

## B. 研究方法

### B-1. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) の新生児期曝露による遅発性影響の検索

妊娠 14 日齢の Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア, 東京) 70 匹を 6 群に分け, 出産後 24 時間以内の新生児に sesami oil に溶解した 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE, Sigma Aldrich, USA, CAS No. 57-63-6) 0 (コントロール), 0.02, 0.2, 2, 20, 200  $\mu$ g/kg を 1 回皮下投与した。生後 3 日目に雌児動物を優先的に 1 腹当たり最高 8 匹となるようにリッター・サイズを調整した。生後 21 日で離乳させ, 雌児動物について離乳~5 週齢まで膣開口の観察, 7 週齢より隔週で週 5 日膣スミアを採取し, 各群 24 匹について 10 か月齢まで性周期の観察を行った。4~5 日で発情が回帰する場合を正常性周期, それ以外を異常性周期と分類した。

子宮発がんを誘発するため, 生後 9 週に *N*-ethyl-*N'*-nitroso-*N*-nitrosoguanidine ENNG (Nacalai Tesque, 京都) 20mg/kg を全匹子宮内投与した。ENNG による子宮内投与では子宮以外の臓器の発がん性を増加させず, また性周期など内分泌系へも影響を与えないことが確認されている (J Reprod Dev., 707-714, 2005)。実験期間中は定期的に体重を測定し, 臨床症状の観察を行った。

生後 14, 21 日, 34 日および 10 週に各群 5 匹の動物を途中解剖した。10 週では膣スミア検査により生後 68 日以降に発情期を迎えた日に解剖を行った。各群 4 匹については断頭採血後, 性ホルモン測定のため血清を凍結保存した。脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肝臓, 副腎, 乳腺, 卵巣, 子宮, 膣を摘出し, 34 日および 10 週では脳, 卵巣, 子宮重量を測定した。脳から視床下部のみを切り出し, 液体窒素で急速凍結した。また, 右卵巣, 右子宮角も凍結し, -80 $^{\circ}$ C で保存した。各群 1 匹についてはエーテル麻酔下で径心臓的にヘパリン加生理食塩水を灌流後, 4%パラホルムアルデヒド (PFA) を灌流した。摘出した脳を 4%PFA で, 4 $^{\circ}$ C, 一晚固定し, 30%スクロース PBS に置換後,

OTC コンパウンド (サクラファインテック, 東京) で包埋した。

最終解剖においても, 性周期を回帰している動物については 10 か月齢以降に発情期を迎えた日に解剖を行った。各群 22 匹については断頭採血後, 性ホルモン測定のため血清を凍結保存した。脳, 下垂体, 甲状腺, 胸腺, 肝臓, 副腎, 乳腺, 卵巣, 子宮, 膣を摘出し, 卵巣, 子宮重量を測定した。各群 8 匹は視床下部および右卵巣を凍結保存した。また, 各群 2 匹は途中解剖と同様に脳の灌流固定を行なった。

脳および凍結保存組織を除き, 摘出した臓器は 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定した。定法に従ってパラフィン包埋切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し鏡検した。子宮発達の程度を比較するため, 生後 14, 21 および 34 日において切片上の子宮腺の数を計測した。子宮内膜全周が確認できるほぼ円形の子宮横断面において, 内膜面より離れて存在している子宮腺を数え, 観察した横断面数で除して, 各個体における子宮 1 断面当たりの子宮腺の数を算出した。

視床下部・下垂体・性腺軸の制御に関与すると考えられる遺伝子について, 10 週齢の視床下部における mRNA 発現を検討した。凍結組織より Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) により抽出した total RNA 2 $\mu$ g を用いて, High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応を行い, ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914\_ml, KISS1 receptor (Kiss1r): Rn00576940\_ml, gonadotropin-releasing hormone 1 (GnRH1): Rn00562754\_ml, estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372\_ml, estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610\_ml, cytochrome P450,

family 19, subfamily a (Aromatase): Rn00567222\_ml. ハウスキーピング遺伝子である hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (HPRT) については別の実験で用いたものを (Toxicol Appl Pharmacol., 127-136, 2005) 使用した。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、各遺伝子と HPRT との相対値を求めた。

### B-2. EE の体内濃度分析

(財) 日本食品分析センター (大阪) に分析を依頼し、雄性新生児ラットを用いて EE 200 µg/kg 1 回皮下投与後 1, 2, 4, 24 時間における体内濃度を測定した (LC-MS/MS 法, 検出限界: 0.002 ppm)。

### B-3. 子宮肥大試験

遅発性影響の検索に用いた EE 各用量の *in vivo* エストロゲン活性を確認するため、新生児期曝露実験で使用した母動物を用いて子宮肥大試験を行った。離乳 1 か月後、膣スメアを観察して性周期が正常に回帰している動物に卵巣摘出術を施した。14 日後、性周期が回帰していないことを確認し、43 匹を試験に供した。動物を 6 群に分け、sesami oil に溶解した EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 µg/kg を 1 回皮下投与し、約 24 時間後にエーテル麻酔下で放血致死させた。子宮は膣とともに摘出し、脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight), 次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度、重量を測定した (blotted weight)。

*in vivo* エストロゲン活性をさらに明確にするため、未成熟雌ラットを用いた子宮肥大試験を実施した。21 日齢の雌性 Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア) 60 匹を 6 群に分け、EE 0, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 µg/kg を皮下投与した。投与回数は新生児期曝露実験と同じ 1 回と、標準的な子宮肥大試験プロトコールとされている 3 回に設定した。最終投与の約 24 時間後に、卵巣摘出

ラットと同様の方法で子宮重量の測定を行った。

### B-4. 統計学的解析

体重、臓器重量、膣開口日齢、子宮断面当たりの子宮腺の数、遺伝子発現解析の結果は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析を行い、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較検は Dunnett の方法で 0 µg/kg 群との間で有意差検定を行った。

異常性周期の発生率は Fisher の直接確率法で検定を行った。

#### (倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

## C. 研究結果

### C-1. 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) の新生児期曝露による遅発性影響の検索

離乳前の期間において、EE 投与による異常、死亡はなく、各群ほぼ同様の体重推移を示した (Figure 1)。離乳後の体重は 0.02 µg/kg 群では 6 週、0.2 µg/kg 群では 5~9, 11~13, 15 週、20 µg/kg 群では 5~8 週、200 µg/kg 群では 6 週に 0 µg/kg 群に比べ有意に高値を示したが、15 週以降はいずれの群も統計学的な差は認められなかった (Figure 2)。0.02 µg/kg 群において、36 週に骨盤腔内腫瘍 1 例、42 週に下垂体腫瘍 1 例を安楽殺した。

途中および最終解剖における体重、臓器重量を Table 1~4 に示す。生後 14 日では体重に群間差は認められなかったが、生後 21 日では、200 µg/kg 群で有意な高値を示した (Table 1)。生後 34 日では、0.02 µg/kg 群で脳相対重量の有意な増加がみられたが、用量相関性はなかった (Table 2)。10 週ではいずれも群間差はみられなかった (Table 3)。最

終解剖では、大型のシストを除外した場合の卵巣重量は、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で有意に低下し、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$  群においても低値傾向を示した (Table 4)。子宮重量は  $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  群で有意な高値を示した。

膣開口の平均日齢はコントロール群、投与群ともに 31 日であった (Table 5)。性周期の観察結果を Figure 3 に示す。 $0\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 26 週まで全例 4~5 日周期で規則的な発情周期を示し、その後不規則な性周期を示す個体が出現し始め、次第に増加した。一方、 $200\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 10 週齢、 $20\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 14 週、 $2\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 18 週、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$  群では 22 週より、 $0\mu\text{g}/\text{kg}$  群に比べ異常性周期を示す動物が有意に増加した。その多くは持続発情を示し用量依存性に漸増した。 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  群は  $0\mu\text{g}/\text{kg}$  群とほぼ同様の推移を示した。

