

表6 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの8-9週齢における性周期の型および10週齢からの交配成績

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Estrous cycle		
Regular cycle	6	5
Irregular cycle	1	1
Fertility		
Copulated	7	6
Pregnant	7	6

^a corn oil 10 mL/kg/day

表7 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの妊娠期間中における体重推移 (平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Body weight (g)		
Gestational day 0	289.6 ± 4.9	267.0 ± 6.4*
day 7	334.1 ± 5.5	312.0 ± 5.1*
day 14	369.7 ± 4.8	349.7 ± 4.7*
day 20	457.0 ± 4.7	421.8 ± 6.3*
Body weight gain (g)		
Gestational day 0-7	44.6 ± 3.5	45.0 ± 3.0
day 7-14	35.6 ± 2.6	37.7 ± 2.3
day 14-20	87.3 ± 3.6	72.2 ± 2.3*

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

表8 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの帝王切開所見

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of corpus luteum	15.0 ± 0.6	13.8 ± 0.6
Number of implantation sites	14.7 ± 0.7	12.7 ± 2.0
Implantation index (%)	98.0 ± 1.9	92.0 ± 5.2
Pre-implantation loss	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.7
Number of live fetuses	13.4 ± 2.2	11.7 ± 1.8
Survival rate (%)	92.8 ± 6.7	92.9 ± 10.1
Post-implantation loss	1.3 ± 1.2	1.0 ± 1.4
Placental remnant	1.0 ± 0.3	1.0 ± 1.4
Dead fetus	0.3 ± 0.5	0

表9 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの妊娠末期胎児所見

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of males	6.4 \pm 1.5	5.7 \pm 1.4
Number of females	7.0 \pm 1.8	6.0 \pm 1.5
Sex ratio (male %)	52.1 \pm 3.5	51.4 \pm 4.0
Feral body weight (g)	3.6 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1*
External abnormality (edema)	0	1
Skeletal anomalies	0	0
Skeletal variations	2	2
Absence of the 13 th rib	0	1
Short 13 th rib	1	0
Lumbar rib		1
Variation in number of lumbar vertebrae	1	0
Frequency of fetuses with ossified bones (%)		
Right forelimb phalanx (V)	19.4 \pm 7.6	48.8 \pm 7.8*
Left forelimb phalanx (V)	17.4 \pm 6.4	39.8 \pm 8.8
Starnebra (II)	98.9 \pm 1.0	100 \pm 0
Starnebra (III)	98.9 \pm 1.0	100 \pm 0
Starnebra (IV)	96.7 \pm 3.1	98.5 \pm 1.4
Starnebra (V)	41.1 \pm 13.0	76.8 \pm 6.5
Starnebra (VI)	24.8 \pm 11.0	57.2 \pm 11.3
Number of ossified caudal and sacral vertebrae	7.69 \pm 0.24	8.37 \pm 0.09*

^a corn oil 10 mL/kg/day

* p<0.05

表 10 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
眼瞼開裂日齢（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	9	10	11
眼瞼開裂（日齢）	13.6 ± 0.5	13.5 ± 0.9	13.4 ± 0.7

表 11 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
13週齢における器官重量（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08	0.4
N	9	10	9
Pituitary (mg)	13.8 ± 1.1	17.1 ± 1.0	21.3 ± 3.6**
Ovaries (mg)	94.4 ± 18.6	98.3 ± 14.7	57.8 ± 6.1**
Uterus (mg)	525 ± 56	493 ± 19	441 ± 93**

^a corn oil 10 mL/kg/day

**p<0.01

表 12 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの
14週齢におけるパルス状 LH 分泌のパラメーター（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	3	3	3
Mean LH	6.72 ± 1.22	7.20 ± 2.06	4.91 ± 1.88
Basal LH	5.36 ± 1.12	5.56 ± 1.88	3.64 ± 1.77
Frequency	4.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0	3.3 ± 1.2
Amplitude	3.65 ± 0.28	5.35 ± 1.18*	4.16 ± 0.32

動物は10週齢で両側卵巣を摘出し、13週齢で装着した頸静脈カニューレから頻回採血した。

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

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 (H25-27 総合研究報告書)

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。平成 25 年から 27 年の 3 年間に於いて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と卵細胞制御遺伝子発現に対する影響について解析した。出生後 24 時間以内の雌ラットに EE を単回皮下投与するモデルを使用した。

I. 90 日齢において、発情前期 (午前および午後)、発情期、休止期の各発情周期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と、脳における生殖関連遺伝子の発現解析を行った。EE 投与群では対照群に比べて EE 投与量に応じたサージピーク値の低下がみられた。脳においては、LH サージに関与する前腹側脳室周囲核(AVPV/POA)のキスペプチンの mRNA 発現量が EE 投与群で投与量に応じて低下していた。性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)ニューロンおよび下垂体での LH mRNA 発現は対照群と EE 投与群で違いはみられなかった。EE の新生期曝露により、発情周期の乱れといった遅発性影響がみられる以前より、LH サージの低下および LH サージの誘起に関連するキスペプチンの遺伝子発現量の低下が確認されたことから、曝露後に脳内に移行した EE がキスペプチンの発現に直接関与する事が、遅発性影響に関与している可能性が示唆された。

II. 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。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 TUNEL 染色で比較した結果、生後 1 日の卵巣で EE 処置群で対照群より染色性が減弱していた。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て培養し、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て卵細胞の Hrk の発現抑制を介しアポトーシスを抑制し、原始卵胞の形成を障害したものと考えられた。

I. 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

I -A. 研究目的

内分泌かく乱物質 EDCs は人工合成あるいは天然の多様な化学物質を含んでおり、その

ほとんどがエストロゲン作用を示す(1)。エストロゲンは胎子期の発育過程で多様な器官の細胞機能を調節する。これらの化学物質がエストロゲン様作用を示すことから、これらの物質による感受期の曝露は胎子および新生子の発育を傷害し、生殖機能の内分泌および神経機構に重要な影響を与えることが知られている(4)。齧歯類では脳の性分化が胎子期末期から新生子期初期にかけて起こることが知られている(5)。雄では精巣で作られたアンドロゲンが血液脳関門を通過し、脳内の芳香化酵素によってエストラジオールに変換される(6)。雄ではこのエストラジオールが脳の正常な性分化に必要な不可欠である。雌では発育中の卵巣からエストラジオールが分泌されるものの、末梢血液中で α -fetoproteinと結合し、血液脳関門を通過できない。(7)。しかしながら人工のエストロゲン様化学物質は α -fetoproteinと結合しない。したがって、人工エストロゲン様化学物質が周生期に体内に入れば雌では正常な脳の性分化が影響される可能性が危惧される。近年キスペプチンが、視床下部・下垂体・性腺軸を刺激して、春機発動を誘起し、発情周期を調節していることが明らかとなってきた(8)。キスペプチンは主に視床下部の二つの核で発現している。前腹側脳室周囲核(AVPV)と弓状核(ARC)である(9)。AVPVにおけるキスペプチンニューロンの数は性的二型を示し、雄より雌の方が多く、ARCではそのような性差が見られない(10)。雌マウスでAVPVのキスペプチンニューロン数は生後増加し、春機発動期に成体のレベルに達する(11)。キスペプチンニューロン数の増加が卵巣からのエストラジオールによって調節されている。キスペプチンニューロンはエストロゲン受容体 α (ER α)を発現している。実際、キスペプチンニューロンがER α を発現しないようにした動物では春機発動に至らず、正常な発情周期を示さない(12)。キスペプチンはGタンパク共役受容体GPR54を介して作用する(8)。この受容体は視索前野(POA)と弓状核(ARC)に存在するGnRHニューロンに発現している(8,13)。POAにおいてキスペプチンが受容体に結合してGnRHサージを誘起した結果、LHサージを生じる(14)。一方、ARCの受容体に結合したキスペプチンはGnRHとLHのパル

ス状分泌に関わっている(13,15)。EDCsがキスペプチンニューロンに影響して生殖機能障害を起こしているとする報告がある(16,17)。しかしながらEDCsがキスペプチンニューロンに作用するかどうかは不明な部分が多い。過去の研究からEE(20 μ g/kg)を生後24時間以内に1回投与すると生後171-190日に異常発情周期を示すことが明らかにされている。新生子期のEE投与によるキスペプチンニューロンに与える変化を明らかにするために、まだ発情周期が乱れていない90日齢において、生殖ホルモンの変化、AVPV/POAとARCにおける遺伝子発現の変化を解析した。

I-B. 材料と方法

実験動物

成熟Wister-Imamichiラットを、14時間明期、10時間暗期の照明条件下(明期5時から19時)、室温25 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 10%で飼育した。餌にはMR-Breeder(Nosan Corporation, Yokohama, Japan)を用い、飲水とともに自由摂取とした。実験は東京農工大学動物実験委員会の承認のもと行った。

実験計画

Fig. I-1に実験計画の概要を示した。新生子を各母親あたり9頭(雌6頭、雄3頭)にし、雌子ラットに以下の処置を施した。

- 1) ゴマ油投与群(対照群)。
- 2) EEを20 μ g/kg投与群。
- 3) EEを200 μ g/kg投与群。

出生後24時間以内に背部皮下に投与した(各処置群16頭)。

膣が開口した後、毎日膣スメアを観察し、90日齢まで記録した。その後、発情休止期2日の11時(D)、発情前期の11時(PE11)と17時(PE17)、発情期の11時(E)に安楽殺し、血液と脳を採取した(各採取時点4例ずつ)。血液は遠心して(3000 rpm、15分、4 $^{\circ}$ C)血清を分離して、-20 $^{\circ}$ Cでホルモンの測定まで保存した。脳のAVPV/POAとARC、下垂体前葉を採取し、液体窒素で凍結後、-80 $^{\circ}$ CでRNAの抽出まで保存した。AVPV/POAとARCを採取するために、ラットの脳地図(Paxinos and Watson atlas(21))を参照して、brain punch set(inner diameter of 1.0mm; Stoeling Corporation., IL, USA(20))を用いて脳のスライスから切り出した。

ホルモン測定

血清中の LH、follicle stimulating hormone (FSH)、プロラクチン濃度をそれぞれのラジオイムノアッセイキットを用いて測定した(NIH, Bethesda, MD)。ヨード化ホルモンには rat LH-I-7、rat FSH-I-7、PRL-I-6 を使用し、第一抗体には anti-rat LH-S-10、anti-rat FSH-S-11、PRL-S-9 をそれぞれ用いた。測定値はそれぞれ NIDDK rat LH-RP-3、rat FSH-RP-2、rat PRL-RP3 で表した。アッセイ内変動とアッセイ間変動はそれぞれ、2.7 % と 22.08 % (LH)、7.1 % と 22.75 % (FSH)、2.46 % と 22.20 % (プロラクチン)であった。

インヒビンは (ir-) inhibin として rabbit antiserum against bovine inhibin (TNDH-1) と 125I-labeled 32-kDa bovine inhibin を用いて測定した。測定値は 32-kDa bovine inhibin として表示した。アッセイ内変動とアッセイ間変動は 4.77 % と 10.30 % であった。

エストラジオールとテストステロンは、125I で標識したステロイドを用い、2抗体法で測定した。エストラジオールの抗体には GDN #244 をテストステロンの抗体には GDN #250 を用いた。両抗体ともに Dr. G.D. Niswender (Animal

17 Reproduction and Biotechnology, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA)より供与していただいた。アッセイ内変動とアッセイ間変動は、エストラジオールで 5.47 % と 18.40 %、テストステロンで 2.89 % と 21.28 % であった。

定量的 real-time PCR

総 RNA を ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan)を用いて抽出した。相補的 DNA (cDNA) を PrimeScript reverse transcriptase (TaKaRa bio, Shiga, Japan) を用いて作製した。

Oligonucleotide primers は web-based Primer3 software を用いて作製した。

(Table 1) 全ての PCR は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa Bio) を用いて行い、それぞれの mRNA 値は GAPDH mRNA あるいは β -Actin mRNA に対する相対値として $2^{-\Delta\Delta CT}$ method を用いて算出した。

統計解析

データは平均値 \pm SEM で表し、分散分析後、他群間の有意差の解析には Graph Pad Prism5)

を用いた。有意さの水準として $p < 0.05$ を用いた。

I -C. 結果

繁殖の指標に対する新生子期 EE 投与の影響

Fig. I -2a に体重の変化を示した。全ての実験群が正常な発育を示した。群間に差が認められなかった。

春機発動期を示す膣の開口日齢を Fig. I -2b に示した。群間に差が認められなかった。

90 日齢における正常発情周期を示す動物の割合を Fig. I -2c に示した。最低 4 日間同様の膣スメア像を示した場合を異常とした。90 日齢で群間に差が認められなかった。

90 日齢における発情周期中におけるホルモン変化に対する新生子期 EE 投与の影響

LH、FSH、inhibin、prolactin、estradiol、と testosterone の変化を Fig. I -3 に示した。LH サージが PE17 認められ、ピーク値の減少が投与された EE の用量に応じて見られた。他のホルモンでは、群間に差が見られなかった。90 日齢における視床下部の遺伝子発現に対する影響

AVPV/POA と ARC の kisspeptin (Kiss1)、GPR54、ER α 、GnRH precursor (GNRH1)の mRNA 発現量を real-time PCR で測定した。AVPV/POA では Kiss1 mRNA が PE17 に EE 投与群で用量依存的に減少した(Fig. I -4a)。その他の GPR54、ER α 、GNRH1 mRNA 発現量には有意差が見られなかった(Fig. I -4b-d)。ARC では ER α mRNA 発現量が PE17 に EE 処置群で対照群に比べ増加した (Fig. I -5c)。その他の Kiss1、GPR54、GNRH1 mRNA の発現量には差が見られなかった(Fig. I -5a,b,d)。

90 日齢における下垂体の遺伝子発現に対する影響

下垂体における LH β 鎖(LHb)、FSH β 鎖 (FSHb)、prolactin (PRL)、GnRH receptor (GNRHR) mRNA の発現量を real-time PCR で測定した結果を Fig. 6 に示した。LHb mRNA が D と PE17 に EE を 200 μ g/kg 投与した群で有意に減少していた (Fig. 6a)。他の遺伝子発現には差が見られなかった (Fig. 6b-d)

I -D. 考察

本研究で、周生期に EDCs に曝露されると脳の発達が影響を受け、HPG 軸の性分化が影響を受けることが明らかになり、性成熟後に遅れて起きる生殖機能障害の原因である可能性が示唆された。新生子期の EE 曝露で、180 日齢には発情周期の異常を示す動物たちが、生後 90 日齢には LH サージが小さくなっていったと考えられた。これらの動物では AVPV/POA における kisspeptin mRNA の発現が減少していた。AVPV/POA の kisspeptin mRNA 発現量が雌より低い雄では LH サージが起こらない(10,23)。新生子期の EE 曝露が、脳の性分化時期に AVPV/POA の不完全な雄性化を引き起こした結果、kisspeptin mRNA 発現量を低下させ、90 日齢で LH サージの縮小を起こしたのであろう。

エストロゲンがキスペプチンニューロンの kiss1 mRNA の発現を調節する(8)。エストロゲン受容体には ER α と ER β 2 の種類が有る(24)。ER α mRNA は子宮、乳腺、精巣、下垂体、肝臓、腎臓などに多く発現している。一方 ER β mRNA は卵巣と前立腺に多く発現している(25)。キスペプチンニューロンは ER α を発現しており雄より雌に多い(26-28)。ER α ノックアウトマウスを卵巣除去し、エストロゲンを投与すると、キスペプチンニューロンの Kiss1 mRNA の発現は増加しない(29)。ER α が Kiss1 の発現を調節する主体である(30)。今回に実験結果は、対照群と EE 曝露群で AVPV/POA と ARC の ER α 発現量に差がないことを示している。さらに EE 投与群で血中エストロゲンレベルに変化が見られなかった。EE 曝露群で見られた AVPV/POA での Kiss1 発現量の低下の原因は、エストロゲン受容体以降で起こっているのかもしれない。

LH サージの低下が Kiss1 mRNA の低下とともに見られた。AVPV/POA と ARC では GnRH と GPR54 の mRNA 発現量に有意な変化が見られなかった。GnRH ニューロン自身は EE 曝露によって影響を受けないのかもしれない。GnRH サージは AVPV/POA から起こり、下垂体のゴナドトロフを刺激して LH サージを起こす。このサージは ARC におけるパルスの生成と異なり、LH の転写が伴わない。LH β と GnRHr mRNA の発現量には変化がなかったのはそのためであろう。したがって LH

サーージの縮小は、EE 曝露動物において AVPV/POA における Kiss1 mRNA 発現量の低下が直接関わっていると考えられる。持続性発情期を示す老齢ラットでやはり LH サージの縮小が見られ、c-fos を発現しているキスペプチンニューロンの割合が AVPV で減少していたが、Kiss1 mRNA の発現レベルやキスペプチンニューロンの数は若い雌ラットと違いが認められなかったと報告されている(31-34)。新生子期の EE 曝露がキスペプチンニューロンの数の増加を抑制したのかもしれない。

