

学 位 論 文 要 旨

氏 名 梶田 信也

題 目 鶏の性分化に及ぼすエストロジェンの作用に関する研究
(Effects of estrogen on sexual differentiation in chickens)

エストロジェンが鶏の生殖腺、副生殖器、性行動発現および性中枢の性分化に及ぼす影響を解明するため、孵卵中の外因性エストロジェンがこれらの現象に及ぼす影響を組織学的および行動学的手法を用いて解析し、鶏の性分化機構を総合的に検討し、あわせて、内分泌攪乱物質が鶏の性分化に及ぼす可能性についても考察した。

まず、生殖腺の分化に及ぼすエストロジェンの影響を解析するため、投与量を検討したところ、孵卵5日に0.64mg以上のエストラジオールベンゾエイト(EB)の投与によって遺伝的雄の生殖腺は卵巣化あるいは卵精巣化した。

次に、孵卵5、10および15日にEB処理した雄鶏の性行動を観察したところ、孵卵5および10日のEB処理鶏では交尾行動が認められず、孵卵15日EB処理鶏には正常な雄が示す一連の性行動がみられた。この原因を追究するため、性行動の中枢であるとされる内側視索前野をこれらの鶏を用いて組織学的に調査した。その結果、孵卵5および10日にEB処理した雄鶏の内側視索前野の組織的特徴は雌鶏のものに近似していたが、孵卵15日にEB処理した雄鶏では対照の雄鶏のものと同じであった。したがって、EB処理雄鶏の交尾行動消失の原因の一つは、雄型内側視索前野の形成不全によるものと考えられた。孵卵中の雌雄の鶏の視索前野にはエストロジェンレセプター(ER)があることが報告されているので、発生初期の雄胚へのEB処理により、エストロジェンがERと結合し、雌型の性中枢が構築されることが推察された。

一方、孵卵5、10および15日にEB処理した成熟雌鶏の卵管を観察したところ、孵卵5および10日のEB処理鶏には正常鶏では認められない発達した右側卵管が認められたが、孵卵15日EB処理鶏では正常鶏と同様、右側卵管の発達は認められなかった。卵管の原基であるミューラー管の分化・発達にはエストロジェンとミューラー管抑制ホルモン(AMH)が関与することが知られ、卵巣より分泌されるエストロジェンはERと結合し、AMHの作用を阻害するが、右側ミューラー管ではER量は左側ミューラー管よりも少量であるためAMHによる発達阻害を受け、左側のみが卵管へと分化・発達すると思われる。しかし、孵卵10日以前の雌胚への大量のEB投与により、エストロジェンは左右ミューラー管のERに結合し、左側同様、右側ミューラー管の卵管への分化・発達をもたらしたと推察された。

以上のように、孵卵5から10日目の外因性エストロジェン0.64mg以上の投与によって、鶏の副生殖器の発生とその後の形態的変化の機序並びに性行動発現と性中枢の性分化との関連性が明らかとなった。また、外因性エストロジェンが内分泌攪乱物質として性分化の異常をもたらす濃度は内因性エストロジェン量より極めて高いことが示唆された。

学 位 論 文 要 旨

氏 名

Shinya Masuda

題 目

Effects of estrogen on sexual differentiation in chickens
(鶏の性分化に及ぼすエストロジェンの作用に関する研究)

This study aimed to explain the effects of estrogen on the gonads and accessory reproductive organs, expression of sexual behaviors, and sexual differentiation of the reproductive center in chickens. The effects on these of exogenous estrogen administered during incubation were analyzed using histological and behavioral techniques to provide a comprehensive overview of the mechanisms of sexual differentiation. Simultaneously, whether endocrine disruptors affect sexual differentiation in chickens was discussed.

First, the estrogen dose needed to analyze the effects of estrogen on the differentiation of gonads was investigated. A dose of estradiol benzoate (EB) ≥ 0.64 mg administered at 5 days incubation was found to change genetically male gonads into ovaries or ovotestes.

Next, the sexual behavior of male chickens treated with EB at 5, 10, and 15 days incubation was observed. No mating behavior was found in chickens treated at 5 or 10 days incubation, while chickens treated at 15 days incubation showed the sequence of sexual behaviors seen in normal male chickens. To investigate the reason for this, the medial preoptic area, which is regarded as the center of sexual behavior, taken from male chickens treated with EB at incubation was examined histologically. The medial preoptic area of male chickens treated with EB at 5 and 10 days incubation showed histological features similar to those in female chickens, while that of male chickens treated with EB at 15 days incubation was the same as that in control males. Therefore, one reason for the loss of mating behavior in EB-treated male chickens appears to be hypoplasia of the male-type medial preoptic area. Treatment of the male embryo with EB during the early developmental stage may therefore be conjectured to cause estrogen to bind with estrogen receptors, so that a female-type reproductive center is constructed.

In addition, observation of the oviduct of adult female chickens treated with EB at 5 to 15 days incubation showed that a developed right oviduct, which is not found in normal chickens, was present in chickens treated with EB at 5 and 10 days incubation. Chickens treated at 15 days incubation showed no right oviduct development, as in normal chickens. As fewer ERs are present in the right Müllerian duct than in the left, anti-Müllerian hormone inhibits development of the right one and only the left one differentiates and develops into an oviduct. However, administration of a large dose of EB to the female embryo up until 10 days incubation must be conjectured to result in estrogen binding to the ERs in both Müllerian ducts, therefore, not only right one but left one differentiates and develops to an oviduct.

A clear relationship was thus shown to exist in chickens between the mechanisms of development and subsequent morphological changes in accessory reproductive organs, expression of sexual behaviors and differentiation of the reproductive center, as a result of administration of ≥ 0.64 mg exogenous estrogen from 5 to 10 days incubation.

These results therefore suggest that an accumulation of the exogenous estrogen that exceeds endogenous estrogen far must arise abnormalities in the sexual differentiation.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	梶田 信也
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 三好 和睦
	副査 鹿児島 大学 准教授 大久津 昌治
審査協力者	
題目	鶏の性分化に及ぼすエストロジェンの作用に関する研究 (Effects of estrogen on sexual differentiation in chickens)
<p>エストロジェンが鶏の生殖腺，副生殖器，性行動発現および性中枢の性分化に及ぼす影響を解明するため，孵卵中の外因性エストロジェンがこれらの現象に及ぼす影響を組織学および行動学的手法を用いて解析し，鶏の性分化機構を総合的に検討し，あわせて，内分泌攪乱物質が鶏の性分化に及ぼす可能性についても考察した。</p> <p>まず，生殖腺の分化に及ぼすエストロジェンの影響を解析するため，投与量を検討したところ，孵卵5日に0.64mg以上のエストラジオールベンゾエイト(EB)の投与によって遺伝的雄の生殖腺は卵巣化あるいは卵精巣化した。</p> <p>次に，孵卵5，10および15日にEB処理した雄鶏の性行動を観察したところ，孵卵5および10日のEB処理鶏では交尾行動が認められず，孵卵15日EB処理鶏には正常な雄が示す一連の性行動がみられた。この原因を追究するため，性行動の中枢であるとされる内側視索前野をこれらの鶏を用いて組織学的に調査した。その結果，孵卵5および10日にEB処理した雄鶏の内側視索前野の組織的特徴は雌鶏のものに</p>	

近似していたが、孵卵15日にEB処理した雄鶏では対照の雄鶏のものと同じであった。したがって、EB処理雄鶏の交尾行動消失の原因の一つは、雄型内側視索前野の形成不全によるものと考えられた。孵卵中の雌雄の鶏の視索前野にはエストロジェンレセプター(ER)があることが報告されているので、発生初期の雄胚へのEB処理により、エストロジェンがERと結合し、雌型の性中枢が構築されることが推察された。

一方、孵卵5、10および15日にEB処理した成熟雌鶏の卵管を観察したところ、孵卵5および10日のEB処理鶏には正常鶏では認められない発達した右側卵管が認められたが、孵卵15日EB処理鶏では正常鶏と同様、右側卵管の発達は認められなかった。卵管の原基であるミューラー管の分化・発達にはエストロジェンとミューラー管抑制ホルモン(AMH)が関与することが知られ、卵巢より分泌されるエストロジェンはERと結合し、AMHの作用を阻害するが、右側ミューラー管ではER量は左側ミューラー管よりも少量であるためAMHによる発達阻害を受け、左側のみが卵管へと分化・発達すると考えられる。しかし、孵卵10日以前の雌胚への大量のEB投与により、エストロジェンは左右ミューラー管のERに結合し、左側同様、右側ミューラー管の卵管への分化・発達をもたらしたと推察された。

以上のように、孵卵5から10日目の外因性エストロジェン0.64mg以上の投与によって、鶏の副生殖器の発生とその後の形態的変化の機序並びに性行動発現と性中枢の性分化との関連性が明らかとなった。また、外因性エストロジェンが内分泌攪乱物質として性分化の異常をもたらす濃度は内因性エストロジェン量より極めて高いことが示唆された。

これらの成果は、雌雄鶏胚の内側視索前野あるいは卵管の原基であるミューラー管の分化・発達へのエストロジェンの関与の過程を明らかにすることによって、鶏の性分化機構に新たな知見を提示すると同時に、内分泌攪乱物質が鶏の性分化に影響を及ぼす条件についての基礎的知見を提供している。これらのことから、審査員一同は、本論文が博士(農学)の学位論文として、十分に価値があるものと判定した。

学力確認結果の要旨

学位申請者 氏名	梶田 信也
審査委員	主査 琉球 大学 教授 川本 康博
	副査 鹿児島 大学 教授 岡本 新
	副査 佐賀 大学 教授 尾野 喜孝
	副査 鹿児島 大学 准教授 三好 和睦
	副査 鹿児島 大学 准教授 大久津 昌治
審査協力者	
実施年月日	平成24年 12月 22日

試験方法（該当のものを○で囲むこと。）

口答・ 筆答

主査及び副査は、平成24年12月22日の公開審査会において学位申請者に対して学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。

具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。また、筆答により外国語（英語）の学力を確認した。

以上の結果から、審査委員会は申請者が大学院博士課程修了者と同等以上の学力ならびに識見を有するものと認め、博士（農学）の学位を与えるに十分な資格を有するものと認めた。

学位申請者	
氏名	梶田 信也

質問 1: 内側視索前野の体積に雌雄差はなかった。しかし、この神経核を構成する直径 10 μ m 以上の神経細胞体数は雄鶏のほうが雌鶏よりも多い結果となっている。雄の内側視索前野の細胞体数や大きさは、あらかじめ決まっているのか？ 季節繁殖をする種ではどうか？

回答 1: 少なくとも孵卵 10 日前に外因性エストロジェンの影響を受けない限り、雄の内側視索前野の神経細胞体数や大きさは、予め決まっていると考えられます。キンカ鳥などは季節繁殖を行いますが、キンカ鳥のさえずりの 4 つの中枢にも性差があることが知られており、外因性の性ホルモンの作用を受けない限りはこれらの性中枢の神経細胞体数および大きさも予め決まっていると考えております。

質問 2: 雌でもエストロゲン阻害剤を投与すると、雄様の行動を起こすと考えているか？

回答 2: 鶏の場合エストロジェンにより性中枢が雌型となりますので少なくとも孵卵 10 以前のエストロゲン阻害剤によって雄型の性行動を起こすと考えられます。

質問 3: 鶏の孵卵中の性線の分化はいつ頃と考えていますか？ 哺乳類の場合、精巢の発生が先ですが、鶏の場合はどうか？

回答 3: 文献によれば孵卵の 5~5.5 日には生殖腺の分化が始まると言われております。鳥類の場合は卵巣先熟であると考えられております。

質問 4: エストロゲン投与によって、精巢は左側の方が影響を受けている。どのような理由によるものか？

回答 4: エストロジェンレセプターは孵卵 4.5, 5.5, 7.5 および 12.5 日の雌雄鶏胚において左右の生殖腺に認められますが、左側生殖腺の方が右側生殖腺よりもエストロジェンレセプターの発現量は大きいことが報告されております。したがって、左側精巢の方が投与したエストロジェンの影響を強く受けるものと考えられます。

質問 5: その影響を受けた左側精巢が成熟に伴って、組織的や機能的には通常の雄と同じように戻るのか？

回答 5: 加齢に伴って組織的には精巢組織となり、機能的には正常な造精能およびアンドロジェン分泌能をもつようになります。

質問 6 : 孵卵 5, 10 日の EB 投与によって雌鶏では右側卵管が分化・発達する。右の卵巢はどのようにになっているか？

回答 6 : 右側の卵巢は退行し、成熟後は全く認められなくなります。

質問 7 : 孵卵の 5 から 10 日の雌胚に EB 処理を行った右側卵管が発達する。左側卵管も通常のものよりも発達しますか？

回答 7 : 右側卵管が発達している個体程左側卵管は発達が劣っております。

質問 8 : 鳥類は全て左側卵管だけが大きく機能的であるか？

回答 8 : 一部の例外を除けば、鳥類では左側だけが大きく機能的であると考えております。

質問 9 : 孵卵 10 日にエストロゲン投与した内側視索前野は雌型、その 5 日後に投与すると雄型になる。このことは内側視索前野の形成が 10 日目までに完了していると考えて良いか？

回答 9 : 本研究の結果では、10 日目にはまだエストロジェンの影響を受けるので内側視索前野の形成は完了しておらず、孵卵の 15 日にはエストロジェンの影響を受けないので、内側視索前野の形成が完了する孵卵中の時期は孵卵の 10 から 15 日の間にあると考えられます。

質問 10 : 孵卵 15 日にエストロゲン投与した鶏の内側視索前野は雄型になっているが、成鶏になって、正常な射精等の性行動を示すものでしょうか？

回答 10 : この点に関しては、確認をしております。

質問 11 : 正常な雌が換毛や鶏冠の退色した時に雄化するという報告があります。このような鶏は発生期に分化の程度がちがうのではないかと考えられないか？

回答 11 : 鶏胚では孵卵中にエストロジェンの作用を受けて性中枢が雌化すると考えられ、そのような個体では、胚の時期に卵巢より分泌量が少ない等の理由で性中枢に対するエストロジェンの作用が弱く性中枢の雌型への性分化の程度が完全ではない可能性が考えられます。

質問 12 : 今回は孵卵中でのエストロゲン投与であるが、打ち続けたり、あるいは環境ホルモンとしてのエストロゲンに暴露された場合、産卵させる可能性はないのか？

回答 13 : 孵卵初期にエストロジェンを投与され孵化後、生殖腺が卵精巢化あるいは卵巢化した雄鶏にエストロジェンを投与し続けても、生殖腺は加齢に伴い精巢化するといわれておりますのでそのような可能性はないと考えます。