組織学的検索では、10 週までの卵巣の発育に投与による影響は認められなかった。子宮 1 断面当たりの子宮腺の数は、生後 14 および 21 日において、20 および  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  群で少ない傾向がみられた (Figure 4)。10 週では、発情期に解剖を行っているのにも関わらず、子宮内腔の拡張や膣上皮の角化不全など発情前期に類似した組織像が  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  群の一部で観察された。

10 週齢における視床下部の KiSS-1, KISS1 receptor, GnRH1, ER alpha, ER beta, Aromatase の mRNA 発現にはいずれも統計学的な有意差は認められなかった (Figure 5)。

### C-2. EE の体内濃度分析

EE  $200\mu\text{g}/\text{kg}$  1 回皮下投与後における全身、脳、肝臓における EE 体内濃度は、いずれも 4 時間後に最も高く、24 時間後では検出限界あるいはそれ以下のレベルであった (Table 6)。

### C-3. 子宮肥大試験

母動物を用いた子宮肥大試験の結果を Figure 6 に示す。解剖時の体重に群間差は認

められなかった。EE 投与後の子宮相対重量は、wet weight では  $2\mu\text{g}/\text{kg}$  以上、blotted weight では  $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  以上でコントロールに対し有意な高値を示した (Figure 6A)。未成熟雌ラットを用いた試験においても、解剖時の体重に群間差は認められなかった。EE1 回投与後の子宮相対重量は wet weight, blotted weight とともに  $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  以上でコントロールに対し有意な高値を示した (Figure 6B)。EE3 回投与後の子宮相対重量は wet weight では 0.2, 2,  $20\mu\text{g}/\text{kg}$  で、blotted weight では  $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で有意に増加した (Figure 6C)。

### D. 考察

体内濃度の測定結果から、皮下投与された EE は 4 時間以降をピークとして、脳を含む全身に分布することが確認された。その後 24 時間以内に大部分が代謝されており、EE の曝露は生後 0~1 日の数時間に限定されることが示された。

未成熟雌ラットを用いた子宮肥大試験では、標準的プロトコールとされている 3 回投与後では、 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で blotted weight が有意に増加した。また、母動物および未成熟雌ラットに 1 回投与した場合でも、 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で blotted weight の有意な増加がみられ、遅発性影響の検索に用いた EE は、 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量から in vivo エストロゲン活性を有することが確認された。

膣開口の平均日齢はいずれの群も 31 日であり、性成熟への影響は認められなかったが、遅発性影響として性成熟以降に  $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で異常性周期を示す動物が有意に増加した。性周期の異常は無処置動物においても加齢に伴い自然に増加するが、EE 新生児期曝露ではその発生が用量依存性に早期化するのが特徴的であった。遅発性影響を示す用量はエストロゲン活性を有する用量に含まれ、 $0.02\mu\text{g}/\text{kg}$  では影響が認められなかったことから、閾値の存在が示唆された。性周期の異常は経時的变化および用量依存性を明確に示しており、雌性生殖器

に対する遅発性影響の指標として極めて有用であると考えられるが、その発現時期は生殖発生毒性試験を開始する10~12週齢以降であり、従来型の試験では遅発性影響の検出が困難であることが示された。0.2 µg/kg以上の群では最終解剖において卵巣重量の減少が認められ、性周期異常による排卵停止に起因すると考えられた。

生後21日の途中解剖では、200 µg/kg群で体重の有意な高値がみられたが、離乳前の雌児動物全体の体重推移に群間差は認められなかったことから、産児数の偏りによる偶発的所見と考えられた。離乳後では、5~15週に一部の群で有意な体重高値がみられたが、持続性、用量相関性はなく、EE投与との関連性は乏しいと考えられた。

途中解剖における臓器重量では卵巣、子宮の発達にEE投与による影響は認められなかった。一方、組織学的検索では20および200 µg/kg群では生後14および21日における子宮腺数が減少傾向を示し、10週では20 µg/kg群の一部で膣スメア像と子宮、膣の組織像に不一致がみられた。これらの変化は遅発性影響が発現した用量で認められており、EE投与との関連が推察された。投与早期における雌性生殖器の病理組織学的検査については、さらに詳細な検討が必要であるが、20 µg/kg群以上でEE投与に関連した変化が認められていることから、遅発性影響を検出する指標の一つになり得ることが示唆された。

KISS-1遺伝子産物であるkisspeptinは生殖機能制御を司る神経ペプチドとして近年注目されている (Peptides, 83-93, 2009)。脳内では視床下部の弓状核 (ARC) と前腹側室周囲核 (AVPV) に発現し、新生児期のエストロゲン様物質曝露により、視床下部におけるKISS-1 mRNAの発現低下が報告されている (Endocrinology, 2359-2367, 2009)。今回、10週齢における視床下部ではKISS-1およびその関連遺伝子の発現に有意な変動は認められなかったが、今後10週以前におけるmRNA発現や免疫組織化学等の検討を

加え、遅発性影響との関連を明らかにする必要があると考えられた。

## E. 結論

新生児期におけるEE 0~200 µg/kgの単回曝露は性成熟には大きく影響しないが、性成熟以降に遅発性影響として性周期の変調を来し、その作用はin vivoにおいてエストロゲン活性を示す0.2 µg/kg以上で用量依存性に発現することが明らかとなった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Yoshida M, Inoue K, Morikawa T, Nishikawa A.: Age-related susceptibility to induction of osteochondral and vascular lesions by semicarbazide hydrochloride in rats. *Toxicol Pathol.*, 38:598-605, 2010.
- 2) Takahashi M, Inoue K, Koyama N, Yoshida M, Irie K, Morikawa T, Shibutani M, Honma M, Nishikawa A.: Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity. *Arch Toxicol.*, 2011, in press.
- 3) Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A.: Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency on female rats. *Toxicol Pathol.*, 2011, in press

### 2. 学会発表

- 1) 高橋美和, 吉田 緑, 井上 薫, 森川朋美, 林 清吾, 松尾沙織里, 入江かをる, 西川秋佳: 若齢および成熟ラットにおける塩酸セミカルバジド誘発骨・軟骨および血管病変の比較: 第27回日本毒性病理学会 (2011.1)
- 2) Miwa Takahashi, Midori Yoshida, Kaoru Inoue, Tomomi Morikawa, Akiyoshi Nishikawa: **Characteristics of histopathological changes induced by**

**semicarbazide hydrochloride in rats.:**  
50th Annual Meeting of Society of  
Toxicology (2011. 3)

G. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

**Table 1 Body weight at postnatal day 14 and 21.**

		EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
		0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		5	5	5	5	5	5
Postnatal day 14	(g)	31.5 $\pm$ 0.7	31.1 $\pm$ 2.0	33.7 $\pm$ 2.4	32.3 $\pm$ 1.7	34.1 $\pm$ 5.2	36.2 $\pm$ 1.4
Postnatal day 21	(g)	49.4 $\pm$ 1.7	49.1 $\pm$ 3.6	52.9 $\pm$ 4.5	52.2 $\pm$ 3.7	55.2 $\pm$ 5.8	56.8 $\pm$ 3.8 *

\*: significantly different from 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group at  $p < 0.05$ .

**Table 2 Body and organ weights at postnatal day 34.**

		EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
		0	0.02	0.2	2	20	200
No. of animals examined		5	5	5	5	5	5
Body weight	(g)	118.4 $\pm$ 2.3	107.2 $\pm$ 5.1	114.6 $\pm$ 6.4	113.7 $\pm$ 7.8	113.9 $\pm$ 4.2	117.1 $\pm$ 8.1
Brain <sup>a</sup>	(g)	1.59 $\pm$ 0.02	1.63 $\pm$ 0.05	1.62 $\pm$ 0.06	1.60 $\pm$ 0.10	1.56 $\pm$ 0.05	1.62 $\pm$ 0.05
	(g%)	1.35 $\pm$ 0.01	1.53 $\pm$ 0.06 *	1.43 $\pm$ 0.10	1.41 $\pm$ 0.11	1.37 $\pm$ 0.07	1.43 $\pm$ 0.07
Ovaries <sup>a</sup>	(mg)	40.0 $\pm$ 8.1	33.3 $\pm$ 8.0	31.8 $\pm$ 8.5	35.8 $\pm$ 4.0	37.0 $\pm$ 6.2	42.5 $\pm$ 5.0
	(mg%)	33.9 $\pm$ 6.9	31.0 $\pm$ 6.2	28.0 $\pm$ 8.4	31.5 $\pm$ 1.9	32.6 $\pm$ 6.4	37.3 $\pm$ 3.7
Uterus <sup>a</sup>	(g)	0.17 $\pm$ 0.03	0.16 $\pm$ 0.05	0.18 $\pm$ 0.09	0.18 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.17	0.13 $\pm$ 0.02
	(g%)	0.14 $\pm$ 0.02	0.15 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.08	0.16 $\pm$ 0.04	0.23 $\pm$ 0.16	0.12 $\pm$ 0.01

a) 1 animal per each group was excluded due to perfusion.

\*: significantly different from 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group at  $p < 0.05$ .

**Table 3 Body and organ weights at 10 weeks of age.**

		EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )											
		0		0.02		0.2		2		20		200	
No. of animals examined		24		22 <sup>a</sup>		24		24		24		24	
Body weight	(g)	307.4 $\pm$ 28.1		304.3 $\pm$ 28.7		318.7 $\pm$ 31.8		298.7 $\pm$ 31.7		312.6 $\pm$ 41.6		316.8 $\pm$ 41.7	
Ovaries <sup>b</sup>	(mg)	76.0 $\pm$ 24.4		74.7 $\pm$ 21.4		60.0 $\pm$ 18.2		144.3 $\pm$ 466.4 <sup>**</sup>		302.1 $\pm$ 969.1		60.1 $\pm$ 37.1 <sup>*</sup>	
	(mg%)	25.0 $\pm$ 9.2		24.7 $\pm$ 7.3		19.1 $\pm$ 6.8		49.1 $\pm$ 159.2 <sup>**</sup>		111.6 $\pm$ 373.0		19.0 $\pm$ 11.2 <sup>*</sup>	
Ovaries except large cyst <sup>b,c</sup>	(mg)	76.0 $\pm$ 24.4		74.7 $\pm$ 21.4		60.0 $\pm$ 18.2		44.9 $\pm$ 7.4 <sup>**</sup>		55.6 $\pm$ 12.6 <sup>*</sup>		60.1 $\pm$ 37.1 <sup>**</sup>	
	(mg%)	25.0 $\pm$ 9.2		24.7 $\pm$ 7.3		19.1 $\pm$ 6.8		15.1 $\pm$ 3.3 <sup>**</sup>		17.8 $\pm$ 4.2		19.0 $\pm$ 11.2 <sup>*</sup>	
Uterus <sup>b</sup>	(g)	1.16 $\pm$ 0.54		2.13 $\pm$ 1.32 <sup>*</sup>		1.06 $\pm$ 0.59		1.10 $\pm$ 0.40		1.19 $\pm$ 0.27		1.12 $\pm$ 0.57	
	(g%)	0.38 $\pm$ 0.21		0.73 $\pm$ 0.51 <sup>*</sup>		0.34 $\pm$ 0.21		0.38 $\pm$ 0.17		0.39 $\pm$ 0.12		0.36 $\pm$ 0.19	

a) 1 animal per each group was excluded due to perfusion.

**Table 4 Body and organ weights at 10 months of age.**

	No. of animals examined	EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )									
		0		0.02		0.2		2		20	
Body weight (g)	5	209.9 $\pm$ 18.3	222.2 $\pm$ 9.8	215.1 $\pm$ 9.3	206.1 $\pm$ 8.1	215.1 $\pm$ 12.5	205.8 $\pm$ 26.9				
Brain <sup>a</sup> (g)	5	1.74 $\pm$ 0.08	1.76 $\pm$ 0.04	1.90 $\pm$ 0.10	1.79 $\pm$ 0.06	1.80 $\pm$ 0.07	1.77 $\pm$ 0.07				
Brain <sup>a</sup> (g%)	5	0.84 $\pm$ 0.10	0.78 $\pm$ 0.02	0.88 $\pm$ 0.05	0.87 $\pm$ 0.02	0.82 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.10				
Ovaries <sup>a</sup> (mg)	5	90.0 $\pm$ 5.5	92.8 $\pm$ 10.6	81.8 $\pm$ 14.7	81.0 $\pm$ 8.2	82.0 $\pm$ 18.3	79.8 $\pm$ 13.7				
Ovaries <sup>a</sup> (mg%)	5	43.4 $\pm$ 2.8	41.0 $\pm$ 4.5	37.9 $\pm$ 6.4	39.4 $\pm$ 4.6	37.6 $\pm$ 9.2	39.7 $\pm$ 2.1				
Uterus <sup>a</sup> (g)	5	0.45 $\pm$ 0.06	0.51 $\pm$ 0.03	0.48 $\pm$ 0.06	0.57 $\pm$ 0.20	0.65 $\pm$ 0.12	0.59 $\pm$ 0.41				
Uterus <sup>a</sup> (g%)	5	0.22 $\pm$ 0.05	0.23 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.02	0.28 $\pm$ 0.11	0.29 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.20				

a) number of effective animals was reduced to 22 due to tumor of the pelvic cavity and the pituitary.

b) 2 animals per each group were excluded due to perfusion.

c) 1 animal of 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group and 2 animals of 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$  group were excluded due to cystic lesions larger than 2cm in diameter.



**Table 5 Day of vaginal opening**

EE (µg/kg)	No. of animals	Vaginal opening (postnatal day)
0	34	31.1 ± 1.2
0.02	34	31.6 ± 1.5
0.2	34	31.4 ± 1.5
2	34	31.3 ± 1.0
20	34	31.1 ± 0.8
200	34	31.3 ± 1.6

**Table 6 EE level in the neonatal rats received 200 µg/kg subcutaneously.**

Organ	Time after EE injection (hours)			
	1	2	4	24
Whole body (ppm)	0.096	0.095	0.100	-
Brain <sup>a</sup> (ppm)	0.029	0.042	0.059	-
Liver <sup>a</sup> (ppm)	0.093	0.099	0.210	0.003

a) Organs from 3 animals were pooled.

- under the detection limit (0.002 ppm)

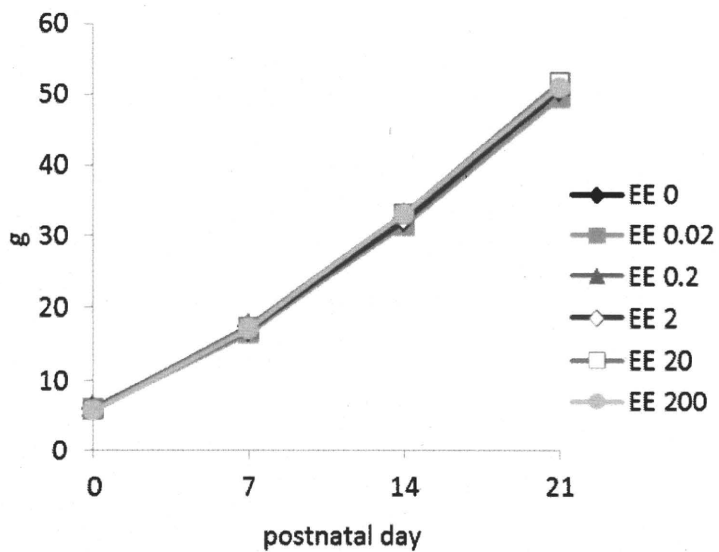
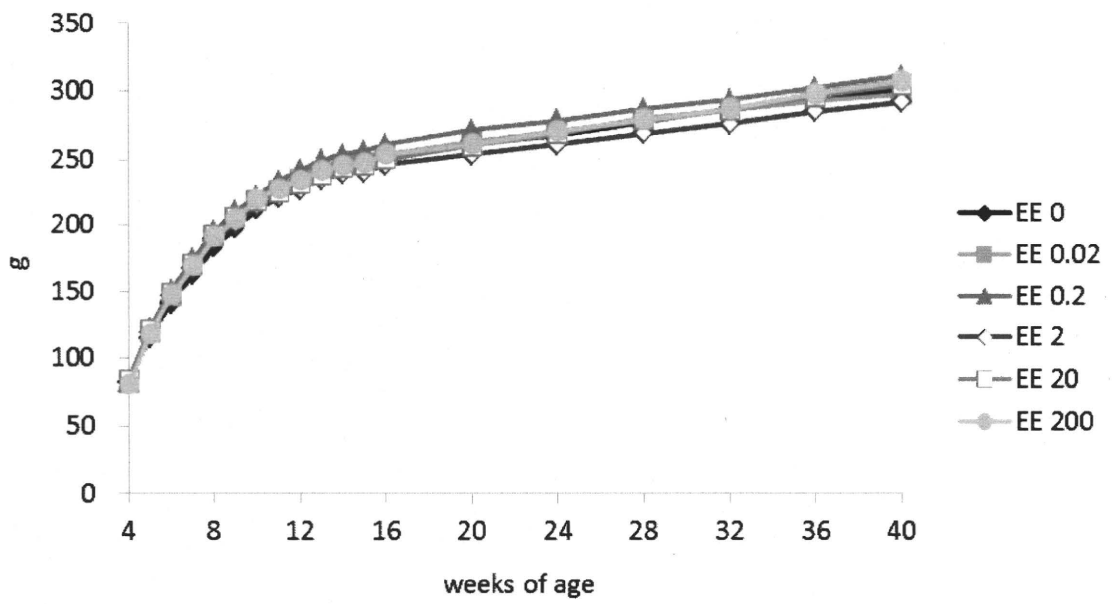
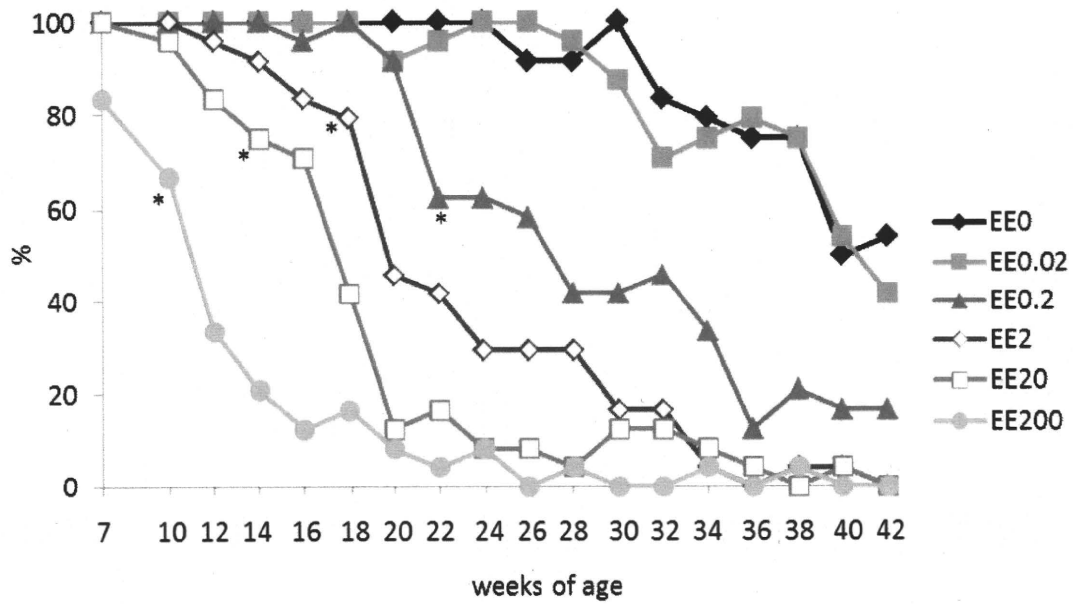


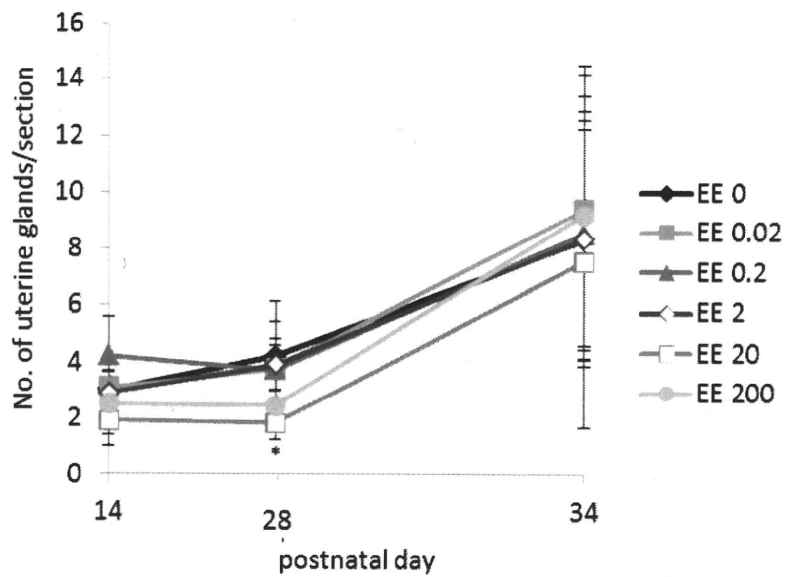
Figure 1 Body weight curve of female pups before weaning.  
n=44~54 per group.



**Figure 2** Body weight curve of female rats after weaning.  
 n=29 per group during 4~10 week of age, and thereafter n=24 per group.



**Figure 3 Sequential changes in incidence of normal estrous cyclicity.**  
 n=29 per group during 4~10 week of age, and thereafter n=24 per group.  
 \*: significantly different from 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group at  $p<0.05$  or  $p<0.01$ , continuously to the end of experimental period (Fisher's exact test).



**Figure 4** Number of uterine glands per section during postnatal day 14 to 34. 5 animals per group were examined. Data represent mean  $\pm$  SD. \*: significantly different from 0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group at  $p < 0.05$ .

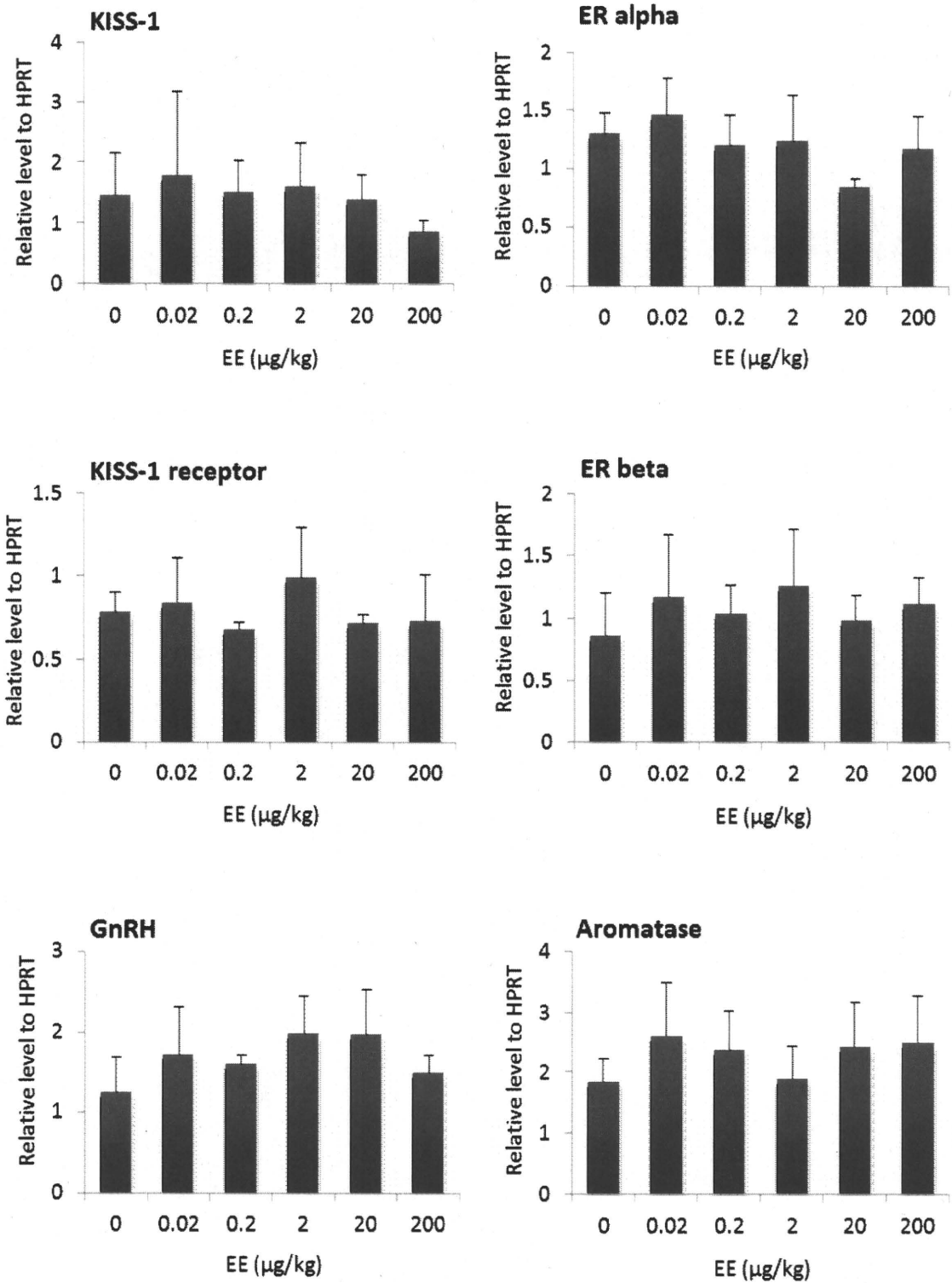
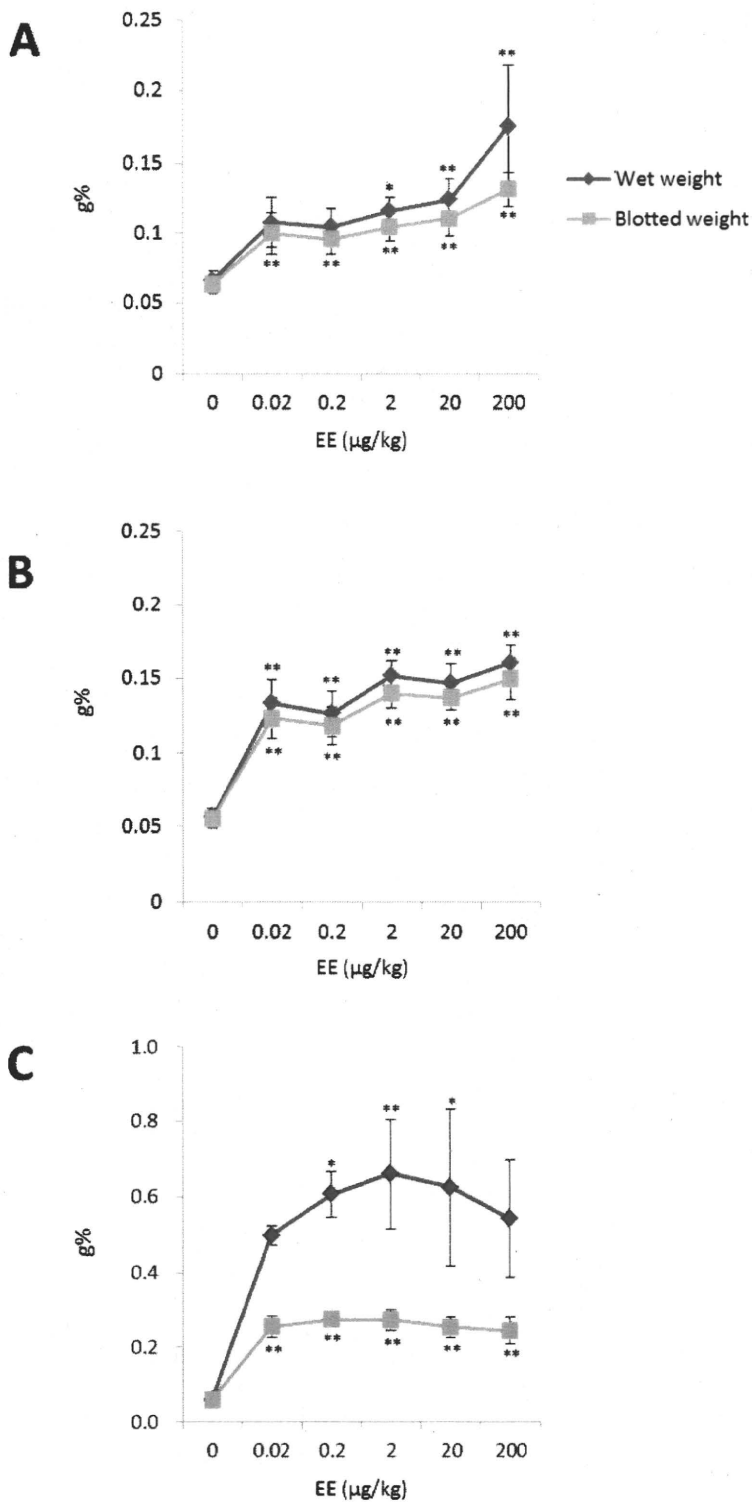


Figure 5 Hypothalamic mRNA levels at 10 weeks of age from rats received neonatal exposure to EE.



**Figure 6 Results of uterotrophic assay using ovariectomized dams and immature female rats.**

(A) Relative uterine weights of ovariectomized dams after single EE injection. (B) Relative uterine weights of immature female rats after single EE injection. (C) Relative uterine weights of immature female rats after 3 times EE injection. \*, \*\*: significantly different from 0 μg/kg group at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

化学物質の臨界期曝露が神経内分泌・生殖機能へ及ぼす遅発型影響の  
機序解明と指標の確立に関する研究

分担研究課題： 化学物質の臨界期曝露が原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影  
響に関する解析

研究分担者： 代田 眞理子 麻布大学獣医学部  
研究協力者： 代田 欣二 麻布大学生物科学総合研究所  
萩原 喜久美 麻生大学環境科学部

**研究要旨**

化学物質の臨界期曝露が、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発型影響を解析し、その指標を探索するために、エストロゲン活性を有するモデル化学物質 (17 $\alpha$ -ethynyl-estradiol, EE) を用いて実験モデルを構築し、曝露量と卵巣を含む生体機能の変化との関係を検討した。すなわち、新生雌ラットの視床下部性分化の臨界期に、異なる用量の EE を、単回皮下投与 (0.08~2.0  $\mu$ g/kg 体重)、あるいは5日間反復経口投与 (0.4~2.0  $\mu$ g/kg 体重/日) した。単回皮下投与では35週齢前後の時期まで、また、反復経口投与では23週齢前後の時期まで性周期を観察し、主として発情期に剖検した。その結果、膣開口を指標とした性成熟の時期あるいは身体的発達、媒体のコーン油を投与した対照群と同様であったが、EE 投与群では、通常は加齢動物で認められる性周期の変化が若齢で認められ、その発現時期は、用量増加に伴い促進された。影響は、性周期以外の指標にも認められ、肝臓および下垂体重量の増加ならびに乳腺の過形成が用量に依存して増加した。また、反復経口投与は単回皮下投与と比べて生体影響が顕著に現れることを認め、本実験モデルにおける用量と影響の発現時期、ならびに影響発現までの過程について確認した。これらの結果は、遅発型影響が現れるまでの間に生体内に生じる変化の検索、ならびに卵巣および卵巣機能に関わる諸器官に及ぼす影響の解析など、バイオマーカー探索ならびにメカニズム解析の研究基盤になるものと考えられる。

**A. 研究目的**

胎児期／新生児期に形成される原始卵胞は、生殖細胞の貯蔵庫として生殖寿命終焉まで卵巣に保持される。原始卵胞数の障害は生殖機能に不可逆的な影響を及ぼすが、原始卵胞形成の臨界期における化学物質曝露の影響は遅発型影響も含めて知見が乏しい。本研究では、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす臨界期曝露の遅発型影響を解析するために組織、細胞、分子の変化から卵巣における遅延型影響を明らかにしていこうとするものであり、これにより、バイオマーカーを捉え、リスク評価に資する科学的根

拠を蓄積していこうとするものである。初年度の平成22年度は、合成エストロゲンの17 $\alpha$ -ethynyl-estradiol (EE) をモデル化学物質として、曝露量と影響、曝露経路と影響の関係を明らかにするとともに、全般的な生体影響を探索することを目的とした。

**B. 研究方法**

1. 被験物質の調整

投与に用いた EE (Sigma-Aldrich、純度 98%以上) は、エタノール (和光純薬) に溶解して 100 mg/mL の濃度に調整し、これをコーン油 (和光純薬) で段



階的に希釈して1匹の投与容量が、皮下投与（実験1）では1 mL/kg 体重に、また、経口投与（実験2）では10 mL/kg 体重になるように調整した。

## 2. 使用動物および飼育条件

実験には、日本チャールスリバー株式会社から、購入したSprague Dawley系 [CrJ:CD(SD)] ラットを用いた。実験1では妊娠13日で購入した妊娠動物を自然分娩させて得られた雌産児を用いた。実験2では、実験1で使用した母動物を、離乳後の回復期間を経て、新たに購入した同系統の成熟雄ラットと交配させて妊娠動物とし、自然分娩させて得られた雌産児を使用した。また、実験2では、経口投与後のEE血中濃度の推移を調べるために、サテライト群を設けたが、サテライト群の動物は、実験1と同様に購入した妊娠動物を自然分娩させて得られた雌産児を使用した。動物は明期12時明、暗記12時間の明暗間隔に設定された飼育施設で、プラスチックケージに木製チップ（サンフレイク、オリエンタル酵母）を床敷きとして入れ、固形飼料（CE-2、日本クレア）および水道水を自由に摂取させて飼育した。

## 3. 投与量の設定根拠および群構成

EEの投与量は、公表されている子宮肥大試験の成績に基づき設定した。すなわち、OECDテストガイドライン策定へ向けたバリデーションにおいて、幼若ラットの子宮肥大に対する経口投与によるEEの最小有効量は $0.3 \cdot \text{g/kg/day}$ であったことから、最高用量にはこれを十分に上回る $2 \mu\text{g/kg/day}$ を設定し、以下公比5で減じて、実験1では $0.4$ および $0.08 \mu\text{g/kg/day}$ をそれぞれ中および低用量に設定し、コーン油を投与する対照群と合わせて4群構成とした。また、実験2では $0.4 \mu\text{g/kg/day}$ を低用量に設定し、コーン油を投与する対照群と合わせて3群構成とした。

## 4. 群分けおよび投与方法

購入あるいは交配により得られた妊娠動物は、妊娠20日から分娩の有無を毎日確認した。分娩が確認された動物は、雌雄別に出生児数を数え、重量を測定し、そのまま母動物に哺育させた。翌日の1日齢に、各腹の雌出生児を各群に振り分け、墨汁（開明墨汁、開明、さいたま市）で四肢に入れ墨を行い、個体を識別して体重を測定し、投与を行った。本研究では、母動物による影響を各群で均等化するために、各腹に全ての投与群の出生児を配し、雄出生児を加えて同腹出生児数を8匹とした。

投与は、実験1では、27G注射針を装着したマイクロシリンジ（Hamilton, 702LT 25 mL）を用い、背部皮下に単回投与した。

実験2では、Watanabeらの報告<sup>2)</sup>を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用いて、1日齢か

ら5日間、反復経口投与を行った。

## 5. 観察方法

実験1および2ともに、投与動物は、投与前後に一般状態を観察し、体重を測定した。投与期間終了後も一般状態を観察した。体重は、7日齢から1週間毎に測定し、剖検日にも測定した。哺育期間中は、全例について11日齢から眼瞼開裂の有無を観察した。両眼の眼瞼が完全に開裂した日を開眼日とし、体重を測定した。また、実験1では、7および10日齢に、実験2では10日齢に、一部の腹の全動物を剖検した。

動物は21日齢に離乳し、4週齢から毎日腔開口の有無を観察した。腔の開口が認められた動物は体重を測定した。実験1では、腔開口の認められた動物の一部を剖検し、初回排卵を確認するとともに、詳細な解析に用いる試料を採取した。

実験1および2ともに、8週齢から4週間に1回、2週間にわたり、毎日腔垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は、実験1では、32週齢まで、実験2では21週齢まで継続し、2週間の観察期間中に4-5日で発情を回帰したものを正常周期に、また、連続した発情休止期が全く観察されなかったものを、連続発情に分類し、これら以外をその他に分類した。また、観察期間中に認められた発情期と発情前期の日数の合計を集計した。剖検前にも性周期の回帰状況を観察し、可能な限り発情期像の認められた日に剖検した。

最終剖検時の日齢は、実験1では、対照群243~257日齢（平均250.2日齢）、 $0.08 \mu\text{g/kg}$ 投与群244~261日齢（平均250.1日齢）、 $0.4 \mu\text{g/kg}$ 投与群244~256日齢（平均249.4日齢）、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 投与群243~257日齢（平均249.4日齢）であった。また、実験2では、対照群155~170日齢（平均160.7日齢）、 $0.4 \mu\text{g/kg}$ 投与群156~170日齢（平均161.3日齢）、 $2.0 \mu\text{g/kg}$ 投与群155~163日齢（平均160.3日齢）であった。

## 6. 剖検方法

### 1) サテライト群の剖検

サテライト群の剖検は、第1回投与後6時間（1日齢）および24時間（2日齢）、ならびに第5回投与後6時間（5日齢）および24時間（6日齢）に行った。剖検では、動物を、冷温麻酔下で開腹し、下大静脈から採血を行い、断頭屠殺した。血液は $4^{\circ}\text{C}$  3000回転で15分間遠心し、分離して得られた血清を $-50^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、脳および肝臓を採取し、重量測定後に、液体窒素で凍結し、 $-50^{\circ}\text{C}$ で保存した。5日齢および6日齢の剖検では、下垂体および卵巣を採取し、下垂体および片側の卵巣は10%リン酸緩

衝ホルマリン溶液で固定し、対側の卵巣はブアン液で固定し、パラフィン包埋した。

## 2) 7日齢および10日齢の剖検

動物を冷温麻酔下で断頭屠殺し、血液を採取し、これを4℃3000回転で15分間遠心して血清を得た。得られた血清は-50℃で保存した。また、実験1および実験2ともに下垂体、卵巣および肝臓を採取し、肝臓は重量を測定し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。下垂体は、生理食塩液に入れて-50℃で保存した。卵巣は、片側はブアン固定し、パラフィン包埋し、対側は遺伝子発現解析に供するためにRNAlater (Ambion) 中に保存した。さらに、実験1では、脳、子宮、胸腺を採取し、子宮以外の器官は重量を測定し、いずれも10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。下垂体は、ホルモン含量測定を目的として-50℃に保存した。卵巣は、片側はブアン固定した。対側の卵巣は遺伝子発現解析を目的としてRNAlater 中に保存した。脳、肝臓および胸腺は重量を測定し、子宮とともに、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定保存した。

## 3) 腔開口日の剖検

腔開口日にペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、共立商事) 深麻酔下で放血屠殺し、卵管を採取して排卵数を数えた。また、卵巣、子宮、胸腺、肝臓、腎臓および副腎を採取し、重量を測定した後、卵巣は10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し、対側の卵巣はブアン液で固定し、パラフィン包埋した。その他の器官、ならびに下垂体は10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

## 4) 最終解剖

実験1では、対照群および2.0 μg/kg/day 投与群の一部について、飼育室で血圧を測定して剖検に供した。

動物は、ペントバルビタールナトリウムによる深麻酔下で下大静脈から採血をした後、放血屠殺した。屠殺後、直ちに下垂体、卵巣、肝臓および子宮を摘出した。これらのうち、片側の卵巣は、OCT コンパウンドに包埋して急速凍結あるいは10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し、対側はブアン液で固定し、その後パラフィン包埋した。子宮は、一方の子宮角を切り分け、急速凍結保存し、残りの組織を10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。肝臓は、約5mm角の組織片を、OCT コンパウンドに包埋して急速凍結し、残りの組織は、急速凍結および10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。下垂体は、生理食塩液に入れて凍結あるいは10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。これらの器官の他に、両側の卵管

を摘出して、排卵検査を行った。また、脳、腎臓、脾臓、胸腺、副腎を摘出して重量を測定し、甲状腺ならびに病変部とともに10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。

## 5) 組織学検査

ブアン液あるいは10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した卵巣は、常法に従ってパラフィン包埋した。ブアン固定標本は3 μmの連続切片としてヘマトキシリン-エオジン染色を行った。10%リン酸緩衝ホルマリン溶液固定標本は、3 μmに薄切して、免疫染色に供した。本年度は、卵巣組織への影響の概要を知るために、一部の標本についてのみ観察を行った。また、本研究班の川口真衣子博士分担研究において、0日齢にEEを8 mg/kg皮下投与し、成熟後に採取した卵巣(4%パラホルムアルデヒド還流固定)も、高用量の影響を推定するために、同様の検査を行った。

## 6) 免疫組織化学

卵巣に発現するタンパク質の発現の変化を免疫組織化学によって検討するために、抗マウスラミニンウサギ抗体、抗ラットCD68 (ED-1) マウス抗体、抗ヒトCD117ウサギ抗体、抗ヒトミューラー管抑制物質ヤギ抗体を用いて、基礎的検討を行った。また、In Situ Apoptosis Detection Kitを用いて、Tunnel法による細胞死の検出方法について検討を行った。

これらの他に、乳腺組織評価のために、抗α-SMAマウス抗体を用いた。

## 7) 統計解析

統計解析ソフト JMP8 (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。すなわち、性周期の型は $\chi^2$ 乗検定を行った。また、二群間の解析は、F検定を行い、分散の一樣性を確認してStudentのt検定を実施した。その他は、まず、分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合に、Dunnettの多重比較検定を用いて、対照群と各投与群との間に有意差検定を行った。有意水準は5%とした。

## (倫理面への配慮)

本研究で行った動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

## C. 研究結果

一般状態の異常は、実験1の0.08 μg/kg 投与群の1例に、199日齢から認められた観察された他に認められなかった。本例は、剖検において右子宮角に約1 mm径の赤色の腫瘤が認められ、病理組織学検査において血管腫と診断された。

動物の体重推移を図1および2に示した。実験1および2のいずれにおいても、対照群と、EE各投与群との間に有意差は認められなかった。

開眼と腔開口の日齢ならびに、その時の体重を表1に示した。いずれの実験においても、対照群と、EE各投与群との間に有意差は認められなかった。

哺育期間中に実施した剖検で測定した器官重量には対照群と、EE各投与群との間に有意差は認められなかった(データは示さず)。また、実験1において実施した、腔開口時の排卵検査において、排卵数ならびに器官重量に対照群と、EE各投与群との間に有意差は認められなかった(データは示さず)。

各観察期間における性周期のタイプの割合を図3および4に示した。また、2週間の観察期間中に認められた発情期および発情前期の合計日数と発情休止期の日数を図5および6に示した。実験1では、性周期の型別分布は、20週齢の観察から有意差が認められ、24週齢から、0.4 μg/kg/day以上の投与群で、発情期あるいは発情前期と判定される日が有意に増加した。実験2では、8-9週齢における観察で、2.0 μg/kg/day投与群のほぼ全例が既に連続発情を示していた。また、発情期および発情前期の合計日数は、12週齢から有意な増加が認められていた。

実験1の動物の一部について剖検日に測定した血圧には、対照群と2.0 μg/kg/day投与群との間に有意差は認められなかった(データは示さず)。

剖検では、実験1および2ともに、乳汁と考えられる白色液が乳腺に貯留し、これが点状ないし斑状に分布している動物が認められ(写真1)、その数はEE投与群で増加していた(表5)。病理組織学検査では乳腺の過形成が認められた(写真2および3)。

表6および7に最終剖検で測定した器官重量を示した。器官重量への影響は実験2の動物で顕著に認められ、0.4 μg/kg/day以上の投与群において卵巢重量の有意な低下ならびに下垂体重量の有意な増加が認められ、2.0 μg/kg/day投与群において子宮重量の有意な低下ならびに肝臓重量の有意な増加が認められた。実験1の動物の器官重量は個体差が大きく、対照群とEE各投与群との間に有意差は認められなかった。

観察した卵巢組織の代表例を写真3~7に示した。幼若期の卵巢は、中心部に発育の進んだ卵胞が観察され、辺縁部には原始卵胞あるいは発育を開始した卵胞が多数観察された(写真3)。また、免疫組織化学(写真4)ではMIS陽性の発育卵胞が卵巢の中心部に数多く観察された。ラミニン陽性部(基底膜)は、卵巢全体に分布し、陽性反応が個々の卵胞を取り囲んでいた。最終剖検で得られた卵巢については、実験1および2ともに対照群では、排卵で形成された黄体が観察された(写真5)。実験1のEE 2.0 μg/kg/day投与群の中で、性周期を回帰してい

た動物の卵巢にも黄体が観察された(写真6)。実験2のEE 0.4 μg/kg/day投与群では、連続発情を示していた動物の卵巢に黄体は観察されず、囊胞化した変性卵胞が多数観察された(写真7)。

武蔵野大学で川口博士らにより実施された臨界期投与実験では8 mg/kgのEEを用いていたことから、本研究の4000倍の用量による影響を検索する目的で卵巢組織の提供を受けた。提供を頂いた一部の卵巢について組織標本を作成し、観察した。対照群は、本研究の対照群と同様に黄体が観察された(写真8)。ラミニンの免疫組織化学では卵胞はいずれも小型で、個々の卵母細胞はラミニン陽性の基底膜によって、間質から隔てられ(写真9)、MISの免疫組織化学では、健全な発育卵胞の顆粒層細胞がMIS陽性反応を示していた(写真10)。ED1陽性細胞は黄体組織全体に分布していた(写真11)。EE投与群の卵巢(写真9)の中には、間質が多く認められたものと囊胞状の変性卵胞が多数形成されているものがあったが、黄体はいずれの組織にも認められなかった。ラミニン、MISおよびED1の免疫組織化学では、それぞれ基底膜、健全な発育卵胞の顆粒層細胞および莢膜や間質に陽性反応が認められた(写真9~11)。

#### D. 考察

雄ラットの視床下部では、精巣から分泌されたアンドロゲンが、脳に局在する芳香化酵素によって、エストロゲンに転換され、これが、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)の大量放出(サージ)を促す神経核にアポトーシスを誘導することにより、GnRHのバルス状分泌のみを有する雄型の視床下部へと分化させると考えられている。このような性分化の時期はラットでは5日齢頃までに限定され、この時期は、視床下部性分化の臨界期といわれている。臨界期の脳に対するエストロゲンの効果は、生殖器官が正常に発生した雌においても認められ、新生児期にエストロゲン活性物質の投与を受けると、視床下部は雄型に分化し、性成熟に至っても発情を回帰しい、あるいは若齢で発情回帰を停止する動物になることが知られている。

視床下部とは別に、新生児期のエストロゲン活性物質投与が、原始卵胞の形成抑制や数の変化を惹起するとの報告がある。哺乳類では、雌性生殖細胞の盛んな増殖は胎児期に限定されており、この時期に分裂が抑制されると、卵巢が保持する卵母細胞が減少し、生殖寿命の短縮を招くことが知られている。

卵巢内部で、増殖を終え、減数分裂前期で休止した卵母細胞は、それぞれが扁平な上皮細胞に囲まれて原始卵胞を形成し、その一部が順次発育を開始し

ていくと考えられている。このように、原始卵胞は、卵母細胞の貯蔵組織ともいえるが、原始卵胞の形成も特定の時期にのみ観察される。近年、原始卵胞形成のメカニズムについて様々な仮説が提唱されて来たが、原始卵胞形成期もまた、化学物質曝露の影響を懸念されるべき時期であると考えられる。

本研究では、この時期のエストロゲン活性化学物質曝露が及ぼす遅発型影響を検討している。検討には、用量と反応、影響の広汎な検索と発現時期の特定が求められることから、平成 22 年度は、実験モデルを構築した。本研究では、この時期の新生雌ラットに、モデル化合物として選んだ合成エストロゲンの EE を投与して、用量と影響の関係、影響の出現時期、投与経路と影響との関係、ならびに全身への影響を確認した。

EE の用量は、幼若雌ラットを用いる子宮肥大試験において、子宮重量を軽度増加させる用量を高用量に設定した。臨界期曝露の直接の影響として異常な性周期を示す動物あるいは、発情期および発情前期の日数の合計を指標に、EE の用量との関係を調べたところ、単回皮下投与した実験 1 においても反復経口投与した実験 2 においても、性周期の異常が若齢で認められ、その時期は、用量の増加に伴い促進されていた。投与動物の体重推移、開眼日齢ならびに腔開口日齢にはいずれの実験においても投与の影響が認められなかったことから、性周期の異常発現までの間に、生体内部で進行あるいは蓄積する変化を明らかにすることによりバイオマーカーの探索へと繋がるものと考えられる。本研究において EE 用量との関係が明らかになったことから、卵巣をはじめとする器官への影響を、特定の時期に集約して、検索できるものと考えられる。また、本研究では、EE 投与の影響を、皮下および経口の二つの経路について検討した。反復経口投与した実験 2 の累積投与量を、単回皮下投与を行った実験 1 の投与量と比較すると、実験 2 の 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群は実験 1 の 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の用量に相当している。しかし、性周期の変化は実験 2 の 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群が約 1 ヶ月早く認められ、反復経口投与の方が、単回皮下投与より影響が顕著であることが示唆された。サテライト群から採取した血清試料を用いて、EE の体内動態を検討するとともに、投与経路による影響の差異について、単回投与実験で確認する必要はあるが、投与方法の違いが影響に反映されることは、リスク評価への適用を考慮する上で有用である。以上の結果から、本研究において、詳細な解析に向けた実験モデルが構築されたものと考えられた。

本研究において卵巣の代表例について免疫組織化

学を実施した。ラミニンは基底膜に発現するタンパク質であることから、基底膜の局在を確認して、原始卵胞の形成異常の有無を検討する上で有用である。MIS は健全な発育卵胞の顆粒層細胞に発現しているタンパク質であることから、発育卵胞の特定に有用である、ED1 はマクロファージの表面抗原であることから、退行卵胞あるいは機能を失った黄体の消退に与るマクロファージの卵巣における分布を検討する上で有用である。同様に、Tunnel 法によるアポトーシスの検出も卵巣の機能を解析する上で有用な手段となる。ヘマトキシリンオジン染色標本の観察および形態計測および遺伝子発現解析を組み合わせることにより、卵巣機能に及ぼす影響を詳細に解析できるものと期待される。

実験 1 および 2 ともに最終剖検は、低用量群に性周期の異常が認められ始める時期を選んだ。これらの剖検では、EE 投与群の中に、乳汁の貯留を伴う乳腺の過形成や下垂体重量の増加を示す動物が認められ、その数は、EE の用量に依存して増加していた。乳腺の変化は、下垂体からのプロラクチン分泌亢進を示唆する所見と考えられる。プロラクチン分泌は、エストロゲンにより促進されるが、子宮重量は EE 投与群で低く、エストロゲン分泌はむしろ低下しているものと推測された。また、実験 2 では肝臓重量が EE 投与群で有意に増加した。実験 1 の動物の中にも、肝臓重量が著しく大きい動物が認められた。幼若期に途中剖検した動物の肝臓重量に有意差が認められなかったことから、遅発して発現した影響の可能性がある。肝臓はプロラクチン受容体がよく発現している器官であり、プロラクチン分泌が亢進すると、さらに発現が亢進することが知られている。一方、新生児期におけるエストロゲン投与が肝臓の薬物代謝酵素 CYP3A の活性を増大させることも報告されている。CYP3A は、成長期の雄ラットの肝臓では、成長に伴い活性が上昇するが、雌の肝臓ではこのような変化は認められていない。しかし、新生雌ラットに estradiol-17 $\beta$  (E2 $\beta$ ) を腹腔内投与すると、程度は雄に及ばないものの、成長期に CYP3A 活性が上昇してくることが報告されている。肝臓重量に反映されている肝臓組織の変化を明らかにし、臨界期曝露の影響を、卵巣機能の変遷との関係に着目しながら検討を進める必要があると考えられる。

実験 1 の 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  投与群の 1 例に腔出血が認められ、剖検で子宮に腫瘍が観察された。病理組織学検査の結果、血管腫と診断された。ラットにおいて子宮がんは稀で、Donryu ラットなど特定の系統に加齢後に認められている。その他の EE 投与群では同様の変化は観察されていないことから、自然発生の