

EE 2000 µg/kg 群では、エストロゲンに対する反応性は保持しているものの、子宮重量が著しく低下していた。新生児期に高用量のエストロゲン曝露を受けると、子宮腺の発達抑制や形態異常を生じることが報告されている (Yoshida M et al., 2011)。今回、組織学的検索は実施していないが、高用量の EE 曝露により子宮の正常な発達が妨げられていると推察された。

E. 結論

新生児期に EE 20 µg/kg の曝露を受けた雌ラットでは、正常に性周期を回帰している個体においても、加齢ラットと類似して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出された。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが新生児期 EE 曝露の標的の一つであることが示唆された。

遅発性影響を発現する新生児期 EE20, 200 µg/kg 曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.
- 2) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Thickened area of external granular layer and Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in *Ptch1*^{+/-} mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.
- 3) Saori Matsuo, Miwa Takahashi, Kaoru

Inoue, Kei Tamura, Kaoru Irie, Yukio Kodama, Akiyoshi Nishikawa, Midori Yoshida. Inhibitory Potential of Postnatal Treatment with Cyclopamine, a Hedgehog Signaling Inhibitor, on Medulloblastoma Development in *Ptch1* Heterozygous mice. *Toxicol Pathol* 2014. In press.

4)

2. 学会発表

- 1) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod Dhakal, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび *kiss1 mRNA* 発現に及ぼす影響: 第 30 回日本毒性病理学会 (2014. 1)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

- 1) Adachi S, Yamada S, Takatsu Y, Matsui H, Kinoshita M, Takase K, Sugiura H, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Tsukamura H, Inoue K, Maeda K.: Involvement of anteroventral periventricular metastin/kisspeptin neurons in estrogen positive feedback action on luteinizing hormone release in female rats. *J Reprod Dev.*, 53, 367-78, 2007.
- 2) Lederman MA, Lebesgue D, Gonzalez VV, Shu J, Merhi ZO, Etgen AM, Neal-Perry G.: Age-related LH surge dysfunction correlates with reduced responsiveness of hypothalamic anteroventral periventricular nucleus kisspeptin neurons to estradiol positive feedback in middle-aged rats. *Neuropharmacology*, 58, 314-20, 2010.
- 3) Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent

mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol.*, 18, 399-406, 2004.

- 4) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.
- 5) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, 69, 265-270, 1983.
- 6) Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A.: Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicol Pathol.*, 39, 823-834, 2011.

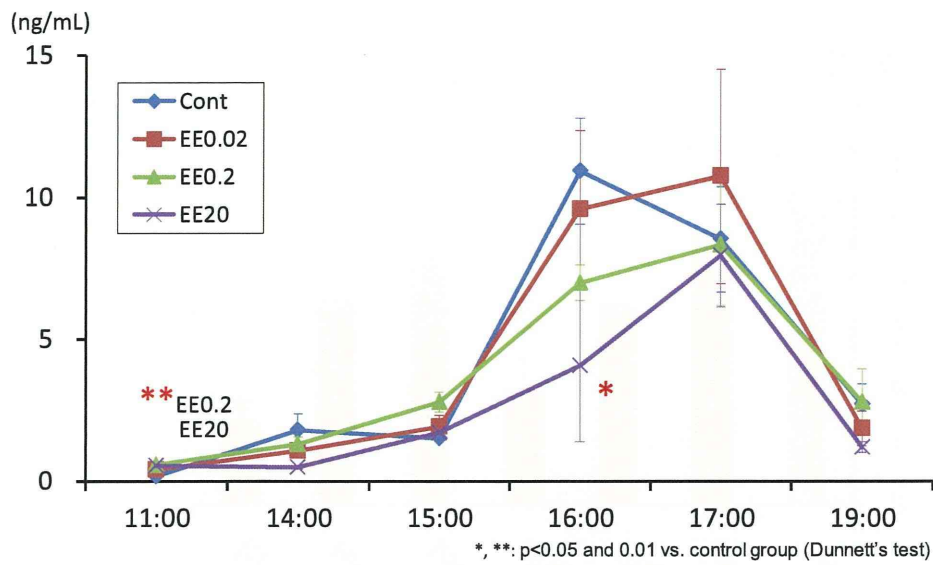


図1. EE群の血清LH濃度の推移

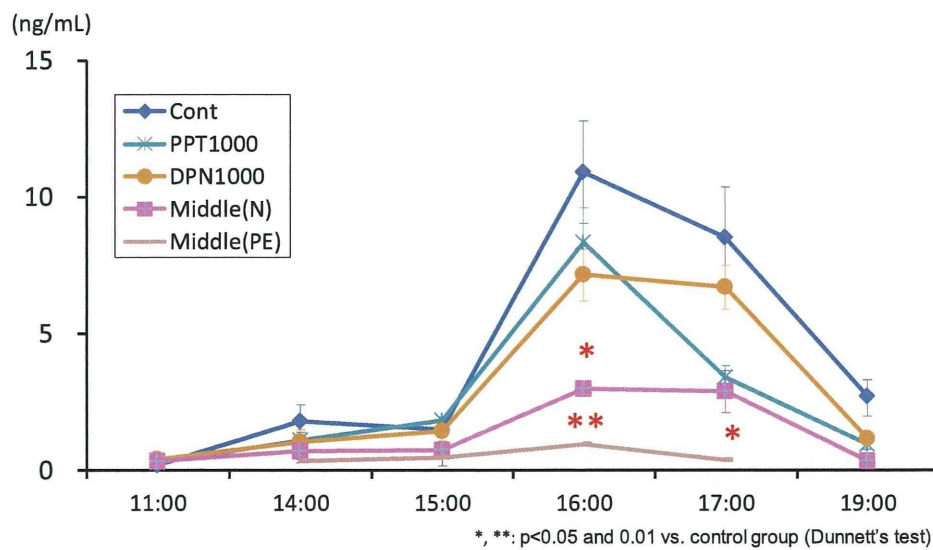
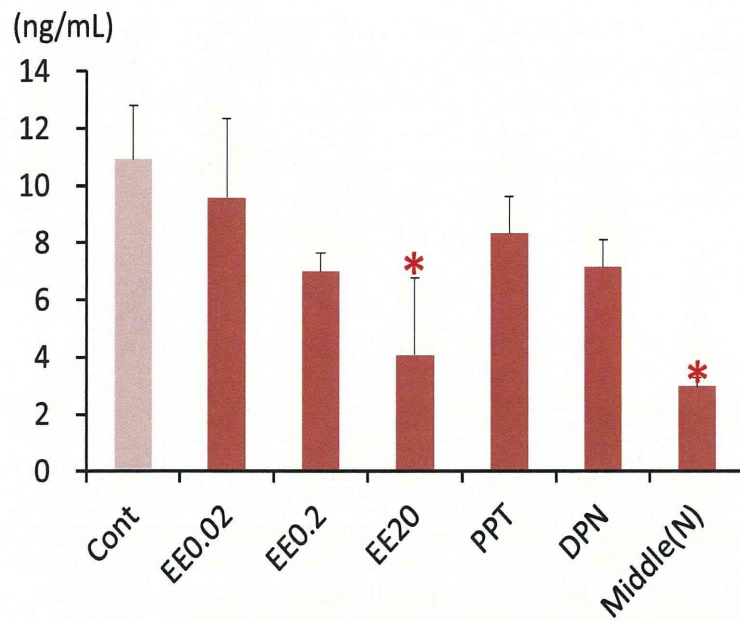


図2. PPT, DPNおよび加齢ラット群の血清LH濃度の推移



*, **: $p < 0.05$ and 0.01 vs. control group (Dunnett's test)

