

図1：新生仔マウスへのEE (20,000 $\mu$ g/kg) 皮下投与後の脳内EE濃度の推移。

生後24時間以内のマウス新生仔の皮下にEEを投与。<30min は投与後30分以内。1H、4H、12H、24Hは、投与後1時間後、4時間後、12時間後、24時間後。新生仔脳標本1g (12~14 匹分) を1サンプルとして、各群3サンプルの測定結果で示す。24時間後 (24H) は3サンプルとも検出限界以下であった。

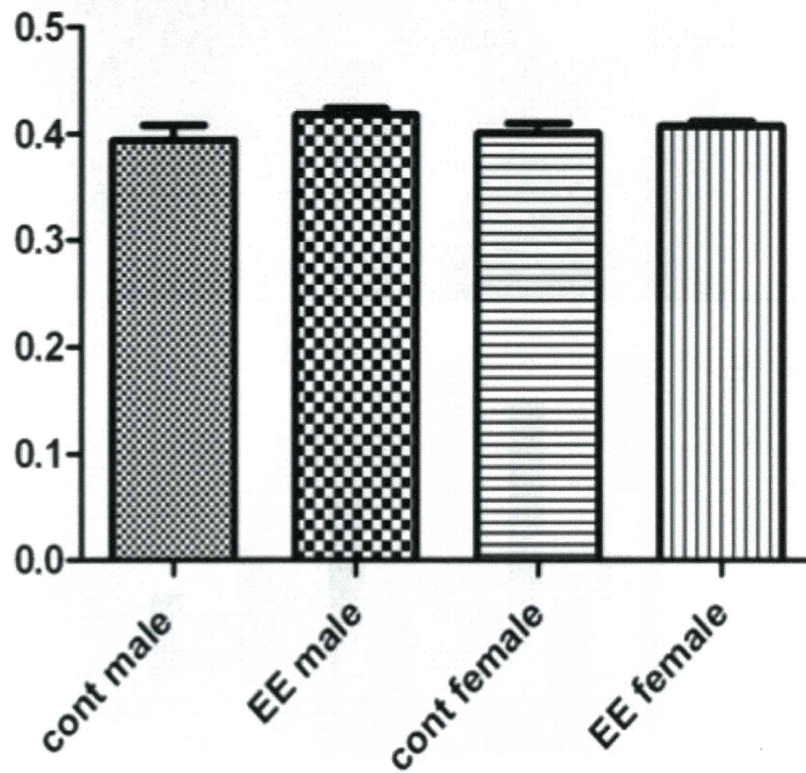
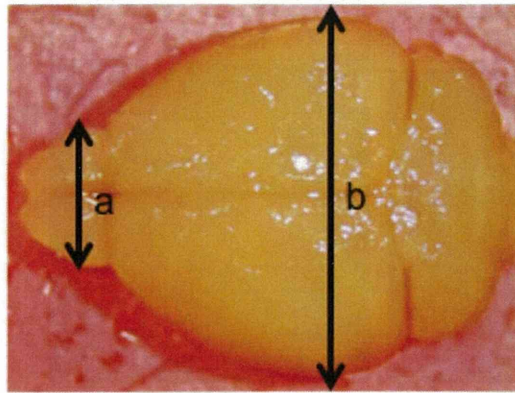


図2：大脳・嗅球比（OBRR）への影響。

生後24時間以内にEE（20,000 $\mu$ g/kg）の投与を受けた生後180日の脳における、大脳の最大幅（b）に対する嗅球の最大幅（a）の割合を算出した。EE投与により有意な変化を認められなかった。

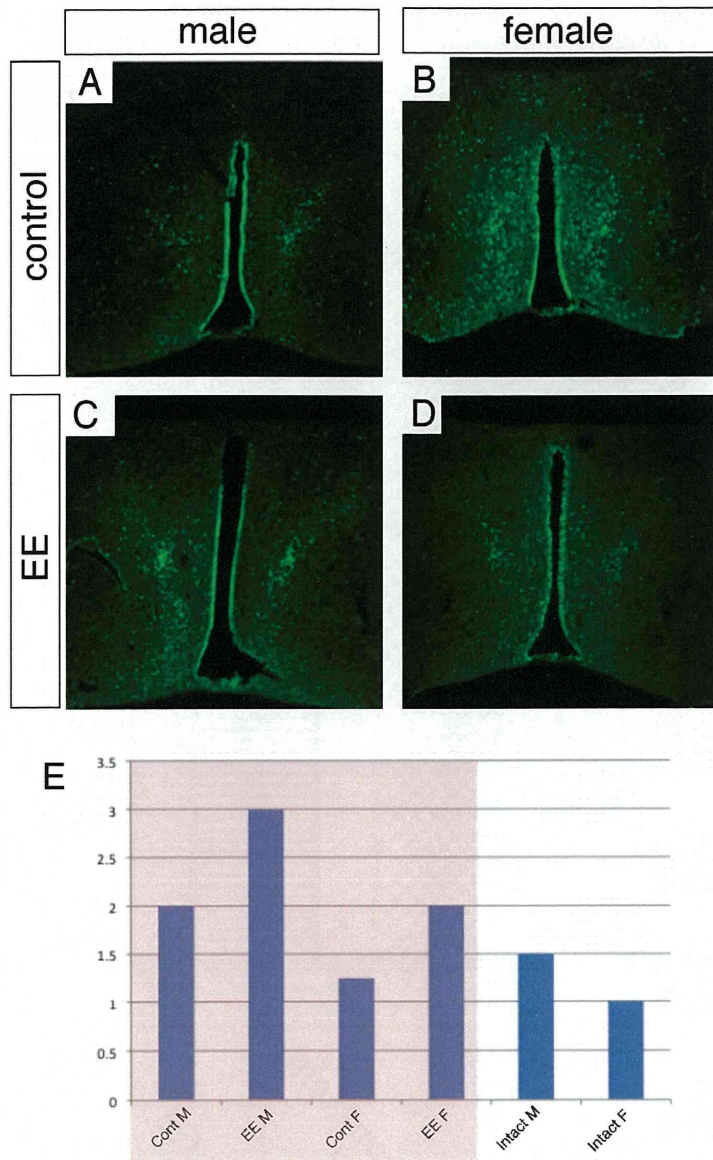


図 3 : 生後24時間以内にEEを20,000 $\mu$ g/kg (EE) あるいはゴマ油 (Cont) を投与された雌雄マウス (生後180日齢) の内側視東前野におけるCalbindon D-28k (CB-28k) 免疫陽性細胞の分布。対照群の雄 (A) では内側視東前核を中心にCB-28k免疫陽性反応細胞が集中して分布する領域が認められる。一方、雌 (B) ではCB-28k陽性細胞の集中した分布は認められない。EE投与群の雌雄を比較してみると、雄 (C) では対照群と同様あるいはそれ以上にMPNを中心としたCB-28k免疫陽性反応細胞の集中分布が認められた。雌 (D) において対照群では認められないMPNにおけるCB-28k免疫陽性反応細胞の集中分布を認める個体が認められた。

