

称号及び氏名	博士（獣医学）	武田 賢和
学位授与の日付	平成24年3月31日	
論文名	Pathological Studies on the Property Changes of Corpora Lutea during Incomplete Estrous Cycle and the Luteal Effects of Ovarian Toxicants in Rats （ラットの不完全発情周期における黄体の特性変化および卵巣毒性化学物質の黄体に及ぼす影響に関する病理学的研究）	
論文審査委員	主査	山手 丈至
	副査	稲葉 俊夫
	副査	玉田 尋通
	副査	岡田 利也

論文要旨

【緒論】

生殖機能の維持は種の保存に重要である。日常生活において我々は様々な化学物質に曝露されており、その一部は生殖機能に影響を及ぼす。生殖機能への化学物質の影響は、一般的には胚・胎児あるいは次世代への影響に焦点を当てた生殖発生毒性試験として評価される。一方で、生殖器官自体への影響は、2週間や4週間の一般毒性試験の中で精巣毒性および卵巣毒性として毒性病理学的に解析される。卵巣毒性物質は、生殖発生毒性試験において、発情周期の異常や受胎率の低下など、生殖機能の様々な項目に悪影響をもたらすものが多い。特に医薬品開発においては、生殖発生毒性試験は臨床試験導入後の開発後期に実施されるため、開発初期段階での実験動物を用いた短期毒性試験において精巣および卵巣毒性を正確に評価し、生殖機能への毒性を予測することが重要である。現在までに、精巣毒性の評価方法は確立されているものの、卵巣毒性に関しては未だ確立されていない。

卵巣毒性評価法の確立が遅れている背景には、正常卵巣組織像の把握の難しさが第一に挙げられる。卵巣には、様々な成長あるいは退行段階の卵胞や黄体が混在することから、それぞれを組織学的に判別する必要がある。第二に、卵巣機能は視床下部一下垂体

の調節を受けており、卵巣毒性物質の卵巣への直接的な影響だけでなく、視床下部－下垂体系の内分泌異常を介した間接的な影響も調べる必要がある。

卵巣毒性の解析には、主にげっ歯類が用いられる。その理由として、げっ歯類は化学物質の安全性研究で最も汎用される実験動物であるため、毒性解析に必要な情報が豊富なことだけでなく、発情周期が短く、そのコントロールが容易なことが挙げられる。一方、げっ歯類の発情周期は、交尾刺激が無い限りは黄体期を欠いた不完全発情周期であり、ヒトと異なる部分があるものの、各動物種におけるそれらの特徴と違いを十分に理解することで、げっ歯類で得られた毒性情報をヒトへのリスクアセスメントにつなげることが可能となる。

卵巣の主要構成組織である黄体は、受精卵の着床や妊娠維持に重要なプロゲステロン (P4) を産生し、生殖機能の維持に不可欠である。黄体の機能化とその維持は各動物種間での発情周期の違いに関与し、黄体の性質や特徴も動物種によって異なる。黄体を標的とする卵巣毒性物質の毒性発現機序に関する知見は極めて少ない。

本研究の目的は、安全性試験で汎用されるラットを用いて、不完全発情周期における黄体の機能と形態学的特性を解析するとともに、ラット黄体に影響を及ぼす卵巣毒性物質について組織形態学および分子病理学的に精査することで、それらの毒性発現機序のメカニズムの一端を解明することである。本研究で得られた成果は、化学物質の卵巣毒性のリスクアセスメントおよび毒性病理学分野における卵巣毒性評価法の確立につながると思われる。

【第1章】ラットの不完全発情周期における黄体の機能的および形態学的変化

げっ歯類の黄体は、4～5日の不完全発情周期において、新規形成後早急に機能的退行が生じることでP4分泌機能を失うが、組織学的に完全に退行するまでには数サイクルを要する。本章では、黄体を標的とする卵巣毒性物質の発現機序解析に向けた基盤研究として、ラットの不完全発情周期における新旧黄体の機能解析および黄体の新規形成から退行までの組織学的特性を解析した。

第1節 不完全発情周期における黄体の機能的変化

本節では、成熟SDラットの各発情周期において、新黄体（前回の排卵で形成された黄体）および旧黄体（前回の排卵以前に形成された黄体）でのP4合成ならびに代謝酵素発現の動態を調べた。

血中P4値は、発情後期に上昇した。Laser microdissection (LMD) 法を用いたreal-time PCRの結果、新黄体の発情後期において、コレステロールからのP4合成酵素 (*P450scc*, *3β-HSD*) の発現上昇およびP4代謝酵素 (*20-αHSD*) の発現低下が認められた。旧黄体では、発情周期を通して *P450scc*, *3β-HSD* ならびに *20-αHSD* の発現が高かった。

以上の結果から、不完全発情周期におけるラットの黄体は、新規形成後の1サイクル

中に P4 合成および代謝酵素発現が大きく変化することで、発情期から発情休止期にかけての一時期のみで機能化することが示された。

第2節 不完全発情周期における黄体の組織学的変化

黄体の新規形成から退行に至るまでの組織学的特徴を、BrdU (S 期細胞を標識) の Pulse labeling 法を用いて経時的に解析した。排卵直後 (発情期) の成熟 SD ラットに、BrdU を単回腹腔内投与後、1, 4, 8 および 12 日目の卵巣を解析した。

その結果、不完全発情周期における黄体は、排卵から 1 サイクル後に最大の大きさとなり、4 サイクル後にはそのほとんどが退行した。さらに、黄体は組織形態学的に次の 4 タイプに分類された。それは排卵直後の新規形成黄体 (Type I)、1 サイクル経過後の成熟黄体 (Type II)、2 サイクル経過後の退行黄体 (Type III) および 3 サイクル経過後の残存黄体 (Type IV) である。

以上の結果から、不完全発情周期におけるラットの黄体は、新規形成の 4 サイクル後にほぼ完全に退行し、それらは組織学的に 4 タイプに分類された。

【第2章】 Ethylene glycol monomethyl ether (EGME), Sulpiride, Atrazine によるラット黄体への影響

EGME (工業用エタノールの一種)、Sulpiride (ドーパミン D2 受容体アンタゴニスト) および Atrazine (トリアジン系除草剤の一種) は、げっ歯類での生殖発生毒性試験において、発情周期の乱れや受胎率の低下などの毒性が報告されている。また、ラットでは毒性病理学的変化として黄体細胞の肥大を招くと共に血中 P4 値の上昇をもたらすとされるが、その詳細な毒性発現メカニズムは不明である。本章では、これら 3 つの化学物質が、ラットの黄体に及ぼす影響を分子病理学的に精査した。

第1節 EGME, Sulpiride, Atrazine によるラット黄体への分子病理学的影響

4 日間の発情周期を示す成熟 SD ラットに、発情前期から発情休止期までの 3 日間 (1 日 1 回投与、計 4 回)、EGME (300 mg/kg)、Sulpiride (100 mg/kg) または Atrazine (300 mg/kg) を投与し、LMD を用いて新旧黄体におけるコレステロールの細胞内取込みタンパク質 (SR-BI)、ミトコンドリア内膜への輸送タンパク質 (StAR)、P450_{scc}、3 β -HSD および 20 α -HSD の mRNA 発現変動を解析した。また、P4 合成に関わる因子については免疫組織化学的に検討した。

EGME, Sulpiride, Atrazine の全ての投与群で血中 P4 値が上昇し、EGME 群と Sulpiride 群では血中プロラクチン (PRL) 値が上昇した。遺伝子発現解析ならびに免疫組織化学染色の結果、全投与群の新黄体で SR-BI, StAR, P450_{scc} および 3 β -HSD の発現上昇ならびに 20 α -HSD の発現低下が認められた。また、EGME 投与群の旧黄体では 3 β -HSD の発現上昇が見られた。

以上の結果から、EGMEおよびSulpirideは、PRL分泌の上昇を介して新黄体のP4分泌を促進し、EGMEは旧黄体のP4合成も促進する可能性が示された。一方、Atrazineは新黄体でのPRL分泌上昇を介さずにP4分泌を刺激することが示唆され、各化学物質による黄体への影響はそれぞれ異なることが明らかとなった。

第2節 Bromocriptine (BRC) を用いたEGMEによるラット黄体への分子病理学的影響

本節では、EGMEによるラット黄体への直接的な影響を、BRC（ドーパミンD2受容体アゴニスト）を用いて精査した。

4日間の発情周期を示す成熟SDラットに、発情前期から発情休止期までの3日間（1日1回投与、計4回）、EGME（300 mg/kg）、BRC（2 mg/kg）またはEGME+BRCを投与し、LMDを用いて新旧黄体でのP4合成および代謝に関わる因子のmRNA発現変動を解析した。また、P4合成に関わる因子については免疫組織化学的に検討した。

EGME群ならびにEGME+BRC群において血中P4値が上昇し、EGME群では血中PRL値が上昇した。一方で、BRC群およびEGME+BRC群では血中PRL値の低下が認められた。遺伝子発現解析ならびに免疫組織化学染色の結果、EGME群およびEGME+BRC群の新黄体で、P4合成に関わる因子の発現上昇および20 α -HSDの発現低下が認められた。

以上の結果から、ラット黄体におけるEGMEの作用には、PRL分泌上昇を介した経路だけでなく、PRLを介さずに新黄体のP4分泌を刺激する経路も存在する可能性が示された。

【第3章】EGMEおよびAtrazineによるラット黄体への形態学的影響

本章では、EGME、AtrazineおよびEGME+BRCがラットの黄体に及ぼす形態学的影響を比較した。

4日間の発情周期を示す成熟SDラットにEGME（300 mg/kg）、BRC（2 mg/kg）、EGME+BRCまたはAtrazine（300 mg/kg）を7日間投与し、卵巢組織を光顕ならびに電顕的に観察した。

HE染色標本観察により、EGME群、EGME+BRC群、Atrazine群の全ての黄体で黄体細胞の肥大が認められた。EGME群、EGME+BRC群およびAtrazine群の肥大黄体では、細胞内に微細空胞を多数認めるタイプ（Type I 肥大黄体: CL I）と、好酸性で充実した細胞質を持つタイプ（CL II）の2種類が観察された。EGME投与群ではCL II、Atrazine投与群ではCL Iの割合が多かった。電顕観察の結果、対照群（発情休止期）の黄体細胞では脂肪滴、滑面小胞体、ミトコンドリアが一様に分布していたのに対し、EGME群、EGME+BRC群およびAtrazine群のCL Iでは、多数の脂肪滴が認められた。EGME群とEGME+BRC群のCL IIでは、滑面小胞体の発達が認められたが、Atrazine群のCL IIおよびBRC群の黄体細胞では対照群と比較して明瞭な変化は認められなかった。

以上の結果から、EGMEおよびAtrazineは新黄体だけでなく旧黄体にも肥大をもたら

すが、それぞれで肥大の微細形態学的な特徴は異なることが示された。また、BRCとの併用下でもEGMEは黄体細胞を肥大させたことから、EGMEはPRLを介さずにラット黄体に作用することが示された。

【総括】

本研究は、不完全発情周期におけるラット黄体の機能および組織学的特徴を明らかにし、それに基づいて卵巣毒性物質であるEGME, Sulpiride, Atrazineの黄体に対する影響を分子病理学および超微形態学的に解析した。本研究で得られた結果は、以下にまとめられる。

1. 不完全発情周期におけるラットの黄体は、新規形成後の1サイクル中にP4合成酵素発現の著しい変化により、発情期から発情休止期にかけての一時期のみで機能化することが示された。
2. 不完全発情周期におけるラットの黄体は、新規形成後4サイクルで退行し、それらは組織学的に4タイプ（新規形成黄体：Type I, 成熟黄体：Type II, 退縮黄体：Type III, 残存黄体：Type IV）に分類された。
3. EGMEならびにSulpirideは、PRL分泌上昇を介して新黄体のP4分泌を促進することが明らかとなった。Atrazineは、PRLを介さない経路で新黄体のP4分泌を促進する可能性が示された。
4. EGMEとBRCの併用投与でもP4分泌が上昇し、新黄体でのP4合成に関わる因子の発現上昇および20- α HSDの発現低下が認められたことから、EGMEはPRL分泌上昇を介する経路だけでなく、PRLを介さずに新黄体を刺激する経路も存在することが示唆された。
5. EGMEおよびAtrazineによる肥大黄体は、2タイプ（CL I：細胞内に多数の微細空胞を認めるタイプ, CL II：好酸性で充実した細胞質を持つタイプ）に分類された。CL Iは脂肪滴の過剰蓄積, EGME群とEGME+BRC群のCL IIは、滑面小胞体の発達によって黄体細胞が肥大することが示された。EGMEおよびAtrazineによる黄体細胞の肥大は、それぞれで超微形態学的特徴が異なることが明らかとなった。

以上、本研究により、不完全発情周期におけるラット黄体の機能および形態学的特徴が明らかになるとともに、黄体に対する化学物質の毒性メカニズムの一端を解明できた。本研究成果は、化学物質の卵巣毒性リスクアセスメントならびに毒性病理学分野における卵巣毒性評価法の確立につながると考える。

審査結果の要旨

日常生活において我々は様々な化学物質に曝露されており、その中には生殖機能に影響を及ぼすものがある。卵巣毒性物質は、発情周期の異常や受胎率の低下など、生殖機能に重大な悪影響をもたらすことがある。医薬品開発において、生殖発生毒性試験は臨床試験導入後の開発後期に実施されるため、開発初期段階での一般毒性試験において、精巣および卵巣に及ぼす影響を把握し、生殖機能への毒性を予測することは重要である。卵巣には、受精卵の着床や妊娠の維持に重要なプロゲステロン (**P4**) を産生する黄体が存在する。卵巣毒性物質の中には、黄体を標的とするものも知られるが、その毒性発現機序の全貌は明らかにされていない。

本研究は、化学物質の安全性研究で最も汎用される実験動物であるラットを用い、発情周期に伴う黄体の機能および形態学的特徴を詳細に解析するとともに、黄体に対する卵巣毒性物質の影響を毒性学的観点から分子病理学的に解明することを目的としている。得られた成果の概要は、以下の通りである。

第1章では、不完全発情周期におけるラットの新旧黄体の機能ならびに黄体の新規形成から退行までの組織学的特性を解析している。その結果、血中 **P4** 値は発情後期に上昇し、新黄体の発情後期においてコレステロールからの **P4** 合成酵素 (**P450scc**, **3 β -HSD**) の発現上昇および **P4** 代謝酵素 (**20 α -HSD**) の発現低下が認められた。以上の成績から、ラットの黄体は新規形成後の1サイクル中に **P4** 合成および代謝酵素発現が大きく変化し、発情期から発情休止期にかけての一時期のみで機能化することが示された。また、黄体の新規形成から退行に至るまでの組織学的特徴を経時的に解析した結果、ラットの黄体は、新規形成後4サイクルで退行し、それらは組織学的に4タイプ(新規形成黄体：**Type I**, 成熟黄体：**Type II**, 退縮黄体：**Type III**, 残存黄体：**Type IV**) に分類されることを示した。

第2章では、卵巣毒性物質として知られている **Ethylene glycol monomethyl ether (EGME)**, **Sulpiride**, **Atrazine** のラット黄体に及ぼす影響を分子病理学的に精査している。その結果、どの化学物質を投与した群でも、黄体細胞が肥大し、血中 **P4** 値が上昇した。さらに、**EGME** 群と **Sulpiride** 群では血中プロラクチン (**PRL**) 値も上昇した。また、全ての投与群の新黄体で **P4** 合成関連因子 (**SR-BI**, **StAR**, **P450scc**, **3 β -HSD**) の発現上昇ならびに **P4** 代謝酵素 (**20 α -HSD**) の発現低下が認められた。以上から、**EGME** および **Sulpiride** は、**PRL** 分泌の上昇を介して新黄体の **P4** 分泌を促進し、**EGME** は旧黄体の **P4** 合成も促進することが示された。また、**Atrazine** は新黄体での **PRL** 分泌上昇を介さずに **P4** 分泌を刺激することが示唆された。さらに、**EGME** によるラット黄体への影響を、**PRL** 分泌を抑制する **Bromocriptine (BRC)** を併用投与し精査した結果、併用投与でも **P4** 分泌が上昇し、新黄体での **P4** 合成関連因子の発現上昇および

20 α -HSD の発現低下が認められた。よって、**EGME** は、**PRL** 分泌上昇を介する経路だけでなく、**PRL** を介さずに新黄体を刺激する経路も存在することを明らかにした。

第3章では、**EGME** と **Atrazine** がラットの黄体に及ぼす形態学的影響を顕微鏡ならびに電顕的に比較解析している。その結果、**EGME** および **Atrazine** による肥大黄体細胞は、顕微鏡的に 2 タイプ (**CL I**: 細胞内に多数の微細空胞を認めるタイプ, **CL II**: 好酸性で充実した細胞質を持つタイプ) に分類されること、そして **EGME** 投与群では **CL II** の割合が高く、**Atrazine** 投与群では **CL I** と **CL II** がほぼ同じ割合で認められることを示した。また、電顕的に **CL I** は脂肪滴の過剰蓄積により、**EGME** 群と **EGME+BRC** 併用群の **CL II** では滑面小胞体の発達によって黄体細胞が肥大することを明らかにした。以上より、**EGME** および **Atrazine** は、新黄体だけでなく旧黄体にも細胞肥大をもたらすが、それぞれで黄体への形態学的影響が異なることを明らかにした。

以上の研究は、不完全発情周期におけるラット黄体の機能および形態学的特徴を明らかにするとともに、卵巣毒性化学物質の黄体に及ぼす毒性メカニズムの一端を解明した。よって、本研究内容は、化学物質による卵巣毒性の病理発生機序を解明する上で極めて有用な知見を提示しており、さらに卵巣毒性リスクアセスメントにおける毒性病理学的な評価法の新たな構築に繋がる。また、これらの成果は、医学・獣医学領域における生殖生理学・病態学の基礎・応用研究の更なる発展に資するものである。従って、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。