

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による生殖内分泌機能の遅発影響に視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が果たす役割と閾値に関する研究

研究分担研究課題：遅発影響の発現機序検索。特に視床下部LHサージ制御部位のキスペプチンの変化と生殖機能遅発影響について

研究分担者：高橋美和 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
研究協力者：井上 薫 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部
市村亮平 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

研究要旨

1. 遅発性影響の初期変化を探るため、生後0日の雌性 Wistar Hannover ラットに無影響量 (0.02, 0.002 µg/kg)、遅発性影響量 (20, 0.2 µg/kg) および脱雌性化用量 (2,000 µg/kg) の 17α-ethynylestradiol (EE) を1回皮下投与し、対照群には sesame oil を投与した。発達期における視床下部前部および後部における kiss1 mRNA 発現解析、血清 FSH 濃度測定、雌性生殖器の組織学的検索を行った。EE 投与群では、生後14および21日において視床下部前部における kiss1 発現低下が認められ、EE の新生児期曝露がキスペプチンニューロンの発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。視床下部前部 (AVPV 相当部位) においては遅発性影響量よりもさらに低い用量から kiss1 mRNA の発現低下がみられ、非常に高い感受性を持つことが示された。

2. 遅発性影響における ERβ の関与について検討するため、生後0日齢の雌性 Donryu ラットに PPT (ERα アゴニスト; 10 mg/kg)、DPN (ERβ アゴニスト; 10 mg/kg) を1回皮下投与あるいは併合投与し、25週齢まで性周期の観察を行った。PPT より作用は弱いものの、DPN 群においても性周期停止の早期化が認められた。一方、今回の検索では性周期に対する PPT、DPN 併合投与の影響は見いだされず、遅発性影響の発現における ERβ の関与について結論を出すにはさらに検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

化学物質の臨界期曝露による遅発性影響は、現行の毒性試験では検出が困難であり、リスク評価上の課題となっている。

先行研究において、生後0日の雌性 Wistar Hannover ラットに 0.02 ~ 200 µg/kg の 17α-ethynylestradiol (EE) を単回投与すると、性成熟には影響しないが、遅発性影響として 0.2 µg/kg 以上で性周期の早期停止を起こすことを報告した (Takahashi et al., 2013)。さらに、EE の新生児期曝露を受けたラットでは、性周期の早期停止に先行して、排卵制御中枢である視床下部前腹側周囲核 (AVPV) におけるキスペプチンニューロン

の機能低下が生じていることを見いだしている (Ichimura et al., 2015)。また、EE の新生児期曝露を受けたラットの視床下部では、生後14日において、性周期の早期停止を起こす用量よりもさらに低い 0.02 µg/kg からキスペプチンをコードする kiss1 mRNA の発現低下が認められた (Takahashi et al., 2014)。今年度は EE の新生児曝露による遅発性影響の初期変化を明確にするため、性成熟前の視床下部における kiss1 mRNA 発現を部位特異的に解析し、発達期のキスペプチンニューロンに対する影響と早期指標の可能性について検討した。

遅発性影響の発現に関わるエストロゲン

受容体 (ER) について、ER α アゴニストである PPT、ER β アゴニストである DPN を用いたこれまでの検討から、性周期異常は主に ER α を介して起こると考えられる。しかし、EE (ER α および β アゴニスト) と同等の性周期異常を起こすには非常に高用量の PPT が必要であること、DPN あるいは別の ER β アゴニストの新生児期曝露によって性周期異常が起きるといった報告 (Bateman and Patisaul, 2008; Patchev et al., 2004) があることから、遅発性影響の発現に ER β も関与する可能性が考えられる。今年度は PPT、DPN 高用量併合曝露による性周期への影響および PPT、DPN 皮下投与後の体内濃度について検討した。

B. 研究方法

B-1. EE の新生児期曝露による初期変化の検索

Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア、東京)、妊娠 14 日齢を 9 腹、妊娠 15 日齢を 17 腹購入し自然分娩させた。出産が遅れた 2 腹を除き、合計 24 腹を実験に使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、生後 24 時間以内に同じ出産日の児動物を全て回収・混合し、雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた。1 群 4 腹の児動物に EE (Sigma Aldrich, USA, CAS No. 57-63-6) を 1 回皮下投与した。投与用量は先行研究の結果を参照し (Takahashi et al., 2013)、遅発性影響として性周期の早期停止を起こさない用量 (無影響量; 0.002、0.02 $\mu\text{g}/\text{kg}$)、性周期の早期停止を起こす用量 (遅発性影響量; 0.2、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) および脱雌性化用量 (2,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) とし、対照群には溶媒である sesame oil を投与した。

生後 12、14 および 21 日に各群 5 匹の雌児動物について、体重を測定後、性ホルモン測定のため断頭採血し、血清を凍結保存した。生後 14 および 21 日では、脳、下垂体、卵巣・子宮・膣を摘出した。脳は視床下部を切り出し、視交叉を境界として前部 (AVPV に相当) と後部 (弓状核 (ARC) に相

当) に分けて液体窒素で急速凍結した。比較のため、対照群の雄ラットについても同様に視床下部の組織を採取した。脳以外の臓器は 10% リン酸緩衝ホルマリンに浸漬した。組織固定後に卵巣および子宮重量を測定し、定法に従って HE 染色標本作製、鏡検した。子宮は 3mm 間隔で横断した全ての切片について子宮腺の数を計測した。