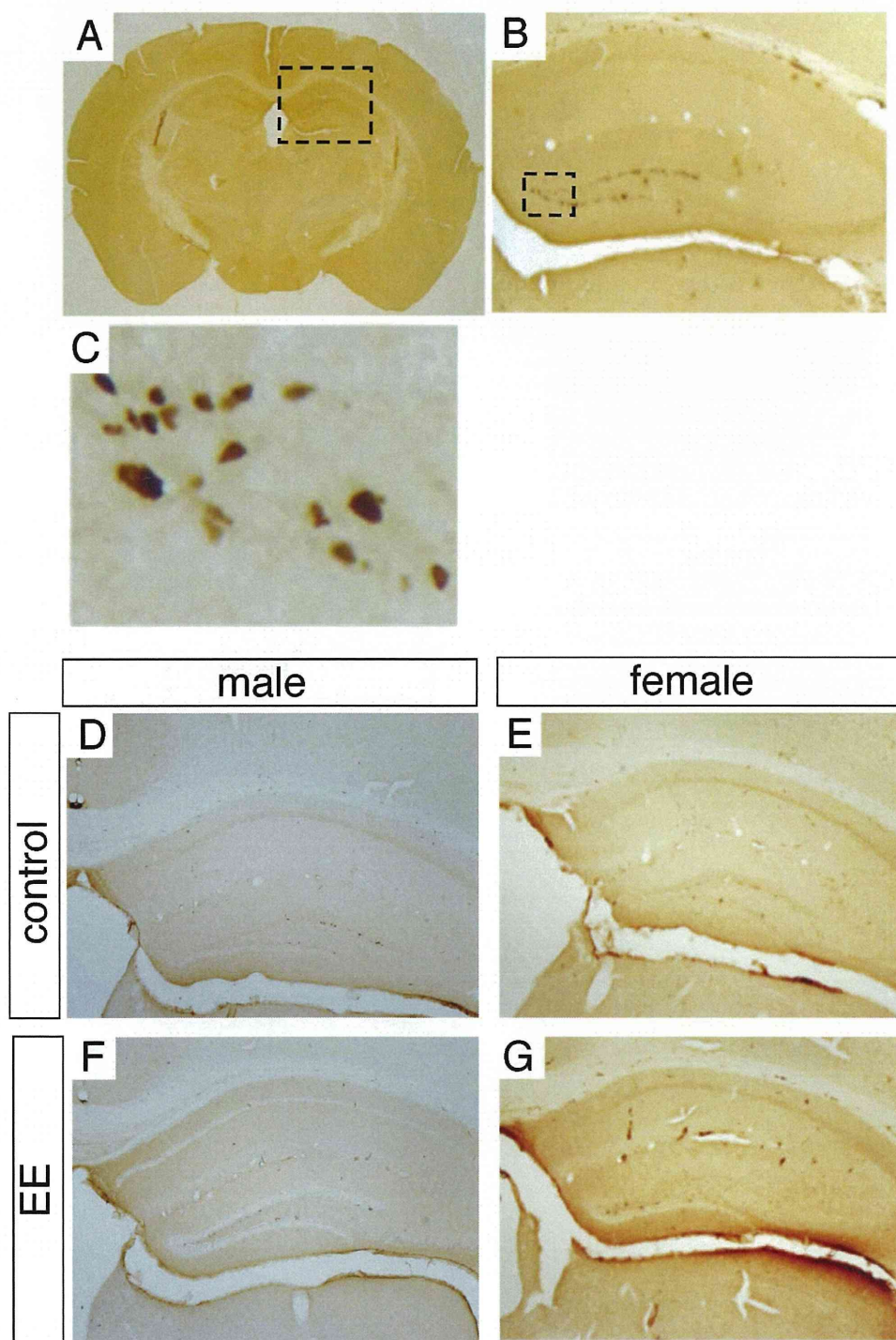


図4：生後24時間以内にEthinylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg)あるいは対象群(ゴマ油)を投与した雌雄マウス(生後180日齢)の海馬歯状回におけるBrdU取り込み細胞。



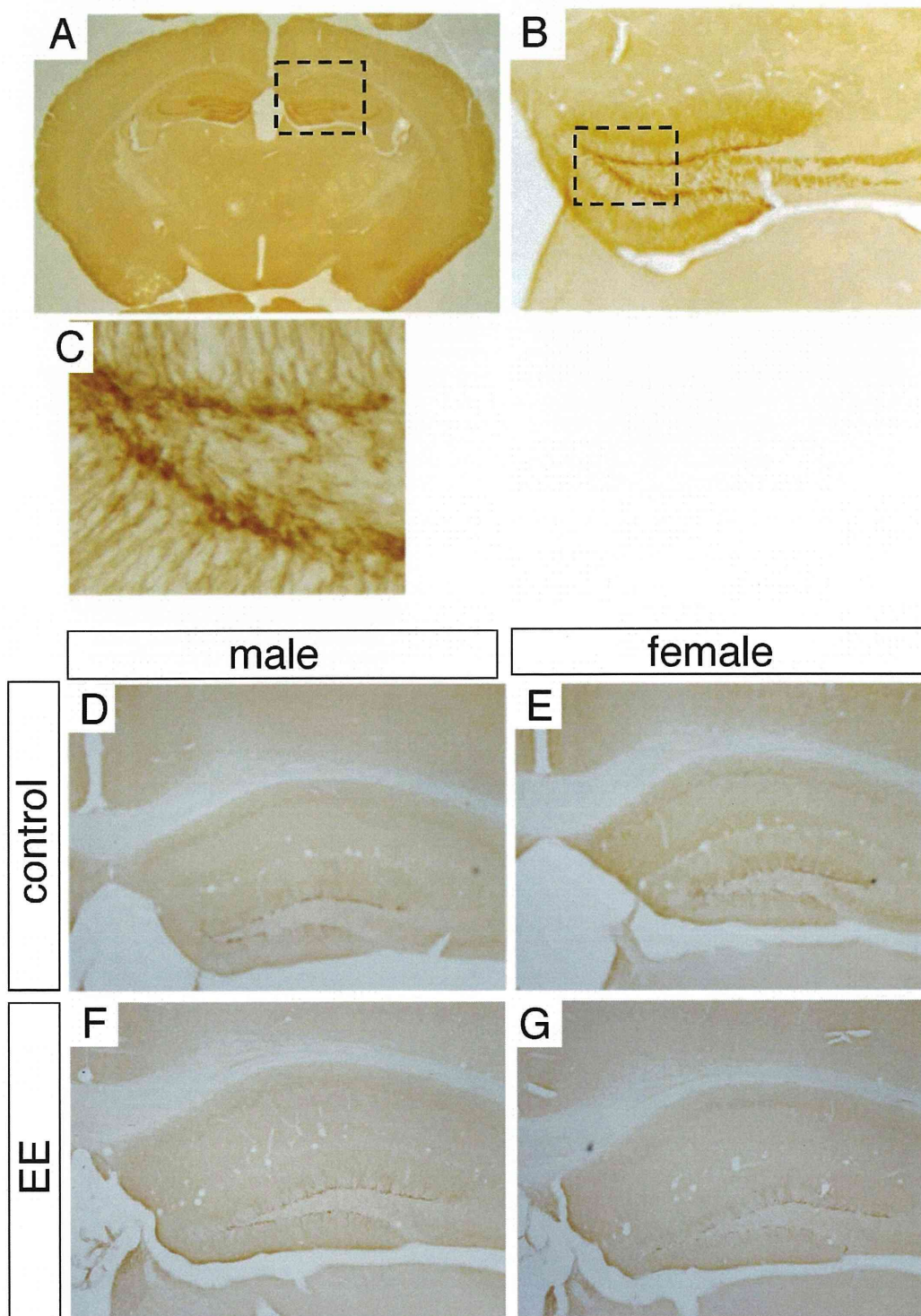


図5：生後24時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後180日齢) の海馬歯状回における Duplecortin 免疫陽性細胞の分布。前頭断方向で50 $\mu$ m厚の連続切片を作製した。一次抗体の染色は VECTASTAIN キット (Vecta 社) を用いた DAB 発色によって行った。

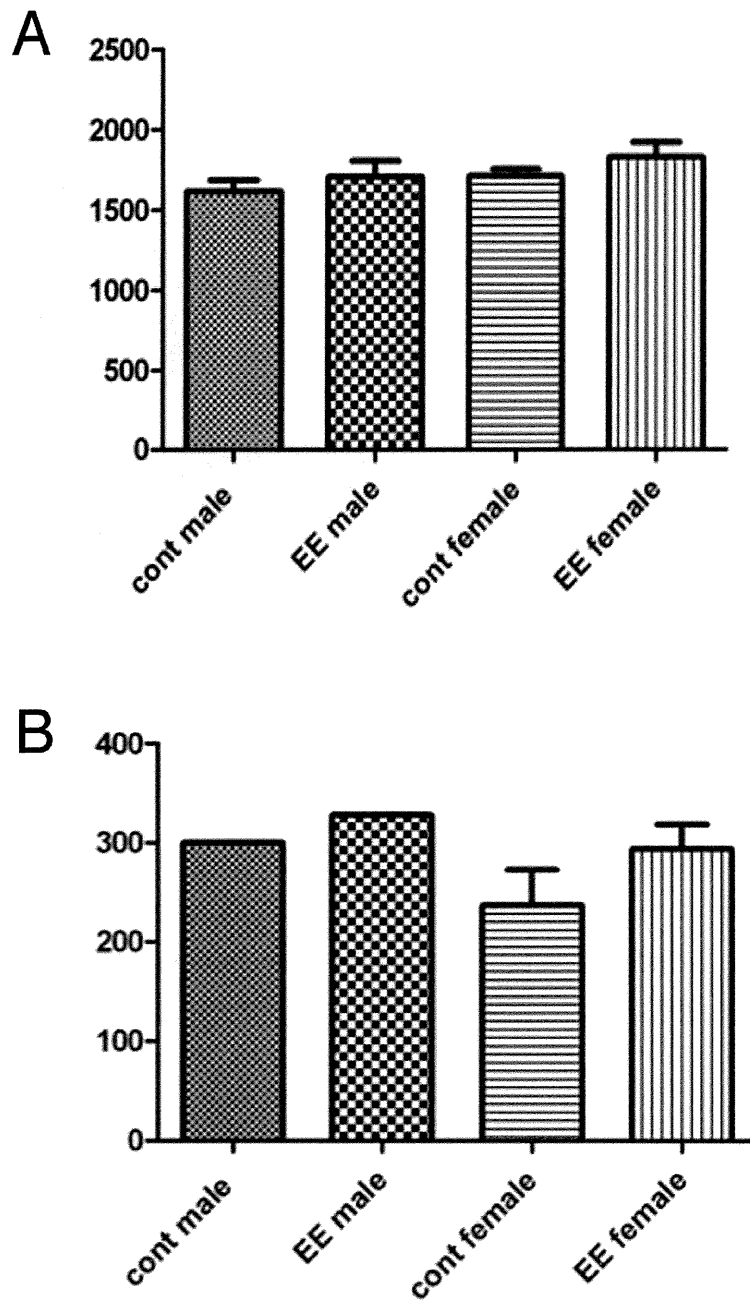


図6：生後24時間以内にEthinylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg)あるいは対象群(ゴマ油)を投与した雌雄マウス(生後180日齢)の海馬歯状回におけるBrdU取り込み細胞数(A)とDuplecortin免疫陽性細胞数(B)。処理群の間に有意な差は認められなかった。Cont male: 対照群の雄、Cont female: 対照群の雌、EE male: EE投与の雄、EE female: EE投与の雌

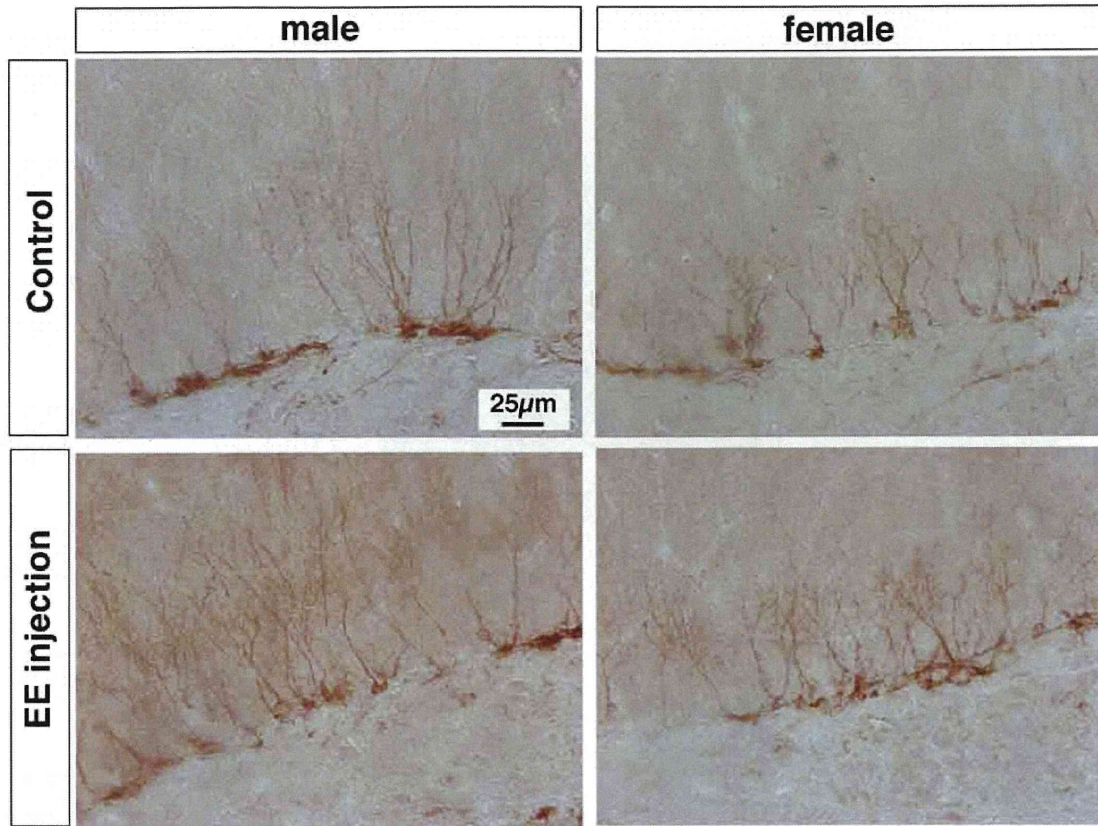


図 7 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後 180 日齢) の海馬歯状回における Dab1 免疫陽性細胞の樹状突起の比較。一次抗体の染色は VECTASTAIN キット (Vecta 社) を用いた DAB 発色によって行った。樹状突起の形態は群間で顕著な差は認められなかった。



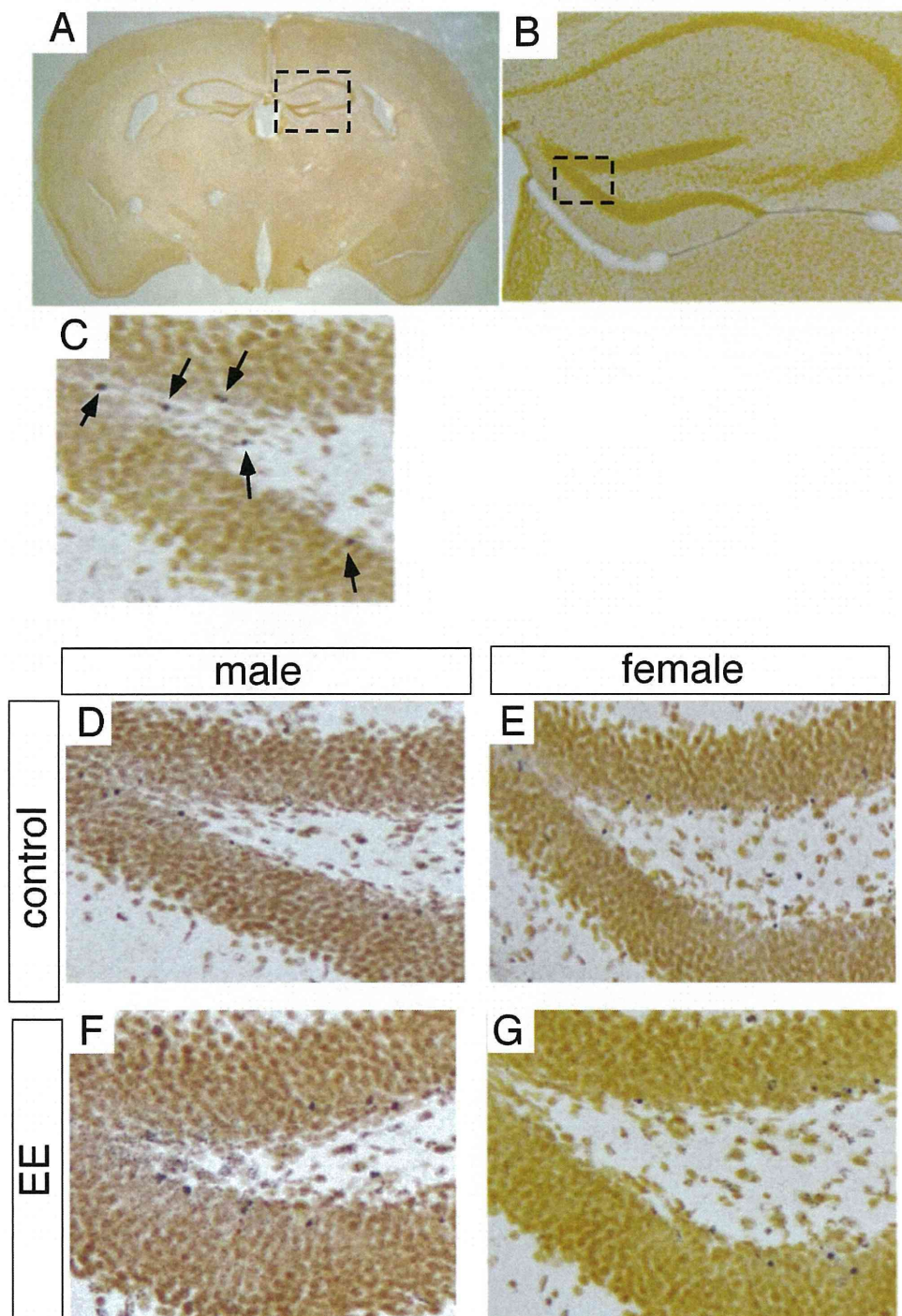


図 8 : 生後 24 時間以内に Ethynylestradiol (EE 20,000 $\mu$ g/kg) あるいは対象群 (ゴマ油) を投与した雌雄マウス (生後 180 日齢) の海馬歯状回における銀染色陽性細胞の分布。前頭断方向で 50 $\mu$ m 厚の連続切片を作製した。染色は FD NeuroSilver Kit II (FD NeuroTechnologies 社) を用いて行った。写真 C の矢印は銀染色による陽性細胞を示す。



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： 化学物質およびホルモンの臨界期曝露による神経内分泌系への遅発型影  
響に対する神経行動学的アプローチ

研究分担者： 川口真以子 学校法人明治大学 農学部農学科 動物環境学研究室  
研究協力者： 平野顕宏 学校法人明治大学 農学部農学科 動物環境学研究室

研究要旨

本研究は臨界期にエストロゲン様物質(EDs)を曝露し、行動神経内分泌学的変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とする。本年度は行動学的解析により遅発型影響を明らかにすることを旨とし、EDsのひとつである17 $\alpha$ -ethinylestradiolの臨界期における低濃度曝露は学習能力を低下させ卵巣摘出後の不安行動を増加させる一方、高濃度曝露および陽性対照の17 $\beta$ -estradiolでは性行動および性選好性に有意な影響を及ぼすこと、活動量・摂食行動・体重へはいずれの暴露も影響を及ぼさないことを明らかとした。

A. 研究目的

エストロゲンは脳に構造的、機能的な変化を引き起こすことが知られ、その作用は形成的作用と機能的作用とに分けられると考えられている(図1)。エストロゲンの形成的作用は出生前後の一時期におこる不可逆的なもので、未発達で可塑性に富んだ神経組織に作用して神経細胞の形態や神経回路を固定化する(1, 2)。従って、この時期にエストロゲン様作用をもつ化学物質(EDs)に曝露されると、正常な脳の分化が阻害される場合がある(3, 4)。一方、機能的作用は神経細胞や神経回路の活動を賦活するもので、可逆的である。多くの場合、形成的作用がホルモンによって引き起こされる神経機構に対し、発達後に機能的作用が認められる。エストロゲンが作用する神経機構は、生殖、摂食、情動、高次機能と多岐にわたり(図2)、その多くは遅発型影響である(5, 6)。しかし発達期EDs曝露が引き起こす神経機構への遅発型影響の機序

は一部しか解明されていない。

そこで本研究では発達期にEDsを曝露し、行動変化および神経内分泌系の変異を検討することで遅発型影響の機序解明と早期指標を確立することを目的とした。本年度は機序解明につながる陽性対象との比較を追加し、繁殖行動を含んだ行動学的解析による遅発型影響の確立を目指した。

B. 研究方法

生後24時間以内のWistar-Imamichi(WI)系雌ラットに、ごま油に溶解した17 $\alpha$ -ethinylestradiol(EE, Sigma Aldrich, USA) 20 $\mu$ g/kg(lowEE)、2mg/kg(highEE)、陽性対照として17 $\beta$ -estradiol(E2, Sigma Aldrich, USA) 20mg/kg、あるいはごま油(oil)を皮下投与した。あるいは生後24時間以内のSprague-Dawley(SD)系雌雄ラットに、ごま油に溶解した2 $\mu$ g/kg(lowEE)、8mg/kg(highEE)EEを投与した。その際、一腹あたり8匹ずつになるよう調整した。

生後 21 日齢で離乳させた後、行動神経内分泌学的解析のため、以下の実験に供した。

＜性行動試験＞卵巣摘出 (OVX) し Estradiol Benzoate (EB) 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  および Progesterone (P) 500  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  を投与して発情状態とした 13~15 週齢 WI 雌ラット：予め動物を慣らした透明アクリル製装置 (40 cm $\times$ 29 cm $\times$ 30 cm) 内でテスト雌ラットと相手雄ラットを 20 分間同居させ、雄の交尾行動であるマウントの回数に対する雌の受容性を示すロードーシス反応の割合であるロードーシス商を測定した。相手雄ラットは 13~15 週齢の WI ラットを用い、事前に性行動を 3 回練習させた。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手雄との組み合わせは 1 回目と 2 回目で変えた。

＜性選好性試験＞OVX し EB 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  および P 500  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  を投与して発情状態とした 13~15 週齢 WI 雌ラット：ステンレス製格子等で 3 部屋に区切られた黒色塩化ビニル製 3 チャンバーケージ (40 cm $\times$ 70 cm $\times$ 40 cm、図 3) に予め動物を慣らし、雄あるいは発情雌への接近回数・接近時間を 5 分間測定した。相手雄ラットは 13~15 週齢の WI ラットを用い、事前に性行動を 3 回練習させた。相手雌ラットは OVX し EB 5  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  および P 500  $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$  を投与して発情状態とした。実験は 1 週間間隔で 2 回検討し、相手ラットの組み合わせは 1 回目と 2 回目で変えた。

＜オープンフィールド試験＞6 週齢 WI 雌ラット：塩化ビニル製四角オープンフィールド (40 cm $\times$ 70 cm $\times$ 40 cm、図 4) にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 (Noldus) を用いて総移動距離、平均移動速度、中央滞在時間を測定した。

＜高架十字試験＞卵巣摘出済み 15~16 週齢 WI 雌ラット：壁のないオープンアームと壁のあるクローズドアームからなる高架十字 (図 5) の中央部にラットを入れ、5 分間の行動を上部から撮影した後、画像解析ソフト Ethovision XT8 を用いてオープンア

ームへの侵入回数・滞在時間を指標に探索・不安行動について測定した。

＜受動回避学習試験＞4 週齢 SD 雌雄ラット、8 週齢 WI 雌ラット：受動回避学習試験装置 (PA-3001; 小原医科産業株式会社、図 6) を用い、嫌悪刺激の 24 時間後における学習成績について検討した。

＜摂食量測定＞卵巣摘出済み 15~16 週齢 WI 雌ラット：Med 社製ペレットフィーダー (図 7) を用い、18:30~16:00 の摂食量について測定した。摂食量測定装置に 5 日間馴化したのち、体重が前日から増加した日の 2 日分のデータを平均して用いた。同時に体重も測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は明治大学農学部動物実験委員会委員および武蔵野大学薬学部動物実験委員会委員の許可の下で行った。行動実験はラットに対し堪え難い程の苦痛を与えないレベルで行った。

## C. 研究結果

＜性行動試験＞生後 24 時間以内の 2 mg/kg EE 投与は陽性対照である E2 と同様に有意に成熟後の WI 雌ラットの性行動を抑制した (図 8、表 2)。

＜性選好性試験＞生後 24 時間以内の 2 mg/kg EE 投与は陽性対照である E2 と同様に有意に成熟後の WI 雌ラットの雄ラットへの選好性を抑制したが (図 9、表 2)、雌ラットへの選好性には影響しなかった (図 10)。

＜オープンフィールド試験＞無処置 6 週齢 WI 雌ラットにおいて、活動量の指標である総移動距離・平均移動速度にはエストロゲン様物質投与は影響を及ぼさなかった (図 11)。しかし探索行動の反映である中央滞在時間は、2 mg/kg EE 投与群で対照群に比べ増加した (図 12、表 2)。

＜高架十字試験＞OVX15~16 週齢 WI 雌ラットでは、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  EE 投与群で対照群に比べ総アーム進入時間に対するオープンアーム滞在時間が有意に低下した (図 13、表

2)。

＜受動回避学習試験＞無処置 4 週齢 SD 雌雄ラットの受動回避学習試験において EE 投与による影響は現れなかった (図 14、表 1)。しかし、無処置 8 週齢 WI 雌ラットの受動回避学習試験の成績は 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  EE 投与により低下した (図 15、表 2)。

＜摂食量測定＞OVX15 週齢 WI 雌ラットにおける摂食量には化学物質曝露の影響は現れなかった (図 16、表 2)。体重においても影響は現れなかった。

#### D. 考察

本実験において陽性対照の E2 曝露が性行動を低下させたことは予想通りであった。というのも、本実験で用いた E2 曝露は、繁殖行動の一部を司る視床下部の性的二型核 SDN-POA の雌における大きさを雄と同じくらいの大きさとする事がわかっているからである (7)。E2 曝露と同様、高濃度 EE 曝露が性行動を低下させたことは、EE も E2 と同様、繁殖行動や性的二型核の大きさに影響を及ぼす可能性を示すが、低濃度 EE 曝露ではその影響が見られないことから、濃度依存的に影響が現れる可能性を示唆している。性選好性についても性行動と同様に E2、高濃度 EE 曝露において影響が現れたが、両者とも雄への選好性は低下したものの雌への選好性には影響が見られなかったことから、本実験での曝露方法では脳の脱雌化が促進される一方、雄化は不完全であることが示された。今後、作用機序を明らかにするため、性行動・性選好性に重要な脳の視索前野と腹内側核の E2 受容体をはじめとした関連タンパク発現について検討する。また、性行動については、雌ラットの誘惑行動などについても解析を行い、化学物質曝露影響の指標として望ましいか否か検討する。

オープンフィールド・高架十字試験については、同じ不安・探索行動の検出系でありながら矛盾した結果が得られているが、この違いは卵巣の有無と週齢、すなわち内

因性エストロゲンあるいはエストロゲン感受性に起因する可能性が高い。今後は OVX±EB 条件下での検討を行うことで、臨界期のエストロゲン様物質の不安・探索行動への影響を明確にする。一方、活動量の指標である総移動距離や平均移動速度には EE 曝露の影響は現れなかった。これは昨年度報告した 4 および 8 週齢 SD 雌ラットの結果と同じであることから、活動量に関しては本実験で用いた EE 曝露では影響を及ぼさないことが示された。

無処置 8 週齢 WI 雌ラットの受動回避学習試験において、本実験における低濃度 EE 曝露が学習能力を低下させた結果は、昨年報告した無処置 8 週齢 SD 雌ラットの結果と一致する (表 1)。そして無処置 4 週齢 SD ラットにおいては影響が検出されなかったことから、受動回避学習試験へのエストロゲン様物質の影響は遅発性である可能性が高い。遅発性に現れる原因としては、性成熟後に開始する卵巣からのエストロゲン分泌やエストロゲンへの脳の感受性の違いが影響している可能性がある。それを明らかにするために、今後は OVX±EB 条件下での検討を試みたい。また、恐怖に基づかない学習試験である新奇物体認知試験および社会性認知試験についても検討し、EE 曝露が影響する脳機能を絞り込む。

摂食行動および体重においては、投与との関連性は明らかにならなかった。摂食行動も脳が制御する性差の見られる行動であるが、本実験の条件では影響を及ぼさないことが示された。

現在、早期指標となり得る母子分離誘発啼鳴反応への臨界期エストロゲン様物質曝露影響について予備実験を進めており、次年度は臨界期 EE 曝露の影響を報告する予定である。

#### E. 結論

高濃度 EE および E2 の臨界期曝露は雌ラットの性行動および性選好性に有意な影響を及ぼす一方、低濃度 EE 曝露は学習能力を



低下させ卵巣摘出後の不安行動を増加させる可能性のあることが示された。また、活動量・摂食行動・体重には本実験で用いた化学物質曝露では影響を及ぼさないことを明らかとした。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

該当なし

### 2. 学会発表

1) Yasuyuki Horii, Itsumi Ozawa, Ryo Ohta, Gen Watanabe, Kazuyoshi Taya, Toshiyuki Himi, and Maiko Kawaguchi

The characteristics of Hatano high- and low-avoidance rats as a model for developmental disorder

8th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (2011年6月2日、名古屋)

2) 堀井康行、小澤愛、丹羽鈴夏、橋倉千聖、平野顕宏、太田亮、渡辺元、田谷一善、氷見敏行、川口真以子

雄性 Hatano 高回避系および低回避系ラットの不安・学習能力と養母交換が及ぼす影響

第 38 回日本神経内分泌学会 (2011 年 11 月 25-26 日、東京)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 参考文献

(1) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and kiss1 in neonatal male and female rats. Cao J, Patisaul HB, *J. Comp. Neurol.*, 2011, Epub ahead of print.

(2) Cellular mechanisms of estradiol-mediated sexual differentiation of the brain., Wright CL, Schwarz JS, Dean SL, et. al., *Trends Endocrinol Metab*, 2010, 21, 553-61.

(3) Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. Golub MS, Wu KL, Kaufman FL, et. al., *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*. 2010, 89, 441-66.

(4) Sexual differentiation of the rodent hypothalamus: hormonal and environmental influences., Negri-Cesi P, Colciago A, Pravettoni A, et.al., *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 2008, 109, 294-9.

(5) Effects of developmental exposure to bisphenol A on brain and behavior in mice., Palanza P, Gioiosa L, vom Saal FS, et. al., *Environ Res*. 2008, 108, 150-7.

(6) Female sexual maturation and reproduction after prepubertal exposure to estrogens and endocrine disrupting chemicals: a review of rodent and human data., Rasier G, Toppari J, Parent AS, et. al., *Mol Cell Endocrinol*. 2006, 254-255, 187-201.

(7) Estrogen Receptor  $\gamma$  Gene Promoter O/B Usage in the Rat Sexually Dimorphic Nucleus of the Preoptic Area., Hamada T and Sakuma Y, *Endocrinology*, 2010, 151(4), 1923-1928.

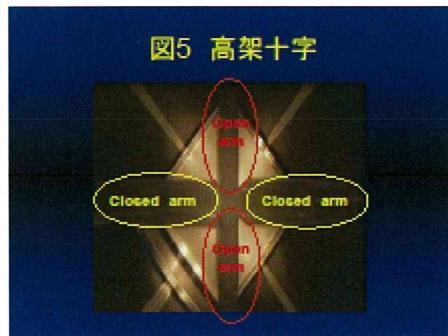


図7 摂食量測定装置



図8 13~15週齢W1雌ラットの性行動試験結果

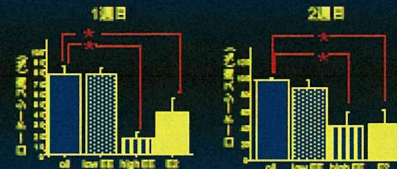


図9 13~15週齢W1雌ラットの雄ラットへの性選好性試験結果

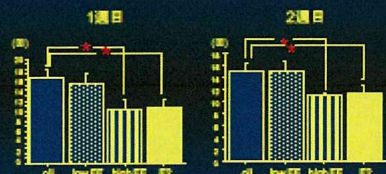


図10 13~15週齢W1雌ラットの雌ラットへの性選好性試験結果

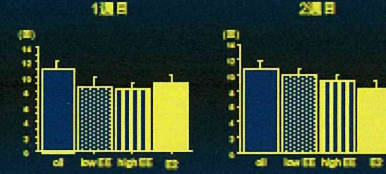


図11 6週齢W1雌ラットのオープンフィールド試験における活動量

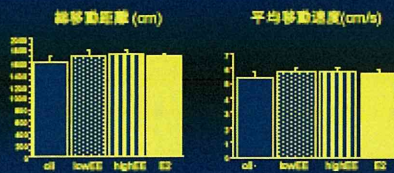
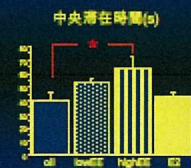
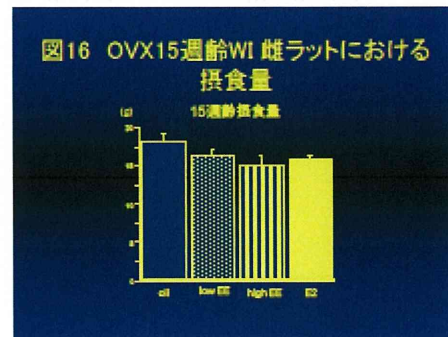
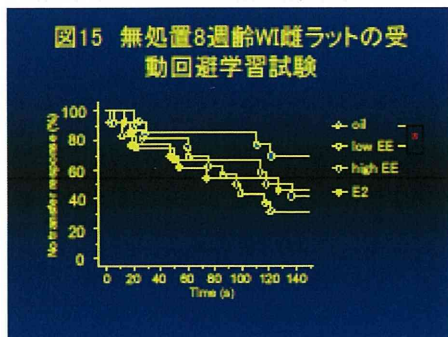
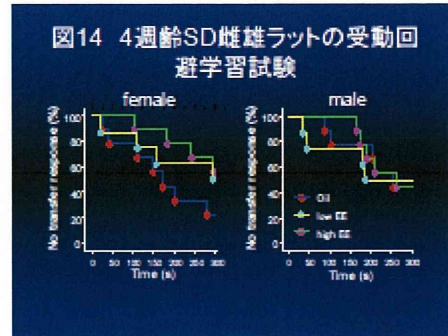
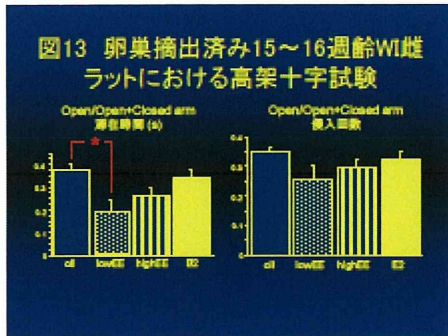


図12 6週齢W1雌ラットのオープンフィールド試験における探索行動







**表1 生後24時間以内のSD系雌雄ラットへの2 ug/kg EE (low EE)、8 mg/kg EE (high EE) 曝露が及ぼす影響 (昨年度報告分を含む)**

試験	処置・年齢	2 ug/kg EE	8 mg/kg EE
オープンフィールド	胎期産後4	活動量↑17	活動量↑17
受動回避学習	胎期産後4	変化なし	変化なし
高架十字	胎期産後5	変化なし	変化なし
ガラス玉置い出し	胎期産後(CD)7-8	変化なし	変化なし
オープンフィールド	胎期産後(CD)7-8	変化なし	変化なし
新奇物体認知	胎期産後(CD)7-8	探索行動↑10	探索行動↑1
社会性認知	胎期産後(CD)7-8	社会性認知↑1	変化なし
受動回避学習	胎期産後8	学習↑1	変化なし
強制水泳	胎期産後9	変化なし	変化なし
採食	胎期産後4-5-8-11	性差消失?	性差消失?

**表2 生後24時間以内のWI系雌雄ラットへの20 ug/kg EE、2 mg/kg EE、20 mg/kg E2 曝露が及ぼす影響**

試験	処置・年齢	20 ug/kg EE	2 mg/kg EE	20 mg/kg E2
オープンフィールド	胎期産後8	不変	不変	変化なし
明暗行動	胎期産後8	変化なし	変化なし	不変
受動回避学習	胎期産後8	学習	変化なし	変化なし
性行動	CD168-P-13-15	変化なし		
性選択性	CD168-P-13-15	変化なし		
高架十字	OVX-15-16	不変	変化なし	変化なし
摂食量	OVX-15-16	変化なし	変化なし	変化なし

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

著者名	タイトル	雑誌名	管・号・ページ	年
<u>Yoshida M</u> , 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.	<i>Tox. Pathol</i>	39 (5): 823-834	2011
Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A.:	Differential stimulation pathways of progesterone secretion from newly formed corpora lutea in rats treated with ethylene glycol monomethyl ether, sulpiride, or atrazine.	Toxicol Sci	121(2):267-78.	2011

#### IV. 研究成果の刊行物



## Delayed Adverse Effects of Neonatal Exposure to Diethylstilbestrol and Their Dose Dependency in Female Rats

MIDORI YOSHIDA<sup>1</sup>, MIWA TAKAHASHI<sup>1</sup>, KAORU INOUE<sup>1</sup>, SENGU HAYASHI<sup>1</sup>, AKIHIKO MAEKAWA<sup>2</sup>, AND AKIYOSHI NISHIKAWA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>Chemical Management Center, National Institute of Technology and Evaluation, 2-24-10, Nishihara, Shibuya-ku, Tokyo, Japan

### ABSTRACT

Neonatal exposure to estrogenic chemicals causes irreversible complex damage to the hypothalamus–pituitary–gonadal axis and reproductive system in females. Some lesions are noted after maturation as delayed adverse effects. We investigated the characteristics and dose dependence of delayed effects using female rats neonatally exposed to diethylstilbestrol (DES). Female *Dosm* rats were subcutaneously injected with a single dose of DES of 0 (control), 0.15, 1.5, 15, 150, or 1,500 µg/kg bw after birth. All except the lowest dose had estrogenic activity in a uterotrophic assay. All rats at 1500 µg/kg and some at 150 µg/kg showed abnormal morphologies in the genital tract, indicating they were androgenized before maturation. Although no morphological abnormalities were noted at 15 µg/kg or lower, onset of persistent estrus was significantly accelerated in the 1.5, 15, and 150 µg/kg groups with dose dependency, and the latest onset was from seventeen to twenty-one weeks of age at 1.5 µg/kg. The neonatal exposure to DES increased uterine adenocarcinoma development only at 150 µg/kg, although uterine anomalies were detected at 1,500 µg/kg. These results indicate that neonatal exposure to DES, which exerts estrogenic activity *in vivo*, induces delayed adverse effects in female rats in a dose-dependent manner. Early onset of persistent estrus appears to be the most sensitive parameter.

**Keywords:** delayed adverse effect; neonatal exposure; DES; dose dependence; estrous cycle; female rat.

### INTRODUCTION

Damage to the hypothalamus–pituitary–gonadal axis is the most worrying issue with perinatal exposure to chemicals that have estrogenic activity, because changes caused during the developmental period can last throughout life. Effects of exposure may be qualitatively different from those experienced in adulthood in rodents as well as human beings (Takasugi et al. 1983; Newbold et al. 1999). Although species differences in neonatal effects are known—such as ovary-independent response to the vagina in mice but not rats (Katsuda et al. 2002; Takasugi et al. 1976) or adenomyosis induction by tamoxifen in mice (Parrott et al. 2001) but uterine cancer in rats (Carthlew et al. 2000)—many experimental data on perinatal exposure to estrogens using rodents are considered likely to be relevant to human beings (Herbst and Bern 1981).

Perinatal exposure to estrogens or estrogenic compounds during critical period disrupts hypothalamus function, which results in lower gonadotropin (FSH and LH) production (Katsuda et al. 2000; Yoshida et al. 2002a). The disruption leads to many complicated abnormalities in the hypothalamus–pituitary–gonadal axis and the genital tract, and direct effects of estrogens on the genital system are also added. Although the abnormalities are dependent on exposure period, time, and dose, they are called androgenization and are commonly irreversible. Typical changes in affected females include lower gonadotropins, anovulation, persistent estrus,

abnormal organogenesis of the reproductive tract, abnormal expression of estrogen receptors in the uterus, or male-type sexual behavior. Testosterone is known to be converted to E2 by aromatase in the brain, and it has effects that are similar to those of estrogens. These abnormalities are usually detectable immediately after treatment or before puberty. Recently, effects of perinatal exposure that manifest after maturation have attracted attention (Adewale et al. 2009; Yoshida et al. 2002b). Such delayed effects of estrogenic chemicals were previously termed the “delayed anovulatory syndrome” (DAS) (MacLusky and Naftolin 1981), characterized by early onset of persistent estrus as determined by vaginal cytology (Ninomiya et al. 2007). Enhancement of tumor development may also result as well, as has been documented for uterine and vaginal neoplasms after perinatal exposure to diethylstilbestrol (DES) in mice (Newbold et al. 1990) as well as young women (Herbst and Bern 1981). Our previous study also showed increased uterine cancer development in rats with neonatal high-dose *p*-tert octylphenol (OP) (Yoshida et al. 2002b). Such effects are hypothesized to be caused by some disruption in the hypothalamus (MacLusky and Naftolin 1981), but precise mechanisms and associated characteristics other than persistent estrus (PE) remain to be determined. For risk assessment of chemicals, delayed adverse effects are of particular concern because they might be overlooked by short-term bioassays or developmental toxicity studies. Therefore, the present study was performed to clarify characteristics of delayed effects of neonatal exposure to DES at various doses on the female reproductive tract in rats using multiple retrospective indicators, including morphological parameters, estrous cyclicity, and

Address correspondence to: Midori Yoshida, Division of Pathology, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; e-mail: midoriy@nhs.go.jp

uterine carcinogenesis. In the present study, we used Donryu rats, which characteristically show a regular four-day estrous cycle as young adults and a high rate of endometrial adenocarcinomas caused by ovarian hormone imbalance (Maekawa et al. 1999; Nagaoka et al. 1990; Nagaoka et al. 1994). To avoid accumulation of DES in the rat body with repeated treatment, single-dose administration was selected in the present study.

#### MATERIALS AND METHODS

##### *Animals and Housing Conditions*

Nonpregnant adult and pregnant female Cj:Donryu rats were purchased from Charles River Japan (Kanagawa, Japan), maintained in an air-conditioned animal room under constant conditions of  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  and  $55\% \pm 10\%$  humidity with a twelve-hour light/dark cycle (light, 8:00 a.m.–8:00 p.m.; dark, 8:00 p.m.–8:00 a.m.), and housed three or four per cage. Commercial pellet diet (CRF-1, Oriental Yeast, Kanagawa) and drinking water were available ad libitum throughout the studies. Animal care and use followed the guidelines of laboratory animal welfare and use according to the Sasaki Institute Ethical Committee.

##### *Chemicals*

Diethylstilbestrol (CAS number 56-53-1, Sigma, St. Louis, MO) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan).

##### *Experiment 1*

Nonpregnant females underwent uterotrophic assays to examine estrogenic activity of the single doses applied in experiment 2 in vivo. Thirty-seven animals at three or four months of age were ovariectomized, and after complete castration was confirmed by vaginal smears, they were allocated to six groups. Three to eight animals per group were subcutaneously treated with a single dose of DES at 0 (control), 0.15, 1.5, 15, 150, or 1,500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight in 0.1 mL/100 g body weight of DMSO. Twenty-four hours after treatment, all animals were euthanized under deep anesthesia and uterine weights were measured.

##### *Experiment 2*

Experiment 2 was conducted to characterize delayed effects of neonatal exposure to DES on the female reproductive tract and their dose dependence. Dams were assigned to one of six groups (six to eight per group) before delivery. Female offspring were treated with a single subcutaneous injection of DES at 0, 0.15, 1.5, 15, 150, or 1,500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight in DMSO at 0.04 mL/10 g body weight in their back skin within twenty-four hours after birth. At postnatal days (PND) 14 and 21 (at weaning) and five weeks of age, three or four rats per group at each time point were examined to detect early effects on the female reproductive organs. The animals examined at five weeks of age were at estrous stage by vaginal smear.

Remaining animals were checked for clinical signs and body weights throughout their life. After vaginal opening (VO), which is a time point during puberty, all animals were checked for estrous cyclicity by vaginal smear every other week throughout the experiment. Additionally, to examine the effects of the neonatal exposure to DES on uterine carcinogenesis, fifteen to twenty-four rats per group were treated with a single injection of 20 mg/kg N-ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) into the uterine horns via the vagina using a stainless steel catheter at seven weeks of age. This treatment is known to cause uterine endometrial adenocarcinoma development in the uterine corpus of rats without carcinogenic effects in other sites, with no disruption of estrous cyclicity (Ando-Lu et al. 1994). All survivors were euthanized at ten months of age in the control and 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and higher treated groups, and at eight months of age in the 0.15 and 1.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups.

##### *Pathology*

After complete necropsy of all rats in experiment 2, the ovaries, uterus, vagina, adrenals, liver, pituitary, thymus, brain, and sites with macroscopic abnormalities were fixed in 4% neutral buffered formaldehyde. All organs were routinely processed and stained with hematoxylin and eosin for histopathological examination. Number of uterine glands in the uterine horn were counted using four or five cross-sections (Katsuda et al. 2000). For the uterus at termination of eight or ten months of age, the main target organs of carcinogenic effects of DES—the upper, middle, and lower parts of each uterine horn and the cervix—were cut into three pieces each in cross-section. Preneoplastic or neoplastic lesions detected in each uterus were classified into three degrees of atypical hyperplasia (slight, moderate, or severe) and adenocarcinomas, according to the criteria described in our previous studies (Ando-Lu et al. 1994). Lesions composed of glandular-structured epithelial cells with atypia showing invasive proliferation to the muscle layer or serosa were diagnosed as endometrial adenocarcinomas.

##### *Immunohistochemistry*

Serial sections of the uterus, vagina, and ovary at PND14, PND21, and five weeks of age were stained immunohistochemically with the antibody of estrogen receptor (ER)- $\alpha$  (SC7027, Santa Cruz, CA, USA). The organs of three or four rats per group were analyzed, and immunoreactive complexes were detected by the avidin-biotin complex method (LSAB kit, Dako Japan, Kyoto, Japan) and visualized with 3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) as the chromogen. Immunohistochemical intensity of ER $\alpha$  expression in these organs was classified into four categories: 0, negative; 0.5, several positive cells in higher magnification field (40 $\times$ ); and 1.0, 2.0, or 3.0 represents about 10–30%, 30–50%, or 50% and higher positive cells in the high magnification, respectively.

TABLE 1.—Uterine weights in uterotrophic assay.

Group ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	No. of rats	Body weight, mean $\pm$ SD (g)	Uterine weight, mean $\pm$ SD	
			Absolute (mg)	Relative ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW $\times$ 100)
Control	8	317.2 $\pm$ 42.3*	195.8 $\pm$ 45.6	613.8 $\pm$ 74.1
DES 0.15	8	317.5 $\pm$ 42.4	192.8 $\pm$ 33.9	604.6 $\pm$ 37.3
DES 1.5	8	300.6 $\pm$ 37.9	259.0 $\pm$ 43.7*	858.8 $\pm$ 66.9**
DES 15	7	323.6 $\pm$ 66.5	331.7 $\pm$ 91.6**	1018.4 $\pm$ 138.9**
DES 150	3	317.0 $\pm$ 31.0	477.0 $\pm$ 26.0**	1519.0 $\pm$ 226.0**
DES 1500	3	350.0 $\pm$ 26.7	440.7 $\pm$ 59.0**	1262.0 $\pm$ 179.5**

Abbreviations: BW, body weight; DES, diethylstilbestrol; SD, standard deviation.

\* Significantly different from control value at  $p < .05$ .

\*\* Significantly different from control value at  $p < .01$ .

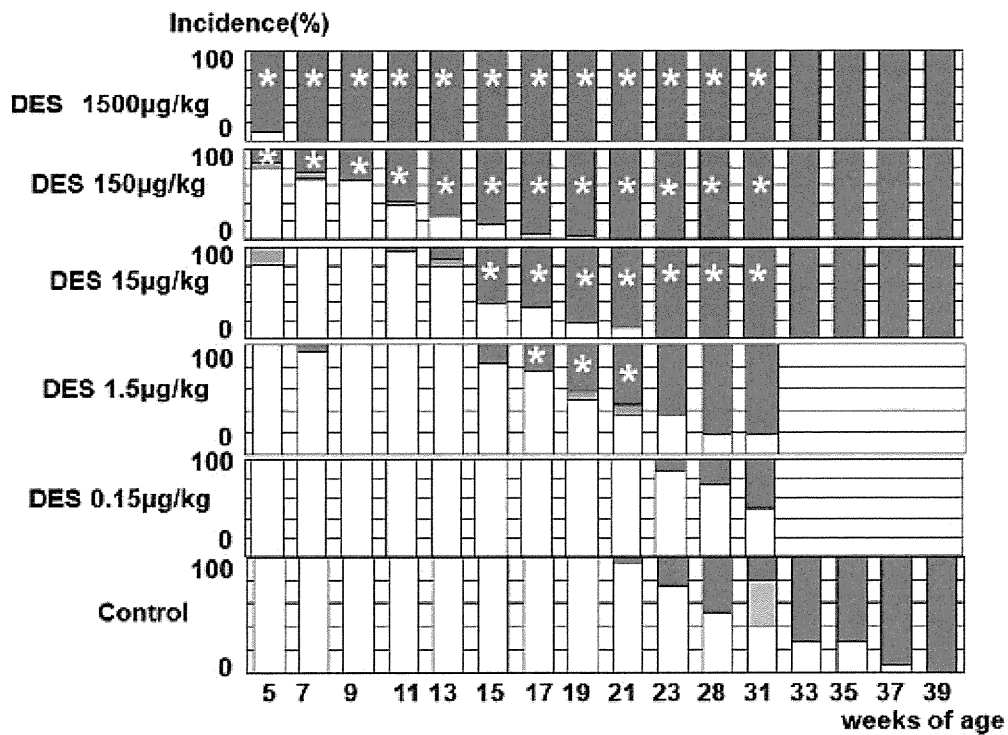


FIGURE 1.—Estrous cycling in experiment 2. White, light grey, and dark grey columns, respectively, represent regular (normal) cycle, irregular cycles, and persistent estrus. Incidences are the percentages of animals showing each estrous stage per group. \*, significantly different from the control value at  $p < .05$  and  $p < .01$ , respectively.

*mRNA Expression of Estrogen Receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and Progesterone Receptor (PR) in the ovary and uterus*

At five weeks of age, total RNA samples obtained from samples of uterine tissues (about 100 mg) and unilateral ovary

of three females at estrous phase in each group except the highest dose were isolated using RNeasy Midi Extraction Kit (QIAGEN, Germany) and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase