

低用量 Diethylstilbestrol の妊娠ラットへの投与が 雌産子の卵胞の成長へ及ぼす影響

*Effects of Maternal Exposure to a Low Dose of Diethylstilbestrol
on Follicular Growth in the Ovaries of Female Rat Offspring.*

西川 修^{1,2}, 政岡 俊夫², 有嶋 和義²

¹ 西川動物病院 福岡県福津市若木台 1-21-10,
² 麻布大学獣医学部 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

Osamu Nishikawa^{1,2}, Toshio Masaoka², Kazuyoshi Arishima²

¹ Nishikawa Animal Hospital
Wakagidai, Fukutsu, Fukuoka 811-3221, JAPAN
² Azabu University, School of Veterinary Medicine
Fuchinobe, Chuo-ku, Sagaiharu, Kanagawa 252-5201, JAPAN

Abstract: Diethylstilbestrol (DES), synthetic estrogen, was administered subcutaneously at 1.5 or 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (DES 1.5 group, DES 0.5 group) to pregnant Sprague-Dawley rats daily from day 7 to 21 of gestation (day 0 = mating) to investigate its effects on growth of ovarian follicles. The plasma FSH and LH concentrations and the percentages of primary and secondary ovarian follicles were higher in the DES 1.5 group at 6 weeks after birth. In the DES 1.5 group, many large interstitial cell clusters appeared in the ovaries, and these interstitial cells strongly expressed estrogen receptor α , mediating the DES effect. However these follicular percentages in the DES1.5 group were almost equal to the percentages in the control group at 15 weeks after birth. These observations indicate that prenatal exposure to a low dose of DES promotes growth of ovarian follicles, but this stimulus effect is not permanent.

Key words: Diethylstilbestrol, Ovarian follicle, Prenatal administration, Rat

要約: 合成エストロゲンであるジエチルスチルベステロール (DES) を 1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (DES1.5 群あるいは DES0.5 群と称する) の用量で妊娠 SD ラットに妊娠 7 日目~ 21 日目の期間, 連日皮下投与し, 産子の卵巣における卵胞の成長に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した。生後 6 週の DES1.5 群において, 血漿 FSH 濃度, 血漿 LH 濃度, そして一次卵胞と二次卵胞の割合が増加し, 卵巣内には多数の大きめの間質細胞の集団が出現し, これらの細胞はエストロゲン受容体 α (DES と結合し, その作用を仲介する) を強く発現していた。しかし, これら卵胞成長の変化は生後 15 週では観察されなくなった。以上の観察結果から, 胎生期に投与された低濃度の DES は卵巣の卵胞の成長に対して促進的な作用を有するが, その作用は恒久的ではないことが示唆された。

1. 目的

ヒトにおいて, 流産防止薬として妊娠中に投与され

た合成エストロゲンである diethylstilbestrol (DES) は, 生まれてくる子の生殖器系の異常を引き起こすことは良く知られている。胎生期に DES を暴露された

いわゆる DES-daughters (DES に暴露された女子) は生殖器系腫瘍を多発した⁽¹⁾。子宮内暴露されたのが男子であれば、精巣上体のシスト、精巣停留、さらにはミューラー管遺残というような生殖道の障害が多く発生した^(2,3)。その結果、1971年に米国食品医薬局によって DES の使用が中止された。その後、実験動物、特にマウスを使用した DES の子宮内暴露および新生子暴露が生殖腺系へ及ぼす影響については多くの研究報告があり、エストロゲン感受性の組織に異常が多く起きることが示されている⁽⁴⁾。また多数の実験は、胎生期あるいは生後の DES 暴露が、アンドロゲン濃度の低下を伴うアンドロゲン依存性の生殖器官と機能の変異を誘発することも明らかとしている⁽⁵⁻⁹⁾。

DES 投与実験において用いられているのはほとんどがマウスであるが、実際はラットの方が DES の流産作用や催奇形作用に対して高い感受性を有する⁽⁴⁾。前述したように多数の DES 投与実験が存在するが、そのほとんどが雄の生殖道に肉眼的な異常を引き起こす様な高容量 (10 ~ 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) の投与実験である。

マウスやラットなどの実験動物を使用して胎生期に DES 暴露した場合、マウスを使用すると腫瘍腫瘍がよく見られ^(10,11)、一方ラットを使用すると、投与方法および投与量によって乳腺や腫瘍腫瘍が誘導されたり^(12,13)、一部に卵巣嚢腫を誘導する場合⁽¹⁴⁾など、得られる結果は様々であるが、卵胞形成に焦点を絞った研究はほとんど存在しない。唯一、妊娠ラットに低容量の DES (0.5, 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を長期間 (妊娠7日目~21日目) 投与し、その産子を観察したところ、雄では血漿テストステロン・レベルの抑制および精巣上体の組織学的発達の乱れが確認され、また雌では卵胞の発育度による分類を試み、DES の母体への投与は生後3週 (離乳時期) の卵胞の成長度を促進したという報告があるのみである⁽¹⁵⁾。しかしながら、十分に成長した卵巣での卵胞の変化については検討されていない。

一般的にホルモンはその受容体を介して、作用を発揮する。エストロゲン受容体には α と β とが存在し、DES はエストロゲン・レセプター α (estrogen receptor α : 以下 ER α とする) に対して高い親和性を有する⁽¹⁶⁾。

そこで本研究では、妊娠母体へ低容量の DES を長

期間投与した場合、離乳後の雌産子の卵巣における卵胞形成にどのような影響を受けるのか、その影響は恒久的なものか、あるいは一過性の作用であるかについて検討することを目的とし、(a) 卵胞の成長程度の観察および (b) 卵巣における ER α の発現を観察した。

