

の後に DEPC treated Water (ニッポンジーン、遺伝子工学研究用) を加え溶解し RNA 溶液を得た。得られた RNA 溶液から 10 倍希釈溶液、もしくは 100 倍希釈溶液を作製して吸光度を測定し、溶液中の RNA 濃度を測定し、肝臓由来 RNA は 100 µg/mL、子宮由来 RNA は 50 µg/mL にそれぞれ調整しそのまま逆転写に用いるか、もしくは -80°C で保存した。

得られた RNA サンプルを SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (インビトロジェン株式会社)、もしくは Taqman® Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) を用いて逆転写し、cDNA サンプルを得た。得られた cDNA は Taqman® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) と StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) を用いてリアルタイム PCR を行い各遺伝子発現の定量解析を行った。プロラクチン受容体ロングフォーム/ショートフォーム (PRLRL/PRLRS)、シトクロム P450 3A9 (CYP3A9)、エストロジェン受容体 α (ERα)、プロゲステロン受容体 (PR) のそれぞれをコードする各遺伝子発現の定量は相対定量法により行った。その際、Pre-Developed Taqman® Assay Reagents Control Kits (Applied Biosystems) を用いてリファレンス遺伝子として Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (グリセルアルデヒド 3 リン酸脱水素酵素: GAPDH) の発現量を各サンプルについて測定し、GAPDH の発現量によって各ターゲット遺伝子の発現量を補正してそれぞれの相対発現量を求めた。また、群間の発現量の比較はコントロール群の発現量を 1 としそれに対する各群の発現量の比を求め比較した。リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブは、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) から得た情報を基にプライマー設計ソフトウェア (Primer Express、Applied

Biosystems) を用いて行った。

## 5) 乳腺の免疫組織学的観察

実験 1 および 2 において採取した乳腺は 10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し、常法によりパラフィン包埋して 3 µm の切片とし、ヘマトキシリンエオジン染色した。また、実験 2 で、乳汁様液の貯留が認められた乳腺の組織切片については、プロラクチン受容体の活性化によってリン酸化するリン酸化 STAT5 の免疫組織化学を行い、プロラクチン受容体シグナル伝達系活性化の有無を検討した。免疫組織化学では一次抗体に抗リン酸化 STAT5 (Tyr694) モノクロナル抗体を用いた。

## 6) 血清中性腺刺激ホルモン濃度の測定

実験 2 の最終解剖で得られた血清について、黄体化ホルモン (LH) および卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度を研究協力者である東京農工大学渡辺 元教授により二抗体法によるラジオイムノアッセイで測定した。

## 2. 視床下部/下垂体/性腺軸の発達解析

### 1) 被験物質の調製

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調整した。今年度は、反復経口投与のために EE を 0.04 あるいは 0.2 µg/mL の濃度に調整した。

### 2) 使用動物および飼育条件

日本チャールスリバー株式会社から、購入した Sprague Dawley 系 [Cr1:CD(SD)] 雌ラットを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。その他の研究は、平成 22 年度研究に供した動物から採取した試料を用いた。

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

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) 群分けおよび投与方法

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、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。各動物の投与液量は 10 mL/kg 体重とし、毎日測定した体重を基に算出した。対照群には媒体としたコーン油を同様に投与した。

### 4) 観察方法

投与動物は、投与前に体重を測定し、一般状態を投与前後に観察した。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。

動物は 21 日齢に離乳し、以下の実験に供した。

#### ① 初回排卵の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察した。膣の開口が認められた動物の体重を測定し、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、卵巢、子宮、下垂体、胸腺、肝臓、腎臓および副腎を採取し、重量を測定した後、卵巢は

10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し、対側の卵巢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。

#### ② 膣開口 1 週間後の観察

EE2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日投与群の動物について、初回排卵の有無を確認するために膣開口 7 日後に体重を測定してし、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た。卵管を採取して排卵の有無を確認し（排卵検査）、両側の卵巢について黄体数を数えた。

#### ③ 性腺刺激ホルモンによる排卵誘発観察

対照群および EE2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日投与群の動物に、23 日齢にウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（equine chorionic gonadotropin, eCG, Sigma）を 5IU 皮下投与し、各群の約半数はその 3 日後に体重を測定してし、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、排卵検査を行った。残りの半数は eCG 投与により発育した排卵可能な卵胞数を知るために、eCG 投与 48 時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（human chorionic gonadotropin, hCG, Sigma）を 10IU 皮下投与して翌日、同様の方法で排卵検査を行った。排卵検査では、卵巢および子宮重量を測定し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液あるいは%パラホルムアルデヒド液で固定した。また、eCG 投与時ならびに誘起排卵検査日齢における卵巢および子宮の発達を調べるために、対照群および EE2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日投与群の動物を 23 および 26 日齢に、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、卵巢および子宮を採取した。これらは重量を測定し、片側の卵巢はブアン固定し、対側の卵巢は 4%パラホ

ルムアルデヒド液で固定した。子宮は子宮角を切り出し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液あるいは%パラホルムアルデヒド液で固定した。

### 3. 統計解析

統計解析ソフト JMP9 (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、分散の一致性を確認して 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、Dunnnett の多重比較検定を用いて、対照群と各投与群との間で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

### 1. 遅発型影響の病態解析

#### 1) 卵巣の形態学的評価

表 1 および 2 に実験 1 および実験 2 の最終解剖で得られた卵巣の形態評価の成績を示す。また、代表的な卵巣組織像を図 1 に示す。両実験ともに、対照群では最終剖検時に殆どの動物の卵巣に黄体が認められ、排卵周期を回帰していたことが示唆された。一方、EE 投与群では黄体を欠く動物が増加し、また、多数の囊胞状卵胞が観察され、排卵周期を停止していることが示唆された。

#### 2) 原始卵胞数の計測結果

EE を 0、0.4 または 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した動物の 10 日齢および最終剖検 (22-23 週齢) 時に採取した卵巣に数えられた原始卵胞数を図 2 に示す。いずれの投与群においても加齢に伴い原始卵胞数は減少したが、それぞれの時点で数えられた原始卵胞数は対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

### 3) 遺伝子発現解析

GAPDH をリファレンス遺伝子として各遺伝子の相対発現量を求め、対照群での相対発現量を 1 として各群の発現量を比較した (図 3 および 4)。

単回皮下投与 (実験 1) では、遺伝子発現の定量結果について有意差がみられた項目はなかった (図 3)。ただし、*PRLRS* については対照群と比較して EE 投与群において発現量が高い傾向がみられた。また、子宮での *ER $\alpha$*  発現量が EE 投与群で高い傾向がみられ、逆に *PR* は EE 投与群で低値の傾向がみられた。

反復経口投与 (実験 2) では肝臓での *CYP3A9* 発現量が対照群と比較し有意に低下した。また、肝臓および子宮における *ER $\alpha$*  発現量に高値の傾向がみられた。子宮での *PR* 発現に関しては 0.4、

2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  群で各 1 匹ずつ発現量が高い個体がみられ、この個体を外して統計解析を行うと、両投与群と対照群との間で有意差がみられた。

#### 4) 乳腺の免疫組織学的観察結果

乳腺における乳蛋白質の合成は、下垂体が分泌するプロラクチンの刺激が不可欠である。プロラクチンは標的細胞の細胞膜に局在する受容体を介してその情報を細胞内に伝達する。乳タンパク質の合成はプロラクチン受容体の中でも細胞内領域が長く自己リン酸化を起点として JAL2 のリン酸化、これによる STAT5 のリン酸化が生じ、リン酸化した STAT5 が核内に移行して標的遺伝子の転写を促進すると考えられている。従って、リン酸化 STAT5 の発現はプロラクチン受容体情報伝達システムの活性化を意味するが、図 5 に示すように、過形成の認められた乳腺にリン酸化 STAT5 が局在することが確認された。

#### 5) 血清中性腺刺激ホルモン濃度

実験 2 の最終解剖で得られた血清について、測定した LH および FSH 濃度を図 6 に示した。血清中 LH 濃度には対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかったが、FSH 濃度は、2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群において対照群と比較して有意な高値が認められた。

## 2. 視床下部／下垂体／性腺軸の発達解析

### 1) 初回排卵の観察

図 6 に膣開口日ならびに 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群における膣開口 1 週間後までの排卵率および排卵で形成された黄体数を示した。また、2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群の膣開口日ならびにその 1 週間後に採取した卵巢組織の代表例を図 7 に示した。

膣開口日に対照群では全例に排卵が認められたが、2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群では半数の動物には排卵が認められなかった(図 7A)。排卵が認められた動物(図 7B)も排卵数は対照群と比較して有意な低値を示した(図 6B)。また、排卵が認められた動物の器官重量を表 3 に示したが、2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群では対照群と比較して卵巢重量が有意な低値を示した。膣開口から 1 週間が経過すると、2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  投与群でも 1 例(図 7C)を除き全例の卵巢に黄体が形成され(図 6A および図 7D)、この間に初回排卵が起こったことが示唆された。しかし図 6B に示すように、黄体数を個別にみると、1 週間を経過しても膣開口時に対照群で数えた黄体数と同等以下の動物が多く、黄体数が多かった卵巢では、複数世代の黄体が認められ(図 7D)、膣開口から遅れても初回排卵数は低値で推移していることが示唆された。

### 2) 性腺刺激ホルモンによる排卵誘起

結果は表 4 に示した。

EE を 2  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  反復経口投与した動物では、eCG を投与した 23 日齢におけ

る卵巢および子宮重量が対照群と比べて有意な低値を示した。この動物に eCG を投与すると、その 3 日後に、対照群では全例に排卵が誘起されるのに対し、EE 投与群では排卵が誘起される例はなかった。eCG 投与を行わなかった動物と比べると eCG 投与群の卵巢重量は増加していたことから、性腺刺激ホルモンに反応していたことは明らかであるが、誘起排卵予定日の前日に、内因性性腺刺激ホルモンサージを欠いて排卵できなかったものと考えられる。しかし、hCG を投与して内因性性腺刺激ホルモンサージを代替しても、排卵は全例に認められたが、排卵数は対照群と比較して少なく、EE 投与群の卵巢は排卵可能な卵胞も少ないことが示された。

## 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)を促す神経核の退行を誘導することにより、GnRH のパ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。初年度研究において、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の EE を高用量に設定して、新生雌ラットに単回皮下投与あるいは反復経口投与すると、開眼時期や体重増加などの身体的発達や膣開口時期に影響は認められないもの

の、週齢の進行に伴って、性周期の回帰を停止して連続発情を示す動物が増加し、性周期を回帰しても発情期に排卵を確認できない例が多く認められた。今回、これらの動物の卵巣組織を評価したところ、黄体を欠く例が EE 投与群で多発していた。ラットの卵巣では、黄体はプロジェステロン分泌を停止しても形態学的に消退するまで、3 回以上の発情を回帰する必要のあることが知られている。従って、最終解剖で EE 投与群では長期にわたって排卵を停止した動物が増加していると考えられる。さらに、これらの動物の卵巣には嚢胞状の卵胞が認められた。嚢胞状の卵胞は、血中 FSH 濃度の上昇により胞状卵胞が排卵できないまま卵巣に残存し、嚢胞状に変性したものと考えられる。

多くの哺乳類において、雌性生殖細胞の盛んな増殖は胎児期に限定され、ラットやマウスでは卵母細胞を貯蔵し、排卵に向けて発育相へと送り出す原始卵胞は、3 日齢までに形成されると考えられている。新生児期のマウスにエストロゲン活性物質を投与すると、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が、本研究では EE を反復経口投与したラットから 10 日齢に卵巣を採取しても、そこに数えられた原始卵胞数に EE 投与の影響は認められなかったことから、ラットでは EE 投与は原始卵胞の形成に顕著な影響を及ぼさないことが示唆された。

原始卵胞数は、その一部が排卵に向けた発育相に順次移行することにより、全体の数が加齢に伴い減少していくと考えられている。実際、本研究において、最終解剖で採取した卵巣に数えられた原始卵胞数は 10 日齢のそれより減少していた。しかし、EE 投与群では、比較的若齢で性周期の回帰を停止し、また、排卵を停止したにもかかわらず、対照群と有意差のない値を示していた。血清中 FSH 濃度の上昇、嚢胞状卵胞の増加といった変化を合わせて考えると、EE 投与動物の卵巣では対照群と

同様に卵胞が消費されながら、排卵に至らず嚢胞化していることが推測された。

初年度研究において顕著に認められた影響として乳腺の過形成があげられる。新生児期におけるエストロゲン活性物質曝露が乳腺組織に質的な変化をもたらすとの報告がある。今年度は、非妊娠動物の乳腺にみられた過形成や管腔の拡張ならびに乳汁様液の貯留が、泌乳動物と同様にプロラクチンシグナルを介しているかどうかを、受容体から検討した。プロラクチン受容体は乳タンパク遺伝子の転写を促進するロングフォームとその作用を有しないショートフォームとが様々な組織に発現している。肝臓におけるプロラクチン受容体遺伝子の発現量は対照群と有意差は認められなかった。しかし、過形成の認められた乳腺腺胞上皮細胞では、プロラクチン受容体からのシグナリングによってリン酸化される STAT5 の局在が認められ、プロラクチン受容体情報伝達系の活性化が確認された。

初年度研究において反復経口投与動物の最終解剖における子宮重量に低下が認められていたが PR 遺伝子についても低下の経口が認められた。PR はエストロゲンにより誘導される遺伝子のひとつである肝臓における薬物代謝酵素 CYP3A9 遺伝子の発現が EE 反復経口投与動物で低下した。CYP3A9 は雄と比べて雌の肝臓で発現量が多いことが知られ、雌ラットにエストロゲンを投与するとその発現がさらに増強されることが報告されている。子宮における PR 遺伝子の発現低下および肝臓における CYP3A9 遺伝子の発現低下にはエストロゲン受容体情報伝達系の活性低下が考えられるが、原因を明らかにするためには血中エストロゲン濃度の測定が必要であると考えられる。

膣開口はげっ歯類の雌における春機発動マーカーとして多くの生殖発生毒性試験で評価の対象とされている。膣開口が初回排卵とほぼ同日に認められるのは、卵巣

で初回排卵に向けて卵胞が発育し、発育した卵胞から分泌されるエストロジェンが、視床下部下垂体軸に対してポジティブフィードバックにより性腺刺激ホルモンサーージを誘発すると同時に膣上皮を角化させて開口に導くことによると考えられている。初年度研究において、EE 投与は膣開口時期に影響は認められなかったが、初回排卵は膣開口から遅れて起こることが反復経口投与動物で明らかになった。また、膣開口日に排卵しても、排卵数は少なく、その傾向が持続することも示唆された。幼若期の卵巣および子宮には発育の遅滞が認められ、eCG で卵胞発育を刺激しても排卵可能な卵胞は少なく、EE 反復経口投与が、視床下部下垂体軸へのフィードバックだけでなく、卵巣における卵胞発育にも影響を及ぼすことが示唆された。これらの幼若期における変化が最終的には排卵周期の停止、嚢胞状卵胞の増加といった遅発型の影響へと繋がるものと考えられる。

初年度の研究においてEE用量との関係が明らかにし、卵巣をはじめとする器官への影響を、遅発型影響が顕著に認められた最終解剖時ならびに春機発動までの幼若期に集約して検索したが、曝露方法による影響の相違を比較すると、影響の性質は単回皮下投与と反復経口投与とで類似していたが、その程度は同じ用量の分割反復経口投与の方が顕著であった。投与経路による影響の差異について、単回投与実験での確認すが求められる。

## E. 結論

臨界期におけるEE曝露が卵巣の発育を直接あるいは性腺刺激ホルモン分泌を介して間接的に遅滞させることが示唆された。これら視床下部／下垂体／性腺軸に生じた初期変化が起点となり、遅発型影響へと進展することが考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) 投稿中

### 2. 学会発表

- 1) Mariko Shiorta, Jun Kawashima, Tomohiro Nakamura, Yuko Ogawa, Kinji Shiota: 51th Annual Meeting Society of Toxicology (Poster presentation) Effects of neonatal exposure to low-dose 17 $\beta$ -ethynylestradiol on the puberty of female rats. March 2012 (San Francisco, USA)
- 2) Mariko Shiorta, Jun Kawashima, Tomohiro Nakamura, Yuko Ogawa, Akane Hara, Ayaka Kobayashi, Kinji Shiota, Midori Yoshida: World Congress on Reproductive Biology (Poster presentation) Delayed effects of low-dose Ethynylestradiol Treatment on Neonatal Female Rats. October 2011 (Canines, Australia)
- 3) 代田 真理子、川嶋 潤、中村 知裕、小川 祐布子、小林 綾佳、原 茜、吉田 緑：第36回日本トキシコロジー学会（口頭発表）雌ラット新生児期におけるエチニルエストラジオール(EE)曝露の長期的影響 2011年7月（横浜）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得  
該当無し
2. 実用新案登録  
該当無し
3. その他  
無し

表 1

最終解剖（32-33 週齢）で採取した卵巣の組織評価結果（実験 1，EE 単回皮下投与）

Dose of EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0	0.08	0.4	2
Animals examined	8	7	8	8
Absence of corpus luteum	1	3	5	4
Presence of cystic follicles	2	5	5	7

表 2

最終解剖（22-23 週齢）で採取した卵巣の組織評価結果（実験 2，EE 反復経口投与）

Dose of EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0	0.4	2
Animals examined	10	8	10
Absence of corpus luteum	2	7	10
Presence of cystic follicles	5	9	10

表 3 EE 反復経口投与動物における膣開口時における器官重量

EE ( $\square\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	Number of animals with CL	BW (g)	Ovary (mg)	Uterus (mg)
0	12	137 $\pm$ 3	42 $\pm$ 1	187 $\pm$ 12
0.4	7	124 $\pm$ 4*	46 $\pm$ 2	166 $\pm$ 15
2	5	129 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2**	149 $\pm$ 18

表 4 EE 反復経口投与動物の幼若期におけるウマ絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン投与による誘起排卵検査結果

Treatments EE ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )	None (PND 23)		None (PND 26)		eCG		eCG & hCG	
	0	2.0	0	2.0	0	2.0	0	2.0
Examined	4	5	1	3	5	5	5	5
Ovulated	0	0	0	0	5	0	5	5
Oocytes	NE	NE	NE	NE	8.4	0**	8.6	5.8**
BW	76.5	81.6	90.2	92.0	91.8	86.6	90.7	90.2
Ovarian wt	21.8	15.1*	19.4	22.1	32.1	17.2**	31.6	37.7
Uterine wt	34.2	24.0**	22.9	44.9	155	129*	141	116*

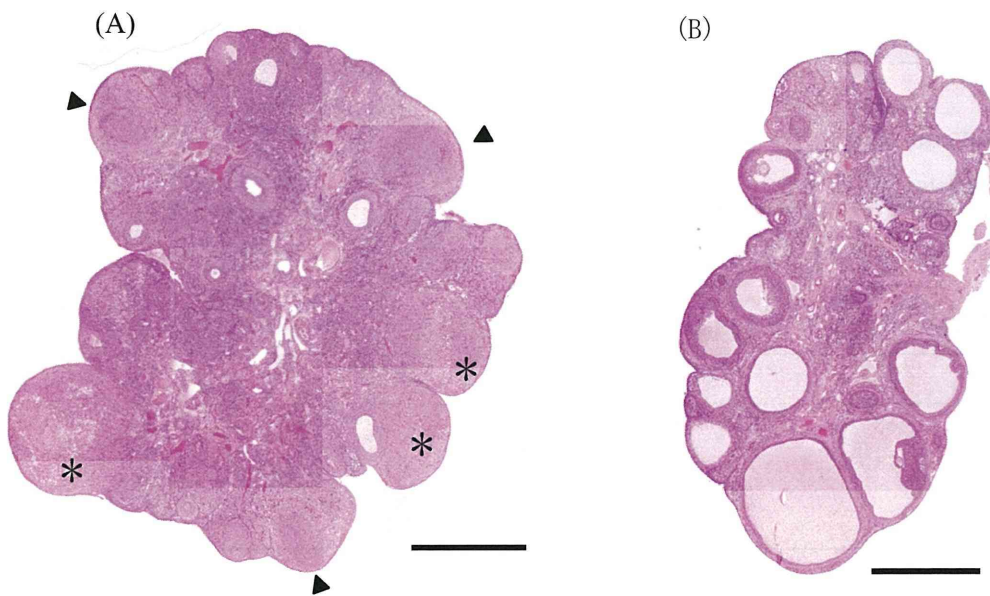


図 1

1日齢にEEを0 (A) または 2 µg/kg (B) 単回皮下投与した動物の最終剖検 (32-33週齢) における代表的な卵巢組織像 (HE染色)。対照群の卵巢(A)には新生黄体 (矢頭) および形態学的退行を開始した黄体 (\*) が認められる。EE投与群の卵巢(B)には黄体を欠き、多数の嚢胞状卵胞が観察される。(Bar=1mm)



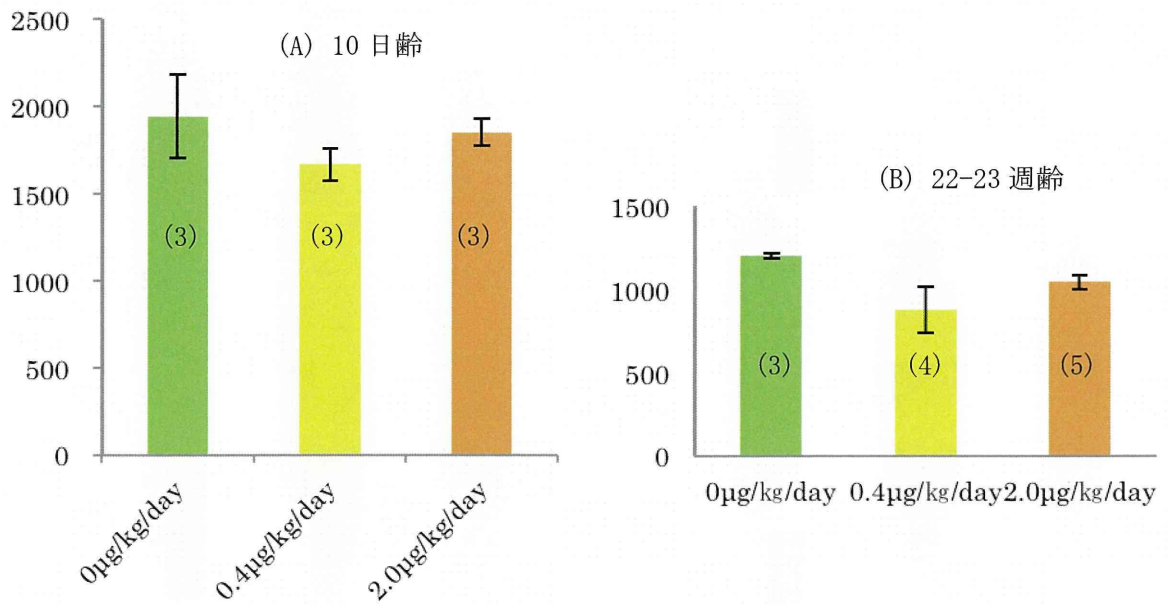


図 2

1-5 日齢に EE を 0、0.4 または 2 μg/kg/day 反復経口投与した動物の 10 日齢(A)および最終剖検 (22-23 週齢) (B)で採取した卵巣に数えられた原始卵胞数 (N) , Bars =S.E.M.

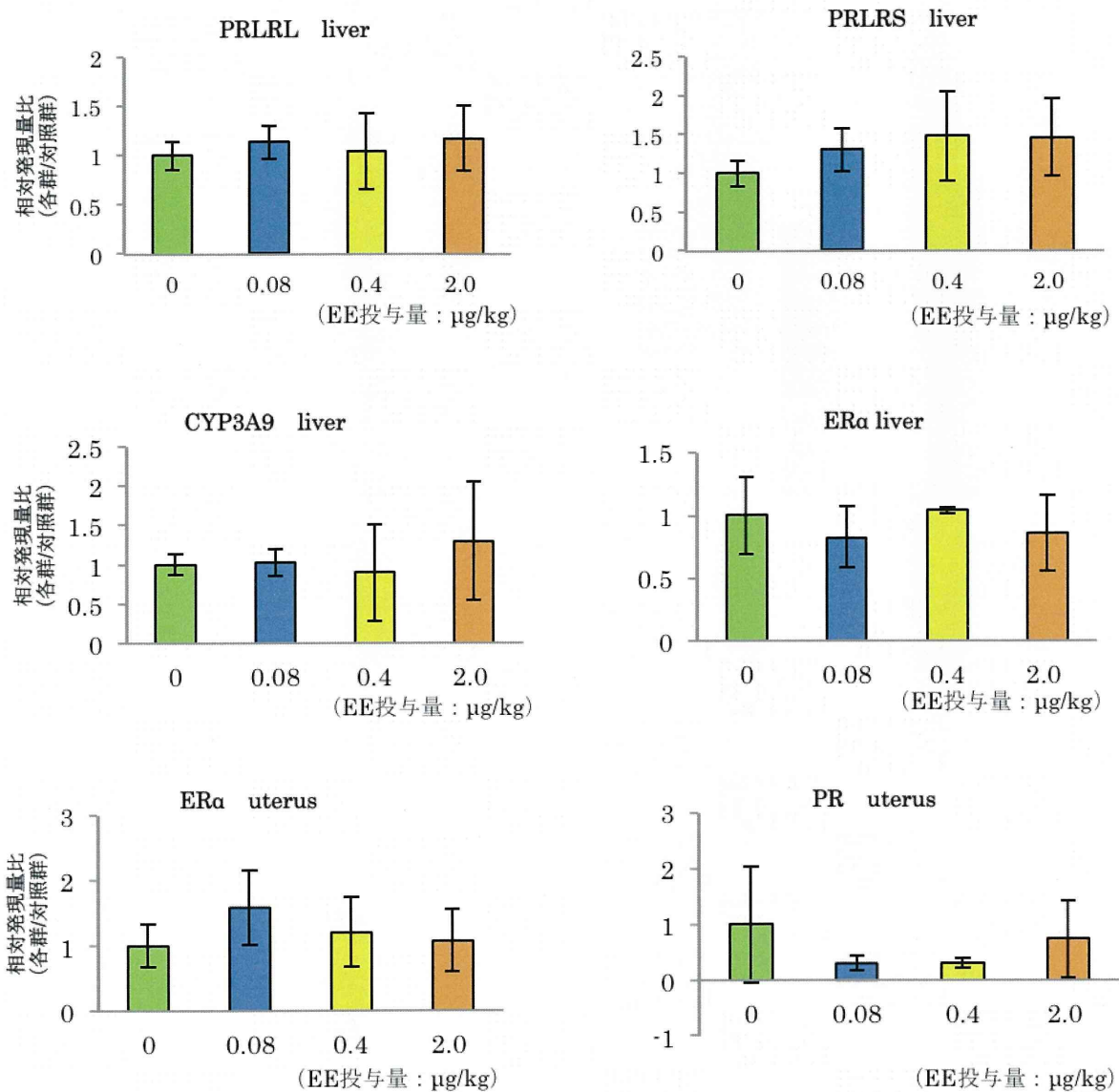


図 3

1日齢にEEを0、0.08、0.4または2 μg/kg単回皮下投与した動物の最終剖検（32-33週齢）で得られた肝臓におけるプロラクチン受容体ロングフォーム（PRLRL）、プロラクチン受容体ショートフォーム（PRLRS）、CYP3A9、エストロゲンα受容体（ERα）ならびに子宮におけるERαおよびプロジェステロン受容体（PR）遺伝子のリアルタイムPCRによる定量解析結果

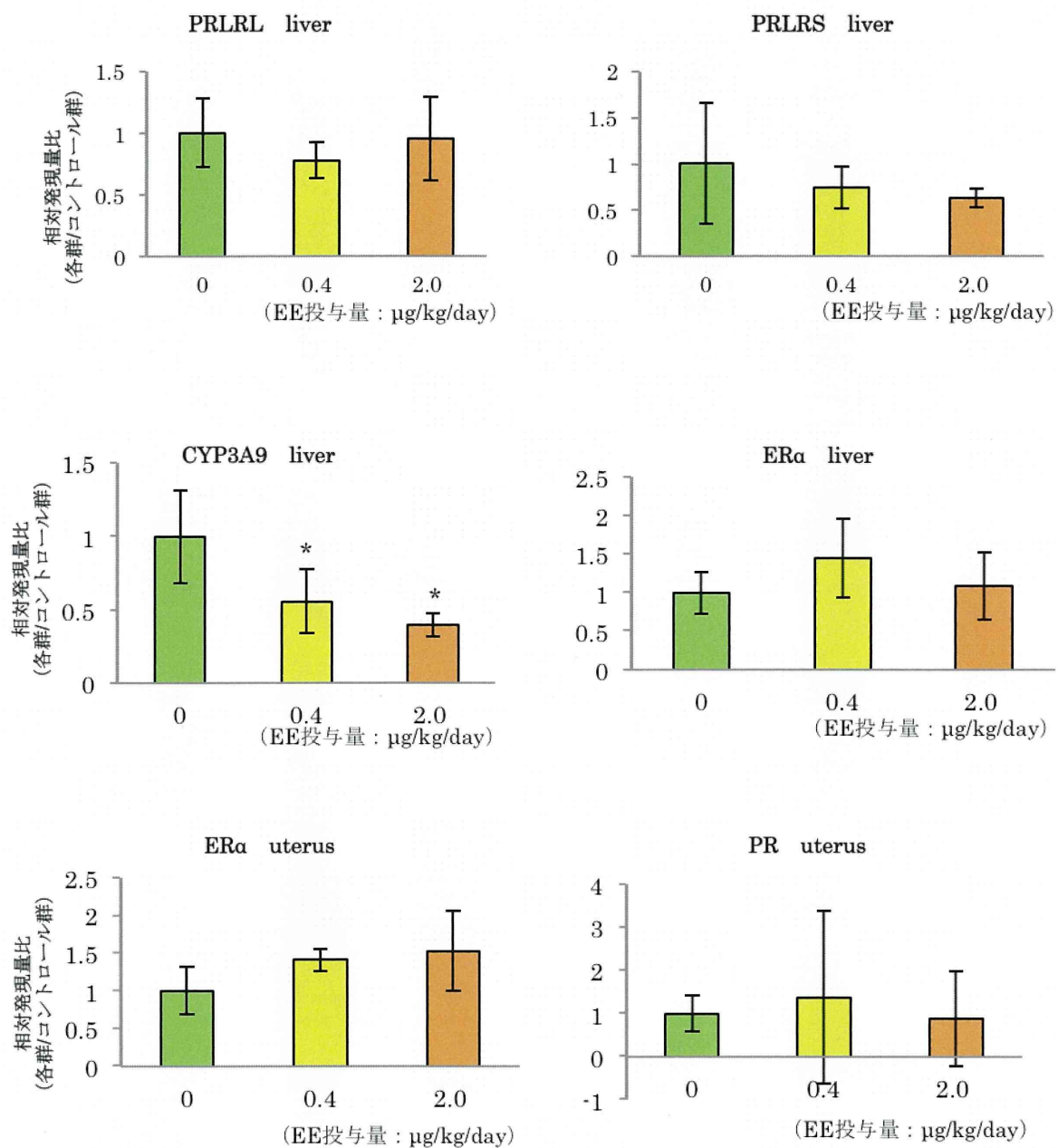


図 4

1日齢から5日間EEを0、0.4または2μg/kg反復経口投与した動物の最終剖検(22-23週齢)で得られた肝臓におけるプロラクチン受容体ロングフォーム(PRLRL)、プロラクチン受容体ショートフォーム(PRLRS)、CYP3A9、エストロゲンα受容体(ERα)ならびに子宮におけるERαおよびプロジェステロン受容体(PR)遺伝子のリアルタイムPCRによる定量解析結果

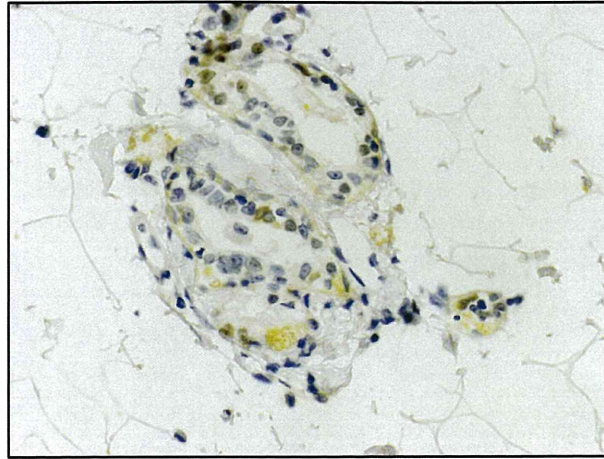


図 5

EE 投与群の最終解剖で過形成の認められた乳腺におけるリン酸化 STAT5 の免疫組織化学像。腺胞上皮細胞に褐色の陽性反応が認められる。写真は 1 日齢から 5 日間 EE を 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  反復経口投与した動物の最終剖検 (22-23 週齢) で得られた乳腺組織。

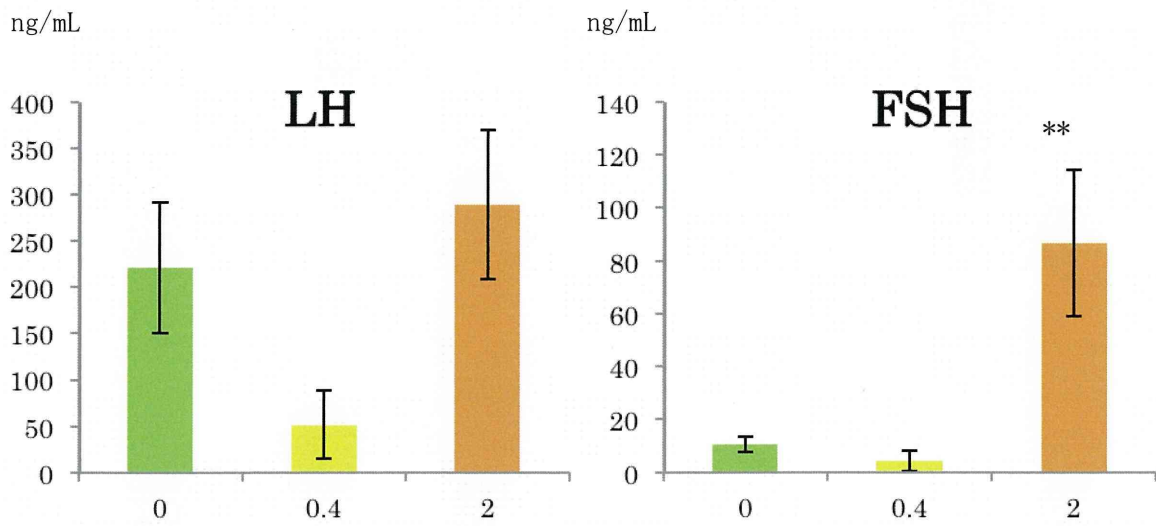


図 6

1日齢から5日間EEを0、0.4または2 μg/kg反復経口投与した動物の最終剖検(22-23週齢)で得られた血清中LHおよびFSH濃度

\*\*p<0.01

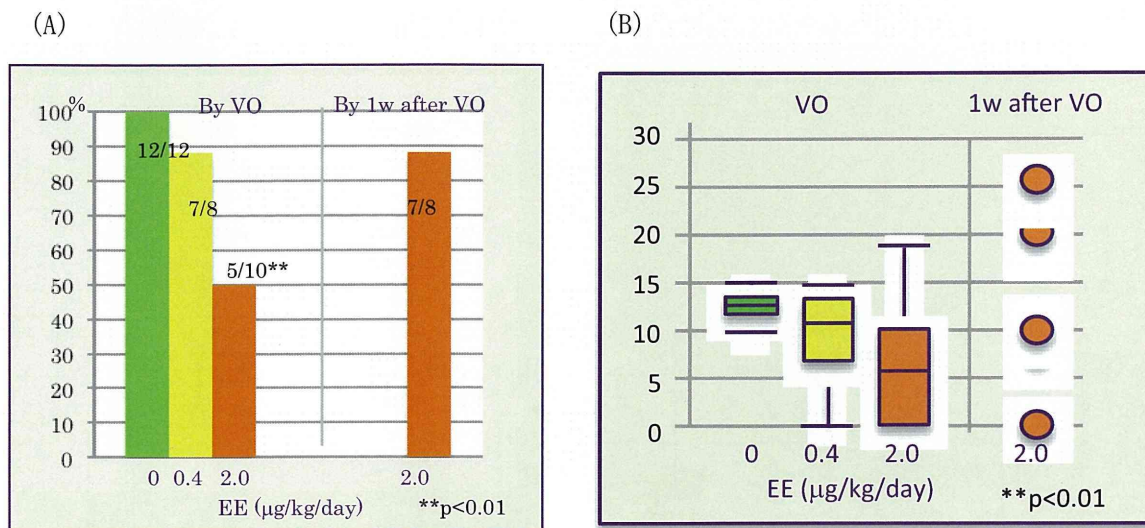


図 6  
1日齢から5日間EEを0、0.4または2 μg/kg 反復経口投与した動物の膣開口日ならびに膣開口1週間後までの排卵率(A)および黄体数 (B)

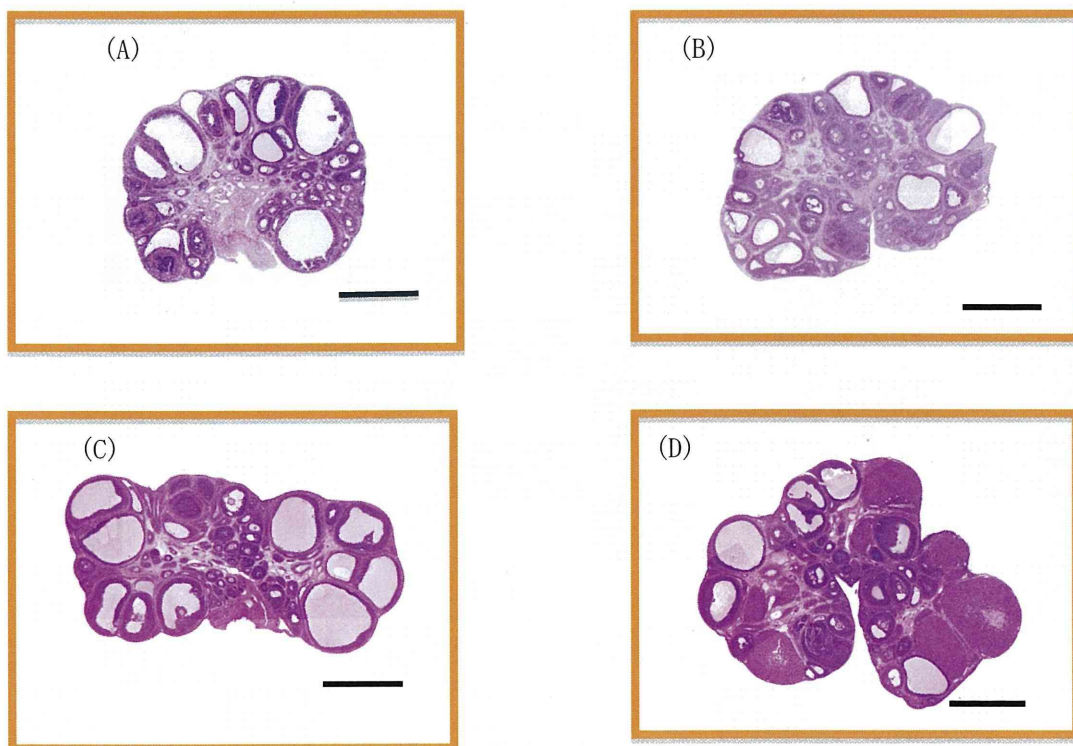


図 7  
1日齢から5日間EEを2 μg/kg 反復経口投与した動物の膣開口日(A、B)ならびに膣開口1週間後 (C、D) の卵巢組織 (HE)。AおよびCに黄体は認められない。Bars=1mm

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： 出生直後のエチニールエストロジェン投与が、雌ラットの春機発動初期  
の生殖内分泌機能に与える影響

研究分担者： 渡辺 元 東京農工大学大学院農学研究院 動物生命科学部門 教授

研究協力者： 岡崎 祥子 東京農工大学

研究協力者： 野澤 香織 東京農工大学

研究要旨

本研究では、化学物質を脳の性分化臨界期に投与した影響が、性成熟後に遅れて現れてくる「遅発性影響」の機序の一端を解明するため、エストロジェン作用を持つ化学物質の一つであるエチニール・エストロジェン (EE) をモデル薬物として用いた。投与時期は、ラットの脳の性分化における臨界期のほぼ中央であると考えられる出生第 1 日に、単回皮下投与した。性成熟過程に見られる影響を明らかにすることを目的とし、性成熟前の 10 日齢から 20 日齢における性腺刺激ホルモンの分泌変化に着目し、生殖器への影響も観察した。さらに遅発性影響の指標を検索すること、ならびに遅発性影響の用量反応性を検証することを目的とし、春機発動の指標として膻開口日の調査、雌性生殖機能の指標として発情周期の推移を膻スメア法を用いて観察した。また、生殖中枢の性分化について確認するために、生後・・月齢で卵巣を摘出し、エストラジオール (E2) を投与して LH 分泌に対する効果を調べ、併せて脳の性的二型核 (SDN・POA) について観察した。

その結果、15 日齢、20 日齢において、EE の用量に依存した卵巣重量、子宮重量の減少が認められた。卵巣組織観察像では、EE の用量に依存した卵巣のサイズ減少、ならびに胞状卵胞の減少が認められた。子宮組織観察像においても、EE の用量に依存した子宮内膜上皮細胞の発育不全が認められた。生殖関連ホルモンの結果では、卵巣中インヒビン含有量が EE の用量に依存して減少傾向を示した。その結果として FSH 分泌が EE の用量に比例して増加したことが示唆された。下垂体中 LH 含有量では、EE 用量に依存して増加傾向が認められ、卵巣所見および子宮所見と合わせて考えると、エストロジェンによる負のフィードバックの減少が示唆された。以上より、ラットの脳の性分化臨界期における EE 投与は、EE の用量に依存して卵巣および子宮発育を抑制することが明らかとなった。性成熟以後の発情周期の観察結果より、EE20-200 $\mu$ g/kg の用量において遅発性影響が引き起こされることが明らかとなった。対照群と比較して、EE の用量に依存した春機発動の早期化ならびに早期発情周期異常が認められた。卵巣摘出+E2 投与により対照群では LH のサージ状分泌が観察されたが、EE 投与群では LH サージが誘起されないあるいは減少する傾向が認められた。また、SDN・POA の大きさについても雄性化傾向が認められた。性中枢の部分的、あ

るいは不完全な雄性化が生じたか、あるいは生殖機能の早期老化が推察された。

## A. 研究目的

現在、遅発性影響を示す個体における性成熟前過程における影響、および遅発性影響のメカニズムを調べた報告はなく、早急な機序解明およびリスク評価系の確立が望まれる (吉田、2011)。

過去にはエストロゲン作用を示す物質で用量依存的に性成熟後の発情周期の継続期間が変化したという報告がある (Katsuda, et al., 2000)。そこで本研究では、低濃度から高濃度の様々な用量を用いて、化学物質に対し著しく感受性の高い臨界期において、エチニルエストラジオールをモデル物質として単回投与を行い、遅発性影響を引き起こされるための条件の検討を行った。さらに、遅発性影響の機序解明および早期指標確立を目指して、性成熟過程に認められる影響を明らかにすること、ならびに遅発性影響の指標を検索することを目的とした。

## B. 研究方法

### 供試動物

供試動物に PND 0 (PND=出生後日齢) の新生子雌ラット (Wistar-Imamichi) を用いた。飼育環境は、14 時間明期 (5:00h-19:00h)、10 時間暗期の照明条件、室温  $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 20\%$  の条件下で飼育した。PND 21 で離乳後、餌 (日本農産工業アニマル、神奈川、日本) と水は自由摂取とした。

新生子ラットを得るまでの手順

Wistar-Imamichi 経産ラットを 32 匹購入し、1 つのプラスチックケージ (日本クレア、大阪、日本) につき 4 匹ずつ、8 ケージに分けて飼育した。

入荷した当日から毎日午前中に膣スメアを観察した。膣スメア観察 3 日目から 5

日目の間に、発情前期が観察された個体は 1 匹ずつケージに分け、交配経験のある雄 Wistar-Imamichi ラットと一晩同居させた。雄と同居させた次の朝、膣スメア中に精子の有無を確認した。妊娠予定日前日まで再び雌ラットを 4 匹ずつ同居させた。

妊娠 11 日目から 15 日目頃の連続 4 日間、偽妊娠でないか確認するために膣スメアを採取した。交配日から 18 日後、24 匹の妊娠ラットを 1 ケージに 1 匹ずつ分け、飼育した。

### 雌雄判別と個体識別

PND 0 に、F1 の肛門から陰核あるいは陰茎までの距離により雌雄判別を行った。1 匹の母ラットにつき雌産子が 5~8 匹となるように雌産子数を調節後、総哺乳子数が 9 匹になるよう調節した。この 9 匹の産子は、体重測定を行い、背中に油性インキで書いた通し番号により個体識別をした。PND4 以降は焼烙痕によるマーキングを行い、再度個体識別をし直した。

### 体重測定

$17\alpha$ -Ethinylestradiol (EE, Sigma E4876, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) 投与後 PND 20 までは 5 日おき (PND 0、5、10、15、20) に、PND 24 以降は 1 週間おき (PND 24、31、38……253) に体重を測定した。

### 試薬作製方法

EE を 5 段階濃度で作製した。EE  $2,000 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群用の試薬は EE 10.0mg を 10ml のゴマ油 (非焙煎、和光純薬工業、大阪、日本) で、一晩  $60^{\circ}\text{C}$  にて加温溶解した。EE  $200 \mu\text{g}/\text{kg}$  投与群用の試薬は EE 10.3mg を 100ml のゴマ油で、一晩  $60^{\circ}\text{C}$  にて加温溶解した。その他 EE  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、EE  $2.0 \mu\text{g}/\text{kg}$  および



EE0.2  $\mu$ g/kg 投与群用の試薬は EE200  $\mu$ g/kg をゴマ油で 10 倍希釈を 3 段階行い、作製した。

### 供試動物への投与方法

PND 0 に EE をハミルトンシリンジを用いて、雌産子の腰部皮下に 1 回投与し、母ラットに戻した。対照群にはゴマ油のみ投与した。EE の投与量により下記 6 群を設定した。いずれの群も雌産子 5~8 匹を 1 つのグループとした。

### 実験群

I 群: 対照群 (ゴマ油: 10  $\mu$ g/kg, n=27, 計 4 グループ)

II 群: EE0.2  $\mu$ g/kg 群 (EE : 0.001  $\mu$ g/10  $\mu$ l, n=19, 計 3 グループ)

III 群: EE2.0  $\mu$ g/kg 群 (EE : 0.01  $\mu$ g/10  $\mu$ l, n=23, 計 3 グループ)

IV 群: EE20  $\mu$ g/kg 群 (EE : 0.1  $\mu$ g/10  $\mu$ l, n=19, 計 3 グループ)

V 群: EE200  $\mu$ g/kg 群 (EE : 1  $\mu$ g/10  $\mu$ l, n=24, 計 4 グループ)

VI 群: EE2000  $\mu$ g/kg (EE : 10  $\mu$ g/10  $\mu$ l, n=24, 計 4 グループ)

これらのうち、性成熟過程の検索においては PND10、15、20 の 3 期に I~VI 群の各 1 グループずつを、性成熟後の検索においては、I、V、VI 群の各 1 グループずつ用いた。

性成熟過程の性腺刺激ホルモン分泌と性腺の発育に与える新生子期 EE 処置の影響

### サンプル採取手順

PND10、15、20 で体重測定後、断頭によりカップに各ラットの末梢血を採取した。採取した血液を約 5000G で遠心し、血清を分離して -20  $^{\circ}$ C で測定まで保存した。子宮、卵巣、副腎、腎臓、肝臓は採取後、重量を測定した。下垂体前葉および左側卵巣は採取後、氷上で保冷した生理食塩

水 0.5 ml に浸漬し、速やかに -20  $^{\circ}$ C で保存した。子宮および右側卵巣はリン酸緩衝 4% パラフォルムアルデヒドで固定した。

### 各種ホルモン濃度の測定

採取した雌ラットの血中黄体形成ホルモン (LH) およびインヒビンを測定するために、微小試験管 (Micro tube for micro sedimentation, SARSTEDT, N ümbrecht, Germany) を用いて、微量測定が可能なラジオイムノアッセイ (RIA) 法を開発し測定した。

### インヒビンの RIA

血清中の inibin 測定には、当研究室で開発した bovine inibin のラジオイムノアッセイ系 (Hamada et al., 1996) を用いて検討した。標準物質として、ウシ卵胞液を抗ウシインヒビンモノクローナル抗体カラムを用いて部分精製したウシ 32kDa インヒビン、標識抗原に、クロラミン T 法によって <sup>125</sup>I で標識したウシインヒビン (32kDa)、第一抗体に、ウサギに免疫して得られた抗ウシインヒビン血清 (TNDH-1) を使用した。第二抗体として、東京農工大学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギグロブリンヤギ血清 (#42-99318 1:40) を使用した。

### LH および卵胞刺激ホルモン (FSH) の RIA

末梢血中あるいは下垂体中の LH、FSH 濃度は、アメリカ National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット FSH および LH の RIA キットを用いて測定した。第一抗体は、anti-rat FSH S-11 および anti-rat LH S-10 を用いた。標識抗原には rat FSH-I-5 および LH-I-5 を用い、クロラミン T 法により <sup>125</sup>I で標識して使用した。標準物質には rat FSH-RP-1 および rat LH-RP-1 を用いた。第二抗体については、ラット FSH および LH とともに東京農工大

学農学部獣医生理学研究室で作製した抗ウサギ  $\gamma$  グロブリンヤギ血清 (#42-99318 1:40) を使用した。

### 下垂体および卵巣のホモジナイズ

生理食塩水 0.5ml を含むチューブ中に  $-20^{\circ}\text{C}$  で冷凍した下垂体、卵巣を、 $4^{\circ}\text{C}$  で解凍した。その後、カッター型破砕機 (ヒストコロン、日音医理科機械、千葉、日本) を用い、氷冷下で 30~70 秒間、チューブを上下させながら組織が完全に破砕されるまで破砕を行った。さらに超音波ホモジナイザー (TOMY、東京、日本) で 1 秒間の処理を 2 度行った。破砕したサンプルは  $4^{\circ}\text{C}$ 、20,800G で 30 分間遠心し、上清を採取した。上清はホルモン測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 組織のパラフィン切片標本の作製

固定から包埋まで

組織の固定から包埋までの操作手順を、図に示した。採取した子宮および左側卵巣を 4% パラフォルムアルデヒド液に室温で一晩浸漬後、70% エタノールに室温で保存した。その後、室温でアルコール脱水系列を用いて脱水、キシレンにて 3 回各 20 分間透徹、 $62^{\circ}\text{C}$  のパラフィンに 3 回各 60 分間浸漬し、パラフィンに包埋した。今回包埋は国立医薬品食品衛生研究所に依頼した。

薄切

包埋した子宮は、滑走式マイクロトーム (大和光機工業、埼玉、日本) を用い、3~6  $\mu\text{m}$  で薄切し、スライドガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) に載せ、一晩  $37^{\circ}\text{C}$  で伸展、乾燥させた。包埋した卵巣は、回転式マイクロトーム (大和光機工業、埼玉、日本) を用い、10  $\mu\text{m}$  で薄切し、スライドガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) に載せ、連続切片を作製し、一晩  $37^{\circ}\text{C}$  で伸展、乾燥させた。

染色

染色は常法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行った。カラッチ・ヘマトキシリン (武藤化学薬品株式会社、東京、日本) と 1% エオジン Y 液 (武藤化学薬品株式会社、東京、日本) を使用し、染色後は、封入剤 mount quick (コスモバイオ、東京、日本) を用いて封入した。

### 組織学的検索

子宮組織の観察

採材した子宮を用い、エストロジェン活性の指標として子宮内膜上皮細胞の高さを観察した。

### 卵巣組織の観察

各個体の左側卵巣を用い、胞状卵胞に注目して観察した。各卵胞は、卵の核が見られたところで、長径と短径を測定し、その平均値をその卵胞の大きさとした。卵胞の分類は、Torden らの報告 (1968) を参考に、胞状卵胞は卵胞腔が形成されているものとした (日本獣医解剖学会、2005; 岩永敏彦、2003)。

### 画像撮影

HE 染色を施したものは、光学顕微鏡 BX-50 (OLYMPUS) に接続した DP-25 (OLYMPUS) により撮影し、cellsens (OLYMPUS) でスケールバーを挿入した。

性成熟後の発情周期に与える新生子期 EE 処置の影響

### 春機発動開始と発情周期追跡

各群のラットに対して PND 21 の離乳後毎日、春機発動の指標である膣開口の有無を確認した。膣開口確認後、毎日膣スメアを観察し、発情周期を判定した。

### 膣スメア法

2000 倍希釈をしたオスバン液を用いて、膣スメアを採取した。ステージの分類は、

休止期は、上皮細胞の数が減り白血球があるもの、発情前期は、有核で円形の上皮細胞と角化細胞が存在し白血球がないもの、発情期は、不整で核がない角化上皮細胞が多くあるものとした (Armenti et al., 2008)。正常周期は、休止期 2 日、発情前期 1 日および発情期 1 日の 4 日間で周期が回帰するものとした。

### 脳の性分化

EE の単回投与により新生雌ラットの脳に性分化の異常が生じている可能性を機能的および形態学的指標を用いて検討した。機能的性分化に対する効果を調べるために、各処置群のラットの卵巣を約 8 ヶ月齢に摘出した。その 2 ヶ月後に、1 mg/ml の濃度にエストラジオール 17 $\beta$  (E2) をごま油に溶解した溶液を含有するシリコンチューブを背部皮下に移植し、正常雌ラットの発情前期レベルの血中 E2 濃度を維持した。E2 投与前 Day0 および翌日 Day1 の 11 時、Day2 の 17 時、Day3 の 11 時に採血し、血漿中 LH 濃度を測定した。

形態学的指標として視索前野性の二型核の大きさを指標にした。処置後の雌ラットの脳を中性緩衝 10%ホルマリン液で乾留固定し脳を取り出した後、30%ショ糖液に浸漬し、クリオスタットにて 50 ミクロンの連続切片を作成した。ニッスル染色法を用いて染色し、視索前野の性的二型核の大きさを比較した。

### 統計処理

統計処理は、Graph Pad Prism5 (San Diego, CA, USA) を用いた。臓器重量の群間平均値、体重の群間平均値および膣開口日の群間平均値の有意差検定には一元配置分散分析 (one way ANOVA) を使用し、各投与群と対照群との有意差検定には Tukey の多重比較検定を用いた。各ホルモン濃度平均値の有意差検定には t tests を用いた。

全ての統計処理に関して、有意水準 5%

以下で有意と判定した。

(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。また、使用する動物の数を最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は東京農工大学動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### C. 研究結果

性成熟過程の性腺刺激ホルモン分泌と性腺の発育に与える新生子期 EE 投与の影響

#### 体重ならびに各臓器重量の変化

図 1 には、体重測定の結果を示した。図 2 ~ 6 には各臓器重量を体重 1g あたりの相対重量として、図 2 には子宮、図 3 には卵巣、図 4 には肝臓、図 5 には腎臓、図 6 には副腎をそれぞれ示した。

#### 体重測定

体重増加には、各処置群で差が認められなかった。

#### 各臓器重量測定

体重 1g あたりの子宮相対重量は、EE の投与量が多いほど低下した。PND 10 では、群間で特に差が見られなかった。しかし PND 15 では対照群の  $0.87 \pm 0.079 \text{mg/g}$  (Mean $\pm$ SEM) と比較し、2,000  $\mu\text{g/kg}$  群は  $0.60 \pm 0.030 \text{mg/g}$  (Mean $\pm$ SEM) と有意な低値を示した。PND 20 でも対照群の  $0.71 \pm 0.029 \text{mg/g}$ 、0.2  $\mu\text{g/kg}$  群の  $0.72 \pm 0.058 \text{mg/g}$ 、2.0  $\mu\text{g/kg}$  群の  $0.66 \pm 0.023 \text{mg/g}$  と比較して、2000  $\mu\text{g/kg}$  群で  $0.48 \pm 0.033 \text{mg/g}$  と有意な低値を示した。体重 1g あたりのお巣相対重量は、EE の投与量が多いほど低下した。PND 10 では、群間に差が見られなかったが、PND 15、20 で顕著な差が認められた。PND 15 では、対照群の  $0.46 \pm 0.059 \text{mg/g}$ 、20  $\mu\text{g/kg}$  群の  $0.39 \pm 0.026 \text{mg/g}$  と比較して、200

μg/kg 群の  $0.20 \pm 0.030 \text{mg/g}$ 、2,000 μg/kg 群  $0.21 \pm 0.013 \text{mg/g}$  と有意な低値を示した。PND 20 では、対照群の  $0.38 \pm 0.031 \text{mg/g}$ 、0.2 μg/kg 群の  $0.36 \pm 0.014 \text{mg/g}$  と比較して、2.0 μg/kg 群の  $0.25 \pm 0.018 \text{mg/g}$ 、20 μg/kg 群の  $0.24 \pm 0.018 \text{mg/g}$ 、2,000 μg/kg 群  $0.24 \pm 0.012 \text{mg/g}$  と有意な低値を示した。

また体重 1g あたりの肝、腎および副腎相対重量は、EE の投与量に依存した変化は認められなかった。

### 内分泌学的変化

血中 LH 濃度、および下垂体前葉中 LH 含有量

図 7 に末梢血液中 LH 濃度、図 8 に下垂体前葉中の LH 含有量の変化を示した。末梢血液中 LH 濃度は、個体間にばらつきが大きく、群間で有意差は認められなかった。下垂体前葉中に含まれる LH 含有量は、PND 15 では対照群の  $0.72 \pm 0.069 \mu\text{g}$  に比較して 0.2μg/kg 群、20μg/kg 群、200μg/kg 群、2,000μg/kg 群で有意差が認められた。0.2μg/kg 群では、 $1.84 \pm 1.05 \mu\text{g}$ 、20μg/kg 群では  $2.52 \pm 0.48 \mu\text{g}$ 、200μg/kg 群では  $3.71 \pm 1.07 \mu\text{g}$ 、2,000μg/kg 群では  $1.12 \pm 0.20 \mu\text{g}$  であった。PND 20 では対照群の  $1.34 \pm 0.21 \mu\text{g}$  に比較して 0.2μg/kg 群、200μg/kg 群、2,000μg/kg 群で有意差が認められた。0.2μg/kg 群では  $1.96 \pm 0.63 \text{ng}$ 、200ng/kg 群では  $4.14 \pm 1.16 \text{ng}$ 、2,000μg/kg 群では  $3.95 \pm 0.92 \mu\text{g}$  であった。

### 下垂体前葉中 FSH 含有量

図 9 に、下垂体前葉中の FSH 含有量の変化を示した。下垂体前葉中に含まれる FSH 含有量は PND 15 では、対照群の  $1.92 \pm 159.9 \mu\text{g}$  と比較し、2.0μg/kg 群は  $1.96 \pm 0.29 \mu\text{g}$ 、2,000μg/kg 群は  $3.01 \pm 0.80 \mu\text{g}$  と有意に高値を示した。一方、PND 20 では、対照群の  $5.60 \pm 1.17 \mu\text{g}$  と比較し、2,000μg/kg 群は  $3.38 \pm 0.41 \mu\text{g}$  と有意に低値を示した。

### 血中インヒビン濃度、および卵巢中インヒビン含有量

図 10 に、末梢血液中インヒビン濃度、図 11 に卵巢中インヒビン含有量の変化を示した。まず末梢血液中インヒビン濃度について、PND10 では、対照群の  $5.29 \pm 0.36 \text{ng/ml}$  と比較して 0.2μg/kg 群、2.0μg/kg 群で有意差が認められた。0.2μg/kg 群では、 $3.86 \pm 0.10 \text{ng/ml}$ 、2.0μg/kg 群では  $3.99 \pm 0.18 \text{ng/ml}$  であった。PND 15 では、対照群の  $6.31 \pm 1.28 \text{ng/ml}$  と比較して、2.0μg/kg 群、20μg/kg 群、200μg/kg 群、2,000μg/kg 群で有意差が認められた。2.0μg/kg 群では  $4.46 \pm 0.42 \text{ng/ml}$ 、20μg/kg 群では  $4.69 \pm 0.41 \text{ng/ml}$ 、200μg/kg 群では  $3.30 \pm 0.23 \text{ng/ml}$ 、2,000μg/kg 群では  $0.64 \pm 0.12 \text{ng/ml}$  であった。PND 20 では、対照群の  $6.03 \pm 0.49 \text{ (ng/ml)}$  と比較して、2.0μg/kg 群では  $8.95 \pm 1.13 \text{ng/ml}$ 、20μg/kg 群では  $4.68 \pm 0.17 \text{ng/ml}$  と有意差が認められた。卵巢中インヒビン含有量について、PND 10 では、対照群の  $6.03 \pm 0.69 \text{ng}$  と比較して 2.0μg/kg 群で  $7.00 \pm 3.06 \text{ng}$  と有意な高値を示した。PND 15 では対照群の  $4.64 \pm 0.42 \text{ng}$  と比較して 2,000μg/kg 群で  $10.60 \pm 8.03 \text{ng}$  と有意差に高値を示した。PND 20 では、対照群の  $18.68 \pm 6.78 \text{ng}$  と比較して、2.0μg/kg 群では  $4.98 \pm 1.80 \text{ng}$ 、20μg/kg 群では  $7.53 \pm 2.17 \text{ng}$  と有意な低値を示した。

### 組織学的変化

子宮の組織学的変化

子宮内膜上皮を観察したところ、PND 10 では顕著な差が認められなかった。PND 20 では、対照群は、子宮内膜上皮細胞が円柱型を示したが、EE2,000μg/kg 投与群で子宮内膜上皮細胞が立方型を示し、子宮内膜上皮の高さが低い傾向が認められた。EE200μg/kg 投与群では対照群と類似した円柱型を示す個体と、EE2,000μg/kg 投与群と類似した立方型を示す個体が認められた (図 12)