

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による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部
キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

研究分担研究課題：遅発影響の発現機序検索。特に遅発影響をもたらす視床下部の制御部位の優位性に関する内分泌学の全般に関わるアプローチ-エストロゲンの新生子期曝露による雌ラットの卵細胞制御遺伝子発現に対する影響-

研究分担者：渡辺 元 所属 東京農工大学大学院農学研究院動物生命科学部門
研究協力者：臼田 賢人 所属 岐阜大学大学院連合獣医学研究科
張 浩林 所属 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

研究要旨

胎子期および新生子期に受けた内分泌かく乱物質による影響は、不可逆的であり一生影響が残るものがある。過去の研究では、雌ラットの出生後 24 時間以内に EE を投与すると生殖機能の早期停止と性成熟後の原始卵胞の減少が認められた。新生子期 EE 曝露の卵巣にける影響の原因遺伝子を探るためにマイクロアレイ解析を行った。その結果、アポトーシス促進因子のひとつである Hrk の mRNA が生後第 1 日で減少していた。マイクロアレイ解析の結果を確認するために、生後 24 時間以内に EE あるいはゴマ油を投与し、生後 1, 3, 7, 14, 21 日齢に卵巣を採取してアポトーシス関連遺伝子量をリアルタイム PCR で定量した。また、免疫組織化学的染色により、Hrk タンパク質が生後 1 日の卵巣の卵細胞に検出された。卵巣におけるアポトーシスを解析するために、TUNEL 染色を行ったところ、生後 1 日の卵巣で、EE 処置群より対照群の方がより強い染色性を示した。さらに、卵巣の卵胞数を解析した結果、EE 投与群では生後 8 日の原始卵胞数が減少していた。EE の卵巣に対する直接作用を確認するため、生後 0 日のラットから卵巣を採取し、EE 添加あるいは無添加で 1 日間培養し、アポトーシス関連因子の遺伝子発現を解析した。その結果、EE 添加群で Hrk 遺伝子発現が減少していた。さらに、Hrk をノックダウンした卵巣で、TUNEL で染色された卵細胞が減少した。以上を合わせて考えると、EE が新生子の卵巣に直接作用し、アポトーシスを抑制し、Hrk の発現抑制を介して、原始卵胞の形成を障害したものと考えられた。

A. 研究目的

雌の生殖可能期間は卵巣における卵胞形成と卵胞発育によって決定される (Hirshfield, 1994)。形成された原始卵胞の数がおおむね将来排卵される卵胞の数を決定するので雌の生殖能力を左右する。一般的にラットでは原始卵胞が生後 1 週間に卵巣で形成される。卵巣内で被嚢生殖細胞が分散する際には卵細胞のアポトーシスが伴い、生き残った卵細胞が顆粒層細胞の前駆細胞によって囲まれ原始卵胞を形成する。扁平状の顆粒細胞が立方状になり、一次卵胞となる。単層の顆粒層細胞が分裂増殖し、多層になり二次卵胞となる。卵胞

はさらに発育し、成熟卵胞となり、排卵し、黄体となっていく (Skinner, 2005; Edson et al, 2009)。しかしながら、卵胞の形成と発育の過程は環境中の化学物質によって影響を受ける。

種々の内分泌かく乱物質 (EDCs) が環境中に認められ、多くの生物の発育、成長、代謝、生殖などの生理機能に有害な影響を与える可能性がある (Kavlock et al., 1996; Safe, 2000; Hotchkiss et al., 2008; Casals-Casas & Desvergne, 2011; Meeker, 2012; Kumar & Holt, 2014)。胎子期ならびに新生子期に内分泌かく乱物質に曝露されるのは大変危険である。なぜならその時期には内因性および外因性の化学物質に対

して感受性の高い臨界期が存在するからである (Ben-Shlomo & Kuh, 2002)。この臨界期に生じる毒性影響には不可逆的で一生残存するものがある (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009)。環境中には多くの人工化学物質がある。合成エストロゲンのひとつである 17 α -ethynyl estradiol (EE) は、女性の経口避妊薬に使用されている。EE は河川などの水にも検出され、水棲生物の生殖かく乱を起こしている (Lai *et al.*, 2002; Pedersen *et al.*, 2005; Combalbert & Hernandez-Raquet, 2010)。さらに、植物にも吸収・蓄積される可能性があり、陸上生物の食物連鎖にも水を介して蓄積される可能性がある (Karnjanapiboonwong *et al.*, 2011)。過去の報告では新生子期に EE に曝露すると、成熟後に影響が現れるいわゆる delayed effect (晩発影響/遅延影響) が見られたことを示した (Sawaki *et al.*, 2003; Mathews *et al.*, 2009; Shiorta *et al.*, 2012; Mandrup *et al.*, 2013; Takahashi *et al.*, 2013)。野澤等は早期の発情周期の乱れや生殖可能期間の短縮を報告している (Nozawa *et al.*, 2014; Usuda *et al.*, 2014)。しかしながら雌の生殖機能における新生子期 EE 投与の晩発影響のメカニズムは未だ不明な部分が多い。