I-E. 結論

新生子期の EE 投与によるキスペプチンニューロンに与える変化を明らかにするために、まだ発情周期が乱れていない 90 日齢において、生殖ホルモンの変化、AVPV/POA と ARC における遺伝子発現の変化を解析した。その結果、新生子期の EE 曝露が LH サージのピーク値を抑制し、AVPV/POA におけるキスペプチンの遺伝子発現を低下させることを見いだした。

II. 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

II-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。

II-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 ブリーダー、日本農産工業) と水は自由摂取とした。膣スメ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: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/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。

定量的 RT-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°C、30 秒、PCR反応を5秒間95°Cで40サイクル、60°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'-TCGAGAAAAAGATTCAAGAGCCAAGA
AATTCTCTTGAAATTTCTTGGCTCTTGAATC
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°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 を持つて有意差ありとした。

II-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 II-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. II-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細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. II-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. II-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. II-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. II-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、10 nM 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. II-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。

II-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 H r k 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系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 (Jurisicova 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

巢への EE の直接作用を解析するために、卵巢の器官培養系を用いた。その結果、EE の卵巢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、成熟後に卵巢機能が異常を示したのかもしれない。

II-E. 結論

新生子期の EE 曝露が直接卵巢の卵細胞における 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巢の機能障害を引き起こしたのかもしれない。

I & II-F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kaori Nozawa, Kentaro Nagaoka, Haolin Zhang, Kento Usuda, Sachiko Okazaki, Kazuyoshi Taya, Midori Yoshida, Gen Watanabe, Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats, *Reproductive Toxicology*, 2014, 46, 77-84.
- 2) Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects kisspeptin expression and LH-surge level in female rats. *The Journal of Veterinary Medical Science* 2014, 76, 1105-1110.
- 3) Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol (EE) disrupts oocyte apoptosis during ovary development the female rats (*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016 年 1 月)
- 4) Zhang H, Taya K, Nagaoka K, Watanabe G. The hormone profiles in developing female rats after neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol (EE). (*J Vet. Med. Sci.*へ投稿予定 2016 年 2 月).

2. 学会発表

- 1) 臼田賢人、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子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 -ethynyl 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)

I & II-G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

I -References

1. Bai, Y., Chang, F., Zhou, R., Jin, P. P., Matsumoto, H., Sokabe, M. and Chen, L. 2011. Increase of anteroventral periventricular kisspeptin neurons and generation of E2-induced LH-surge systems in male rats exposed perinatally to environmental dose of bisphenol-A. *Endocrinology*. 152: 1562-1571.
2. Bateman, H. L. and Patisaul H. B. 2008. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*. 29: 988-997.
3. Cao, J. and Patisaul, H.B. 2011. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and kiss1 in neonatal male and female rats. *J. Comp. Neurol.* 519: 2954-2977.
4. Clarkson, J. and Herbison, A. E. 2006. Postnatal development of kisspeptin neurons in mouse hypothalamus: Sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocrinology*. 147: 5817-5825.
5. Clarkson, J., Boon, W. C., Simpson, E. R. and Herbison A. E. 2009. Postnatal development of an estradiol-kisspeptin positive feedback mechanism implicated in puberty onset. *Endocrinology*. 150: 3214-3220.
6. Couse, J. F. and Korach, K. S. 1999. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr. Rev.* 20: 358-417.
7. Dickerson, S. M., Cunningham, S. L., Patisaul, H. B. P., Woller, M. J. and Gore, A. C. 2011. Endocrine disruption of brain sexual differentiation by developmental PCB exposure. *Endocrinology*. 152: 581-594.
8. Downs, J. L. and Wise, P. M. 2009. The role of the brain in female reproductive aging. *Mol. Cell*.

