

合成エストロジェンの胎生期暴露が生後の 内分泌機能へ及ぼす影響

Effects of maternal exposure to synthetic estrogen on the function of endocrine organs in male and female offspring

山本雅子, 有嶋和義, 村上 賢

麻布大学大学院獣医学研究科

Masako Yamamoto, Kazuyoshi Arishima and Masaru Murakami

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract. Diethylstilbestrol (DES) was administered subcutaneously at 1.5 or 15 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) (DES 1.5 group, DES 15 group) to pregnant SD rats daily on days 7-21 of gestation to investigate its effects on the development and functions of the reproductive system and thyroid gland in their offspring. Of the 11 pregnant rats in the DES 15 group, only one delivered a live pup. Pups in the DES 1.5 group were autopsied at 1, 3, or 6 weeks after birth. In the DES 1.5 group, the plasma T4 concentrations at all weeks of age at autopsy were significantly increased, the TSH concentration at 6 weeks of age was also significantly increased, and the height of thyroid follicular epithelial cells was increased at 3 weeks. The testosterone concentration in the DES 1.5 group at 6 weeks was significantly decreased and the plasma LH concentration was increased. The DES treatment increased the plasma FSH concentration in female pups at 3 weeks, increased the percentages of primary and secondary ovarian follicles, and decreased the percentage of primordial follicles. These observations indicate that prenatally administered DES increases thyroid function, and has an inhibitory effect on testicular function and a promoting effect on maturation of ovarian follicles.

目 的

近年、化学物質による内分泌かく乱の問題は世界的に注目されており、現在、スクリーニング試験法の開発とメカニズムの解明が精力的に行われている。陽性対照物質としては女性ホルモン作用を示す合成女性ホルモン（ジエチルスチルベステロール：DES）が用いられている。DESが器官形成期に多量に投与された場合、胎子の体内のホルモンバランスを大きく崩す可能性が考えられる。例えば、生後のラットにおいては性ホルモンが視床下部-下垂体-副腎系の発達に大きく関わっていることが解明されつつあり、

体内のホルモンバランスの崩れは、他のホルモンの作用にも影響することから、従来考えられてきたDESの作用は、さらに複雑化する可能性が考えられる。

本研究においては、実験動物としてラットを用い、器官形成期に経胎盤でDESを投与し、1) 生後の雌雄の生殖器の発達と機能、2) 主要な内分泌腺の機能、にどのような作用を及ぼすかについて検討し、今後のDESの作用を検討する上で基礎となるデータの収集に重点をおいた。

材料と方法

1) 実験動物

SDラット（日本エスエルシー）を用いた。妊娠3日目の状態で業者から搬入された妊娠ラットは麻布大学附置生物科学総合研究所内で飼育した。ラットは一定の明暗周期（12時間明期，12時間暗期）及び20 ± 2℃，湿度55 ± 10%に設定された麻布大学附置生物科学総合研究所内の動物室において飼育した。飼料（CE-2，日本クレア）と水を自由に与えた。

2) DES投与方法

DES（SIGMA）の投与量は1.5 µg/kg/day及び15 µg/kg/dayとし，妊娠7日目から21日目まで1日1回連日反復投与した。投与方法は皮下注射によった。コントロール群としてコーンオイルのみを投与した。各群の動物数は13匹とした。妊娠ラットは自然分娩させ，生後4日目に産子数を雌雄4匹ずつ，総計8匹に調整した。子ラットは生後21日目に離乳させた。産子の剖検は生後1週，3週，6週に行った。

3) 剖検

剖検時，まず子の体重を測定後，エーテル麻酔下で開腹後，腹大動脈からヘパリン処置した注射針を用いて採血した。採取した血液は遠心分離後，血漿を-80℃において保存した。次いで，甲状腺，副腎，雄の場合は精巣，精巣上部，前立腺（前立腺は生後1週の剖検時には採取せず），雌の場合は卵巣を採取した。甲状腺，副腎，精巣，精巣上部，前立腺及び卵巣は重量を測定した。