図3. ピーク時(16:00)における血清LH濃度

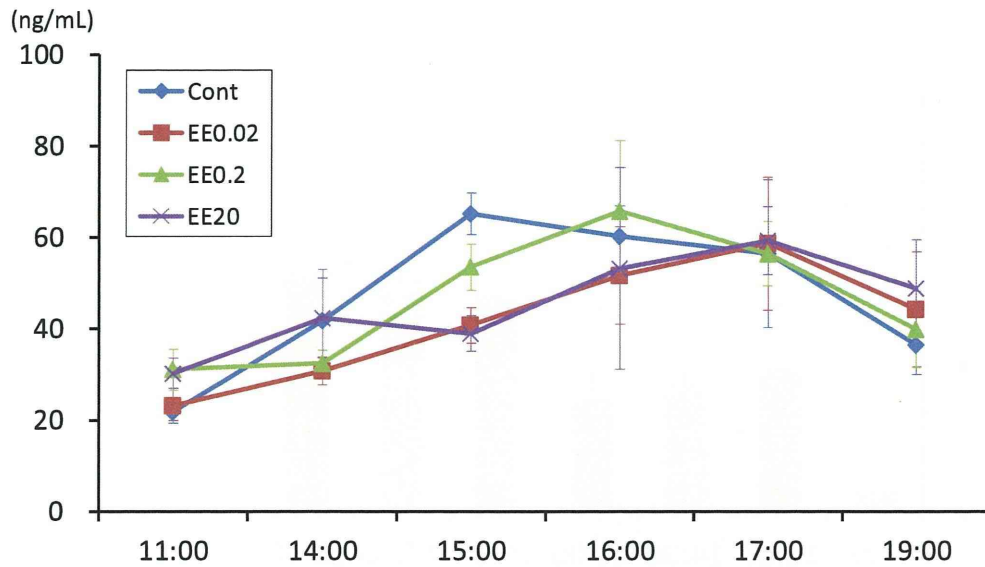


図4. EE群の血清FSH濃度の推移

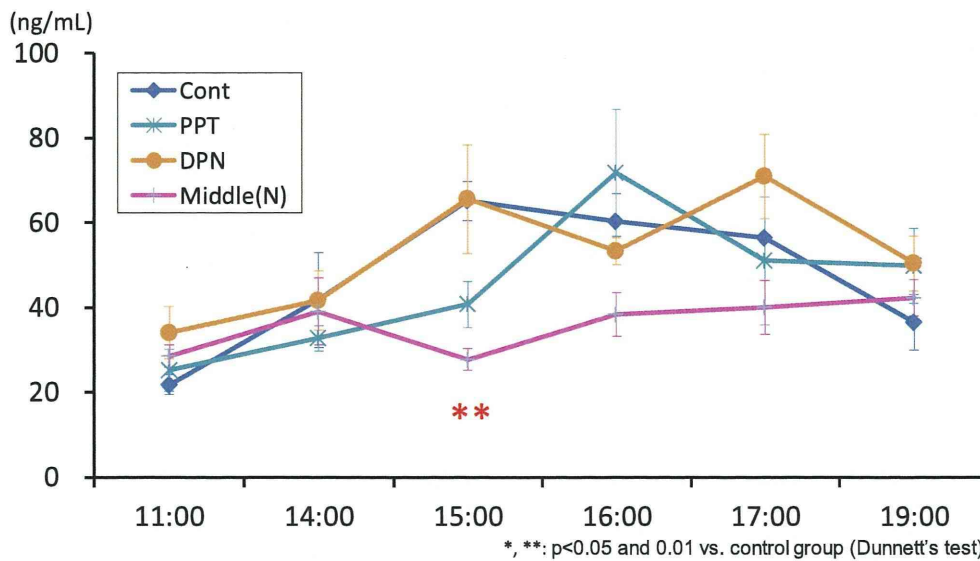


図5. PPT, DPNおよび加齢ラット群の血清FSH濃度の推移

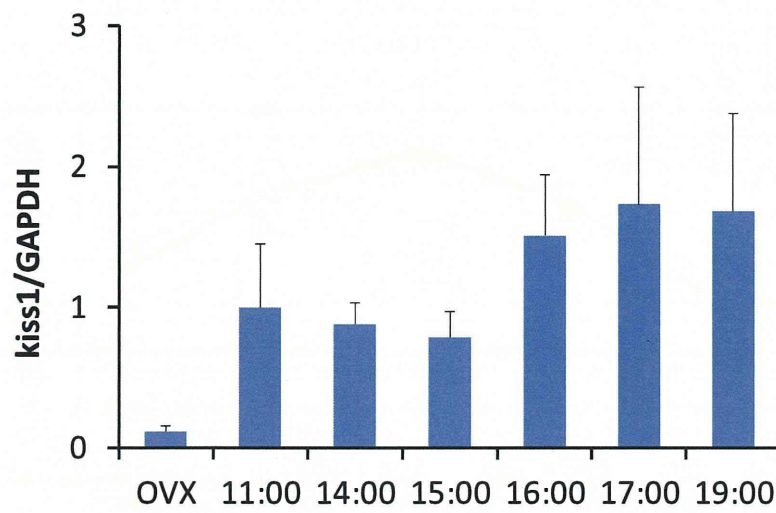
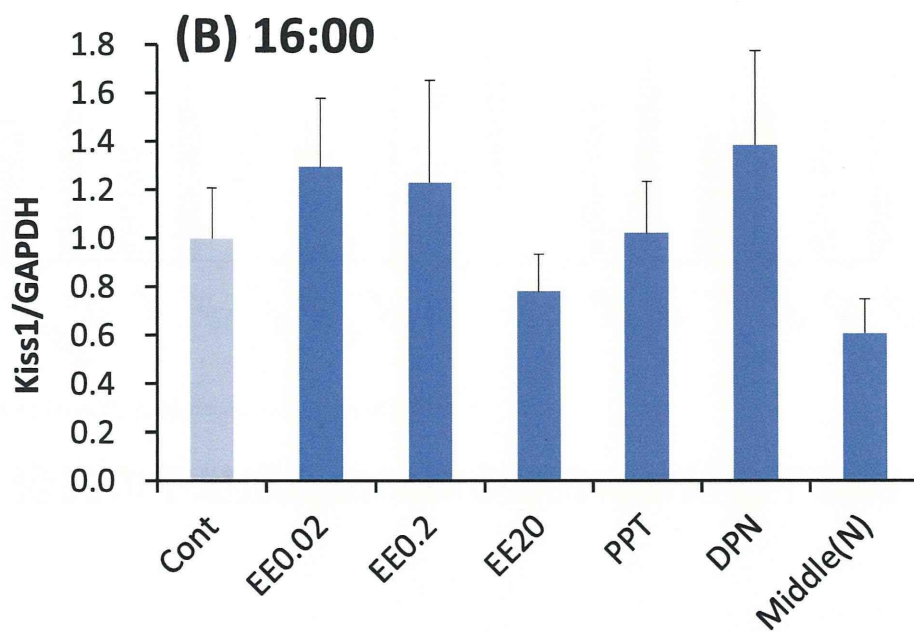
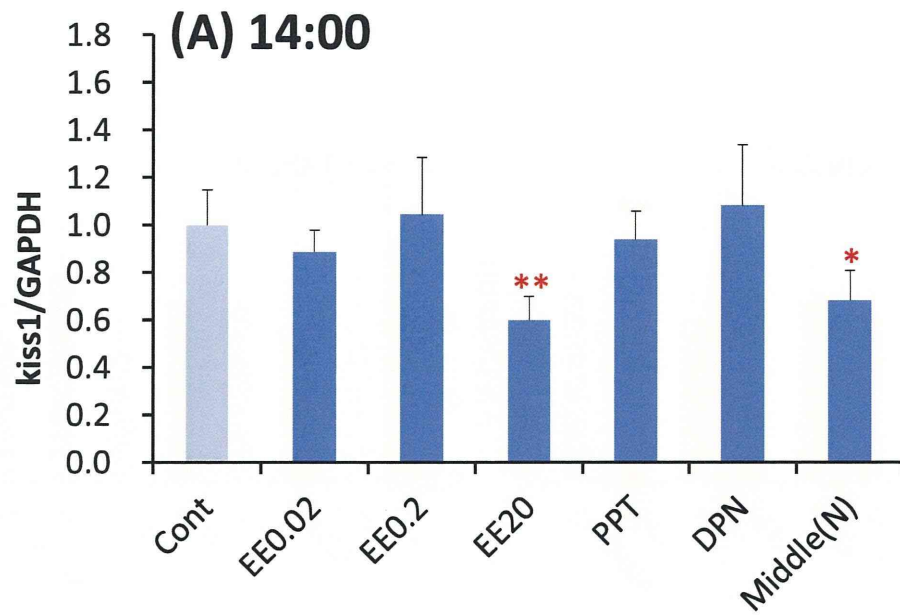
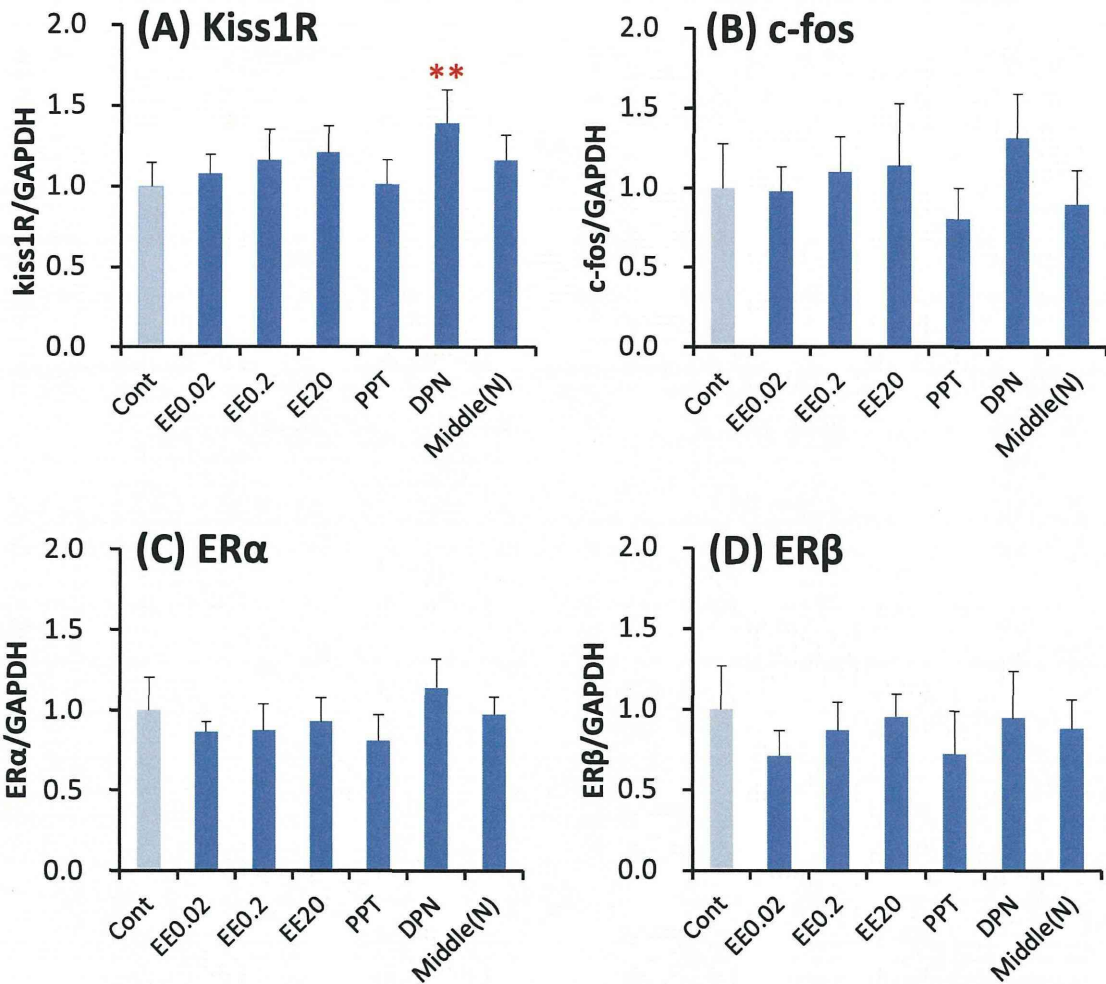


図6. 視床下部前部における対照群のKiss1 mRNA発現



*, **: $p < 0.05$ and 0.01 vs. control group (Dunnett's test)

**図7. 視床下部前部におけるKiss1 mRNA発現
(A)14:00, (B) 16:00**



*, **: p<0.05 and 0.01 vs. control group (Dunnett's test)

図8. 視床下部前部におけるKiss1関連遺伝子の発現

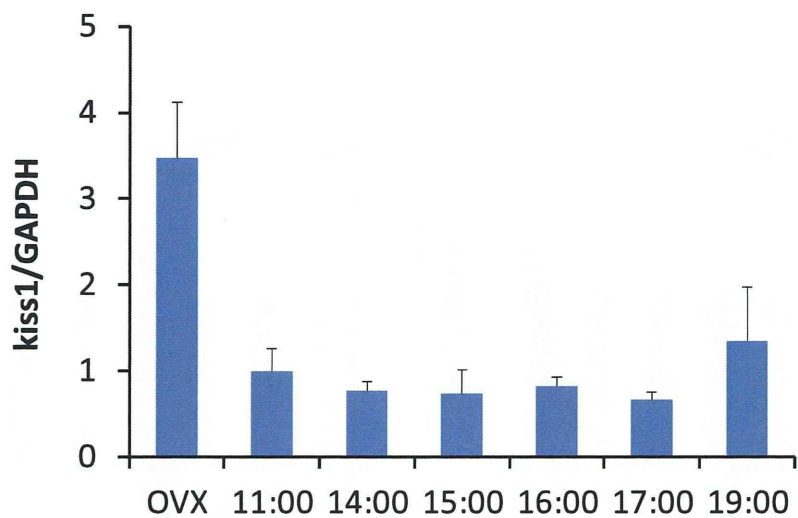


図9. 視床下部後部における対照群のKiss1 mRNA発現

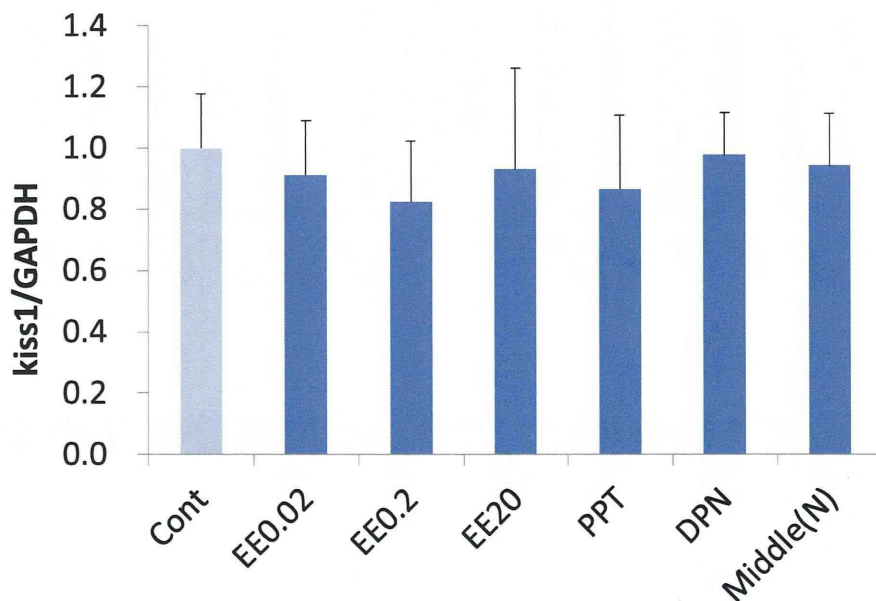


図10. 視床下部後部におけるKiss1 mRNA発現 (16:00)

