

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

分担研究課題： キスペプチンパルス制御部位と遅発影響の関係—遅発影響と閾値の関連性

研究分担者：	代田	眞理子	麻布大学獣医学部
研究協力者：	束村	博子	名古屋大学農学部
研究協力者：	上野山	賀久	名古屋大学農学部
研究協力者：	代田	欣二	麻布大学獣医学部
研究協力者：	田中	恵	麻布大学獣医学部
研究協力者：	鈴木	美帆	麻布大学獣医学部
研究協力者：	長谷川	雄太	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高川	奈緒	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高山	尚大	麻布大学獣医学部
研究協力者：	林	美貴成	麻布大学獣医学部

研究要旨

これまでの研究において、モデル化合物とした合成エストロゲンの 17 $\beta$ -ethinylestradiol (EE)を、ラットにおける脳の性分化臨界期であり、原始卵胞形成期である新生期に反復経口投与すると、雌動物に生殖内分泌機能の異常を反映すると考えられる種々の遅発影響が認められ、遅発影響出現までの期間と用量との間に負の相関性が認められることを明らかにした。遅発影響の中でも、子宮肥大試験の検出感度より低い用量でも増加する嚢胞状卵胞は、遅発影響の閾値を導く新たな指標になり得るが、嚢胞状卵胞は性周期を停止させない用量の EE でも増加することから、性周期停止のメカニズム解明に直接繋がる変化であると考えられる。そこで今年度は、これまでと同様の時期に異なる用量の EE を雌ラット反復経口投与し、性周期回帰停止前の時期に剖検して嚢胞状卵胞の保有と視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の機能との関係を調べた。

その結果、性周期回帰停止前の時期でも嚢胞状卵胞の保有率は用量に依存して増加し、保有率が高い用量の卵巣では LH 受容体の発現が増加し、卵胞発育亢進を示唆する遺伝子発現変化が認められた。しかし、子宮重量は低下し、卵巣での変化が血中エストロゲン ( $E_2$ ) レベルに反映されていないことが示唆された。さらに  $E_2$  のフィードバック部位である視床下部弓状核(ARC)および前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子の発現はフィードバックの減弱を示唆する変化を示し、ARC の *kndy* ニューロンの活動が起点となって発生するパルス状 LH 分泌は、卵巣摘出条件下では Amplitude が有意に増加した。これらのことから、性周期回帰停止に先立ち嚢胞状卵胞が増加する時期は視床下部 / 下垂体 / 性腺軸における情報交換に異常が生じていることが示唆された。

## 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、エストロゲン活性評価の陽性対照物質である EE をモデル化学物質に選定し、脳の性分化臨界期であり原始卵胞形成期にあたる新生雌ラットに、EE を投与すると、性成熟後の性周期回帰停止を始めとする様々な遅発影響が認められることを報告してきた。特に、基底レベル以下のエストロゲンに相当すると考えられる血中 EE 濃度でも、性成熟後に性周期の回帰が停止し、卵巣に嚢胞状卵胞が形成されること、ならびに嚢胞状卵胞形成の最小用量は、子宮肥大試験の検出感度を下回ることを確認した。このような遅発影響は、視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の変化に起因した生殖内分泌機能の変化を反映しているものと考えられる。

これまでの研究において、EE の用量が高いと、初回排卵が遅滞し、幼若期の卵胞発育が抑制されていることを報告した。一方 EE の用量が低いと、正常な春機発動を経て正常な性周期をある程度の期間回帰した後に停止するようになり、さらに低い用量では性周期回帰停止が対照群より早まる事はないが、性周期を回帰していても卵巣に嚢胞状卵胞が形成されることを認めた。このように、用量と投与後の経過時間によって遅発影響の出現に向かって展開される生殖内分泌学的変化は異なっていることから、視床下部 / 下垂体 / 性腺軸も用量と経過時間によって変化しているものと考えられる。そこで本研究では、視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン ( GnRH ) 分泌を上位から直接制御する視床下部キスペプチンニューロンの部位特異的变化が遅発影響出現に果たす役割と閾値を明らかにすることを目的として、今年度は性周期回帰停止前の時期における嚢胞状卵胞の保有状況と視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の機能との関係を検討した。

## 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 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 ( 横浜 ) より購入した Sprague-Dawley 系妊娠雌ラット ( CrI:CD(SD) ) から自然分娩により得た雌新生児を実験に用いた。妊娠 21 日から妊娠雌ラットの出産観察を行い、出産完了日を 0 日齢とした。1 日齢で新生児雌ラットの外表を観察し異常が認められない動物のみを選抜後、各母動物に 1 腹当たり 8 匹哺育となるよう振り分けた。雌動物が 8 匹に満たない場合は雄動物を加え計 8 匹とした。その後、雌ラットは四肢へ墨汁 ( 開明、埼玉 ) による入れ墨を行い個体の識別を行った。

これらの動物は麻布大学附置生物科学総合研究所の動物飼育施設内にて温度 16-25 および相対湿度 45-65% に設定し、明期 12 時間 ( 8-20 時 ) 暗期 12 時間の照明条件下で、木製チップ ( 床敷ソフト、三協ラボサービス、東京 ) を敷いたケージ ( クリーン 200-PC、日本クレア、東京 ) 内で、固形飼料 ( CE-2、日本クレア、東京 ) および水道水を自由摂取させて飼育した。本研究における全ての動物実験は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

新生児期投与動物は、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。子宮肥大試験に用いた動物は、

離乳後に群分けを行った。

新生児への投与は、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、投与日に測定した体重を基に 10 mL/kg を経口投与した。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。子宮肥大試験では、金属ゾンデを装着した注射筒を用いて強制経口投与を行った。投与容量は 10 mL/kg とし、対照群には媒体としたコーン油（和光純薬）を投与した。

### 3. 投与方法及び投与量

1 日齢から 5 日間、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、EE を反復経口投与した。

EE の用量は、先行研究に基づき設定した。すなわち、実験 1 では春機発動後に性周期を回帰した後、連続発情となる 0.4 □g/kg/日および性周期の回帰停止は認められないが、嚢胞状卵胞が増加する 0.08 □g/kg/日を設定した。実験 2 では、初回排卵に影響が認められる 2 □g/kg/日および 0.4 □g/kg/日を設定した。いずれの実験も対照群の動物にはコーン油を同様に投与した。

### 4. 観察方法

#### (1) 実験 1

投与前後に一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 12-13 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。

#### (ア) 体重

投与日および、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

12 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) 腔開口の観察

4 週齢から毎日腔開口の有無を観察し、腔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 2 週間および 12 週齢から剖検まで、毎日腔垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期は、8 週齢からの観察期間中に 4-5 日で発情を回帰したものを正常周期に、それ以外を「その他」に分類した。なお、連続した発情休止期が全く観察されない連続発情、および発情休止期が 14 日以上継続する無発情は認められなかった。また、8 週齢からの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

12 週齢からの性周期観察において、原則として発情期と判断された動物を剖検に供した。

動物は、ペントバルビタールナトリウム溶液（ソムノベンチル、共立製薬、東京）深麻酔下で卵巣および卵管を摘出した後に、4 %パラホルムアルデヒド（4 %PFA）による灌流固定を行い、脳は *in situ* hybridization による *Kiss1* 遺伝子およびエストロゲン受容体 (*ER*) 遺伝子の発現解析に供した。子宮、下垂体および卵巣は重量を測定し、右側の卵巣は遺伝子定量解析およびタンパク質解析のために液体窒素を用いた急速冷凍を行い、-80 で保存した。左側の卵巣は組織学的観察に供するために Bouin 液で固定した。

#### (カ) 卵巣の組織観察

Bouin 固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 μm の厚さで薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定は Acuña [Acuña,2009] に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莖膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