- Endocr. 299: 32-38.
9. Galliano, D. G., Pinilla, L. and Sempere, M. T. Sex steroids and the control of the kiss1 system: Developmental roles and major regulatory actions. 2011. *J. Neuroendocrinol.* 24: 22-33.
 10. Gore, A. C. 2008. Developmental programming and endocrine disruptor effects on reproductive neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* 29: 358- 374.
 11. Hotchkiss, A. K., Rider, C. V., Blystone, C. R., Wilson, V. S., Harting, P. C., Ankley, G.T., Foster, P. M., Gray, C. L. and 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. *J. Toxicol. Sci.* 105:235- 259.
 12. Horii, Y., Dalpatadu, S. L., Soga, T., Ohta, R., Watanabe, G., Taya, K. and Parhar, I. S. 2013. Estrogenic regulation of kiss1 mRNA variants in Hatano rats. *Gen. Com. Endocrinol.* 181: 246-253.
 13. Ishii M. N., Matsumoto, K., Matsui H., Seki, N., Matsumoto, H., Ishikawa, K. hatani,F., Watanabe,G. and Taya, K. 2013. Reduced responsiveness of kisspeptin neurons to estrogenic positive feedback associated with age-relate disappearance of LH surge in middle- age female rats. *Gen. Com. Endocrinol.* 193: 121-29.
 14. Juraska, J. M., Sisk, C. L. and DonCarlos, L. L. 2013. Sexual differentiation of the adolescent rodent brain: Hormonal influences and developmental mechanisms. *Hor. Behav.* 64: 203-210.
 15. Kauffman, A. S., Gottsch, M. L., Roa, ., Byquist, A. C., Crown, A. and Clifton, D. K. 2006. Sexual differentiation of kiss1 gene expression in the brain of the rat. *Endocrinology.* 148: 1774-1783.
 16. Li, X. F., Kinsey-Jones, J. S., Cheng, Y., Konx, A. M. I., Lin, Y. and Petrou, N. A. 2009. Kisspeptin signalling in the hypothalamic arcuate nucleus regulates GnRH pulse generator frequency in the rat. *PLos. One.* 4: Issue 12.
 17. Maeda, K., Ohkura, S., Uenoyama, Y., Wakabayashi, Y., Oka, Y., Tsukamura, H., and Okamura, H. 2010. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain. Res.* 1364:103-115.
 18. Matt, D. W., Glison, M. P., Sales, T. E., Krieg R. J., Kerbeshian, M. C., Veldhuis, D. and Evans, W. S. 1998. Characterization of attenuated proestrous luteinizing hormone surges in middle-aged rats by deconvolution analysis. *Biol. Reprod.* 59: 1477-1482.
 19. Mayer, C., Martinez, M. A., Dubois, S. L., Wolfe, A., Radovick, S., Boehm, U. and Levine, J. E. 2010. Timing and completion of puberty in female mice depend on estrogen receptor α -signaling in kisspeptin neurons. *Neuroscience.* 107: 22693-22698.
 20. Mees, C. D., Laes J. F., Bakker, J., Smitz J., Hennuy,B., and Vooren P. V. 2006. Alpha-fetoprotein controls female fertility and prenatal development of the gonadotropin-releasing hormone pathway through an antiestrogenic action. *Mol. Cell. Biol.* 26; 2012-2018.
 21. Mueller, S. O. and Korach, K. S. 2001. Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr. Opin. Pharmacol.* 1: 613-619.
 22. Nozawa, K., Nagaoka, K., Zhang, H., Usuda, K., Okazaki, S., Taya, K. and Watanabe, G. 2014. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affect ovarian gene expression and causes reproductive dysfunction in female rats. *Reprod. Toxicol.* in press.
 23. Navaro, V. M., Castellano, J. M., Fernandez-Fernandez, R., Tovar, S., Roa, J., Mayen, A., Barreiro, M. L., Casanueva, F. F., Aguilar, E., Dieguez, C., Pinilla, L. and Tena-Sempere, M. 2005. Effects of KISS-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle-stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology.* 146: 1689-1697
 24. Ohta, R., Ohmukai, H., Marumo, H., Shindo, T., Nagata, T. and Ono, H. 2012. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low- dose diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.* 34: 323-330.
 25. Okamura, H., Yamamura, T. and Wakabayashi, Y. 2013. Kisspeptin as a master player in the central control of reproduction in mammals: An overview of kisspeptin research in domestic animals. *Anim. Sci. J.* 84: 369-381.
 26. Overgaard, A., Holst, K., Mandrup, K. R., Boberg, J., Christiansen, S., Jacobsen, P. R., Hass, U. and Mikkelsen, J. D. 2013. The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus. *Neurotoxicology:* 37: 154-162.
 27. Pnilla, L., Aguilar, E., Dieguez, C., Millar, R. P. and Sepere, T. 2012. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiol. Rev.* 92: 1235-1316.
 28. Smith, J. T., Cunningham, M. J., Rissman, E. F., Clifton, D. K. and Steiner, R. A. 2005. Regulation of kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.* 146: 3686-3692.

29. Zhang, J., Yang, L., Lin, N., Pan, X., Zhu, Y. and Chen, X. 2014. Aging- related changes in the RP3V kisspeptin neurons predate the reduced activation of GnRH neurons during the early reproductive decline in female mice. *Neurobiol. Aging*. 35: 655-668.

II -References

1. 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.
2. Casals-Casas, C. & Desvergne, B. (2011) Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual review of physiology*, 73, 135-162.
3. 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.
4. 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.
5. Combalbert, S. & Hernandez-Raquet, G. (2010) Occurrence, fate, and biodegradation of estrogens in sewage and manure. *Applied microbiology and biotechnology*, 86, 1671-1692.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Doerflinger, M., Glab, J.A. & Puthalakath, H. (2015) BH3-only proteins: a 20-year stock-take. *The FEBS journal*, 282, 1006-1016.
11. Edson, M.A., Nagaraja, A.K. & Matzuk, M.M. (2009) The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30, 624-712.
12. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Jurisicova, 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. Kumar, E. & Holt, W.V. (2014) Impacts of endocrine disrupting chemicals on reproduction in wildlife. *Advances in experimental medicine and biology*, 753, 55-70.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. Meeker, J.D. (2012) Exposure to environmental endocrine disruptors and child development. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 166, 952-958.
 25. 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.
 26. Patisaul, H.B. & Adewale, H.B. (2009) Long-Term Effects of Environmental Endocrine Disruptors on Reproductive Physiology and Behavior. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 3.
 27. 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.
 28. Safe, S.H. (2000) Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update. *Environmental Health Perspectives*, 108, 487-493.
 29. 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.
 30. 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.
 31. Skinner, M.K. (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human reproduction update*, 11, 461-471.
 32. 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.
 33. 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.

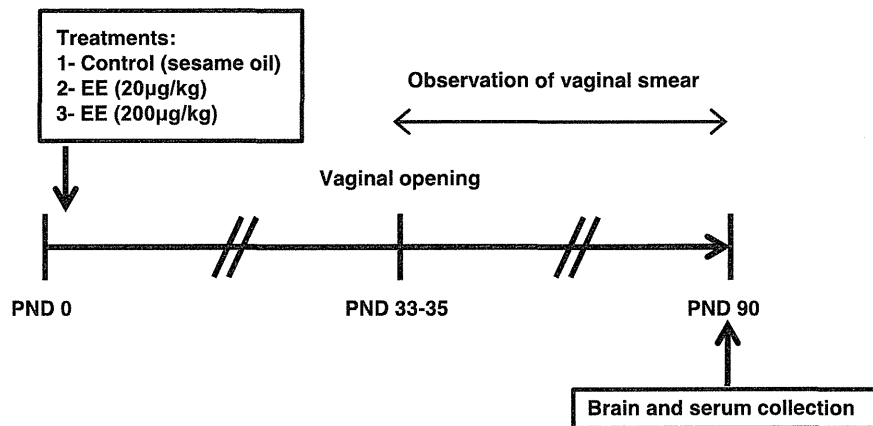


Fig. I -1
 Schematic representation of experimental protocol. PND, postnatal day.

