

Sex-related hormones (10 month-old)

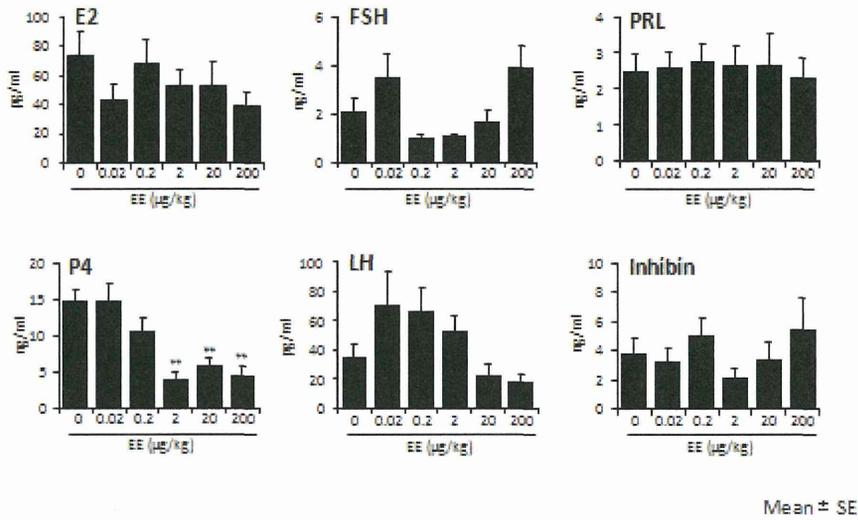


図3 10ヶ月齢におけるエストロゲン(E2)、プロゲステロン(P4)、インヒビン(Inhibin)、FSH、LHおよびプロラクチン(PRL)レベル

Kiss1 expression in the anterior (A) and posterior (B) hypothalamus

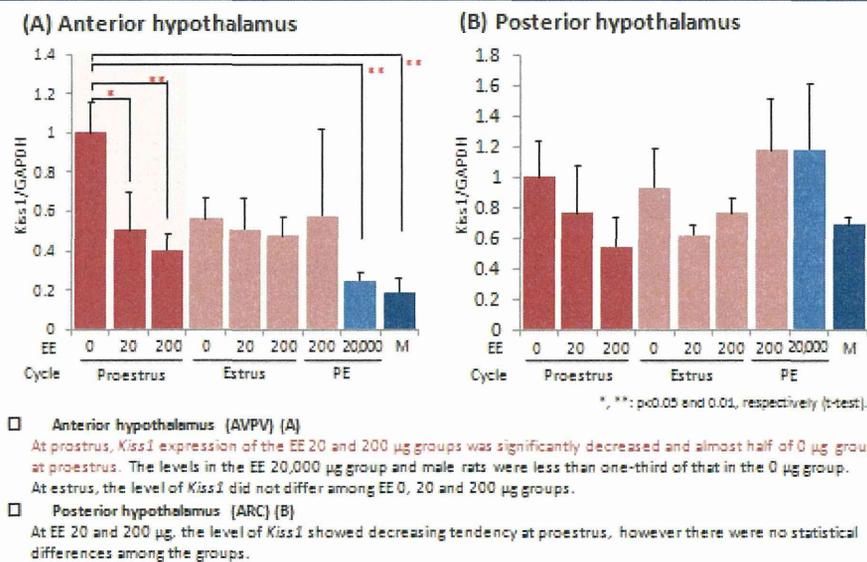


図4 10週齢の発情前期および発情期における視床下部部位別によるキスペプチン遺伝子の発現

ER α and PCNA (PND14)

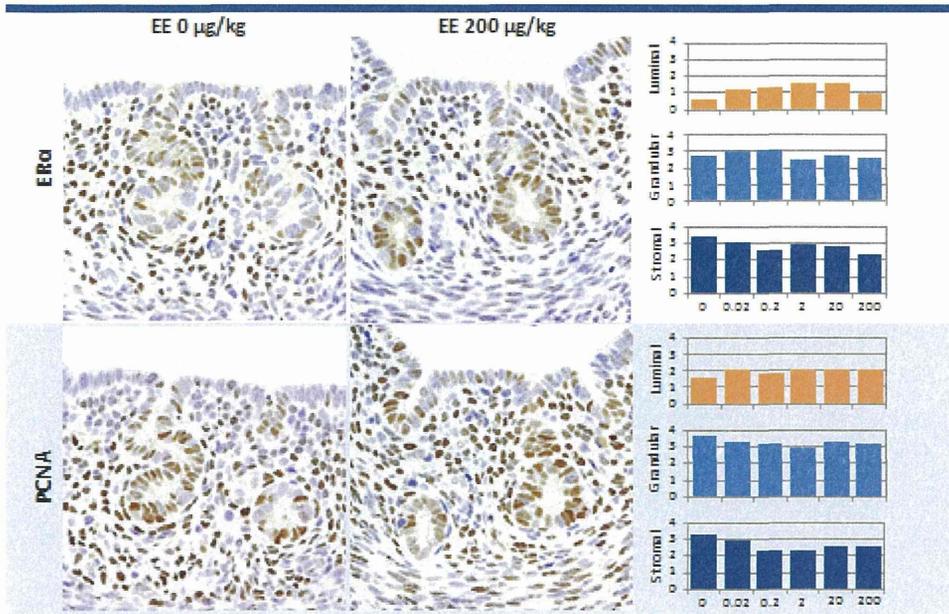


図 5 生後14日齢の子宮におけるER α およびPCNAの発現

PCNA (10wk)

