

- トの脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 685. (2005)
- 15) 宮川宗之、小林健一、王 瑞生、須田 恵、本間健資. 2, 2', 4, 4', 5, 5' - Hexachlorobiphenyl (PCB153) 出生前曝露がラットの学習行動に及ぼす影響 (2). 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 686. (2005)
- 16) 本間健資、須田 恵、宮川宗之、小林健一、王 瑞生. フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体ばく露 (妊娠期・授乳期) がラット脳内の神経活性アミン・アミノ酸におよぼす影響. 第78回日本産業衛生学会講演集、産業衛生学雑誌 47(Suppl) 687. (2005)
- 17) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Neurochemical Changes in the Brain of Offspring Rats following Maternal Exposure to PCB 153. Society of Toxicology (SOT), Toxicologist p.221. (2005)
- 18) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) が成長後のラットの条件付け学習に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p343. (2004)
- 19) 本間健資, 須田恵, 宮川宗之, 王瑞生, 小林健一, 関口総一郎. PCB 経母体ばく露とラット脳内神経伝達物質. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集 p356. (2004)
- 20) 王瑞生、宮川宗之、小林健一、須田恵、本間健資. フタル酸ジ 2-エチルヘキシルの経母体曝露が成熟後の雄仔ラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 日本内分泌攪乱化学物質学会 (環境ホルモン学会) 第7回研究発表会, 要旨集, p277. (2004)
- 21) 宮川宗之. 化学品の分類・表示に関する世界調和システム (GHS); 健康影響及び環境影響に基づいた化学物質及び混合物の分類基準について. 免疫毒性・アレルギー学会シンポジウム 1 (アレルギー性化学物質に抗する国際予防体系を構築する) 日本職業・環境アレルギー学会雑誌 12(1) : 31. (2004)
- 22) 小林健一, 宮川宗之, 王瑞生, 須田恵, 関口総一郎, 本間健資. フタル酸ジ 2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) がラットの発生内分泌系におよぼす影響. 日本内分泌

- 攪乱化学物質学会（環境ホルモン学会）会第7回研究発表会，要旨集 p281. (2004)
- 23) 小林健一，宮川宗之，王瑞生，須田恵，関口総一郎，本間健資. PCB153 の母ラットへの曝露が産仔の脳下垂体-甲状腺軸におよぼす影響. 日本薬学会第 124 回年会，要旨集 p191. (2004)
- 24) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of in utero exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on postnatal development and thyroid status in rat offspring. 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 465. (2004)
- 25) Rui-Sheng Wang, Muneyuki Miyagawa, Kenichi Kobayashi, Megumi Suda, Takeshi Honma. Effect of prenatal and neonatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate on the metabolism of testosterone in rat. 第 31 回日本トキシコロジー学会学術年会 J Toxicol Sci 29: 425. (2004)
- 26) 宮川宗之、小林健一、王瑞生、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) がラットのスケジュール制御オペラント行動 (SCOB) に及ぼす影響. 第 77 回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 393. (2004)
- 27) 小林健一，宮川宗之，王瑞生，須田恵，本間健資. フタル酸ジ2-エチルエチルヘキシル (DEHP) の経母体曝露 (妊娠期・授乳期) が仔ラットの発生におよぼす影響. 第77回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌46(Suppl.): 393. (2004)
- 28) 王瑞生、宮川宗之、小林健一、須田恵、本間健資. フタル酸ジ2-エチルヘキシルの経母体曝露がラットの性ホルモン代謝に及ぼす影響. 第 77 回日本産業衛生学会，産業衛生学雑誌 46(Suppl.): 394. (2004)
- 29) Takeshi Honma, Muneyuki Miyagawa, Megumi Suda, Rui-Sheng Wang, Kenichi Kobayashi and Soichiro Sekiguchi. Effects of Perinatal Exposure to PCB 153 on the Brain Neurotransmitters of Offspring Rats. 43rd Annual Meeting & Toxexpo™, Society of Toxicology (SOT), Baltimore, Program p175. (2004)
- 30) Kenichi Kobayashi, Muneyuki Miyagawa, Rui-Sheng Wang, Megumi Suda, Soichiro Sekiguchi, Takeshi Honma. Effects of prenatal exposure to 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB153) on somatic growth and thyroid status in male rat

offspring. International
Congress of Toxicology (ICT 10),
Toxicol Appl Pharmacol 197: 230.
(2004)

H. 知的財産所有権の出願・登録状況
なし

図表

(マウスのオペラント条件づけを用いた内分泌かく乱化学物質の
神経系高次機能影響の評価)

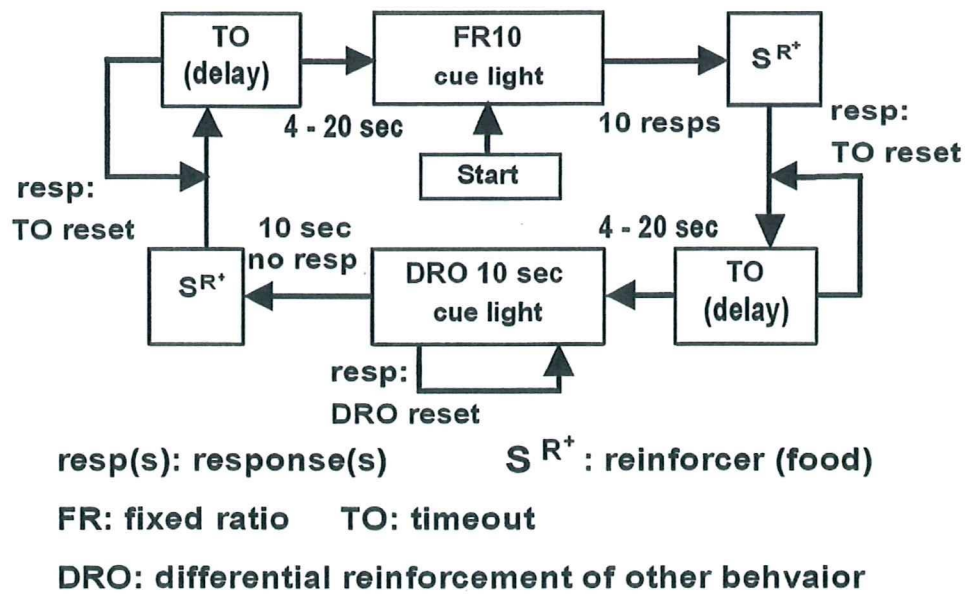


Fig. 1 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 説明図.

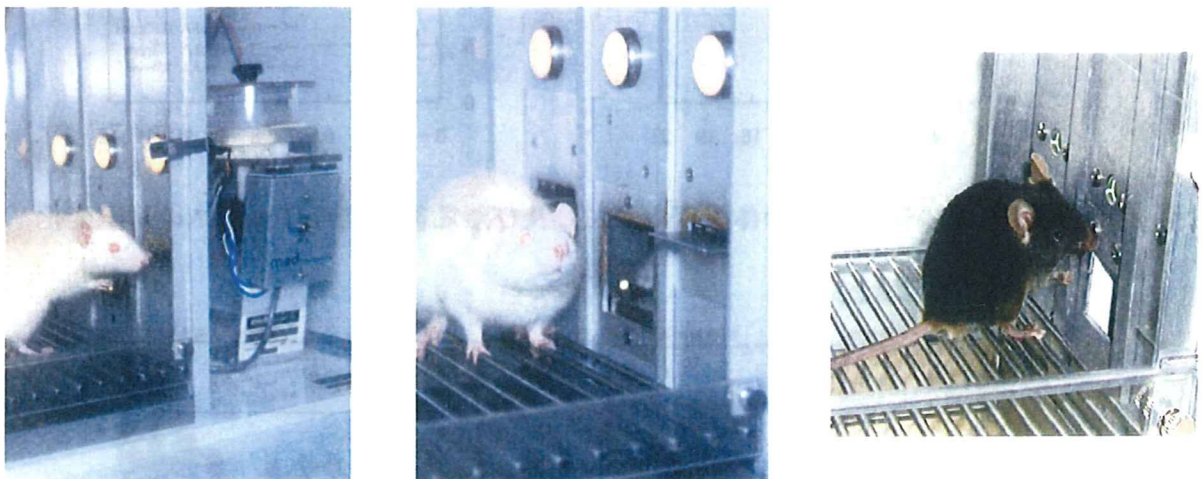


Fig. 2 タイムアウト付交替型混合スケジュール (Alternating Mix FR 10 DRO 10 s with TO Schedule) 下でのSCOB (通常は閉じておく防音箱の扉を開きストロボを使用して撮影).

左: 反応中のラット 中央: 待機中のラット 右: 待機中のマウス

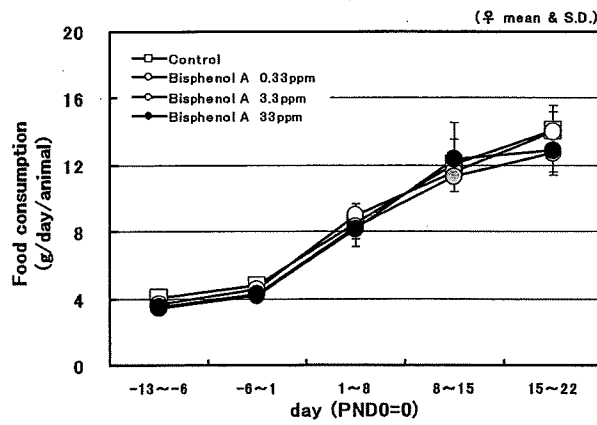


Fig. 3 妊娠期及び授乳期における母マウス1匹あたりの摂餌量

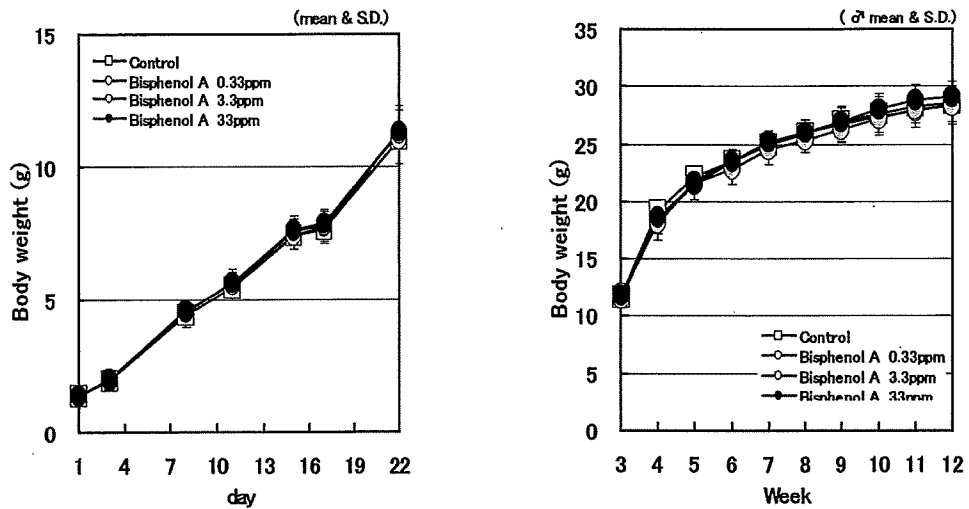


Fig. 4 授乳期の仔マウスの体重変化 (左) 及び離乳後の雄性仔マウスの体重変化 (右)

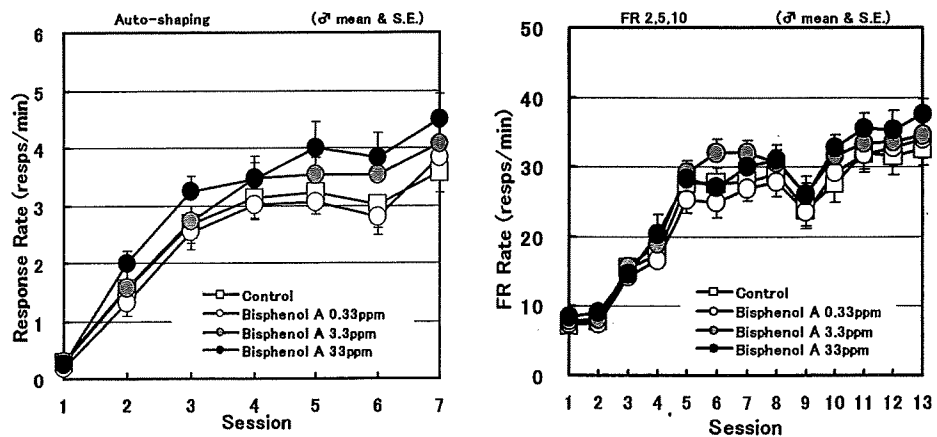


Fig. 5 自動反応形成スケジュール訓練時 (左) 及び定率強化スケジュール訓練時 (右) の反応率の変化

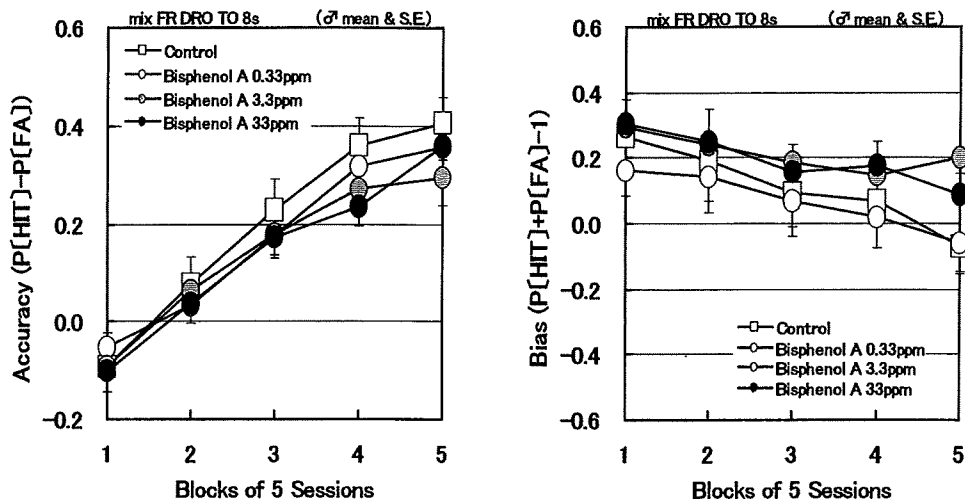


Fig. 6 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with T0 スケジュール訓練第1段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

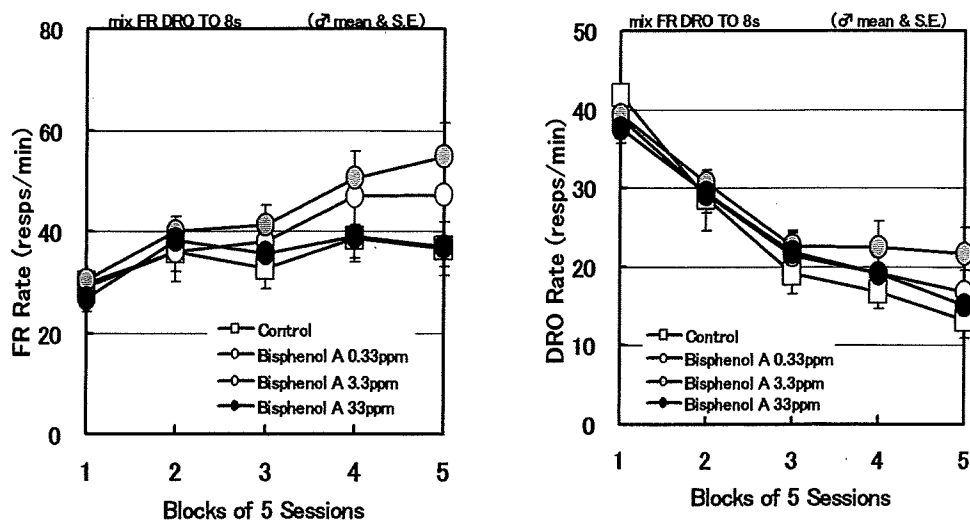


Fig. 7 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with T0 スケジュール訓練第1段階 (固定長タイムアウト 8 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

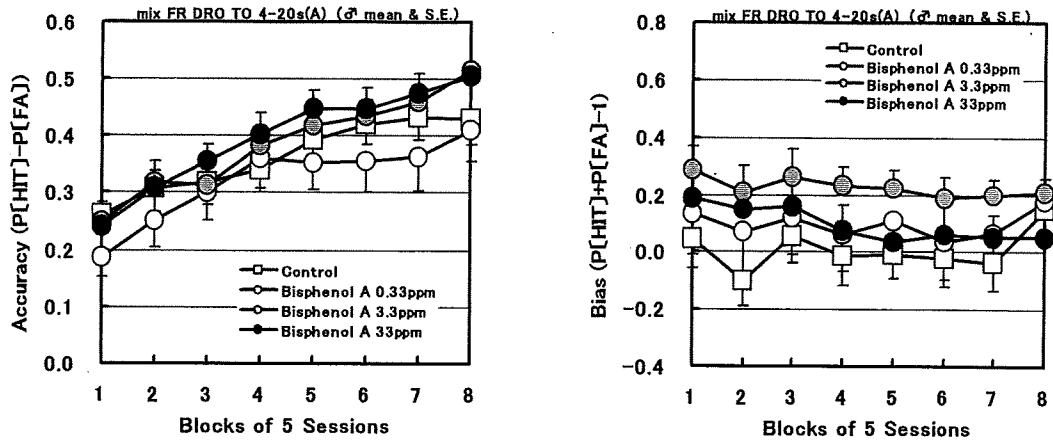


Fig. 8 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

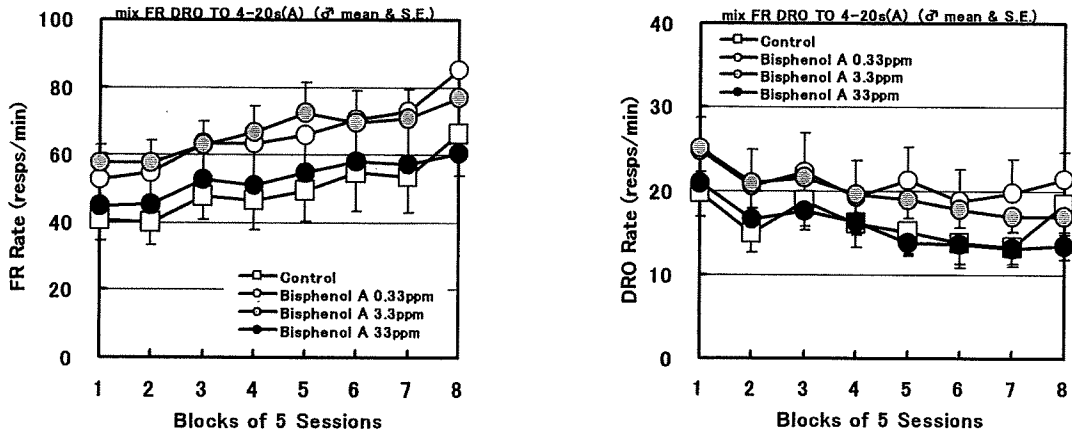


Fig. 9 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第 2 段階 (変動タイムアウト上昇系列 4 - 20 秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

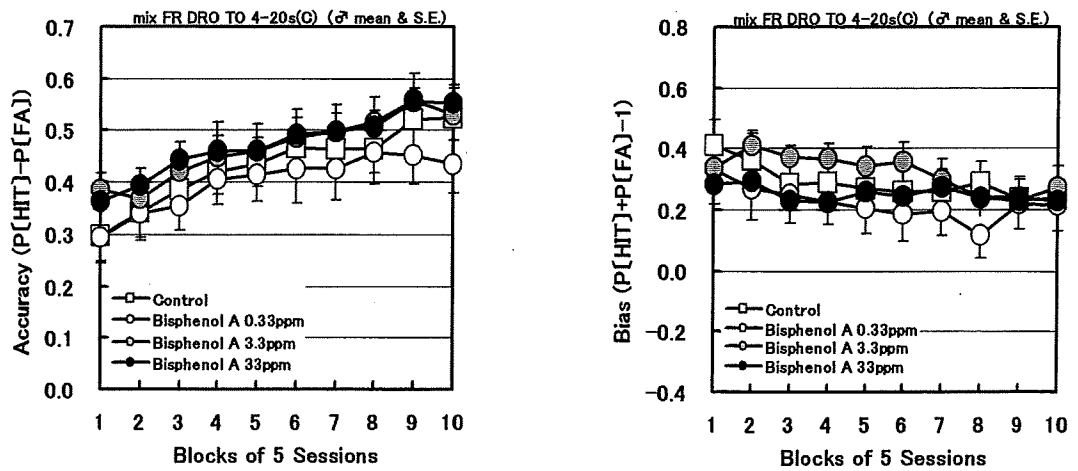


Fig. 10 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒) における Accuracy (左) 及び Bias (右) の変化と BPA の影響

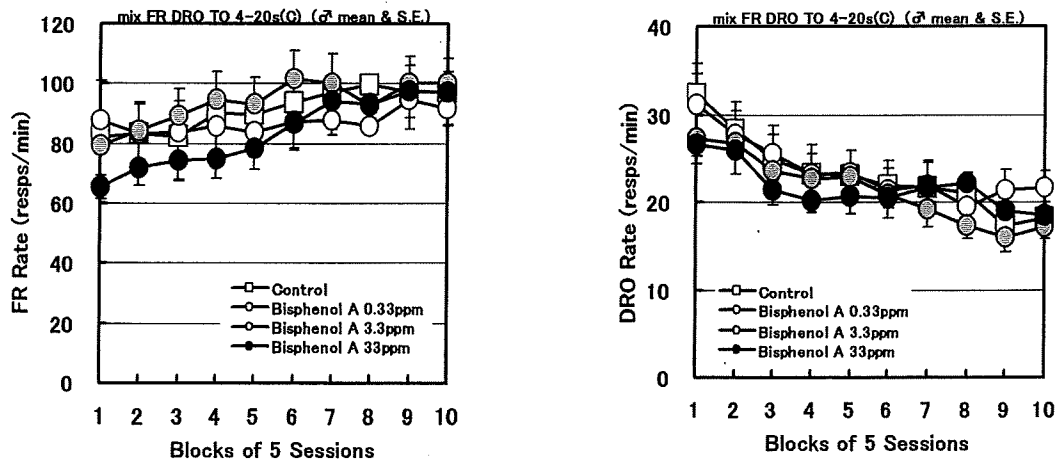


Fig. 11 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (変動タイムアウト上下系列4-20秒) における FR 反応率 (左) 及び DRO 反応率 (右) の変化と BPA の影響

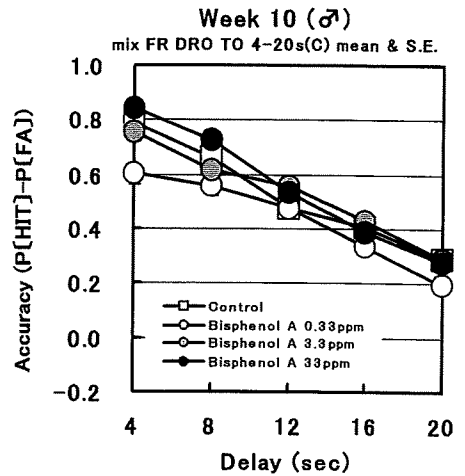
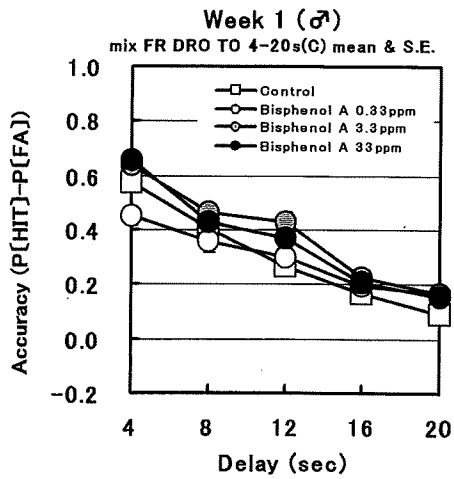


Fig. 12 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (タイムアウト長上下変動条件) 訓練1週目 (左) 及び 10週目 (右) における Delay-Accuracy 曲線と BPA の影響

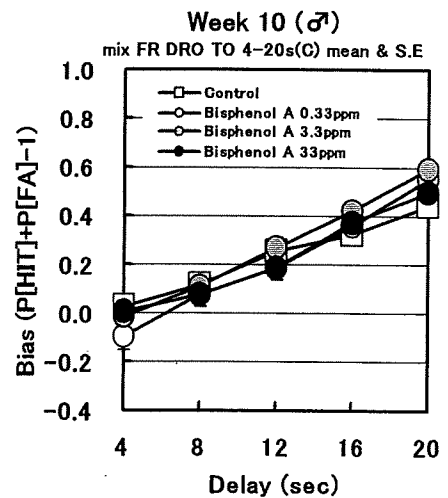
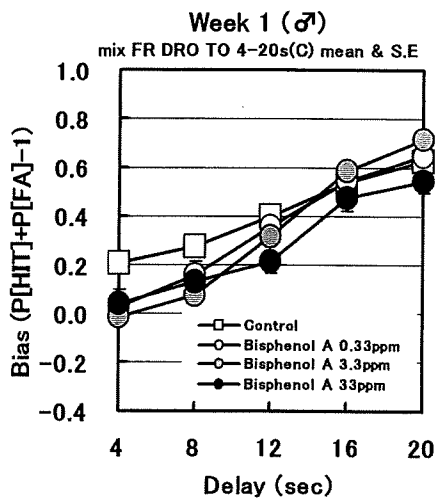


Fig. 13 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO スケジュール訓練第3段階 (タイムアウト長上下変動条件) 訓練1週目 (左) 及び 10週目 (右) における Delay-Bias 曲線と BPA の影響

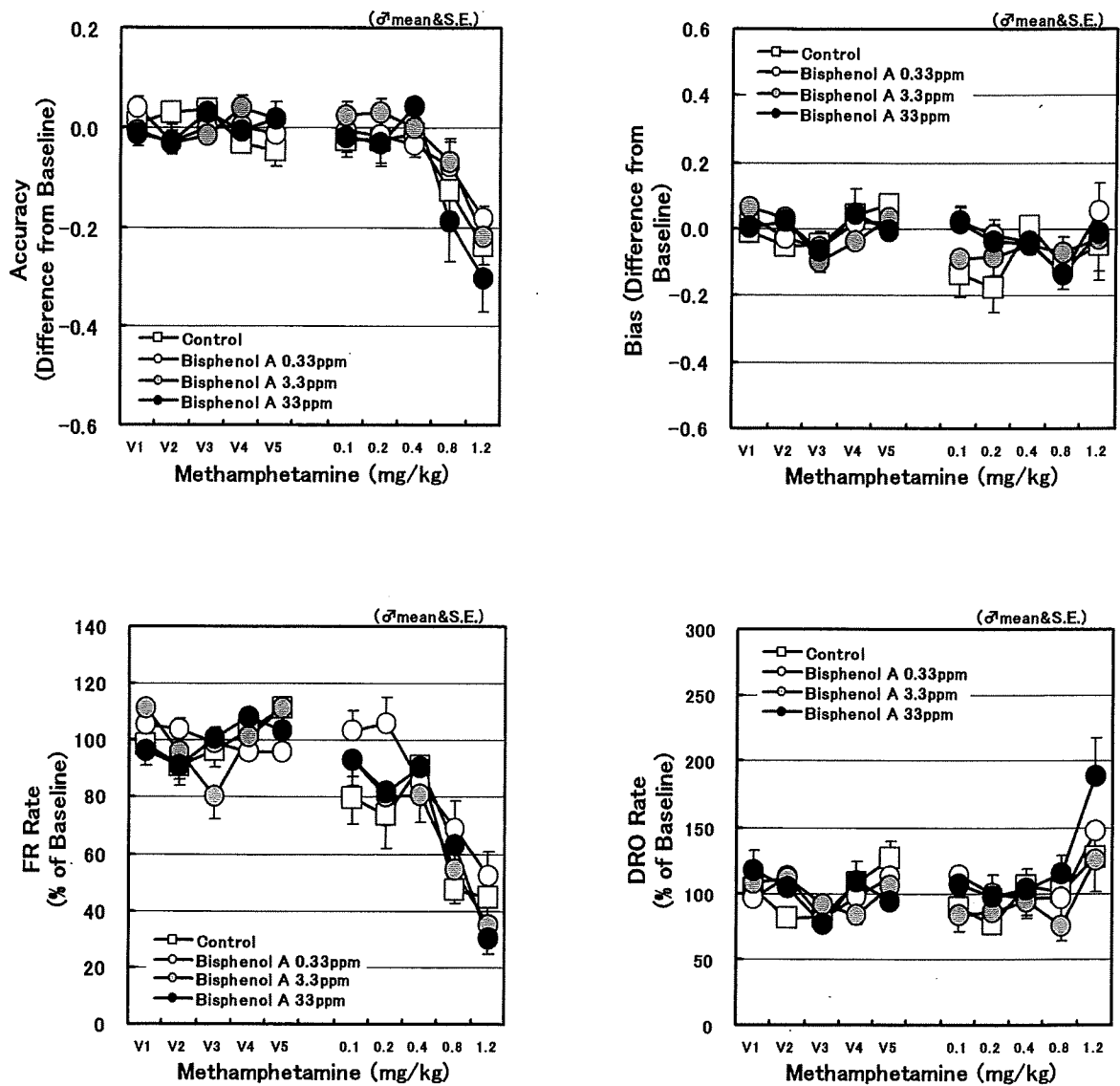


Fig. 14 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with TO 4-20s (C) スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (1) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした methamphetamine の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

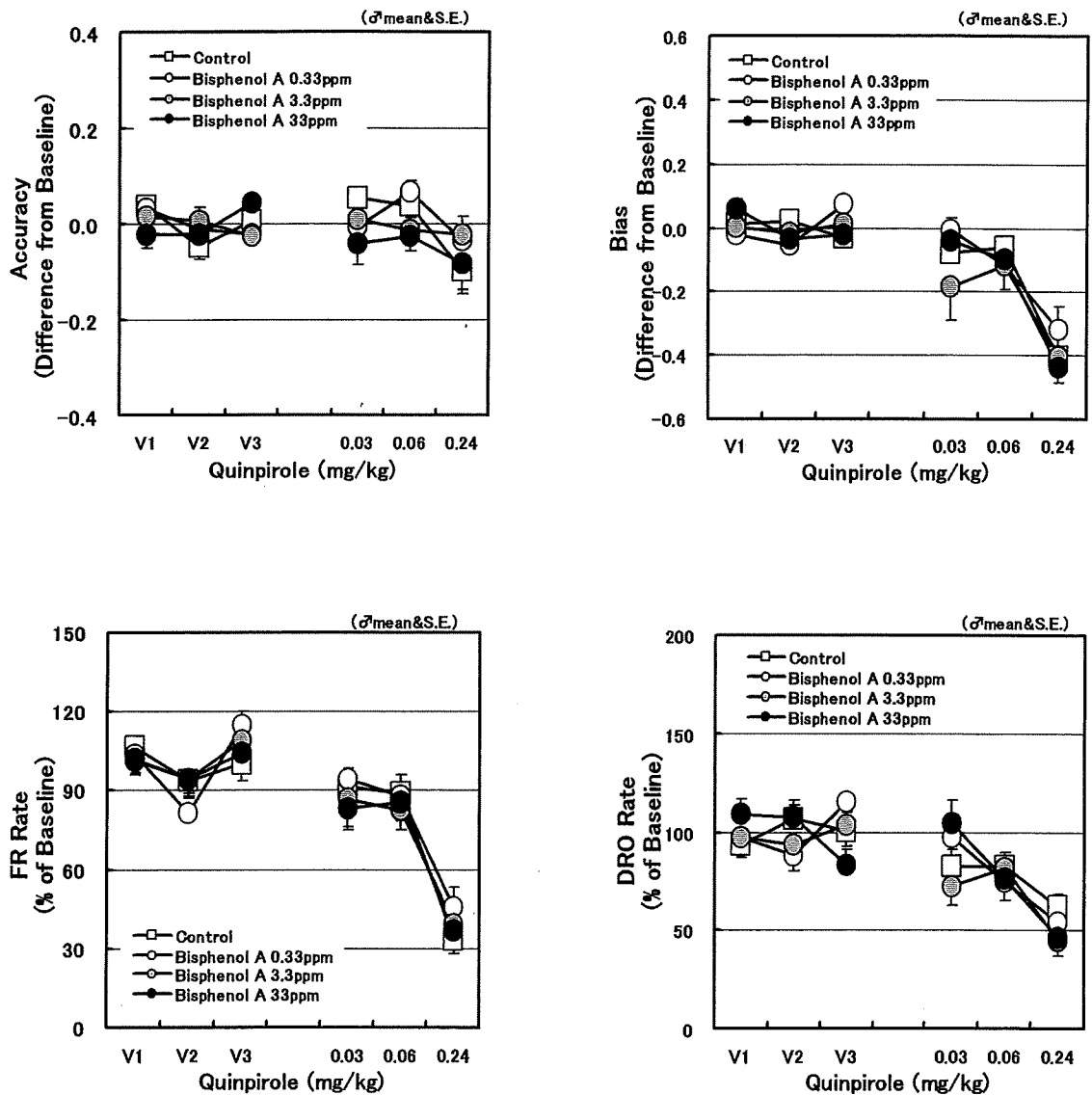


Fig. 15 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with T0 スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (2) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした quinpirole の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

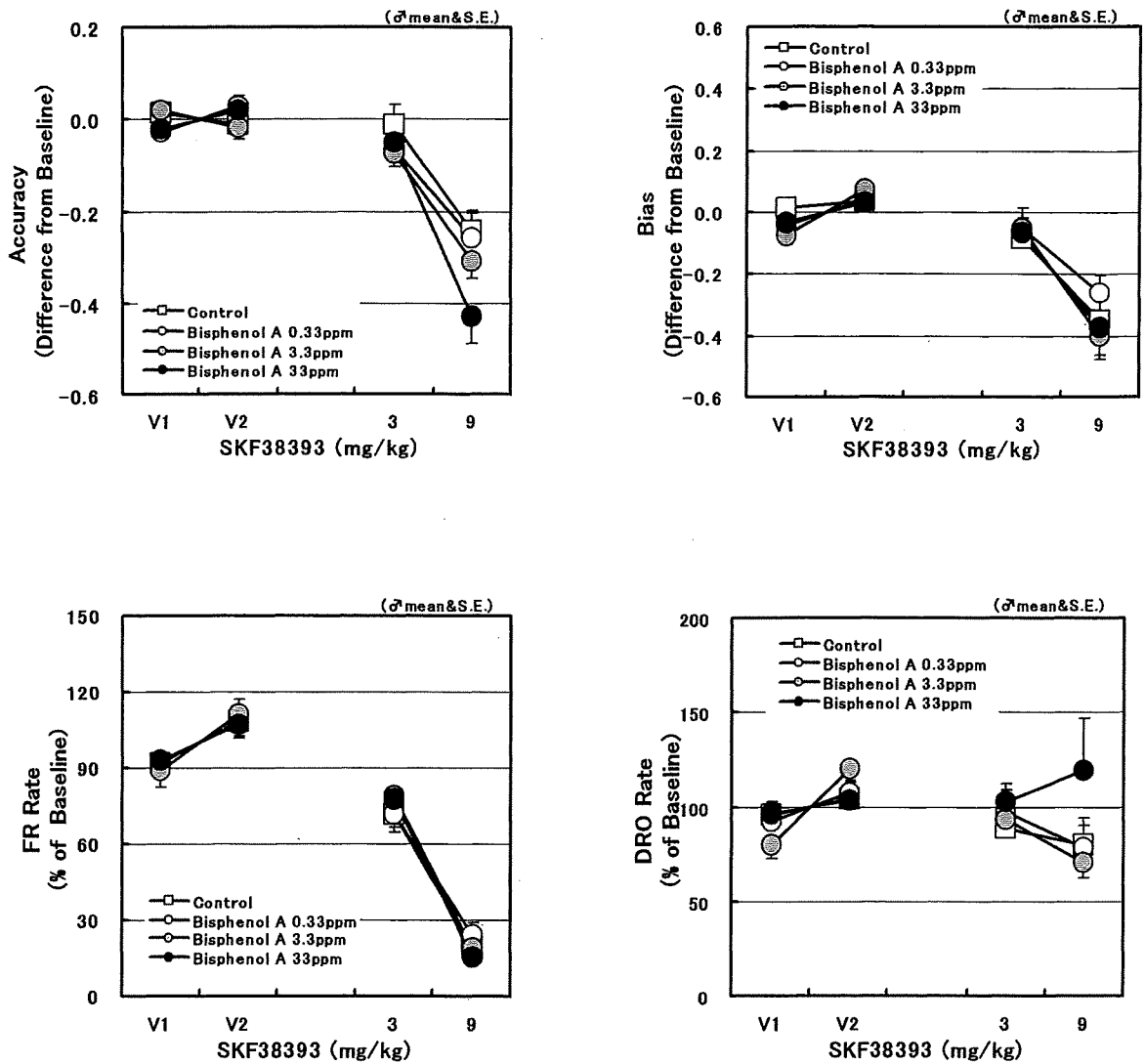


Fig. 16 マウスの Alternating Mix FR 10 DRO 10s with T0 スケジュール (タイムアウト長上下変動条件) 下での行動をベースとした薬理的負荷試験結果 (3) ; Accuracy (左上)、Bias (右上)、FR 反応率 (左下)、DRO 反応率 (右下) を指標とした SKF38393 の量-影響曲線と BPA の影響 (Accuracy と Bias では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値からの差を示し、FR 反応率と DRO 反応率では被験体毎に求めた生理食塩水投与時の平均値を 100 とした % 値を示した。)

4. 内分泌かく乱化学物質の脳の性分化への影響に関する研究

分担研究者 今井 清

(財)食品農医薬品安全性評価センター 技術総括部長

研究要旨

Sprague - Dawley 系 (CrjCD:SD) ラット雌雄新生児に生後直後から 0.1 あるいは 1 μ g/kg の Diethylstilbesterol (DES), 50 あるいは 500 mg/kg の *p*-tert-Octylphenol (OP) を 1 日 1 回 5 日間連続皮下投与して視床下部前腹側室周囲核におけるエストロゲン受容体 α (ER α) を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果, 前腹側室周囲核における ER α 陽性は, DES 投与群および OP 50 mg/kg 投与群では特に雌において離乳期まで持続して細胞密度が高くなる傾向が認められたが, OP 500 mg/kg 投与群の雌では ER α 陽性細胞は逆に減少した. これとともに, OP 500 mg/kg 投与群の 1 例, DES 1 μ g/kg 投与群 3 例中 3 例, 0.1 μ g/kg 投与群 3 例中 1 例に性周期の延長が認められ, OP 投与群では発情期の持続, DES 投与群では発情休止期の持続が特徴的であった. なお, OP 500 mg/kg 投与群では生後 6 日 (最終投与翌日) および生後 7 日に計 4 匹が, 雌では生後 6 日から生後 18 日にかけて計 6 匹が死亡した.

A. 研究目的

成熟したラットのみならず多くの哺乳動物の視床下部には, 雌に比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核(性的二型核: SDN-POA)と, 雌の方が大きな容積を持つ神経核(前腹側室周囲核: AVPVN-SDA)が存在することが明らかにされており, 雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は, これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている. 一方, 周産期にアンドロゲンあるいはエストロゲンに暴露された雌では SDN-POA の容積が増大し, 周産期に去勢あるいはエストロゲン投与された SDN-POA の容積が減少するが, 雌ラットでは胎生期あるいは新生児期のある一定時期(臨界期)に生理的な範囲を

超えた大量のエストロゲン様物質に暴露されると androgenization が起き, 正常な性成熟を迎えるにもかかわらず, 早期に生殖機能の障害が現れること(遅発効果: delayed effect)が知られている. しかしながら, 周産期に急速に発達分化する視床下部における, ホルモン受容体との関連を含め神経線維網の発達・過程に関しては不明の点も多い.

我々は, 昨年度までに, 1) ドーパミン作動性神経の指標であるチロシンヒドロキシラーゼおよび ER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果, チロシンヒドロキシラーゼ陽性細胞の数は視床下部性的二型核において雌雄差はなく, ER α 陽性細胞はむしろ雌に多数観

察されたこと、2) 新生児期における性機能に關与する神経発達の経過を明らかにする目的で、ER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、性的二型核の大部分を占める内側視索前核特に内側視索前核前部から視床下部前腹側室周囲核にかけてER α 陽性細胞が数多く存在し、雄より雌においてより多くの陽性細胞が観察され、雄では生後5日齢でER α 陽性細胞の数は最多になり、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したが、雌では少なくとも生後10日目までは陽性細胞の減少は認められないこと、3) 生後1日から5日間Ethinyl Estradiol (EE)を1日1回連続皮下投与した結果、雌雄ともに0.5 μ g/kg以上の投与量で内側視索前核のER α 陽性細胞数が増加したが、増加の程度は雌においてより著明である事を明らかにした。

そこで今年度は、エストロゲン活性を有する他の化学物質を新生児期のラットに投与し、視床下部におけるER α 陽性細胞数に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

Sprague - Dawley 系の妊娠ラット (CrjCD:SD) 15 匹を購入し、自然分娩させて得られた新生児を、Table 1 に示すように雌雄それぞれ6群に分け、雌雄ともに第1群は溶媒対照群として10%のDimethyl Sulfoxide (DMSO) を含むコーン油を、第2群及び第3群には、上記溶媒に溶解したDESを0.1あるいは1 μ g/kgの割合で、第4群および第5群には同溶媒に溶解したOPを50あるいは500mg/kgの割合で生後1日(分娩終了を確認した

日を生後0日とした)から5日間1日1回皮下投与した。その後投与を中止して生後6日目(投与終了翌日)、10日目(投与終了5日後)、21日目(投与終了16日後)に各群から原則として雌雄各4匹を選出し、体重を測定した後、動物をエーテル麻酔下で安楽死させ剖検し、脳を10%フォルマリンで固定し連続切片を作成し、ER α 染色を施して、前腹側室周囲核におけるER α 陽性細胞の密度を観察した。さらに、各群から雌の新生児3匹(ただしOP 500 mg/kg 群では死亡例が認められたため1匹のみ)を選出して、離乳後も継続して飼育し膣開口を指標として性成熟までの日数を確認し、生後7週齢から性成熟後膣垢を採集して性周期の観察を行った。なお、参考として雌雄各3匹について同様の観察を行う無処置対照群を設定した(第6群)。

C. 研究結果

OP 500 mg/kg 投与群では生後6日(最終投与翌日)および生後7日に計4匹が、雌では生後6日から生後18日にかけて計6匹が死亡した。さらに同群雌雄およびDES 1 μ g/kg 投与群の雄で生後6日齢に体重の増加抑制があり、特にOP 500 mg/kg 投与群の雌ではこの傾向が生後21歳まで認められた(Table 2)。なお、生存例では一般状態の異常は観察されなかった。

各群ともに、離乳以降の体重増加、膣開口完了日数に明確な差は認められなかったが(Table 3)、性周期の観察が可能であったOP 500 mg/kg 投与群の1例、DES 1 μ g/kg 投与群3例中3例、0.1 μ g/kg

投与群 3 例中 1 例に性周期の延長が認められ、OP 投与群では発情期の持続、DES 投与群では発情休止期の持続が特徴的であった (Table 4)。

前腹側室周囲核における ER α 陽性は、DES 投与群および OP 50 mg/kg 投与群では特に雌において離乳期まで持続して細胞密度が高くなる傾向が認められたが、OP 500 mg/kg 投与群の雌では ER α 陽性細胞は逆に減少した。

D. 考察

成熟したラットのみならず多くの哺乳動物の視床下部には、雌に比較して雄の方が大きな容積をもつ神経核 (性的二型核 : SDN-POA) と、雌の方が大きな容積を持つ神経核 (前腹側室周囲核 : AVPVN-SDA) が存在することが明らかにされており、雌雄の生殖機能あるいは性行動の差は、これら神経核の雌雄差に依存していると考えられている。さらに本研究において、雌雄ともに、雌の方が大きな容積を有すると考えられている視床下部前腹側室周囲核において多数の ER α 陽性細胞が観察され、雄では生後 5 日齢でその数は最も多く、それ以降日齢が進むにつれて、急速に減少したのに対し、雌では少なくとも生後 10 日目までは陽性細胞の減少は認められないことが明らかにされた。このことから、視床下部前腹側室周囲核において雄より雌の容積が大きくなる要因の一つとして、雌ではこの部において ER α 陽性細胞が消失せずに長期間保持されていることに起因している可能性が示唆されている。一方、出生直後の新生児に大量の EE を 5 日間連続投与すると、雌雄

とも前腹側室周囲核に ER α 陽性細胞の著しい増加が認められているが、今回の実験においてもエストロゲン活性を有することが明らかにされている OP、DES を出生直後の新生児に大量投与すると雌雄ともに前腹側室周囲核の ER α 陽性細胞数が持続的に増加し、これとともに、性成熟後に性周期の異常が生じることが明らかにされた。山崎らは EE を、吉田らは OP を胎児期あるいは新生時期に大量投与すると、正常な性成熟が見られるが、その後性周期の異常が対照群に比較すると早期に発現する事を明らかにしている。今回の実験から、新生児期に投与投与した化学物質によって惹起される性成熟以降の出現する性周期の異常は、エストロゲン活性を有する化学物質に共通して見られる遅発性の現象で、その発現と視床下部前腹側室周囲核の ER α 陽性細胞の数的な動態との関連が強く示唆されるが、OP 500mg/kg の雌で認められた ER α 陽性細胞の減少も含め、現時点ではこれらの変化の毒性学的あるいは内分泌生理学的意義は明らかにすることは出来なかった。

E. 結論

Sprague - Dawley 系 (CrjCD:SD) ラット雌雄新生児に生後直後から 0.1 あるいは 1 μ g/kg の DES あるいは 50 あるいは 500 mg/kg の OP を 1 日 1 回 5 日間連続皮下投与した。視床下部前腹側室周囲核における ER α を免疫組織化学的に染色して経時的に観察した結果、前腹側室周囲核における ER α 陽性は、DES 投与群および OP 50 mg/kg 投与群では特に雌において離乳期まで持続して細胞密度が高く

なる傾向が認められたが、OP 500 mg/kg 投与群の雌ではER α 陽性細胞は逆に減少した。これと共に、OP 500 mg/kg 投与群の1例、DES 1 μ g/kg 投与群3例中3例、0.1 μ g/kg 投与群3例中1例に性周期の延長が認められ、OP 投与群では発情期の持続、DES 投与群では発情休止期の持続が特徴的であった。なお、OP 500 mg/kg 投与群では生後6日（最終投与翌日）および生後7日に計4匹が、雌では生後6日から生後18日にかけて計6匹が死亡した。今回の実験から、新生児期に皮下投与した化学物質によって惹起される性成熟以降の出現する性周期の異常は、エストロゲン活性を有する化学物質に共通して見られる現象で、その発現と視床下部前腹側室周囲核のER α 陽性細胞の数的な動態との関連が強く示唆された。

F. 健康危惧情報

特になし

G. 研究発表

1) 論文発表

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

Toxicologic/Carcinogenic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on the Female Genital Organs of Rodents" J. Toxicol. Pathol. 17, 69-84, 2004

2) 学会発表

大平東子, 今井 清ほか, 第22回日本毒性病理学会, (2006), 鹿児島

H. 知的財産賞有権の出願・登録状況（予定も含む）

なし

Table 1

試験群	化合物	用量 (単位)	動物数						育成
			剖検日			動物数			
			生後6日	生後10日	生後21日	生後6日	生後10日	生後21日	
1	Corn oil contained 10 vol% DMSO	0	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雌3	
2	DES	0.1 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雌3	
3		1 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雌3	
4	OP	50 ($\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雌3	
5		500 ($\text{mg}/\text{kg}/\text{day}$)	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雄4 雌4	雌1	
6	Non-treated	—	雄3 雌3	雄3 雌3	雄3 雌3	雄3 雌3	雄3 雌3	雌3	

Table 2 Body weight change of newborn rat during lactation period

		Vehicle control (DMSO)			Diethylstilbesterol/ 0.1 kg/day			p-tert-octylphenol 50 mg/kg/day			500 mg/kg/day		
		Mean±	S.D. (N)	Mean±	S.D. (N)	Mean±	S.D. (N)	Mean±	S.D. (N)	Mean±	S.D. (N)	Mean±	S.D. (N)
Male	Day 6	14.13±	2.05 (4)	13.92±	0.80 (4)	12.53±	1.13 (4)	14.73±	1.97 (4)	10.53	(2)		
	Day 10	21.85±	0.97 (4)	22.17±	2.88 (4)	25.19±	2.04 (4)	23.41±	0.29 (4)	20.77±	1.83 (3)		
	Day 21	55.50±	16.89(4)	61.39±	4.65 (4)	58.63±	4.68 (4)	57.40±	4.22 (4)	58.98±	8.19 (4)		
Female	Day 6	13.26±	2.11 (4)	12.91±	2.52 (4)	13.62±	2.32 (4)	13.09±	0.50 (4)	9.59±	1.88 (3)		
	Day 10	22.62±	1.58 (4)	21.26±	1.73 (4)	21.78±	1.13 (4)	22.36±	1.47 (4)	19.19±	3.85 (3)		
	Day 21	57.87±	4.02 (4)	56.06±	8.36 (4)	55.89±	3.52 (4)	57.28±	3.58 (4)	51.18	(2)		

Table 3-1 Body weight of female animals after wearning

Unit : g

Non-treated											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	Days	35	42	49	56	63	70	77	84	
1	107.4(31)	-	128.0	159.4	179.2	195.3	211.9	226.1	235.2	239.5	
2	136.2(34)	-	142.3	183.9	202.6	230.7	254.6	258.6	283.5	292.6	
3	158.6(37)	-	143.3	185.0	217.3	243.3	263.9	277.8	286.6	309.7	
Mean	134.1	-	137.9	176.1	199.7	223.1	243.5	254.2	268.4	280.6	
S.D.	25.7	-	8.6	14.5	19.2	24.9	27.7	26.1	28.8	36.6	

Vehicle control											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	Days	35	42	49	56	63	70	77	84	
2013	162.8(38)	5.77	143.8	179.5	195.8	213.3	226.3	243.3	256.3	268.2	
2014	120.5(33)	5.50	135.8	170.8	192.4	220.4	237.4	253.9	269.8	276.1	
2015	152.8(38)	5.79	131.8	170.4	190.3	213.9	218.5	237.2	243.7	253.5	
Mean	145.4	5.69	137.1	173.6	192.8	215.9	227.4	244.8	256.6	265.9	
S.D.	22.1	0.16	6.1	5.1	2.8	3.9	9.5	8.5	13.1	11.5	

Diethylstilbesterol 0.4g/kg/day											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	Days	35	42	49	56	63	70	77	84	
2113	127.8(32)	6.24	148.2	185.3	192.1	202.1	218.4	233.9	245.9	257.3	
2114	148.1(35)	5.89	148.1	185.6	203.6	228.3	248.8	253.6	270.1	280.4	
2115	119.4(34)	5.86	126.2	168.4	190.9	206.6	227.1	235.2	252.1	261.2	
Mean	131.8	6.00	140.8	179.8	195.5	212.3	231.4	240.9	256.0	266.3	
S.D.	14.8	0.21	12.7	9.8	7.0	14.0	15.7	11.0	12.6	12.4	

Diethylstilbesterol 1.6g/kg/day											
Animal ID-No.	Vaginal Opening (day)	Days	35	42	49	56	63	70	77	84	
2213	177.1(39)	6.78	149.0	198.2	227.9	255.1	279.3	291.3	310.2	323.9	
2214	118.8(32)	6.02	141.2	187.8	220.1	247.9	272.2	283.6	296.4	300.6	
2215	172.5(38)	6.18	149.4	200.5	226.2	258.6	288.4	290.1	297.5	323.9	
Mean	156.1	6.33	146.5	195.5	224.7	253.9	280.0	288.3	301.4	316.1	
S.D.	32.4	0.40	4.6	6.8	4.1	5.5	8.1	4.1	7.7	13.5	

Values in parentheses represent the observed day of vaginal opening