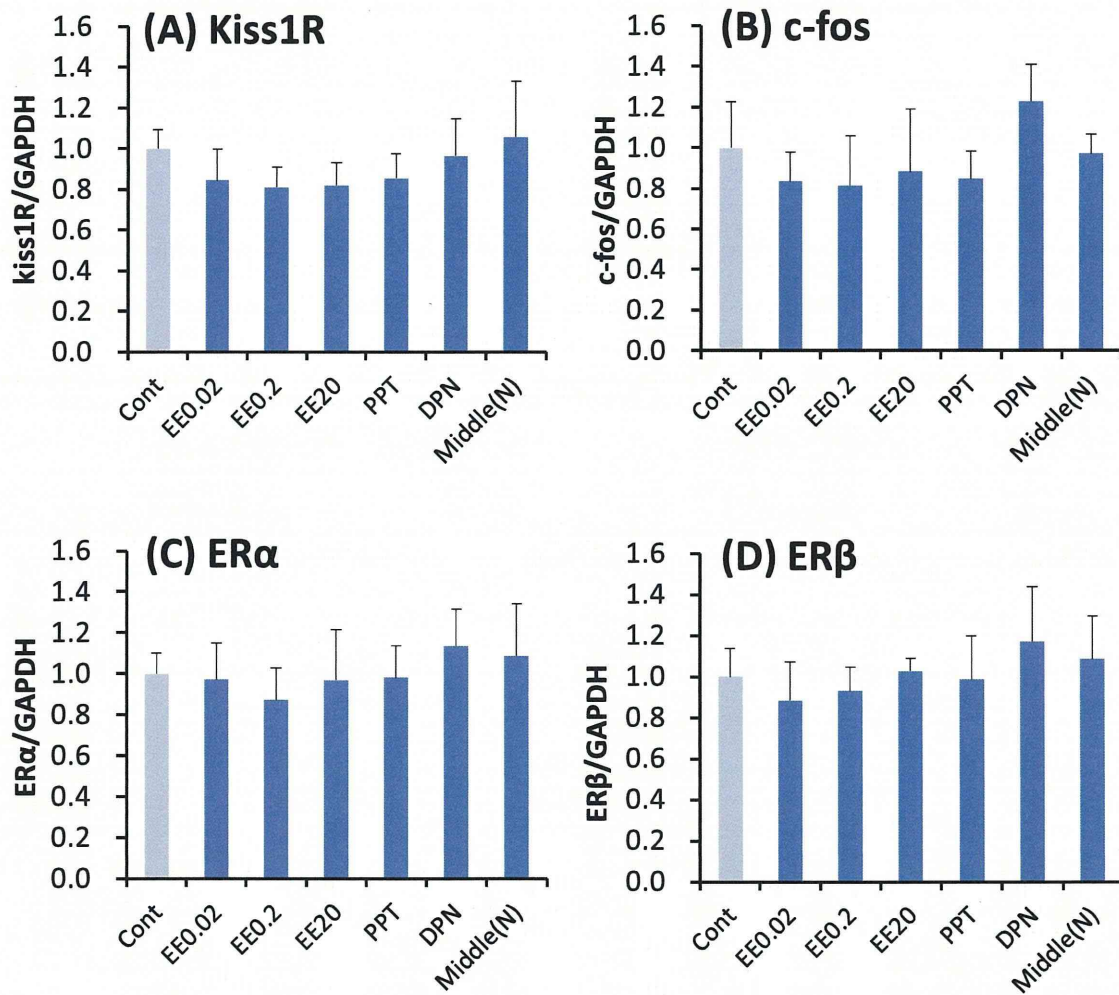
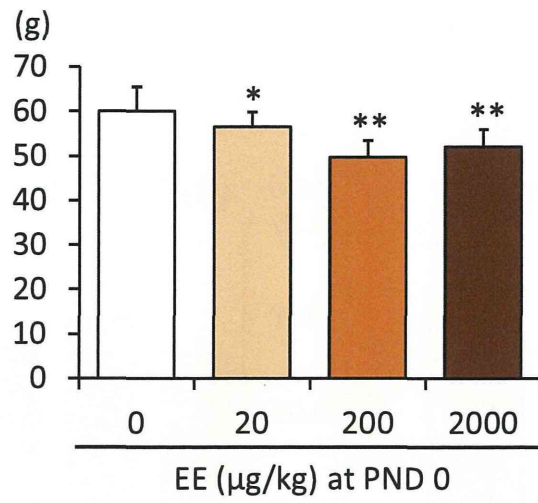
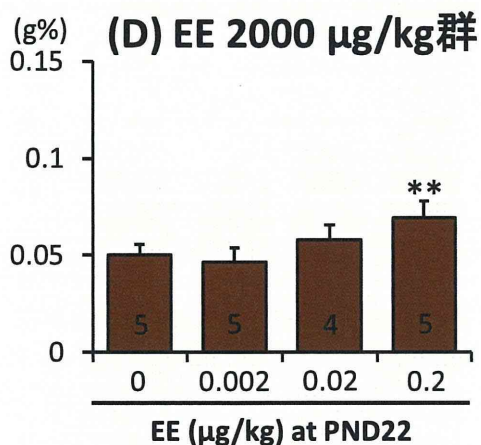
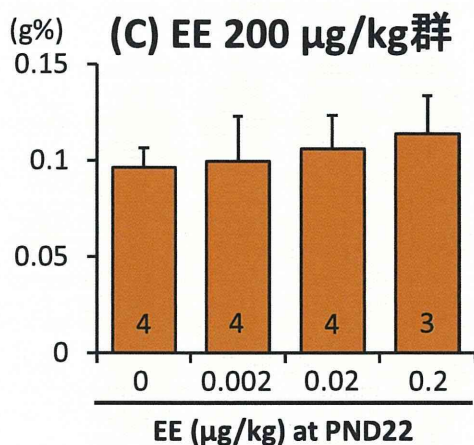
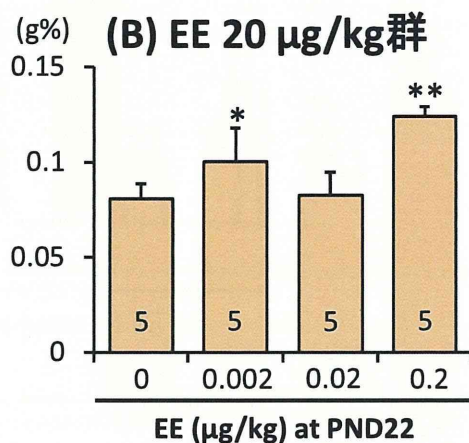
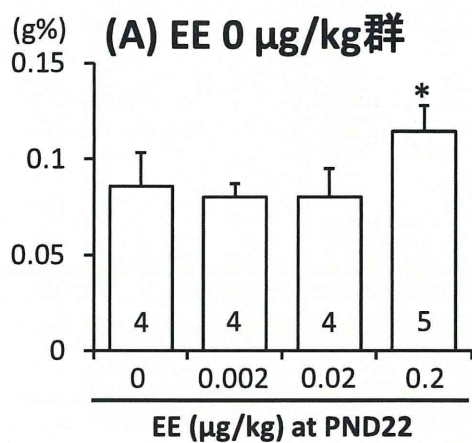


図11. 視床下部後部におけるKiss1関連遺伝子の発現



*, **: p<0.05 and 0.01 vs. 0 μg/kg group.

図12. 22週齢における体重



*, **: $p < 0.05$ and 0.01 vs. $0 \mu\text{g}/\text{kg}$ in each group.
 Number of animals is shown in each bar.

图13. 子宫相对重量

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

分担研究課題： 遅発影響の発現機序検索。特に視床下部パルス制御部位のキスペプチン
の変化と卵巣がもたらす相互作用および遅発影響による卵巣の変化の閾値について
- キスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係—遅発影響と閾値の関連性 -

研究分担者：	代田 真理子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	渡辺 元	東京農工大学農学部
研究協力者：	東村 博子	名古屋大学農学部
研究協力者：	上野山賀久	名古屋大学農学部
研究協力者：	代田 欣二	麻布大学獣医学部・生物科学総合研究所
研究協力者：	川嶋 潤	麻布大学獣医学部
研究協力者：	小川 祐布子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	大隈 瑞穂	麻布大学獣医学部
研究協力者：	立河 紗紀	麻布大学獣医学部
研究協力者：	寺西 瑞希	麻布大学獣医学部
研究協力者：	森 雅史	麻布大学獣医学部

研究要旨

17 α -Ethinylestradiol (EE)は、*in vivo*あるいは*in vitro*でのエストロゲン活性検出試験における陽性対照物質として汎用されていることから、多くの化学物質の活性が同一の試験系で評価されている合成エストロゲンである。先行研究において、ラットの脳の性分化における臨界期とされている1日齢から5日間、EEを0.4~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の用量で雌に反復経口投与すると、性周期の異常、排卵周期の停止や乳腺の過形成などの遅発影響が認められ、性周期回帰停止までの期間はEEの用量低下に伴い延長することを示した。本研究では初年度としてまず、EEを0.0032~0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日の用量で1日齢から5日間雌ラットに経口投与して新生児期投与による遅発影響出現におけるEEの閾値を推定した。その結果、いずれの用量も性周期に明瞭な影響は及ぼさなかったが、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日投与群では27~28週齢の卵巣に嚢胞状卵胞を認める動物の割合が増加した。嚢胞状卵胞の形成増加は、先行研究でも遅発影響のひとつとして認められていることから、遅発影響に関する閾値は経口経路で0.0016 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日付近に存在すると考えられた。一方、EEを幼若雌ラットに3日間経口投与した子宮肥大試験では、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日でも子宮重量の増加は認められず、臨界期曝露による遅発影響の閾値が子宮肥大試験における検出感度以下に存在することが明らかになった。さらに、先行研究において初回排卵に影響の認められた0.4~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日のEEを投与して、視床下部/下垂体/性腺軸の中でも卵巣を中心にキスペプチンパルス制御部位と遅発影響との関係を解析した結果、卵胞の発育遅滞ならびに黄体形成ホルモン受容体(LHR)の発現低下が遺伝子およびタンパク質レベル、ならびにその下流遺伝子の発現レベル低下で確認された。

A. 研究目的

主要な器官の形成が終わった胎児期から新生児期までの期間は、ヒトにおいても動物において

も高次機能が分化発達する重要な時期といえる。

我々は先行研究によって、機能分化の臨界期における化学物質曝露の遅発型影響を明らかに

し、その発現メカニズム解明と指標の確立を目的として、エストロゲン活性評価の陽性対照物質である 17 α -ethinylestradiol (EE) をモデル化学物質として、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる新生雌ラットに、EE を単回皮下投与、反復経口投与あるいは単回経口投与を行い、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発影響を量と反応との関係から検討した。その結果、両投与経路ともに EE 投与は性周期の回帰を若齢で停止させ、停止までの期間は用量の低下に伴い遅延することが明らかになった。投与後の EE 血中濃度を測定した結果、生理学的エストロゲンレベルでも若齢で性周期の回帰を停止させることが明らかとなった。一方、設定した最小用量（皮下 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、経口 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）でも影響が認められたことから、本研究では初年度として、まず、遅発影響の閾値を探索することを目的とした。また、*in vivo* でのエストロゲン活性検出試験として汎用されている子宮肥大試験を行い、エストロゲン活性検出感度を遅発影響の閾値と比較した。さらに、キスペプチンパルス制御部位と遅発影響との関係を明らかにするために、初年度は視床下部／下垂体／性腺軸成立までの幼若期における卵巣を中心に EE の反復経口投与が影響を及ぼす分子の探索を行った。

B. 研究方法

1. 被験物質の調製

投与に用いた EE (Sigma-Aldrich、純度 98%以上) は、エタノール(和光純薬)に溶解して 100 mg/mL の濃度に調整し、これをストックソリューションとして 4°C で遮光保存した。投与検体はストックソリューションをコーン油 (和光純薬) で段階希釈し、1 回の投与液量が 10 mL/kg になるように濃度を調製した。調製検体は遮光室温保存して調製後 1 週間以内に使用した。

2. 使用動物および飼育条件

日本チャールスリバー株式会社から、購入した Sprague Dawley 系 (CrI:CD(SD))ラットを用いた。新生児の投与では、同系統の成熟雄ラットと交配させて妊娠動物とし、自然分娩で得られた雌産児を実験に用いた。

子宮肥大試験には日本チャールスリバー株式会社 (横浜) より養母と共に生後 15 日で購入した同系等の雌ラットを、生後 21 日に離乳して用いた。

3. 群分けおよび投与方法

新生児期投与動物は、出生翌日の 1 日齢に、各腹の雌出生児を各群に振り分け、墨汁 (開明墨汁、開明、さいたま市) を四肢皮下に少量注入して個体を識別した。その際、哺育状態による影響を均等化するために、各腹に全ての投与群の出生児を配し、雄出生児を加えて同腹生児数を 8 匹あるいは 10 匹に揃えた。子宮肥大試験に用いた動物は、離乳後に群分けを行った。

新生児への投与は、Watanabe らの報告を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用い、投与日に測定した体重を基に 10 mL/kg を経口投与した。対照群には媒体としたコーン油 (和光純薬) を同様に投与した。子宮肥大試験では、金属ゾンデを装着した注射筒を用いて強制経口投与を行った。投与容量は 10 mL/kg とし、対照群には媒体としたコーン油 (和光純薬) を投与した。

4. 反復経口投与による遅発影響の閾値探索

(1) 投与量及び投与期間

1 日齢から 5 日間 EE を反復経口投与した。EE の用量は、先行研究において 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ でも若齢で性周期の回帰を停止する動物が認められたことから、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を最高用量に設定し、以下公比 5 で除して 0.016 および 0.0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を設定した。対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

(2) 観察方法

投与前後に一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 26-27 週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

(ア) 体重

投与日および、7、10 日齢ならびに 14 日齢からは 1 週間毎に個別体重を測定し、剖検日にも体重を測定した。

(イ) 開眼の観察

12 日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた日を開眼日として体重を測定した。

(ウ) 膣開口の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(エ) 性周期の観察

8 週齢から 4 週間に 1 回、2 週間にわたり、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は 25 週齢まで継続し、2

週間の観察期間中に4-5日で発情を回帰したものを正常周期に、また、連続した発情休止期が全く観察されなかったものを、連続発情に分類し、発情休止期が14日以上継続したものを無発情に、これら以外をその他に分類した。また、観察期間中に認められた発情期と発情前期の日数の合計を集計した。

(オ) 剖検

性周期の観察は上記の観察期間終了後も継続し、発情期あるいは発情休止期に剖検した。

剖検に際して、まず動物にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル、共立製薬)を腹腔内投与(1 mL/kg)し、深麻酔下で採血を行い、その後放血致死させた。剖検では脳、下垂体、卵巣、肝臓、副腎、子宮、乳腺、膣を採取し、下垂体、卵巣、肝臓、副腎および子宮の重量を測定した。また、卵管を採取し、排卵検査を行った。重量測定後、卵巣は、リン酸緩衝ホルマリン液、4%パラホルムアルデヒド(PFA)あるいはブアンでの固定もしくは液体窒素を用いた急速凍結を行い、 -50°C で保存した。

(3) 卵巣の組織観察

固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、 $4\ \mu\text{m}$ の厚さで薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定はAcuña [Acuña,2009]に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莢膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

5. 幼若雌ラットを用いたEEの経口投与による子宮肥大試験

(1) 投与量及び投与期間

経済協力開発機構(OECD) Test Guideline 440に従い、22日齢の幼若雌ラットに3日間反復強制経口投与した。投与は午前10時に行い、マウス用経口投与胃ゾンデを装着した1 mL注射筒(テルモ、東京)を使用した。

投与量はOECD子宮肥大試験Phase1において経口経路でエストロゲン活性が認められ[Kanno,2001]、先行研究において明瞭な遅発影響が認められた $2.0\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を最高用量とし、以下公比25で除して 0.08 および $0.0032\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を設定した。陰性対照群には溶媒としたコーン油を $10\ \text{mL}/\text{kg}$ 体重/日投与した。

(2) 観察方法

毎日一般状態を観察し、膣開口の有無を観察した。体重は投与開始日から剖検日まで毎日測定した。剖検は最終投与から24時間後の25日齢で剖検を行った。剖検では、まず動物にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル、共立製薬)を腹腔内投与(1 mL/kg)し、深麻酔科で採血を行い、その後放血、安楽死させた。剖検では卵巣および子宮を採取した。子宮は膣とともに摘出し、実体顕微鏡下で脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は、子宮内液を含んだ状態でまず測定し(wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度重量を測定した(blotted weight)。また両側卵巣の重量を測定した。

6. 新生児期エチニルエストラジオール曝露が幼若期卵巣における卵胞発育に及ぼす影響

(1) 投与量及び投与期間

1日齢から5日間EEを反復経口投与した。EEの用量は、先行研究において8週齢で既に異常な性周期を示す動物が増加し、初回排卵に遅延が認められている 0.4 あるいは $2\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ を設定し、対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