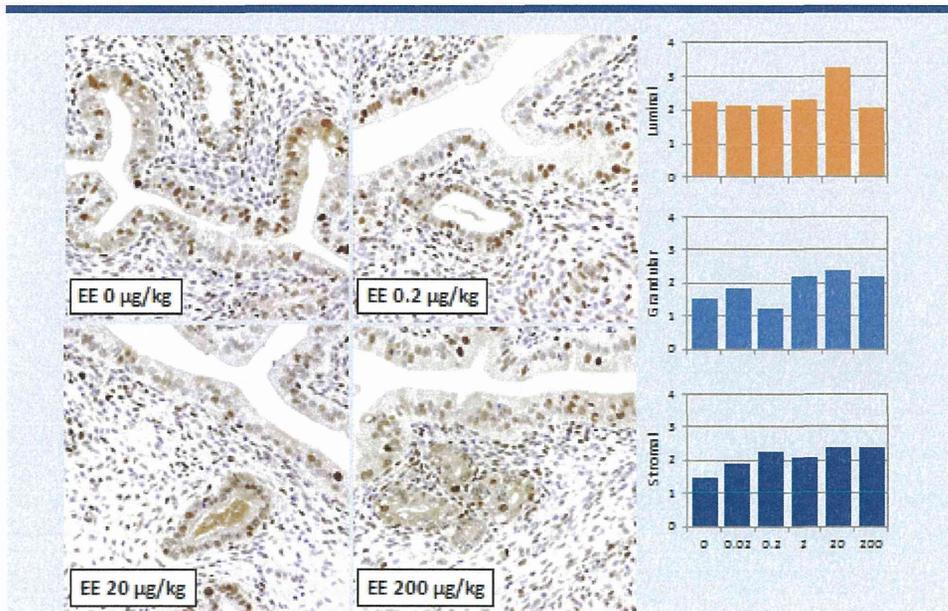


図6 10週齢の子宮におけるPDNAの発現

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 真理子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	代田 欣二	麻布大学獣医学部・生物科学総合研究所
研究協力者：	川嶋 潤	麻布大学獣医学部
研究協力者：	中村 知裕	麻布大学獣医学部
研究協力者：	小川 祐布子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	菅田 恵理世	麻布大学獣医学部
研究協力者：	鈴木 紗綾	麻布大学獣医学部
研究協力者：	大隈 瑞穂	麻布大学獣医学部
研究協力者：	立河 紗紀	麻布大学獣医学部
研究協力者：	寺西 瑞希	麻布大学獣医学部
研究協力者：	森 雅史	麻布大学獣医学部

研究要旨

ラットの脳の性分化における臨界期とされている生後1日から5日間モデル化学物質として選択した17 α -ethinylestradiol (EE)を0.4~2 μ g/kg 体重/日の用量でSD系雌ラットに反復経口投与すると、性周期の異常、排卵周期の停止や乳腺の過形成などの遅発影響が認められることをこれまでの研究で示した。本年度は、まず、初回ならびに最終投与後の血清EE濃度を測定し、経口投与されたEEは血中に移行するが蓄積性は乏しいことが確認された。また、生後10日の卵巣における遺伝子発現に影響が認められ、投与後早期に影響が及んでいることが示唆された。EEを10あるいは20 μ g/kg 体重の用量で生後1日のSD系雌ラットに単回経口投与しても異常周期を示す例が週齢の進行に伴って増加した。反復経口投与実験と同週齢で剖検すると、排卵を認める例はほとんどなかったが、卵巣組織に黄体が認められる例が多く、単回経口投与では排卵周期の停止は遅れて起こるものと推察された。また、乳腺も軽度な変化が1例に認められたのみで影響の程度に差が認められた。一方、単回経口投与では副腎重量の顕著な増加が認められ、形態計測から網状帯の過形成が確認され、視床下部/下垂体/副腎系への遅発影響の可能性も示唆された。曝露時期の影響を知るために生後1、5あるいは7日のいずれかにEEを10 μ g/kg 体重の用量で経口投与したところ、生後1日投与群より遅延していたが、生後5日投与群だけでなく7日投与群でも性周期の異常が増加した。ラットにおける脳の性分化の臨界期より後の生後7日投与によっても遅発影響が認められたことから、EE曝露による遅発影響の中には、all or noneの性分化の攪乱とは異なるメカニズムで発現しているものがある可能性が示唆された。

A. 研究目的

主要な器官の形成が終わった胎児期から新生児期までの時期は、ヒトにおいても動物においても高次機能が分化発達する重要な時期といえる。我々は前年度までの研究から、ラットの脳の性分化の臨界期にあたる新生児期に、EEを単回皮下投与(0.08~2.0 μ g/kg 体重)あるいは5日間反復

経口投与(0.4~2.0 μ g/kg 体重/日)した動物では、週齢の進行に伴い性周期の異常が認められるようになり、また、排卵の停止あるいは乳腺への乳汁様液の貯留を伴う管腔の拡張といった遅発型影響が認められ、これには視床下部/下垂体/性腺軸の異常を伴うことが示唆された。しかし、反復経口投与動物には単回皮下投与動物とほぼ

同様の影響が認められたものの、その発現時期はより若齢であったことから、本年度はその要因を知るために、反復経口投与による EE の蓄積性の有無を調べ、また、反復経口投与後の卵巣にみられる早期影響を知るために卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現解析を行った。さらに、遅発影響が単回経口曝露でも認められるのかどうか、さらに曝露時期により遅発影響が変化するかどうかを検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

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、これをストックソリューションとして 4°C で遮光保存した。投与検体はストックソリューションをコーン油 (和光純薬) で段階希釈し、1 回の投与液量が 10 mL/kg になるように濃度を調製した。調製検体は遮光室温保存して調製後 1 週間以内に使用した。

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 [CrI:CD(SD)] ラットを用いた。新生児の投与では、同系統の成熟雄ラットと交配させて妊娠動物とし、自然分娩で得られた雌産児を実験に用いた。

3. 群分けおよび投与方法

出生翌日の 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) を四肢皮下に少量注入して個体を識別した。その際、哺育状態による影響を均等化するために、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生児数を 8 匹あるいは 10 匹に揃えた。

投与は、Watanabe らの報告²⁾を参照して作製した胃ゾンデを装着した注射筒を用い、投与日に測定した体重を基に 10 mL/kg を傾向投与した。対照群には媒体としたコーン油 (和光純薬) を同様に投与した。

4. 反復経口投与後の血清中 EE 濃度測定

(ア) 投与および試料採取

1 日齢から 5 日間 EE を 2 μ g/kg 反復経口投与した。投与動物は、初回投与 24 時間後、5 回投与後 6 時間ならびに 24 時間に、低温麻醉下で後大静脈から採血を行い、血清を得た。得られた血清は -50°C で凍結保存した。

(イ) 血清中 EE 濃度の定量

定量は住友化学分析センターに委託し、超高速液体クロマトグラフ (Prominence UFLC、島津製作所、京都) および質量分析計 (API 5000、AB Sciex、Massachusetts, USA) を用いて行った。測定に用いた血清は、初回投与 24 時間では、3~5 匹から採取した血清をプールし、その他のポイントは 2~3 匹から採取した血清をプールして 1 試料として、誘導体化して測定に供した。検出感度は 3 pg/mL であった。

5. 反復経口投与が卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響の解析

(1) 投与および卵巣の採取

0.4 および 2 \square g/kg の用量の EE を、1 日齢から 5 日間反復経口投与した。対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。10 日齢では全ての投与群の動物を低温麻醉下で開腹して後大静脈から採血を行い、断頭屠殺した。23 日齢では対照群および 2 \square g/kg/日投与群の動物を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) で深麻醉の後開腹し、後大動脈から採血した後、放血屠殺した。これらの動物から卵巣を採取し、片側を液体窒素で急速凍結し、対側は 4% パラホルムアルデヒド又は 10% リン酸緩衝ホルマリンで固定保存した。

