

Table 1 遅発影響AOP構築に用いた文献および本研究成果から得られた各指標

番号	文献	視床下部 キスベプ チンの低 下	L H サ ー ジ 低 下	異常 性周 期早 期発 現	その他
1	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. <i>Reprod Toxicol.</i> , <b>40</b> , 16-23, 2013.	○(AVPV, ARC込)		○	子宮がんの増加傾向
2	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 17alpha- ethynylestradiol in female rats. <i>Reprod Toxicol</i> , <b>51</b> , 145-156, 2015.	○(AVPV)	○	○	KiSS1/ER*陽性細胞の減少
3	Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. <i>J. Vet. Med. Sci.</i> <b>76</b> (8): 1105–1110, 2014	○(AVPV)	○	○	
4	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. <i>J Toxicol Sci.</i> , <b>39</b> , 775-784, 2014.	○(AVPV)			離乳まで
5	Shiorta 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. <i>J Toxicol Sci</i> 2012; <b>37</b> :681-90.			○	経口投与でも同様
6	Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17alpha- Ethynylestradiol. <i>Biol Reprod.</i> , <b>93</b> , 32, 2015.	○(AVPV)	○	○	生後10日齢で遅発影響

7	Yoshida M, Katashima S, Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Taya K, Watanabe G.: Predominant role of the hypothalamic-pituitary axis, not the ovary, in different types of abnormal cycle induction by postnatal exposure to high dose p-tert-octylphenol in rats. <i>Reprod Toxicol.</i> 57, 21-28, 2015.			○	卵巣交換で遅発影響は中枢影響を確認
8	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. <i>Mol Endocrinol</i> 2011;25:2157-68.			○	
9	Yoshida M, Katsuda S, Tanimoto T, Asai S, Nakae D, Kurokawa Y, Taya K, Maekawa A. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. <i>Carcinogenesis</i> 2002;23:1745-50.			○	子宮癌増加
10	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. <i>Toxicol Pathol</i> 2011;39:823-34.			○	子宮癌増加
11	Kauffman AS, Clifton DK, Steiner RA. Emerging ideas about kisspeptin- GPR54 signaling in the neuroendocrine regulation of reproduction. <i>Trends Neurosci</i> 2007;30:504-11.	○		○	視床下部キスペプチンが繁殖生理を制御
12	Maeda K, Adachi S, Inoue K, Ohkura S, Tsukamura H. Metastin/kisspeptin and control of estrous cycle in rats. <i>Rev Endocr Metab Disord</i> 2007;8:21-9.	○		○	AVPVのキスペプチンが性周期を制御
13	Dungan HM, Clifton DK, Steiner RA. Minireview: kisspeptin neurons as central processors in the regulation of gonadotropin-releasing hormone secretion. <i>Endocrinology</i> 2006;147:1154-8.	○		○	AVPV,ARCのキスペプチンがサージ、パルス中枢を各々制御

# 遅発影響のAOP

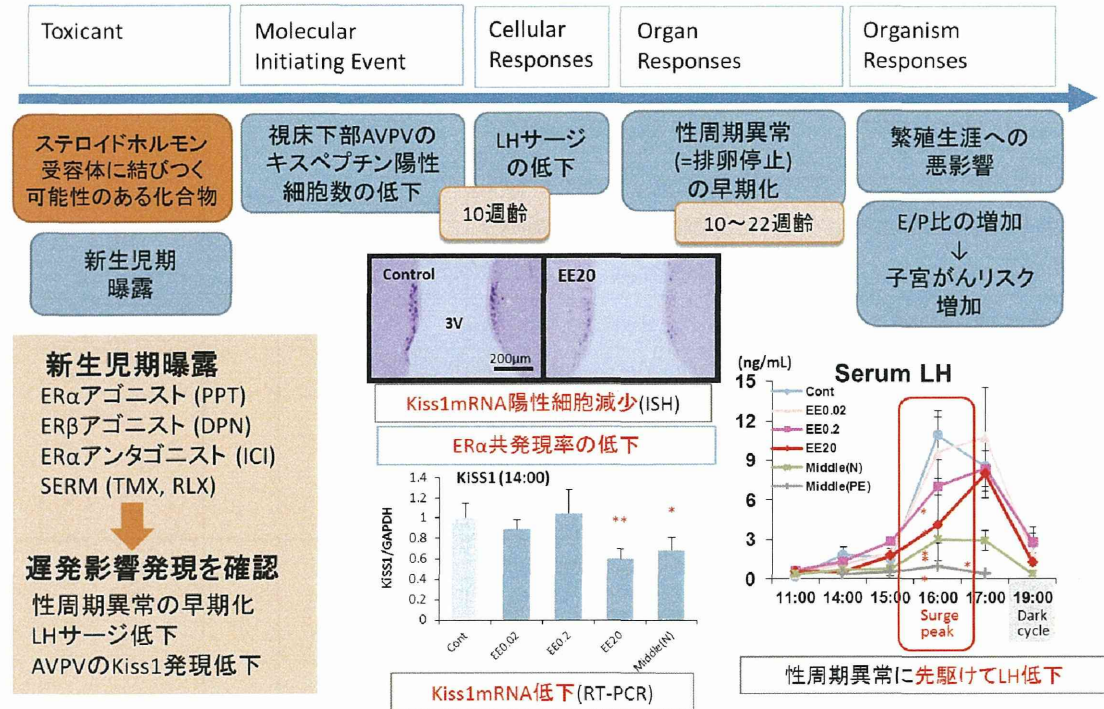


Figure 7. 遅発影響のAOP

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：井上 薫 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
研究協力者：森川朋美 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

### 研究要旨

遅発影響の発現に関わるエストロゲン受容体 (ER) の役割を明確にするため以下の検討を行った。

1. 卵巣摘出雌ラットを用いて、ER $\alpha$  アゴニストである PPT、ER $\beta$  アゴニストである DPN の子宮肥大試験を実施した。PPT は低用量から *in vivo* エストロゲン活性を示し、DPN も高用量では陽性結果となった。性周期への影響と照合すると子宮肥大試験の結果は遅発影響の発現と関連しないと考えられた。

2. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに PPT、DPN および ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI 182,780 (ICI) を 1 回皮下投与し、発達期の視床下部前部/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。PPT、DPN、ICI の新生児期曝露は生後 14 および 21 日における Kiss1 mRNA の発現に影響せず、生殖器の発達に群間差はみられなかった。発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性周期停止と直結しないことが示唆された。

3. 生後 0 日の雌性 Donryu ラットに ICI 0、500、5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を 1 回皮下投与し、生後 23 週まで性周期の観察を行った。5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では生後 13 週以降、持続発情を示す個体が増え、19 週以降では正常性周期の割合が対照群に比べて有意に低くなった。ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI の新生児期曝露は遅発影響として性周期停止の早期化を起こすことが確認された。

### A. 研究目的

化学物質の臨界期曝露による遅発影響は、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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) を単回皮下投与すると、性成熟後に遅発影響として 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で性周期 (排卵) の早期停止を起こすことを報告した (Takahashi et al., 2013)。また、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)。昨年度には、新生児期 EE 曝露ラットの性成熟前

における Kiss1 mRNA 発現を解析した結果、視床下部前部 (AVPV に相当) では遅発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、AVPV のキスペプチンニューロンが EE の新生児期曝露に対して非常に高い感受性を持つことが示された。

一方、遅発影響の発現に関わるエストロゲン受容体 (ER) については、ER $\alpha$  アゴニストである 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT)、ER $\beta$  アゴニストである 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) を用いた検討から、ER $\alpha$  が主要な役割を持つことは明らかである。しかし、非常に高用量の DPN では、PPT より作用は弱いものの、新生児期曝露によって性周期停止の早期化が認められ、遅発影響の発現における ER $\beta$

の関与の有無について結論を出すには至っていない。また、ER $\alpha$  アンタゴニストの新生児期曝露に関する検討は非常に限られている。

今年度は、遅発影響の発現に関わる ER の役割をさらに明確にするため、ER アゴニストおよびアンタゴニストを用いて、子宮肥大試験および新生児期曝露後の初期変化および性周期の観察を行った。

## B. 研究方法

### B-1. PPT、DPN による子宮肥大試験

OECD テストガイドラインに準拠して試験を行った(OECD TG 440)。6 週齢の雌性 Donryu ラットに卵巣摘出術を施した。14 日後、発情徴候がないことを確認した 36 匹を 6 群に分け、10%DMSO/sesame oil (溶媒対照)、PPT (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9) 100 および 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、DPN (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) 1,000 および 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (陽性対照) を 1 日 1 回・3 日間皮下投与した。投与用量、投与経路はこれまでに行った遅発影響の観察結果を基に設定した。最終投与の 24 時間後にイソフルラン麻酔下で放血致死させた。子宮は膈とともに摘出し、脂肪を除去した後、膈を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は子宮内液を含んだ状態でまず測定し (wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度重量を測定した (blotted weight)。その後、10%リン酸緩衝ホルマリンで固定し、子宮角全体を 5mm 間隔で横断し HE 標本作製した。左右子宮角の上・中・下部における子宮内膜上皮細胞の丈を計測し、6 か所の平均値をその動物の値とした。

### B-2. ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化の検索

所内で維持している Donryu ラットを交配させ、同日中に自然分娩した 14 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 時間以内に児動物を全て回収・混合し、12 匹の母動物に雌児動物を優先的に 8 匹/腹ずつ割り付けた。溶媒である 10%DMSO/sesame oil 5mL/kg (対照群)、PPT 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (PPT 群)、DPN 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (DPN 群) および ICI 182,780 (Sigma, CAS No.

129453-61-8) 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  (ICI 群) を 3 腹/群の児動物に 1 回皮下投与した。PPT および DPN の投与用量は、先行研究において性周期停止の早期化を起こす用量に設定した。ICI 182,780 は予備検討で実施した子宮肥大試験において、EE による子宮重量増加を完全に抑制する用量を用いた。

生後 9、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・膈を摘出した。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 染色標本作製し、鏡検した。子宮角は 3mm 間隔で横断し、全ての切片について子宮腺の数を計測した。

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  $\mu\text{g}$  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、ABI PRISM 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 の測定には、TaqMan $\text{\textcircled{R}}$  Rodent GAPDH Control Reagents (Applied Biosystems) を用いた。各遺伝子の発現量を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として、相対的な発現量を算出した。

### B-3. ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

所内で維持している Donryu ラットを交配させ、同日中に自然分娩した15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時間以内に児動物を全て回収・混合した。12腹には雌児動物を優先的に8匹/腹に割り付け、1群4腹の児動物に sesami oil 5mL/kg (溶媒対照)、ICI 182,780 (ICI) 500 および 5,000  $\mu$ g/kg を1回皮下投与した。残りの3腹には雄児動物を優先的に割り付け、ICI 5,000  $\mu$ g/kg を1回皮下投与した。投与後2、4、24時間における肝臓および脳組織内の濃度を(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。

雌児動物は生後21日で離乳し、各群30匹に調整した。実験期間中、臨床観察および体重測定を毎週実施した。生後27~30日には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。

7週齢から23週齢まで隔週で性周期の観察を行った。5日間連続で膣スメアを採取し4~5日周期で規則的に発情が回帰する場合は正常性周期、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。

### B-4. 統計学的解析

体重、臓器重量、血清FSH濃度、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。子宮肥大試験では陽性対照である EE 群を除き、PPT 群、DPN 群を分けて、それぞれ対照群と比較した。正常性周期の割合は 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. PPT、DPNによる子宮肥大試験

解剖時の体重に群間差は認められなかった。陽性対照(EE)群の子宮重量は溶媒対照群に比べて顕著に増加し、子宮内膜上皮細胞丈の増加も明らかであった。PPT群の子宮重量は、wet weight では1,000  $\mu$ g/kg から、blotted weight では100  $\mu$ g/kg から有意な増加を示した(図1)。同様に、子宮内膜上皮細胞丈も用量依存性に増加し、1,000  $\mu$ g/kg において統計学的有意差が認められた。DPN群では、PPT群に比べて増加の程度は小さいが、10,000  $\mu$ g/kg 群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められた。

### C-2. ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化の検索

途中解剖において、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変化と考えられた(data not shown)。

血清FSH濃度は、PPT群では生後9日、その他の群では生後14日に最も高くなった(図2)。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。

卵巣および子宮重量の結果を図3に示す。PPTおよびDPN群では生後14日において、卵巣の相対重量が有意に低下した。

雌性生殖器の組織像を図4に示す。生後14日の卵巣では、原始卵胞から小型胞状卵胞までの卵胞が観察された。生後21日では小型胞状卵胞の径がより大きくなり、一部で大型胞状卵胞の出現が観察された。卵胞の発育段階は各群とも同程度であり、子宮および膣の組織像にも、投与による影響は認められなかった。生後14および21日における子宮腺の数に群間差はなかった(図5)。

視床下部前部および後部における Kiss1 mRNA 発現レベルを図6に示す。視床下部前部では、PPT群で発現レベルが低い傾向がみられたものの、生後14および21日ともに、対照群との間に統計学的有意差はなかった。視床下部後部における Kiss1 mRNA 発現は、

投与による影響はみられなかった。Kiss1 receptor の発現については、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 (data not shown)。

### C-3. ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

新生児ラットに皮下投与後 2、4、24 時間における肝臓および脳内の ICI 濃度を表 1 に示す。

各群の発育はほぼ同様に推移し、生後 23 週までの平均体重に群間差はみられなかった (図 7)。

生後 27~30 日の観察期間において、膣開口の平均日齢は ICI 群で用量相関性に早まり、膣開口時の平均体重は ICI 群で低値を示した (表 2)。

性周期の観察結果を図 8 に示す。ICI 5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、生後 13 週以降持続発情を示す個体が増え、正常性周期の割合が減少した。19 週以降では対照群と有意差が認められた。ICI 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、対照群とほぼ同様の推移を示した。

## D. 考察

### D-1. PPT、DPN による子宮肥大試験

PPT 群では用量依存性に子宮重量および子宮内膜細胞丈の増加が明らかであった。Wet weight において 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から有意差が認められ、今回の試験条件では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で *in vivo* エストロゲン活性を持つことが示された。DPN 群では程度は小さいものの、10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められ、DPN も *in vivo* エストロゲン活性を有するものと考えられた。

DPN は ER $\alpha$  より ER $\beta$  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 $\beta$  選択的アゴニストとして使用されているが、ER $\alpha$  への作用が全くないわけではない。子宮肥大作用には主に ER $\alpha$  が関与すると考えられており (Harris et al., 2002)、DPN 群で観察された子宮重量や内膜上皮細胞丈の増加は ER $\alpha$  を介して生じた可能性が高い。したがって、前年度の研究において、DPN の新生児期曝露による性周期停止の早期化に、DPN の ER $\alpha$  アゴニスト作用が関与した可能性を否定することはできず、ER $\beta$  の関与につい

て別の検討が必要であると考えられた。

一方、性周期に対する作用は、DPN 10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  と PPT 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  で同程度であるが、子宮重量や内膜上皮細胞丈に対する作用には大きな差があった。また過去の検討において、PPT 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  では性周期停止の早期化を認められていないが、子宮肥大試験では陽性結果を示し、遅発影響の発現は子宮肥大試験の結果とは相関しないことが示された。

### D-2. ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化の検索

昨年度の研究において、EE の新生児期曝露では、最も低い用量から視床下部前部の Kiss1 mRNA の発現が低下し、AVPV のキスペプチンニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。同様に、生後 14 日における Kiss1 mRNA の発現低下は先行研究でも認められている (Takahashi et al., 2014)。一方、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では、生後 14 および 21 日の Kiss1 mRNA レベルに対照群との有意な差は認められなかった。EE では無影響量でも Kiss1 mRNA の発現低下が認められたこと、性周期の早期停止を起こす用量の PPT、DPN では Kiss1 mRNA 発現に影響がなかったことから、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性成熟後の性周期停止と直接リンクせず、遅発影響の早期指標には適さないと考えられた。EE のみで Kiss1 mRNA 発現低下が観察され、発達期キスペプチンニューロンに対する作用は遅発影響を起こす物質の中でも異なることが示唆された。

卵巣重量の一部で有意な低値がみられたが、雌性生殖器の発育に群間差はみられなかった。EE の新生児期曝露においても脱雌性化に達しない用量では、FSH 濃度、雌性生殖器の発育に差はみられず、これらのパラメーターは性周期の早期停止の予測には直結しないことが示されており、これと一致する結果であった。

### D-3. ER $\alpha$ アンタゴニストによる遅発影響の検索

新生児ラットにおいて、皮下投与した ICI が脳内に分布することを確認し、24 時間後の脳内濃度は成熟ラットを用いた報告と同程度と考えられた (Alfinito et al., 2008)。

本検索において、ICI 群の膣開口日齢が用量相関性に早まったが、過去の報告では膣開口への影響はみられていない (Pinilla et al., 2002)。今回は観察期間が限られており、膣開口に対する影響は再度検討する必要があると考えられた。

性周期の観察において、5,000 µg/kg 群では加齢に伴って正常性周期の割合が低下し、ICI の新生児期曝露が性周期の早期停止を起こすことが示された。これは Pinilla らの報告と一致する (Pinilla et al., 2002)。また、性周期への影響は不明であるが、抗エストロゲン作用を持つ CI628 の新生児期曝露により卵巣の機能障害や性行動への影響が報告されている (McEwen et al., 1977)。CI628 は弱いエストロゲン作用も併せ持つことから、これが脳の性分化に影響したと考えられている。ICI は ER $\alpha$  のアンタゴニストであるが、特定の条件下ではアゴニスト作用を示すことが報告されている (Robertson et al., 2001; Alfinito et al., 2008)。したがって、新生児ラットの視床下部では、ICI がアゴニストとして働いた可能性が考えられる。また、ICI は膜結合型 ER である GPR30 のアゴニスト作用を有することが知られており (Prossnitz et al., 2008)、GPR30 の関与を含め、ICI による遅発影響の詳細な発現機序についてはさらに検討が必要である。

## E. 結論

ER $\beta$  アゴニストである DPN は、ごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示された。性周期への影響と照合すると、子宮肥大試験の結果は遅発影響の発現と関連しないと考えられた。

PPT、DPN、ICI の新生児期曝露は生後 14 および 21 日における Kiss1 mRNA の発現に影響せず、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性周期停止と直結しないことが示唆された。

ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI 182,780 の新生児期曝露は遅発影響として性周期停止の早期化を起こすことが確認された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G,

Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, **93**, 32, 2015.

- 2) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Repro. Toxicol.* **60**, 33-38, 2016
- 3) Taketa Y, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Effects of sulpiride and ethylene glycol monomethyl ether on endometrial carcinogenicity in Donryu rats. *J Appl Toxicol. Online*. Jul 14 2015.