本研究では、EE 投与晩発影響のメカニズムを解明するために、EE 投与ラットの卵巣で原因遺伝子の網羅的解析をマイクロアレイ法を用いて行った。Bcl2 ファミリーに属しアポトーシスに関連する遺伝子 Hrk に注目した。発育途上のラットの卵巣における Hrk 遺伝子発現と EE 投与の関係を、EE を投与したラットで解析するとともに、器官培養下で EE に曝露された卵巣を用いて解析した。さらに、卵巣にける Hrk の役割を明らかにするために、ラット新生子卵巣の器官培養下で Hrk をノックダウンして、卵細胞のアポトーシスを解析した。

B. 材料と方法

実験動物

雌雄の成熟 Wistar-Imamichi ラット (動物繁殖研究所、茨城) を使用し、 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、14 時間明期 (05:00 から 19:00) 10 時間暗期で飼育した。繁殖用ラット固形飼料 (MR プリナー、日本農産工業) と水は自由摂取とした。

膣スミアの観察より発情周期を観察し、交配、出産させた新生子を実験に用いた。全ての実験は東京農工大学動物実験委員会の審査を経て行われた (23-1)。

実験計画

In vivo 実験: 雌新生子を以下の 3 群に分けた。1) 対照群: 溶媒として用いたゴマ油を投与、2) EE 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群、3) 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群。出生後 24 時間以内に頸部皮下に投与した。200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したラットの卵巣を PND1、PND3、PND7、PND14、PND21 に採取した。2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したラットの卵巣は PND8 に組織学的解析のために採取した。

In vitro 実験: EE 投与による短期的影響を解析するために、PND1 に卵巣を採取し、 -80°C で保存し、マイクロアレイ解析を行った (各群 $n=5$)。さらに PND0 の卵巣を採取し、器官培養下で種々の EE 濃度に曝露した (low: 1 ng/ml, middle: 10 ng/ml and high dose: 100 ng/ml)。基礎培地である DMEM には ITS supplement と antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を加えた。24 時間の培養後、卵巣を液体窒素で速やかに凍結し、 -80°C で保存後 real time PCR で解析した ($n=5$)。

マイクロアレイ法

RNA を各処置群の卵巣から抽出しマイクロアレイ解析を行った。

組織学的解析

卵巣を 4% パラフォルムアルデヒド PBS 溶液で固定し、定法によりパラフィン包埋後 6 μm の切片を作成してヘマトキシリン・エオジン染色を行った。PND8 の卵巣の連続切片を作成し、2 枚おきの切片について卵胞のタイプ別 (被嚢生殖細胞、原始卵胞と一次卵胞) に計数した (1 卵巣あたり約 50 枚、各群 3 例)。

免疫組織学的解析

卵巣の切片を 10% 正常ヤギ血清で処理し、被特異結合を抑制した。その後各切片を 1 次抗体 anti-Hrk (Thermo Scientific, Prod #PA1-86773) を用いて一晩 4°C で反応させた。その後 rabbit VECTASTAIN ABC kit (Vector lab., Burlingame, CA) を用いて、ビオチンを結合させた 2 次抗体と反応させ、アビジンを結合したペルオキシダーゼを結合させた後に、diaminobenzidine (Sigma) を用いて可視化した。

最後にヘマトキシリンにより核を対比染色した。対照切片は正常ウサギ IgG 溶液(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)によって処置した。蛍光画像を蛍光顕微鏡 BX-51 (Keyence, Osaka, Japan)で撮影し、解析した。

TUNEL 染色

アポトーシスを示す卵細胞を TUNEL 法によって染色して、可視化した。ApopTag (Millipore, Darmstadt, Germany)をキット添付説明書どおりに使用し、連続切片の 2 枚おきに観察した。

qRT-PCR 解析

総 RNA を卵巣から TRIzol Reagent (Invitrogen Co., CA, USA) を用いて抽出した。PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて、cDNA を作成した。qRT-PCR 解析用のプライマーを Primer 3 program を用いて作成した(Table 1)。PCR反応は、10 μ l の試料に SYBR-Green I を含む、Ex TaqR Hot Start Version (Takara Bio) を加え、chrome4 Real-Time PCR System (Bio-Rad, CA)を用いて以下の条件で行った: 95 $^{\circ}$ C、30 秒、PCR反応を 5 秒間 95 $^{\circ}$ C で 40 サイクル、60 $^{\circ}$ C で 30 秒、その後分離分泌行程。目的の遺伝子発現量は gamma-tubulin mRNA の量に対して、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method を用いて表した。

プラスミド設計とウイルス感染

以下の様に shHrk のレトロウイルス発現計系を構築した:

sense oligo,

5'-TGATTCAAGAGCCAAGAAATTTCAAGA
GAATTTCTTGGCTCTTGAATCTTTTTTC-3';

antisense oligos,

5'-TCGAGAAAAAAGATTCAAGAGCCAAGA
AATTCTCTTGAATTTCTTGGCTCTTGAATC
A-3'.