Lutenizing hormone (LH) および follicle-stimulating hormone (FSH) 濃度は、凍結保存した血清を用いて、National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) から提供されたラジオイムノアッセイキットを使用して測定した (Taya et al., 1983)。

生後 14 および 21 日の視床下部前部および後部における遺伝子発現は real-time RT-PCR で解析した。Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を使用して凍結組織から total RNA を抽出した。Total RNA 2 μg を鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による cDNA 合成を行い、ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914_ml, KISS1 receptor (Kiss1r): Rn00576940_ml。内部標準である GAPDH は、TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems) を用いて測定した。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。生後 14 日の視床下部前部における対照群の値を 1 とし、相対的な発現量を算出した。

B-2. ER α , β アゴニストおよびその複合投与による遅発性影響の検索

これまでの実験結果と比較するため、先行研究と同系統の Donryu ラットを使用した。所内で維持している Donryu ラットを 2

日間にわたり交配させ、合計 30 腹自然分娩させた。出産が遅れた 3 腹を除き、27 腹を実験に使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、生後 24 時間以内に同じ出産日の児動物を全て回収・混合し、雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた。6~7 腹ずつ 4 群に分け、溶媒である 10%DMSO/ sesame oil (対照群)、PPT (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9)10 mg/kg (PPT 群)、DPN (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) 10 mg/kg (DPN 群) を児動物に 1 回皮下投与した。併合投与群では、PPT 10 mg/kg および DPN 10 mg/kg を各 1 回皮下投与 (PPT+DPN 群) した。

生後 21 日に離乳し、PPT 群は 32 匹、その他の群は 36 匹に雌児動物数を調整した。生後 24 日から膣開口の有無を観察し、膣開口を認めた日の体重を測定した。体重測定は生後 13 週までは毎週、その後は隔週に実施した。

10 週齢時に正常性周期を示す動物の中から発情前期の個体を各群 8 匹選抜し、LH サージのピーク時刻である 16:00 に解剖を行った。各群 5 匹については体重測定後、性ホルモン測定のため断頭採血し、血清を凍結保存した。脳、下垂体、乳腺、卵巣、子宮、膣を摘出し、卵巣、子宮重量を測定した。脳から視床下部を切り出し、視交叉を境界として前部 (AVPV に相当) と後部 (ARC に相当) に分け、液体窒素で急速凍結した。その他の臓器は 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定後、定法に従って HE 染色標本作製した。各群 3 例は脳凍結切片作製用に 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定を行った。脳以外の臓器は上記と同様に組織学的検索に供した。

7 週齢から 25 週齢まで性周期の観察を行った。性周期の判定は、週 5 日膣スミアを採取し 4 日周期で規則的に発情が回帰する場合を正常性周期、それ以外を異常性周期に分類した。特に発情前期あるいは発情期が 5 日間連続した場合を持続発情とした。PPT 群および PPT+DPN 群では、観察初期

から一部の個体で性周期異常が認められた。正常性周期の個体を選抜して解剖したことにより、異常性周期の割合が人為的に上がるのを是正するため、10 週の時点で異常性周期を示す個体を各 1 例ずつ除外した。

性周期の観察を終了後、26 週齢で発情周期に関係なく全ての動物を解剖した。下垂体、卵巣、子宮、膣、肝臓、副腎を摘出し、卵巣および子宮重量を測定した。臓器は全て 10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、HE 染色標本作製した。

B-3 . PPT および DPN の体内濃度分析

雌児動物と同様に、PPT 10 mg/kg あるいは DPN 10 mg/kg を 1 回皮下投与した新生児雄ラットについて、投与後 2、4、24 時間における全身、肝臓および脳における PPT、DPN 濃度を測定した。分析は (財) 日本食品分析センター (東京) に依頼し、LC-MS/MS 法で測定した (定量限界 0.01 ppm)。肝臓および脳は 3 例分の組織を一括して分析に使用した。

B-4 . 統計学的解析

血清性ホルモン濃度、体重、臓器重量、子宮腺の数、遺伝子発現量および膣開口日齢は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較検は Dunnett の方法で対照群との間で有意差検定を行った。正常性周期の割合については Fisher の直接確率法で検定した。

(倫理面への配慮)

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

C . 研究結果

C-1. EE の新生児期曝露による初期変化の

検索

生後7日までに、対照群および2,000 µg/kg 群の児動物各1例が死亡した。その後は死亡や異常を示す動物は認められなかった。生後21日までの各群の平均体重はほぼ同様の推移を示した。途中解剖では、一部の群の体重に統計学的有意差が散見されたが、一定の傾向や継続性はなく偶発的变化と考えられた (data not shown)。

対照群の血清 FSH 濃度は生後12日が最も高く、日齢に従い低下した (図1)。無影響量および遅発性影響量では、生後14日に最も高値を示した。いずれの日齢においても対照群との間に統計学的有意差は認められなかった。脱雌性化用量では、生後12および14日の FSH 濃度は顕著に低く、生後21日では他群よりも有意に高値を示した。血清 LH 濃度については、群間差は認められなかった。

