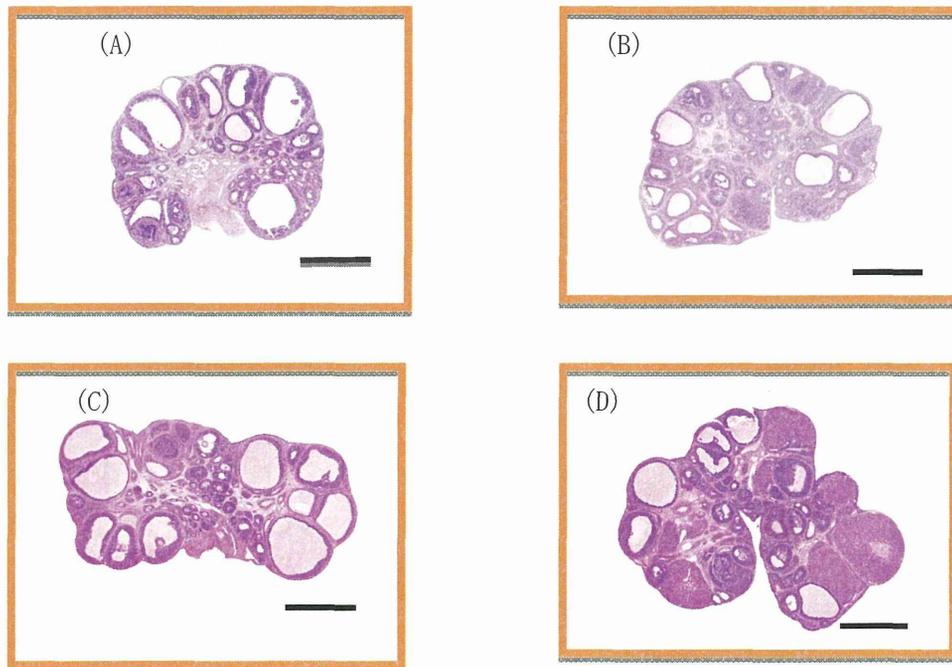


Fig. 16  
 Representative ovarian histology during the pubertal period in the animals treated with 2 µg/kg of EE from postnatal day 1 to 5. An ovary from animal not ovulated (A) or ovulated (B) on the day of vaginal opening. An ovary without corpus luteum (C) or with corpus luteum (D) at 1 week after the vaginal opening.  
 Bars indicate 1 mm.

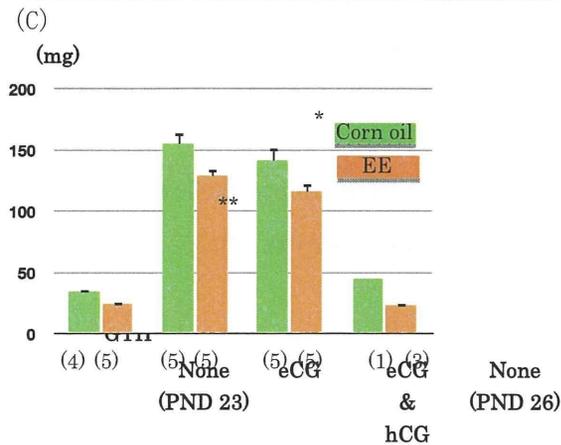
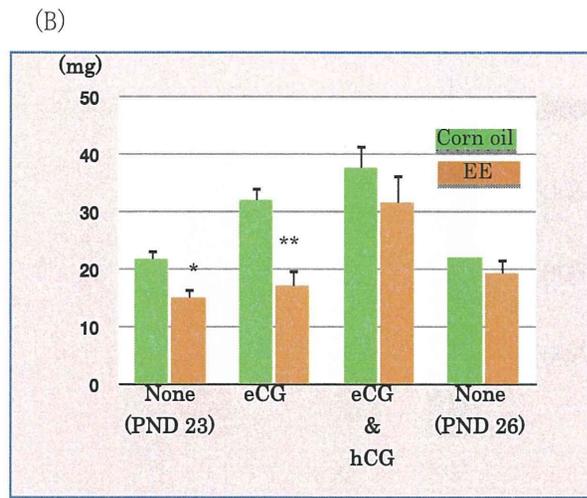
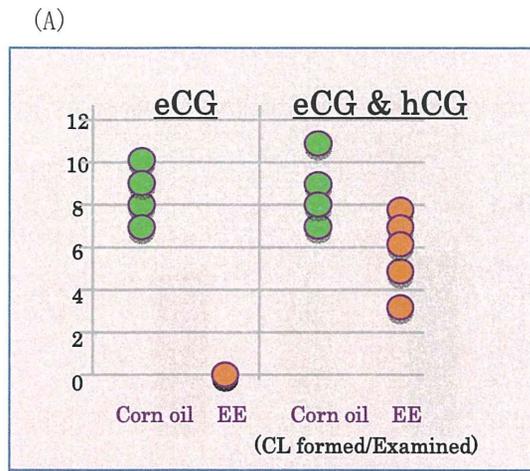


Fig. 17  
Ovulation (A) and weights of ovaries (B) and uterus (C) after equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) treatment in the animals treated orally with or 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of EE from postnatal day 1 to 5. \* and \*\*, Significantly different from control at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ ,

