

低用量 Diethylstilbestrol の妊娠ラットへの投与が 雌産子子宮の発達へ及ぼす影響

*Effects of Maternal Exposure to a Low Dose of Diethylstilbestrol
on the Development of the Uterus in 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 0.5 (DES 0.5 group) or 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (DES 1.5 group) to pregnant Sprague-Dawley (SD) rats daily from days 7 to 21 of gestation to investigate its effects on the development of uteri in female offspring. The lengths of uterine horn in the DES 1.5 group were significantly longer at 20 days of gestation and were significantly shorter at 3, 6 and 15 weeks after birth. The diameters of uterine horns in the DES 1.5 group were significantly larger at 3 and 6 weeks after birth. Furthermore the cell division index of the uterine epithelium in the DES 1.5 group was significantly increased. These observations indicate that prenatal exposure to a low dose of DES promotes the development of uteri in female SD offspring, but this stimulus effect is not permanent.

Key words: Diethylstilbestrol, Uterus, 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (DES 1.5 群あるいは DES 0.5 群) 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、産子の子宮の発達に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した。胎齢 20 日の DES1.5 群において、子宮角の長さが増加し、生後 3, 6 および 15 週の長さは短くなった。生後 3 および 6 週齢の DES1.5 群の子宮角の太さが増加した。さらに生後 1 週の子宮内膜上皮細胞の細胞分裂指数も有意に増加した。以上の結果から、胎生期に投与された低濃度の DES は雌産子の子宮の発達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

妊娠中における子宮内環境要因は、生後のヒト新生児の健康に影響するが、成体において現れる影響は高血圧症であったり心臓疾患であったりというように、

病気に至る場合、変異に至る場合、両者の場合と様々である⁽¹⁾。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: diethylstilbestrol) による人への暴露の歴史は、上記のような現象の痛ましい例である。DES は流産防止薬として 1948 年から 1971 年の

間妊婦に投薬され、生まれた娘が性成熟を迎えた時期や妊娠した時に初めて明らかとなる生殖道や卵巣の異常を誘発することが報告された⁽²⁾。DESを投与された妊婦の娘に腔の明細胞腺癌が確認されて以降、DESの使用は禁止されている⁽²⁾。

胎生期（胎齢12-18日）にマウスを低用量と高用量のDESに暴露すると、暴露された母体から生まれた子の子宮に対して、低容量のDESは促進作用を示し、高用量のDESは阻害作用を示す⁽³⁾。また、前立腺に対してもDESは同様の作用を有することが報告されている⁽⁴⁻⁶⁾。

しかし、本研究に先行する実験において、低容量のDES（1.5あるいは0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ）を長期間（妊娠6日目から妊娠21日目の期間）妊娠ラットに投与すると、雄産子では精巣のステロイド合成系と精子形成がかく乱される⁽⁷⁾が、雌産子では卵胞の成熟が促進されることが実証され⁽⁸⁾、低容量ではあっても雌雄で異なった作用が認められており、DESのラット産子に及ぼす影響は大変興味深いものがある。そこで本研究では、妊娠ラットに低用量のDESを長期間投与した場合、生まれた雌の子宮の発達が卵巣と同様に促進されるか、またその作用は恒久的なものであるかについて検証することを目的として実施した。

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^(8,9)において4.5, 3.0, 1.5あるいは0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与としたところ、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

胎齢20日、生後1, 3, 6および15週目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、子宮を採取した。胎子および生後1週目の子宮は背部体壁とともに、生後3週以降の子宮は、まず子宮を台紙にピンで保定した状態のままブアン液に固定した。固定後、実体顕微鏡の接眼レンズに装着されているマイクロメーターを用いて、胎子および生後1週目では、左右の子宮角の長さ、生後3週以降は子宮角の長さに加えて子宮の外径も計測した。

(4) 子宮の組織学的評価

ブアン液に固定した子宮は、定法によりアルコール脱水後、パラプラスチックに包埋した。包埋した切片は、生後1, 3週目においては回転式マイクロトームを用いて5 μm に、胎子、生後6, 15週目においては滑走式マイクロトームを用いて3 μm に薄切した。切片作製後、子宮組織における細胞増殖の変化を観察するため、増殖細胞核抗原（Proliferating Cell Nuclear Antigen：PCNA）に対するマウス monoclonal PCNA 血清（clone PC10；Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA 1:1000希釈）を用いてABC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を行った。その後、子宮内膜上皮細胞2000個中のPCNA陽性核をカウントし、その割合（細胞分裂指数）を算出した。