### 2. 学会発表

高橋美和、市村亮平、井上薫、森川朋美、渡辺元、吉田緑：17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE)新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下：第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

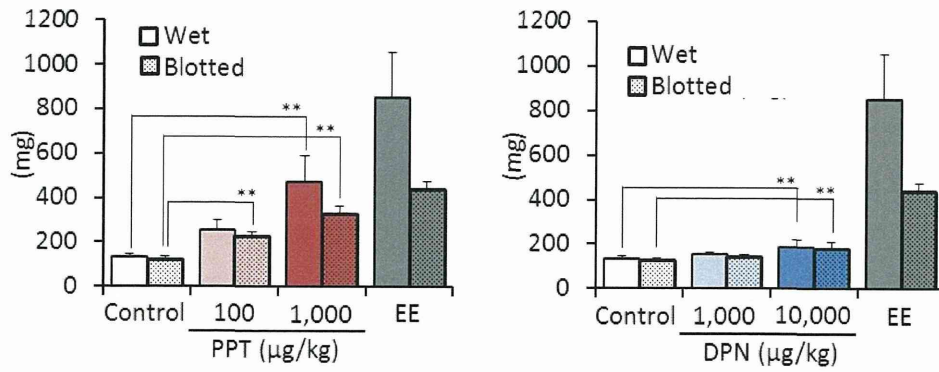
## 参考文献

- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology*, **149**, 5219-5226, 2008.
- 2) Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , in estrogen target tissues in vivo through the use of an ER $\alpha$ -selective ligand. *Endocrinology*, **143**, 4172-4177, 2002.
- 3) 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 $\alpha$ -ethynylestradiol in female rats. *Reprod Toxicol.*, **51**, 145-156, 2015.
- 4) McEwen BS, Lieberburg I, Chaptal C, Krey LC. Aromatization: important for sexual differentiation of the neonatal rat brain. *Horm Behav.*, **9**, 249-263, 1977.
- 5) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure- activity relationship studies of

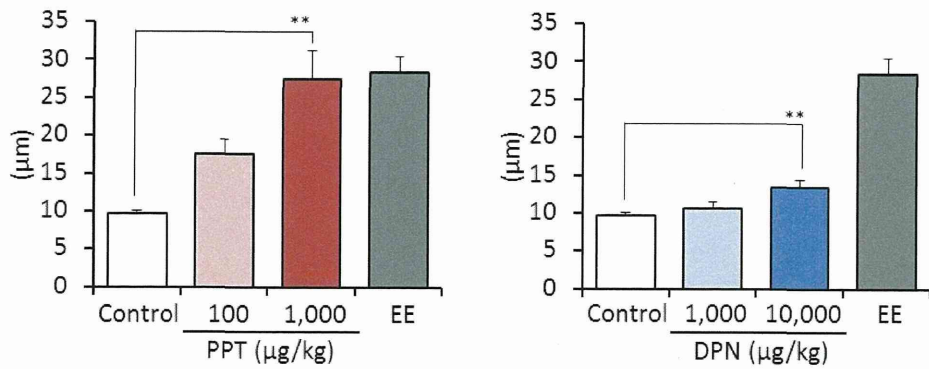


- diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 6) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG440): Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, 2007.
  - 7) Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol.*, **172**, 441-448, 2002.
  - 8) Prossnitz ER, Sklar LA, Oprea TI, Arterburn JB. GPR30: a novel therapeutic target in estrogen-related disease. *Trends Pharmacol Sci.*, **29**, 116-123, 2008.
  - 9) Robertson JA, Zhang Y, Ing NH. ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **77**, 281-287, 2001.
  - 10) 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.
  - 11) 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.
  - 12) 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) 子宮重量**



**(B) 子宮内膜細胞丈**



n=6/group \*\* : p<0.01 vs control (Dunnett)

**図1. PPTおよびDPNの子宮肥大試験における子宮重量 (A) および子宮内膜細胞丈 (B)**

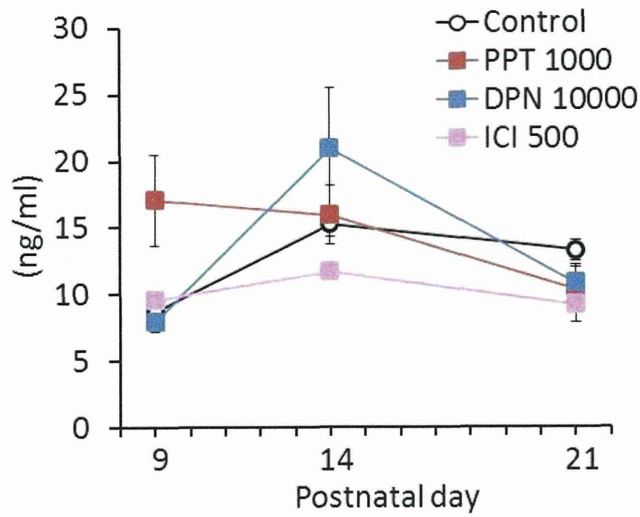
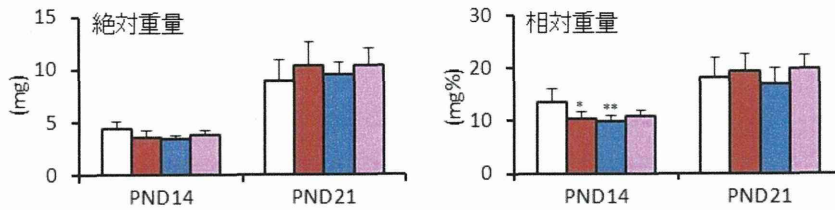
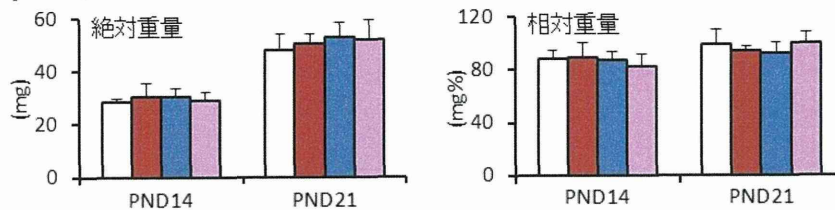


図2. 血清FSH濃度

(A) 卵巢重量



(B) 子宮重量



Cont PPT DPN ICI \*, \*\*: p<0.05, 0.01 vs Control (Dunnett test)

図3. 卵巢 (A)および子宮重量 (B)

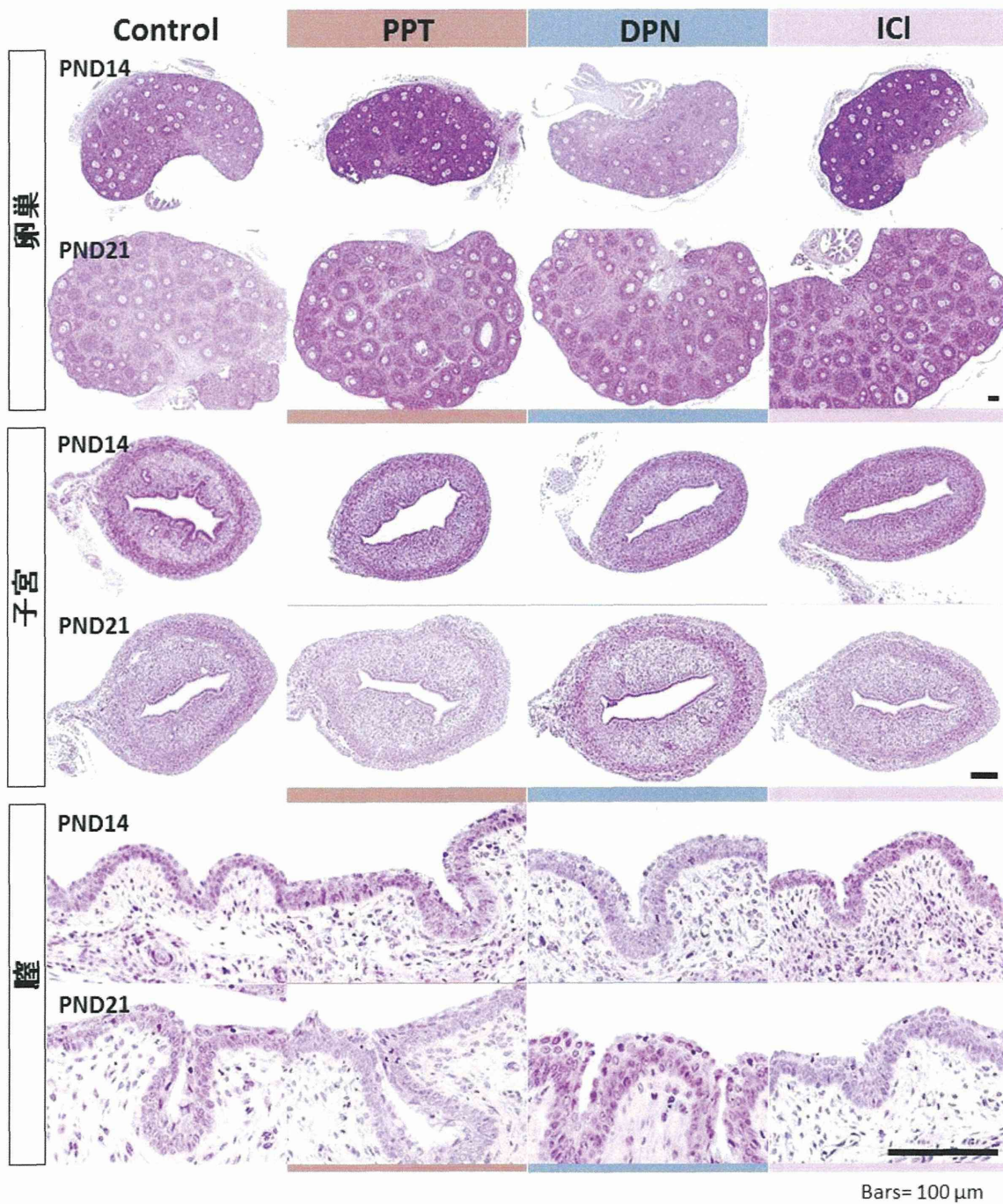


図4. 生後14および21日における卵巣・子宮・膣の組織像

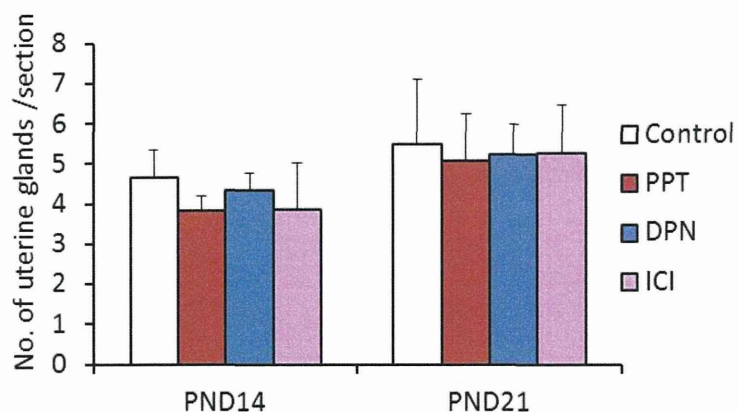
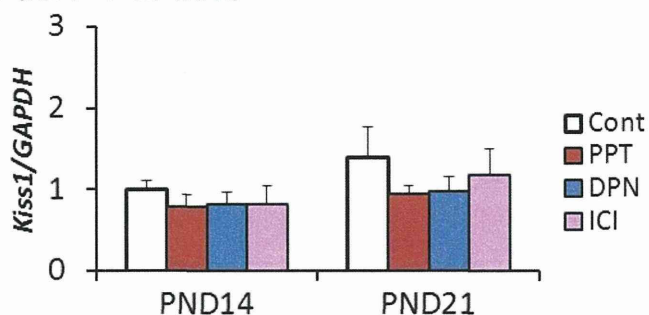


図5. 生後14および21日における子宮腺の数

(A) 視床下部前部



(B) 視床下部後部

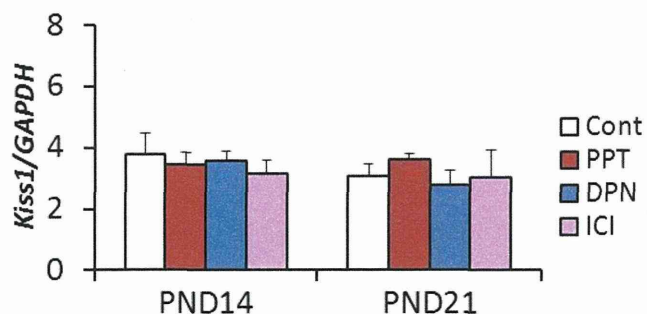
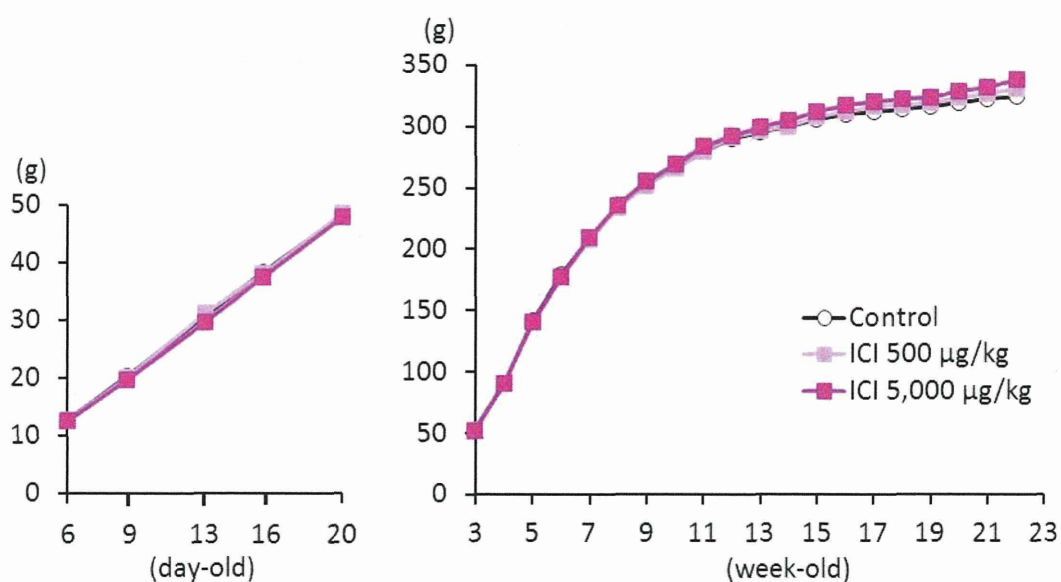


図6. 視床下部前部 (A) および後部 (B) における Kiss1 mRNA発現



**表1. 肝臓および脳内のICI濃度**

(h)	Liver (ppm)	Brain (ppm)
2	0.07	0.02
4	0.07	0.03
24	0.04	0.05



**図7. ICI新生児期投与後の体重推移**

表2. ICI新生児期曝露ラットにおける膣開口平均日齢と体重

ICI 182,780 (μg/kg)	Postnatal day	Body weight (g)
0	28.0 ± 0.8	91.6 ± 7.4
500	27.6 ± 0.6 *	87.8 ± 5.8 *
5,000	27.3 ± 0.5 **	85.0 ± 6.1 **

(観察期間 生後27~30日)

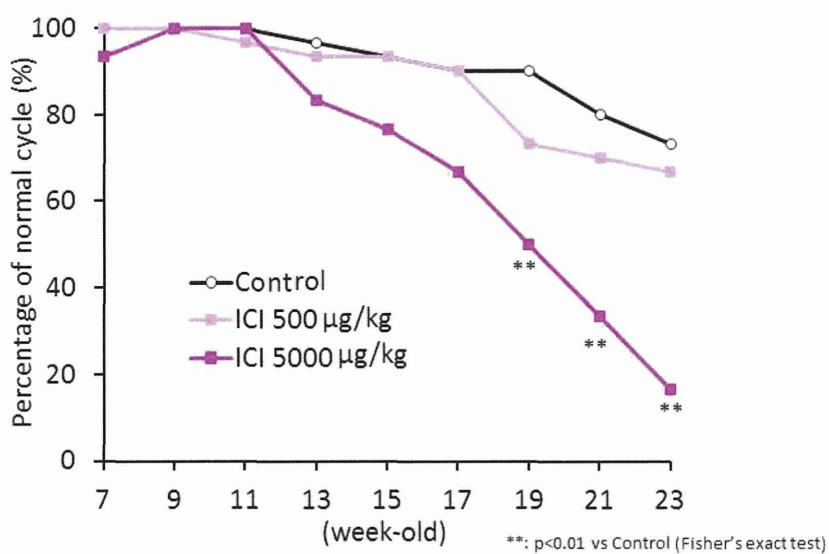


図8 正常性周期を示す動物の割合

平成 27 年度 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：遅発影響の発現機序検索。特に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 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：	東村 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：	上家 潤一	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：	田中 啓陽	麻布大学獣医学部
研究協力者：	古澤 理沙	麻布大学獣医学部
研究協力者：	吉河 佑莉	麻布大学獣医学部

研究要旨

エストロゲン活性化学物質のモデル化合物である 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE)を、新生雌ラットに単回又は 5 日間反復経口投与すると、エストロゲンの生理的変動範囲と同等以下の血中濃度でも、生殖内分泌機能に不可逆的遅発影響を及ぼし、その出現時期は用量に逆相関し、生殖機能の発達に伴い表現型が変化することが明らかになった。今年度は、遅発影響をもたらす最小用量の生殖毒性学的意義を明らかにするために、新生期にこの用量の反復経口投与を受けた動物の生殖能力および胎児の発生を検討した。また性周期回帰停止に先立ち、視床下部/下垂体/性腺軸の異常が示唆されたことから、遅発影響出現のメカニズムを知るために、EE 投与直後の視床下部におけるエストロゲン $\alpha$ 受容体(ER $\alpha$ )を起点とする性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)制御に関わる遺伝子の発現解析を行った。

その結果、遅発影響の最小影響量 (0.08  $\mu$ g/kg/day) は生殖能力評価では影響は認められなかった。また、投与直後の新生雌ラット視床下部では、性周期の早期回帰停止を招く EE 投与を行った動物にのみ *Kiss1* 遺伝子の明瞭な発現低下が認められた。*GPR54* および *ER $\alpha$*  の遺伝子発現についてはいずれの処置においても影響は認められなかった。新生ラットの視床下部では、*Kiss1* は LH パルスを起動する視床下部弓状核の *Kndy* ニューロンにのみ発現していることから、EE はまず *Kndy* ニューロンの *Kiss1* 遺伝子発現を低下させ、GnRH 分泌制御を変化させることで、その後の視床下部/下垂体/性腺軸の正常な発達を妨げ、遅発影響をもたらすことが示唆された。

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、この時期の化学物質曝露の影響とそのメカニズムを明らかにするために、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 を経口投与してその影響を検討し、この時期の EE 曝露は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を及ぼす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。

今年度は最終年度として、嚢胞状卵胞のみを増加させる遅発影響の生殖毒性学的意義を調べ、前年度得られた閾値の妥当性を検討することとした（実験 1）。また、性周期回帰停止前の時期は、卵巣ではエストロゲン合成の律速酵素である *aromatase* を含む性ステロイド合成酵素遺伝子の発現亢進が認められたにもかかわらず、エストロゲンのフィードバックを受けて GnRH 分泌を上位から直接制御するキスペプチンを分泌する視床下部弓状核 (ARC) および前腹側脳室周囲核 (AVPV) における *Kiss1* 遺伝子はエストロゲンによるフィードバックが減弱した発現変化を示した。また、エストロゲンによるネガティブフィードバックを受ける ARC により駆動される LH パルスも大きくなり、視床下部および下垂体と卵巣との間で変化の方向に不一致が認められ、視床下部/下垂体/性腺軸の異常が、性周期早期回帰停止に関与している可能性が示唆された。そこで実験 2 では、遅発影響をもたらす EE による視床下部の初期変化を明らかにすることを目的とし、これまでの研究で得られた、用量と影響との関係および投与日齢と影響との関係に基づき、反復あるいは単回経口投与を行い、投与後の視床下部における *ERα* および *ERβ*、*Kiss1*、*GPR54*（キスペプチン受容体）、ならびに *Kndy* ニューロンに局在してキスペプチンとともに GnRH パルスの発生に与っていると考えられている、ダイノルフィン (DYN)、DYN と高親和性を有する  $\kappa$  オピオイド受容体、ニューロキニン B (NKB)、ならびに NKB 受容体をそれぞれコードする遺

伝子の発現を解析した。とくに *ERα* および *Kiss1* については、ARC における発現に及ぼす影響を *in situ hybridization* により検討した。

## B. 研究方法

### 1. 被験物質の調製

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冷蔵遮光保存した。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

実験 1 および 2 ともに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)) あるいは同一系統の成熟雄ラットを購入し、これとの交配により作出した妊娠ラット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 日から出産観察を行い、出生日を 0 日齢とした。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 匹とした。実験 1 では投与動物の性成熟後の生殖能力を調べるために、別途、同系統の成熟雄ラットを購入した。実験 2 では、脳の部位特定のため、同様の方法で得られた無処置雌新生児も用いた。また、*Kiss1* 遺伝子の *in situ hybridization* における陰性対照として、*Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット (*Kiss1KO*) を用いた。

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°C 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。

実験1および2ともに、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。

### 3. 投与方法及び投与量

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、実験1および2ではEEを1日齢から5日間反復経口投与した。実験2では、さらに1日齢または5日齢に単回経口投与を行った。

EEの用量は、平成26年度までの本研究に基づき設定した。すなわち、実験1では性周期の早期回帰停止は認められないが、嚢胞状卵胞の形成が認められる0.08 µg/kg/dayを選定した。実験2の反復投与では、10日齢で既に卵胞の発育遅延が認められ、初回排卵が遅れ、若齢で性周期の回帰が停止する2 µg/kg/day、ならびに性成熟後早期に性周期の回帰が停止する0.4 µg/kg/dayを選定した。また、さらに低用量での初発影響を調べるために、0.08 µg/kg/dayならびにこれらの遅発影響が認められない0.016 µg/kg/dayを設定した。単回投与では、先行研究において1、5あるいは7日齢における投与によって若齢で性周期の回帰を停止させる10 µg/kg/dayを設定し、この他に2 µg/kg(1日齢投与)あるいは20 µg/kg(5日齢投与)を設定した。いずれの実験も対照群の動物にはコーン油(和光純薬)を経口投与した。

### 4. 観察方法

#### (1) 実験1

投与前後に一般状態を観察し、身体的発達指標として眼瞼開裂日齢を調べた。投与動物は21日齢に離乳し、28日齢から膺開口の有無を調べ、8週齢から2週間、毎日膺垢を採取して性周期を観察した。10週齢から生殖能力の確認されている雄と同居させ、膺垢を観察し

て精子の確認された日を妊娠0日とし、妊娠20日に帝王切開に供した。この間体重を、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、妊娠期間中は妊娠0、7、14および20日に測定した。

性周期は、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。

#### (ア) 剖検

妊娠20日にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル、共立製薬、東京)深麻酔下で放血と殺した。卵巣は左右の黄体数を数え、ブアン液で固定した。左右子宮角は切開し、着床の状況を観察した後胎児及び胎盤を摘出し、それぞれ重量を測定した。遺残胎盤および死亡胎児の数も数えた。摘出した胎児は実体顕微鏡下で生死、性別および外表以上の有無を観察した。生存胎児は全てアルコール固定の後、Dawson法によりアリザリンレッドS透明骨格標本とし、骨格観察に供した。

#### (イ) 胎児の骨格観察

胎児骨格標本は実体顕微鏡下で骨格異常および変異の有無を観察した。また、骨化している仙尾椎、前及び後肢の基節骨ならびに胸骨分節の数を数えた。

### (2) 実験2

#### (ア) 体重および一般状態

投与前後に一般状態を観察した。体重は投与期間中および剖検日に測定した。

#### (イ) 剖検

単回および反復投与のいずれにおいても最終投与24時間後に剖検し、脳を採取した。無処置雌は6日齢に、Kiss1/KOは10日齢に剖検した。

遺伝子発現定量解析に供する動物は、冷却麻酔下で断頭し、直ちに脳を採取してRNAlater® Solution (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)に浸漬し、冷蔵保存した。遺伝子発現の観察あるいは脳の部位特定に供する動物は、冷却麻酔下でリン酸緩衝生理食塩液(PBS)により全身還流を行い放血後、4%パラホルムアルデヒド(PFA)で還流し、脳を採取した。採取した脳はさらにPFAに浸漬し、冷蔵

庫内で一晩固定した。

(ウ) 視床下部における性腺刺激ホルモン放出ホルモン関連遺伝子発現の定量

反復経口投与および単回経口投与の動物について実施した。

① 視床下部および上部領域の切り出し  
RNAlater 中に保存した脳は実体顕微鏡下で、ブレインマトリックス (RODENT BRAIN MATRIX Rat, 200-400 g, Colonal, ASI INSTRUMENTS, USA) を用いて視床下部と中脳との境界から視交叉までを含む領域を切り出し、次に乳頭体の左右の隆起を境界として外側領域を切り落として、さらに冠断面より前交連から視床下部領域とそれより上部の領域とに分割して、*ERα* についてはこの2領域を解析の対象とし、その他の遺伝子は視床下部領域を解析の対象とした。

② Total RNA の抽出

採取した組織は碎装置用チューブ (トミー精工、東京) へ TRIzol (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA) 1 mL および細胞破碎装置用ビーズ (ジルコニア 2.0 Φ、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) によって 4000 rpm、4°C で 90 秒間ホモジナイズした。次にクロロホルム (試薬特級、和光純薬工業、大阪) 200 μL を加えて攪拌し、室温で2分間静置した後、遠心分離を 12,000×g、4°C で 15 分間行った。二層に分離したチューブの溶液から RNA を含む無色の上層を別のチューブへと移し、2-プロパノール (イソプロピルアルコール、分子生物学用、和光純薬工業、大阪) を 0.5 mL 添加して攪拌し、12,000×g、4°C で 10 分間遠心分離した。チューブ内に沈殿物が存在していることを確認後、上清を除去して 75% に希釈したエタノール (分子生物学用、和光純薬工業、大阪) を 1 mL 添加して沈殿物を洗浄し、7,500×g、4°C で 5 分間遠心分離した。75% エタノールを除去後、RNA 沈殿物を 5 分間乾燥させ、DEPC 処理水 (DEPC treated Water、ニッポンジーン、東京) を 100 μL 添加した。これを 60°C で 10 分間インキュベートして RNA 沈殿物を溶解し、RNA 溶液の吸光度の測定により抽出された RNA の濃度を求めた。得られた RNA 濃度をもとに各サンプルの RNA 濃度を DEPC treated Water

を加えて 100 mg/mL に調製し、-80°C で保存した。

③ Real-Time RT-PCR

逆転写に先立ち、total RNA 溶液を deoxyribonuclease I (Amplification Grade、Life Technologies Corporation) 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) 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) 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、EE と結合するエストロゲン受容体をコードする *ERα* および *ERβ*、キスペプチンをコードする *Kiss1*、キスペプチン受容体をコードする *GPR54*、*DYN* をコードするプロダイノルフィン遺伝子 (*Pdyn*) および *DYN* と高親和性を有する κ オピオイド受容体をコードする *Opioid receptor kappa 1 (Oprk1)*、*NKB* をコードする *Tac3*、ならびに *NKB* 受容体をコードする *Tacr3* を選択した。各遺伝子の発現量は *GAPDH* mRNA で補正した相対発現量として求めた。使用したプローブおよびプライマーは表 1 に示す *ERα* および *ERβ* を除き TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems, South San Francisco, CA, USA) の Rn00710914\_m1 (*Kiss1*)、Rn00571351\_m1 (*pdyn*)、Rn00569758\_m1 (*tac3*)、Rn00566955\_m1 (*tacr3*)、Rn01448892\_m1 (*Oprk1*) を用いた。*GAPDH* 遺伝子は Pre-Developed Taqman® Assay Reagents Control Kits (Life Technologies Corporation) を用いた。

(3) *Kiss1* 遺伝子発現の観察

コーン油あるいは EE を 2 μg/kg/day 反復経口投与した動物について観察した。遺伝子発現観察に先立ち、視床下部における ARC および AVPV 領域の位置を確認し、ついで、ARC における *Kiss1* 遺伝子発現部位を確認した。

① ARC および AVPA 領域の確認

PFA 固定した 6 日齢無処置雌ラット脳は、ブレインマトリックス (Colonal, ASI INSTRUMENTS) を用いて視床下部と中脳の境界から吻側方向に向かって 6 mm 幅の領域

を冠状断で切り出した。これを常法に従いパラフィン包埋し、10 µm 厚の連続切片として Kluver Ballera (KB) 染色を施した。

KB 染色標本を観察し、Paxinos & Watson によるラット脳アトラスを参照して、6 日齢雌における ARC は、視床下部の尾側(乳頭体側)から吻側方向へ約 0.66-1.21 mm の領域に位置し、また AVPV は約 1.89-2.11 mm の領域に位置することを確認した(図 1)。

#### ② ARC 領域における *Kiss1* 発現部位の確認

6 日齢無処置雌ラット脳の ARC 領域を、20 µm 間隔で 10 µm 厚の連続切片とし、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) を用いる ISH で確認した(図に示さず)。ISH は処方に従い行ったが、組織の前処理(pretreatment)における煮沸処理は 10 分間とし、protease 処理は 40 °C、5 分間とした。また、*Kiss1* ISH 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションは 40 °C で 150 分間行い、陰性対照には、10 日齢の *Kiss1*KO 雌の脳組織標本を用いた。

#### ③ EE 反復経口投与後の ARC における *Kiss1* 発現

1 日齢から EE 2 µg/kg/day あるいはコーン油 (10 mL/kg/day) を 5 日間反復経口投与した 6 日齢ラットの ARC 領域のうち、②の検討で、最も発現が多く認められた尾部を検索の対象とし、尾部から吻部に向かって 20 µm 間隔で 10 µm 厚の切片を 3 枚作製し、*Kiss1* の ISH に供した。ISH は、②と同じ条件で行った。

#### (4) *ERα* 遺伝子発現の観察

##### ① ARC 及び AVPV 領域における *ERα* 遺伝子発現の確認

6 日齢無処置雌ラットの視床下部 ARC および AVPV 領域における *ERα* の発現を QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics) を用いる ISH で確認した(図 2)。Pretreatment および protease 処理ならびに *ERα* ISH 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションは上記イ)と同じ条件を採用した。

##### ② EE 反復経口投与後の ARC および AVPV における *ERα* の発現

1 日齢から EE 2 µg/kg/day あるいはコーン油 (10 mL/kg/day) を 5 日間反復経口投与した 6 日齢ラットの視床下部 ARC および AVPV 領域

における *ERα* の発現を上記②で採用した方法を用いて観察した。

#### 5. 統計解析

統計解析ソフト JMP10 (SAS Institute Japan) を用いて解析を行った。その際、実験 1 の胎児における各指標については、一腹の平均値をその腹の代表値として扱った。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。

#### 6. (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. 投与動物の一般状態および体重増加

実験 1 および 2 とともに投与期間中の体重および一般状態に EE 投与群と対照群との間に差は認められなかった。

実験 1 については眼瞼開裂日齢ならびに膈開口日齢に EE 投与群と対照群との間で有意差は認められなかった(データは示さず)。体重推移については、7 週齢から交配までは EE 投与群が対照群と比べてやや低値で推移したが、有意差は認められなかった。

##### 2. 性周期の回帰状況および交配成績(実験 1)

8-9 週齢で性周期を観察した結果、対照群および EE 投与群ともに、正常周期に分類される 4 日周期あるいは 4 及び 5 日周期、ならびにその他の性周期が認められたが、それらの頻度はいずれも両群間で同等であった(表 2)。

対照群および EE 投与群ともに、10 週齢から交配適期である発情前期に生殖能力の確認された雄と同居させた。その結果、対照群の 7 例中 2 例は 2 回目の交配適期で交尾したがそれ以外は全例が 1 回目の適期で交尾し、全例が妊娠した(表 2)。

##### 3. 妊娠期間中の体重推移(実験 1)