annealing oligo を plasmid pLetiLox 3.7 に組みこんだ。レンチウイルスとレトロウイルスの発現系を含むそれぞれのプラスミドを、株化細胞である 293T 細胞に Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて、共発現させた。ウイルスを含む上清を感染 48 時間後に回収し、ウイルス感染のため、-80 $^{\circ}$ C で保存した。

新生子の卵巣を採取し器官培養した培地に、ウイルスを含む培養上清を 1 日添加した。その後、卵巣を回収し TUNEL 染色と real-time

PCR で解析した。

統計解析

統計解析には Prism 5 (Graphpad Software, Inc., CA, USA)を用いて、Student's t-test、あるいは One-way ANOVA に加え Turkey's multiple range test を行った。p<0.05 を持って有意差ありとした。

C. 結果

卵巣における EE による Hrk 発現に対する影響

新生子期に EE を投与されたラットの卵巣における影響の責任遺伝子を明らかにするために、生後 1 日の卵巣をマイクロアレイで解析した。Table 2 に発現が増加あるいは減少した遺伝子の上位 5 番までを示した。アポトーシスに関連する遺伝子 Hrk が対照群に比べ有意に減少していた。

EE 処置群の卵巣に見られた原始卵胞の減少

生後 8 日目卵巣の組織学的解析の結果を Fig. 2A に示した。顆粒細胞が立方上皮型を示す卵胞を一次卵胞、扁平上皮型の場合を原始卵胞、顆粒細胞に囲まれていない卵胞を前原始卵胞とした。それぞれの種類の総卵胞数を数えた結果、EE 処置群の卵巣で原始卵胞の数が対照群に比べわずかに減少していた。

Hrk 遺伝子の卵細胞における発現

卵巣における免疫組織化学染色による Hrk タンパク質の発現を Fig. 3 に示した。EE 投与群では、Hrk タンパク質が PND1 卵巣の卵細胞において対照群に比べ減少していた。

EE 直接曝露による Hrk 遺伝子発現の抑制

マイクロアレイ解析の結果を確認するため、real time PCR を行った。Hrk を含む Bcl2 遺伝子群の発現を解析した。興味深いことに Hrk 遺伝子発現が EE 処置生後 1 日の卵巣で有意に減少していた (Fig.4A)。

real time PCR で EE 添加培地で培養した卵巣を解析したところ、Hrk 遺伝子発現が対照群に比べ in vivo 実験と同様に有意に減少していた。(Fig. 4B).

EE 曝露卵巣におけるアポトーシスを示す卵

細胞の減少

TUNEL 染色によって染まる卵細胞は対照群に対して EE 処置群で減少した。さらに生後 1 日の卵巣で EE 処置群の卵巣では TUNEL 染色の強度が減弱していた(Fig. 5)。

Hrk 遺伝子をノックダウンした卵巣における卵細胞アポトーシスの減少

Hrk 遺伝子がノックダウンされているかを real time PCR で確認した。Hrk 遺伝子の発現は 70%以上減少していた。TUNEL 染色を行った結果、対照群に比べ明らかに EE 処置群でアポトーシスを示す卵細胞が減少した。

他の内分泌かく乱物質による Hrk 遺伝子発現に対する作用

Hrk 遺伝子発現低下が、内分泌かく乱物質による新生子期の卵巣影響に共通して見られる影響か否かを検討するために新生子の卵巣を、10nM 17 β -estradiol (E2) あるいは 10 nm DES とともに 1 日培養した卵巣における Hrk 遺伝子発現を real-time PCR で解析した (Fig. 7)。その結果、EE 同様に E2 ならびに DES 曝露によっても Hrk 遺伝子発現が有意に低下した。

D. 考察

本研究の結果、新生子期の EE 曝露が卵巣において卵細胞のアポトーシスを抑制することで卵胞形成を傷害することが明らかとなった。卵細胞のアポトーシス減少はアポトーシス関連遺伝子である Hrk 遺伝子の発現を新生子期の卵細胞で抑制することによることが示唆された。本研究は内分泌かく乱物質の卵巣における直接作用の情報経路を示している。

卵巣において被嚢生殖細胞が崩壊して原始卵胞を形成する過程で卵細胞のアポトーシスが起きる。この過程は齧歯類の卵巣において、生後に起きる卵胞形成に重要である。しかしながら、この時期に内分泌かく乱物質に曝露されると原始卵胞の正常な形成過程が傷害される。本研究において、出生直後に EE を投与されたラットの卵巣ではアポトーシスを示す卵細胞が減少した。この現象は、EE 処置されたラットだけで見られたのではない。合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES)も