#### (キ) Total RNA の抽出

凍結卵巣は細胞破碎装置用チューブ（トミ

ー精工、東京)に、TRIzol 試薬 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) および細胞破碎装置用ビーズ (ステンレスφ3.2、トミー精工、東京) とともに入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R (トミー精工、東京) を用いてホモジナイズした。破碎後、ホモジネートから total RNA を抽出精製し、100 μg/mL の total RNA 溶液となるように depc 処理水 (DEPC treated Water, 遺伝子工学研究用、ニッポンジーン、東京) に溶解し、-80 °C で保存した。

#### (ク) Real-time RT-PCR

逆転写に先立ち、total RNA 溶液を deoxyribonuclease I (Amplification Grade, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) で処理しゲノム DNA を除去した。逆転写のプライマーにはランダムプライマーを用い、Taqman® Reverse Transcription Reagents (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用い、TaqMan プローブ法による real-time PCR を行った。

定量解析の対象には、卵胞発育関連因子をコードする遺伝子、ならびにステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子を選択した。卵胞発育関連因子をコードする遺伝子としては、莢膜細胞に発現する LH 受容体 (LHR)、発育卵胞の卵母細胞に発現する GDF-9、顆粒層細胞に発現する FSH 受容体 (FSHR)、エストロゲン受容体α (ERα)、インヒビンの各サブユニット (Inhibin α、αα、αβ) を選択した。またステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子としては、莢膜細胞でのミトコンドリアへのコレステロールの運送に関わる steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、ミトコンドリアでコレステロールからプレグネノロンの生成を行う側鎖切断酵素 cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)、さらに細胞質

でプレグネノロンからprogesteroneを経てテストステロンを生成する間に作用する酵素である 3α-hydroxysteroid dehydrogenase (3α-HSD) および P450c17、ならびに顆粒層細胞に発現しテストステロンを基質として E<sub>2</sub> を生成する aromatase をコードする各 mRNA を定量した。また内在性コントロールとして glyseraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を定量し、GAPDH mRNA 発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

Real-time PCR に用いた各遺伝子のプライマーおよびプローブの塩基配列は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より得た配列情報を基にプライマー設計ソフトウェア (Primer Express、Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて設計されたものを使用した。GAPDH 遺伝子は Pre-Developed Taqman® Assay Reagents Control Kits (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA USA) を用いて測定した。LHR については、選択的スプライシングによる機能的および非機能的な発現 (Tsai-Morris *et al.*, 1991; Aatsinki *et al.*, 1992; Sokka *et al.*, 1992) が報告されている。本研究では、リガンドへの感受性を持ち合わせた機能的な LHR mRNA 発現のみを対象としていることから、機能的 LHR mRNA に特異的な細胞膜貫通部位をコードする exon11 に特異的なプライマーおよびプローブを設計した (Dufau *et al.*, 1995)。用いたプライマーおよびプローブの塩基配列を表 1 に示す。

#### (ケ) LH 受容体タンパクの定量解析

凍結した卵巣に RIPA バッファー (0.1% SDS, 1% Trion X-100/Tris-HCl pH 8.0) を加え、ビーズ式細胞破碎装置によりホモジナイズし、遠心分離してタンパク溶液を得た。各サンプルは DC Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA) によりタンパク質濃度を測定し、各サンプルとも 10 μg のタンパク質を Western Blotting に用いた。陽性コントロールとして精巣からタンパク質を抽出し、同様に用いた。

各サンプルは、ポリアクリルアミドゲル (e-PAGEL、アトー、東京) にアブライシ、ミニスラブ電気泳動装置 (AE-6530P、アトー、東京) を用いて 20 mA で 80 分間電気泳動した後、セミドライ式プロットング装置 (WSE-4020、アトー、東京) を用いて 152 mA で 30 分間通電し、PVDF メンブレン (WSE-4051、アトー、東京) にプロットングした。プロットング終了後、メンブレンを洗浄、ブロッキング (0.3 % スキムミルク / PBS-T) 後、洗浄して抗 LH 受容体抗体 (sc-25828、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA、USA) および抗  $\alpha$ -actin 抗体 (#4967、Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) とインキュベートした。これを Dako EnVision System-HRP Labelled Polymer (Dako、Glostrup、Denmark) および蛍光基質 (Luminata Forte Western HRP Substrate、Millipore、Billerica、MA、USA) で可視化し、Image Quant LAS 4000 (GE ヘルスケア ジャパン、東京) により撮影した。撮影した画像は、画像解析ソフト Image J によりシグナル強度を測定した。これを同時に測定した  $\alpha$ -actin のシグナル強度で補正し、相対発現量を算出した。

#### (コ) Double-label in situ hybridization (ISH)

還流固定した脳は、Brain Blocker を用い、AVPV と ARC が含まれる部位を切り出し、パラフィンブロックとした。これをラット脳アトラス (Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6<sup>th</sup> ed., Elsevier) を参照ながら、AVPV は Bregma 0.12 mm から -0.48 mm の領域を、ARC は Bregma -1.80 mm から -3.24 mm の領域を、20  $\mu$ m ごとに 10  $\mu$ m 厚で薄切して、各サンプル 3 枚の切片を *Kiss1* 及び *ER $\alpha$*  の *in situ* hybridization に供した。

*In situ* hybridization は、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) 用に設計されたプローブを用いて行った。その際、pretreatment による煮沸処理は 20 分間および protease 処理は 40 分で 15 分間行い、ハイブリダイゼーションは 40 分で 150 分間の条件で行った。*Kiss1* の *in situ* hybridization における陰性対照には、我々が維持している *kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織を用いた。

ISH 後のスライドは光学顕微鏡下で鏡検し、発現陽性細胞数を求めた。

#### (2) 実験 2

実験 1 と同様の日齢に体重を測定し、一般状態、開眼および膣開口の観察を行った。10 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で卵巣を摘出し、その後 1 週間にわたり膣垢像を観察して卵巣の残存がない事を確認した。卵巣は固定保存して形態観察に供した。14 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で右側頸静脈にカニューレを装着し、翌日、装着したカニューレから 6 分間隔で 100  $\mu$ L ずつ 2 時間にわたり血液を採取し血清を分離した。得られた血清は、測定まで -20  $^{\circ}$ C で保存した。

#### (サ) 黄体化ホルモン (LH) のラジオイムノアッセイ

血清中の LH 濃度測定は東京農工大学農学部渡辺 元博士 (研究協力者) の協力を得て、米国 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット LH の RIA キットを用いて二抗体法により測定した (第一抗体 anti-rat LH S-10、第二抗体抗ウサギ  $\gamma$  グロブリンヤギ血清 #42-99318)。標識抗原は rat LH-1-5 をクロラミン T 法により <sup>125</sup>I で標識して使用し、標準物質には rat LH-RP-1 を用いた。測定値は、研究協力者である名古屋大学農学部東村博子博士および上野山賀久博士の下でパルス解析を行い、パルス頻度、大きさ、ピークレベルおよび基底レベルを算出した。

#### 5. 統計解析

統計解析ソフト JMP $\alpha$  (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。すなわち、性周期の型は  $\chi^2$  乗検定を行った。また、二群間の解析は、F 検定を行い、分散の一様性を確認して 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、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. 発育および身体的発達

実験1および2ともに投与期間中も含めてEE投与群と対照群との間に有意差は認められず、開眼あるいは膣開口の日齢にも投与の影響は認められなかった(データは示さず)。

### 2. 性周期の回帰状況(実験1)

図1に示すように、実験1では8-9週齢で連続発情を示す動物はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、不規則な性周期を回帰する例がEEの用量に依存して増加し、0.4 µg/kg体重/日群では4-5日で発情を回帰する正常な性周期を示す例はなかった。

### 3. 剖検所見および器官重量(実験1)

表2に示すように、0.08 µg/kg体重/日群では対照群との間に有意差を認める器官はなかったが、0.4 µg/kg体重/日群では卵巣および子宮重量が有意な低値を示し、下垂体重量が有意な高値を示した。

### 4. 卵巣の組織学的所見

嚢胞状卵胞を有する卵巣の代表的組織像を図2に、また、その保有率を図3に示す。図3Aに示すように、13週齢に卵巣を採取した実験1では、対照群の卵巣に嚢胞状卵胞は認められなかったが、EE投与群では用量に依存して保有率が増加し、0.4 µg/kg体重/日群では75%の動物に嚢胞状卵胞が観察された。一方、10週齢に卵巣を採取した実験2では、嚢胞状卵胞は対照群あるいは0.4 µg/kg体重/日群では4例あるいは3例中1例に確認されたのに対し、2 µg/kg体重/日群では5例全例に観察された(図3B)。

### 5. 卵巣における遺伝子発現およびLHR発現

図4に示すように、0.4 µg/kg体重/日群では発育卵胞の卵母細胞に発現する GDF-9

(図4A)も、顆粒層細胞に発現する FSH受容体(図4B)およびインヒビン(図4D-F)ならびに発育卵胞の莢膜およびグラフ卵胞の顆粒層細胞に発現する LHR(図4G)のいずれも対照群と比べて発現が増加し、LHRについてはタンパク質レベルでも増加の傾向が認められた(図5)。0.08 µg/kg体重/日群では、これらの遺伝子の発現に有意差は認められなかったが、LHR 遺伝子については増加傾向が認められた。

ステロイドホルモン合成にかかわる因子としては、0.08 µg/kg体重/日群ではコレステロールの動員からプロゲステロン合成の間に働く 3 $\beta$ -HSD および StAR の発現が有意に増加し、0.4 µg/kg体重/日群ではプロゲステロン合成からエストロゲン合成にかかわる 3 $\beta$ -HSD、P450c17 および aromatase の発現が有意に増加した(図6A-5E)。

### 6. 視床下部における *kiss1* および ER $\alpha$ 発現

図7には ARC における *kiss1* mRNA および ER $\alpha$  mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示し、図8には AVPV における *kiss1* mRNA および ER $\alpha$  mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示す。

対照群および EE 投与群において、赤色顆粒で可視化される ER $\alpha$  と青色顆粒で可視化される *kiss1* の発現細胞数を数えたところ、ARC では *Kiss1* 発現細胞数が増加し(図7A)、AVPV では *Kiss1* 単独あるいは *Kiss1/ER $\alpha$*  共発現細胞数が共に減少していた(図8A)。

陰性対照とした *kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織では、AVPV および ARC のいずれの部位においても、ER $\alpha$  のシグナルである赤色顆粒は認められたが、*kiss1* のシグナルである青色顆粒は認められなかった(図7Bおよび8B)。子宮では子宮腺に ER $\alpha$  のシグナルである赤色顆粒が局在していた(図8C)。

### 7. EE曝露動物におけるパルス状LH分泌

図9にはパルス状 LH 分泌各パラメーター血清中 LH 濃度の個別変動を示し、表3にはパルス解析結果を示す。

各パラメーターのうち、0.4 µg/kg体重/日群の Amplitude が対照群と比べて有意な

高値を示した。その他のパラメーターは対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

#### D . 考察

成熟雌動物に排卵をもたらす性腺刺激ホルモンの大量放出（サージ）は、視床下部で性腺刺激ホルモン放出ホルモンを上位から直接制御しているキスペプチン分泌ニューロンの局在の性差に起因していることが近年の研究で知られるようになった。このような性差は、視床下部の分化過程で作用する性ステロイドによって決定されるが、性ステロイドが関与し得る時期は限定的で、このような時期は性分化の臨界期と呼ばれている。生殖発生毒性試験に汎用されているラットでは出生直前から生後 5 日ころまでがこの時期に相当し、精巣由来のアンドロゲンが脳内の aromatase によってエストロゲンに変換され、これが、雌に固有の性腺刺激ホルモンサージを制御する AVPV におけるキスペプチンニューロンを不可逆的に消失させて、キスペプチンニューロンが ARC のみに局在する雄型の脳になると理解されている。脳の性分化における性ステロイドに対する感受性は雌にも存在し、この時期の雌にアンドロゲンが作用すると、雄と同様のメカニズムで雄型の脳へと分化する。また、胎児および新生児期の肝臓で合成され、循環血中に分泌されて母体由来のエストロゲンと特異的に結合する  $\alpha$ -fetoprotein とは結合親和性の低いエストロゲン活性物質も雄型の脳へと分化させることができる。本研究でモデル化合物として用いた EE も内因性  $E_2$  と比べて  $\alpha$ -fetoprotein との結合親和性が低いことから、脳の性分化に影響を及ぼすことができると考えられる。

今回我々は、0.4 あるいは 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日の用量の EE を、生後 1 日の雌ラットに反復経口投与し、性周期の回帰停止以前の時期における視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の変化を検討した。この時期が性周期回帰停止前であることは、平成 25 年度までの研究で

も確認され、0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日の用量では 26 週齢に至っても、不規則な性周期を回帰するものの、発情の回帰は停止しないことが確認されている。本研究において、EE 投与群では、視床下部 AVPV および ARC のいずれにおいても *kiss1* 遺伝子の発現変化が認められ、また、卵巣では、性腺刺激ホルモン受容体の発現増加、ならびにその下流に位置するステロイド合成酵素などの遺伝子発現増加が認められ、この時期に既に視床下部および性腺のいずれにも明瞭な変化が生じている事が明らかになった。

視床下部における *kiss1* 遺伝子の発現変化は、部位により異なる。すなわち、エストロゲンのポジティブフィードバックを受ける AVPV では低下が認められ、ネガティブフィードバックを受ける ARC では増加が認められた。子宮重量が減少していることから、循環血中  $E_2$  濃度が 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日群では低下し、フィードバックが減弱したことが *kiss1* 遺伝子の発現増加をもたらしたとも考えられるが、卵巣摘出条件下で測定したパルス状 LH の Amplitude も 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重/日群で増加していた。パルス状 LH 分泌は ARC の Kndy ニューロンといわれるキスペプチン、ダイノルフィンおよびニューロキニン B を分泌する細胞で発生する刺激によって発生する LH の分泌パターンである。今回、卵巣からのフィードバックを欠く条件でも Amplitude が増加していたことから、ARC の Kndy ニューロン自身に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

EE 投与群の卵巣における遺伝子発現は、 $E_2$  合成促進を示唆する変化となっていた。しかし、子宮重量から推測すると、 $E_2$  濃度はむしろ低下しているものと推測された。血中  $E_2$  濃度の確認が必要とされるが、昨年度の研究において EE 投与群では幼若期の血中  $E_2$  濃度は卵巣発育や卵巣における遺伝子発現動態と一致していなかった。幼若期では、卵巣発育は抑制されており、性成熟期とは全く逆の変化を示していた。時期によって卵巣発育に及ぼす影響が異なる理由は

不明である。しかが、いずれの時期も卵巣内部の変化が血中 E<sub>2</sub> 濃度に反映されていないと考えられる。

性腺刺激ホルモンによってステロイド合成系が増強されても、それが血中濃度に反映されないと、卵巣の機能的変化に一致しない刺激がさらに卵巣に加えられる結果となる。嚢胞状卵胞の形成にはこのような視床下部 / 下垂体 / 性腺軸における情報交換の異常が関与している事が推測された。

嚢胞状卵胞の形成については、10 週齢に観察した実験 2 の対照群でも 1 例に認められていることから、13 週齢での出現が EE 投与の影響かどうかは、さらに例数を追加して検討する必要がある。しかし、本研究から、性周期の回帰を停止しない用量でも卵巣に影響が認められ、性周期の回帰を停止する用量でも、回帰停止前の時期にすでに視床下部 / 卵巣のいずれにも変化が生じていることが明らかになり、嚢胞状卵胞は閾値の指標として有用であると考えられる。しかし、性周期を回帰している段階での嚢胞状卵胞の毒性学的意義についてはさらに検討が必要である。

以上のように、今年度の研究から、子宮重量を増加させない用量の EE でも、新生児期での経口曝露により嚢胞状卵胞を形成させ、その時期には視床下部 / 下垂体 / 性腺軸における情報交換に異常が生じていることが示唆された。

## 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 $\alpha$ -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) 川嶋 潤、中村 知裕、菅田 恵理世、鈴木 紗綾、小川 祐布子、吉田 緑：新生ラットへのエチニルエストラジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響 第 40 回日本毒性学会学術年会 (2013 年 6 月)

2) 代田 眞理子：ラット周生期エストロゲン活性物質曝露による遅発影響—毒性学的視点での解析 第106回日本繁殖生物学会大会シンポジウム (2013年9月)

3) 代田 眞理子、川嶋 潤、森 雅史、立河 紗紀、菅田 恵理世：リプロダクティブヘルスからみた遅発影響 - 遅発影響検出のための実践的指標の探索 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014 年 7 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

Aatsinki JT, Pietilä EM, Lakkakorpi JT, Rajaniemi HJ. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. *Molecular Cellular Endocrinology* 84,127-135 (1992)

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-Ozuyisal 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, Ederly 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, Ederly 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)
- Beale KE, Kinsey-Jones JS, Gardiner JV, Harrison EK, Thompson EL, Hu MH, Sleeth ML, Sam AH, Greenwood HC, McGavigan AK, Dhillo WS, Mora JM, Li XF, Franks S, Bloom SR, O'Byrne KT, Murphy KG. The physiological role of arcuate kisspeptin neurons in the control of reproductive function in female rats. *Endocrinology* 155, 1091-1098 (2014)
- Banu SK, Samuel JB, Arosh JA, Burghardt RC, Aruldas MM. Lactational exposure to hexavalent chromium delays puberty by impairing ovarian development, steroidogenesis and pituitary hormone synthesis in developing Wistar rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 232, 180-189 (2008)
- Becú-Villalobos D, González Iglesias A, Díaz-Torga G, Hockl P, Libertun C. Brain sexual differentiation and gonadotropins secretion in the rat. *Cellular and Molecular Neurobiology* 17, 699-715 (1997)
- Biles JE, McNeal TP, Begley TH, Hollifield HC. Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids. *J Agriculture and Food Chemistry* 45, 3541-3544 (1997)
- Blair RM, Fang H, Branham WS, Hass BS, Dial SL, Moland CL, Tong W, Shi L, Perkins R, Sheehan DM. The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicological Sciences* 54, 138-153 (2000)
- Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM. Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *Journal of Nutrition* 132, 658-664 (2002)
- Brotans JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released

- from lacquer coatings in food cans. *Environment and Health Perspectives* **103**, 608-612 (1995)
- 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)
- Clarkson J. Effects of estradiol on kisspeptin neurons during puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology* **34**:120-131 (2013)
- d'Anglemont de Tassigny X, Fagg LA, Dixon JP, Day K, Leitch HG, Hendrick AG, Zahn D, Franceschini I, Caraty A, Carlton MB, Aparicio SA, Colledge WH. Hypogonadotropic hypogonadism in mice lacking a functional Kiss1 gene. *Proceeding of National Academy Science U S A*. **104**,10714-10719 (2007)
- Dufau ML, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Buczko E. Structure and regulation of the luteinizing hormone receptor gene. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **53**, 283-291 (1995)
- 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)
- Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews* **30**, 624-712 (2009)
- Fernández M, Bianchi M, Lux-Lantos V, Libertun C. Neonatal exposure to bisphenol a alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environment and Health Perspectives* **117**,757-762 (2009)
- Goldenberg RL, Vaitukaitis JL, Ross GT. Estrogen and follicle stimulation hormone interactions on follicle growth in rats. *Endocrinology* **90**,1492-1498 (1972)
- González-Martínez D, De Mees C, Douhard Q, Szpirer C, Bakker J. Absence of gonadotropin-releasing hormone 1 and Kiss1 activation in alpha-fetoprotein knockout mice: prenatal estrogens defeminize the potential to show preovulatory luteinizing hormone surges. *Endocrinology* **149**,2333-2340 (2008)
- Gore AC, Walker DM, Zama AM, Armenti AE, Uzumcu M. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Molecular Endocrinology* **25**, 2157-2168 (2011)
- 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)
- Hirshfield AH. Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29,10-15 (1997)
- Homma T, Sakakibara M, Yamada S, Kinoshita M, Iwata K, Tomikawa J, Kanazawa T, Matsui H, Takatsu Y, Ohtaki T, Matsumoto H, Uenoyama Y, Maeda K, Tsukamura H. Significance of neonatal testicular sex steroids to defeminize anteroventral periventricular kisspeptin neurons and the GnRH/LH surge system in male rats. *Biology of Reproduction* 81, 1216-1225 (2009)
- Hong H, Branham WS, Dial SL, Moland CL, Fang H, Shen J, Perkins R, Sheehan D, Tong W. Rat  $\alpha$ -Fetoprotein binding affinities of a large set of structurally diverse chemicals elucidated the relationships between structures and binding affinities. *Chemical Research of Toxicology* 25, 2553-2566 (2012)
- Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Developmental Biology* 157, 100-109 (1993)
- Hutter HS, Gibson MJ. Effect of neonatal androgenization on positive feedback in female mice. *Biology of Reproduction* 38, 636-638 (1988)
- 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)
- Ieda NI, Uenoyama Y, Tajima Y, Nakata T, Kano M, Naniwa Y, Watanabe Y, Minabe S, Tomikawa J, Inoue N, Matsuda F, Ohkura S, Maeda K, Tsukamura H. KISS1 gene expression in the developing brain of female pigs in pre- and peripubertal periods. *Journal of Reproduction and Development* 60, 312-316 (2014)
- 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. Ethynylestradiol-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 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, Skinner MK. Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Endocrinology* 144, 3329–3337 (2003)

Kimura F, Funabashi T. Two subgroups of gonadotropin releasing hormone neurons control gonadotropin secretion in rats. *News of Physiological Sciences* 13,225-231 (1998)

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, Shiyong J, Kelly EM, Woodruff TK. 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 R, Handa J. Ontogeny of Gene Expression in the Gonadotroph of the Developing Female Rat. *Biology of Reproduction* 56, 563-568 (1997)

McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews* 88, 91-124 (2008)

McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 64, 293-298 (2001)

Mena MA, Arriaza CA, Tchermitchin 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)
- Morohashi KI, Omura T. Ad4BP/SF-1, a transcription factor essential for the transcription of steroidogenic cytochrome P450 genes and for the establishment of the reproductive function. *FASEB Journal* **10**, 1569-1577 (1996)
- 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)
- Murray AA, Gosden RG, Allison V, Spears N. Effect of androgens on the development of mouse follicles growing in vitro. *J Reprod Fertility* **113**, 27-33 (1998)
- Nagai A, Ikeda Y, Aso T, Eto K, Ikeda MA. Exposure of neonatal rats to diethylstilbestrol affects the expression of genes involved in ovarian differentiation. *Journal of Medical and Dental Sciences* **50**, 35-40 (2003)
- Nagaraja AK, Middlebrook BS, Rajanahally S, Myers M, Li Q, Matzuk MM, Pangas SA. Defective gonadotropin-dependent ovarian folliculogenesis and granulosa cell gene expression in inhibin-deficient mice. *Endocrinology* **151**, 4994-5006 (2010)
- 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, Shiota 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)
- Ojeda SR, Advis JP, Andrews WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federal Proceedings* **39**, 2365-2371 (1980)
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environment and Health Perspectives* **104**, 298-305 (1996)
- Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, Tsang BK, Kotsuji F, Yoshida Y. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* **154**, 2870-2880 (2013)
- 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)
- Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* **17**, 555-557 (1968)