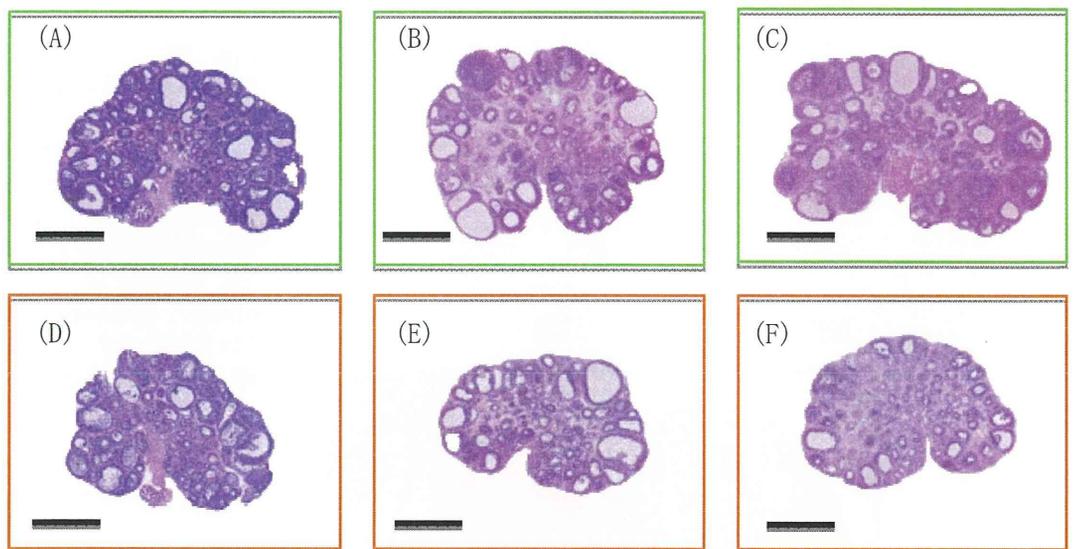


Fig. 18  
Representative ovarian histology after equine chorionic gonadotropin (eCG) and human chorionic gonadotropin (hCG) treatment in the animals treated orally with 0 (A, B, C) or 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of EE (D, E, F) from postnatal day 1 to 5. An ovary on postnatal day 1 without gonadotropin (A, D), that treated eCG on PND 23 and collected on postnatal day 26 (B, E) and that treated eCG and hCG on PND 23 and 26, respectively, and collected on postnatal day 26 (C, E). Bars indicate 1 mm.

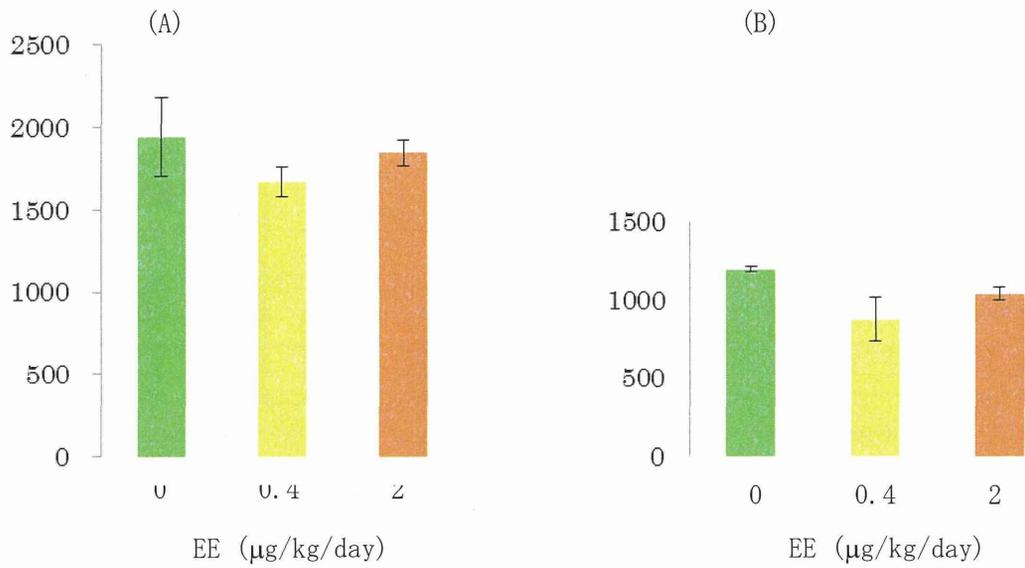


Fig. 19  
 Number of primordial follicles in the ovaries collected at postnatal day 10 (A) or postnatal week 22-23 (B) from animals given orally with 0, 0.4 or 2 µg/kg of EE from postnatal day 1 to 5.