C57BL/6J において卵細胞のアポトーシス減少を起こすことが報告されている(Kim et al., 2009)。estradiol monobenzoate (EB) を新生子期に投与された生後 5 日のマウスの卵巣で、卵細胞のアポトーシスの減少が報告されている(De Pol et al., 2001)。これらの報告は新生子期のエストロゲン曝露が卵巣発達の初期において、卵細胞のアポトーシスを抑制することを示している。さらに、本研究の結果は EE を投与されたラットの生後 8 日の卵巣における原始卵胞の減少が、卵細胞のアポトーシス減少により原始卵胞の形成を阻害した結果であることを示している。本研究の結果は、新生子期のエストロゲンあるいはゲニステインによる処理が、被嚢生殖細胞の崩壊を抑制し、原始乱歩の形成を阻害するという過去の研究と一致している(Kezele & Skinner, 2003; Chen et al., 2007; Chen et al., 2009)。

細胞外からの刺激を受けて、ミトコンドリアの Bcl2 群タンパク質のアポトーシスへの引き金が引かれる(Czabotar et al., 2014)。アポトーシス誘導タンパク質 Hrk (harakiri)は抗アポトーシスタンパク質 A1、Bcl-W や Bcl-XL と相互作用する(Doerflinger et al., 2015)。本研究で出生直後の卵巣で、Hrk 遺伝子発現の減少に伴い TUNEL 染色陽性の卵細胞が減少した。さらに、免疫組織学染色により Hrk タンパク質は卵細胞に局在していた。合わせて考えると、Hrk 遺伝子発現の減少により卵細胞のアポトーシスが減少したと考えられる。また、in vivo と in vitro 実験結果から EE が直接、ラットの卵巣で Hrk 遺伝子の発現を抑制し得ることを示している。Hrk の遺伝子発現調節が、EE 投与による卵細胞のアポトーシス減少の標的となっていたと考えられる。卵巣における Hrk 遺伝子発現に関する研究は、数少ないものの、Hrk 遺伝子発現は EE の標的遺伝子というだけでなく、内分泌かく乱物質である他の多環芳香属炭化水素も同様にマウス新生子の卵巣およびヒト胎児卵巣でも標的遺伝子となっている(Juriscicova et al., 2007; Fowler et al., 2014)。しかしながら EE による Hrk 遺伝子発現調節メカニズムは今後の研究課題である。

一般に、雌の生殖機能は視床下部、下垂体と卵巣の相互作用によって制御されている。内分泌かく乱物質の曝露は卵巣のみならず、

下垂体や視床下部にも影響を与えると考えられている(Dickerson & Gore, 2007)。本研究で卵巣へのEEの直接作用を解析するために、卵巣の器官培養系を用いた。その結果、EEの卵巣への間接作用ではなく、直接作用がHrk遺伝子発現の抑制を介していることが確認された。既に知られているように、エストロゲン様化合物により胎子期あるいは新生子期に曝露されると、障害が成熟後に現れてくる(Hotchkiss et al., 2008)。過去の報告では、新生子期ラットのEE曝露により成熟後の早期に発情周期が乱れ、PND90で原始卵胞の減少が見られている(Nozawa et al., 2014)。本実験の結果と合わせて考えると、新生子期にEEに曝露されたことにより、卵細胞のアポトーシス減少により原始卵胞形成障害が起きた結果、成熟後に卵巣機能が異常を示したのかもしれない。

E. 結論

新生子期のEE曝露が直接卵巣の卵細胞におけるHrk遺伝子発現抑制により卵細胞のアポトーシスを抑制したことを示した。卵細胞のアポトーシス減少と原始卵胞数が減少した結果、成熟後の性周期異常と卵巣の機能障害を引き起こしたのかもしれない。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17 α -Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, 93, 32, 2015.
- 2) Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. *Reprod Toxicol.* 57, 21-28, 2015.
- 3) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17 α -ethinylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.
- 4) Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol (EE)

disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats

(*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016年1月)

- 5) Zhang H, Taya K, Nogaoka K, Watanabe G. The hormone profiles in developing female rats after neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol (EE). (*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016年2月).

2. 学会発表

- 1) 白田賢人、野澤香織、永岡謙太郎、吉田緑、田谷一善、渡辺元エチニルエストロゲンの雌ラットへの新生期曝露による血中ホルモンおよび生殖関連遺伝子発現の変化(第28回日本下垂体研究会学術集会2013年8月7-9日、花巻、岩手)
- 2) Zhang H, Nagaoka K, Nozawa K, Usuda K, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats. The 107th SRD annual meeting (第107回日本繁殖生物学会大会、2014年8月20-24日、帯広)

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

References

- Ben-Shlomo, Y. & Kuh, D. (2002) A life course approach to chronic disease epidemiology: conceptual models, empirical challenges and interdisciplinary perspectives. *International journal of epidemiology*, 31, 285-293.
- Casals-Casas, C. & Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
- Chen, Y., Breen, K. & Pepling, M.E. (2009) Estrogen can signal through multiple pathways to regulate oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary. *The Journal of endocrinology*, 202, 407-417.
- Chen, Y., Jefferson, W.N., Newbold, R.R., Padilla-Banks, E. & Pepling, M.E. (2007) 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.
- Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G. (2010) Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied microbiology and*

biotechnology, 86, 1671-1692.

Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A. & Adams, J.M. (2014) Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15, 49-63.

De Pol, A., Benelli, A., Arletti, R., Cavazzuti, E., Sena, P., Vaccina, F. & Marzona, L. (2001) Influence of estrogens and oxytocin on germ cells death in the neonatal mammalian ovary. *Italian journal of anatomy and embryology = Archivio italiano di anatomia ed embriologia*, 106, 233-239.

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. & Gore, A.C. (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews*, 30, 293-342.

Dickerson, S.M. & Gore, A.C. (2007) Estrogenic environmental endocrine-disrupting chemical effects on reproductive neuroendocrine function and dysfunction across the life cycle. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 8, 143-159.

Doerflinger, M., Glab, J.A. & Puthalakath, H. (2015) BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *The FEBS journal*, 282, 1006-1016.

Edson, M.A., Nagaraja, A.K. & Matzuk, M.M. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30, 624-712.

Fowler, P.A., Childs, A.J., Courant, F., MacKenzie, A., Rhind, S.M., Antignac, J.P., Le Bizec, B., Filis, P., Evans, F., Flannigan, S., Maheshwari, A., Bhattacharya, S., Monteiro, A., Anderson, R.A. & O'Shaughnessy, P.J. (2014) In utero exposure to cigarette smoke dysregulates human fetal ovarian developmental signalling. *Human reproduction (Oxford, England)*, 29, 1471-1489.

Hirshfield, A.N. (1994) Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of reproduction*, 50, 421-428.

Hotchkiss, A.K., Rider, C.V., Blystone, C.R., Wilson, V.S., Hartig, P.C., Ankley, G.T., Foster, P.M., Gray, C.L. & Gray, L.E. (2008) Fifteen years after "Wingspread"--environmental endocrine disrupters and human and wildlife health: where we are today and where we need to go. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 105, 235-259.

Juriscova, A., Taniuchi, A., Li, H., Shang, Y., Antenos, M., Detmar, J., Xu, J., Matikainen, T., Benito Hernandez, A., Nunez, G. & Casper, R.F. (2007) Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *The Journal of clinical investigation*, 117, 3971-3978.

Karnjanapiboonwong, A., Chase, D.A., Canas, J.E., Jackson, W.A., Maul, J.D., Morse, A.N. & Anderson, T.A. (2011) Uptake of 17alpha-ethynylestradiol and triclosan in pinto bean, *Phaseolus vulgaris*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 74, 1336-1342.

Kavlock, R.J., Daston, G.P., DeRosa, C., Fenner-Crisp, P., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Moore, J., Rolland, R., Scott, G., Sheehan, D.M., Sinks, T. & Tilson, H.A. (1996) Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives*, 104, 715-740.

Kezele, P. & Skinner, M.K. (2003) Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, 144, 3329-3337.

Kim, H., Nakajima, T., Hayashi, S., Chambon, P., Watanabe, H., Iguchi, T. & Sato, T. (2009) Effects of diethylstilbestrol on programmed oocyte death and induction of polyovular follicles in neonatal mouse ovaries. *Biology of reproduction*, 81, 1002-1009.

Kumar, E. & Holt, W.V. (2014) Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Advances in experimental medicine and biology*, 753, 55-70.

Lai, K.M., Scrimshaw, M.D. & Lester, J.N. (2002) Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and environmental microbiology*, 68, 859-864.

Mandrup, K.R., Jacobsen, P.R., Isling, L.K., Axelstad, M., Dreisig, K., Hadrup, N., Vinggaard, A.M., Hass, U. & Boberg, J. (2013) Effects of perinatal ethinyl estradiol exposure in male and female Wistar rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 42, 180-191.

Mathews, E., Braden, T.D., Williams, C.S., Williams, J.W., Bolden-Tiller, O. & Goyal, H.O. (2009) Mal-development of the penis and loss of fertility in

- male rats treated neonatally with female contraceptive 17alpha-ethinyl estradiol: a dose-response study and a comparative study with a known estrogenic teratogen diethylstilbestrol. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 112, 331-343.
- Meeker, J.D. (2012) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166, 952-958.
- Nozawa, K., Nagaoka, K., Zhang, H., Usuda, K., Okazaki, S., Taya, K., Yoshida, M. & Watanabe, G. (2014) Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 46, 77-84.
- Patisaul, H.B. & Adewale, H.B. (2009) Long-Term Effects of Environmental Endocrine Disruptors on Reproductive Physiology and Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3.
- Pedersen, J.A., Soliman, M. & Suffet, I.H. (2005) Human pharmaceuticals, hormones, and personal care product ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1625-1632.
- Safe, S.H. (2000) Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, 108, 487-493.
- Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T., Mitoma, H., Takakura, S., Sakamoto, S. & Yamasaki, K. (2003) In utero through lactational exposure to ethinyl estradiol induces cleft phallus and delayed ovarian dysfunction in the offspring. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 75, 402-411.
- Shiorta, M., Kawashima, J., Nakamura, T., Ogawa, Y., Kamiie, J., Yasuno, K., Shiota, K. & Yoshida, M. (2012) Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17alpha-ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *The Journal of toxicological sciences*, 37, 681-690.
- Skinner, M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human reproduction update*, 11, 461-471.
- Takahashi, M., Inoue, K., Morikawa, T., Matsuo, S., Hayashi, S., Tamura, K., Watanabe, G., Taya, K. & Yoshida, M. (2013) Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 40, 16-23.
- Usuda, K., Nagaoka, K., Nozawa, K., Zhang, H., Taya, K., Yoshida, M. & Watanabe, G. (2014) Neonatal exposure to 17alpha-ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 76, 1105-1110.

Table 1. 定量的real time PCR に用いたプライマー。

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Hrk	tgtgaagctctggcacaatc	ggatggatgcacacacact
Bcl2	cgactttgcagagatgtcca	catccacagagcgatgttgt
Bax	cgagctgatcagaacctca	ctcagcccatcttcttccag
Bcl2l1	accggagagcattcagtgat	tgcaatccgactcaccaata
Bcl2l2	gctgaggcagaaggttatg	tggaaaagttcgtcggaaac
Mcl1	gggctggcttgcatatcta	gggagcacttttcccatgta
Bak	tctcagaggggctgacagat	ccgaccttcaaagtagcag
Bid	ggctttctccgaaacaatga	tggcaatgttgtggatgact
Bim	gcagtctcaggaggaacctg	agtgccttctccagaccaga
Puma	aaagccttctcaaccctagt	aatgaatgccagtggtcaca
Bmf	ggtacagatcgccagaagc	gcgatctatccgacaagagc
Bad	gcttagcccttttcgaggac	gatcccaccaggactggata
Bik	at t t c a t g a g g t g c c t g g a g	t t t t c c c t g a g g t t g g t g a g
Bok	gaaggtggctaacgcagaag	ctcctcatccacaggctctc
Beta-Actin	agccatgtacgttagccatcc	ctctcagctgtgggtggtgaa

Table 2. EE処置ラットの卵巣で、マイクロアレイ法により検出された発現上昇遺伝子と低下遺伝子各5つずつ。

Up-regulated genes	Down-regulated genes
Calb3	Sepp1
Mmp7	Ca3
Tnfip6	Hrk
Itmap1	Fxyd7
Dhdh	Vdr

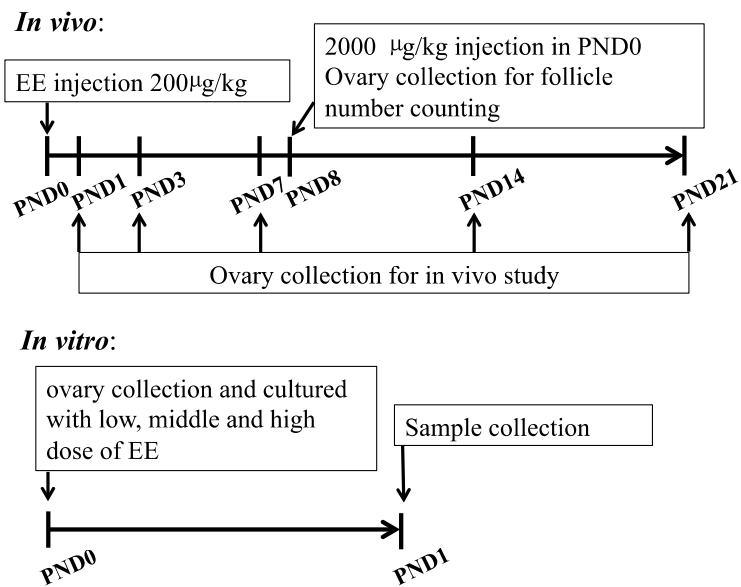


Fig. 1. in vivo および in vitro の実験計画。PND, postnatal day : 生後日齢。

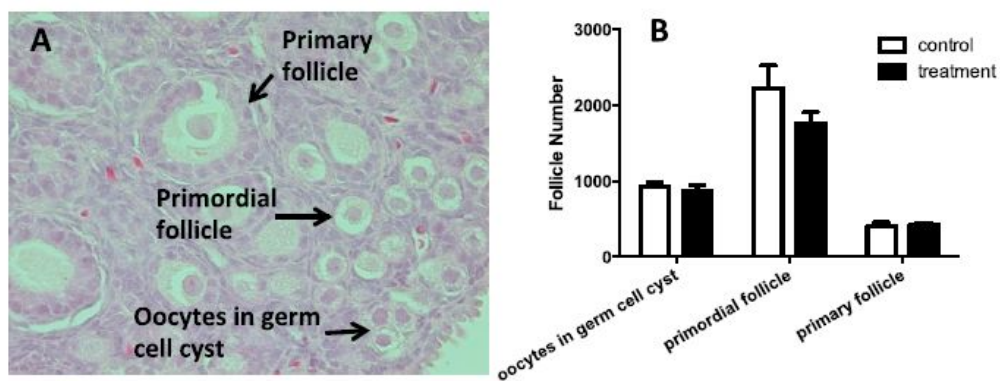


Fig. 2. (A) 生後 8 日のラット卵巢の組織象。(B) 生後 8 日のラット卵巢における種々の卵胞の総数。それぞれの卵胞は (A) の写真に示してある。

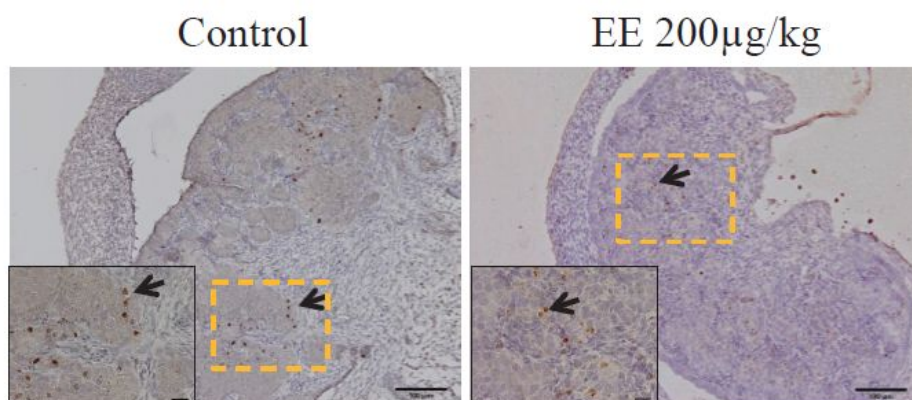


Fig. 3. 生後1日の対照群およびEE処置群 (200 μ g/kg) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。

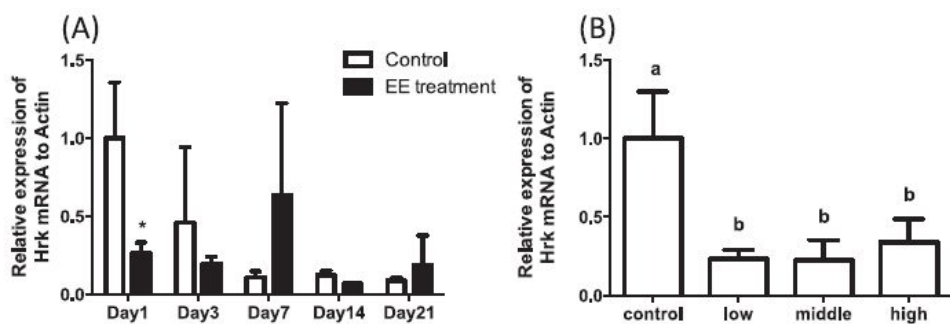


Fig. 4. EE処置群および対照群の *in vivo* 卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量 (A) と EE 添加 (low: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/ml)、あるいは非添加で新生子卵巣を培養したときの *Hrk* 遺伝子発現量 (B)。*は有意差有り ($P < 0.05$)。

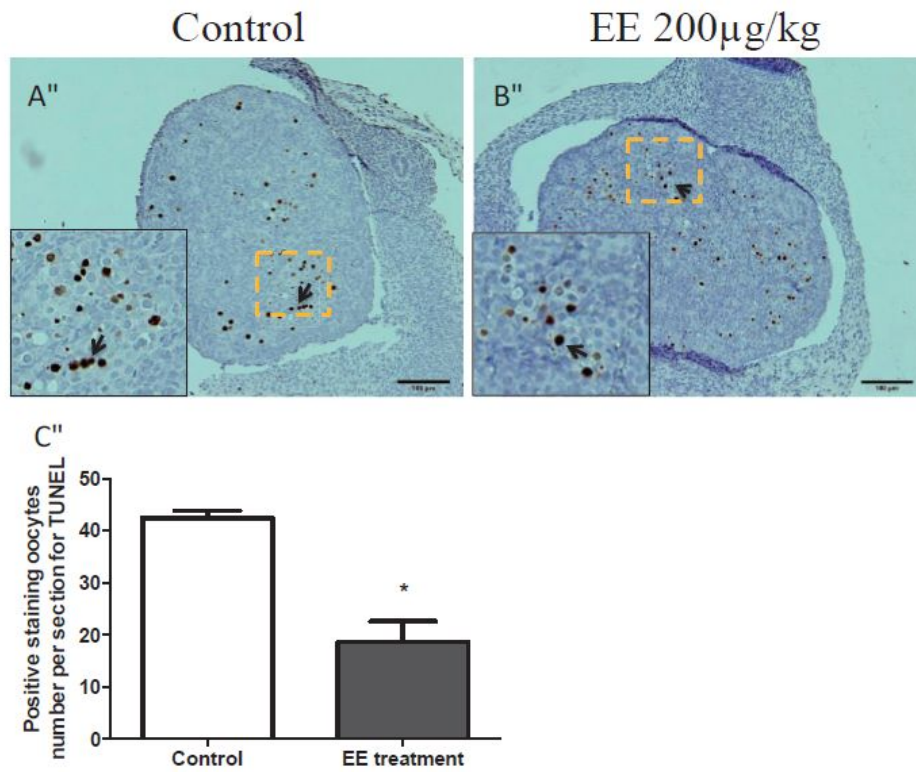


Fig. 5 生後1日の卵巣におけるTUNEL染色。対照群(A)とEE処置群(B)。(C)は生後1日の卵巣における対照群およびEE処置群の卵巣切片中のTUNEL染色陽性卵細胞数。*は有意差有り(P<0.05)。

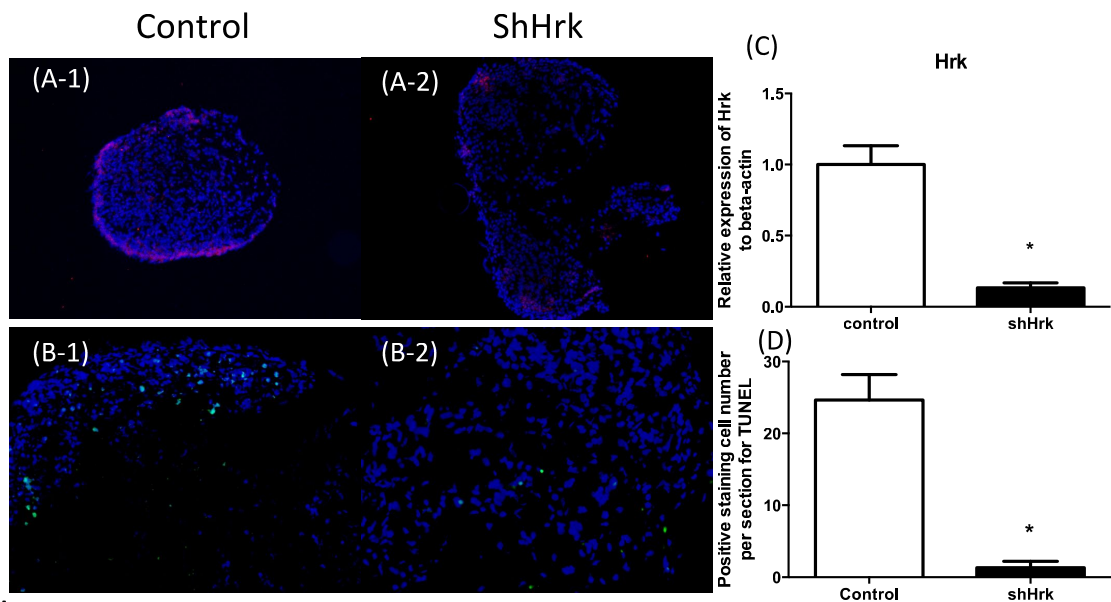


Figure 6. (A) Control (A-1) and *ShHrk* (A-2) ovaries were stained with anti-Hrk antibody (red) and DAPI (blue). (B) TUNEL (B-1) and anti-Hrk antibody (B-2) were stained with anti-Hrk antibody (red) and DAPI (blue). (C) real time PCRによる、対照群と *Hrk* 遺伝子ノックダウン群 (*ShHrk*) の卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量。 (D) 対照群と *Hrk* 遺伝子ノックダウン群 (*ShHrk*) の卵巣の切片中平均 TUNEL 陽性細胞数。* は有意差有り ($P < 0.05$)

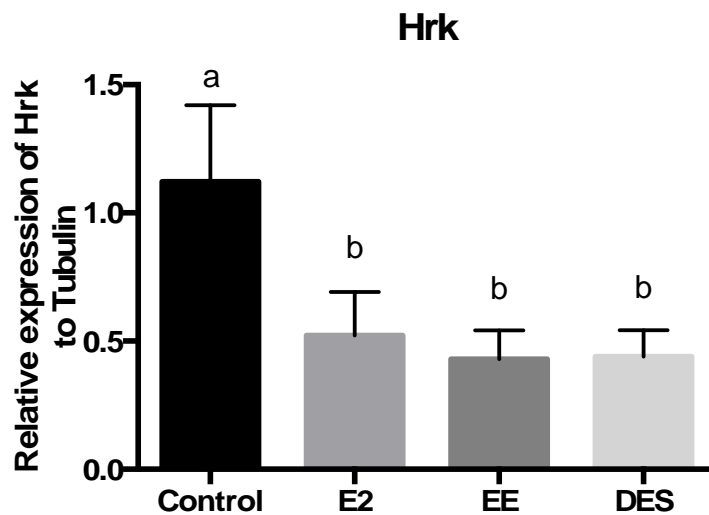


Figure 7. 新生子の卵巣の器官培養系における *Hrk* 遺伝子発現に対する影響。10nM 17 β -estradiol (E2)、EE(100ng/ml)、あるいは 10nm DES とともに 1日培養した卵巣における *Hrk* 遺伝子発現を real-time PCR で解析した。