(5) 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

胎齢 20 日において、DES 1.5 群および DES 0.5 群の胎子体重はコントロール群の体重と比較して有意に増加していた (表 1)。

1 週齢において、DES 0.5 群の胎子体重は DES 1.5 群の体重と比較して有意に増加していた。

3 週齢以降において、体重の変化は見られなかった。

子宮角の長さおよび外径

胎齢 20 日および全ての週齢における子宮角の長さ、3 週齢以降の子宮角の外径を表 2 に示す。

[胎齢 20 日]

DES1.5 群の左右の子宮角の長さは、Control 群の子宮角の長さと比較して有意に増加していた。

[生後 1 週]

いずれの群も左右の子宮角の長さに変化は認められなかった。

[生後 3 週]

DES 1.5 群の左右の子宮角の長さは、DES 0.5 群および Control 群の長さと比較して有意に減少していた。

DES 1.5 群の左右の子宮角の外径は、DES 0.5 群および Control 群の外径と比較して有意に増加していた。

[生後 6 週および 15 週]

DES 1.5 群の左右の子宮角の長さは、Control 群の長さと比較して有意に減少した。生後 6 週齢の DES 1.5 群の左右の子宮角の外径は、DES 0.5 群および Control 群の外径と比較して有意に増加していた。しかし、生後 15 週になると差は見られなくなった。

子宮における細胞分裂の変化

生後 1 週齢の DES1.5 群の子宮内膜上皮細胞における細胞分裂指数 (上皮細胞全体に対する PCNA 陽性核の割合) が、Control 群の指数と比較して有意に増加した (表 3)。

図 1, 2 に子宮の組織的観察結果を示す。

表 1 ラット胎子および産子体重 (全て雌)

群	胎齢 20 日	1 週齢	3 週齢	6 週齢	15 週齢
Control	3.37 ± 0.05 [11] a	12.75 ± 0.32 [10] ab	46.37 ± 1.68 [10]	155.5 ± 5.3 [10]	292.5 ± 7.3 [10]
DES 0.5	3.92 ± 0.05 [12] b	13.57 ± 0.51 [10] a	47.34 ± 1.20 [9]	146.0 ± 4.1 [10]	285.3 ± 7.5 [10]
DES 1.5	3.78 ± 0.11 [12] b	11.79 ± 0.46 [10] b	42.53 ± 2.26 [10]	147.3 ± 6.4 [10]	287.2 ± 10.8 [10]

平均値 ± SEM。

[] : 測定した個体数。

a, b : 異なった文字間で統計学的に有意差あり (p < 0.05)。

表 2 DES を投与した妊娠ラット産子の子宮角の長さ及び子宮角の外径

群	胎齢 20 日	1 週齢	3 週齢	6 週齢	15 週齢										
子宮角の長さ 右側 (mm)	Control 3.07 ± 0.12 [11] a	DES 0.5 3.45 ± 0.14 [12] ab	DES 1.5 3.65 ± 0.15 [12] b	Control 5.90 ± 0.14 [6]	DES 0.5 6.18 ± 0.43 [6]	DES 1.5 5.55 ± 0.27 [6]	Control 14.27 ± 0.83 [6] a	DES 0.5 12.58 ± 0.83 [6] a	DES 1.5 10.29 ± 0.54 [6] b	Control 14.71 ± 0.75 [6] a	DES 0.5 12.98 ± 0.74 [6] ab	DES 1.5 11.33 ± 0.35 [6] b	Control 19.00 ± 0.73 [6] a	DES 0.5 17.00 ± 0.73 [6] ab	DES 1.5 16.17 ± 0.75 [6] b
子宮角の長さ 左側 (mm)	Control 3.36 ± 0.09 [11] a	DES 0.5 3.51 ± 0.20 [12] ab	DES 1.5 4.05 ± 0.16 [12] b	Control 6.82 ± 0.14 [6]	DES 0.5 6.65 ± 0.43 [6]	DES 1.5 6.33 ± 0.27 [6]	Control 14.03 ± 1.38 [6] a	DES 0.5 11.78 ± 0.63 [6] a	DES 1.5 9.95 ± 0.36 [6] b	Control 14.65 ± 0.59 [6] a	DES 0.5 13.15 ± 0.92 [6] ab	DES 1.5 11.90 ± 0.54 [6] b	Control 20.50 ± 0.50 [6] a	DES 0.5 17.83 ± 0.91 [6] ab	DES 1.5 15.67 ± 0.80 [6] b
子宮角の外径 右側 (mm)	Control	DES 0.5	DES 1.5	Control 0.87 ± 0.06 [6] a	DES 0.5 0.80 ± 0.06 [6] a	DES 1.5 1.02 ± 0.03 [6] b	Control 2.78 ± 0.18 [6] a	DES 0.5 2.79 ± 0.23 [6] a	DES 1.5 3.61 ± 0.18 [6] b	Control 3.58 ± 0.27 [6]	DES 0.5 3.83 ± 0.17 [6]	DES 1.5 4.17 ± 0.17 [6]			
子宮角の外径 左側 (mm)	Control	DES 0.5	DES 1.5	Control 0.97 ± 0.12 [6] a	DES 0.5 0.90 ± 0.06 [6] a	DES 1.5 1.15 ± 0.06 [6] b	Control 2.69 ± 0.23 [6] a	DES 0.5 2.66 ± 0.16 [6] a	DES 1.5 3.74 ± 0.18 [6] b	Control 3.67 ± 0.25 [6]	DES 0.5 4.00 ± 0.00 [6]	DES 1.5 4.25 ± 0.17 [6]			

平均値 ± SEM。

[] : 測定した個体数。

a, b : 異なった文字間で統計学的に有意差あり (p < 0.05)。

表3 DESを投与した妊娠ラット産子の子宮内膜上皮における細胞分裂指数

群	胎齢20日	1週齢	3週齢	6週齢	15週齢
Control	92.0 ± 3.40 [7]	81.6 ± 0.9 [5] ab	2.8 ± 0.7 [6]	27.5 ± 10.5 [5]	15.5 ± 6.0 [6]
DES 0.5	92.2 ± 2.40 [10]	76.5 ± 2.4 [5] a	4.4 ± 2.7 [5]	14.9 ± 4.5 [5]	5.0 ± 1.5 [6]
DES 1.5	96.4 ± 0.70 [12]	87.9 ± 2.7 [6] b	2.1 ± 0.2 [6]	17.1 ± 5.5 [6]	5.6 ± 2.4 [6]

平均値 ± SEM。

[] : 測定した個体数。

a, b : 異なった文字間で統計学的に有意差あり (p < 0.05)。

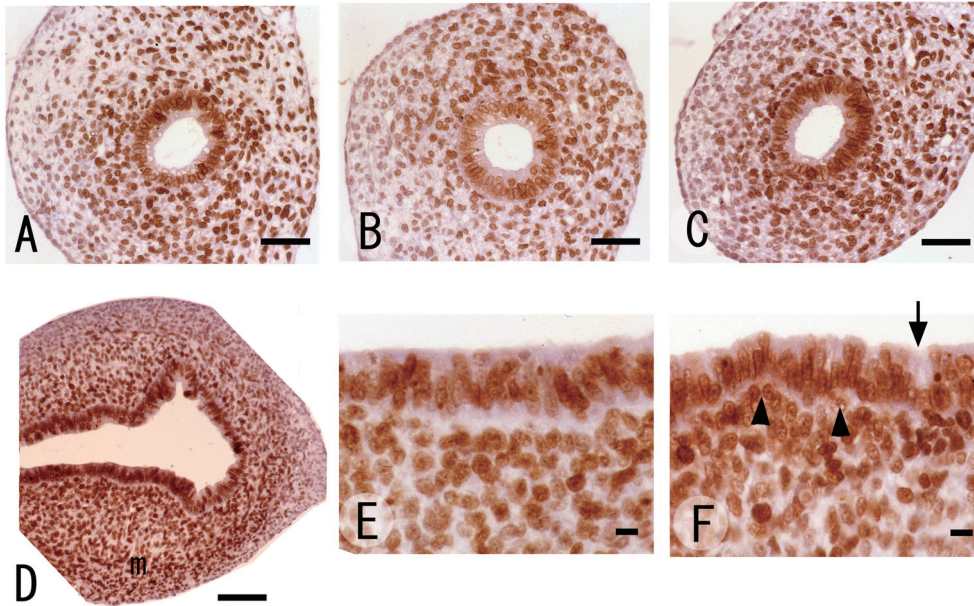


図1 胎生期DES投与がラット子宮の発達に及ぼす影響(胎齢20日および生後1週)。抗PCNAP血清を用いて免疫染色した子宮組織像。褐色の核を持った細胞が分裂している。

胎齢20日の子宮 (A : Control群, B : DES 0.5群, C : DES 1.5群)

子宮内膜上皮細胞はほとんどの細胞がPCNAに反応し、盛んな細胞分裂状態であった。上皮下の間葉細胞の盛んに細胞分裂していた。

生後1週の子宮 (D : Control群, E : DES 0.5群, F : DES 1.5群)

生後1週では、子宮内腔が拡張し、筋層(m)が形成されていた(D)。子宮内膜上皮細胞の多くの細胞が細胞分裂していた(E, F)。DES1.5群の上皮細胞の基底膜は波打っており(矢頭)、子宮腺形成の開始を窺わせる上皮の落ち込みも観察された(F: 矢印)。

※ 図中のスケールバーはA-C : 50µm, D : 100µm, E, F : 10µmを示す。

[胎齢20日]

胎齢20日の子宮内膜上皮は偽重層上皮であり、上皮下は間葉細胞の集団が取り巻いていた(図1A)。上皮細胞のほとんどが細胞分裂状態であることを示すPCNA陽性細胞であり、多くの間葉細胞もPCNA陽性であった。Control群(図1A)、DES0.5群(図1B)、およびDES1.5群(図1C)の子宮の組織像に有意な差は認められなかった。

[生後1週齢]

子宮内膜上皮下の組織には筋層が出現し、管腔が胎

子と比較して拡張していた(図1D)。子宮内膜上皮はまだ胎子と同様に偽重層上皮であったが、上皮の高さは高くなっていった(図1D)。子宮内膜上皮のほとんどがPCNA陽性であり、細胞増殖がさかに行われていることを示していた。DES1.5群の内膜上皮基底膜は波打ち、上皮の落ち込みも散見され、子宮腺形成開始の兆しが見られた(図1F: 矢印, 矢頭)。これに対しDES0.5群およびControl群の上皮にはあまり落ち込みが存在せず、上皮細胞基底膜はほぼ直線状であった(図1D, E)。