(2) 遺伝子発現解析に用いる試料の調製

凍結卵巣に Trizol 試薬 (インビトロジェン株式会社) および細胞破碎装置用ビーズ (トミー精工) を加え冷却型ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R (株式会社トミー精工) でホモジナイズを行った。Trizol 試薬の処方に従いホモジネートから総 RNA を得、これを 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 を合成した。

(3) 時間分解型 PCR 装置による mRNA の定量

StepOne™ Real Time PCR System (Applied Biosystems) 装置で測定した。National Center for Biotechnology Information, NCBI) のデータベースを基にプライマー設計ソフトウェア (Primer Express, Applied Biosystems) を用いて、luteinizing hormone 受容体 (LHR)、follicle-stimulating hormone 受容体 (FSHR)、estrogen \square 受容体 (ER β)、growth differentiation factor-9 (GDF-9)、inhibin β および β A、 β B、抗ミューラー管ホルモン (AMH)、3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) ならび

に aromatase を定量するプライマーおよび FAM 標識プローブを設計して定量に用いた。得られた測定値は、同じサンプルについて、Pre-Developed Taqman® Assay Reagents Control Kits (Applied Biosystems) を用いて測定したハウスキーピング遺伝子の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の測定値で補正した。

6. 単回経口投与の遅発影響解析

(1) 投与量及び投与回数

10 および 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の EE を 1 日齢に単回経口投与した。対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

(2) 観察方法

毎日一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 23 週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。2 日齢からは毎日一般状態を観察し、

(ア) 体重

1、5、7、10 日齢ならびに 14 日齢からは 1 週間毎に個別体重を測定し、剖検日にも体重を測定した。

(イ) 開眼の観察

10 日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた日を開眼日として体重を測定した。

(ウ) 膣開口の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(エ) 性周期の観察

8 週齢から 4 週間に 1 回、2 週間にわたり、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は初年度に実施した反復経口投与実験と同様の 23 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、発情休止期が 14 日以上継続したものを連続休止に、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。

(オ) 剖検

性周期の観察は上記の観察期間終了後も継続し、発情期あるいは発情休止期に剖検した。

剖検に際して、まず動物を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) で深麻酔の後開腹し、後大動脈から採血した後、放血屠殺した。さらに、乳腺を肉眼的に観察した。次いで

で排卵検査のために卵管を採取し、卵巢、子宮、下垂体、肝臓、腎臓および副腎を採取し、重量を測定した。また、膣および乳腺も採取し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。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。

(3) 卵巢の組織観察

ブアン液で固定した卵巢はパラフィン包埋し、2 μm の厚さで薄切して連続切片を作製し、黄体の有無ならびに嚢胞状卵胞の有無を観察した。4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(4) 副腎の形態計測

ホルマリン固定した副腎はパラフィン包埋してマイクロトームで 4 μm の厚さに薄切し、最初の断面が現れてから 400、600、800、1000 および 1200 μm の位置で採取し (表 1)、その中で、十分に髄質が認められ断面が比較的大きかった約 1000 μm 薄切時の切片を hematoxylin-eosin 染色してバーチャルスライドに画像を取り込み、バーチャルスライド閲覧ソフトウェア i-Viewer (株式会社クラーロ) を用いて、副腎の全体、髄質および皮質それぞれ長軸と短軸の長さを測定した。さらに皮質は球状帯、束状帯および網状帯の各 3 層に識別し短軸方向と長軸方向の両者の長さを測定し、その平均を個体の値とした。

さらに取り込んだ画像から球状帯を除いた束状帯と網状帯を無作為に選んで画像処理ソフトウェア Image J (NIH) を用いて 50000 μm^2 を設定し、そこに認められた細胞をカウントした。

(5) 子宮腺および子宮内腔上皮の観察

子宮は、パラフィン包埋してマイクロトームで 2 μm の厚さで薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色を行った。また、ラットと交差性が認められている抗マウス proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 抗体あるいは抗マウス estrogen Receptor α (ER α) 抗体を一次抗体として用い、ABC 法によりこれらの免疫組織化学染色を行った。これらの標本は光学顕微鏡下 (400 倍) で子宮内腔上皮細胞における陽性細胞数の割合を求めた。さらに、光学顕微鏡下 (200 倍) で子宮腺の総数を計測した。

7. 単回経口投与の初回排卵に及ぼす影響解析

(1) 投与量及び投与回数投与方法

10 □g/kg の EE を 1 日齢に単回経口投与した。対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

(2) 観察方法

毎日一般状態を観察し、21 日齢に離乳して、膣開口の有無を観察した。

(3) 剖検

膣開口が認められた動物は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) で深麻酔の後開腹し、後大動脈から採血した後、放血屠殺した。次いで排卵検査のために卵管を採取し、卵巣、子宮、下垂体および副腎を採取し、重量を測定した。また、膣も採取し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。卵巣は片側を急速凍結し-80°Cで保管し対側はブアン液で固定し、パラ

8. 単回経口投与の遅発影響に関する感受期の解析

(1) 投与量及び投与回数

1,5 あるいは 7 日齢に EE を 10 □g/kg 単回経口投与した。対照群の動物には 1 あるいは 5 日齢にコーン油を経口投与した。

(2) 観察方法

毎日一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 23 週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。2 日齢からは毎日一般状態を観察し、

(ア) 体重

1, 5, 7, 10 日齢ならびに 14 日齢からは 1 週間毎に個別体重を測定し、剖検日にも体重を測定した。

(イ) 開眼の観察

10 日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた動物は体重を測定した。

(ウ) 膣開口の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(エ) 性周期の観察

8 週齢から 4 週間に 1 回、2 週間にわたり、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は初年度に実施した反復経口投与実験と同様の 23 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、発情休止期が 14 日以上継続したものを連続休止に、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。

(オ) 剖検

性周期の観察は上記の観察期間終了後も継続し、発情期に剖検した。

剖検に際して、まず動物を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) で深麻酔の後開腹し、後大動脈から採血した後、放血屠殺した。さらに、乳腺を肉眼的に観察した。次いで排卵検査のために卵管を採取し、卵巣、子宮、下垂体、肝臓、腎臓および副腎を採取し、重量を測定した。また、膣および乳腺も採取し、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。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。

9. 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 χ^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、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. 経口投与後の血清中 EE 濃度

Table 1 に示すように、初回投与後 24 時間と 5 回投与後 24 時間の間には有意差は認められなかった。一方、5 回投与後 6 時間の値はこれらの時間と比べて有意な高値を示し、経口投与した EE は血中に移行するが、蓄積しないことが明らかになった。

2. 反復経口投与が卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響

Fig. 1 に結果を示した。統計学的有意差は得られなかったが、EE 投与群で LHR mRNA の発現が低下した。幼若ラットの卵巣で LHR は間質および莖膜に発現すると考えられているが、間質が少ない 10 日齢でより顕著な低下が認められたことから、EE 投与が莖膜細胞における LHR 発現に影響を及ぼしている可能性が示唆された。また、3 β -HSD および aromatase mRNA 発現が低下した。

10日齢の卵巣は血中性ステロイド濃度への寄与が乏しいが、23日齢でも aromatase mRNA の発現低下が認められ、estradiol の合成および分泌は幼若期に低下しているものと考えられた。発育卵胞の卵母細胞に発現する GDF-9 ならびに健全な顆粒層細胞で発現する FSHR、ER β 、inhibin 各サブユニットおよび AMH mRNA 発現に影響はみられなかった。以上のことから、新生児期 EE 曝露は10日齢ですでに卵巣での LHR 発現低下ならびにステロイドホルモン合成系に影響を及ぼすことが示唆された。

3. 単回経口投与の遅発影響

体重推移に投与の影響は認められなかった (Fig. 2)。また、一般状態の異常を認める例もなかった。

開眼並びに陰開口における日齢と体重を Table 2 に示す。また、陰開口における日齢と体重の相関を Fig. 3 に示した。これら身体的発達指標に投与の影響は認められなかった。

週齢の進行に伴う性周期の変化を Fig. 4 に示した。対照群では8週齢から全例が正常な性周期を回帰していた。その後、連続発情あるいはその他の性周期などの異常な周期を示す例も認められたが、少数であり、正常な性周期を回帰する動物の割合には各観察期間の間に有意差は認められなかった。一方、EE 投与群では、異常周期を示す個体が、観察を開始した8週齢に既に多数認められ、その割合は対照群と比較して有意な高値を示した。さらに週齢の進行に伴い、正常な性周期を回帰する動物の割合が減少し、16週齢から対照群との間に有意差が認められた。EE 投与群の異常性周期の内訳では、いずれの観察時期も、無発情あるいは連続発情に分類されない「その他」の割合が最も多く、その割合は、いずれの観察時期も対照群と比較して有意な高値を示していた。連続発情は、対照群の動物にも観察された16週齢から EE 投与群でも認められたが、各観察時期での出現頻度は対照群と EE 投与群との間に有意差は認められなかった。EE 投与群では対照群で認められていない無発情の動物が認められたが、その割合は、いずれの観察時期も対照群と EE 投与群との間に有意差はなかった。

各観察期間における発情前期あるいは発情期の日数と発情休止期の日数の割合を Fig. 4 に示した。20 μ g/kg 投与群では、対照群と比べて各観察期間ともに情休止期の割合が少ない傾向が認められたが、有意差は認められなかった。また、同

群では週齢の進行に伴い情休止期の割合が減少する傾向が認められたが、週齢間で有意差は認められなかった。

各観察期間に回帰した性周期の回数を Table 3 に、また平均周期日数を Table 4 に示した。EE 投与群では20 μ g/kg 投与群において、週齢の進行に伴い性周期の回帰回数が減少し、平均周期日数も短縮する傾向が認められた。

器官重量を Table 5 に示した。EE 投与群では下垂体および副腎重量の有意な増加が認められた。剖検時の排卵検査の成績ならびに卵巣および子宮重量を Table 6 に示した。発情期あるいは発情後期に実施した排卵検査では、対照群では13例中6例の卵管に卵が確認されたが、EE 投与群では10 μ g/kg 投与群の1例のみであった。卵が認められなかった動物の間では卵巣および子宮重量に対照群と EE 投与群との間に有意差は認められなかった。Table 7 に示すように、対照群と10 μ g/kg 投与群について卵巣組織の連続切片を作製し、黄体の有無を確認した結果、対照群では観察した5例全例に黄体が認められたが、10 μ g/kg 投与群では6例中3例では黄体が認められなかった。一方、10 μ g/kg 投与群では、全例に嚢胞状卵胞が観察された。乳腺では20 μ g/kg 投与群の1例に白色点がひとつ観察された他に異常は認められなかった (Table 8)。

前述の様に子宮は重量には EE 投与の影響は認められなかったが、子宮腺の数が EE 投与群で有意に減少した (Figs.5-6)。また、内腔上皮細胞に占める PCNA 陽性細胞割合も20 μ g/kg 投与群で有意に低下した (Figs.5-6)。一方、発情後期に採取した各2例の子宮内腔上皮細胞における ER α 陽性細胞の割合は、EE 投与群で増加の傾向が認められ、同様の傾向は遺伝子定量解析でも確認された (データは示さず)。

EE 投与群で副腎重量が増加したことから形態計測を行った。結果は Figs. 7-9 に示した。副腎の長軸と短軸の平均値は20 μ g/kg 投与群が対照群と比較して有意な高値を示した。髄質の厚さは EE 投与群と対照群の間に有意差はみられなかったが、皮質は20 μ g/kg 投与群で有意な高値を示した。さらに皮質を構成する3層について長軸方向と短軸方向の厚さを測定し、その平均値を算出した結果、網状帯の厚さのみに対照群と20 μ g/kg 投与群との間に有意差がみられた。さらに束状帯および網状帯について細胞密度を調べた結果、いずれの部位も20 μ g/kg 投与群の値が対照群と比

較して有意に低い値を示し、これらの層では細胞のサイズが増加していることが示唆された (Table 9)。

4. 単回経口投与が初回排卵に及ぼす遅発影響

Table 10 に対照群および 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の膣開口日における排卵検査の結果を示した。対照群では全例に排卵が認められたが、10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では排卵が認められない例があった。排卵の認められた動物の排卵数は対照群との間に有意差は認められなかったが、卵巢重量は有意な低値を示していた。子宮重量は低値の傾向を示したが有意差はなかった。下垂体および副腎重量には投与の影響は認められなかった。

5. 単回経口投与の遅発影響に関する感受期

体重推移に投与の影響は認められなかった。また、一般状態の異常を認める例もなかった。また、開眼および膣開口の日齢についても、対照群との間に有意差は認められず、投与時期による遅速の変動も認められなかった (Table 11)。

週齢の進行に伴う性周期の変化を Fig. 10 に示した。生後 1 日投与群では 8 週齢で連続発情を示す動物が認められたが、この群も含めて 8 週齢には正常な性周期を回帰する動物の割合は対照群と EE 投与群との間に有意差は認められなかった。12 週齢からは EE を 1 日齢に投与した動物で異常な性周期を示す例が増加の傾向を示し、16 週齢では全例が連続発情を示した。EE を 5 日齢に投与した動物では 16 週齢から異常な性周期を示す例が増加の傾向を示し 20 週齢では連続発情を示す動物も増加の傾向を示した。7 日齢に EE を投与した動物でも 16 週齢から異常な性周期を示す例が増加の傾向を示し、20 週齢では連続発情を示す例が認められた。性周期の変化に伴って発情回帰回数 (Table 12) ならびに平均周期日数 (Table 13) は減少の傾向を示したが、対照群との間に有意差は認められなかった。

22-23 週齢で実施した剖検時に測定した器官重量を Table 14 に示した。生後 1 日投与群では下垂体および副腎重量が対照群と比べて高値を示したが、有意差は認められなかった。生後 7 日投与群では 1 例に下垂体の腫大が認められたため平均重量が増加したが、その他の動物は対照群と同等の値であった。生後 5 日投与群も対照群と同様の重量であった。剖検時に実施した排卵検査の成績を Table 15 に示したが、生後 1 日投与群および生後 7 日投与群で排卵を認める例がなかった。排

卵が認められた生後 5 日投与群では排卵数は対照群と同等であった。排卵の有無にかかわらず、卵巢および子宮重量に対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。剖検時に認められた肉眼所見としては、下垂体腫大の他に乳腺における白色点が生後 5 日コーン油投与群および EE 投与群の各 1 例ならびに生後 7 日 EE 投与群の 1 例に観察された (Table 16)。

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。

膣開口の日齢には単回投与においても EE 投与の影響は認められなかった。しかし、膣開口日に排卵が認められない例が単回投与でも EE 投与群で増加した。さらに反復投与を受けた動物の生後 10 日および 23 日の卵巢に発現する卵胞発育関連遺伝子、特に、莖膜でのステロイドホルモン合成に関わる遺伝子の発現に EE の用量に依存した変化が認められたことから、視床下部/下垂体/性腺軸のいずれかのレベルへの影響は、投与後比較的早期に及んでいるものと推察された。こうした初発影響を詳細に調べることにより遅発影響発現のメカニズムが明らかになるものと期待される。

本年度は単回経口投与による影響を検討した。その結果、副腎重量の変化を除き、反復投与における総投与量あるいはその 2 倍量を単回投与した方が反復投与と比べて、初回排卵の遅延も、性周期に及ぼす影響も、剖検時における無排卵の割合も、乳腺の異常の程度と頻度も、減弱して認められ、反復投与の方が低用量でも顕著な影響を及ぼすことが今年度までの研究で明らかになった。EE 投与後の血中濃度は初回投与 24 時間も 5 回投与 24 時間も同様であったことから、反復投与においてより顕著な影響が認められたのは、反復経口投与による相加的な血中濃度の上昇によるものではなく、低用量でも反復した曝露による影響であると考えられた。このような低用量による反復曝露は日常的に起こりうることから、メカニズ

ムに立脚したリスク評価が求められるものと考えられる。

本年度は単回投与による遅発影響の感受期も検討した。性周期のパターンは、異なる用量のEEによる単回投与実験と必ずしも同等ではなかったが、週齢の進行に伴い異常な性周期が発現してくることは再現された。また、副腎重量の増加も再現された。新生児期における雄性化/脱雌性化処置は連続発情の他に連続休止期を誘導するとの報告もあることから、いずれも新生児期におけるEE投与の影響と考えられる。ラットの脳における性分化の臨界期と考えられている生後1日あるいは生後5日、さらに臨界期を超えた生後7日に同じ用量のEEを単回経口投与して遅発影響を比較すると、生後1日の投与による影響が最も顕著で、生後5日投与では減弱して認められたことから、低用量曝露においても遅発影響に対する感受性は出生直後が最も高いことが確認された。しかし、生後7日投与によっても性周期の異常が遅延して認められたことから、感受期は従来から知られている脳の性分化より後の時期まで及んでいることが明らかになった。本研究において卵巣における遺伝子発現の変化が視床下部/下垂体/性腺軸が確立する前の時期から認められたことを考慮すると、性周期にみられる遅発影響は脳の性分化攪乱とは異なるメカニズムも関与している可能性が示唆された。

EEの単回経口投与によって副腎重量が顕著に増加した。膣開口日における剖検では影響が認められなかったことから、副腎重量の増加も遅発影響と考えられる。副腎重量の増加は生後5あるいは7日の投与では認められなかったこと、また、単回投与の用量を分割して反復投与すると副腎重量の増加は軽度であったことから、副腎重量の増加は生後1日付近に感受期があるものと考えられる。副腎からの糖質コルチコイド分泌パターンに性差が認められること、出生前からノニルフェノール曝露を受けた雌雄ラットでは糖質コルチコイドおよび鉱質コルチコイドのいずれも血中濃度が上昇するとの報告があることから副腎機能もエストロゲン活性物質の新生児期曝露により影響を受けることが考えられる。しかし、形態計測では糖質コルチコイドを産生する束状帯より性ステロイドを産生する網状帯において顕著な肥大が認められたことから、新生児期エストロゲン活性物質曝露による過形成による副腎機能の変化ならびに過形成の原因については今後明らかにされるべき課題と考えられる。

単回経口投与動物の子宮では子宮腺の有意な減少が認められた。また、子宮内腔上皮におけるPCNA陽性細胞の割合が低下した。PCNAは分裂期にある細胞のマーカータンパク質であることからPCNA陽性細胞の割合の低下は子宮内腔上皮細胞の分裂活性の低下を示唆するものと考えられる。子宮腺の増加も宮内腔上皮における細胞分裂の促進もエストロゲンによって刺激されることから、重量に差は現れないものの、血中エストロゲン濃度が低下している可能性が示唆された。

E. 結論

EEは新生児に経口投与しても血中に移行するが反復投与しても蓄積性は乏しい。しかし、遺伝子レベルでは投与後早期に卵巣に影響を及ぼし、副腎皮質網状帯細胞の過形成以外は単回経口投与より影響が顕著に認められ、脳の性分化の臨界期以降も遅発影響の感受期が存在していることから、低用量による反復曝露のリスクが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Shirota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M.

Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats.

Journal of Toxicological Sciences 37: 681-689 (2012)

2) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Shirota K.

Vascular Hamartoma in the Uterus of a Female Sprague-Dawley Rat with an Episode of Vaginal Bleeding.

Toxicologic Pathology (in press)

2. 学会発表

1) 中村 知裕, 川嶋 潤, 小川 祐布子, 代田 欣二, 吉田 緑, 代田 眞理子: 新生児期エチニルエストラジオール曝露がラットの原始卵胞数推移に及ぼす影響 第39回日本毒性学会学術年会 (2012年7月)

2) 川嶋 潤, 中村 知裕, 川嶋 潤, 小川 祐布子, 代田 欣二, 渡辺 元, 永岡 謙太郎, 田谷 一善, 代田 眞理子: エチニルエストラジオール新生児期曝露による雌ラットの内分泌系への遅発影

3) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Sugata E, Suzuki S, Ogawa Y, Shirota K. Effects of Neonatal oral exposure to ethinylestradiol on the puberty of female rats. Society for the Study of Reproduction 2012 Meeting (2012年8月)

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

参考文献

Akieda-Asai S, Ohta R, Shirota M, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K. Endocrinological differences between Hatano high- and low-avoidance rats during early two-way avoidance acquisition. *Experimental Animals* 60, 509-516 (2011)

Ayyanan A, Laribi O, Schuepbach-Mallepell S, Schrick C, Gutierrez M, Tanos T, Lefebvre G, Rougemont J, Yalcin-Ozuysal O, Brisken C. Perinatal exposure to bisphenol A increases adult mammary gland progesterone response and cell number. *Molecular Endocrinology* 25, 1915-1923(2011)

Betancourt AM, Eltoum IA, Desmond RA, Russo J, Lamartiniere CA. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environmental Health Perspectives* 118, 1614-1619 (2010).

Burdick HO, Whitney R. Ovulation induced in mice by single injection of follutein or untreated human pregnancy urine. *American Journal of Physiology* 132, 405-410 (1941).

Bandiera S and Dworschak C
Effects of Testosterone and Estrogen on Hepatic Levels of Cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the Rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296, 286-295 (1992).

Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ.

A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives*. 111, 1020-1036 (2003).

Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*. 53, 69-77 (1988).

Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicoeur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 3, 1455-1461 (1989).

Byers M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Park-Sarge OK. Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Molecular Endocrinology* 11, 172-182 (1997).

Chakraborty TR, Gore AC
Aging-Related Changes in Ovarian Hormones, Their Receptors, and Neuroendocrine Function. *Experimental Biology and Medicine* 229, 977-987 (2004).

Chang L-L, Wun W-S A, Paulus S, Wang PS. *In utero* and neonate exposure to nonylphenol develops hyperadrenalism and metabolic syndrome later in life. I. First generation rats (F1). *Toxicology* 301, 40-49 (2012)

Chen Y, Jefferson WN, Newbold RR, Padilla-Banks E, Pepling ME. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and *in Vivo*. *Endocrinology* 148, 3580-3590 (2007)

Cimafranca MA, Davila J, Ekman GC, Andrews RN, Neese SL, Peretz J, Woodling KA, Helferich WG,

- Sarkar J, Flaws JA, Schantz SL, Doerge DR, Cooke PS.
Acute and chronic effects of oral genistein administration in neonatal mice.
Biology of Reproduction 83,114-121 (2010).
- Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Ingraham HA, Nachtigal MW, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, Themmen AP.
Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary.
Endocrinology. 143, 1076-1084 (2002).
- Graham R. Robertson, Geoffrey C. Farrell, Liddle C.
Sexually Dimorphic Expression of Rat CYP3A9 and CYP3A18 Genes Is Regulated by Growth Hormone.
Biochemical and Biophysical Research Communications. 242, 57–60 (1998)
Greenstein BD.
Effects of rat alpha-fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors.
Endocrinology 130, 3184-3190 (1992).
- Kim H, Nakajima T, Hayashi S, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T
Effects of Diethylstilbestrol on Programmed Oocyte Death and Induction of Polyovular Follicles in Neonatal Mouse Ovaries.
Biology of Reproduction 81, 1002–1009 (2009)
- Herath CB, Yamashita M, Watanabe G, Jin W, Tangtrongsup S, Kojima A, Groome NP, Suzuki AK, Taya K.
Regulation of follicle-stimulating hormone secretion by estradiol and dimeric inhibins in the infantile female rat.
Biology of Reproduction 65,1623-1633 (2001).
- Hutter HS, Gibson MJ.
Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice.
Biology of Reproduction 38, 636-638 (1988).
- Hirshfield AH
Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist.
Environmental and Molecular Mutagenesis 29,10-15 (1997).
- Horie K, Takakura K, Taii S, Narimoto K, Noda Y, Nishikawa S, Nakayama H, Fujita J, Mori T.
The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development.
Biology of Reproduction 45, 547-552 (1991).
- Ikeda Y, Nagai A, Ikeda M, AND Hayashi S
Increased Expression of Mullerian-Inhibiting Substance Correlates with Inhibition of Follicular Growth in the Developing Ovary of Rats Treated with E2 Benzoate.
Endocrinology 143, 304–312 (2002)
- Ikeda Y, Tanaka H, and Esaki M
Effects of Gestational Diethylstilbestrol Treatment on Male and Female Gonads during Early Embryonic Development.
Endocrinology 149:3970-3979 (2008).
- Jager W, Correia MA, Bornheim LM, Mahnke A, WALTER G. Hanstein WG, XUE L, and Benet LZ
Ethinylestradiol-mediated induction of hepatic *CYP3A9* in Female rats: implication for cyclosporine metabolism.
Drug Metabolism and Disposition, 27, 1505–1511 (1999)
- Jefferson W, Newbold R, Padilla-Banks E, and Pepling M.
Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival.
Biology of Reproduction 74, 161–168 (2006)
- Jaroenporn S, Horii Y, Asai S, Wang KM, Nagaoka K, Ohta R, Shirota M, Watanabe G, Taya K.
Endocrine mechanisms responsible for different follicular development during the estrous cycle in Hatano high- and low-avoidance rats.
Journal of Reproduction and Development 57, 690-699 (2012)
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W
The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase I.

- Environmental Health Perspectives. 109,785–794 (2001)
- Kelly PA, Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Shirota M, Edery M, Dusanter-Fourt I, Djiane J. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biology of Reproduction* 40, 27-32 (1989).
- Kenny HA, Woodruff TK. Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology*. 147, 51-60 (2006).
- Kezele P and Skinner MK. Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Endocrinology* 144, 3329–3337 (2003).
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology*. 148:1968-1976 (2007).
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-4263 (1998).
- Lei L, Shiyang Jin, Kelly E. Mayo and Teresa K. Woodruff. The Interactions Between the Stimulatory Effect of Follicle-Stimulating Hormone and the Inhibitory Effect of Estrogen on Mouse Primordial Folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 82, 13–22 (2010)
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S. Consequences of Fetal Irradiation on Follicle Histogenesis and Early Follicle Development in Rat Ovaries. *Biology of Reproduction* 75, 749–759 (2006)
- Melinda E. Wilson and Robert J. Handa. Ontogeny of Gene Expression in the Gonadotroph of the Developing Female Rat. *Biology of Reproduction* 56, 563-568 (1997)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 46,1080-1085 (1992).
- Montano MM, Welshons WV, vom Saal FS. Free estradiol in serum and brain uptake of estradiol during fetal and neonatal sexual differentiation in female rats. *Biology of Reproduction* 53,1198-207 (1995).
- Moral R, Santucci-Pereira J, Wang R, Russo IH, Lamartiniere CA, Russo J. In utero exposure to butyl benzyl phthalate induces modifications in the morphology and the gene expression profile of the mammary gland: an experimental study in rats. *Environmental Health* 10, 5(2011).
- Murakami T, Sato A, Inatani M, Sakurai H, Yumoto R, Nagai J, Takano M. Effect of neonatal exposure of 17beta-estradiol and tamoxifen on hepatic CYP3A activity at developmental periods in rats. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19, 96-102 (2004).
- Navarro VM, Sánchez-Garrido MA, Castellano JM, Roa J, García-Galiano D, Pineda R, Aguilar E, Pinilla L, Tena-Sempere M. Persistent impairment of hypothalamic KiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation. *Endocrinology*. 150, 2359-2567(2009).
- Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81, 1535-1565 (2001).

- Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K.
Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats.
Experimental Animals 58, 471-479 (2009).
- Osterlund M, Kuiper GG, Gustafsson JA, Hurd YL.
Differential distribution and regulation of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA within the female rat brain.
Molecular Brain Research 54, 175-180 (1998).
- Ramirez MC, Luque GM, Ornstein AM, Becu-Villalobos D.
Differential neonatal testosterone imprinting of GH-dependent liver proteins and genes in female mice.
Journal of Endocrinology 207, 301-308 (2010).
- Rasier G, Parent AS, Gérard A, Lebrethon MC, Bourguignon JP.
Early Maturation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion and Sexual Precocity after Exposure of Infant Female Rats to Estradiol or Dichlorodiphenyltrichloroethane.
Biology of Reproduction 77, 734-742 (2007)
- Ryan BC, Hotchkiss AK, Crofton KM, Gray LE Jr.
In utero and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberty, fertility, and anatomy of female LE rats.
Toxicological Sciences. 114, 133-148 (2010).
- Sakuma Y
Gonadal steroid action and brain sex differentiation in the rat.
Journal of Neuroendocrinology 21, 410-414 (2009).
- Sakurada Y, Sawai M, Inoue K, Shirota M, Shirota K.
Comparison of aryl hydrocarbon receptor gene expression in laser dissected granulosa cell layers of immature rat ovaries.
Journal of Veterinary Medical Science 73, 923-926 (2011)
- Schindler R, Nilsson E, Skinner MK.
Induction of Ovarian Primordial Follicle Assembly by Connective Tissue Growth Factor CTGF.
PLoS ONE 5, e12979 (2010)
- Schwarz JM, McCarthy MM.
The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat.
Horm and Behavior. 54, 662-668 (2008).
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A.
Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles.
Molecular Cellular Endocrinology 272, 22-37 (2007).
- Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K.
Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats.
Reproduction 125, 85-94 (2003).
- Shirota M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shirota K, Kelly PA.
Detection of in situ localization of long form prolactin receptor messenger RNA in lactating rats by biotin-labeled riboprobe.
Endocrine Journal. 42, 69-76 (1995).
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA.
Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver.
Molecular Endocrinology 4, 1136-1143 (1990).
- Sokka TA, Huhtaniemi IT.
Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat.
Biology of Reproduction 52, 1404-1409 (1995).
- Tena-Sempere M
Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function.
International Journal of Andrology 33, 360-368 (2010).
- Thomas FH, Vanderhyden BC.

- Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 19 (2006).
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK.
The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries.
Molecular Human Reproduction, 15, 795–803 (2009)
- Umekita Y, Souda M, Hatanaka K, Hamada T, Yoshioka T, Kawaguchi H, animoto A.
Gene expression profile of terminal end buds in rat mammary glands exposed to diethylstilbestrol in neonatal period. *Toxicology Letter* **205**, 15-25 (2011).
- Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L.
Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary.
Journal of Endocrinology 191, 549–558 (2006).
- Vannier B, Raynaud JP.
Long-term effects of prenatal oestrogen treatment on genital morphology and reproductive function in the rat.
Journal of Reproduction and Fertility 59, 43-49 (1980).
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP.
Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function.
Reproduction 131,1-9 (2006).
- Wang C and Roy SK.
Development of Primordial Follicles in the Hamster: Role of Estradiol-17β.
Endocrinology 148, 1707–1716 (2007)
- Watanabe C, Kuwagata M, Yoshimura S, Azegami J, Kojima K, Ono H, Nagao T.
An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates.
Congenit Anom (Kyoto) 43, 177-179 (2003).
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M
Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals.
Toxicology 183, 93-115 (2003)
- Yasuno K, Sakashita H, Araki S, Kobayashi R, Sakurada Y, Shiota M, Kamiie J, Shiota K.
Cutaneous hybrid cyst in a Sprague-Dawley rats.
Journal of Toxicologic Pathology 25, 175-178 (2012)
- Yeh J, Kim B.
Increasing blunting of inhibin responses to dynamic ovarian challenge is associated with reproductive aging in the rat.
*Reproductive Sciences*14, 10-19 (2007).
- Ying Chen, Wendy N. Jefferson, Retha R. Newbold, Elizabeth Padilla-Banks, and Melissa E. Pepling
Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and *in Vivo*.
Endocrinology 148, 3580–3590 (2007).
- Yoshida M, Watanabe G, Shiota M, Maekawa A, Taya K.
Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in donryu rats.
Journal of Reproduction and Development. 51, 707-714 (2005).
- Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL.
Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats.
Fitoterapia. 81, 998-1002 (2010)

Table 1

Changes in serum EE concentration in the neonatal rats after repeated oral treatment of 2 µg/kg of EE for 5 days from postnatal day 1

Time after treatment	Number of samples	EE (pg/mL)
Twenty four hours after the first treatment	4	12.8 ± 3.4 ^a
Six hours after fifth treatment	3	47.3 ± 8.1 ^b
Twenty four hours after fifth treatment	3	6.7 ± 2.1 ^a

Values represent mean ± SEM. Each sample consists serums from 3-5 rats at 24 hours after the first treatment and from 2 or 3 rats at 6 and 24 hours after the fifth treatment. Different characters shown in the serum EE concentration represent significantly different at p<0.01 by Turkey-Kramer's HSD test.

Table 2

Ages and body weights at eyelid opening (EO) and vaginal opening (VO) in the animals treated orally with 0, 10 or 20 µg/kg of EE on postnatal day 1. Values represent mean ± SEM.

EE (µg/kg)	0	10	20
N of animals	13	13	13
Age at EO	13.2 ± 0.9	12.7 ± 0.6	12.8 ± 0.8
BW at EO	35.2 ± 3.6	33.2 ± 2.3	33.0 ± 2.6
Age at VO	31.8 ± 1.2	31.2 ± 1.9	31.5 ± 2.3
BW at VO	127 ± 8.5	123 ± 13	122 ± 12

Values represent mean ± SEM.

Table 3

Number of estrous cycle revolved during each observation period in the animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10	20
N of animals	13	13	13
Postnatal week			
8-9	1.9 \pm 0.1	1.5 \pm 0.2	1.8 \pm 0.3
12-13	1.9 \pm 0.1	1.5 \pm 0.3	1.9 \pm 0.2
16-17	1.9 \pm 0.2	0.6 \pm 0.2**	1.2 \pm 0.3
20-21	1.7 \pm 0.2	1.2 \pm 0.3	0.7 \pm 0.2*

Values indicate mean \pm SEM.

* and **, Significantly different from control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

Table 4

Average length in days of estrous cycle during each observation period in the animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10	20
N of animals	13	13	13
Postnatal week			
8-9	4.0 \pm 0.0	3.6 \pm 0.5	4.2 \pm 0.5
12-13	4.2 \pm 0.2	3.5 \pm 0.6	4.2 \pm 0.5
16-17	3.7 \pm 0.3	2.3 \pm 0.8	3.4 \pm 0.8
20-21	3.5 \pm 0.4	2.6 \pm 0.7	2.0 \pm 0.7

Values indicate mean \pm SEM.

Table 5

Organ weights at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals

treated orally with 0, 10 or 20 µg/kg of EE on postnatal day 1.

EE (µg/kg)	0	10	20
N of animals	13	13	13
Body weight (g)	370 ± 10	366 ± 9	343 ± 9
Pituitary (mg)	18.0 ± 1.1	22.8 ± 1.2*	22.0 ± 1.3*
Liver (g)	11.4 ± 0.5	12.5 ± 0.4	11.6 ± 0.3
Adrenal glands (mg)	71.9 ± 3.2	85.6 ± 3.5*	90.1 ± 3.6**

Values indicate mean ± SEM.

* and ** Significantly different from control at p<0.05 and p<0.01, respectively.

Adrenal glands were weighed for 10, 11 and 11 in the 0, 10 or 20 µg/kg of EE treated group, respectively.

Table 6

Ovulation and reproductive organ weights at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals treated orally with 0, 10 or 20 µg/kg of EE on postnatal day 1.

EE (µg/kg)	0	10	20
N of animals examined	13	13	13
Animals found fresh oocytes	2	1	0
Ovaries (mg)	83.7	120	---
Uterus (mg)	664	322	---
N of oocytes	13.5	11	---
Animals found old oocytes	4	0	0
Ovaries (mg)	91.1 ± 6.3	---	---
Uterus (mg)	463 ± 33	---	---
Animals found no oocyte	7	12	13
Ovaries (mg)	69.0 ± 6.4	55.1 ± 1.5	61.1 ± 5.5
Uterus (mg)	464 ± 53	520 ± 15	503 ± 10

Values indicate mean ± SEM.

Table 7

Histological findings of ovaries collected at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals treated orally with 0 or 10 µg/kg of EE on postnatal day 1.

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10
N of animals examined	5	6
No corpus luteum	0	3
Formation of cystic follicles	0	6

Table 8

Incidence of macroscopic abnormality of the mammary gland at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 in the animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10	20
N of animals examined	13	13	13
N of animals with a white spot	0	0	1

Table 9

Cell densities of adrenal glands collected at the terminal necropsy on postnatal week 22-23 from the animals treated orally with 0, 10 or 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day 1.

Values indicate mean \pm SEM.

* Significantly different from control at $p < 0.05$.

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10	20
N of animals examined	3	4	4
N of cells/ 50mm^2 zona fasciculata	140 \pm 19	102 \pm 9	91 \pm 6*
N of cells/ 50mm^2 zona fasciculata	315 \pm 22	290 \pm 31	197 \pm 22*

Table 10

Ovulation and organ weights on the day of vaginal opening (VO) in the animals treated orally with 0 or 10 µg/kg of EE on postnatal day 1.

EE (µg/kg)	0	10
N of animals examined	6	7
Age at VO	30.3 ± 0.4	29.1 ± 0.3
Body weight at VO	114 ± 14	106 ± 8
N of animals ovulated	6	5
N of oocytes in the ovulated animals	12.2 ± 1.9	12.2 ± 2.2
Ovarian weight (mg)	35.1 ± 2.8	31.5 ± 2.8*
Uterus weight (mg)	180 ± 35	143 ± 19
Pituitary weight (mg)	5.7 ± 0.7	5.6 ± 0.5
Adrenal weight (mg)	28.8 ± 2.5	25.7 ± 2.4

* Significantly different from control at p<0.05.

Table 11

Ages and body weights at eyelid opening (EO) and vaginal opening (VO) in the animals treated orally with 0, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day (PND) 1, 5 or 7.

Administration of EE	N	Age at EO (days)	BW at EO (g)	Age at VO (days)	BW at VO (g)
PND 1					
0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	13.5 \pm 0.3	34.1 \pm 1.1	33.3 \pm 1.1	128 \pm 7
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	13.3 \pm 0.3	33.1 \pm 1.4	33.0 \pm 1.6	129 \pm 10
PND 5					
0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	13.4 \pm 0.2	33.9 \pm 0.8	33.3 \pm 0.3	131 \pm 2
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	13.3 \pm 0.2	32.7 \pm 0.8	31.2 \pm 0.9	114 \pm 5
PND 7					
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	13.0 \pm 0.0	32.7 \pm 1.1	32.5 \pm 1.3	124 \pm 4

Values indicate mean \pm SEM.

Table 12

Number of estrous cycle revolved during each observation period in the animals treated orally with 0, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of EE on postnatal day (PND) 1, 5 or 7.

Administration of EE	N	Postnatal week 8-9	Postnatal week 12-13	Postnatal week 16-17	Postnatal week 20-21
PND 1					
0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	1.5 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	1.5 \pm 0.5	1.5 \pm 0.6	1.3 \pm 0.6	0.5 \pm 0.3
PND 5					
0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	1.8 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	2.4 \pm 0.2	2.0 \pm 0.2
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	1.6 \pm 0.3	1.8 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	1.1 \pm 0.4
PND 7					
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	1.3 \pm 0.8	1.8 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	0.8 \pm 0.5

Values indicate mean \pm SEM.

Table 13

Average length in days of estrous cycle during each observation period in the