卵巣、子宮重量の結果を図2に示す。脱雌性化用量では、生後14日における卵巣および子宮重量が対照群に比べて有意に低く、21日においても同様の傾向がみられた。遅発性影響量では、生後14日の卵巣、子宮重量が若干低下していたが、21日では対照群とほぼ同等であった。無影響量では生後14、21日ともに対照群との差はみられなかった。

対照群の卵胞発育は、生後14日では小型胞状卵胞、生後21日では大型胞状卵胞の段階まで進んでおり、無影響量および遅発性影響量においても同様であった。脱雌性化用量では卵胞発育がやや遅延しており、他群に比べ卵胞が小型であった。

生後14日の子宮腺の数は、脱雌性化用量群ではやや増加していたが、いずれの群も有意差は認められなかった (図3)。生後21日では0.002 µg/kg 群を除いた群において、子宮腺の数が対照群よりも有意に減少あるいは減少傾向を示した。

生後14および21日における膣粘膜上皮は、3~4層の非角化上皮細胞で構成されていた (図4)。脱雌性化用量群のみで、生後14日に粘膜最上層に好酸性の角化細胞や粘

液含有細胞の出現が観察され、他群とは異なる組織像を示した。

視床下部前部および後部における kiss1 mRNA 発現レベルを図5に示す。対照群および同日齢の雄における日齢、部位、性別ごとの相対的な発現レベルは in situ hybridization 法を用いた過去の報告 (Takumi *et al.*, 2011) と概ね一致しており、視床下部前部は AVPV、後部は ARC における kiss1 発現に相当すると判断した。脱雌性化用量では、視床下部前部における kiss1 mRNA 発現は、生後14および21日ともに対照群に比べて顕著に低かった。視床下部後部においても、生後14日における発現レベルが対照群に比べて半減しており、雄と類似した発現パターンを示した。無影響量および遅発性影響量では、生後14および21日の視床下部前部の kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、生後21日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。視床下部後部においては、両日齢とも対照群と差はなかった。

Kiss1 receptor については、視床下部の部位、日齢に関わらず、mRNA 発現量に群間差は認められなかった (図6)。

C-2. ER α , β アゴニストおよびその複合投与による遅発性影響の検索

PPT 群では一部の腹で投与直後に食殺が起こり児動物数が減少した。その他の群でも少数例食殺が認められたが、生後5日以降すべての群で死亡や臨床症状の異常は認められなかった。

離乳後の各群の平均体重は、PPT 群では生後5週、DPN 群では9週にかけて、対照群に比べて有意に高値を示した (図7)。10~17週は群間差のないまま推移し、PPT 群では19週から、DPN 群および PPT+DPN 群では21週から、対照群に比べて有意に高値を示した。

膣開口日齢は対照群および PPT+DPN 群では生後27.2 - 27.3日、PPT 群および DPN 群では生後27.8 - 28.2日であった (表1)。

膣開口時の平均体重は対照群および PPT+DPN 群では 78.8 - 80.4g、PPT 群および DPN 群では 88.0 - 88.3g であった。4 群を一括して比較した場合は、対照群に対して PPT 群および DPN 群の膣開口日齢、体重に統計学的有意差がみられたが、同一出産日の 2 群間 (対照群と PPT+DPN 群、PPT 群と DPN 群) では統計学的有意差は認められなかった。

性周期の観察結果を図 8 に示す。対照群では 15 週まで全例が正常性周期を示し、その後徐々に性周期の延長や持続発情を示す個体が増え、正常性周期の割合が低下した。PPT 群では観察を始めた 7 週から異常性周期を示す動物が一部に認められた。10 週以降急激に正常性周期の割合が減少し、19 週以降ではほぼ全例が持続発情を示した。PPT+DPN 群においても、ほぼ同様の推移を示した。DPN 群では 11 週まで全例が正常性周期であったが、13 週から性周期の延長や持続発情を示す個体が出現し、正常性周期の割合は 15 週以降対照群に比べて有意に低下した。

途中解剖 (生後 10 週) では、体重、卵巣および子宮重量に群間差は認められなかった (図 9)。最終解剖 (生後 26 週) では PPT 群、DPN 群および PPT+DPN 群において、体重の有意な増加、卵巣重量の有意な低下が認められた (図 10)。子宮重量に群間差はみられなかった。

C-3 . PPT および DPN の体内濃度分析

単回皮下投与後の PPT 濃度は、全身、脳および肝臓のいずれも 2~4 時間後に高くなり、24 時間後には大きく低下して脳では定量限界以下となっていた (表 2)。全身における DPN 濃度は、PPT と同様に 2~4 時間後に高く、24 時間後には低下していた。一方、脳および肝臓では 2 時間後に最も高く、4 時間後には半分以上に低下し、24 時間後には定量限界あるいはそれ以下のレベルに下降していた。全体として PPT 濃度より DPN 濃度が低い傾向がみられた。

D . 考察

D-1. EE の新生児期曝露による初期変化の検索

今回の検索において、EE の新生児期曝露がキスペプチンニューロンの発達に影響を及ぼすことが明らかとなった。ラットの AVPV では生後 10 日頃から、ARC では生後 0 日から kiss1 mRNA の発現が認められている (Takumi et al., 2011; Cao and Patisaul, 2011)。視床下部前部では、最も低い用量から kiss1 mRNA の発現低下がみられ、AVPV の kiss1 発現ニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。一方、視床下部後部における kiss1 mRNA 発現は、無影響量および遅発性影響量では変化がみられず、AVPV より影響を受けにくいことが示唆された。

脱雌性化量では、生後 14 および 21 日における視床下部前部の kiss1 mRNA 発現が低いまま維持され、視床下部後部においても生後 14 日に kiss1 mRNA 発現が雄と同レベルに低下していた。遺伝子発現パターンが他群とは明確に区別されており、20~2,000 µg/kg の間に脱雌性化の閾値が存在すると推測された。FSH 分泌抑制、卵巣および子宮腺の発達抑制、膣上皮の組織学的変化は視床下部の脱雌性化に伴う変化と考えられた。

無影響量および遅発性影響量群においても、生後 14 および 21 日の視床下部前部の kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。先行研究では、EE の新生児期曝露を受けたラットにおいて、5 週齢あるいは 10 週齢発情期の kiss1 mRNA 発現レベルは対照群と EE 投与群で同等であった (Takahashi et al., 2014)。したがって、無影響量および遅発性影響量で認められた kiss1 mRNA の発現低下は発達期における一時的な変化で、性成熟に向かって対照群との差が縮まっていくものと推測される。

20 μ g/kg 群では卵巣、子宮重量に若干影響がみられたが、無影響量および遅発性影響量では kiss1 mRNA 発現、FSH 濃度、雌性生殖器官の発育に差はみられず、これらのパラメーターは成熟後に現れる性周期の早期停止の予測には直結しないことが示された。遅発性影響では性周期の停止に先行して、発情前期の AVPV における kiss1 mRNA の発現および LH サージの低下が認められ、排卵誘起機能の減弱が示唆されている (Ichimura et al., 2015)。成熟後のキスペプチンニューロンの機能低下に発達期の kiss1 mRNA 発現低下が影響していることが推測されるが、無影響量でも kiss1 mRNA 発現の低下が認められたことから、成熟後に影響が顕在化するには kiss1 以外の因子も関与している可能性が考えられた。

D-2. ER α , β アゴニストおよびその複合投与による遅発性影響の検索

DPN 群では、PPT より作用は弱いものの、対照群に比べて性周期停止の早期化が認められた。性周期の早期停止に ER α が関与することはこれまでの研究成果から明らかであるが、ER β の関与については様々な可能性について慎重に考察する必要があると考えられる。

DPN は ER α より ER β に対して約 70 倍の結合親和性、約 170 倍の転写活性を示し (Meyers et al., 2001)、ER β 選択的アゴニストとして使用されているが、ER α への作用が全くないわけではない。本検索では DPN の用量が非常に高く設定されていたため (10 mg/kg)、 β アゴニスト作用だけでなく、ごく弱いながらも α アゴニスト作用が現れ、性周期停止の早期化が起きた可能性も否定できない。この点を明らかにするため、高用量 DPN の子宮肥大試験を計画している。

ラットの AVPV では、ER α と比べると発現量が低いものの出生時から ER β mRNA 発現が認められており、性差があるとの報告もある (Orikasa et al., 2002; Cao and Patisaul, 2011)。DPN 新生児期曝露による性周期異常

の報告もあり (Bateman and Patisaul, 2008)、遅発性影響の発現には ER α だけでなく ER β も関与することが推測される。しかし、今回の検索では PPT+DPN 群における性周期の停止の発現時期および頻度は、PPT 群とほぼ同等であり、DPN を併合投与したことによる加算、相乗効果は明らかではなかった。その原因の一つとして、PPT の用量が挙げられ、PPT の用量が高すぎて DPN 併合投与による効果が隠れてしまった可能性があることから、低用量についても検討が必要と考えられる。また、性周期以外のパラメーターに併合投与の影響がないかどうか、途中解剖の動物について解析を進める予定である。

PPT 群および DPN 群では、膣開口日齢および 9 週齢までの体重に対照群と有意差が認められたが、同じ出産日の 2 群間で差がなかったことから、投与による影響ではないと判断した。雌ラットにおいて、エストロゲンは摂餌や運動など体重に関わる行動に影響を及ぼし、卵巣摘出により体重が増加することが報告されている (Butera, 2010)。19 週以降に認められた体重増加は、性周期の停止により卵巣由来のエストロゲンが低下した影響であると推察された。

D-3 . PPT および DPN の体内濃度分析

EE と同様に、新生児ラットに投与された PPT、DPN は 24 時間以内に大部分が代謝され、脳への曝露は生後 0~1 日の数時間以内に限定されることが示された。脳における最高濃度は、EE 200 μ g/kg 投与の場合では 0.059 ppm であったの対し (Takahashi et al., 2013)、PPT 10 mg/kg 投与では 0.35 ppm であった。EE に比べ PPT の投与量は 50 倍高いが、脳内濃度は 6 倍に留まっており、脳内への分布量が EE に比べて少ないことが性周期への影響が弱い原因の一つと考えられた。

E . 結論

EE の新生児期曝露がキスペプチンニュー

ーロンの発達に影響を及ぼすことが明らかとなり、ARC に比べ AVPV は非常に高い感受性を持つことが示された。

PPT より作用は弱いものの、DPN 群においても性周期停止の早期化が認められた。一方で、今回の検索では性周期に対する PPT、DPN 併合投与の影響は見いだされず、遅発性影響の発現における ER β の関与について結論を出すにはさらに検討する必要があると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.

2. 学会発表

- 1) 高橋美和：**遅発性影響のメカニズムに迫る-神経内分泌側面から-**：第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 2) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod DHAKAL, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元：**Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスベプチンニューロンの異常**：第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 3) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑：**ヒト肝細胞キメラマウス(PXBマウス)における卵胞発育不全**：第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 4) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 臼田賢人, 渡辺元, 吉田緑：**Ethynyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検索**：第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)

G. 知的財産権の出願・登録状況

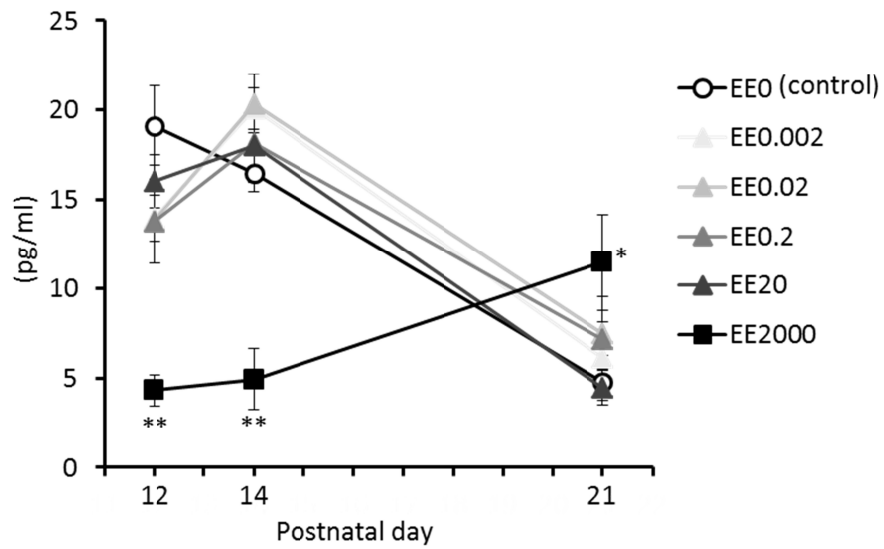
なし

参考文献

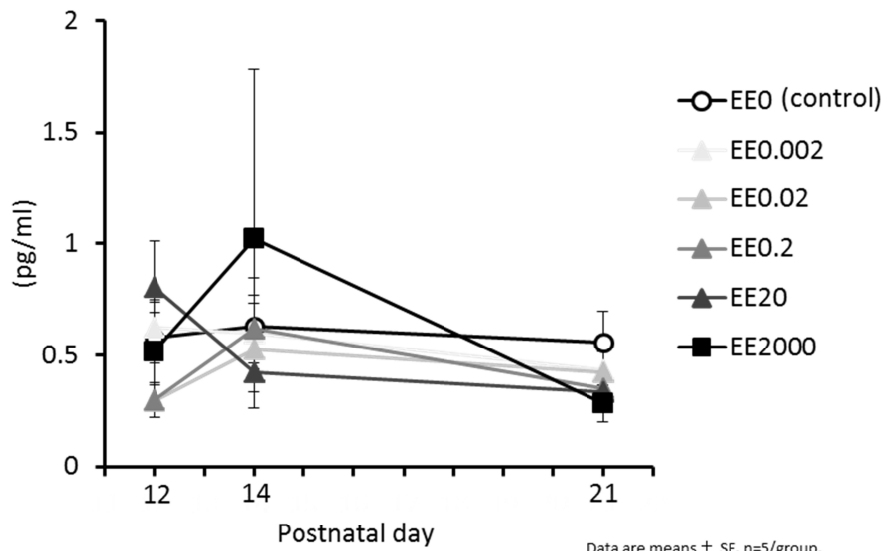
- 1) Bateman HL, Patisaul HB. Disrupted female reproductive physiology following neonatal exposure to phytoestrogens or estrogen specific ligands is associated with decreased GnRH activation and kisspeptin fiber density in the hypothalamus. *Neurotoxicology*, **29**, 988-997, 2008.
- 2) Butera PC. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav.*, **99**, 175-180, 2010.
- 3) Cao J, Patisaul HB. Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol.*, **519**, 2954-2977, 2011.
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Maeda J, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M. Prior attenuation of KiSS1/GPR54 signaling in the anteroventral periventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol in female rats. *Reprod Toxicol.*, 2015 in press.
- 5) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure-activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 6) Orikasa C, Kondo Y, Hayashi S, McEwen BS, Sakuma Y. Sexually dimorphic expression of estrogen receptor beta in the anteroventral periventricular nucleus of the rat preoptic area: implication in luteinizing hormone surge. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **99**, 3306-3311, 2002.
- 7) Patchev AV, Götz F, Rohde W. Differential

- role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.*, **18**, 1568-1570, 2004.
- 8) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.
 - 9) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.
 - 10) Takumi K, Iijima N, Ozawa H. Developmental changes in the expression of kisspeptin mRNA in rat hypothalamus. *J Mol Neurosci.*, **43**, 138-145, 2011.
 - 11) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, **69**, 265-270, 1983.

(A) FSH



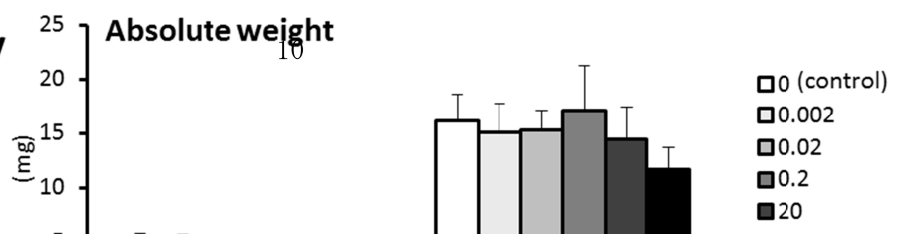
(B) LH



Data are means \pm SE. n=5/group.
*, **: p<0.05 and 0.01 vs 0 μ g/kg group (Dunnett)

図1. 生後12、14、21日における血清FSH(A) およびLH(B) 濃度

(A) Ovary



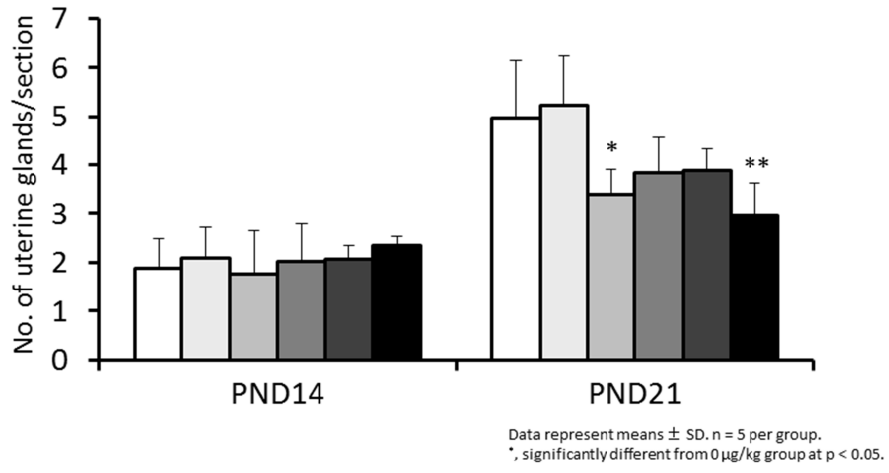


図3. 生後14および21日における子宮腺の数

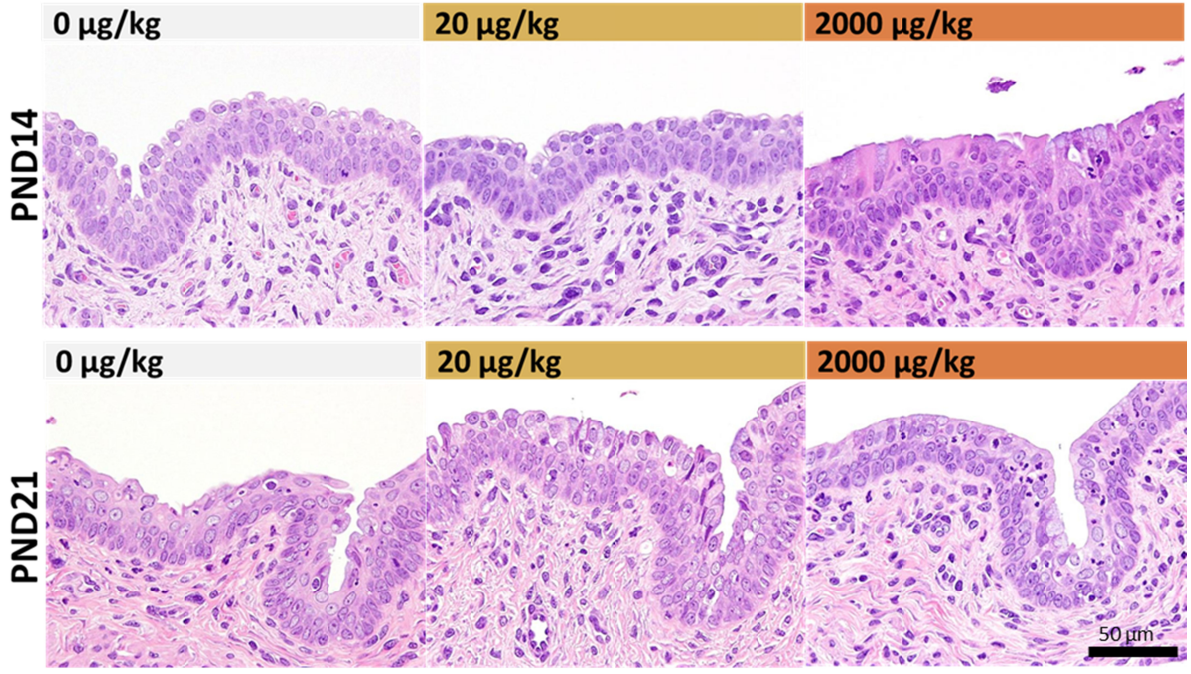
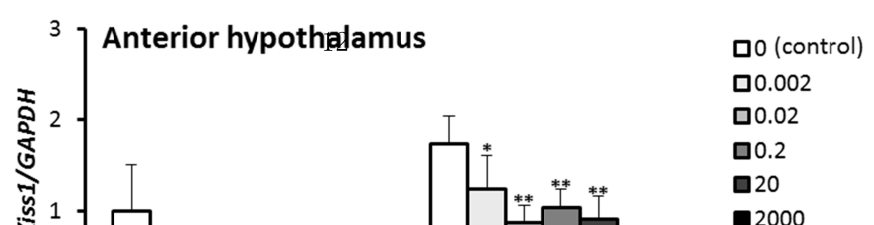


図4. 生後14および21日における腔上皮の組織像



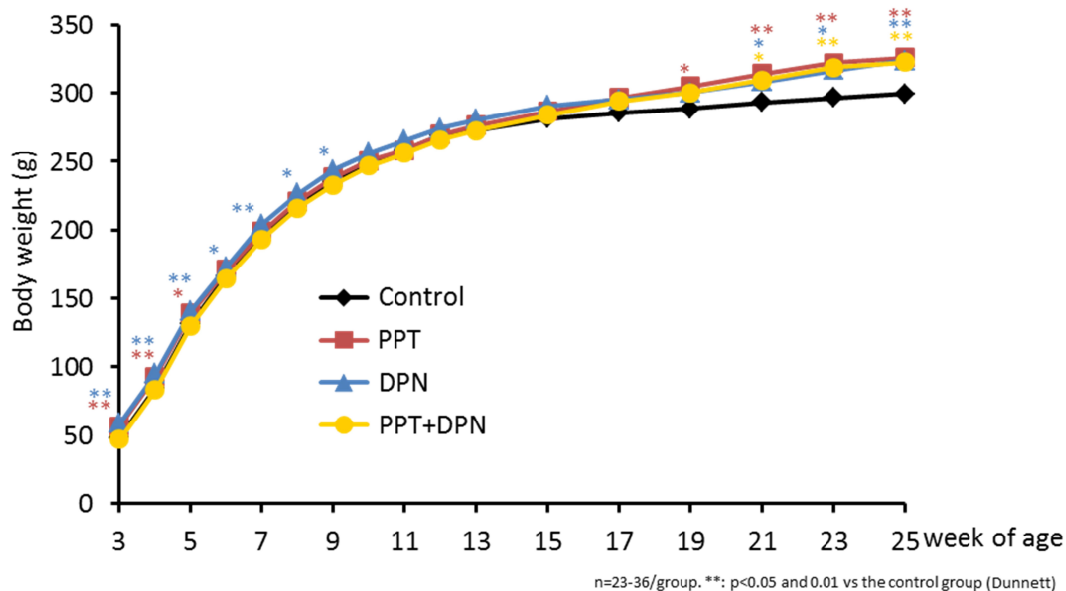
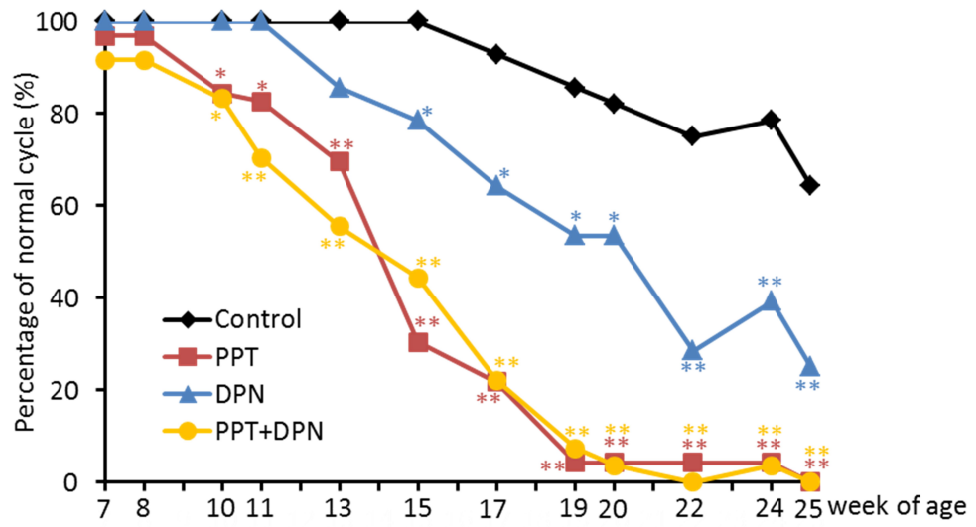


図7. 離乳後の体重推移

表1. PPTおよびDPN新生児期曝露を受けたラットの腔開口平均日齢および体重

Group	No. of animals (litter)	Delivery	Postnatal day	BW (g)
Control	36 (14)	Day 2	27.2 ± 0.7	80.4 ± 7.3
PPT	32 (13)	Day 1	28.2 ± 1.3**	88.3 ± 7.1**
DPN	36 (13)	Day 1	27.8 ± 0.8*	88.0 ± 5.5**
PPT+DPN	36 (14)	Day 2	27.3 ± 1.1	78.8 ± 8.3

*, **: p<0.05 and 0.01 vs the control group (Dunnett)



n=23-36/group

*, **: significantly different from the control group at p<0.05 and 0.01, respectively (Fisher's exact test).

図8. 正常性周期を示す動物の割合

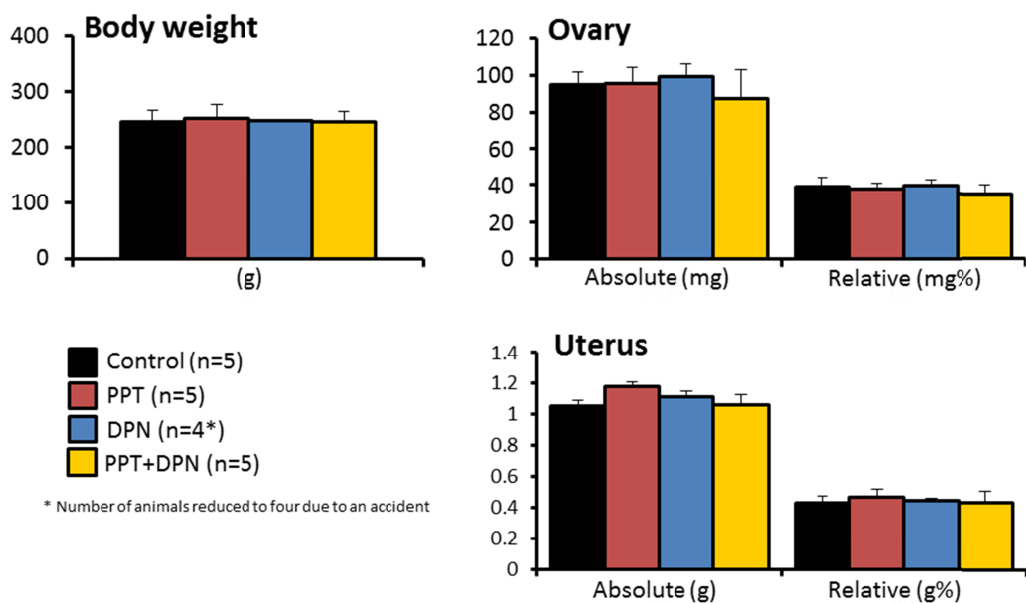


図9. 途中解剖 (10週齢)における体重および臓器重量

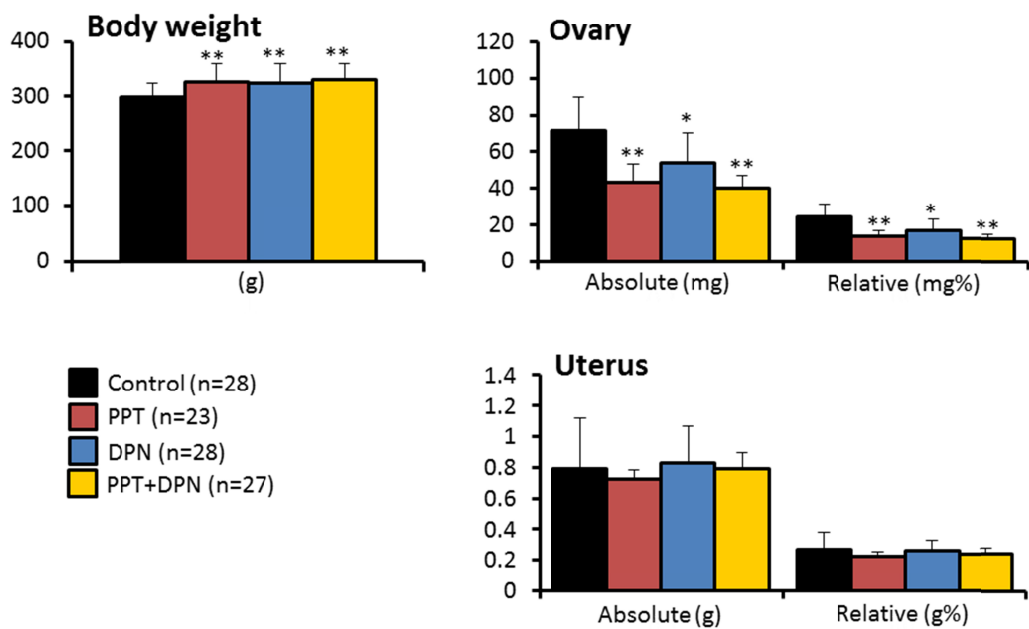


図10. 最終解剖 (26週齢)における体重および臓器重量

表2. 単回皮下投与後の全身、肝臓、脳におけるPPT、DPN濃度

Treatment	Organ		Time point (hours)		
			2	4	24
PPT 10 mg/kg	Whole body	(ppm)	1.6	1.9	0.6
	Brain*	(ppm)	0.34	0.35	-
	Liver*	(ppm)	0.87	0.9	0.01
DPN 10 mg/kg	Whole body	(ppm)	0.73	0.84	0.06
	Brain*	(ppm)	0.19	0.05	-
	Liver*	(ppm)	0.95	0.45	0.01

* Organs from 3 animals were pooled.

Bold: peak concentration

- below the limit of quantitation (0.01 ppm)

Fig. 2-5