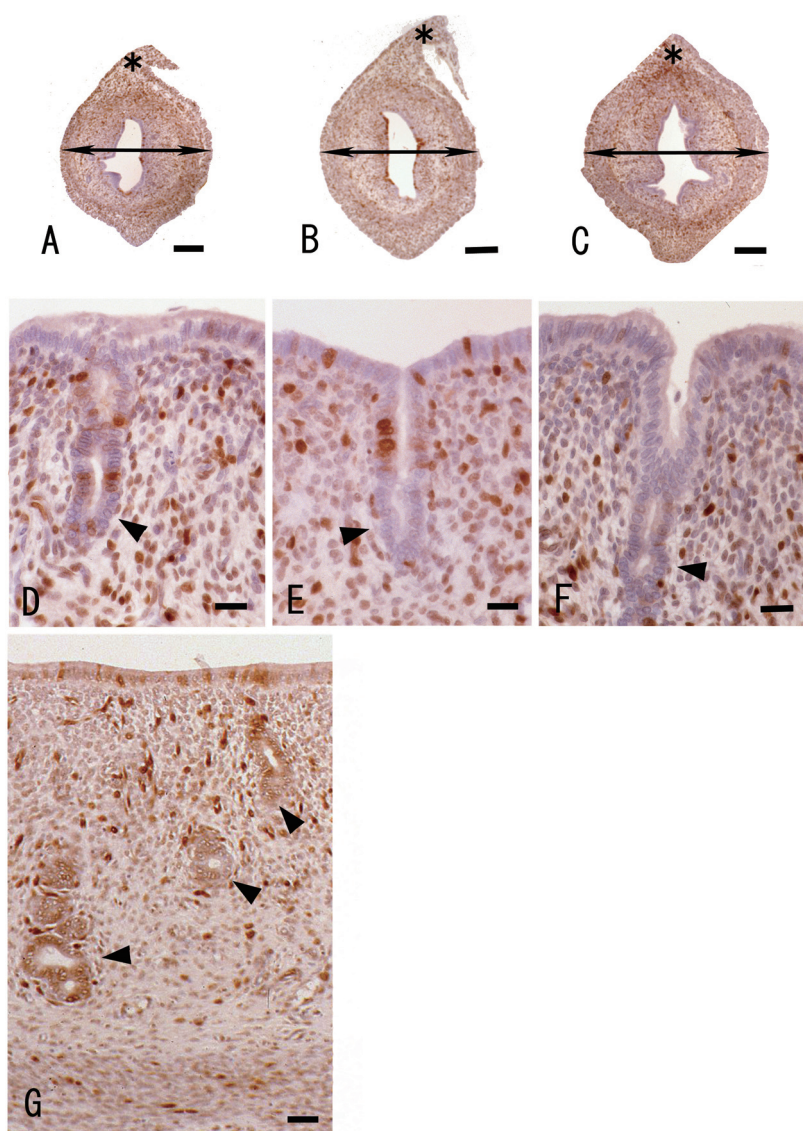


図2 胎生期 DES 投与がラット子宮の発達に及ぼす影響 (生後3および6週)。

生後3週では DES 1.5 群 (C) の子宮角外径 (⇔) が他の2群の外径 (A, B) に比べて増加していた。図の上方*は子宮広間膜。子宮腺 (矢頭) の形成が開始していた ((D: Control 群, E: DES 0.5 群, F: DES 1.5 群)。

生後6週では子宮腺 (矢頭) の形成が盛んであり, 子宮内膜固有層の多くの細胞が分裂していた。

※ 図中のスケールバーは A-C: 200 μ m, D-F: 20 μ m, G: 10 μ m を示す。

[生後3週齢]

DES1.5 群の子宮外径は他の2群の子宮に比べて増加していた (図 2A-C)。生後1週齢の子宮に比べて筋層がさらに発達し, 内膜上皮, 内膜固有層, 筋層にははっきりと識別できるようになった。Control 群の子宮内膜上皮は偽重層上皮から単層円柱上皮へと分化し, 上皮の内膜固有層への落ち込み, 子宮腺の形成が開始していた。上皮が落ち込んで形成された腺底部には PCNA 陽性核がみられた。子宮内膜上皮における

PCNA 陽性核はまばらに存在していた。内膜固有層において, PCNA 陽性細胞が多数みられ, 子宮腺が形成されていた。また, 子宮腺および子宮腺の周囲の細胞に PCNA 陽性核がみられた (図 2A, D)。DES1.5 群の子宮は内膜固有層が肥厚したため他の2群 (図 2B, C, E, F) の外径と比べて増加しているように思われ, 子宮腺も良く発達していた (図 2C, F)。

[生後6週齢]

生後6週齢の子宮は、生後3週に比べて子宮内膜固有層、子宮腺、筋層が著しく発達していた。また、発情の変化に伴い、個体毎に子宮内膜上皮、内膜固有層、子宮腺の発達が多様化していた。

子宮内膜上皮は主に単層立方上皮でありPCNA陽性核は多数みられた。子宮内膜上皮が立方上皮である場合、PCNA陽性核が多数みられた。また、子宮内膜上皮が立方上皮から円柱上皮である場合は、PCNA陽性核はまばらに存在していた。子宮内膜上皮に多数の落ち込みをつくっていた個体もあった。内膜固有層は肥厚していたものと、薄いものがあり、PCNA陽性核はほとんどみられなかった。子宮腺が小型で、数が少ない場合はPCNA陽性核の割合が高かった。また逆に子宮腺が大きく発達している場合は、PCNA陽性核がみられなかった。筋層にはPCNA陽性核が多数みられる個体と、そうでない個体があった。筋層にPCNA陽性核がみられる個体では、筋層、内膜固有層を貫いている血管の内皮細胞に多数PCNA陽性核がみられた。

考 察

本研究はラットの雌を用い、これまでの実験^(7,8)で得られた雄の精巣機能を抑制する2用量のDES 1.5あるいは0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を器官形成期に投与し、胎子および生後の子宮の細胞増殖にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

