

# 合成エストロジェンの胎生期暴露が雄生殖腺に及ぼす影響

*Effect of maternal exposure to synthetic estrogen on male reproductive organs.*

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, Azaabu University

**Abstract.** Diethylstilbestrol(DES) was administered subcutaneously at 1.5 or 0.5 ( $\mu\text{g/kg/day}$ )(DES 1.5 or DES 0.5 group) to pregnant SD rat daily on day 7-21 of gestation to investigate its effects on the development of epididymis in their offspring. Male pups were autopsied at 1, 3, 6 and 15 weeks after birth. Plasma testosterone concentrations in DES 1.5 group at 6 weeks and in DES 0.5 group at 15 weeks decreased. By morphometrical analysis, DES suppressed histological maturation in the epididymis. The expression levels of AR mRNA in both DES groups at 15 weeks decreased and the expression levels of ER $\alpha$  mRNA in both DES groups at 6 weeks increased. These results indicate that maternal DES treatment induces low level testosterone, causes to down-regulate AR mRNA expression and up-regulate ER $\alpha$  mRNA expression, resulting to suppress the morphological development of epididymis.

## 1. 目 的

合成女性ホルモンであるジエチルスチルベステロール (DES) は1940年代から1950年代にかけて多用された流産防止薬であるが。しかしKaplan (1) がDESの男児生殖器系への悪影響を報告して以来、数々の事例が報告された。結果として、1971年にアメリカFADによって医薬品としてヒトへの使用が禁止された。その後、マウスを中心とする実験動物を用いてDESの及ぼす影響が多数報告されている (2-4)。しかしこれらの研究の多くは高用量のDESを用いたの実験である (3,5-7)。そこで、我々は比較的低用量のDESをラットへ胎生期暴露したところ、DESは精巣内分泌機能に対しては、阻害効果を、雌の卵巣の発達にたいしては促進機能を有していることが明らかになった (8)。

そこで、今回の実験ではDESを胎生期暴露した場

合、雄の生殖器の一部である精巣上体の発達がどのように変化するかについて検討した。

## 2. 方 法

### 1) 実験棟物

Sprague Dawley 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  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  及び湿度  $55 \pm 10\%$  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, 日本クレア) 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  $\mu\text{g/kg}$  となるように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10個体のラットに投与した。

### 3) 剖検

剖検は生後1, 3, 6及び15週に行った。剖検時、子(雄のみ)の体重を測定後、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、血漿テストステロン濃度および血漿黄体形成ホルモン(LH)濃度を測定した。

採血後、左右の精巣上体の重量を測定後、左側精巣上体は組織学的検討のため、右側精巣重量はmRNA発現量定量に用いた。

### 4) 精巣上体に関する組織計測

採取した左側精巣上体のうち、生後3, 6及び15週の精巣上体は常法に従って処置し、顕微鏡切片を作製した。Hermoら(9)は、精巣上体を精巣上体管上皮の形態および機能から7カ所に分類しているの、本実験では精巣上体起始部、精巣上体頭部、精巣上体尾部近位部及び精巣上体遠位部における精巣上体管外径及び内径の直径、及び上皮細胞の高さを測定した。測定は、光学顕微鏡の接眼レンズに装着したマイクロメーターを用いて行った。

### 5) mRNA発現量の定量

採取した右側精巣上体のうち、生後6及び15週の精巣上体からアイソジェン(ニッポン・ジーン)を用いてRNAを抽出した。

逆転写反応にはantisense primer法を用い、以下の性ホルモン受容体に関するプライマーを用いて反応させた: Androgen Receptor $\alpha$  (AR $\alpha$ ), Estrogen Receptor (ER), 5 $\alpha$  Reductase。

増幅されたDNAは電気泳動して分離し、バンドの濃さを数値化した。各mRNA発現量は $\beta$ Actin発現量に対する相対値で表した。

## 3. 結果と考察

1) 3群(DES1.5群, DES0.5群及びコントロール群)の妊娠動物は全て正常に妊娠を維持し、出産した。雄産子の体重に有意な変化はなかったが、生後15週ではDES1.5群の精巣上体重量が減少していた。従って、DESの投与が精巣上体の発達に抑制作用があることが示唆された。

### 2) 血漿ホルモン濃度

生後6週齢のDES1.5群の、生後15週ではDES0.5

群の血漿テストステロン濃度が有意に減少していた。

生後3週の両DES投与群の血漿LH濃度は有意に減少していたが、生後6及び15週のホルモン濃度は変化していなかった。

### 3) 精巣上体に関する組織計測

DES投与は精巣上体管の発達に阻害的な作用を及ぼした。

生後3週: 精巣上体起始部の精巣上体管外径および内径, 精巣上体尾部近位部の精巣上体管外径, さらに精巣上体尾部遠位部精巣上体管外径および内径の直径が低値であった。

生後15週: 精巣上体頭部精巣上体管外径および内径, 精巣上体尾部近位部精巣上体管外径および内径の直径が低値であった。

以上の結果からDES投与によって誘発された血漿テストステロンの低い血漿レベルが、精巣上体の発達を抑制した可能性が示唆された。

### 4) 性ホルモン受容体及び5 $\alpha$ Reductase mRNA発現量

生後15週の両DES投与群のAR mRNA発現量が有意に減少していた。精巣上体の発達と機能の発現はテストステロンに依存している(10)。本実験では生後6週のDES1.5群と生後15週のDES0.5群の血漿テストステロンが減少し、15週の両DES群のAR mRNA発現量が減少していた。アンドロジェンはAR mRNAをdown-regulateするという報告(11)があるので、本実験において、DES投与によって誘導された低レベルのテストステロンがAR mRNAをdown-regulateした可能性が考えられる。

生後6週で両DES投与群のER $\alpha$  mRNA発現量が有意に減少していた。精巣上体にはERが存在することは良く知られている(7,12,13)。また新生子にDESを投与してもER $\alpha$ の発現に影響を与えないという報告(7)があるが、本実験においては、DESの胎生期投与はER $\alpha$  mRNAを増加させた。これらの結果から、胎生期のDES投与は、生後のAR及びER $\alpha$ の発現を変化させ、精巣上体の発達に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

テストステロンをより活性の高いディハイドロテストステロン(DHT)に転換する5 $\alpha$  ReductaseのmRNA発現量は変化していなかった。テストステロンに比べてARに対して高い親和性を有するので、テストステロンに比べて強いアンドロジェン作用を

有している。Pratisら (14) は、テストステロン・レベルが低下すると、 $5\alpha$  Reductase mRNAが増加し、よりアンドロゲン活性の高いDHTが増加するという仮説を提示している。この仮説を背景に $5\alpha$  Reductase mRNAを定量したが、DES投与はこのmRNA発現を変化させなかったため、本実験でのテストステロンの低下は精巣上体におけるDHTレベルの増加を誘導しなかったものと考えられる。

上述した結果から、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、精巣上体におけるAR及びER $\alpha$ mRNA発現量を変化させ、結果として精巣上体の発達を阻害することが明らかとなった。

#### 4. 要 約

合成エストロゲンDiethylstilbestrol (DES) を妊娠ラットに投与し、生まれた子の精巣上体の発達に及ぼす影響を調べた。SDラットを用い、妊娠7～21日目にDES 1.5あるいは0.5  $\mu$ g/kg投与し、自然分娩後、1, 3, 6及び15週に雄を剖検した。生後15週の精巣上体重量が減少した。生後6週のDES1.5群及び生後15週のDES0.5群の血漿テストステロン濃度が減少した。精巣上体の発達を組織学的に検索した結果、DES投与は精巣上体菅の発達を抑制した。またDES投与は精巣上体におけるARmRNA発現量を減少させ、ER $\alpha$ mRNA発現量を減少させた。これらの結果から、胎生期のDES投与はされたDESは、生まれた雄のテストステロンを減少させ、精巣上体におけるAR及びER $\alpha$ mRNA発現量を変化させ、結果として精巣上体の発達を阻害することが明らかとなった。

#### 文 献

- 1) Kaplan, MN., N. Engl. J. Med., 261: 641-644, 1959.
- 2) Herbest, AL. and Bem, 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. Sumpter, JP., Environ. Health Perspect., 103: 1136-1143, 1995.
- 6) Haavisto, T. Nur, ela, K. Pohjanvirta, R. Huudkonen, H. Eighani, F. Paranko, J., Mol. Cell Endocrinol., 178: 169-179, 2001.
- 7) McKinnel, C. Atannassova, 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., 43: 385-394, 2003.
- 9) Hermo, L., Oko, R. and Robaire, B. Anat. Rec., 232: 202-220, 1992.
- 10) Carson-Jurica, MA. Schrader, WT. O'Malley, BW., Endocr. Rev., 11: 201-220, 1990.
- 11) Zhu et al., Biol. Reprod., 63: 368-376, 2000.
- 12) Fisher et al., J. Endocrinol., 153: 485-495, 1997.
- 13) Atamassova, N. McKunnekk, C. Williams, K. Turner, KJ. Walker, M. Fisher, JS. Saunders, TK. Millar, MR. Sharpe, RM., Endocrinology, 140: 5364-5373, 2001.
- 14) Pratis, K. O'Donnell, L. Ooi, GT. Stanton, PG. McLachlan, RI. Robertson, DM., J. Endocrinol., 176: 393-403, 2003.