4) 血漿ホルモン・アッセイ

血漿中のホルモンは以下の6種類についてアッセイした。甲状腺ホルモン（T4）はDPC・トータルT₄・キット（Diagnostic Products Co., USA），コルチコステロンはrat corticosterone [¹²⁵I] assay system（Amersham Pharmacia Biotech, UK），テストステロンはDPC・トータルテストステロン・キット（Diagnostic Products Co., USA）を用いてradioimmunoassay（RIA）によって測定した。測定は麻布大学附置生物科学総合研究所内のRIA施設内で行い，放射活性はガンマカウンターによって測定した。甲状腺刺激ホルモン

（TSH），濾胞刺激ホルモン（FSH）及び黄体形成ホルモン（LH）は，rat TSH enzyme immunoassay system，rat FSH enzyme immunoassay system及びrat LH enzyme immunoassay system（Amersham Pharmacia Biotech, UK）を用いて測定した。

5) 甲状腺の形態計測

染色した甲状腺の組織切片は画像解析装置（Image Command 5098，オリンパス工業株式会社）を用いて甲状腺の濾胞上皮細胞の高さ及び濾胞の短径（a）と長径（b）を計測した。濾胞の大きさは短径と長径を乗じた値の平方根で表した（ \sqrt{ab} ）。計測は1個体あたり40個の濾胞について行った。

6) 卵胞成熟程度の数値化

卵巣の連続切片を用いて，生後3週及び6週の卵巣内に存在する卵胞の成熟程度を検討するため，全ての卵胞数を顕微鏡下でカウントした。その際，卵胞は原始卵胞，一次卵胞，二次卵胞及び成熟卵胞に区別してカウントした。

結果と考察

1) 一般的観察結果

DES 15 µg/kg/day 投与群のほとんどの妊娠動物は投与開始1週間後から腔に出血が確認されるようになり，出産した動物はわずか1匹であり，出産した子は1匹だけであった。DES 1.5 µg/kg/day 投与群の動物は，13匹投与実験に用いたが，実際に妊娠していたのは10匹であった。その全数が出産したが10匹のうち4匹が出産後2日目までに産子の死亡が確認された。コントロール群の動物は，13匹投与実験に用いたが，実際に妊娠していたのは11匹であった。その全数が出産したが，そのうち1匹死産，もう1匹は出産翌日に産子の死亡が確認された。

本実験のDES投与量はBoylan（1）の結果を参考に決定した。Boylanは妊娠期間を3等分した第2期（second trimester）に高用量のDESを投与すると妊娠の維持に重大な影響を与えると述べている。本実験の結果から，妊娠7日目から21日目のDES 15 µg/kg/day 投与は，妊娠の維持に多大な阻害作用を有することが明かとなった。以降の実験結果はDES 1.5 µg/kg/day 投与群（DES 1.5群）とコントロール群

のデータを掲載する。

2) 体重及び臓器重量 (Table 1a, 1b)

胎生期でのDES投与は、体重及び臓器重量 (精巣

Table 1a. Effects of prenatal exposure to DES on body weight and the weight of the thyroid gland and adrenal gland.

	Group	Sex	1 week	3 weeks	6 weeks
Body W. (g)	Control	♂	13.1 ± 0.5 [9]	47.0 ± 1.8 [10]	190.5 ± 6.7 [10]
		♀	12.8 ± 0.5 [9]	41.9 ± 1.1 [10]	155.7 ± 3.2 [16]
	DES 1.5	♂	12.0 ± 0.5 [6]	47.0 ± 1.9 [6]	192.6 ± 5.7 [6]
		♀	11.6 ± 0.6 [7]	43.7 ± 1.3 [7]	164.0 ± 2.6 [7]
Thyroid W. (mg)	Control	♂	1.6 ± 0.1 [9]	6.3 ± 0.7 [10]	14.7 ± 0.5 [10]
		♀	1.4 ± 0.1 [9]	4.6 ± 0.4 [10]	12.1 ± 0.7 [15]
	DES 1.5	♂	1.3 ± 0.2 [6]	4.6 ± 0.5 [6]	14.5 ± 0.9 [6]
		♀	1.2 ± 0.2 [7]	5.3 ± 0.4 [7]	11.0 ± 0.5 [7]
Thy. W./B.W. (mg/100 g)	Control	♂	12.2 ± 0.5 [9]	13.3 ± 1.1 [10]	7.6 ± 0.2 [10]
		♀	11.9 ± 0.9 [9]	10.9 ± 0.9 [10]	7.8 ± 0.4 [15]
	DES 1.5	♂	11.0 ± 1.5 [6]	9.6 ± 0.8 [6]*	7.5 ± 0.4 [6]
		♀	10.4 ± 1.3 [7]	12.1 ± 1.0 [7]	7.1 ± 0.5 [7]
Adrenal W. (mg)	Control	♂	2.7 ± 0.2 [8]	15.1 ± 0.8 [10]	32.3 ± 1.0 [10]
		♀	2.8 ± 0.2 [9]	14.4 ± 0.8 [10]	38.3 ± 1.2 [16]
	DES 1.5	♂	2.6 ± 0.3 [5]	16.2 ± 1.1 [6]	34.1 ± 1.2 [6]
		♀	2.9 ± 0.2 [7]	17.8 ± 0.7 [7]	41.6 ± 1.3 [6]
Adr. W./B.W. (mg/100g)	Control	♂	20.6 ± 1.5 [8]	32.0 ± 0.9 [10]	17.0 ± 0.6 [10]
		♀	21.7 ± 0.9 [9]	34.1 ± 1.5 [10]	24.6 ± 0.7 [16]
	DES 1.5	♂	21.9 ± 2.3 [5]	34.4 ± 1.3 [6]	17.7 ± 0.5 [6]
		♀	24.8 ± 1.3 [7]	40.8 ± 1.6 [7]	25.6 ± 1.1 [6]

[] : No. of offspring

* : Significantly different from control values ($p < 0.05$).

Table 1b. Effects of prenatal exposure to DES on the weight of testis, epididymis and ovary.

	Group	Sex	1 week	3 weeks	6 weeks
Testicular W. (mg)	Control	♂	20.5 ± 1.3 [9]	214.5 ± 8.3 [10]	1820 ± 76 [10]
	DES 1.5	♂	18.9 ± 1.4 [6]	228.4 ± 7.9 [6]	1923 ± 90 [16]
Test.W./B.W.	Control	♂	157.6 ± 9.5 [9]	457.3 ± 5.8 [10]	357 ± 33 [10]
	DES 1.5	♂	157.1 ± 8.2 [6]	487.3 ± 9.2 [6]*	1000 ± 35 [6]
Epididymis W. (mg)	Control	♂	13.1 ± 1.0 [9]	62.5 ± 4.5 [10]	341.0 ± 14.6 [10]
	DES 1.5	♂	14.8 ± 1.2 [6]	59.3 ± 2.2 [6]	268.5 ± 18.9 [6]*
Ep.W./B.W. (mg/100 g)	Control	♂	101.0 ± 8.2 [9]	134.8 ± 11.2 [10]	181.2 ± 10.5 [10]
	DES 1.5	♂	123.7 ± 8.9 [6]	126.8 ± 4.2 [6]	139.1 ± 7.8 [6]*
Ovary W. (mg)	Control	♀	0.9 ± 0.0 [9]	14.0 ± 0.9 [10]	57.0 ± 2.8 [10]
	DES 1.5	♀	0.8 ± 0.0 [7]	15.1 ± 0.8 [7]	55.3 ± 4.2 [7]
Ov. W./B.W. (mg/100 g)	Control	♀	7.1 ± 0.4 [9]	33.5 ± 2.1 [10]	36.2 ± 1.5 [10]
	DES 1.5	♀	7.0 ± 0.6 [7]	34.7 ± 1.6 [7]	33.9 ± 2.6 [7]

[] : No. of offspring

* : Significantly different from control values ($p < 0.05$).

Table 2. Effects of prenatal exposure to DES on plasma T4 concentrations and histological parameters of thyroid glands.

	Group	1 week		3 weeks		6 weeks	
T4 (ng/ml)	Control	8.3 ± 0.8	[10]	25.5 ± 2.2	[11]	25.0 ± 2.0	[11]
	DES 1.5	15.5 ± 0.1	[10]*	31.5 ± 1.6	[12]*	33.5 ± 1.7	[12]*
TSH (ng/ml)	Control	17.6 ± 1.4	[6]	27.7 ± 2.3	[7]	39.5 ± 3.4	[7]
	DES 1.5	21.4 ± 1.9	[6]	34.9 ± 3.9	[7]	58.1 ± 6.9	[7]*
Diameter of Follicle (μm)	Control	51.4 ± 1.4	[10]	90.9 ± 2.6	[10]	123.7 ± 4.0	[10]
	DES 1.5	47.5 ± 1.1	[10]*	88.2 ± 2.4	[10]	120.9 ± 4.8	[10]
Follicular epithelial cell height (μ)	Control	5.9 ± 0.2	[10]	7.7 ± 0.2	[10]	10.2 ± 0.3	[10]
	DES 1.5	5.9 ± 0.1	[10]	8.4 ± 0.3	[10]*	11.0 ± 0.8	[10]

[]: No. of samples.

*: Significantly different from control values ($p < 0.05$)

上体を除く)へ大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

3) 甲状腺への影響 (Table 2)

DES 1.5 群の血漿 T4 濃度はいずれの測定時期においてもコントロール群の濃度に比べて統計学的に有意に増加していた。生後6週において、DES 1.5 群の TSH 濃度はコントロール群の濃度に比べて有意に上昇していた。

血漿 T4 濃度が変化したので、甲状腺自身がどのような状態であるかを評価するため、画像解析装置を用いて濾胞上皮細胞の高さならびに濾胞の大きさを計測した。甲状腺濾胞上皮細胞の高さは、生後3週の投与群においてコントロール群と比べて有意に増加していたが、それ以外の週齢では上皮細胞の高さに変化はみられなかった。

本実験において DES 投与群の血漿 T4 濃度が、計測した全ての週齢において増加していた。投与時期の如何を問わず DES の投与が T4 濃度に変化を与えするという研究報告はこれまでのところみあたらないが、Kimらは、生後21日の雌ラットに20日間、数種のホルモン作用物質を投与した場合、DES の投与は T3 を増加させ、テストステロンの投与は T4 を減少させたと報告している (2)。一般的に、T4 を運搬する thyroxine-binding globulin (TBG) は肝臓で合成され、女性ホルモンの投与は TBG 合成量を増加させ、男性ホルモンや糖質コルチコイドは減少させ、また、TBG 量とトータル T4 レベルは平行な動態を示すので、TBG 量が増加すればトータル T4 も増加す

ると考えられている (3)。従って本実験において観察された血漿 T4 濃度の増加は、妊娠母体に投与された DES が胎盤経由で胎子へ移行して胎子 TBG 合成量を増加させ、生後もその影響が残ったためと推測することもできる。また、T4 レベルの増加の要因を検討するために下垂体から分泌される甲状腺刺激ホルモン (TSH) を測定したところ、生後6週の投与群のみがコントロール群に比べて有意に増加していた。さらに、甲状腺の形態的な変化は機能状態の指標となりうるので (4)、形態計測学的に検討した結果、生後3週において、投与群の濾胞上皮細胞の高さが増加していた。これらの結果を考えると、DES の経胎盤性の暴露は産子の下垂体-甲状腺系を活性化したと考えられる。

4) 血漿ホルモン濃度の変化 (Table 3)

本実験においてテストステロン濃度の測定に用いたトータル テストステロン・アッセイ・キットは、抽出などの前処理を必要としない手法であり、最小検出濃度も 0.4 ng/ml とかなり精度は高いが、生後3週ではテストステロンを検出できなかった。これは精巣がテストステロンを分泌していないことを意味するのではなく、血漿中には使用したキットの検出限界より低い濃度のテストステロンしか存在しないと考えられる。投与群の生後6週のテストステロン濃度はコントロール群の濃度と比較して統計学的に有意に減少していた。

本実験において用いた雌ラットは受精後56から57日に陰が開いたので、生後6週では血漿 FSH 及び

Table 3. Effects of prenatal exposure to DES on plasma hormone concentrations.

Hormone	Group	Sex	3 weeks		6 weeks	
Testosterone (ng/ml)	Control	♂	nd	[10]	674 ± 238	[10]
	DES 1.5	♂	nd	[6]	50 ± 25	[6]*
FSH (ng/ml)	Control	♂	3.3 ± 2.0	[7]	19.7 ± 6.4	[8]
	DES 1.5	♂	40.9 ± 10.8	[6]*	42.7 ± 6.7	[5]*
	Control	♀	8.3 ± 2.5	[6]		
	DES 1.5	♀	25.2 ± 6.4	[5]*		
LH (ng/ml)	Control	♂	1.75 ± 0.44	[7]	8.97 ± 1.25	[8]
	DES 1.5	♂	7.72 ± 3.33	[6]	14.73 ± 2.84	[5]
	Control	♀	5.29 ± 0.95	[5]		
	DES 1.5	♀	5.54 ± 0.76	[7]		

nd : not detected

[] : No. of samples.

* : Significantly different from control values ($p < 0.05$)

Table 4. Effects of prenatal exposure to DES on follicular maturation in ovary.

Group	Age	No.	Primordial follicles %	Primary follicles %	Secondary follicles %	Vesicular follicles %
Control	3 wks	6	78.1 ± 1.4	11.0 ± 0.5	5.5 ± 0.5	5.5 ± 0.7
DES 1.5		6	68.3 ± 2.5*	14.8 ± 1.8*	9.3 ± 0.7*	7.7 ± 0.9
Control	6 wks	5	84.5 ± 0.2	7.0 ± 0.4	5.7 ± 0.5	1.8 ± 0.2
DES 1.5		6	83.1 ± 1.5	9.0 ± 0.4	5.3 ± 0.6	2.6 ± 0.6

No.: Number of ovaries.

Data represent the proportion of total follicles.

* : Significantly different from control values ($p < 0.05$).

LH濃度は個体によって変動していると思われ、従って生後3週については雌雄の、生後6週では雄のみの血漿中FSH濃度を測定した。3週では雌雄ともDES 1.5群の血漿中FSH濃度はコントロール群の濃度に比べて統計学的に有意に増加していた。生後6週ではDES 1.5群の雄の血漿中FSH濃度はコントロール群に比べて有意に増加していた。LH濃度はDESの投与によって変化しなかったが、生後3および6週では、DES 1.5群の雄の血漿LH濃度はコントロール群の濃度に比べて増加傾向にあった。

副腎皮質ホルモンの測定は生後3週及び6週について行ったが、DES投与による影響は見られなかった(データは示していない)。

新生子へDESを投与すると、生殖腺系のホルモン・レベル、セルトリ細胞の数及び精子形成が永久的に抑制され(5, 6)、精巣上体におけるエストロゲン・レセプター α の発現が抑制される(6)等の報告がある。本実験では、妊娠母体へのDES投与は生

後6週の血漿中テストステロン濃度を大きく減少させた。外因性のエストロジェンはライディッヒ細胞におけるアンドロジェン合成系を阻害する事が実証されている(7, 8)。妊娠中母親は多量のエストロジェンを分泌し、このホルモンは胎盤を簡単に通過して胎子の血液中进行する。しかしゲツ菌類では、胎子の肝臓が合成する α -フェトプロテインが血中の母親由来のエストロジェンと結合し、雄胎子において女性ホルモン作用が発揮されるのを阻害している(9)。本実験において用いたDESは α -フェトプロテインと結合しないので(10)、妊娠母体に投与したDESは胎子体内に遊離状態で存在し、胎子精巣のライディッヒ細胞内のアンドロジェン合成系を阻害することが示唆された。

5) 卵胞の成熟度 (Table 4)

卵巣全体に存在している原始卵胞、一次卵胞、二次卵胞及び胞状卵胞(グラフ卵胞)の実数をカウン

トし、総卵胞数に対する割合を算定した。生後3週のDES 1.5群において、一次卵胞と二次卵胞の割合がコントロール群に比べて統計学的に有意に増加していた。しかし、生後6週になると、胎生期に母体経路で投与されたDESが卵胞成熟を促進する効果は効力を失ったと思われる。

エストロジェンは卵胞の成熟にパラクライン的な促進作用を持つ(11, 12)。エストロジェン及びFSHは卵胞の成熟を促進する。本実験において、生後3週のDES 1.5投与群の卵巣では、一次卵胞及び二次卵胞の割合が増加し、原始卵胞の割合が減少した。この時、血漿FSH濃度が増加していたことから、妊娠期間のDES投与はFSHの分泌を促進することによって卵胞の成熟に促進的な作用を及ぼすことが明かとなった。

要 約

合成エストロジェンであるDiethylstilbestrol (DES)を妊娠期間中に母体に投与し、生まれた子の生殖腺系及び甲状腺の発達と機能への影響を検討した。SDラットを用い、妊娠7日から21日の期間、DESを1.5あるいは15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 連日皮下投与したが、DES15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与した母体11匹中1匹しか出産せず、得られた子は1匹のみであった。DES1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与した母体(DES 1.5群)及びコントロール群の動物は、自然分娩後、1, 3及び6週齢で剖検し、甲状腺、精巣、及び卵巣を採取した。DES 1.5群の血漿T4濃度はいずれの週齢においてもコントロール群の濃度に比べて有意に増加し、生後6週のTSH濃度も有意に増加した。また組織学的に甲状腺濾胞細胞の高さを測定したところ、生後3週のDES 1.5群の濾胞上皮細胞の高さが増加していた。生後6週のDES 1.5群の血漿テストステロン濃度は

コントロール群と比べて有意に減少し、血漿LH濃度は増加傾向にあった。DES投与は生後3週の雌血漿FSH濃度を増加させ、卵巣の一次卵胞と二次卵胞の割合を増加させ、原始卵胞の割合を減少させた。以上の観察結果から、胎生期に投与されたDESは、生後の子の甲状腺機能を高進させ、精巣機能に対しては阻害的に、雌の生殖器系に促進的に作用することが明かとなった。

文 献

- 1) Boylan, E. S. *Biol. Reprod.*, 19: 854-863, 1978.
- 2) Kim, H. S., Shin, J-H., Moon, H. J., Kim, T. S., Kang, I. H., Seok, J. H., Kim, I. Y., Park, K. L. and Han, S.Y. *Toxicol. Sci.*, 67, 52-62, 2002.
- 3) Emerson, C. H., Cohen, J. H. 3rd, Young, R. A., Alex, S. and Fang, S. L. *Acta Endocrinol.*, 123: 72-78, 1990.
- 4) Yamamoto, M., Takizawa, T., Arishima, K. and Eguchi, Y. *Anat. Rec.*, 215: 361-364, 1986.
- 5) 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. *Biol. Reprod.*, 59: 1084-1094, 1998.
- 6) Atanassova, N., McKinnel, C., Williams, K., Turner, K. J., Fisher, J. S., Saunders, P. T. K., Millar, M. R. and Sharpe, R. M. *Endocrinology*, 142, 874-886, 2001.
- 7) Moger, W. J. *Steroid Biochem.*, 13, 61-66, 1980.
- 8) Majdic, G., Sharpe, R. M., O'Shaughnessy, P. J. and Saunders, P. T. *Endocrinology*, 137: 1063-1070, 1996.
- 9) Vannier, B. and Raynaud, J. P. *Mol. Cell Endocrinol.*, 3: 323-337, 1975
- 10) Savu, L., Benassayag, C., Vallette, G. and Nunez, E. A. *Steroids*, 34: 737-748, 1979
- 11) Wu, T. C., Wang, L. and Wam, Y. J. *Mol. Reprod. Dev.*, 33: 407-412, 1992.
- 12) Wu, T. C., Wang, L. and Wam, Y. J. *Fertil. Steril.*, 59: 54-59, 1993.