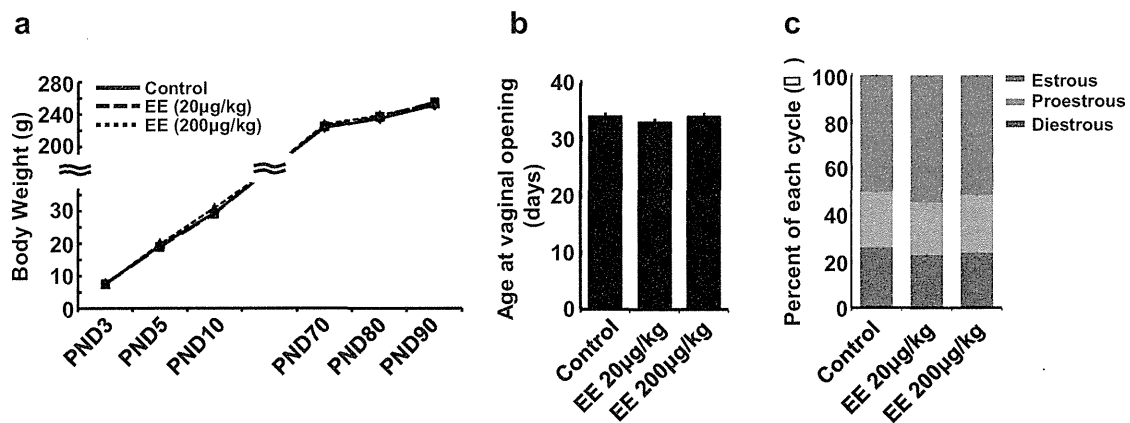


Fig. I -2
 Effect of neonatal EE exposure on body weight and reproductive parameters. (a) Body weight from PND3 to PND10 and from PND70 to PND90. PND, postnatal day. (b) Age at vaginal opening. (c) Percent of time spent in each cycle day during PND75-90. Rats were neonatally treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg, 2000 µg/kg). Estrous stage was determined by vaginal cytology. Data are presented as the mean ± SEM.

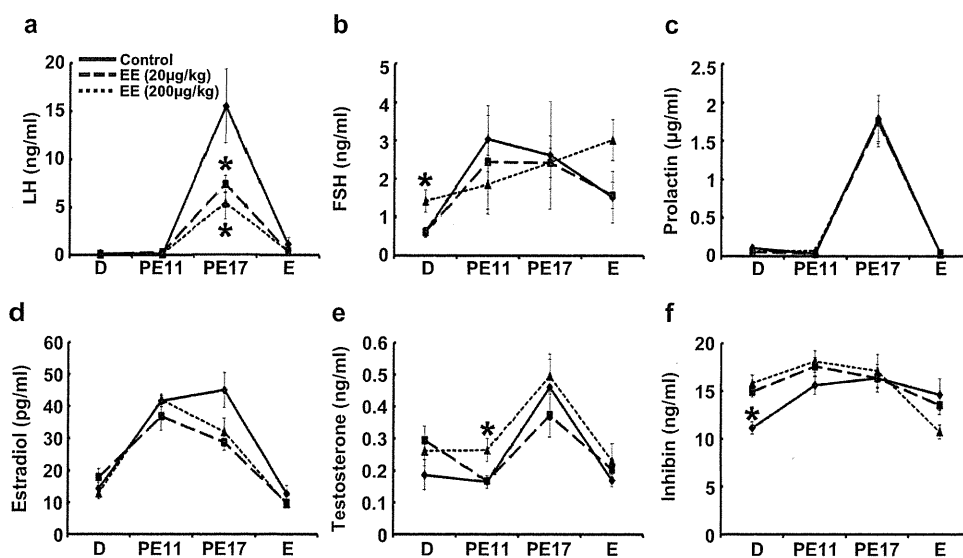


Fig. I -3

Changes in serum level of LH (a), FSH (b), prolactin (c), estradiol-17 β (d), testosterone (e) and inhibin (f) in neonatal EE treated rats. Bloods were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). Hormone level was measured by RIA. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

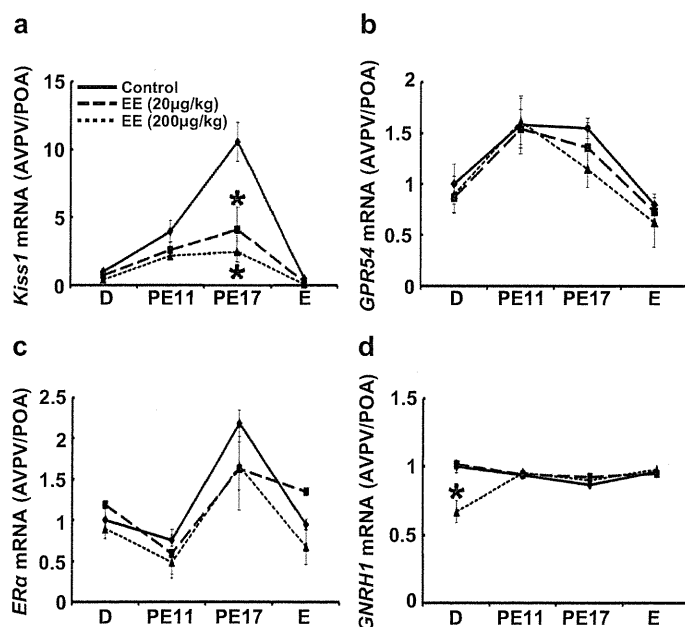


Fig. I -4

Changes in Kiss1 (a), GPR54 (b), ER α (c) and GNRH1 (d) mRNA expression in AVPV/POA. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 μ g/kg and 200 μ g/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean \pm SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

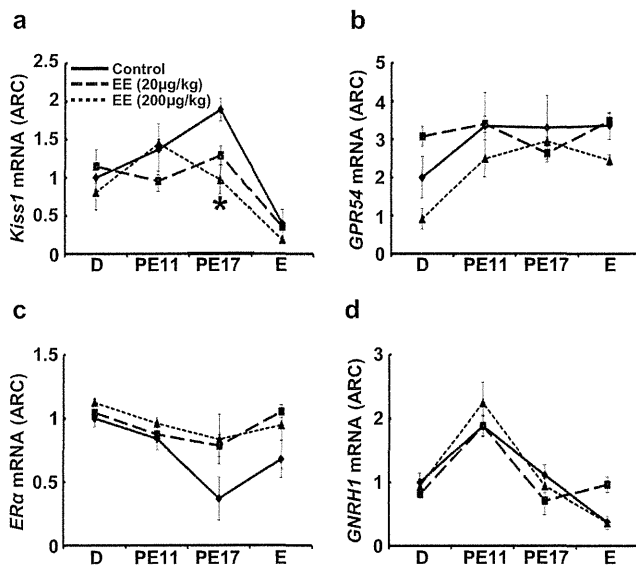


Fig. I -5

Changes in Kiss1 (a), GPR54 (b), ERα (c) and GNRH1 (d) mRNA expression in ARC. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg and 200 µg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean±SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

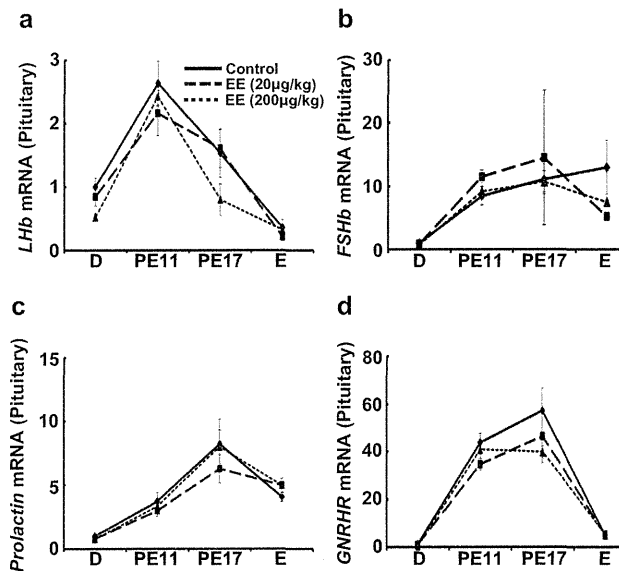


Fig. I -6

Changes in LHb (a), FSHb (b), prolactin (c) and GNRHR (d) mRNA expression in pituitary. Samples were collected at PND90 from animals treated with sesame oil and with two concentrations of EE (20 µg/kg and 200 µg/kg). mRNA expression level was analyzed by real-time PCR. Each point represents mean±SEM. Asterisk indicates a significant difference compared to the control (p<0.05). D, Diestrous PE11, Proestrous at 11hr00 PE17, Proestrous at 17hr00 E, Estrous.

Table II-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	ctcagcccatcttcttcag
Bcl2l1	accggagagcattcagtgat	tgcaatccgactcaccaata
Bcl2l2	gctgaggcagaagggttatg	tggaaaagttcgtcggaac
Mc11	gggctggtctggcatatcta	gggagcacttttcccatgta
Bak	tctcagaggggctgcagat	ccgaccttcaaagtagcag
Bid	ggctttctccgaacaatga	tggcaatggttgatgact
Bim	gcagtctcaggaggaacctg	agtgccttctccagaccaga
Puma	aaagccttctcaaccagtg	aatgaatgccagtggtcaca
Bmf	ggtacagatgccagaaagc	gcgatctatccgacaagagc
Bad	gcttagcccttttcgaggac	gatcccaccaggactggata
Bik	atctcatgaggtgcctggag	ttttccctgaggttggtgag
Bok	gaagtggttaacgcagaag	ctctcatccacaggtctc
Beta-Actin	agccatgtacgtagccatcc	ctctcagctgtggtggtgaa

Table II-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
Tnfrsf6	Hrk
Itmap1	Fxyd7
Dhhd	Vdr