妊娠17日目および19日目にDES 0.01あるいは0.1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$ のDESを投与すると、7週齢の体重が減少するという報告がある⁽¹⁰⁾。また、妊娠6日から18日にDES 45 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を経口投与すると、1週齢の子の体重は、コントロール群と比較して有意に減少するという報告もある⁽¹¹⁾。しかし本研究では、3週齢以降で体重の変化はなかったが、胎齢20日ではコントロール群と比較してDES投与群の胎子体重は有意に増加した。また1週齢では、DES 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与した群と比較して有意に増加した。器官形成期に本研究で用いた量のDESを投与すると、雌では初期の段階で体重増加に促進的に作用したと考えるが、成熟後にまでその作用は持続しないと考えられる。本研究と比較して、投与量の多寡および投与期間が異なること

によって体重の変化が全く異なると思われる。

妊娠16日から20日のCDラット(SDラットを起源とする)にDES 0.004, 0.04, あるいは0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を皮下投与すると、胎齢20日の子宮重量は、低用量のDESを投与した場合は増加し、高用量を投与した場合は減少したという報告がある⁽¹²⁾。また、出生1日から5日にDES 0.1 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$ あるいは10 $\mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$ を投与すると、直後は子宮重量と内膜上皮の高さが増加するが、次第にその効力は失われるという報告もある⁽¹³⁾。本研究において、子宮重量は測定しなかったが、子宮角の長さや外径を測定したところ、胎齢20日において、DES 1.5群の左右の子宮角の長さが、Control群と比較して有意に増加した。しかし、子宮内膜上皮の細胞分裂指数に統計学的な有意差はなかったが、DES投与群の指数はコントロール群と比較してやや増加傾向にあった。1週齢において、左右の子宮角の長さに変化はなかったが、DES 1.5群の子宮内膜上皮における細胞分裂指数は、DES 0.5群と比較して有意に増加した。しかしながら6週齢以降においては、ほとんど変化がみられなかった。

ラット胎子の卵巣はエストロジェンを合成せず、新生子で初めて卵巣内にエストロジェンが検出される^(14,15)。胎生期後半から新生子期にかけて、ラットの体内にはエストロジェンに対して高い結合力を持つ α -フェトプロテインが、母体由来のエストロジェンと結合し、結果として細胞内への移行を阻止する防御機構が存在する⁽¹⁶⁾。また、母親の体内のエストロジェンは血液中にある輸送タンパク質と結合しており⁽¹⁷⁾、結合したエストロジェンは胎盤を通過できない。しかし、DESは輸送タンパク質と結合しないため、胎盤を通過し、AFPとは結合せず、胎子組織に分布するエストロジェン・レセプター(ER)と結合することができる。ERは、成熟ラットの子宮では、子宮内膜上皮、子宮腺上皮、内膜固有層、および平滑筋層で観察される^(18,19)。齧歯類の胎生期雌生殖道にER α が存在するかどうかの論争がしばらく続いていたが、Okadaら⁽²⁰⁾は、SDラットの胎子では、胎齢17.5日(本研究の胎齢17日に相当)にミューラー管の上皮細胞と間葉細胞に存在することを実証した。さらに、ミューラー管には同時期に細胞分裂を調節する上皮成長因子の存在も実証されている⁽²¹⁾。従って、本研究の胎生期に投与されたDESは胎盤を経由

して胎子に到達し、将来子宮に分化するミューラー管の ER α を介してその効力、特に細胞分裂の促進を発揮することが可能である。その結果として DES1.5 群の生後 1 週齢での子宮上皮における細胞分裂指数の増加につながったと考えられる。

これまでの実験において血漿 LH 濃度と FSH 濃度を測定したところ、3 週齢において、両 DES 投与群の血漿中 FSH 濃度は、Control 群と比較して有意に増加した⁽²²⁾。FSH は濾胞の成長やエストロゲン分泌を促進し、分泌が促されたエストロゲンは子宮に対して、子宮内膜固有層の増殖肥厚、平滑筋の増大、子宮腺の発達を促す。本研究では血漿中のエストロゲン濃度の測定を行っていないが、3 週齢の DES 投与群において、子宮腺形成の特徴である子宮内膜上皮の落ち込みが多く観察され、子宮腺がよく発達していたのは、FSH 濃度が高くなったことによりエストロゲン作用を促進させたと考えられる。また、3 および 6 週齢の子宮角の外径は、DES1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与した群が最も太くなっており、血漿中 FSH 濃度が増加し、エストロゲン作用による内膜固有層の肥厚、子宮腺の発達により子宮角の外径が太くなったと考えられる。6 週齢において、DES 1.5 群の血漿中 FSH 濃度は DES 0.5 群のホルモン濃度と比較して有意に増加した。この時期にはすでに発情の周期性が確立し始める時期のために個体差が大きく、また子宮内膜上皮における PCNA 陽性核の割合も統一した変化はみられず、血漿中 FSH 濃度の増加によって、どのような影響を及ぼしたどうかは分からなかった。

出生後に DES を処置した成熟した雄雌ラットの生殖器に、ER α ではなく ER β の発現が変化したという報告がある^(23, 24)。また、胎齢 15 日から 19 日に高用量の DES 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与すると、胎齢 19.5 日の雌ラットのミューラー管中間領域（将来子宮に分化）における上皮増殖因子である EGF、ER β 1 および ER β 2 の mRNA 量の発現を抑制し、その結果、細胞分裂の調節が乱されるのであろうという報告がある⁽²¹⁾が、本研究で用いた DES 投与量はかなり低レベルであるので、前述の結果と比較することはできない。低用量の DES 投与は子宮重量を増加させる⁽¹²⁾ことから、本研究で観察された DES 投与による子宮外径の増加は、胎子ミューラー管の ER だけではなく他の成長因子を介して、子宮内膜上皮細胞の分裂や子宮内膜

固有層の発達を促進したものと考えられる。また、この時血漿中 FSH 濃度が増加していたことから、DES 投与による子宮内膜固有層の発達の促進効果の一部は FSH によるものと思われる。

DES の投与は子宮角の外径を大きくしたが、長さは短縮されていた。今後さらに詳細な検討が必要ではあるが、低用量の DES 投与は子宮角の太さに対しては促進作用を有するが、長さに対して促進的に作用しない可能性が考えられる。

胎齢 17 日から 19 日にかけて、DES 0.01 mg/kg あるいは 0.1 mg/kg を投与すると、子宮のアデノカルシノーマが誘発される⁽¹⁰⁾など、DES 投与による様々な生殖器のさまざまな異常が報告されているが、いずれも高用量の DES を投与した場合である。

以上、本研究の観察結果から、雄の精巣機能をかく乱する低濃度の DES の母体投与は、細胞分裂の増強によって雌産子の子宮の発達を促進するが、その作用は恒久的なものではないことが示唆された。

文 献

- 1) Sallout, B., Walker, M., The fetal origin of adult diseases. *J Obstet. Gynaecol.*, **23**, 555-560 (2003).
- 2) Herbst, A. L., Anderson, D., Clear cell adenocarcinoma of the vagina and cervix secondary to intrauterine exposure to diethylstilbestrol. *Semin. Surg. Oncol.*, **6**, 343-346 (1990).
- 3) Alworth, L. C., Howdeshell, K. L., Ruhlen, R. L., Day, J.K., Lubahn, D. B., Huang, T. H-M., Besch-Williford, C. L., and vom Saal, F. S., Uterine responsiveness to estradiol and DNA methylation are altered by fetal exposure to diethylstilbestrol and methoxychlor in CD-1 mice: Effects of low versus high doses. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **183**, 10-22 (2002).
- 4) vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., and Welshons, W. V., Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2056-2061 (1997).
- 5) Welshons, W. V., Nagel, S. C., Thayer, K. A., Judy, B. M., and vom Saal, F. S., Development of in vitro assays to predict activity of xenoestrogens in animals: Fetal exposure to methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol. Ind. Health*, **15**, 12-25

- (1999).
- 6) Gupta, C., Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **224**, 61-68 (2000).
 - 7) Kobayashi, K., Shirai, M., Sakaue, M., Murakami, M., Ochiai, H., Arishima, K., and Yamamoto, M., Effects of maternal exposure to low doses of DES on testicular steroidogenesis and spermatogenesis in male rat offspring. *J. Reprod. Dev.*, **55**, 629-637 (2009).
 - 8) Yamamoto, M., Shirai, M., Sugita, K., Nagai, N., Miura, Y., Mogi, R., Yamamoto, K., Tamura, A. and Arishima, K., Effect 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).
 - 9) Yamamoto, M., Shirai, M., Tamura, A., Kobayashi, T., Kohara, S., Murakami, M., and Arishima, K., Effects of maternal exposure to a low dose of diethylstilbestrol on sexual dimorphic nucleus volume and male reproductive system in rat offspring. *J. Toxicol. Sci.*, **30**, 7-18 (2005).
 - 10) Kitamura, Y., Nishimura, S., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Takahasji, M., Shirai, T., and Maekawa, A., Transplental administration of diethylstilbestrol(DES) causes lesions in females reproductive organs of Donryu rats, including endometrial neoplasia. *Cancer Letter*, **141**, 219-228 (1999).
 - 11) Clenenger, W. R., Cornwall, G. A., Carter, M. W., and Bradshaw, W. S., Diethylstilbestrol-induced perinatal lethality in the rat. I. Relationship to reduced maternal weight gain. *Biol. Reprod.*, **44**, 575-582 (1991).
 - 12) Harmon, J. R., Branham, W. S., and Sheehan, D. M., Transplacental estrogen responses in the fetal rat: increased uterine weight and ornithine decarboxylase activity. *Teratology*, **39**, 253-260 (1989).
 - 13) Branham, W. S., Zehr, D. R., Chen, J.J., and Sheehan, D. M., Uterine abnormalities in rats exposed neonatally to diethylstilbestrol, ethynylestradiol, or clomiphene citrate. *Toxicology*, **51**, 201-212 (1988).
 - 14) Weniger, J. P., Estrogen production by fetal rat gonads. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **44**, 459-62 (1993).
 - 15) Weniger, J. P., Zeis, A., and Chouraqui, J., Estrogen production by fetal and infant rat ovaries. *Reprod. Nutr. Dev.*, **33**, 129-136 (1993).
 - 16) Raynaud, J. P., Mercie-Bodard, C., and Baulieu, E. E., Rat oestradiol binding plasma protein. *Steroids*, **18**, 767-788 (1971).
 - 17) Raynaud, J. P., Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. *Steroids*, **21**, 249-258 (1973).
 - 18) Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Aorimo, W., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y., and Muramatsu, M., Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *J. Mol. Endocrinol.*, **22**, 37-44 (1999).
 - 19) Pelletier, G., C Labrie, C., and Labrie, F., Localization of oestrogen receptor α , oestrogen β and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J. Endocrinol.*, **165**, 359-370 (2000).
 - 20) Okada, A., Ohta, Y., Buchanan, D., Sato, T., and Iguchi, T., Effect of estrogens on ontogenetic expression of progesterone receptor in the fetal female rat reproductive tract. *Mol. Cell Endocrinol.*, **195**, 55-64 (2002).
 - 21) Okada, A., Sato, T., Ohta, Y., Buchanan, D. L., and Iguchi, T., Effect of diethylstilbestrol on cell proliferation and expression of epidermal growth factor in the female rat reproductive tract. *J. Endocrinol.*, **170**, 539-554 (2001).
 - 22) 西川修, 政岡俊夫, 有嶋和義 低容量 Diethylstilbestrol の妊娠母体への投与が雌産子の卵胞の成長へ及ぼす影響, 麻布大学雑誌 投稿中
 - 23) Sato, T., Chiba, A., Hayashi, S., Okamura, H., Ohta, Y., Takasugi, N., and Iguchi, T., Induction of estrogen receptor and cell division in genital tracts of male mice by neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Reprod. Toxicol.*, **8**, 145-153 (1994).
 - 24) Atanassova, N. McKinnell, C., William, K., Turner, K. J., Fisher, J. S., Saunders, P. T. K., Millar, M. R., Sharpe, R. M., Age-, cell- and region-specific immunoreexpression of estrogen receptor alpha (but not estrogen receptor beta) during postnatal development of the epididymis and vas deferens of the rat and disruption of this pattern by neonatal treatment with diethylstilbestrol. *Endocrinology*, **142**, 874-886 (2001).