

Hatano 高および低回避反応ラットの 卵巣老化および寿命に及ぼす妊娠経験の影響

太田 亮¹, 大向英夫²

Effects of pregnancy experience on ovarian senescence and longevity in Hatano high- and low-avoidance response rats

Ryo OHTA, Hideo OHMUKAI

We investigated the effects of pregnancy experience on ovarian senescence and longevity using two inbred lines of Hatano rats. These lines have been selectively bred for high- and low-avoidance animals (HAA and LAA, respectively) in the shuttle-box test, but the HAA line has a slower onset of ovarian senescence and a shorter lifespan compared with the LAA line. The onset of abnormal estrous cycles and survival curves were compared between nulliparous and parous rats in each line. In the HAA line, pregnancy experience did not change the onset of ovarian senescence but increased longevity. There was, however, no difference in the frequency of pituitary tumor, which was a causal factor for accelerated mortality in this line. In the LAA line, pregnancy experience delayed the onset of ovarian senescence and reduced the incidence of mammary tumors but did not increase longevity because of an increased frequency of constipation with megacolon. These data suggest that the effects of pregnancy experience on ovarian senescence and longevity depend on the reproductive characteristics of the rat lines.

緒言

初経年齢, 出産経験, 閉経年齢などの生殖要因は, 女性の寿命に影響を与えることが疫学調査のコホート研究で報告されている¹⁻³⁾. 例えば, マヤ人女性における子供の数とテロメアの長さの比較研究において, 子供の数が少ない女性は, 子供の数が多い女性よりもテロメアの長さが短いことが報告されている⁴⁾. 女性ホルモンであるエストラジオールは細胞内で強力な抗酸化作用を示すことから⁵⁾, テロメアは妊娠中に増加するエストラジオールによって酸化ストレスから保護されると考えられている⁶⁾. しかし, 出産経験によってテロメアの長さが短くなるという逆の報告⁷⁾もあり, 正確なことは分かっていない. 一方, 妊娠経験のない女性は, 妊娠経験のある女性に比べて乳がんの発症リスクが高くなることが報告されている^{8,9)}. 妊娠レベルのエストラジオールをラット

に短期間曝露させると, 化学物質誘発の乳がんが抑制されることも示されている^{10,11)}. 一般に, コホート研究で得られる生殖要因と寿命の関係は, 喫煙習慣, 肥満, 教育水準, 栄養状態など非生殖要因の影響を受け易い¹²⁾. したがって, 生殖要因と寿命の関係を正確に分析するには, 非生殖要因を除外できるモデル動物が必要と考えられる.

シャトルボックス回避学習試験の成績に基づき, Sprague-Dawley系ラットから選抜交配して, 回避反応率の高い高回避動物(HAA)と低い低回避動物(LAA)の2つの近交系ラットが作出された¹³⁾. また, 両系の雌は発情周期中のホルモン分泌パターンが異なり, LAA系はHAA系に比べての発情周期が1日長い¹⁴⁾. さらに, LAA系はHAA系より性成熟が遅いこと¹⁵⁾, LAA系はHAA系に比べて発情周期の加齢性変化が早発であること¹⁶⁾, LAA系はHAA系に比べて生存日数が約2か月長いこと¹⁶⁾, HAA系では下垂体腫瘍, LAA系では乳腺腫瘍の発生頻度が高いこと¹⁶⁾が分かっている.

本研究では, 生殖要因と寿命の異なる HAA 系

1 信頼性保証部

2 安全性事業部安全性評価室

とLAA系雌ラットを用いて、妊娠経験が卵巣老化や寿命に及ぼす影響を調べ、生殖要因と寿命の関係を解析した。

材料および方法

秦野研究所で25年以上兄妹交配によって維持しているHAA系とLAA系雌ラットを使用した。動物は、室温22~25℃、相対湿度50~65%、12時間の明暗周期(7:00~19:00点灯)に維持された飼育室で、金属製ケージ(220w×270d×190h mm)に個別に収容し、飼料(CE-2, 日本クレア)および水道水を自由摂取させた。同系の雄と交配した妊娠雌は、妊娠18日から分娩後10日まで、ペーパークリーン(日本エスエルシー)を入れたプラスチック製ケージ(350w×400d×180h mm)に収容した。動物実験は、食品薬品安全センター(FDSC)の動物実験に関する指針に基づき、FDSCの動物実験委員会によって承認された動物実験計画書に従って実施した。

Sprague-Dawley系ラットは他の系統より発情周期の加齢性変化が早期にみられることから¹⁷⁾、8か月齢前後より膣スメアを採取し、発情周期の加齢性変化を調べた。検査に使用した動物のロット、動物数、妊娠経験、発情周期の検査時期を表1に示す。なお、ロットA~Cは、既報¹⁶⁾のデータを使用した。膣スメアは7:00~11:30の間に採取した。ギムザ染色したスメア標本を顕微鏡で観察し、観察された細胞に基づいて休止期、発情前期および発情期に分類した。発情周期は2週間の観察期間ごとに正常周期(4または5日周期)および異常周期(長期周期、持続性発情、無発情)に分類した。

ラットの発情周期は、加齢に伴い正常周期から長期周期に移行し、持続性発情を経て無発情に至ると考えられている¹⁸⁾。

発情周期の検査が終了した動物のうち、ロットA, B, C, E, FおよびGは、生存日数を調べるために24か月齢まで継続飼育した。生存例は105~106週齢時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血致死させ、剖検し、途中死亡例および途中瀕死例も発見後、すみやかに剖検した。両系には、系統特有の自然発生腫瘍があり、HAA系雌ラットでは下垂体腫瘍が、LAA系雌ラットでは乳腺腫瘍が高頻度に認められることから¹⁶⁾、下垂体腫瘍と乳腺腫瘍の発生頻度を比較した。

内分泌器官の重量を測定するために、ロットDおよびHは、52週齢時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で放血、致死させ、下垂体、副腎および卵巣の重量を測定した。

ロットD, E, FおよびGの経産雌は、離乳後の発情周期を観察するために、分娩後14日(分娩日=分娩0日)から膣スメアを採取し、離乳後6~7週(離乳日=分娩後22日)まで発情周期を観察した。発情周期は2週間の観察期間ごとに4日周期、4および5日周期の混在、5日周期および異常周期(長期周期、持続性発情)に分類した。

LAA系の経産雌において、離乳後の発情周期に変化がみられたことから、両系の未経産雌を精管切除した雄と交配して偽妊娠を誘発し、偽妊娠誘発後8週まで発情周期を観察した。発情周期は、上記の離乳後の観察と同様に分類した。

妊娠経験の影響を調べるために、系統別に未経産雌と経産雌のデータを比較した。生存曲線お

表1 使用した動物のロット、動物数、妊娠経験、発情周期の検査時期および剖検時期

Lot	Number of females		Pregnancy experience	Age examined vaginal smear	Purpose	Terminal age
	HAA	LAA				
A	14	8	Nulliparous	35-51 weeks	Survival rate	24 months
B	12	14	Nulliparous	31-51 weeks	Survival rate	24 months
C	9	13	Nulliparous	31-51 weeks	Survival rate	24 months
D	8	9	Biparous	30-50 weeks	Organ weight	12 months
E	9	9	Primiparous	28-50 weeks	Survival rate	24 months
F	11	11	Biparous	28-50 weeks	Survival rate	24 months
G	11	12	Biparous	34-50 weeks	Survival rate	24 months
H	12	12	Nulliparous	29-51 weeks	Organ weight	12 months

よび発情周期の推移は、 Kaplan-Meier 分析のログランク検定 (SPSS Statistics software, IBM) により解析し、発情周期の割合と肉眼的所見の頻度はフィッシャーの正確確率検定、器官重量はスチューデントの t 検定 (SAS®, SAS Institute Japan) により解析した。

結果

発情周期に及ぼす妊娠経験の影響： 発情周期の加齢性変化および発情周期の型をそれぞれ図1および図2に示す。HAA系では、正常な発情周期個体の割合 (図1) や発情周期の型 (図2A) に示される加齢性変化に、未経産雌と経産雌の間で有意差はみられなかった ($p=0.105$, ログランク検定)。

一方、LAA系では、加齢に伴う異常周期の発症が経産雌で有意 ($p=0.017$, ログランク検定) に遅れ (図1), 特に、持続性発情および無発情の発症が経産雌で遅れた (図2B)。

生存率に及ぼす妊娠経験の影響： 生存曲線を図3に示す。HAA系では、24か月齢の生存率が未経産雌 (40%) に比較して経産雌 (52%) で高かったが、有意差はなかった ($p=0.287$, ログランク検定)。LAA系では、24か月齢の生存率に経産雌 (50%) と未経産雌 (54%) の間で有意差はなかった ($p=0.935$, ログランク検定)。

腫瘍発生に及ぼす妊娠経験の影響： 下垂体腫瘍の発生頻度については、HAA系の未経産雌 (80.0%) と経産雌 (87.1%), およびLAA系の未経

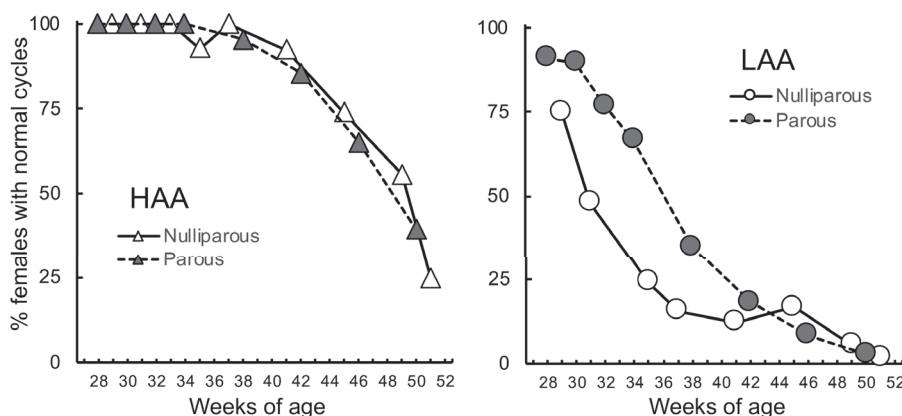


図1 HAA系およびLAA系雌ラットにおける発情周期の加齢性変化に及ぼす妊娠経験の影響
各値は各週齢において正常な発情周期を示した未経産雌および経産雌の割合 (%) を示す。

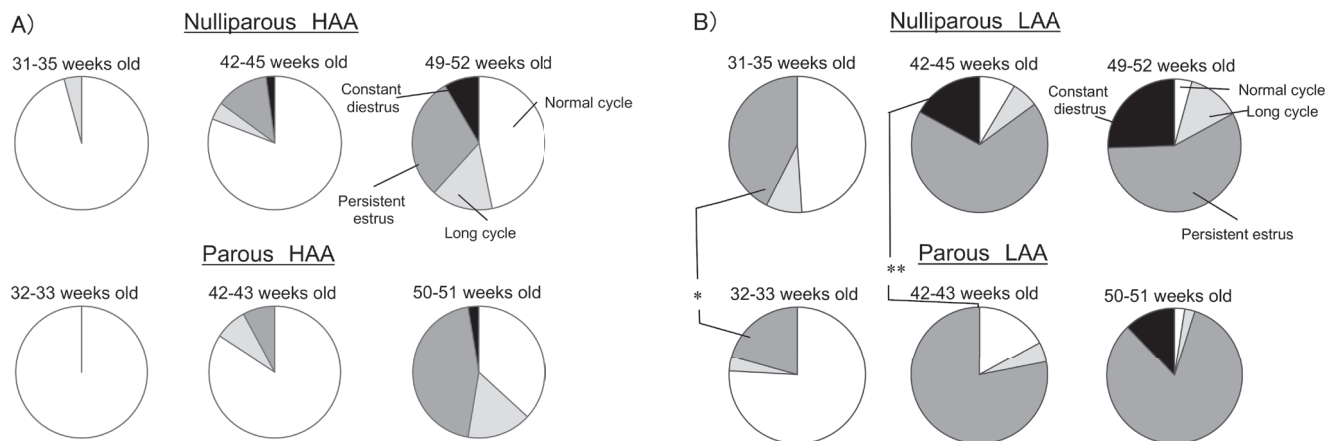


図2 HAA系およびLAA系雌ラットにおける発情周期の型に及ぼす妊娠経験の影響

図2AはHAA系の未経産雌および経産雌、図2BはLAA系の未経産雌および経産雌の発情周期の型を示す。
*, **フィッシャーの正確確率検定で未経産雌と経産雌の間に有意差があることを示す (* $p<0.05$, ** $p<0.01$)。

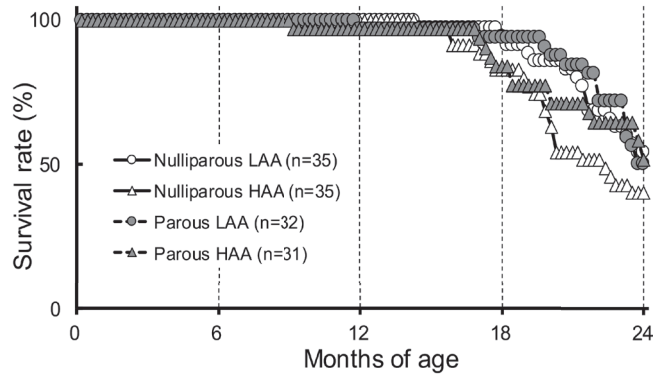


図3 HAA系およびLAA系雌ラットの生存率に及ぼす妊娠経験の影響
各系の未経産雌および経産雌の生存曲線を示す。

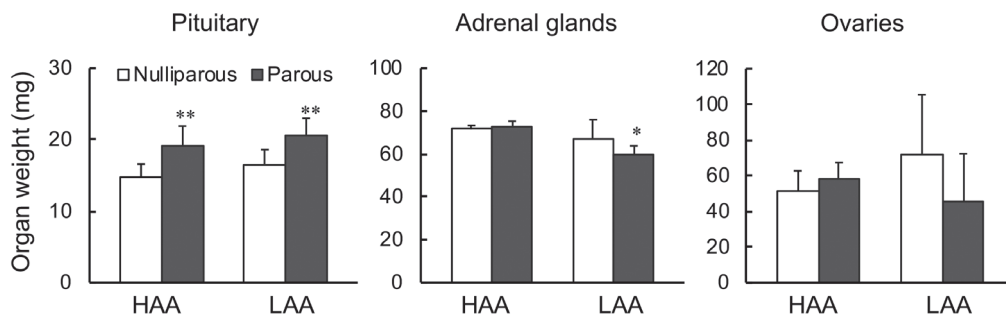


図4 52週齢時におけるHAA系およびLAA系雌ラットの器官重量に及ぼす妊娠経験の影響
各値は各系の未経産雌および経産雌の器官重量 (mg: 平均±標準偏差) を示す。
*, ** スチューデントのt検定で未経産雌および経産雌の間に有意差があることを示す (* p<0.05, ** p<0.01).

産雌(48.6%)と経産雌(46.9%)の間に有意差はなかった。乳腺腫瘍の発生頻度については、LAA系の未経産雌(71.4%)に比較して経産雌(18.8%)で有意(p<0.01, フィッシャー検定)に低下した。HAA系雌ラットの乳腺腫瘍についても、未経産雌(40.0%)に比較して経産雌(19.4%)の頻度が低下したが、有意差はなかった。腫瘍以外の所見として、便秘/巨大結腸の頻度がLAA系の未経産雌(5.7%)に比較して経産雌(40.6%)で有意(p<0.01, フィッシャー検定)に増加した。

内分泌器官重量に及ぼす妊娠経験の影響：52週齢時に測定した主な内分泌器官の重量を図4に示す。下垂体重量は、両系とも未経産雌に比較して経産雌の値が有意(p<0.01, t検定)に増加した。副腎重量は、LAA系のみで未経産雌に比較して経産雌の値が有意(p<0.05, t検定)に低下した。卵巣重量は、両系とも未経産雌と経産雌の間に有意差はなかった。最終体重には、両系とも未経産雌と経産雌の間に有意差はなかった。

離乳後および偽妊娠後の発情周期：離乳後における発情周期の型を図5に示す。LAA系の経産雌では、4日周期の個体割合が離乳後1~2週は100%、3~4週は67%、5~6週は33%、7~8週は0%であった。HAA系では、すべての経産雌個体が離乳後の各観察期間を通して4日間周期を示した。

LAA系雌ラットの偽妊娠後における発情周期の型を図6に示す。LAA系では、4日周期の個体割合が偽妊娠後2~3週は100%、4~5週は60%、6~7週は40%であった。HAA系では、すべての雌個体が偽妊娠後の各観察期間を通して4日間周期を示した(データ示さず)。

考察

発情周期の加齢性変化と寿命に違いがある2つの近交系ラットを用いて、卵巣の老化と寿命に及ぼす妊娠経験の影響を調べた。より短い寿命を有するHAA系の経産雌は、同系の未経産雌と比

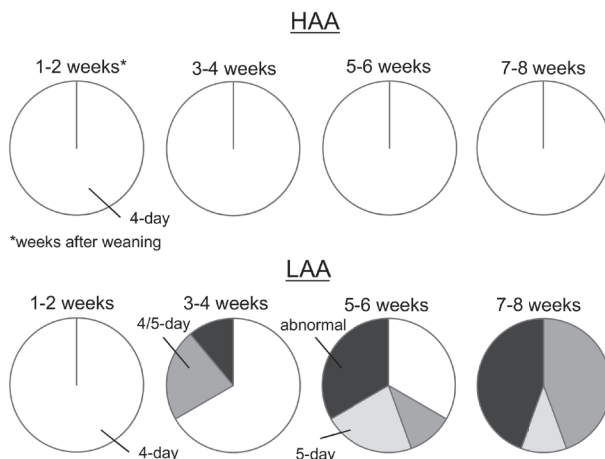


図5 HAA系およびLAA系雌ラットにおける離乳後の発情周期の型
 上段および下段は、それぞれHAA系およびLAA系雌の離乳後における発情周期の変化の割合(%)を示す。

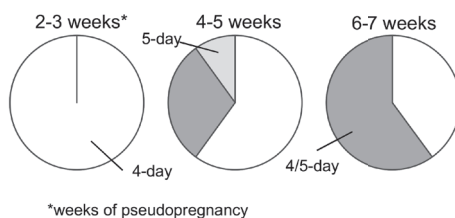


図6 LAA系雌ラットにおける偽妊娠後の発情周期の型
 LAA系雌の偽妊娠後における発情周期の変化の割合(%)を示す。

較して発情周期の加齢性変化に差はなかったが、24か月齢の生存率は未経産雌に比べて高かった。より長い寿命を有するLAA系の経産雌は、同系の未経産雌と比較して異常周期の発症が遅延したが、生存率の加齢変化に差はみられなかった。

HAA系雌ラットの死亡原因の一つとして、下垂体腫瘍の腫大により引き起こされる脳底部の圧迫が考えられているが¹⁶⁾、HAA系の経産雌と未経産雌の間で下垂体腫瘍の頻度に差はなかった。なお、最近の研究では妊娠がラットの下垂体腫瘍の増殖を促進することが報告されている¹⁹⁾。

LAA系の経産雌は、同系の未経産雌と比較して発情周期の加齢性変化の発症が遅れていた。さらに、LAA系の経産雌では、離乳後の発情周期が4日周期を示しており、同様の変化はLAA系の偽妊娠雌においても観察された。LAA系雌ラットの多くは5日周期を示すが¹⁴⁾、その原因の一つとして発情前期から発情期にかけて起こるプロラクチンサージのレベルが高いことが挙げられてい

る¹⁴⁾。授乳中の雌ラットは、吸乳刺激により卵巣における卵胞発育が抑制され、発情周期は停止することが知られているが²⁰⁾、離乳後に再開する発情周期中のプロラクチンサージは妊娠前より減少するという報告がある²¹⁾。したがって、離乳後のプロラクチンサージの減少が、LAA系の経産雌における発情周期の加齢性変化の遅れに寄与していると推察される。

LAA系の経産雌では、乳腺腫瘍の発生頻度が同系の未経産雌と比較して低下したことから、この変化もプロラクチンレベルの制御に関係していると推定される。同様の変化はHAA系の経産雌でも観察された。妊娠レベルのエストラジオールをラットに投与すると化学物質誘発の乳がんを抑制することが知られているが¹¹⁾、自然発生性の乳腺腫瘍についても、妊娠によってその発生頻度が抑制されることが示唆された。しかしながら、LAA系の経産雌では便秘/巨大結腸の頻度が増加したため、加齢による生存率低下の抑制はみら

れなかった。LAA系の経産雌にみられた便秘の原因は不明だが、自発運動量の少ないLAA系特有の行動特性¹³⁾が腸の蠕動運動の低下を引き起こした可能性が考えられる。

52週齢時にみられた経産雌の下垂体重量の増加は、両系で認められたことから、妊娠中に増加する下垂体の乳腺刺激ホルモン分泌細胞が離乳後も残存していたと推察される。LAA系のみで低下した経産雌の副腎重量については、原因は不明であった。

コホート研究で得られる生殖要因と寿命の関係は、喫煙習慣、肥満、教育水準、栄養状態などの非生殖要因によって影響を受け易い¹²⁾。また、ヒトや実験動物では、初経年齢、月経周期、閉経年齢などの生殖要因や寿命に大きな個人差がある。一方、HAA系とLAA系は、性成熟¹⁵⁾、発情周期の間隔¹⁴⁾、発情周期の加齢性変化¹⁶⁾などの生殖要因と生存日数や腫瘍発生¹⁶⁾に明らかな系統差があり、系統内の個体差は小さい。本研究では、妊娠経験によって誘発された卵巣老化の遅れは、発情周期の加齢性変化を早発するLAA系でのみ観察された。一方、妊娠経験によって誘発された寿命の延長は、生存日数の短いHAA系でのみ観察された。このように、妊娠経験が及ぼす卵巣老化や寿命への影響は、使用する系統の特性に依存することが示され、生殖要因の異なるHAA系およびLAA系雌ラットは、生殖要因と寿命の関係を解析する上で、有用な動物モデルになると考えられる。

謝辞

秦野研究所動物飼育管理室の支援に感謝いたします。

文献

- 1) Wu X, Cai H, Kallianpur A, Gao YT, Yang G, Chow WH, Li HL, Zheng W, Shu XO: Age at menarche and natural menopause and number of reproductive years in association with mortality: results from a median follow-up of 11.2 years among 31,955 naturally menopausal Chinese women. *PLoS One* 2014; 9: e103673
- 2) Levine ME, Lu AT, Chen BH, Hernandez DG, Singleton AB, Ferrucci L, Bandinelli S, Salfati E, Manson JE, Quach A, Kusters CD, Kuh D, Wong A, Teschendorff AE, Widschwendter M, Ritz BR, Absher D, Assimes TL, Horvath S: Menopause accelerates biological aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2016; 113: 9327-9332
- 3) Sun F, Sebastiani P, Schupf N, Bae H, Andersen SL, McIntosh A, Abel H, Elo IT, Perls TT: Extended maternal age at birth of last child and women's longevity in the long life family study. *Menopause.* 2015; 22: 26-31
- 4) Barha CK, Hanna CW, Salvante KG, Wilson SL, Robinson WP, Altman RM, Nepomnaschy PA: Number of children and telomere length in women: a prospective, longitudinal evaluation. *PLoS One.* 2016; 11, e0146424
- 5) Barrett EL, Richardson DS: Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging Cell.* 2011; 10: 913-921
- 6) Behl C, Widmann M, Trapp T, Holsboer F: 17- β Estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 216: 473-482
- 7) Pollack AZ, Rivers K, Ahrens KA: Parity associated with telomere length among US reproductive age women. *Hum. Reprod.* 2018; 33: 736-744
- 8) Kelsey JL: Breast cancer epidemiology: summary and future directions. *Epidemiol. Rev.* 1993; 15: 256-263
- 9) MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, Salber EJ, Valaoras VG, Yuasa S: Age at first birth and breast cancer risk. *Bull. World Health Organ.* 1970; 43: 209-221
- 10) Guzman RC, Yang J, Rajkumar L, Thordarson G, Chen X, Nandi S: Hormonal prevention of breast cancer: mimicking the protective effect of pregnancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1999; 96: 2520-2525
- 11) Rajkumar L, Guzman RC, Yang J, Thordarson G, Talamantes F, Nandi S: Short-term exposure to pregnancy levels of estrogen prevents mammary carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2001; 98: 11755-11759
- 12) Merritt MA, Riboli E, Murphy N, Kadi M, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K, Dossus L, Dartois L, Clavel-Chapelon F, Fortner RT, Katzke VA, Boeing H, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Palli D, Sieri S, Tumino R, Sacerdote C, Panico S, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Lund E, Nakamura A,

- Weiderpass E, Quirós JR, Agudo A, Molina-Montes E, Larrañaga N, Dorronsoro M, Cirera L, Barricarte A, Olsson Å, Butt S, Idahl A, Lundin E, Wareham NJ, Key TJ, Brennan P, Ferrari P, Wark PA, Norat T, Cross AJ, Gunter MJ: Reproductive factors and risk of mortality in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition; a cohort study. *BMC Med.* 2015; 13: 252
- 13) Ohta R, Matsumoto A, Hashimoto Y, Nagao T, Mizutani M: Behavioral characteristics of rats selectively bred for high and low avoidance shuttlebox response. *Congenit. Anom. (Kyoto)*. 1995; 35: 223-229
- 14) Asai S, Ohta R, Shirota M, Sato M, Watanabe G, Taya K: Reproductive endocrinology in Hatano high- and low-avoidance rats during the estrous cycle. *Endocrine*. 2002; 18: 161-166
- 15) Shirota M, Sato M, Kojima K, Ohta R: Minor involvement of somatic growth in the onset of puberty of Hatano high- and low-avoidance rats. *Reproduction*. 2004; 127: 389-395
- 16) Ohta R, Kumagai F, Marumo H, Usumi K, Saito Y, Kuwagata M: Stress-reactive rats (high-avoidance female rats) have a shorter lifespan than stress-nonreactive rats (low-avoidance female rats). *J. Toxicol. Pathol.* 2016; 29: 77-84
- 17) 渡辺千朗, 代田真理子, 長尾哲二: SD系雌ラットの性周期の加齢性変化に関する研究. 秦野研究所年報 1994; 17: 37-40
- 18) Finch CE, Felicio LS, Mobbs CV, Nelson JF: Ovarian and steroidal influences on neuroendocrine aging processes in female rodents. *Endocr. Rev.* 1984; 5: 467-497
- 19) Yin C, Qi X: Pregnancy promotes pituitary tumors by increasing the rate of the cell cycle. *Oncol. Lett.* 2017; 14: 4873-4877
- 20) Taya K, Greenwald GS: Mechanisms of suppression of ovarian follicular development during lactation in the rat. *Biol Reprod.* 1982; 27: 1090-1101
- 21) Bridges RS, Felicio LF, Pellerin LJ, Stuer AM, Mann PE: Prior parity reduces post-coital diurnal and nocturnal prolactin surges in rats. *Life Sci.* 1993; 53: 439-445