(2) 観察方法

動物は母動物もしくは養母動物に哺育させて、卵巣が受容体を介して性腺刺激ホルモンへの感受性を獲得している10日齢の一部を剖検した。残りの動物は21日齢に離乳後、視床下部-下垂体-性腺軸の発達が進み、外来性の性腺刺激ホルモンの反応し自然排卵することが可能となる23日齢に剖検した。

10日齢では低温麻酔下で断頭屠殺し、実体顕微鏡下で卵巣を採取した。23日齢では6.48%ペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル、共立製薬、東京)の腹腔内投与(1 mL/kg)による深麻酔下で腹大動脈から採血した後に放血致死させ、卵巣および子宮、下垂体を採取し重量を測定した。

採取した卵巣の片側は形態学的解析のためにBouin液、リン酸緩衝ホルマリン液(マスクドホルムB、日本ターナー、大阪)または4%パラホルムアルデヒド(4%PFA)で固定した後、常法に従ってパラフィン包埋した。対側の卵巣は遺伝子発現解析のために、10日齢ではRNA later (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA)中で保存し実体顕微鏡下でトリミングした後に液体窒素中で急速凍結し、23日齢では液体窒素中で急速凍結し、いずれも -80°C で保存した。

23日齢に採取した子宮および下垂体はリン酸緩衝ホルマリン液で固定した。採取した血液は氷上に静置後、4℃、3,000 rpmで15分間遠心分離して血清を得た。得られた血清はホルモン測定のために-50℃で保存した。

(3) 発育卵胞数の計測

EE投与の卵胞発育に及ぼす影響を知るために、Bouin固定してパラフィン包埋した卵巣を6μm厚の連続切片とし、HE染色を行って発育卵胞数を計測した。計測はすべての切片を対象とし、光学顕微鏡下で観察して卵母細胞の核小体が明瞭に確認できた卵胞を、preantral、early antralならびにantralに分類しそれぞれの数を計測した。各発育段階の卵胞は、Pedersen & Petersによる分類 [Pedersen T and Peters H, 1968]でそれぞれtype 4-5b、type 6およびtype 7に相当する。各発育段階の卵胞の代表例を図1に示す。

(4) Total RNAの抽出

凍結卵巣はTRIzol試薬 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) および細胞破碎装置用ビーズ (ステンレス φ3.2、トミー精工、東京) とともに細胞破碎装置用チューブ (トミー精工、東京) に入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置MS-100R (トミー精工、東京) を用いてホモジナイズした。その際、10日齢サンプルについては3個体分の卵巣を1サンプルとした。TRIzol試薬はそれぞれ10日齢サンプルでは550μL、23日齢サンプルでは1 mL使用した。破碎後、ホモジネート500μLを別のチューブに移し、クロロホルム (試薬特級、和光純薬工業、大阪) 100μLを加え攪拌し、室温で2分静置後に5℃、12,000 gの条件で15分間遠心して水層およびフェノール・クロロホルム層に分離した。RNAを含む水層のみを別チューブに回収して2-プロパノール (イソプロピルアルコール、分子生物学用、和光純薬工業、大阪) 250μLを加え軽く攪拌し、室温で10分間静置した後、4℃、12,000 gの条件で10分間遠心分離した。チューブから上清を除き、残った沈殿物に75%に希釈したエタノール (分子生物学用、和光純薬工業、大阪) 1 mLを加え4℃、7,500 gで5分間遠心分離し洗浄した。その後75%エタノールを除去し、10分間風乾した後にDEPC treated Water (遺伝子工学研究用、ニッポンジーン、東京) 100μLを加え、55℃で10分間インキュベートしRNAを溶解させた。得られたRNA溶液の吸光度測定によって濃度を算出し、100μg/mLのtotal RNA溶液となるように調整し-80℃で保存した。

(4) Real-time RT-PCR

逆転写に先立ち、4μLのtotal RNA溶液 (RNA換算400 ng) をdeoxyribonuclease I

(Amplification Grade、Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA USA) 処理しゲノムDNAを除去した。逆転写にはTaqman® Reverse Transcription Reagents (Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA USA) を用いて、処方に従いcDNAを合成した (25℃・10分間および48℃・30分間、95℃・5分間でインキュベーション)。逆転写プライマーにはランダムプライマーを用いた。合成したcDNAを鋳型としてStepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA USA) を用い、TaqManプローブ法によるreal-time PCRを行った。

定量解析の対象には幼若期の卵巣を構成する組織に特異的に発現する卵胞発育関連因子をコードする遺伝子、ならびにステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子を選択した。すなわち、卵母細胞に発現するGDF-9、顆粒層細胞に発現するFSH受容体 (FSHR)、エストロゲン受容体β (ERβ)、インヒビンの各サブユニット (Inhibin α、βA、βB)、AMHならびに莢膜細胞に発現するLH受容体 (LHR) を選択した。またステロイドホルモン合成経路では莢膜細胞でのミトコンドリアへのコレステロールの取り込みを促進するsteroidogenic acute regulatory protein (StAR)、ミトコンドリアでコレステロールからプレグネノロンの生成を行うcholesterol side-chain cleavage enzyme (P450sc)、さらに細胞質でプレグネノロンを基質としてテストステロンを生成する酵素である3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD) およびP450c17、ならびに顆粒層細胞でテストステロンを基質として17β-estradiol (E2) を生成するaromataseをコードする各mRNAを定量した。また、内在性コントロールとしてglyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) mRNAを定量し、GAPDH mRNA発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

Real-time PCRに用いた各遺伝子のプライマーおよびプローブの塩基配列は、NCBI

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より得た配列情報を基にプライマー設計ソフトウェア (Primer Express、Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA USA) を用いて設計した (表1)。なお、LHRについては選択的スプライシングによる機能的

および非機能的な発現が知られており [Tsai-Morris, et al., 1991; Aatsinki, et al., 1992; Sokka, et al., 1992]、本研究では機能的な LHR mRNA 発現のみを対象とするため機能的 LHR mRNA 特異的な細胞膜貫通部位をコードする exon 11 に特異的なプライマーおよびプローブを設計した [Dufau, et al., 1995]。AMH mRNA の定量には TaqMan® Gene Expression Assays (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用い、GAPDH mRNA の定量には Pre-Developed TaqMan® Assay Reagents Control Kits (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いた。

(5) LH 受容体タンパクの定量解析

(ア) タンパク質の抽出

凍結した 23 日齢の卵巣から RIPA バッファー (0.1% SDS、1% Trion X-100 / Tris-HCl pH=8.0) を用いてタンパク質を抽出した。組織重量 1 g あたり 10 mL の RIPA バッファーを加え、RNA 抽出時と同様にビーズ式細胞破碎装置によりホモジナイズした。ホモジナイズ後、Benzonase (Novagen, Madison, WI, USA) を 1 μ L 加え、氷上で 15 分間インキュベートした。その後 15,000 g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離し、上清を回収しサンプルとなるタンパク溶液を得た。各サンプルのタンパク溶液は DC Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA) によりタンパク濃度を測定した。

(イ) Western Blotting

タンパク質 10 μ g 分のサンプルに水を加えて 5 μ L に合わせ、2 \times サンプルバッファーを 5 μ L 加え 100 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした。その後、サンプル溶液の全量をポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL、アトー、東京) にアプライし、ミニスラブ電気泳動装置 (AE-6530P、アトー、東京) を用いて 20 mA で 80 分間電気泳動した。電気泳動後、セミドライ式ブロッティング装置 (WSE-4020、アトー、東京) を用いて 152 mA で 30 分間通電し、PVDF メンブレン (WSE-4051、アトー、東京) にブロッティングした。ブロッティング終了後、メンブレンを 0.1% Tween 20 入り 3% スキムミルクにより室温で 30 分間インキュベートし、ブロッティングした。一次抗体には anti-LHR (sc-25828、Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) および anti- β -actin (#4967、Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) をそれぞれ 1:1000 に希釈して用い、4 $^{\circ}$ C で一晩インキュベートした。メンブレンを 3% スキムミルク入り PBS で洗浄した後、二次抗体に Dako

EnVision+ System-HRP Labelled Polymer (Dako, Glostrup, Denmark) を 1:2000 に希釈して用い、室温で 1 時間インキュベートした。メンブレンを 0.1% Tween 20 入り PBS で洗浄し、Liminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA) と室温で 5 分間反応させた後、ImageQuant LAS 4000 (GE ヘルスケアジャパン、東京) により撮影した。撮影した画像は、バンドの発光強度を画像解析ソフトである ImageJ により測定しタンパク質の発現を定量した。LHR の発現量を β -actin の発現量により補正した、相対発現量により比較を行った。

(6) 血清中 E2 濃度測定

田谷らの方法 [田谷ら、1985] に従い、23 日齢の血清中 E2 濃度をラジオイムノアッセイ (RIA) により測定した。RIA の一次抗体には G. D. Niswender 博士 (Colorado State University) から供与された抗 E2 血清 (GDN#244) を用いた。また、標識ホルモンには 125I 標識 E2 (GE ヘルスケアジャパン、東京)、二次抗体には抗ヒツジガンマグロブリンロバ血清 (AB200K) をそれぞれ用いた。1、5、7、10 日齢ならびに 14 日齢からは 1 週間毎に個別体重を測定し、剖検日にも体重を測定した。

7. 統計解析

統計解析ソフト JMP9 (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。すなわち、性周期の型は χ^2 二乗検定を行った。また、二群間の解析は、F 検定を行い、分散の一様性を確認して Student の t 検定を実施した。その他は、まず、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnnett の多重比較検定を用いて、対照群と各投与群との間で有意差検定を行った。有意水準は 5% とした。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

(倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

1. 反復経口投与による遅発影響の閾値探索

発育および身体的発達に投与の影響は認められなかった (図 2、3、表 1)。その他の成績は以下に示す。

(1) 性周期 (図 4、5)

0.08 µg/kg 体重/日群では 12~25 週齢まで発情周期が不規則な変化を示したが、本研究で連続発情を示す個体はなかった。

発情前期および発情期、発情後期および休止期の日数の割合においては EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。また、性周期の平均回帰回数においても EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。

(2) 器官重量 (表 3)

0.016 µg/kg 体重/日群では、卵巢重量が対照群と比較し有意 ($P<0.05$) な高値を示したが、用量に依存した変化ではなかった。子宮および下垂体重量については対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

(3) 卵巢の組織学的観察結果 (図 6、7)

卵巢における黄体および嚢胞状卵胞の有無を観察した結果、黄体保有率は対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。一方、嚢胞状卵胞が認められた動物の割合は 0.08 µg/kg 体重/日群で有意に増加した。

2. 幼若雌ラットを用いた EE の経口投与による子宮肥大試験 (図 8~10)

体重および一般状態に投与の影響は認められなかった。

体重増加に投与の影響は認められなかった (図 8)。子宮重量は、2 µg/kg 体重/日群では、対照群との間に有意差 ($P<0.01$) が認められたが、0.08 µg/kg 体重/日以下の投与群では対照群との間に有意差は認められなかった (図 9)。

卵巢重量は 2 µg/kg 体重/日群の値のみが対照群と比較して有意 ($P<0.01$) な低値を示した (図 10)。

3. 新生児期エチニルエストラジオール曝露が幼若期卵巢における卵胞発育に及ぼす影響

発育および身体的発達に投与の影響は認められなかった (図 11、表 4)。その他の成績を以下に示す。

(1) 23 日齢における器官重量 (図 12)

EE 2 µg/kg 体重/日群では卵巢が対照群と比較し肉眼で確認できるほどに小さく、卵巢重量 ($P<0.01$) および子宮重量 ($P<0.05$) は対照群と比較し有意な低下を示した。0.4 µg/kg 体重/日群では卵巢重量に有意差はみられなかったが、低値の傾向が認められた。子宮重量については 1 例に 40.4 mg という高値を示す個体が認められたため、平均重量が対照群と同等のレベルとなったが、この 1 例を除くと 23.63 ± 1.23 mg であり、有意差はみられなかったが対照群の 28.48 ± 2.32 mg と比較

し低下傾向が示された。下垂体重量については対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

(2) 発育卵胞数の計測結果 (図 13、14)

10 日齢の卵巢では early antral 以下の発育段階の卵胞しか認められなかったが、preantral ステージの卵胞数は対照群と EE 投与群との間で差は認められなかった。Early antral ステージの卵胞については、2 µg/kg 体重/日では対照群の 65 %程度、0.4 µg/kg 体重/日群では、対照群と 2 µg/kg 体重/日群の中間的な値となり、EE 投与群において減少傾向を示していたが、統計学的有意差はみられなかった (2 µg/kg 体重/日群、 $P=0.0662$) (図 13)。

23 日齢の卵巢では 2 µg/kg 体重/日群において antral ステージの卵胞数が対照群と比較して有意に減少した (t 検定、 $P<0.05$)。一方、preantral および early antral の発育段階の卵胞数に有意な変化はみられなかった。0.4 µg/kg 体重/日群では標本破損により 2 例のみの計測となったため統計解析は行わなかったが、各段階の卵胞数が低値の傾向を示した。用量相関性は antral ステージのみに認められた (図 14)。

(3) 卵巢における卵胞発育関連因子 mRNA の発現 (図 15、16)

10 日齢卵巢では、LHR mRNA 発現が用量依存的な低下傾向を示し、2 µg/kg 体重/日群では対照群との間に有意差が認められた ($P<0.05$)。その他の測定項目に有意な変化はみられなかったが、FSHR および ERβ mRNA は 2 µg/kg 体重/日群で若干の増加傾向を示した (図 15)。

23 日齢卵巢においても対照群との間に有意差はみられなかったが、2 µg/kg 体重/日群において LHR mRNA 発現が低値の傾向を示した。その他の測定項目には対照群と EE 投与群間で有意差はみられなかった (図 16)。

(4) 卵巢におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA の発現 (図 17、18)

10 日齢の卵巢では、2 µg/kg 体重/日群で StAR mRNA の発現が有意に低下した ($P<0.05$)。また有意差はみられなかったが、同群において P450scc、3β-HSD ならびに aromatase mRNA 発現は低下の傾向を示した。0.4 µg/kg 体重/日群でも StAR および P450scc mRNA 発現に類似の傾向が認められたが、3β-HSD および aromatase mRNA 発現は対照群とほぼ同レベルであった (図 17)。

23 日齢卵巢では、2 µg/kg 体重/日群において P450scc および P450c17 の各 mRNA 発現が対照群と比較し有意な低値を示した ($P<0.01$ および

P<0.05)。また StAR および 3 β -HSD、Aromatase mRNA 発現についても有意差はなかったが、対照群に対する発現量はそれぞれ約 60、82、69 % と低下していた (図 18)。

(5) 卵巣における LH 受容体タンパク質の発現 (図 19)

23 日齢卵巣における β -Actin に対する LH 受容体タンパク質の相対発現量は 2 μ g/kg 体重/日群において低下した。

(6) 血清中 E2 濃度 (図 20)

23 日齢の血清中 E2 レベルについて、対照群と EE 投与群との間で有意な差はみられなかった。

D. 考察

雄ラットの視床下部では、精巣から分泌されたアンドロゲンが、脳に局在する芳香化酵素によって、エストロゲンに転換され、これが、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の大量放出(サージ)を促す神経核の退行を誘導することにより、GnRH のパルス状分泌のみを有する雄型の視床下部へと分化させると考えられている。このような性分化の時期はラットでは 5 日齢頃までに限定され、この時期は、視床下部性分化の臨界期といわれている。先行研究においてこの時期に EE を投与すると、用量の減少に伴い、性周期の回帰停止が遅延して認められることを報告した

[Shirota, et al., 2012]。本研究において、0.08 μ g/kg 体重/日の用量で反復経口投与すると、観察期間内では性周期に明瞭な影響は認められないものの、変動を繰り返し、卵巣に嚢胞状卵胞を有する動物の割合がこの用量で増加することが明らかになった。嚢胞状卵胞は先行研究でも認められている遅発影響のひとつであることから、EE の反復経口投与による遅発影響に関する閾値は

0.0016 μ g/kg 体重/日付近に存在すると考えられる。本研究で認められている遅発影響はエストロゲン活性に起因すると考えられるが、化学物質のエストロゲン活性を *in vivo* で検出する子宮肥大試験では、0.08 μ g/kg 体重/日の用量でも陽性反応を得ることができなかった。一方、先行研究において経口投与後の血中 EE 濃度は 2 μ g/kg 体重/日の用量でも成熟動物における血中エストロゲン濃度と同程度であったことから、臨界期におけるエストロゲン活性の僅かな上昇が不可逆的な遅発影響を及ぼすものと考えられる。

嚢胞状卵胞の形成は卵胞の性腺刺激ホルモンに対する反応性の低下および性腺刺激ホルモンの分泌異常などによるものと考えられ、これにはキ

スベプチンパルス制御部位に及ぼす影響が疑われる。そこで EE の用量を増加させると短期間のうちに性周期の回帰を停止することから、先行研究において初回排卵を遅延させることが明らかにされた用量の EE を用いて幼若期卵巣における卵胞発育に及ぼす影響を検討した。

本研究において EE を投与した生後 5 日までの時期は、ラットあるいはマウスでは脳の性分化における臨界期であるとともに、卵巣で原始卵胞が形成される時期でもある。この時期のエストロジェンあるいはゲニステイン投与はマウスにおいて原始卵胞形成を阻害し preantral 以前の卵胞発育を抑制することが報告されている[Chen et al., 2007]。Preantral ステージ以前の卵胞発育は性腺刺激ホルモン非依存性であり、チロシンキナーゼ受容体である c-Kit およびそのリガンドである kit ligand、GDF-9、AMH などの成長因子がパラクラインに作用することにより発育を進行させていると考えられている[Huang et al., 1993; Yoshida et al., 1997; Vitt et al., 2000; McGee et al., 2001]。本研究において preantral ステージ卵胞数は 10 日齢および 23 日齢のいずれにおいても対照群と EE 投与群との間に顕著な差はみられず新生児期の低用量 EE 投与は幼若期卵巣における preantral ステージ以前の卵胞発育には影響を及ぼさないと考えられた。

一方、発育段階が進んだ early antral ステージの卵胞数は、2.0 μ g/kg 体重/日群の 10 日齢卵巣では対照群との間に有意差はなかったが減少の傾向が認められ、23 日齢ではさらに発育が進んだ antral ステージの卵胞数が対照群と比較して有意に減少したことから、新生児期 EE 投与は early antral ステージ以降の卵胞発育を抑制することが示された。23 日齢の 2.0 μ g/kg 体重/日群でみられた卵巣重量の低下は、胞状卵胞への発育抑制を反映した結果であると考えられる。新生児期に始まる卵胞発育は、日齢を追ってより発育が進行することから、2.0 μ g/kg 体重/日群で 10 日齢に認められた early antral ステージの卵胞数減少が、23 日齢における antral ステージの卵胞数減少へとつながったものと推測される。このように、卵胞発育が抑制され、より後期の発育ステージにある卵胞数が減少し排卵可能な状態まで発育する卵胞数も減少することが初回排卵時の排卵不全および排卵数減少をもたらしていると考えられた。0.4 μ g/kg 体重/日群の卵巣でも有意ではないが 10 日齢の early antral および 23 日齢での antral の各発育ステージ卵胞数に若干の低下がみられ、23 日齢では

preantral および early antral ステージの卵胞数が低値の傾向を示した。サンプル数の不足により統計学的解析は行わなかったが、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日群では 10 日齢に認められる early antral ステージ卵胞数の減少が、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日群ではより遅れて 23 日齢で認められた可能性が推測される。今後この点についてはサンプル数を増やしての追究が必要ではあるが、この仮説が証明されれば遅発影響の用量依存的な発現時期の差を発生させるメカニズムを明らかにするための重要な知見になると思われる。

Preantral ステージ以降の卵胞発育は性腺刺激ホルモン依存的に進行する。下垂体から分泌される LH は preantral ステージにある卵胞の発育を促進させ、early antral ステージへの移行を促す[Wu et al., 2000; Orisaka et al., 2013]。さらに LH は卵胞でのステロイドホルモン合成を促進させており、莢膜細胞において生成されるアンドロジェンの卵胞発育への関与[Murray et al., 1998]、およびアンドロジェンを基質として顆粒層細胞で生成される E2 による卵胞の発育促進が知られている[Richards, 1975]。Real-time PCR による mRNA 定量解析の結果、新生児期 EE 投与により LHR mRNA 発現が 10 日齢で有意に低下し、23 日齢でも低下の傾向が認められたことから、EE 投与により LHR の発現が低下した可能性が考えられる。また、real-time PCR の結果では LHR mRNA 発現が低下したが、これは LHR が主に発現する莢膜細胞だけではなく、幼若期において発現が認められる顆粒層細胞での変化も反映したものであると考えられる。Real-time PCR で LHR mRNA 発現の低下が示されたことから、新生児期 EE 投与雌ラットでは LHR の発現低下を介した LH による卵胞発育刺激の減弱が起きることで、early antral ステージ移行の卵胞発育が抑制されている可能性が示唆された。また、この変化は卵巣が LH に対する感受性を獲得する時期である[Sokka et al., 1996]、10 日齢という早期において既に認められることが示された。

ステロイドホルモンの合成に関しては、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日群において 10 日齢卵巣での StAR mRNA 発現、および 23 日齢での P450scc ならびに P450c17 mRNA 発現が有意に低下し、その他のステロイドホルモン合成に関連した因子をコードする mRNA についても発現低下の傾向がみられた。特に 10 日齢での StAR および P450scc mRNA 発現については 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重/日群でも対照群と比較し若干の低下を示し、新生児期 EE 投

与による用量依存的な低下傾向があると考えられた。過去の研究では、新生児期 EE 投与による幼若期卵巣での StAR および P450scc mRNA 発現の低下[Ikeda et al., 2001]、および新生児期 DES 投与による StAR ならびに P450scc mRNA 発現の低下[Nagai et al., 2003]が報告されており、今回の結果はこれらの既報と同様の結果を示していた。これらのステロイドホルモン合成関連因子 mRNA の発現に低下がみられたことから、卵巣でのステロイドホルモン合成における最終産物である E2 の分泌低下が疑われた。EE 投与群においては E2 の主要な標的器官である子宮の重量が 23 日齢において低下していたこともこの仮説と一致する結果であった。そこで RIA により 23 日齢の血清中 E2 濃度を測定したが、EE 投与群の E2 濃度に低下はみられず新生児期 EE 投与は循環血中の E2 レベルには影響を及ぼさないと考えられた。よって、新生児期 EE 投与はステロイドホルモン合成関連因子の発現を mRNA レベルで低下させるものの、循環血中の E2 レベルには影響を及ぼさなかった。EE 投与群では E2 を分泌する胞状卵胞への発育が抑制され、血中 E2 濃度とは一致しない結果となった。E2 は循環血中へと放出されるだけでなく、卵巣内でも顆粒層細胞の増殖を促し、卵胞を発育させるはたらきをもつことが知られている[Goldenberg et al., 1972; Richards, 1975]。本研究では卵巣内での E2 レベルについて検討は行っていないが、ステロイドホルモン合成系の mRNA 発現低下を反映した卵巣内 E2 レベルの低下が 10 および 23 日齢における発育卵胞数の減少に関与している可能性が考えられる。EE 投与群において子宮重量が低下した原因については E2 に対する子宮の感受性低下が考えられる。過去の研究において新生児期に BPA もしくは DES 曝露を受けた雌ラットにおける成熟後の子宮のステロイドホルモンに対する感受性低下が報告されている[Varayoud et al., 2008]。新生児期 EE 投与雌ラット卵巣における E2 産生に関しては、ステロイドホルモン合成関連因子のタンパク質レベルでの発現解析およびそれぞれの酵素活性についての解析、卵巣抽出物の E2 濃度測定、子宮での ER 発現解析といった更なる検討が今後必要であると考えられる。

発育卵胞の顆粒層細胞で産生されるペプチドホルモンであるインヒビンは下垂体へとフィードバックし、FSH 分泌を抑制することで卵胞発育の調節を行っている。インヒビン欠損マウスにおいては性腺刺激ホルモン依存的な卵胞発育の抑