- Pineda R, Garcia-Galiano D, Roseweir A, Romero M, Sanchez-Garrido MA, Ruiz-Pino F, Morgan K, Pinilla L, Millar RP, Tena-Sempere M. Critical roles of kisspeptins in female puberty and preovulatory gonadotropin surges as revealed by a novel antagonist. *Endocrinology* **151**, 722-730 (2010)
- Pinilla L, Castellano JM, Romero M, Tena-Sempere M, Gaytán F, Aguilar E. Delayed puberty in spontaneously hypertensive rats involves a primary ovarian failure independent of the hypothalamic KiSS-1/GPR54/GnRH system. *Endocrinology* **150**, 2889-2897 (2009)
- 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 wxposure of infant female rats to estradiol or dichlorodiphenyltrichloroethane. *Biology of Reproduction* **77**, 734-742 (2007)
- Richards JS. Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development: modification by estradiol and gonadotropins. *Endocrinology* **97**, 1174-1184 (1975)
- Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environment and Health Perspectives* **109**, 675-680 (2001)
- 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)
- Sandhoff TW, Hales DB, Hales KH, McLean MP. Transcriptional regulation of the rat steroidogenic acute regulatory protein gene by steroidogenic factor 1. *Endocrinology*. 1998 **139**:4820-4831.
- 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, Shiota M, Shiota 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. *Hormones and Behavior* **54**, 662-668 (2008)
- Seminara SB, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaughaupt SA, Gusella JF, O'Rahilly S, Carlton MB, Crowley WF Jr, Aparicio SA, Colledge WH. The GPR54 gene as a regulator of puberty. *New England Journal of Medicine* **349**,1614-1627 (2003)
- Shiota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shiota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Science* **37**, 681-690 (2012)
- Shiota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shiota 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 T, Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *Journal of Endocrinology* 127, 297-303 (1990)
- Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology* 130, 1738-1740 (1992)
- Sokka TA, Huhtaniemi IT. Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction* 52, 1404-1409 (1995)
- Sokka TA, Hämäläinen TM, Kaipia A, Warren DW, Huhtaniemi IT. Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biology of Reproduction* 55, 663-670 (1996)
- 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)
- Takumi K, Iijima N, Iwata K, Higo S, Ozawa H. The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of Kiss1 mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development. *Journal of Physiological Sciences* 62, 453-460 (2012)
- 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)
- Toran-Allerand CD. Gonadal hormones and brain development: implications for the genesis of sexual differentiation. *Annual New York Academy of Sciences* 435, 101-111 (1984)
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie XZ, Dufau ML. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1355-1359 (1991)
- Uenoyama Y, Nakamura S, Hayakawa Y, Ikegami K, Watanabe Y, Deura C, Minabe S, Tomikawa J, Goto T, Ieda N, Inoue N, Sanbo M, Tamura C, Hirabayashi M, Maeda KI, Tsukamura H. Lack of Pulse and Surge Modes and Glutamatergic Stimulation of Luteinising Hormone Release in Kiss1 Knockout Rats. *Journal of Neuroendocrinology* 27, 187-197 (2015)
- 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)
- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Developmental exposure to Bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* **149**, 5848-5860 (2008)
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* **141**, 3814-3820 (2000)
- 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 $\beta$ . *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. *Congenital Anomalies (Kyoto)* 43, 177-179 (2003)
- Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, Michelmann HW. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. *Biology of Reproduction* **63**, 320-327 (2000)
- 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)
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* **184**, 122-137 (1997)
- Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* **39**, 823-834 (2011)
- 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)
- Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* **15**, 172-183 (2001)
- 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)

田谷一善、渡辺元、笹本修司.  $^{125}\text{I}$  標識ホル  
モンを用いたプロジェステロン、エストラ  
ジオール  $17\beta$  のラジオイムノアッセイにつ  
いて. 家畜繁殖雑誌 1985 年 31 卷 4 号  
186-197 頁





ターゲット	Accession No.			配列 (5' 3')
GDF-9	AF 099912	プライマー	F	AGCTCAAATGGGACAACCTGGAT
			R	GGGACAGTCCCCTTTACAGTACCT
		プローブ		CCCCGCACAGATAC
FSHR	NM 199237	プライマー	F	CAAATGATCCTTTTCGGGATGA
			R	CCCGAACGCCATTGA
		プローブ		TGAGCACAAACCTC
ERβ	NM 012754	プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
			R	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
		プローブ		TTATGAAAGTAGGAATGGTCAAGTG
Inhibin α	M 36453	プライマー	F	GCAGCTCTACCAGGGAGCAT
			R	ACTTGAAAGAGTAGCCTCCATCTGA
		プローブ		AGGTCCCTACGCGTCCGAACCAC
Inhibin βA	M 37482	プライマー	F	CCCAGAGGTGCCTGCTATGT
			R	CATTGCTCCCTCTGGCTATCA
		プローブ		CTTGGGCACTCACCTCACAATAGTTGG
Inhibin βB	NM 080771	プライマー	F	CCCTGGGCCGGTGAA
			R	CGTCATCAAAGTAGAGCATAGACATAGA
		プローブ		TTGCTGCATCCCCACCAAGCTGAG
LHR	NM 012978	プライマー	F	CCGTCAGGGTGTAGACAGAGAGT
			R	CGGTGCAGCTGGCTTCTT
				CACTGGCAAACACAG
StAR	NM 031558	プライマー	F	GGCATGGCCACACACTTTG
			R	AGTGGATGAAGCACCATGCA
		プローブ		AGATGCCTGAGCAAAG
P450scc	J 05156	プライマー	F	TCCCAGCGGTTTCATCGA
			R	GAAATAAGTCTGGAGGCATGTTGA
		プローブ		CCGTCTACCAGATGTT
P450c17	NM 012753	プライマー	F	TGGCTTTGGTGGTGCACAATC
			R	TGAAAGTTGGTGTTCGGCTGAAG
		プローブ		ATCCAAAAGGAGATTGACCA
Aromatase	M 33986	プライマー	F	GAAACGGTCCGCCCTTTCT
			R	TGGATTCCACACAGACTTCTACCA
		プローブ		ATGAAAGCTCTGACGGGC
3β-HSD	L 17138	プライマー	F	AAGTATGCAATGTGCCACCATTT
			R	GCAAAAAGATGGCCGAGAA
		プローブ		CATTGGCTGCCAGCAC

表1 リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ

表2 1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢における器官重量（平均±標準偏差）

EE (□g/kg/day)	0 <sup>a</sup>	0.08	0.4
N	9	10	9
Pituitary (mg)	13.8 ± 1.1	17.1 ± 1.0	21.3 ± 3.6**
Ovaries (mg)	94.4 ± 18.6	98.3 ± 14.7	57.8 ± 6.1**
Uterus (mg)	525 ± 56	493 ± 19	441 ± 93**

<sup>a</sup> corn oil 10 mL/kg/day

\*\* p<0.01

表 3 1 日齡から 5 日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの 14

EE (μg/kg/day)	0 <sup>a</sup>	0.4	2
N	3	3	3
Mean LH	6.72 ± 1.22	7.20 ± 2.06	4.91 ± 1.88
Basal LH	5.36 ± 1.12	5.56 ± 1.88	3.64 ± 1.77
Frequency	4.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0	3.3 ± 1.2
Amplitude	3.65 ± 0.28	5.35 ± 1.18*	4.16 ± 0.32

週齡におけるパルス状 LH 分泌のパラメーター (平均 ± 標準偏差)

動物は 10 週齡で両側卵巢を摘出し、13 週齡で装着した頸静脈カニューレから頻回採血した。

<sup>a</sup> corn oil 10 mL/kg/day

\*p<0.05

図1 1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの8-9週齢における性周期

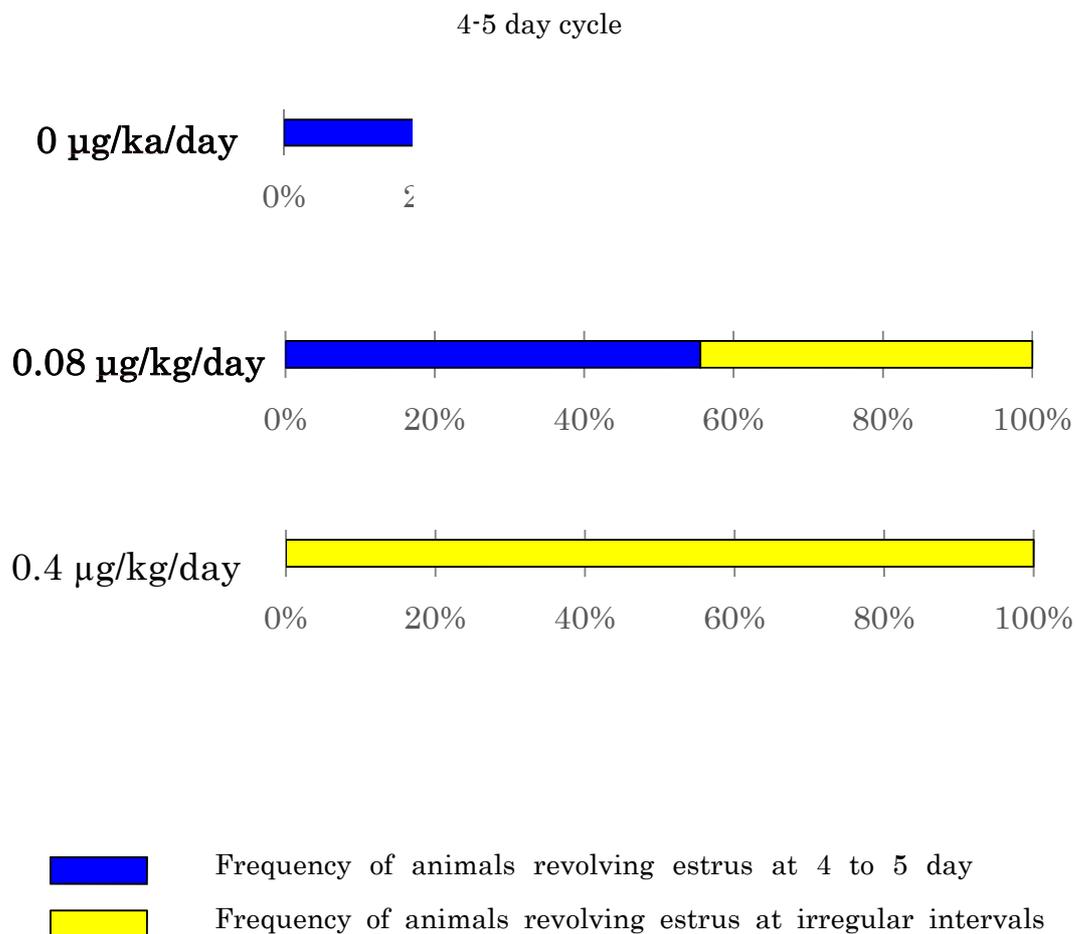


図2 1日齢から5日間エチニルエストラジオール（EE）の反復経口投与を受けた雌ラットの卵巣にみられた嚢胞状卵胞の代表的画像

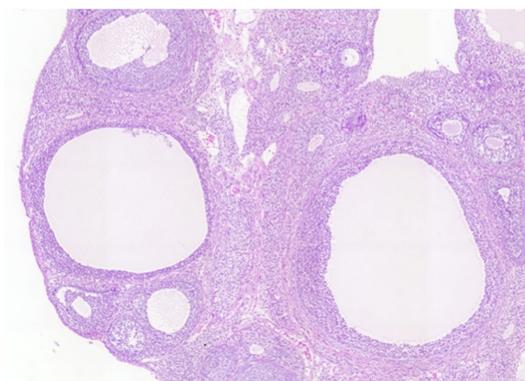
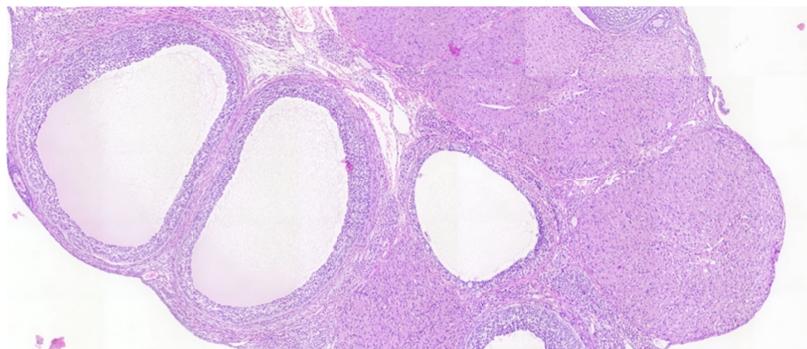
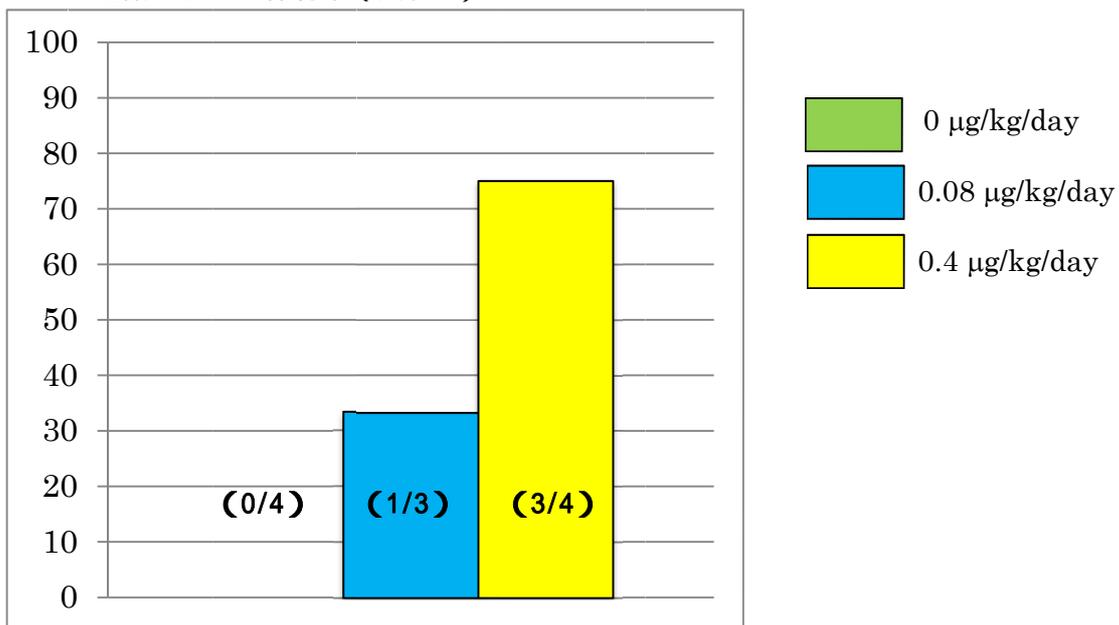


図3 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)の反復経口投与を受けた雌ラットの囊胞状卵胞の保有率

A. 13週齢における保有率(実験1)



B. 10週齢における保有率(実験2)

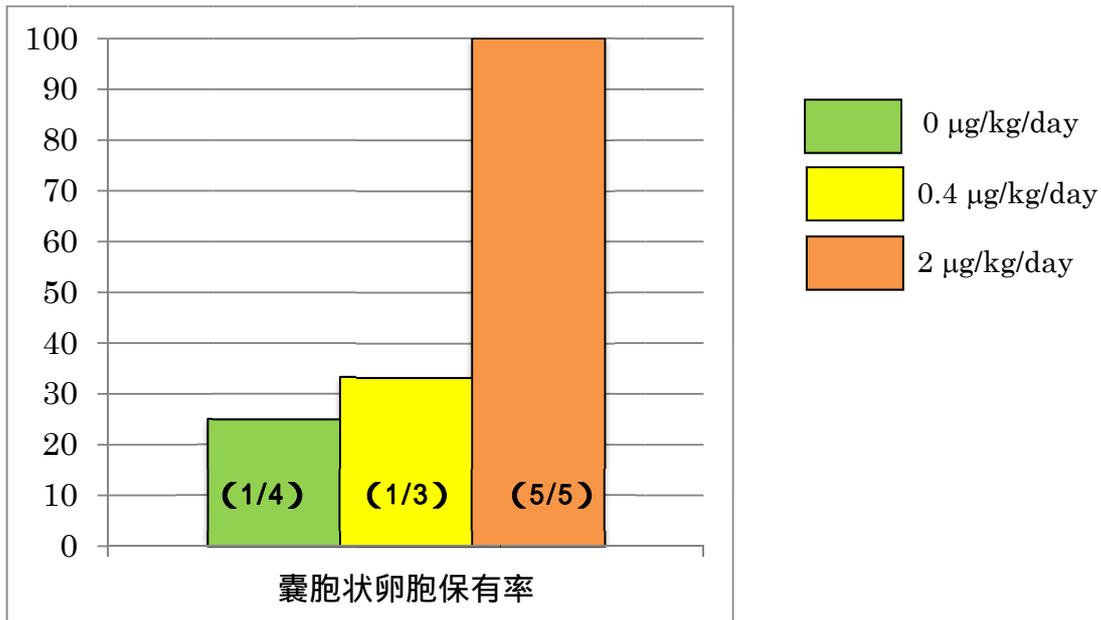


図4 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (\*  $p < 0.05$ )

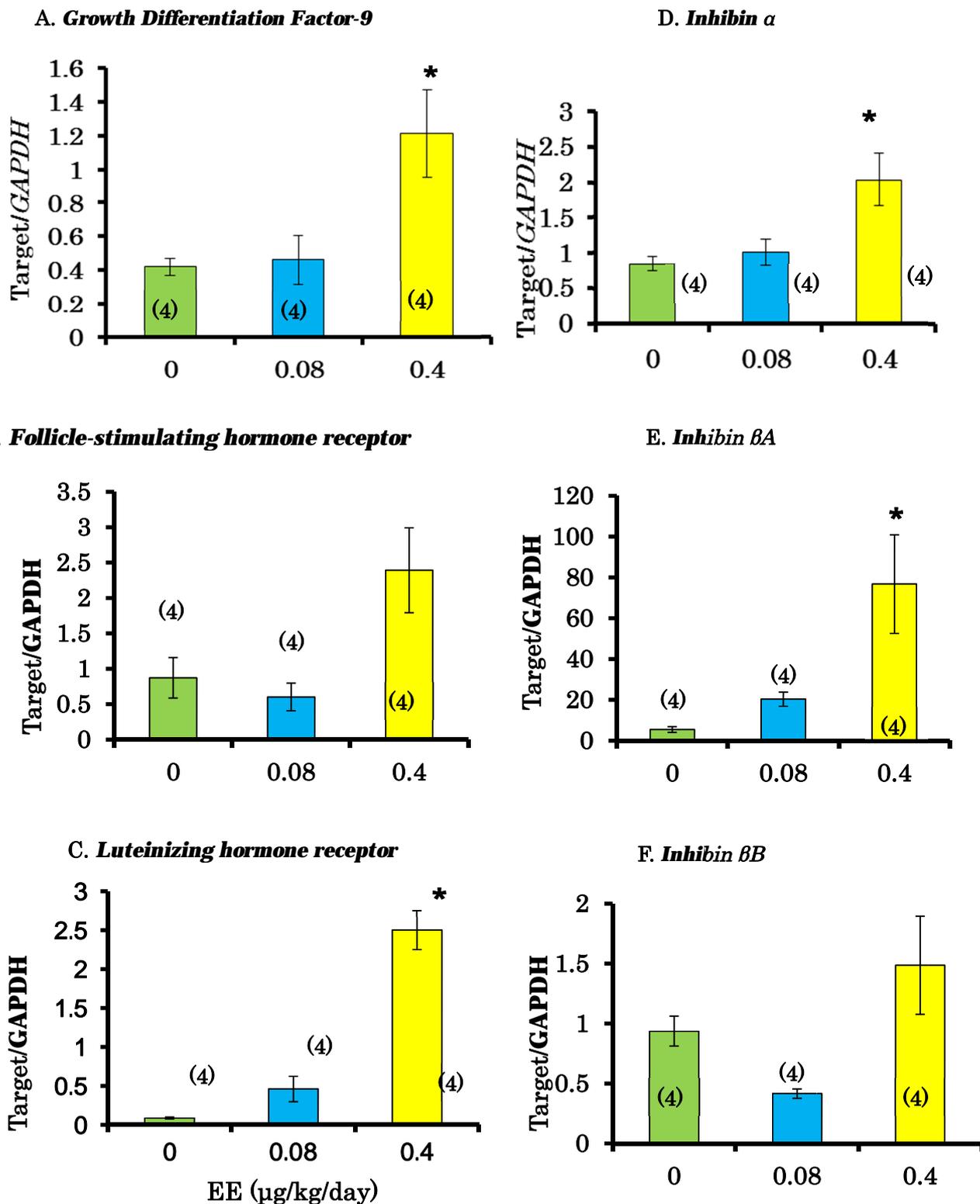
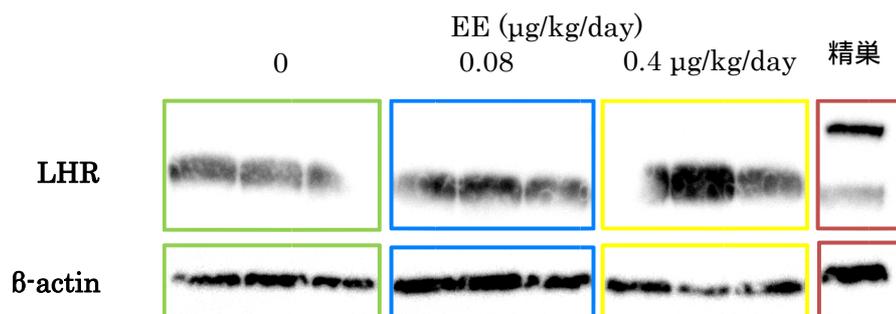


図5 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)の反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢卵巣における luteinizing hormone 受容体(LHR)タンパク質の発現

A. Western blotting



B. LHR の $\beta$ -actin に対する相対発現量

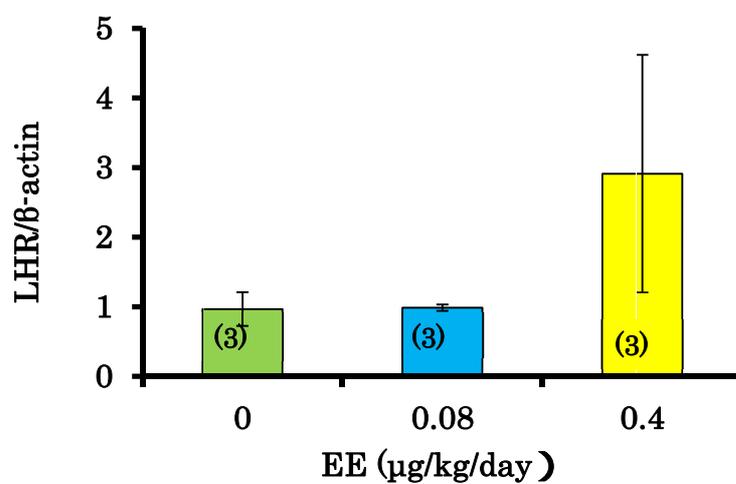
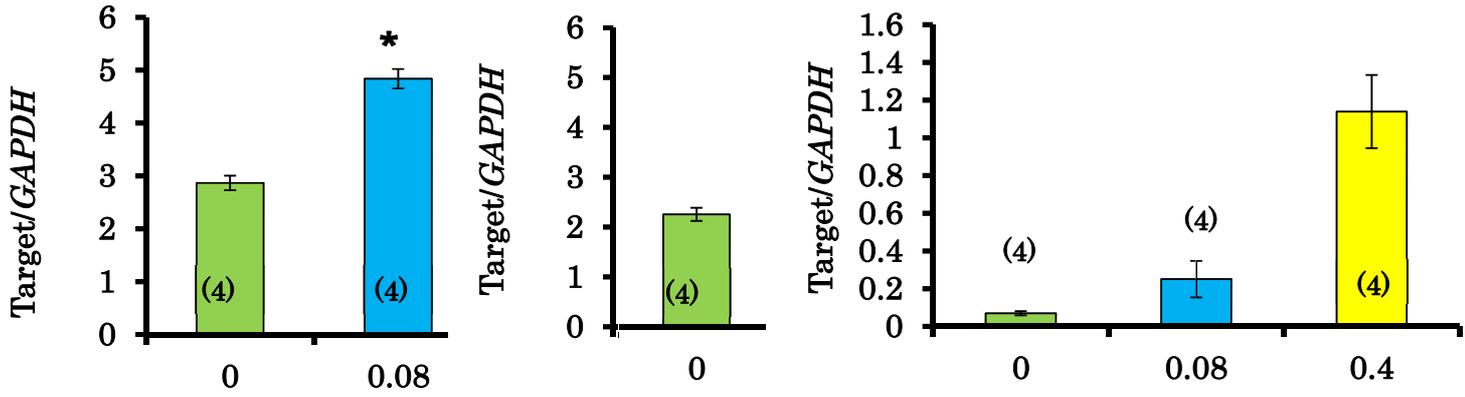


図6 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)の反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連遺伝子の発現 (\* p<0.05)

StAR

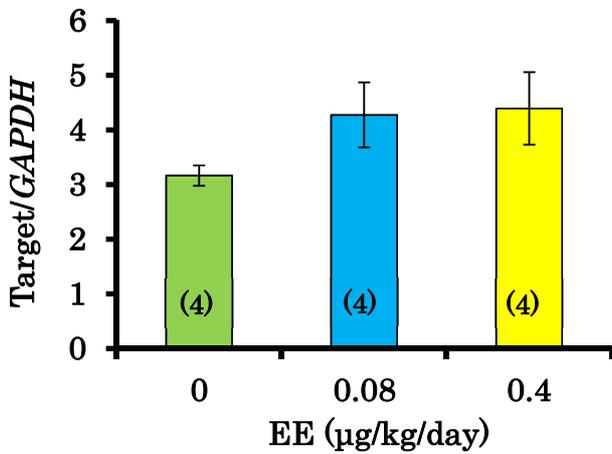
*Steroidogenic acute regulatory protein*

C. *3β-Hydroxysteroid* E. *Aromatase*



B. *Cholesterol side-chain cleavage enzyme*

D. *P450c17*



*Aromatase*

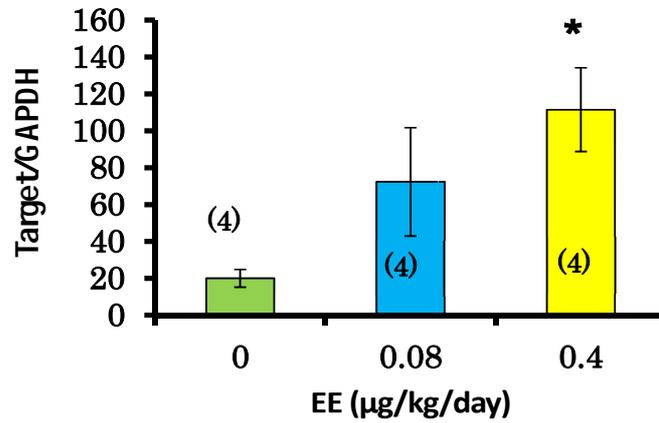


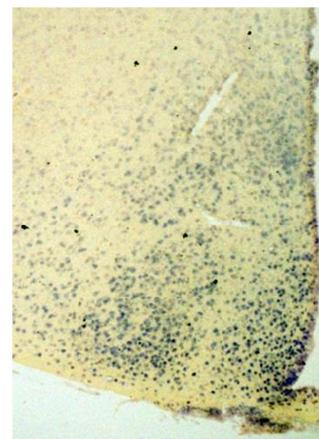
図7 視床下部弓状核(ARC)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン $\alpha$ 受容体 ( $ER\alpha$ 、赤色顆粒)の double-labelled *in situ* hybridization

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット

EE 0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

EE 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$

EE 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



*Kiss1* expressing cells 1032  
Co-expression with  $ER\alpha$  433

953  
616

1838  
552

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット

*Kiss1*  $-/-$

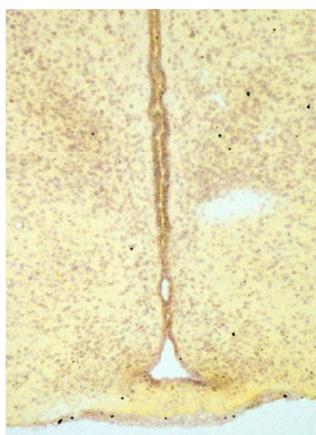
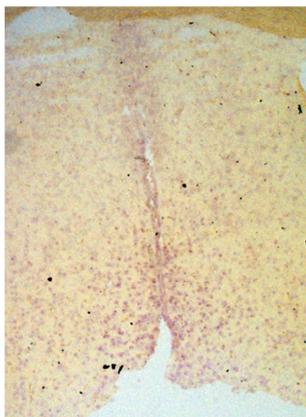


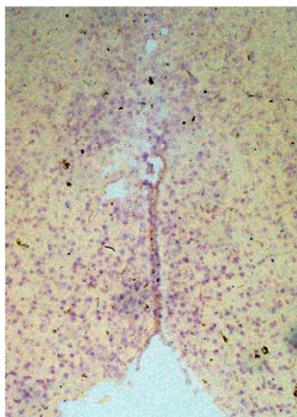
図8 視床下部前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン  $\alpha$  受容体 (*ER $\alpha$* , 赤色顆粒)の double-labelled *in situ* hybridization

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット

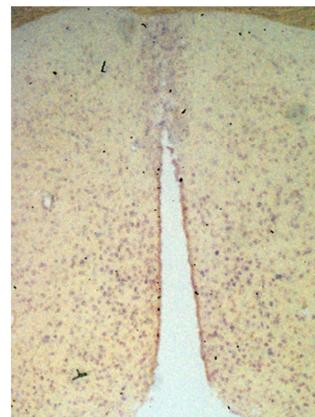
EE 0  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



EE 0.08  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



EE 0.4  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$



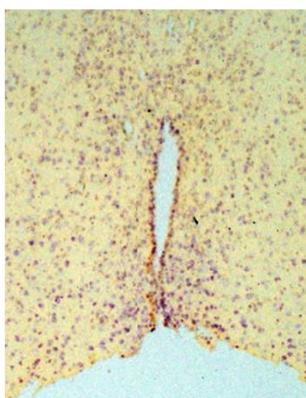
<i>Kiss1</i> expressing cells	41
Co-expression with <i>ER<math>\alpha</math></i>	30

20
8

21
12

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット

*Kiss1*  $-/-$



C. 成熟ラットの子宮

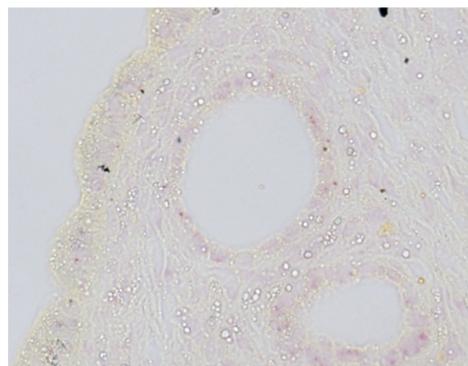


図9 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)の反復経口投与を受けた雌ラットの14週齢におけるパルス状LH分泌(実験2)

EE

( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )

