

Summary of results (PND14-10wk)

EE ($\mu\text{E}/\text{kg}$)	In vivo estrogenic activity	Uterus		Hormone	Gene expression in the hypothalamus	Vaginal opening	Onset of abnormal cycle
		Develop- ment of the uterine gl.	ER α				
0				-		31.1	32wk~
0.02	+			-		31.6	32wk~
0.2	+		10wk	-	PND14	31.4	22wk~
2	+		↓	-	FSH ↓	31.3	18wk~
20	+	PND21 ↓	↓↓	-	FSH ↓	31.1	14wk~
200	+	PND21 ↓	↓↓	-	FSH ↓	31.3	10wk~

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：	渡辺 元	東京農工大学農学部
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

機能分化の臨界期における化学物質曝露の遅発型影響を明らかにし、その発現メカニズム解明と指標の確立を目的として、エストロゲン活性評価の陽性対照物質である17 α -ethinylestradiol (EE)をモデル化学物質として、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる生後1日の雌ラットに、EEを0~2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回皮下投与あるいは5日間反復経口投与して、原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす遅発影響を量と反応との関係から検討した。さらに0~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を単回経口投与して、曝露の期間および時期の影響を検討した。

その結果、両投与経路ともに対照群より若齢で性周期の回帰が停止し、その時期は用量の低下に伴い遅延し、設定した最小用量（皮下0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、経口0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）でも影響が認められた。性周期回帰停止の他にも卵巣における嚢胞状卵胞形成および黄体の欠如、乳腺の過形成ならびに副腎重量の増加も認められた。単回投与と比較して反復経口投与による影響は増強して認められたが、投与24時間後の血中EE濃度は初回投与と5回投与後で差はなく、低用量でも反復曝露が影響を増強させることが示唆された。若齢での性周期回帰停止誘発の感受性は生後1日が最も高く生後7日でも感受性のあることが明らかになった。遅発影響が最も顕著であった反復経口投与を行っても原始卵胞数に影響は認められなかったが、初回排卵が遅延し、幼若期における性腺刺激ホルモンに対する感受性も低下していることが明らかになった。さらに、生後10日の卵巣で卵胞発育関連遺伝子発現に対する影響が示唆され、遅発影響の背景に存在する投与後早期の変化を解析することにより、遅発影響発現のメカニズムが明らかになるものと考えられた。

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期間は、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。このような時期は外来性の化学物質に対する感受性が高い一方で、性成熟までに時日を要するため、卵巣機能への影響評価は必ずしも容易ではない。

本研究では化学物質曝露の原始卵胞をはじめとする卵巣に及ぼす影響を明らかにし、その発現メカニズムに迫ることを目的として、新生雌ラットをモデル化学物質に選定した合成エストロゲンの17 α -ethinylestradiol (EE)で皮下単回曝露、経口反復曝露ならびに単回経口曝露を行い、通常の生殖発生毒性試験の試験計画では検出が困難と考えられる遅発影響を、用量と影響ならびにその発現時期から検討した。

モデル化合物としたEEは経口経路でもエストロゲン活性を発揮できる一方で、内因性のエストロゲンであるestradiol-17 β と構造が極めて類似していることから、本研究で得られた成果が、経口曝露が想定されるエストロゲン活性化学物質全般の遅発影響評価にも適用し得る科学的根拠が得られるものと期待される。さらにEEは子宮肥大試験をはじめとする*in vivo*あるいは*in vitro*のエストロゲン活性評価試験において陽性対照物質として用いられていることから、既存のデータを利用する上でも有用であると考えられる。

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[Cr1: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

Fig. 1に本研究における実験計画を模式的に示した。生後1日に、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、皮下投与実験(Exp. 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。

経口投与実験(Exp. 2-4)では、Watanabeらの報告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経口投与を行った。

投与容量は皮下投与では1 mL/kg体重とし、経口投与では10 mL/kg体重として投与日毎に体重を測定して容量を算出した。対照群には媒体としたコーン油(和光純薬)を投与した。

4. 投与量の設定根拠

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・g/kg/dayであったことから、Exp. 1では最高用量にはこれを十分に上回る2 μ 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 μ 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、Exp. 2では0.4・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。Exp. 3および4では反復経口投与の総用量を中心に設定した。

5. 哺育期間中の観察および測定

乳児は個別に体重を測定し、一般状態を観察した。さらに身体的分化の程度を知るために両側の眼瞼の開裂時期を調べ、体重を測定した。動物は生後 21 日に離乳した。

6. 離乳後の観察

4 週齢から毎日膣開口の有無を調べ、膣開口が確認された動物は体重を測定した。

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、最終解剖まで継続し、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、発情期が認められなかった例を持続休止期に分類し、それ以外をその他に分類した。また、観察期間中に回帰した周期の回数および平均周期日数を算定した。剖検前にも性周期の回帰状況を観察し、可能な限り同じステージで剖検した。

7. 剖検

(ア) 7 日齢および 10 日齢の剖検

Exp. 1 および 2 で実施した。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、Exp. 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。

(イ) 23 日齢の剖検

Exp. 2 の投与方法で 0.4 および 2 μg/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酔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 μg/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) で深麻酔の後開腹し、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%パラヒ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。採取した卵巣は秤量後急速凍結して-80℃に保管し、遺伝子発現解析に供した。剖検では子宮重量も測定した。

(ウ) 膣開口日の剖検

Exp. 1-3 で実施した。膣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。

(エ) 最終剖検

Exp. 1 では 33 週齢まで性周期を観察して、可能な限り発情期に剖検を行った。

Exp. 2-4 では 21 週齢まで性周期を観察して、Exp. 2 および 4 では可能な限り発情期に剖検を行い、Exp. 3 では発情期または発情休後期に剖検を行った。剖検に際して動物は、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 5 mm 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。乳腺も同様に採取した。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。

8. 標本の解析

(ア) 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。Exp. 2 では連続切片から約 5 枚毎に切片を選び、そこに数えられる原始卵胞の数を数えた。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、組織学検査に供した。

(イ) 免疫組織学検査

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、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。また、乳腺組織評価のために、抗 α -SMA マウス抗体ならびに抗リン酸化 STAT5 抗体を用い、ABC で可視化した。

(ウ) 副腎の形態計測遺伝子発現解析

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、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 (株式会社クラーク) を用いて、副腎の全体、髄質および皮質それぞれ最長になる縦軸と横軸を測定した。さらに皮質は球状帯、束状帯および網状帯の各 3 層に識別し同様に測定した。

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、50000 μm^2 あたりの細胞数をカウントした。

(エ) 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。

(オ) 遺伝子発現解析

Exp. 1 および 2 において凍結保存した子宮、肝

臓および卵巣は Trizol 試薬 (インビトロジェン株式会社) を添加し、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。

(カ) 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、PRL 受容体ロングフォーム (PRLRL) およびショートフォーム (PRLRS)、cytochrome P450 (CYP) 3A9, estrogen \cdot receptor (ER α)、progesterone receptor (PR)、luteinizing hormone 受容体 (LHR)、follicle-stimulating hormone 受容体 (FSHR)、estrogen β 受容体 (ER β)、growth differentiation factor-9 (GDF-9)、inhibin α 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。

9. 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 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。

10. 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、分散の一様性を確認して 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. 身体的発達に及ぼす影響

いずれの実験においても体重増加に EE 投与の影響は認められなかった (データは示さず)。Table 2 に示すように、いずれの実験においても開眼の日齢および膈開口の日齢に影響は認められなかった。

3. 性周期に及ぼす影響

各観察期間における性周期のタイプ、構成するステージを Figs. 2-3 に示し、周期回帰回数ならびに平均周期日数をおよび Tables 3-4 に示した。いずれの実験においても EE 投与群において性周期の異常が対照群と比べて若齢で認められた。性周期の異常は EE の用量に逆相関して遅延して認められた。単回皮下投与した Exp. 1 では 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の用量では 20 週齢から異常が増加し、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群でも 32 週齢から異常が増加した (Fig. 2)。経口投与でも、2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では観察を開始した 8 週齢で既に連続発情を示す例が多数を占めていたが 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群では、16 週齢で同様

の頻度となり、用量が低いと、高週齢になるまで影響が検出されないことが明らかになった。

反復経口投与 (Exp. 2) と比較すると単回経口投与 (Exps. 3, 4) では性周期に及ぼす影響が軽度で、反復経口投与では 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において 16 週齢から発情期あるいは発情前期像を示す日の割合が増加し (Fig. 3)、発情回帰回数が減少したのに対して (Table 3) 5 倍以上の EE を単回経口投与した Exp. 3 あるいは 4 ではこれらの変化が不明瞭で、認められた時期も遅延していた。

単回投与による感受期を検討した Exp. 4 では、生後 1 日投与群に最も顕著な影響が認められたが、生後 7 日投与群でも 22 週齢から異常が増加の傾向を示した。

4. 剖検成績

Table 5 に示すように、EE 投与群で排卵の認められない例が増加した。排卵が認められなかった例について比較すると、反復経口投与を行った Exp. 2 のみで卵巣重量が有意な低値を示した。Fig. 5 に示すように、EE 投与群の卵巣には多数の囊胞状卵胞が形成され、黄体欠く例が増加していた (Table 6)。

その他の器官では下垂体重量が Exp. 1-4 の間で共通して増加していた (Table 7)。また、Exp. 4 の生後 7 日投与群を除き、副腎重量の増加も共通して認められたが、対照群との間に有意差が認められたのは単回経口投与を行った Exp. 3 のみであった。Exp. 3 で得られた副腎組織の形態計測を行った。Table 8 および Figs. 6-8 に示すように、皮質網状帯が厚さを増し、細胞が肥大していることが示唆された。

Exp. 1-4 で共通して乳腺の白色班が認められた (Fig. 9)。単回皮下投与して 32-33 週齢で剖検した Exp. 1 ならびに反復経口投与して 22-23 週齢で出現頻度が増加し、乳汁様液の漏出例も認められた。組織学検査では乳腺ならびに管腔上皮の過形成が認められた (Table 9, Fig. 9)。さらに、プロラクチン受容体の細胞内情報伝達分子であるリン酸化 STAT-5 陽性シグナルが過形成部位に観察された (Fig. 9)。

重量に明瞭な影響は認められなかったが、単回経口投与を行った Exp. 3 で、EE 投与群の子宮で、子宮腺の減少ならびに内腔上皮細胞における PCNA 陽性細胞の割合が低下していることが免疫組織化学ならびに形態計測で明らかになった (Figs. 10-11)。

5. 血清中性腺刺激ホルモン濃度

Exp. 2で採取した血清中の性腺刺激ホルモン濃度をFig. 12に示した。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。

6. 最終解剖時採取器官における遺伝子発現解析

単回皮下投与を行った Exp. 1 および反復経口投与を行った Exp. 2 の最終解剖で得られた組織について 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 (Figs. 12, 13)。

Exp. 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。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 α* 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。

Exp. 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 α* 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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で各 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。

7. 初回排卵に及ぼす影響

反復経口投与を行った Exp. 2 ならびに単回経口投与を行った Exp. 3 では膣開口日に剖検して排卵検査を行った。Table 10 および Figs. 15-16 に示すように、Exp. 2 では EE 投与群で用量に依存した排卵率の低下が認められ、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では有意差が認められ、排卵動物で数えられた排卵数も有意に低下した。Exp. 3 でも 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群で排卵率がやや低下したが、排卵率および排卵数ともに対照群との間に有意差は認められなかった。Exp. 2 において膣開口1週間後に剖検して黄体形成の有無を確認したところ、8 例中 7 例に黄体の形成が確認され、初回排卵が膣開口より遅延して起こることが明らかになった。

幼若期における卵巢機能を知るために、反復経口投与を行った Exp. 2 の動物の 23 日齢に性腺刺激ホルモンの eCG を 5IU 皮下投与して排卵を誘発したが、対照群は全例に排卵が誘発されたのに対して 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群で排卵する例はなかった。さらに誘起排卵前日に hCG を 10IU 皮下投与して排卵刺激を加えた結果、全例に排卵が誘発された

ものの排卵数は少なかった (Fig. 17)。また、23 日齢を含めて卵巢および子宮重量が有意な低値を示した。

排卵が図 1 に結果を示した。EE 投与群で LHR mRNA の発現が低下した。幼若ラットの卵巢で 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 日齢の卵巢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 日齢ですでに卵巢での 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。

8. 新生児期の卵巢機能

(ア) 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 Exp. 1 の動物の 10 日齢および最終剖検 (22-23 週齢) 時に採取した卵巢に数えられた原始卵胞数を Fig. 19 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。また、卵巢組織も EE 投与群と対照群との間で明瞭な差は認められなかった (Fig. 20)。

(イ) 遺伝子発現解析

Fig. 21 に結果を示した。対照群との間に有意差の認められる遺伝子はなかったが、EE 投与群で LHR mRNA の発現が用量に依存して低下した。また、3 β -HSD および aromatase mRNA 発現が低下した。10 日齢の卵巢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。

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。また、ラットでは胎児期に増殖を終了し減数分裂の前期で分裂を休止した卵母細胞が生後3日までに体細胞に囲まれて原始卵胞を形成し、生殖細胞の貯蔵組織となる時期でもある。

本研究はこの時期に子宮重量を僅かに増加させる用量のEEを皮下あるいは経口経路で曝露し、遅発影響を調べた。単回曝露、反復曝露のいずれによってもEEは性周期の回帰異常を中心とした遅発影響を及ぼすことが明らかになった。さらに曝露量が低いと異常の発現時期が遅延、加齢性変化を生じる時期と重複し始めることが示唆された。生殖発生毒性試験で評価対象とされていない加齢動物で認められる遅発影響の評価方法は新たな検討課題であると考えられる。

低用量での反復曝露はその総投与量の2倍の用量の単回曝露より顕著な影響が認められた。投与24時間後の血中EE濃度は初回投与と5回投与後で差はなく、低用量でも、新生児におけるEEの標的への繰り返し曝露が影響を増強させているものと考えられる。

乳腺の過形成も反復経口投与で顕著に認められた。単回皮下投与でも同様の影響が認められたが、単回経口投与で明瞭な影響は認められなかった。用量の低下に伴い性周期回帰停止が遅延して認められることを考慮すると、短回皮下投与動物に認められた乳腺の過形成は、単回経口投与と比較して高週齢で観察したことにより認められるようになったものと推察される。過形成が認められた乳腺ではプロラクチン受容体情報伝達系の活性化が認められたことから、加齢が内分泌の不均衡を促進しているものと考えられた。

性周期の異常は生後5日までのEE投与だけでなく生後7日の投与によっても認められた。EEは原始卵胞に影響を及ぼさないことが明らかになったが、性腺刺激ホルモンに対する反応性の低下、初回排卵の遅延は、卵巢に対する影響を示唆するものである。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、遅発型影響のメカニズム解析においてもバイオマーカーの検索においても、投与初期からの解析が重要であると考えられた。

EEの単回経口投与によって副腎重量が顕著に増加した。陰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。本研究において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。

形態計測の結果、ステロイドホルモン産生細胞が分布する網状帯細胞の肥大が副腎重量を増加させているものと考えられた。ラットの副腎ではプレグネノロンを起点としてコルチコステロンおよびアルドステロンの他にアンドロゲンおよびエストロゲンが産生されている。新生児期エストロゲン活性物質曝露による副腎機能の変化については今後明らかにされるべき課題と考えられる。

E. 結論

臨界期におけるEEの反復曝露は卵巢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。遅発影響として若齢での性周期回帰停止、卵巢における嚢胞状卵胞形成および黄体の欠如、乳腺の過形成ならびに副腎重量の増加が認められたが、曝露用量の低下に伴う性周期異常の発現遅延は、メカニズムに基づく新たな評価方法確立の必要性を示唆するものと考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shiota M, Kawashima J, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shiota 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) Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Shiota K.
- 2) 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) 代田 眞理子, 川嶋 潤, 中村 知裕, 小川 祐布子, 小林 綾佳, 原 茜, 吉田 緑: 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)曝露の長期的影響第38回日本毒性学会学術年会 (2011年7月)
- 2) Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Hara A, Kobayashi A, Shiota K, Yoshida M. Delayed effects of low-dose 17- α ethynylestradiol on neonatal female rats. *Second World Congress on Reproductive Biology*. (2011年10月)
- 3) Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Effects of Neonatal exposure to ethynylestradiol on the puberty of female rats. *Society of Toxicology 2012 Annual Meeting* (2012年3月)
- 4) 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)
- 5) 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響 第39回日本毒性学会学術年会 (2012年7月)
- 6) Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Sugata E, Suzuki S, Ogawa Y, Shiota K. Effects of Neonatal oral exposure to ethynylestradiol 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

- 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, Shiota 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, Shiota 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).
- 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)
- 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 1. *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).
- 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 Letteer 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-17 . .
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)

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, Shirota 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 with EE during the neonatal period.

Exp. 1 Subcutaneous injection on postnatal day 1

Dose of EE (µg/kg)	0	0.08	0.4	2
Number of animals examined	11	10	11	11
Ages at eyes opening (day)	13.8 ± 0.1	13.9 ± 0.2	13.7 ± 0.1	13.6 ± 0.1
BW at eyes opening (g)	35.1 ± 0.9	34.8 ± 0.9	35.4 ± 0.9	35.0 ± 0.9
Ages at vaginal opening (day)	32.1 ± 0.5	33.0 ± 0.5	32.2 ± 0.5	32.5 ± 0.5
BW at vaginal opening (g)	115 ± 3	120 ± 3	118 ± 3	121 ± 3

Exp. 2 Repeated oral administration from postnatal day 1 to 5

EE (µg/kg)	0×5	0.4×5	2×5
N of animals	10	9	10
Age at EO	13.5 ± 0.2	13.8 ± 0.2	13.7 ± 0.2
BW at EO	34.8 ± 0.8	34.2 ± 1.2	33.4 ± 0.4
Age at VO	33.0 ± 1.0	33.1 ± 0.8	31.9 ± 0.4
BW at VO	125 ± 2.9	121 ± 2.7	115 ± 3.1

Table 2 (continued)

Exp. 3 Oral administration on postnatal day 1

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	10	20
N of animals	13	13	13
Age at EO	13.2 \pm 0.9	12.7 \pm 0.6	12.8 \pm 0.8
BW at EO	35.2 \pm 3.6	33.2 \pm 2.3	33.0 \pm 2.6
Age at VO	31.8 \pm 1.2	31.2 \pm 1.9	31.5 \pm 2.3
BW at VO	127 \pm 8.5	123 \pm 13	122 \pm 12

Exp. 4 Oral administration on postnatal day 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 represent mean \pm SEM.

Table 3

Number of estrous cycle revolved during the observation period in the animals treated with EE during the neonatal period.

Exp. 1 Subcutaneous injection on postnatal day 1

Dose of EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	0.08	0.4	2
N of animals	8	7	8	8
Postnatal week				
8-9	1.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	1.6 \pm 0.2
12-13	2.4 \pm 0.2	2.4 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	1.8 \pm 0.2
16-17	1.6 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	1.3 \pm 0.2	1.4 \pm 0.2
20-21	2.1 \pm 0.3	2.4 \pm 0.3	1.6 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3*
24-25	2.0 \pm 0.3	2.3 \pm 0.3	1.5 \pm 0.3	1.3 \pm 0.3
28-29	1.8 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4	1.3 \pm 0.3	1.1 \pm 0.3
32-33	1.6 \pm 0.3	1.4 \pm 0.4	0.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.3

Exp. 2 Repeated oral administration from postnatal day 1 to 5

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0 \times 5	0.4 \times 5	2 \times 5
N of animals	10	9	10
Postnatal week			
8-9	2.4 \pm 0.2	1.9 \pm 0.3	0.1 \pm 0.1**
12-13	2.3 \pm 0.5	1.6 \pm 0.7*	0.3 \pm 0.7**
16-17	2.2 \pm 0.2	0.8 \pm 0.3**	0.2 \pm 0.1**
20-21	2.1 \pm 0.3	0.7 \pm 0.4**	0.2 \pm 0.1**

Table 3 (continued)

Exp. 3 Oral administration on postnatal day 1

Exp. 4 Oral administration on postnatal day 1, 5 or 7

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*	
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.

* 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 with EE during the neonatal period.

Exp. 1 Subcutaneous injection on postnatal day 1

Dose of EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	0.08	0.4	2
N of animals	8	7	8	8
Postnatal week				
8-9	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.3
12-13	4.0 ± 0.0	4.6 ± 0.5	4.1 ± 0.1	4.4 ± 0.2
16-17	4.6 ± 0.4	4.4 ± 0.1	5.5 ± 0.8	5.5 ± 0.6
20-21	4.0 ± 0.0	4.1 ± 0.1	3.8 ± 0.1	$4.7 \pm 0.2^*$
24-25	4.0 ± 0.0	4.3 ± 0.2	4.7 ± 0.9	4.1 ± 0.2
28-29	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.7 ± 0.4	6.5 ± 1.4
32-33	4.2 ± 0.1	4.2 ± 0.4	5.5 ± 0.5	3.7 ± 0.9

Exp. 2 Repeated oral administration from postnatal day 1 to 5

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0×5	0.4×5	2×5
N of animals	10	9	10
Postnatal week			
8-9	4.0 ± 0.0	5.2 ± 0.6	8.0 (1)
12-13	4.0 ± 0.0	4.4 ± 0.4	5.0 (2)
16-17	4.0 ± 0.0	5.3 ± 0.8	5.5 (2)
20-21	4.0 ± 0.0	4.5 ± 1.0 (3)	5.0 (2)

Parentheses indicate the number of animals determined the average estrous length.

Table 4 (continued)

Exp. 3 Oral administration 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

Exp. 4 Oral administration on postnatal day 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	3.8 \pm 0.6	4.4 \pm 0.5	4.4 \pm 0.5	5.0 \pm 0.7
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	3.6 \pm 1.2	4.2 \pm 3.3	3.2 \pm 2.5	2.5 \pm 1.5
PND 5					
0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3.9 \pm 0.6	4.0 \pm 0.9	4.1 \pm 0.8	4.3 \pm 0.2
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	9	3.5 \pm 0.7	3.7 \pm 1.5	3.9 \pm 1.4	1.8 \pm 0.6
PND 7					
10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4	2.3 \pm 1.3	5.9 \pm 2.2	5.0 \pm 1.4	1.8 \pm 1.6

Values indicate mean \pm SEM.