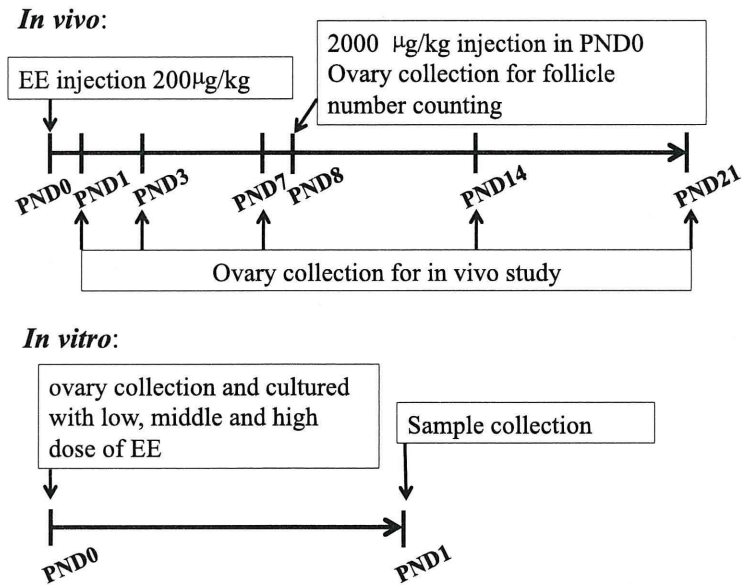


Fig. II-1. in vivo および in vitro の実験計画。PND, postnatal day : 生後日齢。

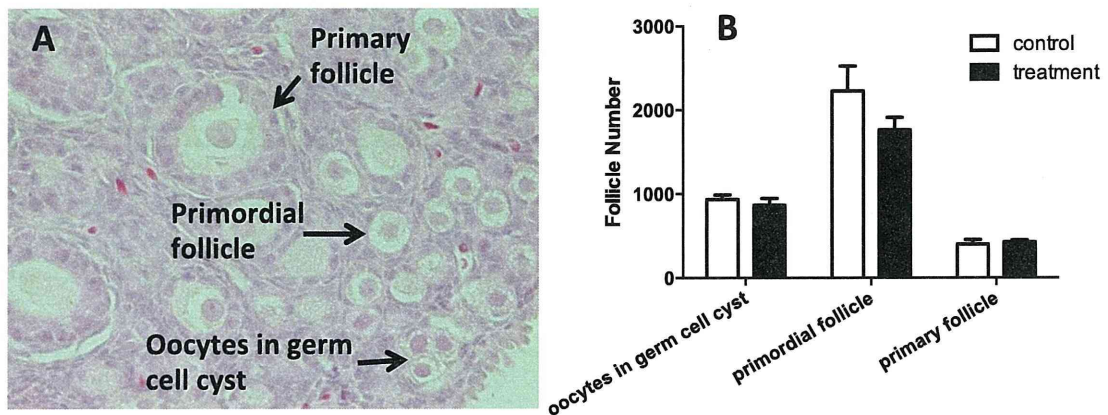


Fig. II-2. (A) 生後 8 日のラット卵巢の組織象。(B) 生後 8 日のラット卵巢における種々の卵胞の総数。それぞれの卵胞は (A) の写真に示してある。

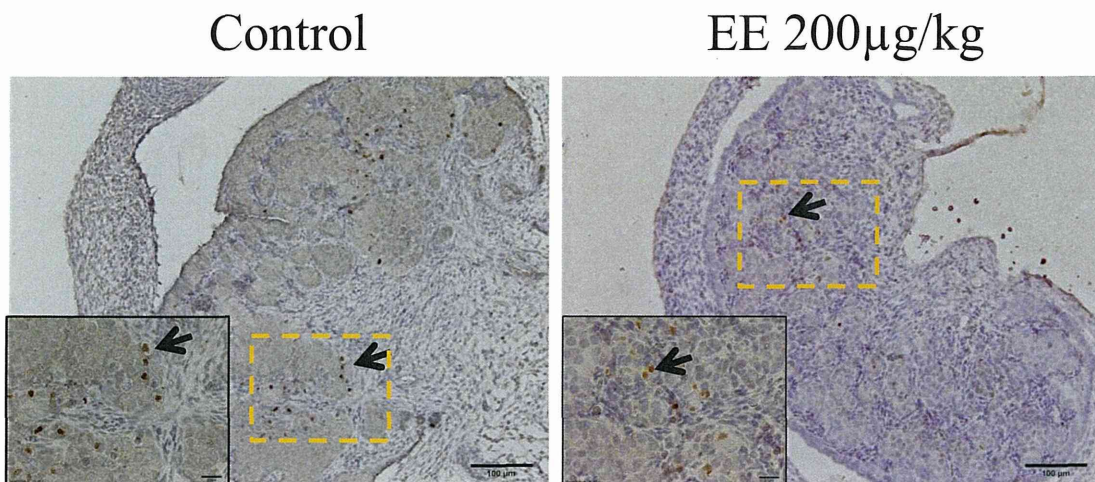


Fig. II-3. 生後1日の対照群およびEE処置群 (200 μg/kg) の卵巣におけるHrkタンパク質の免疫組織化学的染色。

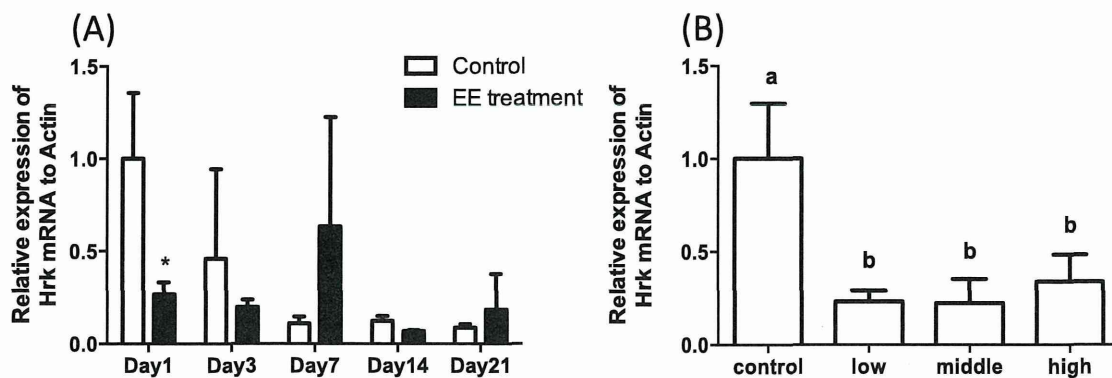


Fig. II-4. EE処置群および対照群の in vivo 卵巣における *Hrk* 遺伝子発現量(A)とEE添加 (low: 1ng/ml, middle: 10ng/ml and high dose: 100ng/ml)、あるいは非添加で新生子卵巣を培養したときの *Hrk* 遺伝子発現量 (B)。*は有意差有り (P<0.05)。