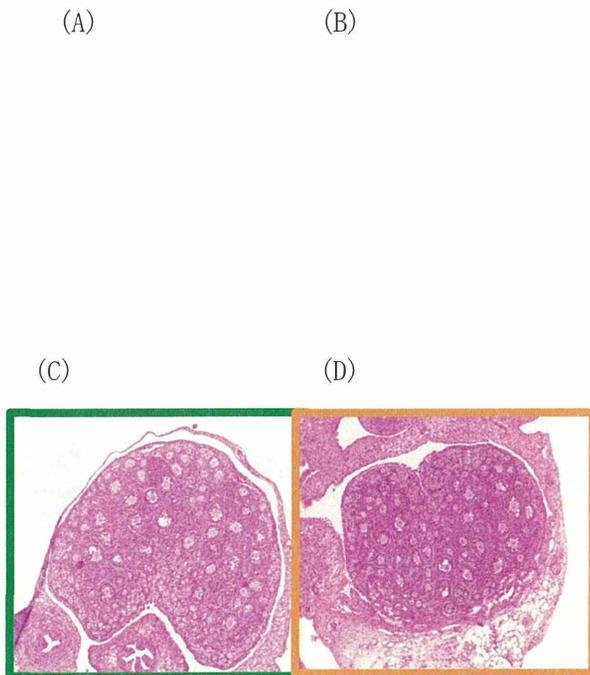
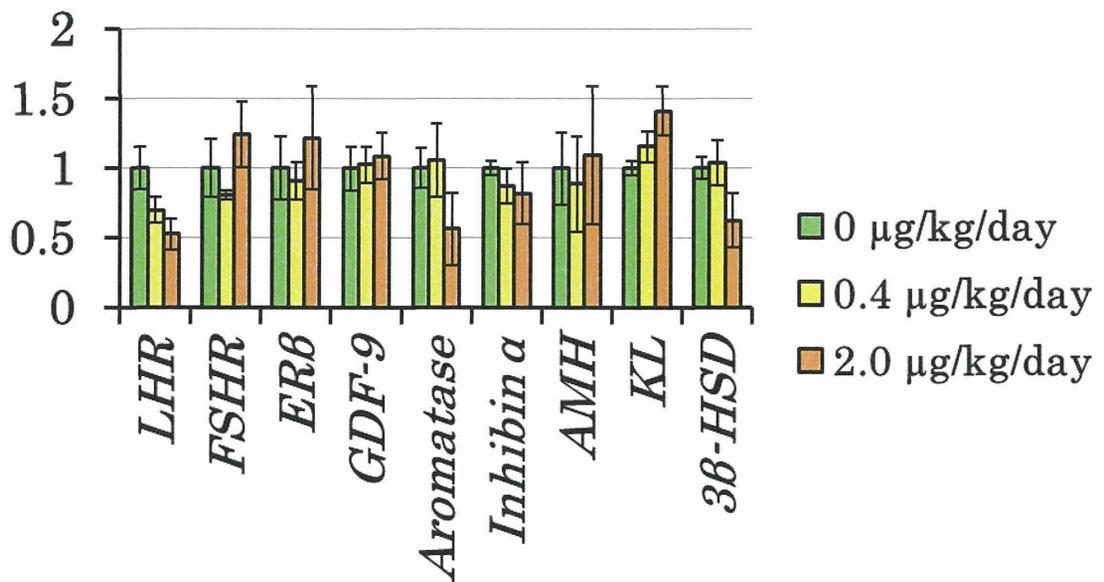


Fig. 20  
 Representative ovarian histology on postnatal day 6 (A, B) and 10 (C, D) of animals treated orally with 0 or 2 µg/kg of EE from postnatal day 1 to 5. Immunohistochemistry for laminin (A) and AMH (B) in the EE-treated animal, and hematoxylin and eosin staining of control (C) and EE-treated animal (D).

A)



B)

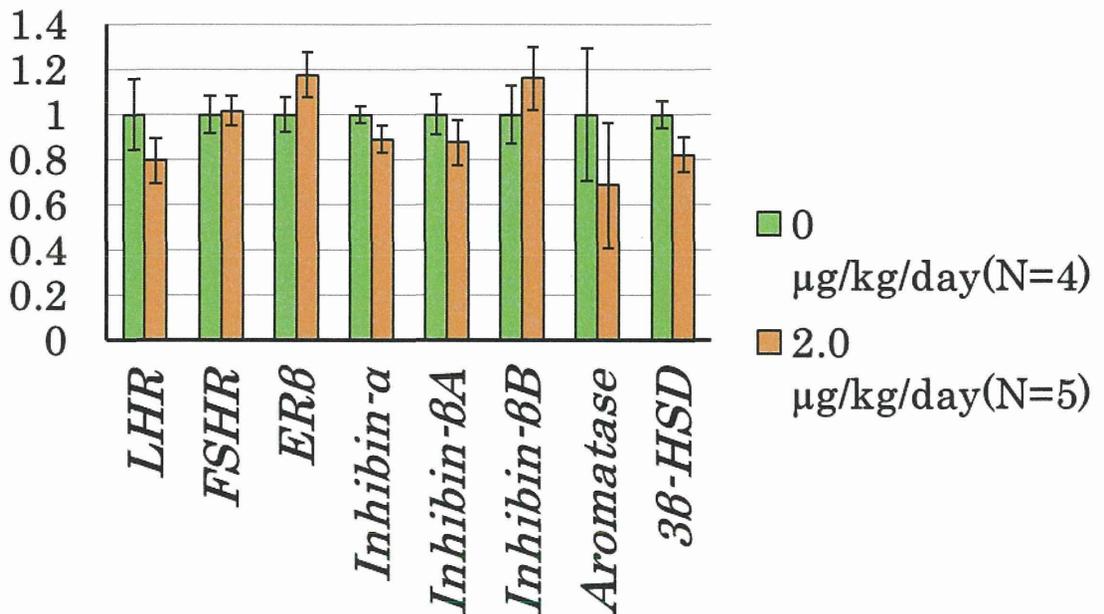


Fig. 20

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

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  
研究協力者：野澤 香織 東京農工大学

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。

ラットの脳の性分化における臨界期のほぼ中央であると考えられる出生第1日に、種々の用量EEを単回皮下投与し暴露した。性成熟過程に見られる影響を明らかにすることを目的として、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の分泌変化に着目し、生殖器への影響も観察した。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。遅発性影響の指標を検索すること、ならびに遅発性影響の用量反応性を検証することを目的とし、春機発動の指標として膣開口日の調査、雌性生殖機能の指標として発情周期の推移を膣スメア法を用いて観察した。また、生殖中枢の性分化について確認するために、生後8ヶ月齢で卵巣を摘出し、エストラジオール（E2）を投与してLH分泌に対する効果を調べ、併せて脳の性的二型核（SDN-POA）について観察した。また、膣スメア法による発情周期観察により異常が見られない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。

その結果、EE投与量に依存した春機発動の早期化が見られた。15日齢、20日齢において、EEの用量に依存した卵巣重量、子宮重量の減少が認められた。卵巣組織観察像では、EEの用量に依存した卵巣サイズの減少、ならびに胞状卵胞の減少が認められた。子宮組織観察像においても、EEの用量に依存した子宮内膜上皮細胞の発育不全が認められた。生殖関連ホルモンの測定結果では、卵巣中インヒビン含有量がEEの用量に依存して減少傾向を示した。FSH分泌はEEの用量に比例して増加した。下垂体中LH含有量では、EE用量に依存して増加傾向が認められ、卵巣所見および子宮所見と併せて考えると、エストロジェ

ンによる負のフィードバックの減少が示唆された。5日齢の卵巣では、EE2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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。

対照群ではすべての個体で正常発情周期を示したが、EE投与群では性成熟後に正常発情周期を示す個体の割合がEE投与量依存的に低下した。また、EE20–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 用量では、しばらく正常性周期を回帰した後に早期に異常周期を示す、いわゆる遅発性影響が引き起こされることが明らかとなった。EE20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群の正常発情周期を示す個体では、対照群と同様に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減少が観察された。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 $\alpha \cdot \beta\text{A} \cdot \beta\text{B}$ 、エストロジェン受容体 $\alpha$ 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。

性成熟後に卵巣を摘出しE2を投与した実験では、EE投与群でLHサージが誘起されないあるいは減少する傾向が認められた。また、SDN-POAの大きさについても雄性化傾向が認められた。性中枢の部分的、あるいは不完全な雄性化が生じたか、あるいは生殖機能の早期老化が推察された。

以上より、ラットの脳の性分化臨界期におけるEE投与はEEの用量に依存して、卵巣および子宮発育を抑制することが明らかとなった。EE投与により、20–200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で遅発性影響が引き起こされることが明らかとなったが、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。これらの結果は卵巣および性中枢の早期老化が生じた結果とも考えられた。

## 研究目的

本研究では、遅発性影響の機序解明と早期指標の確立を目指して、性成熟過程に認められる影響を明らかにし、早期指標の検索を目的にした。17 $\beta$ -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投与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。

### A. 研究目的

本研究では、17 $\beta$ -エチニルエストラジオール本研究では、遅発性影響の機序解明と早期指標の確立を目指して、性成熟過程に認められる影響を明らかにし、早期指標の

検索を目的にした。17 $\beta$ -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投与の

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、PND 0 (PND=出生後日齢)の新生仔雌ラット (Wistar-Imamichi) を用いた。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  $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、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。

新生仔ラットを得るまでの手順

Wistar-Imamichi 経産ラットを動物繁殖研究所 (土浦、日本) から購入し、1 つのプラスチックケージ (日本クレア、大阪、日本) につき 5 匹ずつ飼育した。入荷した当日から毎日午前中に膣スメアを毎日確認し、発情前期に雄ラットと同居させ交配を行った。翌日の膣スメア中に精子の有無を確認した。その後も膣スメアを観察し、プラセンタルサイン (ほぼ交配 2 週間後) を確認後に 1 ケージに 1 匹ずつ分け、飼育した。

薬物の投与は、出生後 24 時間以内の新生仔雌ラットに行った。

雌雄判別と個体識別

PND 0 に、F1 の肛門と陰核あるいは陰茎との距離により雌雄判別を行った。1 匹

の母ラットにつき総哺育子数が 9 匹になるよう調節した。背部に焼烙痕によるマーキングを行い個体識別し、毎日体重を測定した。

### 試薬作製方法

$17\alpha\text{Ethinylestradiol}$  (EE, Sigma E4876) 10.0mg をゴマ油 (非焙煎、和光純薬工業、大阪) 10ml で、一晚  $60^{\circ}\text{C}$  にて加温溶解した ( $2,000\mu\text{g}/\text{kg}$ )。この溶液を基にゴマ油による 10 倍希釈によって 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。

### 供試動物への投与方法

PND0 に EE をハミルトンシリンジを用いて、雌産子の頸部から針を挿入して腰部皮下に 1 回投与した。対照群にはゴマ油のみを投与した。いずれの群も雌産子 5~10 匹を 1 群とした。

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影響

### サンプル採取手順

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。

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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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た。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。

下垂体および右側卵巣のホモジナイズ

生理食塩水 0.5ml 含むチューブ中に-20°Cで冷凍した下垂体、右側卵巣を、4°Cで解凍した。その後、カッター型破碎機(ヒストコロン、日音医理工機、千葉、日本)を用い、氷冷下で30~70秒間、チューブを上下させながら組織が完全に破碎されるまで破碎を行った。さらに超音波ホモジナイザー (TOMY、東京、日本) で1秒間の処理を二度行った。破碎したサンプルは4°C、20,800Gで30分間遠心し、上清を採取した。上清はホルモン測定まで-20°Cで保存した。

血中各種ホルモン濃度の微量測定

採取した雌ラットの血中黄体形成ホルモン (LH) およびインヒビンを測定するために、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 (RIA) 法を設定し測定した。

### 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) および卵巣刺激ホルモン (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DELFLIA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。

組織のパラフィン切片標本の作製

### 1) 固定から包埋まで

採取した子宮および左側卵巣を4%パラフォルムアルデヒド液に室温で一晩浸漬後、70%エタノールに室温で保存した。その後、室温でアルコール脱水系列を用いて脱水、キシレンにて3回各20分間透徹、62°Cのパラフィンに3回各60分間浸漬し、パラフィンに包埋した。

### 2) 薄切

包埋した子宮は、滑走式マイクロトーム(大和光機工業、埼玉、日本)で、3~6 μmで薄切し、スライドガラス(松浪硝子工業、大阪、日本)に載せ、切片を作製し、一晩37°Cで伸展、乾燥させた。包埋した卵巣は、回転式マイクロトーム(大和光機工業、埼玉、日本)で、10 μmで薄切し、スライドガラス(松浪硝子工業、大阪、日本)に載せ、連続切片を作製し、一晩37°Cで伸展、乾燥させた。

### 3) 染色

染色はヘマトキシリン・エオジン染色を行い、カラッチ・ヘマトキシリン(武藤化学薬品株式会社、東京、日本)と1%エオジンY液(武藤化学薬品株式会社、東京、日本)を使用し、染色後は、封入剤 mount quick(コスモバイオ、東京、日本)を用いて封入した。

組織学的検索

### 1) 子宮組織の観察

採材した子宮を用い、子宮内膜上皮細胞

の高さを観察した。

### 2) 卵巣組織の観察

採材した個体の左側卵巣を用い、1個体が所有する胞状卵胞を観察した。各卵胞は、卵の核が見られたところで、長径と短径を測定し、その平均値をその卵胞の大きさとした。

卵胞の分類は、Tordenらの研究(1968)を参考に、原始卵胞は卵母細胞のみで周りを囲む上皮細胞がないもの、一次卵胞は卵母細胞を一層の卵胞上皮細胞が囲んでいるもの、二次卵胞は上皮細胞が重層化し、卵胞腔が形成されていないもの、胞状卵胞は卵胞腔が形成されているもの、成熟卵胞は卵丘が形成されているものとした(日本獣医解剖学会 2005、岩永敏彦 2003)。

画像撮影と処理

HE染色を施したものは、光学顕微鏡BX-50(OLYMPUS)に接続したDP-25(OLYMPUS)により撮影し、cellsens(OLYMPUS)でスケールバーを挿入した。

性成熟後の発情周期に与える新生子期EE処置の影響

春機発動開始と発情周期追跡

各群のラットに対してPND21の離乳後毎日、春機発動の指標である膣開口の有無を確認した。膣開口確認後、毎日膣スメアを観察し、発情周期を判定した。

膣スメア法による発情周期の判定

2000倍希釈をしたオスバン液を用いて、膣スメアを採取した。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、多くの不整で核がない角化上皮

細胞が多くあるものとした (Armenti et al.2008)。正常周期とは、休止期 2 日間と発情前期 1 日間と発情期 1 日間の 4 日間で周期が回帰するものとした。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。

#### 5 日齢の卵巣における遺伝子発現への影響

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 (20 $\mu$ g/kg)、高濃度群 (2,000 $\mu$ g/kg) 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

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、PND5 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。

#### 新生仔卵巣に対する EE の直接影響

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。

#### 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

PrimeScript™RTase 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、下記 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  $2^{-\Delta CT}$  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 NaVO<sub>4</sub>, 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 チュブリン抗体で、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。タンパクシグナルは ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) を用いて検出した。

#### 脳の性分化

EE の単回投与により新生雌ラットの脳の性分化の異常が生じている可能性を機能的および形態学的指標を用いて検討した。機能的性分化に対する効果を調べるために、各処置群のラットの卵巣を約 8 ヶ月齢に摘出した。その 2 ヶ月後に 1mg/ml の濃度にエストラジオール 17 $\beta$  (E2) をゴマ油に溶解した溶液を含有するシリコンチューブを背部皮下に移植し、正常雌ラットの発情前期レベルの血中 E2 濃度を維持した。E2 投与前の Day0 および翌日 Day1 の 11 時、Day2 の 17 時、Day3 の 11 時に採血し、血漿中 LH 濃度を測定した。

形態学的指標として、視索前野性の二型核の大きさを指標にした。処置後の雌ラットの脳を中性緩衝ホルマリン 10% 溶液で還流固定し脳を取り出し後、30% ショ糖液に浸漬し、クリオスタットにて 50 ミクロンの連続凍結切片を作成した。ニッスル染色法を用いて染色し、視索前野の性的二型核の大きさを比較した。

#### 統計処理

統計処理は、Graph Pad Prism5 (San Diego, CA, USA) を用いた。臓器相対重量の群間平均値、体重の群間平均値および膻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 (one way ANOVA) を使用し、各曝露群と対照群との有意差検定には Tukey の多重比較検定を用いた。膻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

#### 体重ならびに各臓器重量の変化

図1には体重測定の結果を、図2～図6は各臓器重量を体重1gあたりの相対重量として各々示した。

#### 1) 体重測定

20日齢までの体重増加は各処置群で差が見られなかった。

#### 2) 各臓器重量測定

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2)。PND10では群間で特に差が見られなかった。しかしPND15では対照群の $0.886 \pm 0.079$ g/gと比較し、 $2000 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群は $0.597 \pm 0.030$ g/g(Mean/SEM)と有意な低値を示した。PND20でも対照群の $0.710 \pm 0.029$ g/g、 $0.2 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.719 \pm 0.058$ g/g、 $2.0 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.657 \pm 0.023$ g/gと比較して、 $2000 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で $0.477 \pm 0.033$ g/gと有意な低値を示した。

卵巣の体重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)。それらの影響はPND10では群間に差が見られなかったが、PND15、20で差が顕著に見られた。PND15では対照群の $0.463 \pm 0.059$ g/g、 $20 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.394 \pm 0.026$ g/gと比較して、 $200 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.201 \pm 0.030$ g/g、 $2000 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で $0.208 \pm 0.013$ g/gと有意な低値を示した。PND20では対照群の $0.380 \pm 0.031$ g/g、 $0.2 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.356 \pm 0.014$ g/gと比較して、 $2.0 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.248 \pm 0.018$ g/g、 $20 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $0.243 \pm 0.018$ g/g、 $2000 \cdot \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で $0.238 \pm 0.012$ g/gと有意な低値を示した。

また肝(図4)、腎(図5)および副腎(図6)の体重1gあたりの相対重量はEE

の容量に依存した変化は見られなかった。

### 内分泌学的変化

#### 1) 血中LH濃度、下垂体前葉中LH含有量

図7に末梢血液中LH濃度、図8に下垂体前葉中のLH含有量の変化を示した。末梢血液中LH濃度はばらつきが大きく、群間で有意差は見られなかった。下垂体前葉中に含まれるLHはPND15では対照群の $717.64 \pm 69.38$ ngと比較して $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意差が見られた。 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群では $1839.09 \pm 1049.95$ ng、 $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群では $2523.03 \pm 482.02$ ng、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群 $3714.01 \pm 1070.24$ ng、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群 $1121.28 \pm 201.36$ ngだった。PND20では対照群の $1335.30 \pm 206.68$ ngと比較して $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群で有意差が見られた。 $0.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群では $1957.53 \pm 629.17$ ng、 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群 $4138.91 \pm 1161.66$ ng、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群 $3950.14 \pm 918.05$ ngだった。

#### 2) 下垂体前葉中FSH含有量

図9に下垂体前葉中のFSH含有量の変化を示した。下垂体前葉中に含まれるFSHはPND15ではEEの対照群の $1916 \pm 159.9$ (ng/pituitary)と比較し、 $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群の $1958.3 \pm 291.0$ (ng/pituitary)、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群は $3005.04 \pm 800.42$ (ng/pituitary)と有意に増加した。一方PND20では対照群の $5598.63 \pm 1172.85$ (ng/pituitary)と比較し、 $2000 \mu\text{g}/\text{kg}$ 群は $3384.7 \pm 413.0$ (ng/pituitary)と有意に減少した。

#### 3) 血中インヒビン濃度、卵巣中インヒビン含有量

図10に末梢血液中インヒビン濃度、図11に卵巣中インヒビン含有量の変化を示した。PND10では対照群の $5.29 \pm 0.36 \text{ ng/ml}$ と比較して $0.2 \mu\text{g/kg}$ 群、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群で有意差が見られた。 $0.2 \mu\text{g/kg}$ 群では $3.86 \pm 0.10 \text{ ng/ml}$ 、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群では $3.99 \pm 0.18 \text{ ng/ml}$ だった。PND15では対照群の $6.31 \pm 1.28 \text{ ng/ml}$ と比較して、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群、 $20 \mu\text{g/kg}$ 群、 $200 \mu\text{g/kg}$ 群、 $2000 \mu\text{g/kg}$ 群で有意差が見られた。 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群では $4.46 \pm 0.42 \text{ ng/ml}$ 、 $20 \mu\text{g/kg}$ 群では $4.69 \pm 0.41 \text{ ng/ml}$ 、 $200 \mu\text{g/kg}$ 群では $3.30 \pm 0.23 \text{ ng/ml}$ 、 $2000 \mu\text{g/kg}$ 群  $0.64 \pm 0.12 \text{ ng/ml}$  だった。PND20では対照群の末梢血中では $6.03 \pm 0.49 \text{ (ng/ml)}$ と比較して、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群では $8.95 \pm 1.13 \text{ ng/ml}$ 、 $20 \mu\text{g/kg}$ 群では $4.68 \pm 0.17 \text{ ng/ml}$ と有意差が見られた。

卵巣中ではPND10では対照群の $6.03 \pm 0.69 \text{ ng}$ と比較して $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群で $7.00 \pm 3.06$ と有意に増加した。PND15では対照群の $4.64 \pm 0.42 \text{ ng}$ と比較して $2000 \mu\text{g/kg}$ 群で $10.60 \pm 8.03 \text{ ng}$ と有意差に増加した。PND20では対照群の $18.68 \pm 6.78 \text{ ng}$ と比較して、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 群では $4.98 \pm 1.80 \text{ ng}$ 、 $20 \mu\text{g/kg}$ 群では $7.53 \pm 2.17 \text{ ng}$ と有意差が見られた。

### 組織学的変化

#### 1) 子宮の組織学的変化

子宮内膜上皮を観察したところ、10日齢では顕著な差が認められないものの、20日齢では対照群は子宮内膜上皮細胞が円柱型を示したが、 $EE2000 \mu\text{g/kg}$ 投与群で子宮内膜上皮細胞が立方型を示し、子宮内膜上皮の高さが低いものが多い傾向が見られた(図12)。

#### 2) 卵巣の組織学的変化

20日齢の卵巣の組織像では、対照群で種々の大きさの胞状卵胞、特に $300 \cdot \text{m}$ 、 $400 \cdot \text{m}$ 以上の大きさの胞状卵胞が認められるのに対し、 $EE200 \mu\text{g/kg}$ 投与群では1匹のみ $300 \cdot \text{m}$ 以上の大きさの胞状卵胞を持つ個体があったが、あとは $300 \cdot \text{m}$ 未満の小さな胞状卵胞しか認められず、 $EE2000 \mu\text{g/kg}$ 投与群ではほとんど胞状卵胞が認められなかった(図13)。さらに $EE2000 \mu\text{g/kg}$ 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。

### 性成熟後の発情周期に与える新生子期EE処置の影響

#### 体重の変化

図14に対象群と各曝露群の体重の変化を示した。253日齢において対照群と $2000 \cdot \text{g/kg}$ 群で有意差が見られた。

#### 膻開口日齢

PND0でのEE単回投与が膻開口時期に与える影響の観察結果を図15、表1に示した。膻開口日齢は、対象群、 $200 \mu\text{g/kg}$ 群、 $2000 \mu\text{g/kg}$ 群でそれぞれ、 $32.8 \pm 0.37$ 日、 $31.2 \pm 1.02$ 日、 $29.5 \pm 0.42$ 日(Mean  $\pm$  SEM)と、対照群と比較して $2000 \mu\text{g/kg}$ 群、 $2000 \mu\text{g} \cdot \text{kg}$ 群で膻開口日齢が早期化した。対照群と $2000 \mu\text{g/kg}$ 群は有意差が見られた。一方、 $200 \mu\text{g/kg}$ 群では対照群と $2000 \mu\text{g/kg}$ 群の膻開口日齢の両方にまたがる範囲の広さを示した。

表1 新生子期EE単回投与が膻開口時期に与える影響

	mean (日齢)	S. E. M.
Vehicle	32.8	0.374165739
$EE200 \mu\text{g/kg}$	31.2	1.019803903
$EE2000 \mu\text{g/kg}$	29.5	0.422577127

各群における膣開口日の平均値±SEMを示す。

対照群と EE2000 $\mu$ g/kg 投与群の間で有意差が見られた。

### 膣スメアの観察

新生児期 EE 単回投与が膣開口後の膣スメア像に与える影響を図 1 6 に、膣開口後から 36 週齢までを 2 週間ごとに区切り、その観察期間中に認められた発情期、発情前期および発情休止期の日数を図 1 7 に示した。

対照群および 200  $\mu$ g/kg 群と比較し、2000 $\mu$ g/kg 群は膣開口後より異常発情を示した。2000 $\mu$ g/kg 群は対照群と比較し、連続発情、連続休止期が認められた。

発情周期を膣スメア法によって調査したところ、対照群は観察期間中発情期、発情前期、休止期の割合が一定に保たれていたのに対し、200 $\mu$ g/kg 群では 30 週齢以降に 2000 $\mu$ g/kg 群では 14 週齢以降にその割合が乱れた。対照群は 36 週の観察期間中に発情周期の異常が見られなかったのに対し、EE2000 $\mu$ g/kg 投与群で開口後まもなく連続発情または連続休止期を示したものが 62.5% (5/8 匹)、30 週齢以降では 87.5% (7/8 匹) において連続発情となった。一方、EE200 $\mu$ g/kg 投与群では 40% (2/5 匹) が 26 週齢を過ぎて連続発情など異常発情となり、30 週齢以降に周期が乱れたものは 80% (4/5 匹) だった。

### 脳の性分化に対する影響

E2 投与による LH 分泌の反応を指標にして新生仔期 EE 単回投与が、脳の性分化に与える影響について検討した結果を図 18 に示した。対照群にはバラツキはあるもの

の、E2 投与 2 日後の 17 時に LH 分泌の増加が見られた。新生仔期 EE 投与群では低濃度では 17 時の LH 分泌増加が見られるものも認められたが、EE2000 $\mu$ g/kg 投与群では E2 投与による LH 分泌の抑制のみが認められた。

新生仔期 EE 単回投与が脳の形態学的性分化に与える影響を視索前野の性的二型核 (SDN-POA) の大きさを検討した結果を図 19 に示した。SDN-POA の大きさは新生仔期 EE 単回投与群で増大する傾向を示した。

### 90 日齢における発情周期中の内分泌学的変化

PND90 における末梢血中生殖関連ホルモン濃度変化を図 20 に示した。

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。インヒピ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

図 20-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

図 20-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

図 20-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

図 20-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

図 20-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 (図 21)。

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  $\beta$  のみであった。

図 22 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  $\alpha$ 、エストロゲン受容体  $\beta$ 、インヒビン  $\beta B$  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  $\alpha$ 、インヒビン  $\beta A$ 、P450scc に関しても、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

図 23-A に、PE17 における LH 受容体 mRNA の発現量を、図 23-B に同発情ステージにおける LH 受容体タンパクのウェ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、図 24 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、対照群と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  $\beta A$  においては、有意に増加した。

### 新生仔卵巣に対する EE の直接作用

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、図 25 に示した。

LH 受容体において、すべての処置群で対照群と比較して、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。

#### A. 考察

### 性成熟過程に認められる影響

体重 1g あたりの卵巣相対重量が、EE の用量に依存して有意に低下した。特に PND20 で採取した EE200、EE2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の卵巣を組織学的に観察したところ、EE の用量に依存して卵巣のサイズ減少、ならびに胞状卵胞の減少という影響が認められた。特に 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において顕著に胞状卵胞が減少しており、卵巣重量も減少していた。EE 投与の用量により、原始卵胞が退行したか、卵胞発育の遅延が推察された。過去には、ビスフェノール A を新生子期に投与すると、用量に依存して胞状卵胞の減少、卵巣重量が減少した報告がある (Adwale, et al., 2009)。

子宮においても卵胞の所見と一致した結果が認められた。体重 1 g あたりの子宮相対重量が EE の用量に依存して低下傾向が認められた。対照群と比較して特に 2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では子宮の相対重量が PND15, 20 において有意に減少した。子宮組織を観察すると、EE の用量に依存して子宮内膜上皮細胞が発達していなかった。これは卵巣からのエストラジオール分泌が、投与した EE の用量に依存して低下していることを示唆している。

末梢血液中インヒビン濃度および卵巣中インヒビン含有量も EE の用量に依存して減少傾向が見られた。インヒビンは、雌ラットでは主に卵胞の顆粒層細胞から分泌される。卵胞の発育が対照群と比較して遅れていることが推察された。卵胞発育と一致した変化を示す (Watanabe, et al., 1990)。

下垂体前葉中の FSH 含有量の結果を見ると、対照群と比較して EE200、

2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群において低い傾向が認められた。ラットの発情周期中では下垂体中 FSH 含有量が、FSH 分泌亢進時に低下する (Watanabe, et al. 1990) ことから、血中インヒビン濃度が低い点と考え合わせると、FSH 分泌が亢進している結果と推察された。

下垂体前葉中の LH 含有量は EE の用量に依存して高い傾向が見られ、特に PND 20 では対照群と比較して EE200、2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群で有意に増加した。この結果は、視床下部からの性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 分泌が増加していることを示しており、前述の卵巣所見と合わせるとエストロジェンのネガティブフィードバックが減少していることが推察された。

一方、末梢血液中 LH 濃度については一定の傾向が認められなかった。LH の分泌はパルス状に変動していることが知られており (Gallo, 1988)、本研究の結果も変動が大きいゆえであると考えられた。

以上より、卵胞発育抑制の原因は、ゴナドトロピンの分泌過少によるものではなく、卵胞自身のゴナドトロピンに対する感受性低下が推察された。考えられる原因として、ゴナドトロピンに対するレセプターの発現減少が挙げられる。過去には、メトキシクロル (MXC) とその代謝物が、PND 50-60 における卵巣において、エストロゲンレセプター  $\beta$  プロモータ領域のメチル化を増加させ、レセプター発現を抑制させることが報告されている (Zama and Uzumcu 2009)。ただし、EE2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の観察結果と比較して、EE200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群では、対照群と類似し

た観察結果の個体も認められたことから、用量に依存して影響の程度が異なるかもしれない。

低濃度 EE 投与群の卵巣内における遺伝子発現変化に着目した。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、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する報告 [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、新生期に「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が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ければ、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。

#### 遅発性影響が引き起こされる用量条件、 遅発性影響の指標

本研究において性成熟以後の発情周期の観察結果より、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群において遅発性影響が引き起こされることが明らかとなった。

膣の開口日齢が、対照群と比較してEE2、000 $\mu$ g/kg 投与群において有意に早期化した。また EE200、2、000 $\mu$ g/kg 投与群において膣の開口が小さいピンホール型を示した。この結果は、新生子期にアンドロジェンを投与して性中枢の雄化を誘起した下記の報告と類似した結果であった。雌ラットの新生児期にアンドロジェンあるいは大量のエストロジェンを投与して、性中枢を雄化した場合、膣の開口が小さく、早期化し、その後も膣スメアが連続的に発

情期像を示すことが報告されている (Gorski, et al. 1977)。本研究では、オクチルフェノールを性分化の臨界期に投与した場合 (Katsuda et al, 2000, Herath et al, 2001) と類似して、性中枢の部分的あるいは不完全な雄化が生じたものと推察された。

発情周期を調査した結果は EE の用量と関連した変化が認められた。すなわち EE2、000 $\mu$ g/kg 投与群では膣開口直後から連続発情期または連続休止期を示した一方、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群では 6 ヶ月齢を過ぎた頃から発情周期の異常が認められた。しかし観察期間中、対照群では発情周期の異常が認められなかったことから、EE20、200 $\mu$ g/kg 投与群では EE2、000 $\mu$ g/kg 投与群とは異なる影響を受け、遅発性の影響が現れたと推察された。

臨界期における EE 投与が性中枢に与える影響として、性的二型核の形態的異常が知られている (近藤ら、2010)。性的二型核は、近年、ヒトやラットを含めて多くの動物において発見されている神経核の形態学的な性差である。発達期の脳における性的二型核の形成にはエストロジェンが関与することも明らかとなっている (本郷ら、2005)。本研究において機能的にも形態学的にも性中枢の性分化が部分的に雄型になっている可能性が高い。

#### B. 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。臨界期における EE 投与は末梢、

特に卵巣と子宮に影響を与える可能性が推察された。すなわち、EE 投与によって卵巣における卵胞発育が抑制され、卵胞から分泌されるエストラジオール分泌やインヒビンの分泌が減少し、それらによる視床下部、下垂体前葉に対するネガティブフィードバックが減少した結果、下垂体前葉からの LH 分泌、FSH 分泌が増加したことが推察された。これは、老化した生殖機能で認められる現象に非常に類似しており、生殖機能の早期老化とも考えられる。

さらに 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。遅

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。

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 EE20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群(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。

#### C. 研究発表

##### 1. 論文発表

該当無し (準備中)

##### 2. 学会発表

1) 岡崎祥子、渡辺元、永岡謙太郎、田谷一善 出生直後のエチニル・エストロジェン投与が、雌ラットの春機発動初期の栄職内分泌機能に与える影響:第 16 回日本生殖内分泌学会学術集会 (2011.11)

2) 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ジェ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,

#### D. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし