

合成エストロジェンの胎生期暴露が誘発する 雄生殖器阻害機能作用の解明

Mechanism of the inhibitory effect of maternal exposure to synthetic estrogen on male reproductive system in the rat

山本雅子, 有嶋和義, 白井明志, 村上 賢

麻布大学大学院獣医学研究科

Masako Yamamoto, Kazuyoshi Arishima, Mitsuyuki Shirai, Masaru Murakami

Graduate School of Veterinary Science, Azabu University

Abstract. Diethylstilbestrol(DES) was administered subcutaneously at 1.5 or 0.5($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)(DES 1.5 or DES 0.5) to pregnant SD rat daily on days 7-21 of gestation to investigate its effects on the male testicular function in their offspring. Plasma testosterone concentrations in both DES 1.5 and DES 0.5 groups at 6 weeks were significantly decreased whereas plasma LH concentration was not altered at the same age. The DES treatment altered frequencies in the cycles of the seminiferous tubules in small degree, in spite of the low testosterone level. It seems that the prenatal DES treatment does not inhibit the steroidogenesis in the testis, however, DES disrupts the higher neuronal center. Moreover, the increases of ABP and AR mRNA expression in DES 1.5 group rescue the spermatogenesis from the inhibitory effect of the DES-induced low level of testosterone.

1. 目的

合成女性ホルモン, ジエチルスチルベステロール(DES)は1940年代と50年代にヒトの流産防止薬として多用されてきた。しかしながら, Kaplan (1)が, DESの服用が男児の生殖器系の発達に悪影響を及ぼすことを報告した。それ以来, DESの悪影響に関する事例が報告され, さらには実験動物を用いてDESの及ぼす作用について詳細に研究がなされるようになった(2-4)。これらの研究のほとんどは, 胎生期あるいは新生子期に10~300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の範囲の高用量のDESを暴露し, 生殖器系への重大な阻害作用を実証したものである(3, 5-7)。我々は, 最近比較的低用量のDESを胎生期暴露すると, ① 生後の精巢内

分泌機能低下, ② 卵胞成熟の促進, ③ 甲状腺の機能亢進, が誘発されることを明らかにした(8)

そこで, 今回の実験では, DESを胎生期暴露した時の, ① 精巢におけるテストステロン合成系酵素 ② 精巢におけるホルモンレセプター ③ 精子形成を調べることにより, DESが精巢へどのような作用を及ぼすかについて詳細に検討した。

2. 方法

1) 実験動物

Sprague Dawley系ラットを用いた。妊娠3日目のSDラットを日本SLC(株)から入手し用いた。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の飼育室内において餌 (CE-2, クレア) と水を自由に与えて飼育した。出生4日目に同腹子を雌雄4匹ずつに調整し、離乳後は雌雄別々に飼育した。

2) DES 投与方法

DES (Sigma) は投与量が1.5あるいは0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ となるようコーンオイルに溶解し、妊娠7日目から21日目に頸部皮下に連日単回投与した (DES1.5群, DES0.5群と称する)。またコントロール群は実験群と同様にコーンオイルのみを投与した。各群に10個体を用いた。

3) 剖検

剖検は生後3, 6および15週に行った。剖検時、子の体重を測定後、エーテル麻酔下で、腹大動脈から採血した。採血した血液は、遠心分離後、血漿をホルモン測定まで -80°C において保存した。次いで、精巣を採取し、重量測定した後、左側精巣は組織学的観察のためブアン液に固定し、右側精巣はRNA抽出用に -80°C に保存した。また、下垂体も採取し、RNA抽出用に -80°C に保存した。

4) 精子形成ステージの判別

ブアン固定した生後6および15週齢の精巣は4 μm の連続切片とし、Periodic Acid Schiff染色 (PAS染色) およびヘマトキシリン染色した。染色した切片を用いて、精細管における精子形成ステージをHess (9) の分類に従って判別した。1固体につき500~1000本の精細管を無作為に抽出して精子形成段階をI~XIVステージに分類した。各ステージごとの精細管の割合を算出した。

5) 血漿ホルモン濃度の測定

血漿ホルモンは以下の3種類についてアッセイした。テストステロンはDPC [^{125}I] 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。黄体形成ホルモン (FSH) および濾胞刺激ホルモン (LH) は、rat FSH immunoassay system 及び rat LH immunoassay system (Amersham Pharmacia Biotech, UK) を用いて測定した。

6) RNA抽出および半定量的RT-PCR

凍結保存した精巣及び下垂体からのRNA抽出は

ISOGEN (ニッポンジーン(株)) を用いて行った。

逆転写反応には antisense primer法を用い、以下のプライマーを用いて反応させた: 精巣; P450 side chain cleavage (P450scc), 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD), 17α -Hydroxylase + C_{17-21} Lyase (P450 $_{17\alpha}$), Androgen receptor (AR), Estrogen receptor α (ER α), Androgen binding protein (ABP), :下垂体; Gnadotrophin releasing hormone receptor (GnRHr)。いずれも内部標準として β actin を用いた。試薬は Super Script TM One-Step RT-PCR Taq (Invitrogen, USA) を用いた。マニュアルに準じて反応液を混和し、サーマルサイクラー (BIO-RAD, USA) を用いて RT-PCR を行った。

増幅されたDNAは3%アガロースゲル/TAE buferにて電気泳動し、エチジウム・ブロマイドを用いて染色した後、紫外線照射のもとゲルの写真を撮影した。撮影した画像はスキャナーで取り込みデジタル化し、画像解析ソフトを用いてバンドの濃さを数値化した。各々の mRNA 発現量は β actin に対する相対比で表した。

7) 統計学的解析

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、 $p < 0.05$ の場合を統計学的に有意差があると判定した。

3. 結果と考察

1) 一般的観察結果

3群 (DES1.5群, DES0.5群およびコントロール群) の妊娠動物は全て正常に妊娠を維持し、出産した。また、生後3, 6および15週齢の雄産子の体重および精巣重量は変化していなかった。従って本実験において投与されたDESはこれらパラメーターには影響を及ぼさなかった。

2) 血漿ホルモン濃度

生後3週齢の血漿テストステロン濃度は用いたホルモン・アッセイ・キットの検出限界以下であったが、生後6週齢の両DES群の血漿テストステロン濃度はコントロール群の濃度に比べて有意に減少していたが、生後15週では変化していなかった。

生後3週のDES1.5群の血漿LH濃度および生後6週のDES1.5群の血漿FSH濃度はコントロール群の濃度に比べて有意に増加していた。また、生後3週

のDES0.5群の血漿LH濃度は増加傾向にあった。これらの結果から、DES投与は生後6週の血漿テストステロン濃度を減少させた。生後3週のテストステロン濃度はキットの検出限界以下であったが、これはテストステロンを分泌してないという事ではない。生後3週のDES1.5群の血漿LH濃度が増加していたことから、負のフィードバック作用が働いたと考えられ、DESは生後3週の血漿テストステロン濃度も減少させたことが推察される。

3) 精子形成ステージの変化

生後6週において、DES1.5群の精子形成ステージIVの割合が増加していた。生後15週においては、DES1.5群の精子形成ステージIVの割合が増加し、IXとXIの割合が減少していた。しかし、それ以外のステージの割合には変化がみられなかった。精子形成にはテストステロン濃度を高いレベルに保つ必要があると考えられているので、生後6週のDES1.5群のテストステロン濃度が減少したことから精子形成に変化が起きる可能性が考えられたが、予想とは異なり、精子形成にはほとんど変化が観察されなかった。

4) 精巣におけるステロイド合成系酵素mRNA発現量

生後3、6および15週齢の精巣におけるステロイド合成系酵素(P450_{scc}, 3 β -HSD, P450_{17 α}) mRNA発現量は変化していたが、これらの変化とDESの投与との相関関係はみられなかった。従ってDES投与によって誘発された低レベルなテストステロンの要因は、精巣におけるステロイド合成系への阻害作用によるものでないことが示唆された。

5) 精巣におけるホルモンレセプター等のmRNA発現量

DES1.5群の生後6および15週齢の精巣におけるABP mRNA発現量は有意に増加していた。

3および15週でのDES1.5群のAR mRNA発現量が、3週のDES1.5群のER α mRNA発現量が増加していた。

ラットにおいて、テストステロンは精細管内に高ホルモン濃度を維持することによって精子形成を調節する主要なアンドロジェンである(10)。しかしながら本実験においてテストステロン濃度が減少した生後6週で精子形成の変化はみられなかった。しかし他方、DES群において、精巣内にテストステロン

を滞在させるタンパクであるABP(Androgen Binding Protein)が増加しており、さらにARも増加していたことから、DES誘導の低テストステロンに対応して精巣内にホルモンを留めおくタンパクを増加させ、さらにはARを増加させることによって、正常な精子形成を維持させるシステムが作動した可能性が考えられる。

6) 下垂体におけるGnRH mRNA発現量

生後6週の下垂体におけるGnRH mRNA発現量はDES投与によって変化していなかった。

上述した結果を総合すると、胎生期に母体経由で投与されたDESは生まれた雄のテストステロンを減少させた。このDESの阻害作用は、精巣ステロイド合成系酵素へ直接的に作用するものではなく、上位中枢へのものであることが示唆された。予想に反してDESは精子形成に大きな影響を及ぼさなかった。これは、精巣内のAPB及びARを増加させることによって低いテストステロン・レベルから精子形成を正常に維持するシステムが存在することを推察させた。

4. 要約

合成エストロジェンDiethylstilbestrol(DES)を妊娠母体に投与し、生まれた子の精巣機能に及ぼす影響を調べた。SDラットを用い、妊娠7~21日目にDES1.5あるいは0.5 μ g/kg投与し、自然分娩後、3、6および15週齢の雄を剖検した。生後6週に両DES投与群の血漿テストステロン濃度が減少し、生後3週のDES1.5群の血漿LH濃度が増加した。DES投与は精子形成サイクルを大きく変化させなかった。また、DESに誘導された血漿テストステロン濃度の減少は、精巣ステロイド合成系酵素の変化によるものではなく、視床下部-下垂体などの上位中枢の変化によるものであることが示唆された。さらに精巣のABPおよびAR mRNA発現量が増加したことから、これら精巣内のAPB及びARを増加させることによって低いテストステロン・レベルにもかかわらず、精子形成を正常に維持するシステムが存在することが推察された。

文 献

- 1) Kaplan, MN. N. Engl. J. Med., 261: 641-644, 1959.
- 2) Herbst, AL, and Bern, HA. *In* Developmental Effects of Diethylstilbestrol in Pregnancy. Thieme-Stratton, New York 1981.
- 3) McLachen, C. Newbold, RR. Bullock, B., Science, 190: 991-992, 1975.
- 4) Arai, Y. Mori, T, Suzuki, Y. Bern, HA., Int. Rev. Cytol., 84: 235-268, 1983.
- 5) Sharpe, RM. Fisher, JS. Millar, MM. Jobling, S. Sumpster, JP., Environ. Health Perspect., 103: 1136-1143, 1995.
- 6) Haavisto, T. Nurmela, K. Pohjanvirta, R. Huuskonen, H. ElGehani, F. Paranko, J., Mol. Cell Endocrinol., 178: 169-179, 2001.
- 7) McKinnel, C. Atanassova, N. Williams, K. Fisher, JS. Walker, M. Turner, KJ. Saunders, TK., J. Androl., 22: 323-338, 2001.
- 8) Yamamoto, M. Shirai, M. Sugita, K. Nagai, N. Miura, Y. Mogi, R. Yamamoto, K. Tamura, A. Arishima, K., J. Toxicol. Sci., 28: 385-394, 2003.
- 9) Hess, RA., Biol. Reprod., 43: 525-542, 1990.
- 10) Wright, WW. Frankel, AL., J. Steroid Biochem., 10: 633-640, 1979.