2. 材料および方法

(1) 実験動物

妊娠3日目の Sprague-Dawley rat を日本 SLC から入手して実験に用いた。ラットは一定の明暗周期 (12時間明期, 12時間暗期)、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ および湿度 $55 \pm 10\%$ に設定された、麻布大学附置生物科学総合研究所内の飼育室において餌 (CE-2, 日本クレア) と水を自由に与えて飼育した。

本研究の実験計画は麻布大学動物実験委員会の審査を受け、承認されている (承認番号 050208-1)。

(2) 投与方法

DES (Sigma Chemical Co., USA) は投与量が 1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ body weight となるように Corn oil (Tocopherol Stripped Corn Oil: ICN Biomedical Inc., USA) に溶解し、妊娠7日から21日目にかけて妊娠ラットの頸部皮下に連日単回投与した (DES 1.5 群および DES 0.5 群)。また Control 群は Corn oil のみを投与した。DES 投与量は、これまでの実験^(15,17) において 4.5, 3.0, 1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与したところ、1.5 あるいは 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与した場合のみ、妊娠が維持されたので、これらの結果を踏まえて決定した。妊娠ラットは正常分娩させ、出生4日目に同腹子を雌雄4匹ずつに調節し、離乳後は雌雄別々に飼育した。

(3) 剖検

生後3, 6 および 15 週に雌産子の剖検を行った。剖検時に雌の子の体重を測定後、麻酔下で腹大動脈から採血し、卵巣を取り出し重量測定した。卵巣はブアン液に固定した。また採取した血液は遠心分離後、血漿ホルモン濃度分析を行うまで -80°C に保存した。

(4) 卵胞成長度の解析

ブアン固定した生後6および15週の卵巣は、常法

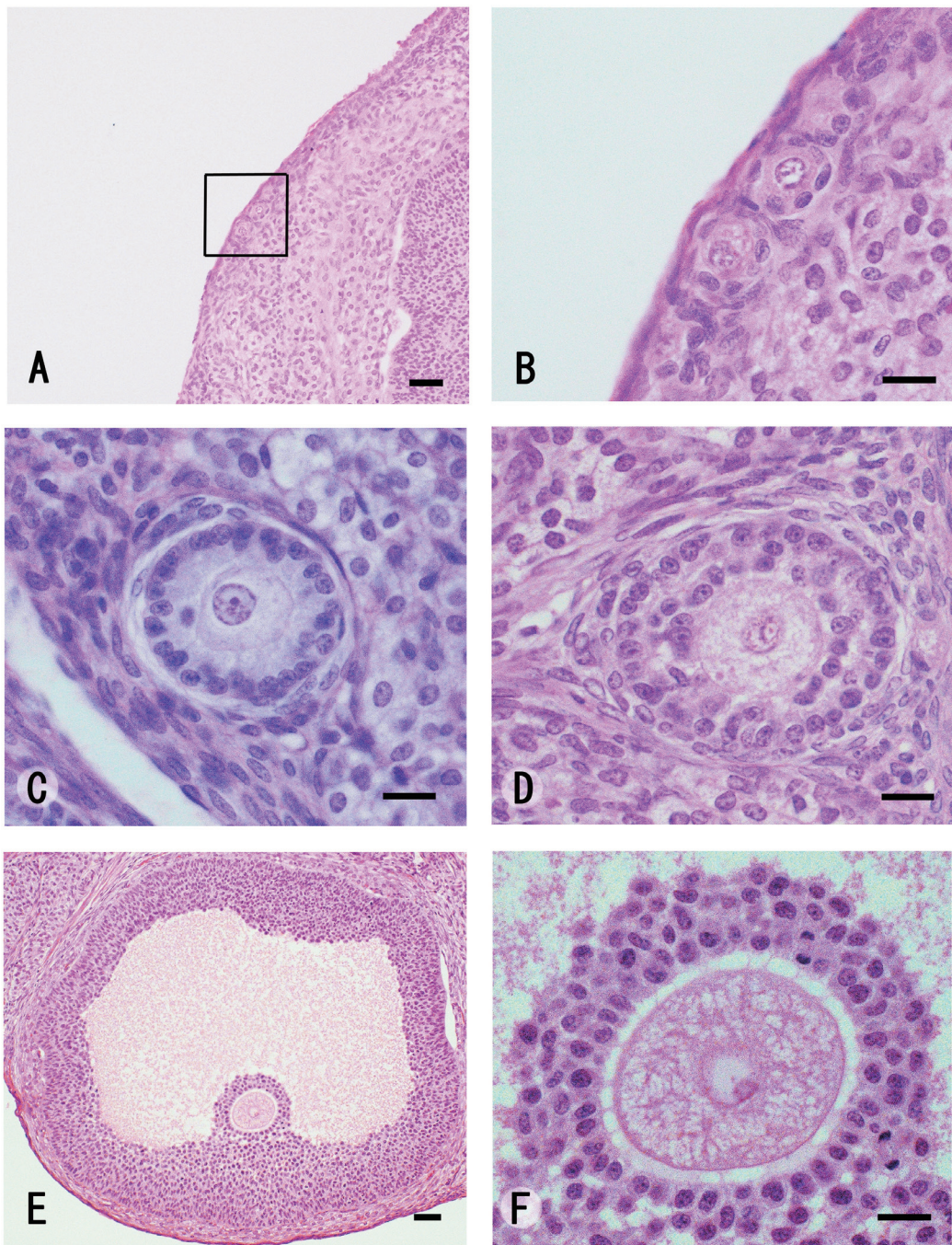


図1 生後6週齢のラット卵巣に観察される様々な成長状態の卵胞。ヘマトキシリン・エオジン染色した卵巣組織像。
 A：卵巣表面上皮細胞直下に多数の原始卵胞が存在する。
 B：A中の囲まれた部分を拡大したもの。単層扁平の卵胞上皮細胞が卵母細胞を囲む原始卵胞が2つ存在する。
 C：単層立方の卵胞上皮細胞が卵母細胞を囲む一次卵胞。
 D：二層の卵胞上皮細胞が卵母細胞を囲む二次卵胞。
 E：卵丘内に卵母細胞が存在する胞状卵胞。
 F：Eの卵母細胞を拡大した図。核内に核小体が存在する。このような組織像を示すとき卵胞をカウントした。
 AとEの図中のスケールバーは50 μ m、他は20 μ mを示す。

に従ってパラフィン樹脂に包埋した。包埋した卵巣は回転式マイクロームを用いて10 μ mの連続切片を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

染色した卵巣切片を用いて、卵巣内に存在する総卵胞数を、図-1に示すように原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、胞状卵胞に分類してカウントした。それぞれ

表1 DESを投与した妊娠ラットの雌産子の体重と卵巣重量

	群	個体数	3週齢	6週齢	15週齢
体重 [A] (g)	Control	10	45.8 ± 1.4	153.6 ± 3.8	281.6 ± 7.5
	DES 0.5	10	46.5 ± 1.5	155.6 ± 4.5	308.6 ± 7.9 * #
	DES 1.5	10	45.8 ± 2.0	153.4 ± 3.0	272.2 ± 8.1
卵巣重量 [B] (mg)	Control	10	18.3 ± 1.0	62.5 ± 2.7	102.2 ± 3.2
	DES 0.5	10	16.3 ± 0.9	63.4 ± 3.3	112.6 ± 3.4 *
	DES 1.5	10	14.7 ± 0.7 *	63.5 ± 3.3	118.7 ± 3.4
A/B 比 (mg/100 g)	Control	10	39.6 ± 1.4	41.3 ± 1.8	23.3 ± 1.4
	DES 0.5	10	35.0 ± 1.1 *	40.9 ± 2.2	26.8 ± 0.8 *
	DES 1.5	10	32.5 ± 1.8 *	40.6 ± 1.3	27.1 ± 1.2 *

値は 平均値 ± SEM。

* : Control 群に比べて統計学的に有意差有り (P < 0.05)

: DES1.5 群に比べて統計学的に有意差有り (P < 0.05)

の卵胞は、卵母細胞の核に核小体 (仁) が見られた場合をカウントした。

(5) 卵巣における ER α 発現の観察

前述した方法で生後6および15週のDES1.5群およびControl群の卵巣の5 μ m組織切片作製後、マウス抗ER α 血清 (MC-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA: 500倍希釈) を用いてポリマー法により抗体染色を行った。対比染色としてヘマトキシリン染色した。

(6) 血漿のホルモン濃度測定

生後3および6週の血漿の黄体形成ホルモン (LH) および、卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度は、それぞれ、rat LH Enzymeimmunoassay System および rat FSH Enzymeimmunoassay System (Amersham pharmacia Biotech Inc., USA) を用いて測定した。

(7) 統計学的解析法

得られた実験データは、全て Student's t-test を用いて統計学的に処理し、p < 0.05 を統計学的に有意差ありとした。

3. 結果

産子の体重

本研究で用いた生後3, 6および15週の体重を比較したところ、生後15週において、DES 0.5群の体重は、Control群およびDES 1.5群の体重と比べて統計学的

に有意に増加していた (表1)。

産子の卵巣重量

生後3週において、DES 1.5群の卵巣重量は、Control群に比べて統計学的に有意に減少したが、生後15週では、DES 0.5群の卵巣重量が、Control群およびDES 1.5群の卵巣重量と比べて統計学的に有意に増加していた (表1)。

卵巣重量 / 体重・比

生後3週産子において、DES1.5群およびDES0.5群の相対重量は、Control群に比べて統計学的に有意に減少したが、生後15週では、DES1.5群およびDES0.5群の相対重量は、Control群及の相対重量と比べて統計学的に有意に増加していた (表1)。

血症中ホルモン濃度

血漿 LH および FSH ホルモン濃度を表2に示す。

血漿 LH 濃度

生後3週の血漿 LH 濃度は変化していなかった。生後6週では、DES1.5群の血漿 LH 濃度はControl群に比べて有意に増加していた。

血漿 FSH 濃度

生後3週において、DES15投与の血漿 FSH 濃度は他の2群のホルモンの濃度と比較して有意に増加した。

生後6週において、DES1.5群の血漿 FSH 濃度はDES0.5群の濃度と比較して有意に増加した。

表2 DES を投与した妊娠ラットに雌産子の血漿中ホルモン濃度

ホルモン	群	生後3週	生後6週
黄体形成ホルモン (LH) ng/ml	Control	12.8 ± 6.7 [6]	1.7 ± 0.6 [6] a
	DES 0.5	28.8 ± 10.5 [7]	3.2 ± 1.1 [7] ab
	DES 1.5	15.6 ± 7.6 [7]	5.3 ± 1.1 [7] b
濾胞刺激ホルモン (FSH) ng/ml	Control	35.1 ± 6.1 [6] a	57.4 ± 8.2 [6] ab
	DES 0.5	41.4 ± 2.8 [7] a	51.9 ± 6.0 [7] a
	DES 1.5	58.8 ± 6.6 [7] b	70.4 ± 9.2 [7] b

値は 平均値 ± SEM。

[] : 測定した個体数

a, b: 異なる記号間に統計学的に有意差有り (p < 0.05)

表3 妊娠ラットに投与した DES が産子卵胞の成長へ及ぼす影響

卵胞の発育段階	週齢	原始卵胞	一次卵胞	二次卵胞	胞状卵胞 (三次卵胞)
		(%)	(%)	(%)	(%)
Control	6	87.35 ± 1.03 a	6.61 ± 0.34 a	3.15 ± 0.24 a	3.11 ± 0.82
DES 0.5	6	82.77 ± 0.90 b	8.35 ± 0.63 ab	5.67 ± 0.41 b	4.39 ± 0.70
DES 1.5	6	80.35 ± 2.22 b	10.22 ± 0.75 b	5.64 ± 0.87 b	5.06 ± 0.90
Control	15	83.01 ± 1.30	10.48 ± 1.11	3.76 ± 0.49	2.75 ± 0.47
DES 0.5	15	83.83 ± 1.92	9.64 ± 1.00	4.04 ± 0.89	2.50 ± 0.42
DES 1.5	15	81.03 ± 2.38	11.11 ± 1.42	4.85 ± 0.63	3.02 ± 0.85

・ 値は総卵胞数に対する割合 (%) を, 平均値 ± SEM で表す。

・ a, b: 異なる記号間に統計学的に有意差有り (p < 0.05)

・ 各群 5 個体の卵巣を用いた。

産子における卵胞の成長度

卵巣に存在する総卵胞数に占める原始卵胞, 一次卵胞, 二次卵胞および胞状卵胞の割合を算出した (表3)。

原始卵胞

生後6週のDES 1.5群およびDES 0.5群の原始卵胞の割合は, Control群の割合に比べて統計学的に有意に減少していた。生後15週において, DESの投与は, 原始卵胞の割合に影響を与えなかった。

一次卵胞

生後6週のDES 1.5群の一次卵胞の割合は, Control群の割合に比べて統計学的に有意に増加していた。生後15週において, DESの投与は, 一次卵胞の割合に影響を与えなかった。

二次卵胞

生後6週のDES 1.5群およびDES 0.5群の一次卵胞の割合は, Control群の割合に比べて統計学的に有意に増加していた。生後15週において, DESの投与は, 二次卵胞の割合に影響を与えなかった。

胞状卵胞

生後6週および15週のいずれの場合も, DESの投与は, 胞状卵胞の割合に影響を与えなかった。

産子卵巣におけるERαの局在性

生後6週の卵巣

全ての群の卵巣において, ERαは二次卵胞および胞状卵胞の内卵胞膜の卵胞膜細胞の核に強く発現していたが, 原始卵胞および一次卵胞には発現していなかった (図2: A ~ C, D, E)。黄体がいくつか形成されており, 一部の黄体細胞の核がERαを発現していた。

卵胞間の間質には退縮した卵胞が起源と考えられている間質細胞 (interstitial cell) が集団で多数存在し, これらの細胞の大部分がERαを発現していた。DES1.5群の卵巣にはDES0.5群およびControl群の卵巣と比べて多数の間質細胞の集団が存在し, ほとんどの細胞の核は強くERαを発現していた (図2: B,

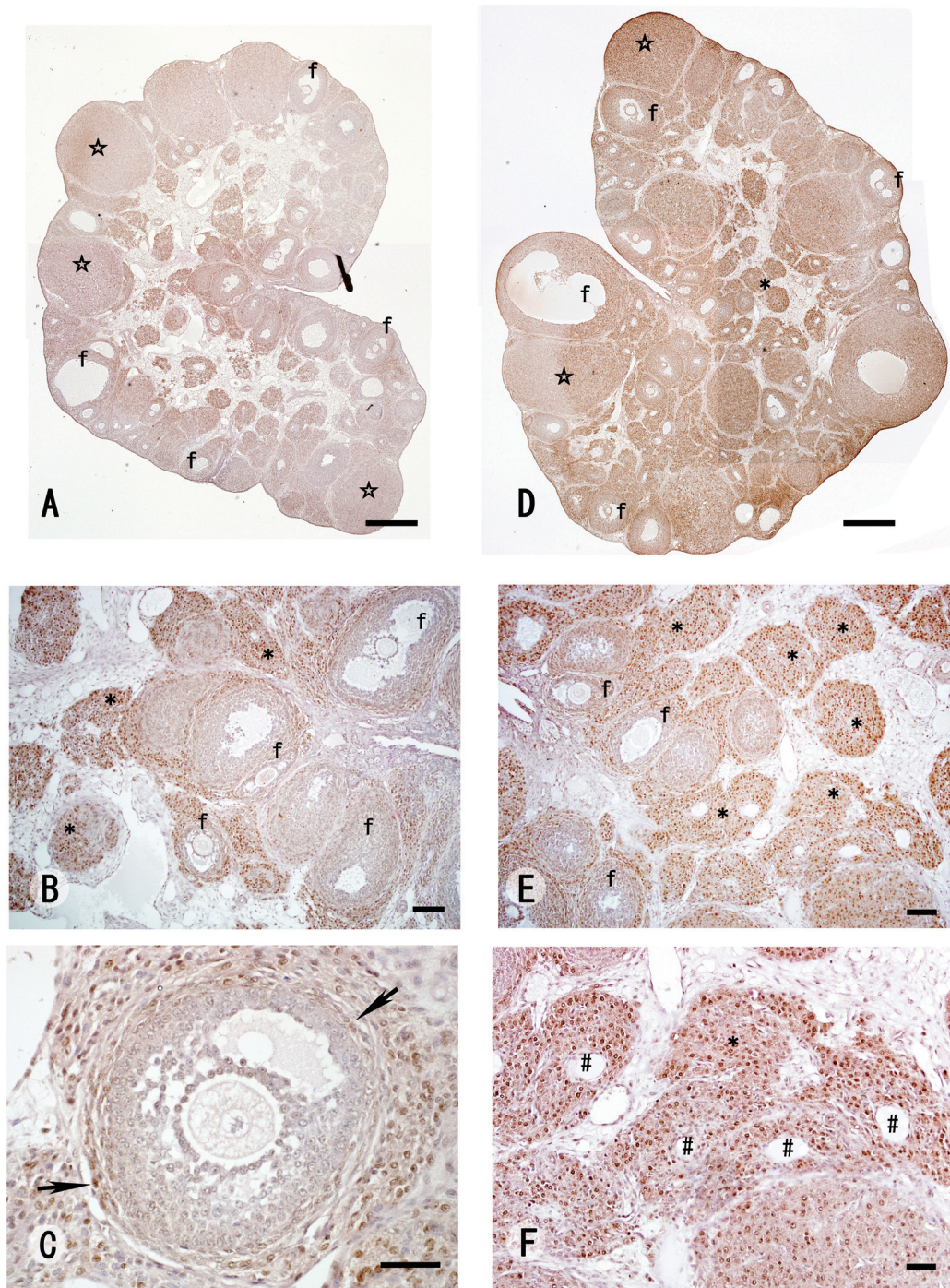


図2 生後6週のラット卵巣におけるER α の局在。抗ER α 血清を用いて免疫染色した卵巣組織像。

Control群の卵巣 (A-C)。

A: 卵巣には様々な成長段階の卵胞 (f), いくつかの黄体 (☆), が存在する。

B: Aの一部の拡大像。二次卵胞, 胞状卵胞 (f) の卵胞膜細胞がER α を発現している。間質細胞の集団 (*) が散見され, その多くの細胞はER α を発現している。

C: 胞状卵胞の卵胞膜細胞の核 (←) がER α を発現している。

DES1.5群の卵巣 (D-F)。

D: 卵巣には様々な成長段階の卵胞 (f), いくつかの黄体 (☆) が存在する。髓質に多くの間質細胞の集団が存在する。

E: Dの間質細胞の集団 (*) が多く存在する髓質を拡大した組織像。Control群の卵巣と同様に二次卵胞, 胞状卵胞 (f) の卵胞膜細胞がER α を発現し, その発現強度は類似している。

F: Eの間質細胞の集団 (*) を拡大。これら集団は中心部に空間 (#) があり, 退化した卵胞を起源としていることを窺わせる。いずれの細胞もER α を強く発現している。

※ A, Dのスケールバーは500 μ m, B, Eは100 μ m, 他は50 μ mを示す。

D-F)。従って DES1.5 群の卵巣の髄質部分は他の 2 群の卵巣と比べ、多くの間質細胞の集団で占有されていた (図 2 : B, D)。

生後 15 週の卵巣

生後 15 週の卵巣における $ER\alpha$ の発現部位および発現程度は 6 週の卵巣の場合とほぼ同様であった (図 3)。つまり、 $ER\alpha$ は二次卵胞以上の卵胞の内卵胞膜に存在する卵胞膜細胞と間質細胞の核に発現し、特に間質細胞の核に強く発現していた。6 週の卵巣に比べて多くの黄体が存在していたが、一部の黄体細胞の核が $ER\alpha$ を発現していた。しかし、3 群の卵巣における $ER\alpha$ の発現部位および発現強度の差は観察できなかった。

考 察

本実験は、合成エストロゲンである DES が、器官形成期に連続的に低用量投与された雌ラットにおいて、生後の産子卵巣の卵胞成長の程度および $ER\alpha$ 発現にどのような影響が及ぼすかについて調べたものである。

妊娠 7 日目から 21 日目に 1.5 および 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day の DES を妊娠ラットに連日皮下投与すると、DES 15 群では 11 匹すべてのラットが早産した。DES 1.5 群では 10 匹すべてのラットが出産した。その時、生後 1 週、3 週、6 週の産子の体重は、Control 群と比べて有意な差がなかったという報告⁽¹⁵⁾がある。一方、妊娠 15 日目と 18 日目に総量 1.2 μg または 120 μg の DES を投与すると、14 ヶ月後の子の体重は Control 群に比べ、用量依存的に増加傾向にあることが報告⁽¹³⁾されている。本研究においては、DES を妊娠 7 ~ 21 日目に 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day (総量にして約 2 μg)、1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day (総量にして約 6 μg) の 2 群に分けて連日皮下投与しており、生後 15 週の DES0.5 群の体重は、DES1.5 群および Control 群の体重に比べて統計学的に有意に増加していた。本実験において、DES 投与は妊娠 7 ~ 21 日目に連日皮下、低用量で行ったが、その総量は約 6 μg であったため、Rothschild ら⁽¹³⁾が行った実験の 2 群の間の投与量に値する。これらのことより、器官形成期の DES 投与は、生後の体重増加に抑制的には働か

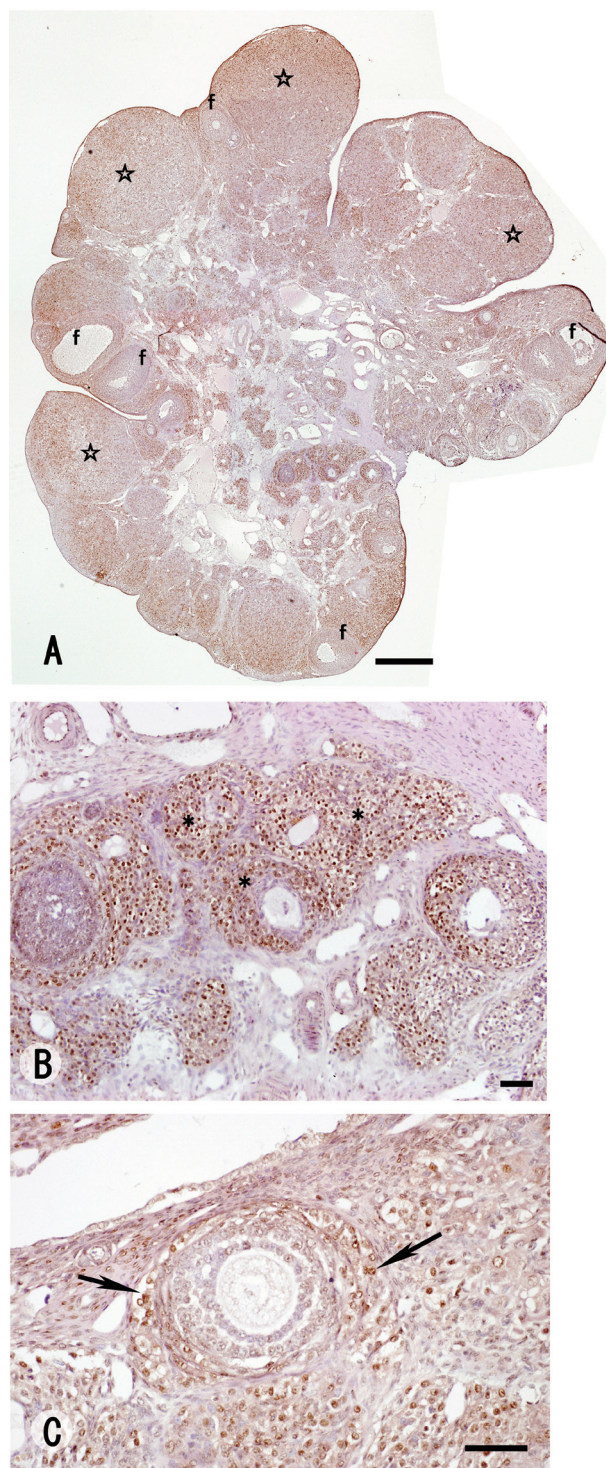


図 3 生後 15 週の Control 群のラット卵巣における $ER\alpha$ の局在。抗 $ER\alpha$ 血清を用いて免疫染色した卵巣組織像。

A : 卵巣には様々な成長段階の卵胞 (f)、多くの黄体 (☆) が存在する。

B : A の一部の拡大像。間質細胞の集団 (*) が多く存在し、その多くの細胞は $ER\alpha$ を発現している。

C : 胞状卵胞の卵胞膜細胞の核 (←) が $ER\alpha$ を発現している。

※ A のスケールバーは 500 μm 、B は 100 μm 、C は 50 μm を示す。

ないと考えられる。また、DESが体重増加に影響を及ぼしたとしても、それは用量依存的に体重を増加させるとは限らず、投与時期や投与方法によってその作用に違いがあると考えられる。

前述したYamamotoらの実験において、妊娠7日目から21日目に1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/dayのDESを連日皮下投与したDES 1.5群では、生後1週、3週、6週の卵巢重量、および卵巢重量/体重比のどちらも、Control群に比べて有意な差がなかったという報告⁽¹⁵⁾がある。一方、同じく前述した実験において、妊娠15日目と18日目にDESを総量120 μg 投与されたラットから産まれた14ヶ月齢の雌の子の卵巢重量が、有意に増加したという報告⁽¹³⁾、また、妊娠17日目と19日目に0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weightのDESを投与されたラットから産まれた18ヶ月齢の雌の子の卵巢重量が、有意差はないがわずかに増加していたという報告⁽¹⁴⁾がある。本実験では、生後3週のDES 1.5g群の卵巢重量および卵巢重量/体重比が減少していたものの、生後15週のDES1.5群およびDES0.5群の卵巢重量/体重比が増加していた。これらのことから、器官形成期のDES投与は、成長過程の卵巢に作用し、生後の卵巢の成長を促進している可能性があると考えられる。

DESに暴露された卵巢の総卵胞数を顕微鏡的にカウントしたところ、対照群と比べて統計学的に有意に減少したという報告⁽¹⁴⁾がある。そこで本研究では、卵胞を4段階（原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞、および胞状卵胞）に分類してその数をカウントし、それぞれの卵胞が総卵胞数に占める割合を算出した。結果として、生後6週におけるDES投与群の卵巢の原始卵胞の割合は、Control群と比べて用量依存的に有意に減少し、二次卵胞の割合は、Control群と比べて用量依存的に有意に増加していた。また、DES 1.5群のみ一次卵胞の割合がControl群と比べて有意に増加しており、DES 0.5群の割合も有意差はないもの（ $p = 0.051$ ）、Control群と比べて増加傾向にあった。しかし、生後15週になると、3群の卵胞の成長の程度に有意差はなくなった。これらのことより、DES投与は、原始卵胞から、二次卵胞への成長を促進させる効果があるが、その促進作用は恒久的な作用ではないことが明らかとなった。

ラット胎子の卵巢はエストロジェンを合成せず、

新生子で初めて卵巢内にエストロジェンが検出される^(18,19)。しかし、妊娠中に母親が分泌する多量のエストロジェンは胎盤を通過するので、胎子体内には高いレベルのエストロジェンが存在することになる。ラットでは肝臓がエストロジェンに特異的に結合する α -フェトプロテインを合成し、母体由来のエストロジェン作用を発揮させないメカニズムがある⁽²⁰⁾。しかし、DESは α -フェトプロテインと結合しないため、胎子体内においてエストロジェン作用を発揮することが可能となる。そこで、本実験において、エストロジェンの受容体であり、DESとの親和性が高いER α の卵巢における局在の変化に注目して免疫組織化学染色を行い、卵巢を顕微鏡下で観察した。生後6週および15週の卵巢において、ER α は二次卵胞以上の卵胞膜細胞と間質細胞に発現しており、この局在性は過去の観察結果⁽²¹⁾と一致した。

卵巢には卵胞、黄体および血管系とともに、実質および間質組織が存在している。間質細胞（interstitial cells）は形態的に精巣ライディッヒ細胞に類似し、同様にアンドロジェンを分泌する。齧歯類では間質細胞は卵巢の大きな部分を占め、退化する卵胞の卵胞膜細胞が形質転換することによって出現する⁽²²⁾。これら間質細胞は、退化した卵胞が次々間質細胞に転換するため常にリニューアルされている。

間質細胞は卵巢の機能に重要な役割を果たしている^(23,24,25)。卵巢の間質細胞によるアンドロジェン分泌の実際の調節は、卵胞の活性を維持するためと視床下部と下垂体への適度なシグナリングのために必須である^(26,27)。間質細胞はLH receptorを発現し、この細胞でのステロイド合成はLHによってコントロールされている。ラットでは、生後5日に卵胞膜細胞から一次間質細胞（primary interstitial cell）が発達し、7日まではLHに反応可能となる^(24,28)。二次間質細胞は閉鎖へと向かう卵胞の内卵胞膜の細胞が肥大し、生後17日から蓄積されていく⁽²³⁾。卵胞上皮細胞（顆粒層細胞）はアンドロジェンをエストロジェンに転換するアロマターゼを有しているため、間質細胞が合成したテストステロン（あるいはアンドロステンジオ）は成長した排卵前の卵胞でのエストロジェン合成の基質となる⁽²⁹⁾。ER α をノックアウトしたマウスでは、間質細胞の出現が抑制されるとの報告がある⁽³⁰⁾。

DES 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を妊娠13日、15日、および17日に

投与すると、生後14日の卵胞のエストロゲン分泌量が増加するという報告がある⁽³¹⁾。本研究においてDESに暴露されると、生後6週の卵巣では卵胞の成長が促進されるとともに、卵巣髄質に多くの間質細胞の集団が出現した。間質細胞はER α の支配下にあるので、胎生期に多量のDESに暴露され、一部の卵胞はその成長が促進されたが、退行する卵胞の、その進行速度が促進され、結果として間質細胞の集団が多くなった可能性が考えられる。間質細胞が多く存在すれば、結果として卵胞上皮細胞から多くのエストロゲンが分泌され、卵胞の成長を促すと考えられる。

胎子を母体由来のエストロジェンの作用から防衛する α -フェトプロテインは生後23日に急激に減少し、結果として遊離エストロゲンが急激に増加することになるが、実際には生後21日からエストロゲンは負のフィードバック機構を介してFSH分泌の調節(抑制)を開始する^(32, 33)。しかし卵胞発育に関しては、卵胞上皮細胞(顆粒層細胞)から分泌されたエストロゲンは、FSHやLHと協同的に働いて、卵胞上皮細胞の増殖、ER発現、FSH受容体およびLH受容体の発現やアロマターゼ活性の増加を刺激する。本研究におけるDES 1.5群の血漿LH濃度は生後6週のみ、血漿FSH濃度は生後3および6週においてControl群と比較して有意に増加した。本来であれば15週のホルモン濃度も測定すべきであるが、ラットは6週前後で性周期が完成し、下垂体ホルモンは周期的に増減を繰り返すようになる。本研究では性周期についても検査は行ったが、性周期、特に発情期にサンプリングするためには多くの実験動物を使用することが必須であるため、成長後のホルモン濃度は測定しなかった。先行する実験でDESの投与は生後3週の卵胞成長程度を促進すること⁽¹⁵⁾が明らかであり、本実験で得られた結果も生後6週においてDESの投与が卵胞の成長を促進することを証明した。これらの卵胞成長の促進作用は、上記の間質細胞の増加による卵巣内エストロゲン量の増加とともに、これら下垂体ホルモンの増加によることが示唆される。しかしながら卵巣内のエストロゲンが増加するのであれば、負のフィードバック機構を介して下垂体ホルモンの分泌は抑制されるはずである。従って本研究で得られた下垂体ホルモンの増加がDES投与による直接的な作用である可能性も考えられる。

以上、本研究の結果から、母体に低濃度のDESを長期間投与すると、産子の卵胞の成長を促進すること、その作用経路はDES誘導性の間質細胞の増加による卵巣内エストロゲンの増加、および下垂体ホルモンの増加であることが示唆された。しかしこれらの促進作用は恒久的な作用ではないことも明らかとなった。

文 献

- 1) Bornstein, J., Adam, E., Adler-Storthz, K., and Kaufman, R. H., Development of cervical and vaginal squamous cell neoplasia as a late consequence of in utero exposure to diethylstilbestrol. *Obstet Gynecol. Surv.*, **43**, 15-21 (1988).
- 2) Gill, W. B., Schumacher, G. F., and Bibbo, M., Structural and functional abnormalities in the sex organs of male offspring of mothers treated with diethylstilbestrol (DES). *J. Reprod. Med.*, **16**, 147-153 (1976).
- 3) Whitehead, E. D., and Leiter, E., Genital abnormalities and abnormal semen analyses in male patients exposed to diethylstilbestrol in utero. *J. Urol.*, **125**, 47-50 (1981).
- 4) Marselos, M., and Tomatis, L., Diethylstilbestrol. II. Pharmacology, toxicology and carcinogenicity in experimental animals. *Eur. J. Cancer*, **29A**, 149-155 (1993).
- 5) Stillman, R. J., In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance and male and female offspring. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **142**, 905-921 (1982).
- 6) Arai, Y., Mori, T., Suzuki, Y., and Bern, H. A., Long-term effects of perinatal exposure to sex steroid and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. *Int. Rev. Cytol.*, **84**, 235-268 (1983).
- 7) Sharpe, R. M., Atanassova, N., Mckinnel, C., Parte, P., Turner, K. J., Fisher, J. S., Kerr, J. B., Groome, N. P., Macpherson, S., Millar, M. R., and Saunders, P. T. K., Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats reacted neonatally with diethylstilbestrol: a possible role for estrogens in Sertoli cell development. *Biol. Reprod.*, **59**, 1084-1094 (1998).
- 8) Fisher, J. S., Turner, K. J., Brown, D., and Sharpe, R. M., Effect of neonatal exposure to estrogenic compounds on development of the excurrent ducts of the rat testis through puberty to adulthood. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 397-405 (1999).
- 9) Haavisto, T., Nurmela, K., Pohjanvirta, R., Huuskonen, H., ElGhani, F., and Paranko, J., Prenatal testosterone and

- luteinizing hormone levels in male rats exposed during pregnancy to 2,3,7,8-tetrachlorodiabeno-p-dioxin and diethylstilbestrol. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **178**, 169-179 (2001).
- 10) Newbold, R. R., and McLachlan, J.A., Vaginal adenosis and adenocarcinoma in mice exposed prenatally or neonatally to diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, **M42**, 2003-2011 (1982).
 - 11) Vassilacopoulou, D., and Boylan, E. E., Mammary gland morphology and responsiveness to regulatory molecules following prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, **13**, 59-74 (1993).
 - 12) Baggs, R. B., Miller, R. K., and Odoroff, C. L., Carcinogenicity of diethylstilbestrol in the Wistar rat: effect of postnatal oral contraceptive steroid. *Cancer Res.*, **51**, 3311-3315 (1991).
 - 13) Rothschild, T. C., Calhoon, R. E., and Boylan, E. S., Genital tract abnormalities in female rats exposed to diethylstilbestrol in utero. *Reprod. Toxicol.*, **1**, 193-202 (1987-1988).
 - 14) Kitamura, T., Nishimura, S., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Takahashi, M., Shirai, T., and Maekawa, A., Transplacental administration of diethylstilbestrol (DES) causes lesions in female reproductive organ of Donryu rats, including endometrial neoplasia. *Cancer Lett.*, **141**, 219-228 (1999).
 - 15) Yamamoto, M., Shirai, M., Sugita, K., Nagai, N., Miura, Y., Mogi, R., Yamamoto, K., Tamura, A., and Arishima, K., Effects of maternal exposure to diethylstilbestrol on the development of the reproductive system and thyroid function in male and female rat offspring. *J. Toxicol. Sci.*, **28**, 385-394 (2003).
 - 16) Kuiper, G.G.J.M., Cairlsson, B., Grandien, K., Enmarke, E., Hägblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J. Å., Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, **138**, 863-870 (1997).
 - 17) Yamamoto, M., Shirai, M., Tamura, A., Kobayashi, T., Kohara, S., Murakami, M., and Arishima, K., Effects of maternal exposure to low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. *J. Toxicol. Sci.*, **28**, 385-394 (2003).
 - 18) Weniger, J. P., Estrogen production by fetal rat gonads. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **44**, 459-62 (1993).
 - 19) Weniger, J. P., Zeis, A., and Chouraqui, J., Estrogen production by fetal and infant rat ovaries. *Reprod. Nutr. Dev.*, **33**, 129-136 (1993).
 - 20) Vannier, B., and Raynaoud, J. P., Effect of estrogen plasma binding on sexual differentiation of the rat fetus. *Mol. Cell Endocrinol.*, **3**, 323-337 (1975).
 - 21) Sar, M., and Welsch, F., Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*, **140**, 963-971 (1999).
 - 22) Peters, H., and McNatty, K. P., The Ovary. A correlation of structure, and function in mammals. University of California Press, Berkeley and Los Angeles, California (1980).
 - 23) Guraya, S. S., and Uppal, J., Morphological and histochemical studies on the foetal and postnatal ovaries of the field rat (*Millardia meltdada*). *Acta Morphol. Neerl. Scand.*, **6**, 287-304 (1973).
 - 24) Sokka, T., and Huhtaniemi, I., Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *J. Endocrinol.*, **127**, 297-303 (1990).
 - 25) Gelety, T. J., and Magoffin, D. A., Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol. Reprod.*, **56**, 938-945 (1997).
 - 26) Zachow, R. J., Weitsman, S. R., and Magoffin, D. A., Hepatocyte growth factor regulates ovarian theca-interstitial cell differentiation and androgen production. *Endocrinology*, **138**, 691-697 (1997).
 - 27) Abhilasha, K. A., High androgen production by ovarian thecal interstitial cells: a mechanism for delayed ovulation in a tropical vespertilionid bat, *Scotophilus heathi*. *J. Reprod. Fertil.*, **106**, 207-211 (1996).
 - 28) Gelety, T. J., and Magoffin, D. A., Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca-interstitial cells in the rat: regulation by a paracrine theca-differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biol. Reprod.*, **56**, 938-945 (1997).
 - 29) Couse, J. F., Hewitt, S. C., and Korach, K. S., Steroid receptors in the ovary and uterus. In: Neill JD, ed. *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3rd ed. San Diego and Oxford: Elsevier Science; pp593-678 (2006).
 - 30) Couse, J. F., Yates, M. M., Karina F. Rodriguez, K. F., Johnson, J.A., Poirier, D., and Korach, K. S., The intra-ovarian actions of estrogen receptor- α are necessary to repress the formation of morphological and functional Leydig-like cells in the female gonad. *Endocrinology*, **147**, 3666-3678 (2006).
 - 31) Sari, A.P., Haavisto, T. E., Viluksela, M., Toppari, J., Paranko, J., Effects of in utero and lactational exposure

- to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on rat follicular steroidogenesis *Reprod. Toxicol.*, **22**, 521-528 (2006).
- 32) Raynaud, J. P., Mercie-Bodard, C., and Baulieu, E. E., Rat oestradiol binding plasma protein. *Steroids*, **18**, 767-788 (1971).
- 33) Puig-Duran, E., Greenstein, B. D., and Mackinnon, P. C. B., The effects of serum oestrogen-binding components on the unbound oestradiol-17 beta fraction in the serum of developing female rats and on inhibition of [³H]estradiol uptake by uterine tissue in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, **56**, 707-714 (1979).