

LLNA

媒体対照群におけるAOO、0.25、0.5、1%DNCB、2.5、5及び10%TMA群のSI値はそれぞれ 1.00 ± 0.081 、 5.60 ± 0.586 、 6.83 ± 0.394 、 7.01 ± 0.618 、 2.74 ± 0.399 、 5.19 ± 0.653 及び 7.85 ± 0.570 であり、EC6はDNCBが0.33%、TMAが6.52%であった。

1 μ g/kg/day群におけるAOO、0.25、0.5、1%DNCB、2.5、5及び10%TMA群のSI値はそれぞれ 1.00 ± 0.025 、 3.45 ± 0.386 、 5.24 ± 0.503 、 5.94 ± 0.377 、 2.78 ± 0.407 、 3.67 ± 0.164 及び 5.87 ± 0.757 であり、EC6はDNCBが1.04%、TMAが10.30%であった。

10 μ g/kg/day群におけるAOO、0.25、0.5、1%DNCB、2.5、5及び10%TMA群のSI値はそれぞれ 1.00 ± 0.079 、 8.71 ± 1.593 、 16.29 ± 0.590 、 16.51 ± 1.011 、 6.35 ± 0.966 、 11.82 ± 0.959 及び 18.65 ± 1.234 であり、EC6はDNCBが0.16%、TMAが2.34%であった(表4)。

胸腺細胞の分化能解析

雄仔動物離乳時の胸腺を用いた。離乳時における胸腺の各分化ステージのT細胞存在比には、明白な変化はみられなかった(表5)。

*In vitro*でのCD4⁺CD8⁺細胞への分化操作後、10 μ g/kg/day群においてCD4⁺CD8⁺細胞が減少、CD4⁺CD8⁻細胞及びCD4⁻CD8⁺細胞の増加が認められた(表6)。

更にTh1及びTh2細胞への分化操作後、細胞内サイトカインを染色することにより、Th1・Th2バランスへの影響を検討した結果、IL-4及びIL-10産生T細胞増加傾向を認め、Th2優位の変動が示唆された(表7、表8)。

D. 考察

CBA/JN マウスに1あるいは10 μ g/kg/dayの用量でEEを経胎盤・経乳汁曝露した結果、出産数、妊娠期間、産仔数などの生殖

毒性学的指標には媒体対照群との間で統計的な有意差は認められず、EEの経胎盤・経乳汁曝露による影響はないものと推察された。各群の母動物から生まれた出生仔の免疫機能への影響を検討するため、Th1誘導抗原(Dinitrochlorobenzene)及びTh2誘導抗原(Trimellitic anhydride)を用いてNon-RI LLNA試験を実施したところ、10 μ g/kg/day投与群の出生仔において、いずれの抗原に対しても統計的に有意なStimulation indexの上昇が確認され、初期免疫応答能が亢進している可能性が示唆された。また、EEの経胎盤・経乳汁曝露のT細胞分化への影響を検討するため、離乳直後に胸腺を摘出し、得られた胸腺細胞をPhorbol 12-myristate 13-acetate及びionomycinで刺激した後の分化状況を解析した結果、対照群と比較して10 μ g/kg/day投与群において、CD4/CD8(+ / +)細胞の減少、CD4/CD8(- / -)細胞の増加がみられ、胸腺細胞の分化能への影響が示唆された。以上の結果からEEの経胎盤・経乳汁曝露により、出生仔の胸腺細胞分化の変調により、初期免疫応答能の亢進される可能性が示唆された。

E. 結論

EEを経胎盤・経乳汁曝露により、出生仔の胸腺細胞分化の変調及び初期免疫応答能の亢進される可能性が示唆される。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

Takeyoshi M, Noda S, Yamasaki K. Differences in responsiveness of mouse strain against p-benzoquinone as assessed by non-radioisotopic murine local lymph node assay. *Exp Anim.* 2004, 53(2):171-3.

Takeyoshi M, Noda S, Yamazaki S, Kakishima

H, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of the skin sensitization potency of eugenol and its dimers using a non-radioisotopic modification of the local lymph node assay. *J Appl Toxicol*. 2004, 24(1):77-81.

Takeyoshi M, Sawaki M, Yamasaki K, Kimber I. Assessment of statistic analysis in non-radioisotopic local lymph node assay (non-RI-LLNA) with alpha-hexylcinnamic aldehyde as an example. *Toxicology*. 2003, 191(2-3):259-63.

Takeyoshi M, Kuga N, Yamasaki K. Development of a high-performance reporter plasmid for detection of chemicals with androgenic activity. *Arch Toxicol*. 2003, 77(5):274-9.

Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K. Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reprod Toxicol*. 2002, 16(4):367-9.

Takeyoshi M, Yamasaki K, Sawaki M, Nakai M, Noda S, Takatsuki M. The efficacy of endocrine disruptor screening tests in detecting anti-estrogenic effects downstream of receptor-ligand

interactions. *Toxicol Lett*. 2002, 126(2):91-8.

Takeyoshi M, Yamasaki K, Yakabe Y, Takatsuki M, Kimber I. Development of non-radio isotopic endpoint of murine local lymph node assay based on 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) incorporation. *Toxicol Lett*. 2001, 119(3):203-8.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

環境ホルモン活性測定用プラスミドの開発

出願番号：特許出願2001-274877

公開番号：特許公開2003-79368

化学物質のアレルギー性強度推定法

出願番号：特許出願2003-333984

公開番号：特許公開2005-95080

Non-RI LLNA法の感度上昇法

出願番号：特許出願2004-230151

未公開

表 1

出産数(匹)		
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	出産数	未出産数
VC	16	19
1	31	19
10	23	27

表 2

妊娠期間(日)	
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	
VC	20.44 \pm 0.157
1	20.44 \pm 0.100
10	20.40 \pm 0.163

平均 \pm 標準偏差

表 3

産仔数(匹)			
Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	雄	雌	合計
VC	1.5 \pm 0.26	2.1 \pm 0.30	3.6 \pm 0.35
1	1.5 \pm 0.22	1.9 \pm 0.22	3.5 \pm 0.29
10	1.8 \pm 0.20	2.1 \pm 0.24	3.9 \pm 0.27

平均 \pm 標準偏差

表 4

F0 Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	感作群	濃度	動物数	リンパ節重量 (mg)		Stimulation index		EC6
				平均	\pm 標準誤差	平均	\pm 標準誤差	
VC	AOO	-	3	3.8	\pm 0.19	1.00	\pm 0.081	-
		0.25%	3	12.0	\pm 0.62	5.60	\pm 0.586	
	DNCB	0.5%	3	18.5	\pm 0.64	6.83	\pm 0.394	0.33%
		1%	3	19.5	\pm 0.58	7.01	\pm 0.618	
	TMA	2.5%	3	10.3	\pm 0.23	2.74	\pm 0.399	
		5%	3	14.4	\pm 1.21	5.19	\pm 0.653	6.52%
10%	3	19.6	\pm 2.51	7.85	\pm 0.570			
1	AOO	-	4	4.3	\pm 0.15	1.00	\pm 0.025	-
		0.25%	4	13.9	\pm 0.78	3.45	\pm 0.386	
	DNCB	0.5%	4	19.4	\pm 1.17	5.24	\pm 0.503	1.04%
		1%	4	22.9	\pm 0.70	5.94	\pm 0.377	
	TMA	2.5%	4	11.5	\pm 1.05	2.78	\pm 0.407	
		5%	4	14.5	\pm 0.75	3.67	\pm 0.164	10.30%
10%	4	17.5	\pm 0.64	5.87	\pm 0.757			
10	AOO	-	4	4.2	\pm 0.35	1.00	\pm 0.079	-
		0.25%	4	14.0	\pm 0.67	8.71	\pm 1.593	
	DNCB	0.5%	4	18.3	\pm 1.15	16.29	\pm 0.590	0.16%
		1%	4	21.4	\pm 1.28	16.51	\pm 1.011	
	TMA	2.5%	4	10.6	\pm 1.02	6.35	\pm 0.966	
		5%	4	14.6	\pm 0.89	11.82	\pm 0.959	2.34%
10%	4	19.3	\pm 1.66	18.65	\pm 1.234			

表 5 雄仔動物離乳時の胸腺における各分化ステージの T 細胞存在比

F0 Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	n	T 細胞存在比 (%)			
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻
VC	4	1.36 \pm 0.25	87.97 \pm 2.63	1.90 \pm 0.50	8.77 \pm 2.40
1	4	1.36 \pm 0.20	87.74 \pm 0.91	1.85 \pm 0.43	9.06 \pm 1.04
10	4	1.34 \pm 0.36	88.63 \pm 1.12	1.71 \pm 0.46	8.32 \pm 0.99

平均 \pm 標準偏差

表 6 CD4⁺CD8⁻細胞への分化誘導操作後における各分化ステージの T 細胞存在比

F0 Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	n	T 細胞存在比 (%)			
		CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD8 ⁻	CD4 ⁺ CD8 ⁻
VC	4	6.19 \pm 1.39	28.05 \pm 6.85	8.78 \pm 2.06	56.99 \pm 4.82
1	4	6.19 \pm 1.07	26.64 \pm 10.29	8.66 \pm 1.90	58.51 \pm 7.75
10	4	6.99 \pm 1.35	17.84 \pm 2.45	13.61 \pm 3.74	61.57 \pm 4.88

平均 \pm 標準偏差

表 7 Th1 及び Th2 細胞への分化誘導操作後におけるサイトカイン産生 T 細胞存在比

F0 Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	n	サイトカイン産生 T 細胞存在比 (%)	
		IL-4	IFN- γ
VC	4	17.77 \pm 4.81	13.02 \pm 9.06
1	4	15.93 \pm 3.27	12.65 \pm 1.21
10	4	18.96 \pm 2.74	11.20 \pm 3.48

平均 \pm 標準偏差

表 8 Th1 及び Th2 細胞への分化誘導操作後におけるサイトカイン産生 T 細胞存在比

F0 Doses ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	n	サイトカイン産生 T 細胞存在比 (%)	
		IL-10	IFN- γ
VC	4	9.79 \pm 1.43	13.35 \pm 7.56
1	4	10.57 \pm 2.58	10.47 \pm 1.60
10	4	11.20 \pm 2.14	11.65 \pm 2.80

平均 \pm 標準偏差

3) 生殖器

7. 内分泌かく乱化学物質の雄性生殖器発達及びその機能に及ぼす影響

分担研究者 長尾 哲二 近畿大学理工学部 生命科学・発生生物 教授
研究協力者 斉藤 義明 (財)食品薬品安全センター秦野研究所
研究協力者 臼見 憲司 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨：生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、器官形成、性分化、組織発生、出生、発達・発育、性成熟、生殖、老化、死に至るすべての生命事象において、EDCs の低用量曝露により予想される内分泌学的毒性変化を含む生殖・発生毒性学的変化を、鋭敏に且つ早期に捉えることができる試験系を確立するための毒性指標をラットあるいはマウスを用いて網羅的に検討することを目的とした。今年度はマウスを用いて胎生期曝露による肛門-生殖突起間距離(AGD)の変化、肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリクス増生およびヒドロキシプロリン量の変化、ラットを用いて精巣下降不全あるいは尿道下裂など先天性生殖器奇形の誘発について観察し、それらの有用性を検討した。精巣下降不全あるいは尿道下裂が合成ホルモン剤あるいはフタル酸エステルの胎生期曝露により末期胎児あるいは新生児に確認されたが、低用量 BPA 曝露ではみられなかった。EDCs に曝露された雄胎児の肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリクス増生およびヒドロキシプロリン量は抑制される傾向がみられたことから、AGD の測定と同様、鋭敏な指標になり得ると思われた。

A. 研究目的

本研究は、個体の一生涯で起こる生命事象を標的とした有害性評価試験系を構築することを目的とした。特に胎生期ならびに新生児期にあたる高感受期（いわゆるウインドウ期）に焦点を当てて、これらの時期の EDCs の曝露が、曝露後間もない時期の生殖巣あるいは初期発生・発達段階の精巣に生じたと予測される傷害は、その後のライフサイクルのいかなる時期に初めて毒性として捉えることができるのか、あるいは晩発的な障害としてのみ捉えることができるのか、さらにもどのような初期傷害が性成熟後にみられる生殖機能障害と関連するのかについて検討することは重要である。すなわち本研究では、EDCs の環境レベルに近い低用量における毒性影響の検出を考慮しつつ、先天性生殖器奇形、生殖細胞死、配偶子形成あるいはステロイド合成などの指標のいずれが EDCs の adverse effects を検出する雄性生殖毒性指標として適切であるかを検討し、内分泌かく乱作用により懸念される生体傷害を網羅的に確認する一生涯試験の確立に貢献することを目的とした。そこで本年度は、胎生期曝露による肛門-生殖突起間距離(AGD)の変化と肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリクス増生およびヒドロキシプロリ

ン量の変化について、前年度にひきつづき検討した。また精巣下降不全 cryptorchidism あるいは尿道下裂 hypospadias など男児において出生時に最も高率にみられる先天性生殖器奇形の誘発についても用量・反応性あるいは時期特異性について検討した。なお精巣下降不全は全出生男児の 1~5%に、尿道下裂は 0.3~0.7%にみられる (Toppari *et al.*, 1996; Pierik *et al.*, 2002)。

B. 研究方法

生殖細胞形成、排卵、受精、卵割、着床、胎盤形成、器官形成、性分化、組織発生、出生、発達・発育、性成熟、生殖、老化、死に至るすべての生命事象において、EDCs の低用量曝露により予想される内分泌学的毒性変化を含む生殖・発生毒性学的変化を、鋭敏に且つ早期に捉えることができる試験系を確立するための毒性指標を網羅的に検討した。そのために、分担研究者らのこれまでの生殖・発生毒性試験・研究からその毒性指標としての鋭敏性・確実性が認められたものについて、一生涯試験法のなかでの有効性を確認するため、まず以下の実験を行った。

ICR マウスは日本クレア株式会社より 8 週齢にて、SD ラットは日本チャール

ス・リバー株式会社よりそれぞれ購入し、入荷後 1 週間の検疫・馴化の後、体重増加および一般状態に異常のない動物を実験に使用した。飼育環境・方法などについては分担研究者らの既報と同様にした。実験方法の概要を以下に示した。

①EDCs の外生殖器の形成過程に及ぼす影響については、マウスの妊娠 15 日から 17 日の連日に数種の EDCs および抗アンドロゲン剤のフルタミド(Flu)12.5~100 mg/kg 体重/日あるいはピンクロゾリン(Vcz) 25~100 mg/kg 体重/日を強制的に経口投与し、妊娠 18 日に帝王切開により胎児を摘出して、雌雄別に体重を測定後、生殖突起から肛門までの距離(Ano-genital distance: AGD)を測定した。次いで Flu あるいは Vcz の 100 mg/kg 体重/日投与群の雌雄については、1.25%グルタルアルデヒドおよび 2%パラホルムアルデヒド固定したマウス胎児の肛門-生殖突起周辺組織を正中で切り出し、2%四酸化オスミウムで後固定してエタノール脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。各ブロックから約 1 μ m の厚切り切片を作製し、トルイジンブルー染色を行って、光学顕微鏡による観察を行った。また、一部の例については、超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡による観察を実施した。さらに、一部の胎児については細胞外マトリクス増生の有無を観察するために、4%パラホルムアルデヒド固定されたマウス胎児の肛門-生殖突起周辺組織を正中で切り出し、パラフィン切片とした。また、各群の一部の胎児については凍結し、クリオスタットで薄切した。各切片を ABC 法により Type IV Collagen (線維成分)、Fibronectin (接着分子) および Proteoglycan (非線維成分) の免疫染色を行った。なお、Fibronectin および Proteoglycan については現在、観察を実施中である。次いで同部位における間葉細胞群のヒドロキシプロリン(HP)量を細胞外マトリクス量としてその定量を、Smith らの方法 (*J. Immunol.*, 153, 1994) に準じて試みた。

②先天性生殖器奇形(尿道下裂、停留精巣等)の誘発については、妊娠 3~20 日にジブチルフタレート DBP の 250~750 mg/kg 体重/日をコーン油に懸濁して強制的に経口投与した。また、先天性生殖器奇形誘発に関する時期特異性については、Vcz の 400 mg/kg 体重/日を妊娠 12 日から 21 日の間、2 日間連続して強制的に経口投与し、生後 1 日に観察した。

なお、いずれの実験においても近畿大学理工学部「動物実験に関する指針」に準拠して行い、使用した動物の屠殺にあたっては、麻酔薬の使用ないしは頸椎脱臼など苦痛の少ない方法を用いた。

C. 研究結果

①EDCs の外生殖器の形成過程に及ぼす影響については、DES、E₂、EE、EB、Flu あるいは Vcz の胎生期曝露により雄の末期胎児の AGD(AGD \cdot 体重³)が対照群と比較して有意に短縮した。Flu および Vcz の 100 mg/kg 体重/日について実施した雌雄胎児の肛門-生殖突起間周辺の組織観察においては、対照群の雄および Vcz 投与群の雄では、肛門-生殖突起間の表皮組織直下真皮層に毛嚢様あるいは腺様構造を呈する上皮様細胞の集塊が認められたが、Flu 投与群ではこれらの組織構造は認められなかった。また、対照群および各投与群の雌にも観察されなかった。

上記腺様構造の電子顕微鏡観察では、上皮細胞に特異的なデスモソーム結合が認められ、これら細胞集塊は基底膜様構造により取り囲まれていた。当該部位の単位重量あたりの HP 量の定量については Flu あるいは Vcz 曝露群の雄胎児における HP 量が対照群と比較して抑制される傾向がみられた。また、当該部位における Type IV Collagen の免疫染色では、肛門-生殖突起間の表皮細胞層直下の染色性および分布について比較したが、群間および雌雄間に差は認められなかった。

②DBP の妊娠期投与の結果、生後 1 日の AGD(AGD \cdot 体重³)は、DBP の用量に依存して短縮した。先天性生殖器奇形の誘発に関しては尿道下裂ならびに精巣下降不全の発現頻度がいずれも有意に上昇した。Vcz を用いて検討した先天性生殖器奇形誘発に関する臨界期は、ラットでは妊娠 16~17 日であった。

D. 考察

正常雄胎児の肛門-生殖突起間の組織観察では、雌胎児と比較して細胞間質の増加がみられ、同時に細胞外マトリクスの増生が認められた。当該部位の単位重量あたりの HP 量の定量については、Flu 曝露群の雄胎児における HP 量が対照群と比較して抑制される傾向がみられた。ヒドロキシプロリン(HP)はヒドロキシリシン(HL)とともにコラーゲンに多い修飾アミノ酸で、リシンとプロリンがプロコラーゲン分子に取り込まれた後に働く酵

素により作られる。HP および HL は動物細胞のほかのタンパク質にはほとんど存在しないアミノ酸である。HP あるいは HL 量の変化が、ホルモン様作用物質 hormonally active agents の胎生期曝露効果に関する鋭敏な指標と考えられている AGD と同様に EDCs の胎生期、新生児期曝露の毒性指標の一つと成り得るかについては、その機構解明とともに今後も検討を継続することが重要である。

フタル酸エステルを胎児期に曝露すると、雄ではテストステロン合成を抑制し、胎児の精巣下降に関連している遺伝子など (*insulin-like peptide 3*, *Hoxa-10*, *calcitonin gene related peptide* など) に干渉することが知られている。発生学的には、上方靱帯と精巣導帯により腎臓近位にその位置を保つ生殖原基は、発生の進行とともに、雄ではアンドロゲンにより上方靱帯が退化し、逆に精巣導帯が発達して下方に精巣を引き寄せることにより精巣下降が進む。このように精巣下降あるいは尿道下裂の成立機構については組織から分子のレベルまでかなり詳細に解析されていることから、今後、分子レベルでの指標、例えば雄胎児 Leydig 細胞における *insulin-like peptide 3* (Insl 3) 遺伝子の発現変化などが、鋭敏な指標になり得るか検討することは重要であると思われる。

E. 結論

従来の毒性評価法に則ったこれまでの一世代、多世代生殖・発生毒性試験を中心とする大規模なバイオアッセイ (OECD TG415, 416, 421, 422) では、多くの内分泌かく乱性に関して陽性候補物質が陰性の結果に終始することが大いに予測されるが、本研究は個体の一生涯の殆どすべての事象において発現が予想される多様な生殖・発生毒性に焦点を当てているため、本研究で検討する毒性指標の中から鋭敏な指標が確認できれば、本研究は一生涯を標的とした有害性評価試験系の構築に寄与できると思われる。とくに Flu あるいは Vcz 胎生期曝露により肛門-生殖突起周辺組織における細胞外マトリクス増生および HP 量が抑制される傾向がみられたことから、これらの指標は、今後さらに検討を重ねることにより AGD と同様、鋭敏な指標になると思われる。さらに、精巣下降の解剖学的検索のみならず、精巣下降の制御に関連する様々な遺伝子群について検討することにより鋭敏な指標が見つかる可能性も十分にある

と思われる。

F.健康危惧情報

得られた研究成果に健康危惧に関する情報は無い。

G.研究発表 (過去3年間)

1. 論文発表

1) 書籍

Nagao T., Kagawa N., Nakagomi M., Fujikawa K. Increased incidence of malformations in the offspring of male mice prenatally exposed to synthetic estrogens. In: *Advances in Male Mediated Developmental Toxicity*. (Robaire B. and Holes BF. eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp.211-217(2003).

2) 雑誌

Okuda H., Nagao T. Cardiovascular defects induced by prenatal exposure to phenobarbital in rats. *Cong. Anom.*, in press (2006).

Shirota M., Saito Y., Imai K., Horiuchi S., Yoshimura S., Sato M., Nagao T., Ono H., Katoh M. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fetal testicular development by oral administration to pregnant rats. *J. Toxicol. Sci.*, **30**: 175-194 (2005).

Kuwagata M., Muneoka KT., Ogawa T., Takigawa M., Nagao T. Locomotor hyperactivity following pregnant exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine: neurochemical and behavioral evidence of dopaminergic and serotonergic alterations. *Toxicol. Lett.*, **152**: 63-71 (2004).

Nagao T., Wada K., Kuwagata M., Nakagomi M., Watanabe C., Yoshimura S., Saito Y., Usumi K., Kanno J. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod. Toxicol.*, **18**: 109-120 (2004).

Watanabe C., Kuwagata M., Yoshimura S., Azegami J., Kojima K., Ono H., Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Cong. Anom.*, **43**: 177-179 (2003).

2. 学会発表

Nagao T.: Biological effects of

diethylstilbestrol -Transgenerational effect of endocrine disrupting chemicals- 国際毒性病理学会シンポジウム (神戸) 抄録集 p.91、2004

長尾 哲二：ジエチルスチルベストロールの生体影響 内分泌攪乱化学物質特別シンポジウム 性腺軸 (視床下部-下垂体-性腺) の発育と異常 (葉山)、抄録集 pp. 41-45、2003

H. 知的財産所有権の出願、登録状況

特許取得および実用新案登録はない。

8. 内分泌かく乱化学物質の胎生期・新生児期曝露が雌性生殖器に与える影響に関する研究

分担研究者 吉田 緑 財団法人 佐々木研究所 研究員

研究要旨 ラットおよびマウスを用いて EDCs の胎生期・新生仔期曝露による遅発性影響検出系確立するため、陽性対照物質 DES を Donryu ラットに、1500、150、15、1.5、0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の用量で、C57BL/6N マウスには、2、0.2、0.02 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の用量で生後 24 時間以内に単回皮下投与した。その結果、ラットでは即時型 androgenization が 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で、遅発型影響が約 30 週齢までに 150～1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群で観察されたが、0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群は対照群と同様の変化を示した。これらの結果より Donryu ラットでは DES 1.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 生後 24 時間以内に単回皮下投与により遅発影響を検出でき、性周期観察は鋭敏な endpoint であることが明らかとなった。観察期間は陰性対照群の動物が持続発情を示す 10 ヶ月齢まで行うことが望ましいと結論した。飼育管理方法の改善により C57BL/6N マウスの繁殖・哺育成績が良好となったが、マウスでは性周期観察を指標にした明らかな遅発型影響の発現は認められなかった。また、第一次卵胞数を減少させる busulfan を子宮癌好発系 Donryu ラットの胎生期曝露し、卵胞数減少が子宮内膜腺癌に及ぼす影響を検索したところ、子宮内膜腺癌の発生が促進された。Busulfan 投与により持続発情の出現が早期化を示し、E/P 比が増加傾向を示した。

A. 研究目的

EDCs の胎生期・新生児期暴露影響として遅発型影響が存在することはあまり知られていないが、この遅発型影響が、動物実験データを基にヒトへの化学物質の内分泌かく乱性を考慮した場合、性成熟期までの短期観察期間では検出できないこの影響の存在は極めて重要と考える。この遅延型影響は主として雌ラットおよびマウスで報告されており、特徴として性成熟前における影響は明らかでなく、性成熟後における卵巣機能の早期低下など、影響の発現までにかかりの時間を要する。さらに、ラットではこの遅発型影響によって子宮癌の発生が促進することが報告されている。この遅延型の影響は、視床下部・下垂体・性腺系へのなんらかの異常が引き金になっていると考えられるが、発生機序あるいは雄に対する影響について明らかではない。

子宮体部癌の発生には卵巣の機能が密接に関連しており、ヒトやラットにおいては卵巣機能の低下、形態的には黄体形成がなく閉鎖卵胞のみからなる萎縮性卵巣の存在が、子宮内膜腺癌発生の最も重要な因子とされているが、萎縮に至る経緯は明らかではない。近年、慢性白血病の抗癌剤である busulfan の胎生期単回投与が SD 系ラットの第一次卵胞数を顕著に減少させることが報告された (Shirota et al, Reproduction,

2003)。本年度は busulfan を子宮癌好発系 Donryu ラットの胎生期に単回曝露し、卵胞数の減少が子宮内膜腺癌に及ぼす影響について検索した。即ち、前年度までの遅発型影響研究を継承し、Donryu ラットおよび C57BL/6N マウスを用いて上述の遅発型の影響を検出するとともに busulfan の胎生期曝露による卵胞数減少が子宮癌好発系 Donryu ラットの子宮内膜腺癌に及ぼす影響について解明することを目的として、研究を実施した。遅発型影響については (1) 陽性対照物質の用量 (2) 遅延型影響を確実に検出す指標の確立 (3) 観察期間について検索した。また、卵巣を含むホルモン環境の変化が子宮癌に与える影響の研究の一環として、busulfan の胎生期曝露による卵胞数減少が子宮癌好発系 Donryu ラットの子宮内膜腺癌に及ぼす影響について、(1) 子宮癌への修飾作用 (2) 発現機序について検討した。

B. 研究方法

1) ラットおよびマウスを用いた遅発型影響検出のための陽性対照動物の作製

(1) Donryu ラットを用いた遅発型影響検出のための陽性対照動物の作製

前年度までの研究結果より、新生児期曝露の陽性対照として DES (Sigma) を選択した。DES は生後 24 時間以内の Donryu 雌ラットに 0.001、0.01、0.1、1.0 および 10 $\mu\text{g}/\text{rat}$

(0.15、1.5、15、150 および 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重に相当) (Table 1) を背部皮下に単回投与し、遅発型影響の発現の有無を観察した。DES は少量を dimethylsulphoxide (DMSO) に溶解し、コーン油で希釈し指定濃度に調製した。投与液量は、25 $\mu\text{l}/\text{rat}$ になるよう調製した。陰性対照群には溶媒のみを投与した。

実験デザインについて Fig.1 に示した。DES の投与量は、高用量 2 群が文献的に SD 系ラットにおいて視床下部・下垂体・性腺系を直ちに障害する即時型 androgenization と遅発型影響を誘発する量であると報告されていることから採用した。

遅発型影響発現の判定には、性成熟に至るまで児の体重測定、膈開口時期の観察を行い、PND 14、21、5 週齢および 7 週齢に一部の動物を剖検して臓器重量、生殖器・内分泌系臓器の病理組織学的検索を行った。5 および 7 週齢では、持続発情を示す動物が存在する投与群では持続発情を示す個体を、正常性周期を示す動物のみが存在する場合は発情期の動物を剖検に供した。性成熟後は性周期における検索を指標とし、体重を定期的に測定した。5 および 7 週齢の剖検時に、卵巣、子宮、胸腺および乳腺の組織の一部を凍結し、RNA を抽出後、estrogen receptor α あるいは β などの遺伝子について RT-PCR 法にて解析を行った(7 週齢のサンプルについては 17 年 1 月現在解析中である)。

子宮癌および乳癌発生に対する影響を観察する目的で、49 日齢に全例に DMBA 10mg/rat を単回強制経口投与、N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) 20mg/kg を子宮腔内に経膈的に単回投与した。12 ヶ月齢で生存例を剖検し、子宮癌および乳癌の発生頻度および発生病変数を病理形態学的に検索した。平成 17 年 1 月現在これらの動物について標本作製中であり発癌に対する影響については次年度に解析する予定である。

DES の投与量が示すエストロゲン作用を確認する目的で、正常性周期を示す Donryu ラットの卵巣摘出 2 週間後に、0.15、1.5、15、150 および 1500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重の DES を

単回皮下投与し、24 時間後に剖検して子宮重量を測定した。

(2) C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

妊娠後期の C57BL/6N 雌マウスの搬入・飼育に際し、以下の三点についてとくに留意して飼育管理を行った：

床敷用チップを多目に入れる

輸送時のチップと餌をケージに入れる

出産後投与以外は約 1 週間程度ケージ越しの観察のみ行う。

PND 1 の C57BL/6N 雌マウスに、0.02、0.2、2 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の DES を背部皮下投与し、遅延型影響の発現の有無を観察した。DES は少量を DMSO に溶解し、コーン油にて希釈し指定濃度に調製した。投与容量は、20 $\mu\text{l}/\text{mouse}$ になるよう調製した。PND1 投与による影響を確認する目的で陰性対照群として溶媒投与群と無処置群を設けて DES 各投与群と比較した。高用量が文献的にマウスの視床下部・下垂体・性腺系を障害し、androgenization を誘発する量であること採用した。これらの母マウスは、妊娠後期(妊娠 16 日~12 日)で日本チャールス・リバー社から入手し、佐々木研究所実験動物施設で出生したものを実験に使用した。

遅延型影響発現の判定には、性周期における検索を指標とし、16 週齢まで観察し、体重についても定期的に測定した。12 ヶ月齢に生存例全例を剖検し、生殖器および内分泌系臓器について形態学的に観察した。平成 17 年 1 月現在、標本作製中であり、解析は次年度に実施予定である。

(3) busulfan の胎生期曝露による卵胞数減少が子宮癌好発系 Donryu ラットの子宮内膜腺癌に及ぼす影響

妊娠 14 日目のラットに 2.5 および 5.0mg/kg の busulfan を単回腹腔内投与し得られた雌仔を実験に用いた。雌仔ラットは 11 週齢に N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (ENNG) 20mg/kg 子宮腔内経膈的単回投与による発癌起始操作を行い、15 ヶ月齢まで飼育して子宮の増殖性病変の発生と卵巣の形態を観察し、15 ヶ月齢で下垂体、性ステロイド、インヒビンなど関連ホルモンの血中レベルを測定した。対照群には溶媒のみを

投与し、busulfan 投与群と比較した。動物には子宮内膜腺癌好発系の Donryu 雌ラットを用いた。

本実験は「動物の保護及び管理に関する基準(昭和53年3月27日、総理府告示第6号)」の主旨およびおおよびWHO(World Health Organization:世界保健機構)の医学研究顧問委員会の勧告に基づきCIOMS(The Council for International Organization of Medical Sciences:国際医科学関係組織協議会)が発表した「動物を用いる生物医学研究のための国際指導(International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals)」に沿って実施した。

C. 研究結果

1) ラットおよびマウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

Donryu ラットを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

①性成熟までの観察

体重および膣開口時期に投与による影響は認められなかった(Figs. 2, 3)。PND14、21、5 および 7 週齢における臓器重量を Fig. 4 に示した。胸腺、子宮の重量はいずれの検査時期においても差が認められなかったが、卵巣重量は5、7 週齢で DES10 および 1 μ g 群において有意に低下した。

病理組織学的検査において、DES 10 および 1 μ g 群において影響が観察された。10 μ g 群では PND 21 より低形成を示したが、1 μ g 群では異常は認められなかった。初回排卵後の5週齢の検査では両群の卵巣ともにのう胞状の変性卵胞より構成され卵巣の小型化が認められた(Fig. 5)。子宮は PND21 までは被覆および腺上皮ともに形成が認められ、投与による変化は認められなかったが(Fig. 6A)、5週齢では DES 10 μ g 群では被覆上皮の高さが明らかに高く、DES 1 μ g では被覆上皮の上皮内過形成(intraluminal hyperplasia)が認められた(Fig. 6B)。膣では PND 14 の DES 10 μ g 群において扁平上皮の肥厚が観察された(Fig. 7)が、PND 21 ではいずれの DES 群も対照群と同様の組織像であった。5週齢以降は DES10 および 1 μ g

群で扁平上皮の肥厚が認められた(Fig. 7)。胸腺および乳腺には HE 染色では異常は認められなかった。

5 週齢の卵巣、子宮および胸腺 ER α 、 β 、プロゲステロンレセプター(ProgR)あるいは卵胞・黄体に発現している rat inhibitor of apoptosis protein (rIAP3) の mRNA の発現を RT-PCR 法により比較したが、DES 10 μ g 群で ProgR の発現の増加が観察された以外、とくに変化は認められ勝った。

②性周期

性周期の結果を Fig. 9 に示した。DES 10 μ g 群では膣開口後ただちに持続発情を示した。DES 1 μ g 群においても膣開口後持続発情を示す動物は少数例ながら認められ、経時的に増加して 11 週齢で半数、15 週齢で大部分の動物が持続発情となった。DES 0.1 μ g 群では 11 週齢までは正常な性周期を示したが、13 週齢より持続発情が出現し 15 週齢で半数 19 週齢で大部分が持続発情となった。DES 0.01 μ g 群では 15 週齢より持続発情が出現し 19 週齢で半数、28 週齢で大部分が持続発情を示した。DES 0.001 μ g 群および対照群は同じ推移を示し、23 週齢で持続発情が出現、31 週齢で半数が持続発情となった。

③DES 投与量のエストロゲン活性

体重あたりの DES の用量を Table 1 に、子宮肥大試験の結果を Fig. 10 に示した。子宮重量は DES 0.1 μ g 群以上で有意に増加し、DES 0.01 μ g 群においても有意差はないものの増加傾向を示した。DES 0.001 μ g 群は対照群と同様の値を示した。

C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

離乳までの児数、死亡数および哺育を中断した母動物数を Table 2 に示した。いずれの群においても死亡児数、哺育中断母動物数は少なく、ほとんどの児動物が離乳まで成育することが明らかとなった。また、対照群と投与群で有意な差はいずれの項目にも認められなかった。溶媒対照群と無処置対照群の間にも有意な差は認められなかった。また、児動物の体重についても投与による変化は観察されなかった。

性周期については、DES2 μ g 群で持続発情

を示す動物が多い傾向が 9 週齢より観察された (Fig. 11)。経時的な変動について、本実験は 16 週齢までの観察であるものの、持続発情動物の増加傾向はいずれの群にも認められなかった。

(3) busulfan の胎生期曝露による卵胞数減少が子宮癌好発系 Donryu ラットの子宮内膜腺癌に及ぼす影響

Busulfan 5.0mg/kg 群では、子宮内膜腺癌の発生頻度と腫瘍性病変数ともに有意な増加を示したが、2.5mg/kg 群は対照群と同様であった (Table 3)。Busulfan 群では対照群と比べ早くより持続発情を示し、5.0mg/kg 群では対照群より約 4 ヶ月間早い 6 ヶ月齢で、2.5mg/kg 群では 8 ヶ月齢で大部分が持続発情となった (Fig. 12)。Busulfan 投与の卵巣は萎縮し、形態学的に黄体および卵胞ともに殆ど認められなかった (Fig. 13)。Busulfan 投与により血中のインヒピン、エストロゲンおよびプロゲステロンともに減少したが、E/P 比は 5.0mg/kg 群で増加傾向を示した (Fig. 14)。

D. 考察

1) ラットおよびマウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

Donryu ラットを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

今回得られた実験結果より Table 4 にまとめた。性成熟期までの検索では DES 1 μ g (150 μ g/kg) 群以上の群で、卵巣重量の低下、卵巣の形態異常、DES 10 μ g (1500 μ g/kg) 群ではさらに膈上皮の肥厚が認められた。膈開口後の性周期観察では、性成熟前観察では異常の認められなかった DES 0.01 μ g 群 (1.5 μ g/kg) 以上の投与群で持続発情の早期出現が明らかに認められた。DES 0.001 μ g 群 (0.15 μ g/kg) では投与による影響は認められなかった。これらの結果は DES 10 μ g (1500 μ g/kg) 群では即時型の androgenization が起きていると考えられ、DES 1 μ g 群 (150 μ g/kg) から 0.01 μ g 群 (1.5 μ g/kg) では遅延型影響が出現していると結論した。

また、本実験の結果は、DES 新生児期曝露による遅延型影響が一般的な化学物質と同

様、用量依存性に出現することが明らかとなった。また、新生児期曝露による遅延影響を検出する指標として、継続的な性周期の観察が最も検出感度の高いことが明らかとなった。観察期間としては、対照群の大部分が持続発情となる 10 ヶ月齢が至適な観察期間であると考えられた。

C57BL/6N マウスを用いた遅延型影響検索のための陽性対照動物の作製

今回の実験結果より、妊娠マウスは搬入後の飼育環境を十分留意すれば、正常に分娩・哺育を行うことが明らかとなり、実験に使用する児動物数を確保可能であると思われた。

マウスの遅延影響については、今回の実験結果では明らかにならなかった。今回は観察期間が短期間であったため、さらに長期の性周期観察を行う必要があると考えられた。

(3) busulfan の胎生期曝露による卵胞数減少が子宮癌好発系 Donryu ラットの子宮内膜腺癌に及ぼす影響

実験結果より、busulfan 胎生期曝露による卵胞数の減少が Donryu ラットの子宮内膜腺癌発生を増強することが明らかとなった。その機序として、卵胞数の減少による早期からの卵巣機能障害が相対的高エストロゲン状態をもたらし、その結果子宮体部癌の発生に影響している可能性が示唆された。

E. 結論

ラットにおける遅延影響検出モデルの概略を Table 5 に記した。

陽性対照物質 DES を Donryu ラットに、1500、150、15、1.5、0.15 μ g/kg 体重の用量で、C57BL/6N マウスには、2、0.2、0.02 μ g/mouse の用量で生後 24 時間以内に単回皮下投与した結果、ラットでは即時型 androgenization が 1500 μ g/kg 群で観察され、遅延型影響が 150~1.5 μ g/kg 群で観察された。最低用量である 0.15 μ g/kg 群には投与の影響は観察されなかった。マウスの遅延性影響を検出するには至らなかった。

これらの結果より Donryu ラットでは DES 1.5 μ g/kg 生後 24 時間以内に単回皮下投与

により遅発影響を検出でき、性周期観察は鋭敏な endpoint であり、観察期間は陰性対照群の動物が持続発情を示す 10 ヶ月齢まで行うことが望ましいと結論した。また、子宮癌好発系 Donryu ラットへの busulfan 胎生期曝露により子宮内膜腺癌の発生が促進され、その機序として卵胞数減少による持続発情の早期化および E/P 比の増加傾向が関連していると結論した。

F 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

Yoshida M, Maekawa A.
Uterine carcinogenesis based on estrogen or metabolite driven pathways in the Donryu rat.
Cancer
Tanaka and H Tsuda
arcinogenesis and modification of
carcinogenesis
Research Signpost,
India
2005
135-151

2) 雑誌

Yoshida, M., Watanabe, G., Shirota, M.,
Maekawa, A., Taya, K., 51, 707-
714. Shimomoto T., Yoshida, M., Katusda S,
Takahashi M, Uematsu F, Kuniyasu H,
Maekawa A, Nakae D
Reduction of primordial follicles caused by
maternal treatment with busulfan promotes
endometrial adenocarcinoma development in
Donryu rats.
Journal of Reproduction and Development
51
, 707-714
2005

① Shimomoto T., Yoshida, M., Katusda S,
Takahashi M, Uematsu F, Kuniyasu H,
Maekawa A, Nakae D
Alpha-smooth muscle actin-positive stromal
cells reactive to estrogens surround
endometrial glands in rats but not mice
Journal of Toxicologic Pathology
18
47-52
2005

Uematsu, F., Takahashi, M., Yoshida, M.,
Igarashi, M, Watanabe, N., Suzuki, N., Abe, M.,
Rusyn, I., Floyd, R., Nakae, D
Distinct patterns of gene expression in
hepatocellular carcinomas and adjacent non-
cancerous, cirrotic liver tissues in rats fed a
choline-deficient, L-amino acid-defined diet.
Cancer Science.
96
414-424
2005

Yoshida, M, Katashima, S., Ando, J., Tanaka,
T., Uematsu, F., Nakae, D. and Maekawa, A.
Dietary indole-3-carbinol promotes
endometrial adenocarcinoma development
in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-
nitrosoguanidine, with induction of cytochrome
P450s in the liver and consequent modulation
of estrogen metabolism.
③Carcinogenesis
④25
⑤2257-2264
⑥2004

Katsuda, S., Yoshida, M., Saarinen, N., Smeds,
A., Nakae, D., Santti, R. and Maekawa, A.
Chemopreventive effects of
hydroxymatairesinol on uterine carcinogenesis
in Donryu rats.
③Experimental Biology and Medicine
④229
⑤417-424
⑥2004

Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S.,
Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A.
Lack of effect for maternal exposure to low-
doses of bisphenol A on development of the
female reproductive tract and uterine
carcinogenesis in rats.
③Journal of Reproduction and Development.
④50
⑤349-367
⑥2004

Uematsu, F., Yoshida, M., Takahashi, M., Abe,
M., Igarashi, M., Watanabe, N., Maekawa, A.,
Nakae, D.
 α -Naphthylisothiocyanate induces intrahepatic
bile duct with greater proliferation in female
rats than in males.
Journal of Toxicologic Pathology,

17
205-210
2004

Maekawa, A., Yoshida, M., Katsuda, S. and Imai K.

Toxicologic/carcinogenic effects of endocrine disrupting chemicals on the female genital organs of rodents.

③Journal of Toxicologic Pathology,

④17

⑤59-83

⑥2004

Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Shirai, T., Nakae, D., Watanabe, G., Taya, K. and Maekawa, A..

Effects of maternal exposure to nonylphenol on growth and development of the female reproductive system and uterine carcinogenesis in rats.

③Journal of Toxicologic Pathology,

④16

⑤259-266.

⑥2003

2. 学会発表

吉田 緑、渡辺 元、谷本 倫、田谷一善、前川昭彦、Bromocriptine 長期投与によるラット子宮発癌抑制作用。EDCs 学会第 8 回研究発表会要旨集 p.55,2005 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦、Indole-3-carbinol による雌ラット肝臓および子宮中の cytochrome P450 酵素の発現パターンについて。第 32 回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集。P.159、2005 年

吉田 緑。薬物代謝酵素誘導によるホルモン代謝変調がもたらす発がんへの修飾作用。シンポジウム「多臓器を病理する」。第 21 回日本毒性病理学会講演要旨集 P.40、2005 年

吉田 緑、代田眞理子、中江 大、渡邊 元、田谷一善、前川昭彦、Busulfan の胎生期単回曝露による Donryu ラット子宮癌促進作用。内分泌かく乱化学物質学会第 6 回研究発表会要旨集 p.79,2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦 Indol-3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。日本癌学会総会、2004 年

吉田 緑、中江 大、前川昭彦 吉田 緑、畑中 豊、三原卓二、前川昭彦、中江 大 ラット子宮内膜癌発生・進展過程におけるエストロゲンレセプターとその関連因子の発現変化。第 138 回日本獣医学会学術集会 講演要旨集 p.60、2004 年

Yoshida M., Nakae D, Maekawa A. Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats by increase of cytochrome P450 activities and modulation of estrogen metabolism in the liver 10th International Congress of Toxicology, Toxicology and Applied Pharmacology, p.243,197 (4), 2004

Indol-3-carbinol の cytochrome P450 酵素誘導を介したラット子宮内膜腺癌促進作用。日本トキシコロジー学術集会 p.236 2004 年

Yoshida M., Shimomoto T, Hatanak Y, Mihara T, Maekawa A, Nakae D. Expression profile of estrogen receptor-alpha-related signaling pathways in the developmental of endometrial adenocarcinomas in Donryu rats. Joint International Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology & the International Federation of Societies of Toxicologic Pathology; Co-sponsored by the International Academy of Toxicologic Pathology. Program & Abstract p.73, 2004

Yoshida M., Ando, J., Uematsu, F., Takahashi, M., Watanabe, N., Igarashi, M, Maekawa, A. and Nakae, D. Promotive effects of dietary treatment of high dose indole-3-carbinol on endometrial carcinogenesis initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in female Donryu rats. The 3rd International Conference of Food Factors, Programs & Abstracts. p.91,2003

吉田緑、渡辺元、田谷一善、前川昭彦、中江大、新生仔期 p-ter-octylphenol 大量曝露が雌ラットの下垂体に与える経時的な影響。内分泌かく乱化学物質学会第 6 回研究発表会要旨集,p.120, 2003

吉田緑、片嶋紗弓、前川昭彦、中江大、オク
チルフェノールのラット新生仔期曝露が卵巣
に与える影響。第 30 回日本トキシコロジー
学会学術年会。プログラム・要旨集
p.209,2003 年

片嶋紗弓、吉田緑、前川昭彦、鎌田壽彦、渡
辺元、田谷一善、中江大。内分泌かく乱化学
物質オクチルフェノールのラットへの新生仔
期曝露による卵巣への影響。第 19 回日本毒

性病理学会、講演要旨集、p.42,2003 年 東
京

H. 知的所有権の出願・取得状況

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

Fig. 1 遅発型影響検出の検索のための実験デザイン(ラット)

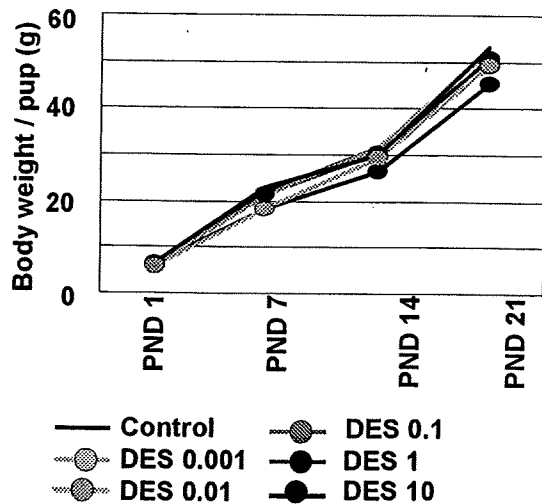
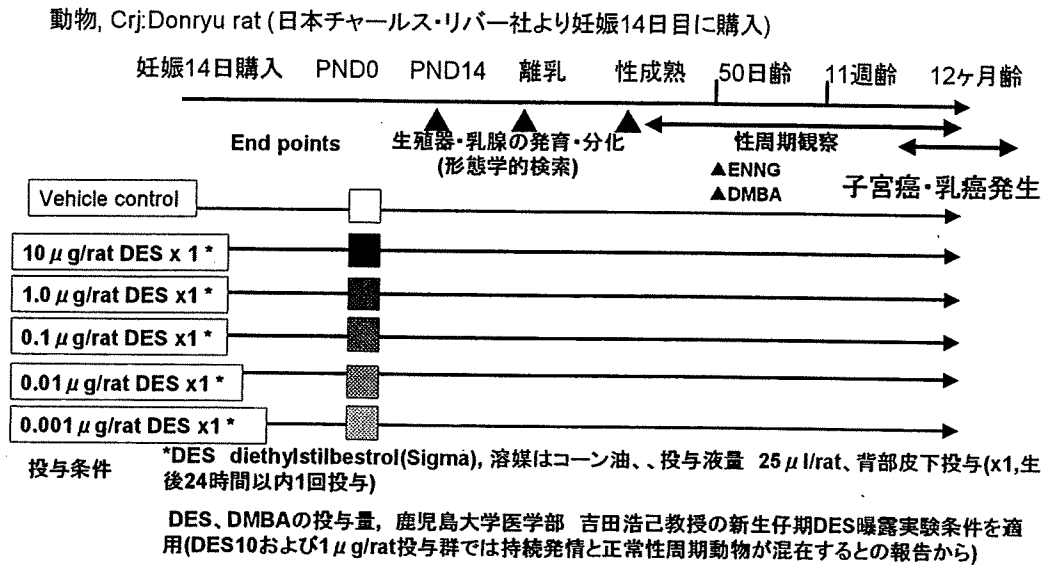


Fig.2 Growth curve up to weaning

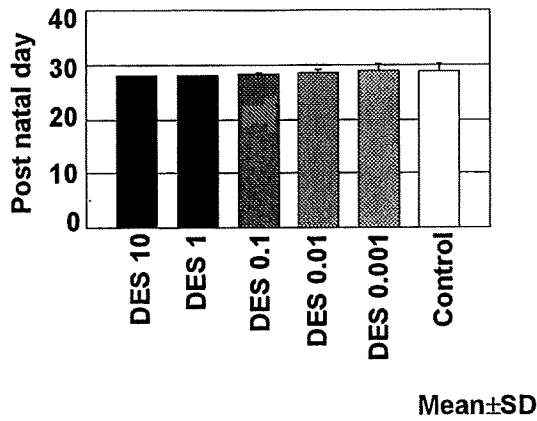


Fig. 3 The day of vaginal open

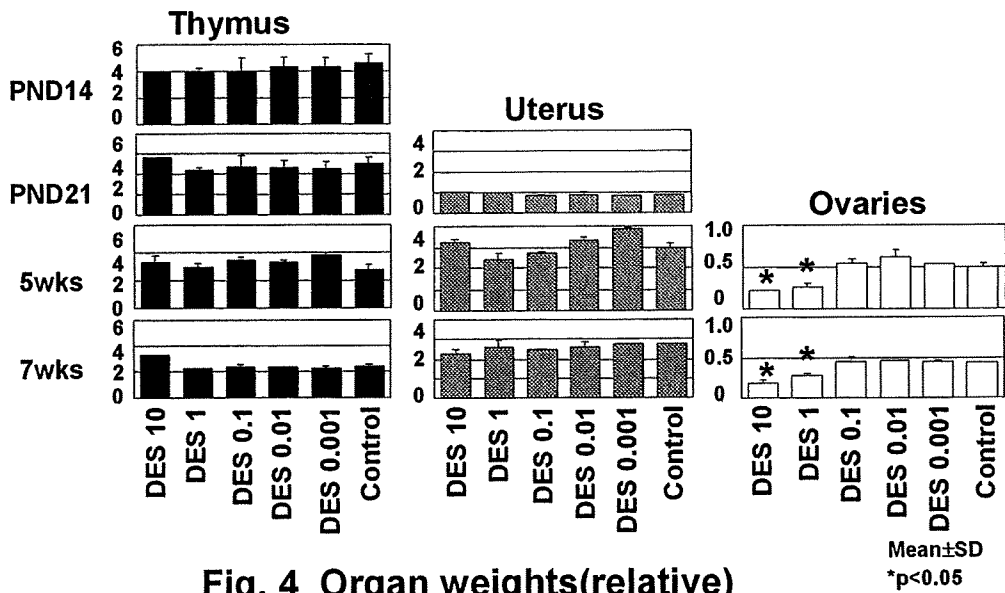


Fig. 4 Organ weights(relative)

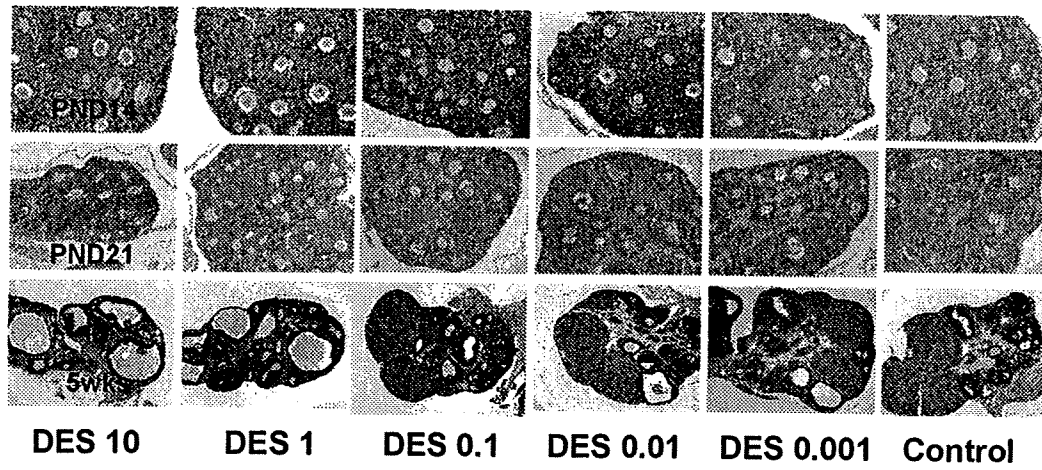
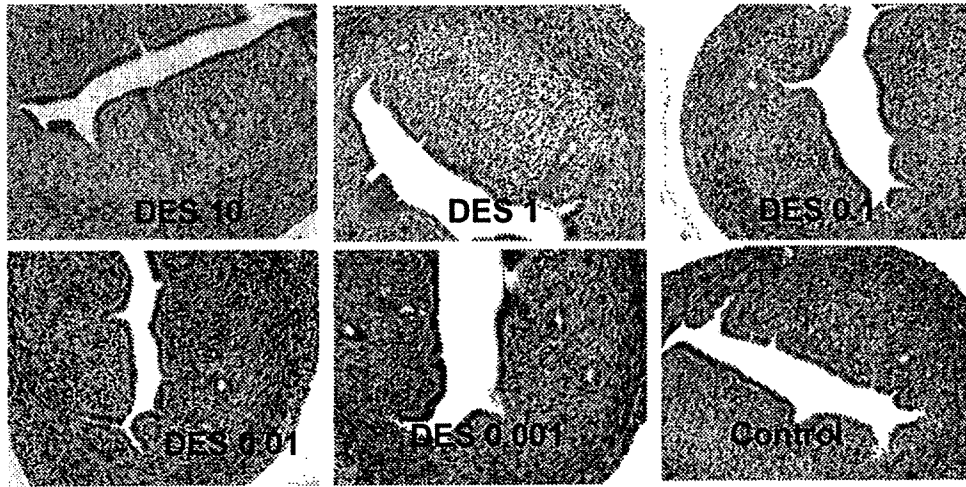
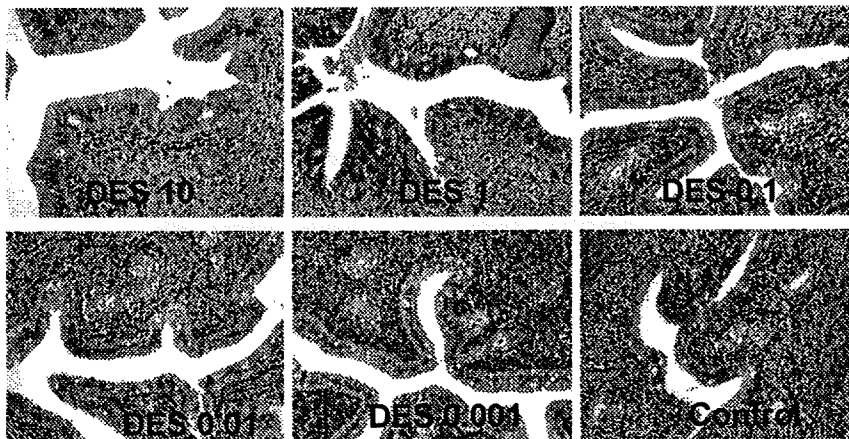


Fig. 5 Histopathology of the ovary



PND14

Fig. 6A Histopathology of the uterus



5wks

Fig. 6B Histopathology of the uterus