

妊娠0日から20日までEE投与群の体重が対照群と比べて有意な低値で推移したが、体重増加量は妊娠末期の妊娠14-20日の値のみに有意差が認められ、それ以前の時期は群間で差は認められなかった(表3)。

4. 帝王切開所見(実験1)

EE投与群における黄体数、着床数ならびに着床率は対照群と比べてやや低値の傾向を示したが、有意差はなかった。生存胎児数、着床前死亡数あるいは着床後死亡数についても群間で差は認められなかった(表4)。

5. 胎児所見(実験1)

表5に示すように、胎児の性比に対照群とEE投与群の間で有意差は認められなかった。一方、胎児体重は対照群と比べて有意な高値を示していた。

外表異常として全身浮腫の胎児がEE投与群に1例認められたが、それ以外に異常は観察されなかった。

骨格検査で奇形は観察されなかった。また、変異も対照群およびEE投与群の双方に少数例ずつ観察されたが、投与の影響を示唆する傾向は認められなかった。しかし、全般的に骨化の進行がEE投与群で亢進し、右第5基節骨が骨化している胎児の割合ならびに骨化仙尾椎数に有意差が認められた。

6. EE反復経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図3に示すように、EE 2 µg/kg/day 群では視床下部における *ERα* mRNA 量が対照群と比較して有意な低値を示したが、上部領域では群間に差は認められなかった。

図4に示すように、視床下部における遺伝子発現量を対照群と0.4 µg/kg/day 以上の投与群との間で比較したところ、EE投与群における *Kiss1* mRNA 量が顕著に低下し、対照群との間に有意差が認められた。*ERα* mRNA についても、対照群と比較して、2 µg/kg/day 群では有意な低値を示し、0.4 µg/kg/day 群でも低下の傾向が認められた。*Kndy* ニューロンでキスペプチンとともに *GnRH* パルスの制御に関わると考えられている *NKB* および *Dyn* ならびにそれらをコードする遺伝子については、

対照群とEE投与群との間に有意差は認められなかった。しかし、EEの用量に依存して *NKB* 受容体をコードする *Tacr3* の発現が低下し、*DYN* 受容体をコードする *Oprk1* の発現が増加した。

キスペプチン受容体をコードする *GPR54* およびEEが結合する可能性のある *ERβ* については遺伝子発現量に群間で著差は認められなかった(図5)。

図6に示すように、0.08 µg/kg/day 以下の投与群については、対照群が1例であったため対照群との間で比較はできなかった。用量間で比較しても *ERα* および *Kiss1* のいずれも0.016 µg/kg/day 群と0.08 µg/kg/day 群との間で有意差は認められなかった。

7. EE単回経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図7には1日齢における2あるいは10 µg/kg のEE単回投与翌日の視床下部における *ERα* および *Kiss1* 発現量を示した。*ERα* については対照群とEE投与群との間で差異は認められなかったが、*Kiss1* は両投与群ともに対照群と比べて有意な低値を示した。しかし、用量間で差は認められなかった。

図8には5日齢における20 µg/kg のEE単回投与翌日の視床下部における *ERα* および *Kiss1* 発現量を示したが、*ERα* および *Kiss1* ともに対照群と比較して有意な低値を示した。

8. EE単回経口投与後の視床下部における遺伝子発現(実験2)

図9および10に代表例を示すように、*ERα* mRNA については、EE反復経口投与した動物でも対照群と同様に *AVPV* および *ARC* のいずれにおいても局在が認められ、その程度にも明瞭な差は認められなかった。一方、*Kiss1* mRNA については、EE反復投与動物の *ARC* で顕著な発現低下が観察された(図11)。

D. 考察

平成26年度までの研究から、新生期におけるEEの反復経口投与による遅発影響の閾値は0.016 µg/kg/day 付近にあると推定されている。これは0.08 µg/kg/day 群において、性周期は回帰したものの、卵巣に囊胞状卵胞を有

する動物が増加したことによるものである。囊胞状卵胞は加齢に伴い観察される変化であり、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与では 26 週齢で対照群との間に有意差が認められている(平成 25 年度分担研究報告書) ことから、その生殖毒性的意義を検討するために、通常の生殖毒性試験で評価される週齢で生殖能力を検討した。その結果、全例の受胎能が確認され、胎児の生存にも影響は認められなかった。しかし、投与動物の妊娠後期における体重増加は有意に抑制されていた。この時期は、胎児体重が母体重に反映される時期であるが、EE 投与群の胎児体重は対照群と比べてむしろ有意に増加していた。リッターサイズに差は認められなかったことから、EE 投与群では妊娠後期における母動物自身の体重増加が抑制されていることが示唆された。

胎児については外表および骨格に奇形や変異の増加は認められなかったが、EE 投与群では対照群と比べて骨化が促進されていた。体重変化を考慮すると、EE 投与群では胎児の発育が促進されていたものと考えられる。

新生児期に EE 投与を受けた動物が妊娠すると妊娠末期における母体重は抑制されるにもかかわらず、胎児の発育が促進される理由は明らかではない。用量反応性を考慮した検討が必要とされるが、これまで検討されなかった糖質や脂質代謝などにおける遅発影響も否定できない。

今年度は、新生児期の EE 投与による初発影響を検討した。その結果、最も顕著な影響が *Kiss1* 発現に認められた。すなわち、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の反復投与あるいは 1 日齢における 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の単回投与あるいは 5 日齢における 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与によって、*Kiss1* の発現低下が認められた。ISH でも ARC における *Kiss1* 発現に明瞭な低下が確認されている。この日齢では AVPV に *Kiss1* は発現していないことから、視床下部の定量解析で認められた *Kiss1* 発現の低下は、ARC における *Kiss1* の発現低下を反映したものと考えられる。さらに、*Kiss1* の発現低下が認められた群はいずれも性周期の早期回帰停止が認められている。一方、囊胞状卵胞の形成は認められるが、性周期の回帰は維持されている 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では *Kiss1* mRNA に影響が認められていない。

これらのことを考慮すると、ARC における *Kiss1* の発現低下は遅発影響の中でも性周期の早期回帰停止に深く関与している可能性が示唆される。

ARC における *Kiss1* の発現が EE 投与によって低下する理由は本研究からは明らかではない。EE はまず ER を介して生体に影響を及ぼすが、*Kiss1* の発現低下が認められた 1 日齢での 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与では *ER α* の発現量に影響は認められなかったことから、ARC における *Kiss1* の発現低下は *ER α* の発現低下に起因するものではないと考えられる。

脳の様々な部位に *ER α* は発現するが、前交連から上部の組織ではこのような変化は認められなかったことから、AVPV および ARC を含む視床下部のみの変化であると推測される。*ER α* はこの日齢でも AVPV および ARC の両神経核に発現していることが本研究でも確認されているが、ISH では両神経核ともに *ER α* の発現に EE 投与の影響は認められなかった。従って、これらの神経核以外の部位での EE 投与による発現低下が疑われる。

ARC でキスペプチンとともに GnRH パルス状分泌を促進する NKB の受容体遺伝子 *Tacr3* の発現が EE 投与群で低下の傾向を示し、パルス状分泌を抑制する DYN の受容体遺伝子 *Oprk1* の発現が増加の傾向を示していた。*Kiss1* の発現低下のような顕著な変化ではないが、*Kndy* ニューロンで作動する 3 つの分子がいずれも GnRH パルスを抑制する方向に変化していることは、遅発影響に繋がる変化として注目すべきである。

前述のように *Kiss1* の発現低下は ARC における *Kiss1* の発現低下を反映すると考えられるが、定量解析では *Kiss1* 発現の低下に用量反応関係が認められなかった。この点は *Oprk1* あるいは *Tacr3* の変化とは異なっており、GnRH パルスを抑制する方向の変化ではあるが、*Kiss1* 発現低下とは異なる機序の存在が伺われる。

ER α はエストロゲンによって誘導されることが知られているが、EE 反復投与群では 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で最終投与翌日の視床下部における *ER α* 発現量が低下した。1 日齢の単回投与では 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ でも発現量が増減することはなかったので、EE を反復投与するこ

とで視床下部の $ER\alpha$ が低下したものと推察される。

以上のように、今年度の研究から、遅発影響の最小影響量 ($0.08 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) は生殖能力評価では影響は認められないことが明らかになったが、妊娠末期の生理状態についてはさらに検討を要することが示唆された。また、投与した 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。

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 17α -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* 41, 1011-1015 (2013).
- 3) Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)

2. 学会発表

- 1) 田中 恵他 「新生児期エチニルエストラジオール (EE) 曝露による遅発影響に関わる初発影響の探索—視床下部におけるエストロゲン受容体 (ER) 及び Kisspeptin (KP) シグナル伝達分子の遺伝子発現解析」(第 32 回日本毒性病理学会、2016 年 1 月、徳島市)
- 2) 代田 眞理子、吉田 緑 「幼若動物を用いた毒性評価において認識すべき発達期の繁殖生物学の特徴」(第 42 回日本毒性学会シンポジウム、2015 年 6 月、金沢市)
- 3) 田中 恵他 「嚢胞状卵胞形成における新生期エチニルエストラジオール経口曝露量と子宮肥大試験の検出感度」(第 42 回日本毒性学会、2015 年 6 月、金沢市)
- 4) Shirota, M., et al. Gonadotropin-

independent follicle development in the *Kiss1*^{-/-} female rats. (3rd World Congress on Reproductive Biology, August 2014, Edinburgh, UK)

- 5) 代田 眞理子 「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 回日本毒性学会シンポジウム、2014 年 7 月、神戸市)
- 6) 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、府中市)
- 7) 川嶋 潤他 「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、2013 年 6 月、千葉市)

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)

Asai S, Ohta R, Shirota M, Sato M, Watanabe G, Taya K. Reproductive endocrinology in Hatano high and low-avoidance rats during the estrous cycle. *Endocrine* 18, 161-166 (2002)

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

- 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)
- 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)
- Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S. Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology* 54,105-112 (1998)
- Barracough CA. Production of anovulatory, sterile rats by single injections of testosterone propionate. *Endocrinology* 68, 62-66 (1962)
- 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)
- 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)
- 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)
- Borgert CJ, LaKind JS, Witorsch RJ. A critical review of methods for comparing estrogenic activity of endogenous and exogenous chemicals in human milk and infant formula. *Environmental Health Perspectives* 111, 1020-1036 (2003)
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA. Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 53, 69-77 (1988)
- Boutin JM, Edery M, Shirota M, Jolicoeur C, Lesueur L, Ali S, Gould D, Djiane J, Kelly PA. Identification of a cDNA encoding a long form of prolactin receptor in human hepatoma and breast cancer cells. *Molecular Endocrinology* 3, 1455-1461 (1989)
- 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)
- Brotos 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)
- 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)
- Bukovsky A, Ayala ME, Dominguez R, Keenan JA, Wimalasena J, McKenzie PP, Caudle MR. Postnatal androgenization induces premature aging of rat ovaries. *Steroids* 65, 190-205 (2000)
- Cao J, Joyner L, Mickens JA, Leyrer SM, Patisau HB. Sex-specific Esr2 mRNA expression in the rat hypothalamus and amygdala is altered by neonatal bisphenol A exposure. *Reproduction* 147, 537-554 (2014)
- 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)
- Chung WCJ, Anthony PA. Gender differences in neurodevelopment and epigenetics. *Pflugers Archives European Journal of Physiology* 465, 573–584 (2013)
- 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)
- Downsa JL, Wise PM. The role of the brain in female reproductive aging. *Molecular and Cellular Endocrinology* 299, 32-38 (2009)
- 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)
- Frye CA, Bo E, Calamandrei G, Calzà L, Dessi-Fulgheri F, Fernández M, Fusani L, Kah O, Kajta M, Le Page Y, Patisaul HB, Venerosi A, Wojtowicz AK, Panzica GC. Endocrine disrupters- a review of some sources, effects, and mechanisms of actions on behaviour and neuroendocrine systems. *Journal of Neuroendocrinology* 24, 144-159 (2012)
- 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, Martien KM, Gagnidze K, Pfaff D. Implications of prenatal steroid perturbations for neurodevelopment, behavior, and Autism. *Endocrine Reviews* 35, 961-991 (2014)
- 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)
- Gorski RA. Influence of age on the response to perinatal administration of a low dose of androgen. *Endocrinology* 82, 1001-1004 (1968)

- 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 α -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)
- 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 anteroventralperiventricular nucleus is a trigger for the delayed effect induced by neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol in female rats. *Reproductive Toxicology* 51, 145-156 (2015)
- 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)
- 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)
- 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)
- Jefferson WN, Patisaul HB Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* 143, 247-260 (2012)
- Hu J, Du G, Zhang W, Huang H, Chen D, Wu D, Wang X. Short-term neonatal/prepubertal exposure of dibutylphthalate (DBP) advanced pubertal timing and affected hypothalamic kisspeptin/GPR54 expression differently in female rats. *Toxicology* 314, 65-75 (2013)
- 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)
- Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor-promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology* 151, 2297–2305 (2010)
- 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)
- 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)
- McLachlan JA, Tilghman SL, Burow ME, Bratton MR. Environmental signaling and reproduction: A comparative biological and chemical perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* 354, 60-62 (2012)
- 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)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biology of Reproduction* 46, 1080-1085 (1992)
- Mineshige T, Kamiie J, Sugahara G, Yasuno K, Aihara N, Kawarai S, Yamagishi K, Shirota M, Shirota K. Expression of periostin in normal, atopic, and nonatopic chronically inflamed canine skin. *Veterinary Pathology* 52, 1118-1126 (2015)
- Mogi K, Takanashi H, Nagasawa M, Kikusui T. Sex differences in spatiotemporal expression of AR, ER α , and ER β mRNA in the perinatal mouse brain. *Neuroscience Letters* 584, 88–92 (2015)
- 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)
- Nozawa K, Nagaoka K, Zhang H, Usuda K, Okazaki S, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethynyl estradiol affects ovarian gene expression and disrupts reproductive cycles in female rats. *Reproductive Toxicology* **46**, 77-84 (2014)
- Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata, T Ono H. Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reproductive Toxicology* **34**, 323-330 (2012)
- Ohta R, Shirota M, Kanazawa Y, Shindo T, Furuya M, Seki T, Ono H, Kojima K, Asai S, Watanabe G, Taya K. Effects of transmaternal exposure to genistein in Hatano high- and low-avoidance rats. *Experimental Animals* **58**, 471-479 (2009)
- 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 exposure 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, Shirota M, Shirota K. Comparison of aryl hydrocarbon receptor gene expression in laser dissected granulosa cell layers of immature rat ovaries. *Journal of Veterinary Medical Science* 73, 923-926 (2011)
- Schindler R, Nilsson E, Skinner MK. Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF. *PLoS ONE* 5, e12979 (2010)
- Schwarz JM, McCarthy MM. The role of neonatal NMDA receptor activation in defeminization and masculinization of sex behavior in the rat. *Hormones and Behavior* 54, 662-668 (2008)
- Seminara SB, Messager S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwino KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, Slaugenhaupt 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)
- Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Kamiie J, Shirota K, Yoshida M. Dose-dependent acceleration in the delayed effects of neonatal oral exposure to low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive functions in female Sprague–Dawley rats. *Journal of Toxicological Sciences* 40, 727-738 (2015)
- Shirota M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shirota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Science* **37**, 681-690 (2012)
- Shirota M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shirota K. Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125, 85-94 (2003)
- Shirota M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shirota K, Kelly PA. Detection of in situ localization of long form prolactin receptor messenger RNA in lactating rats by biotin-labeled riboprobe. *Endocrine Journal* 42, 69-76 (1995)
- Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 4, 1136-1143 (1990)
- Soga T, Kitahashi T, Clarke IJ, Parhar IS. Gonadotropin-inhibitory hormone promoter-driven enhanced green fluorescent protein expression decreases during aging in female rats *Endocrinology* 155, 1944–1955 (2014)
- 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)
- Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reproductive Toxicology* **40**, 16-23 (2013)
- 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)
- Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 414, 42-52 (2015)
- 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, 1355-11359 (1991)
- 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)
- Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 76, 1105-1110 (2014)
- 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)
- Walker DM, Kirson D, Perez LF, Gore AC. Molecular profiling of postnatal development of the hypothalamus in female and male rats. *Biology of Reproduction* 129, 1-12 (2012)
- Wang C and Roy SK. Development of Primordial Follicles in the Hamster: Role of Estradiol-17 β . *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)

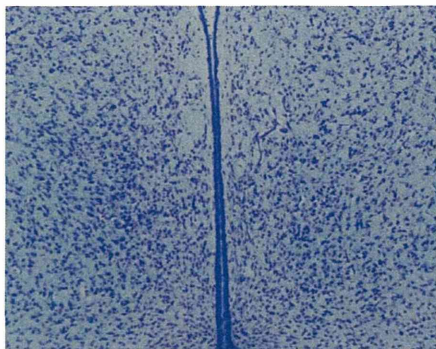
Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* **39**, 823-834 (2011)

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)

(A) AVPV



(B) ARC

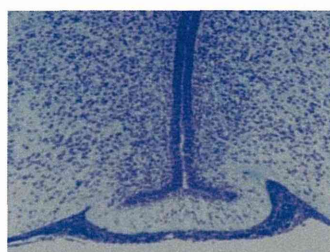
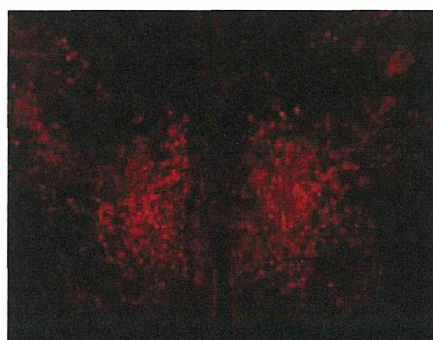


図 1. 6 日齢雌ラットの視床下部における AVPV (A) および ARC (B) (KB 染色)

(A) AVPV

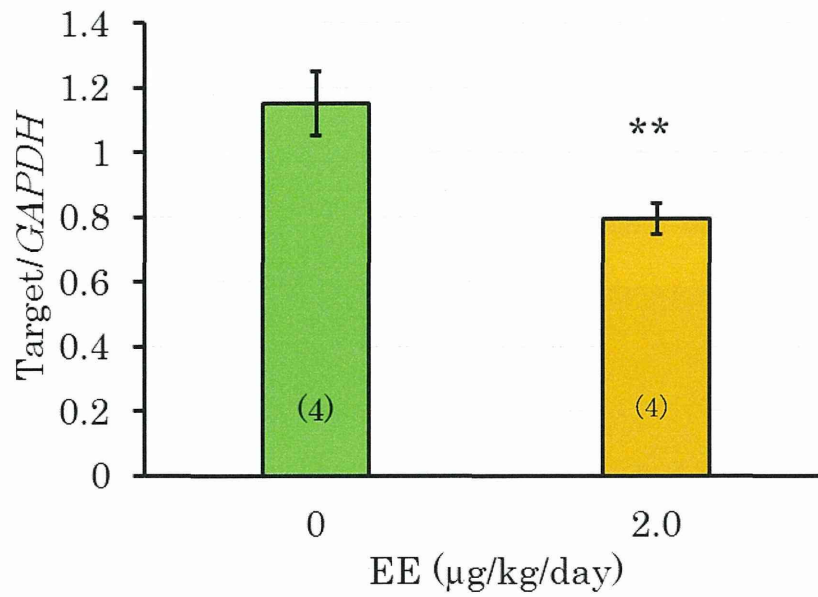


(B) ARC



図 2. 6 日齢雌ラットの AVPV 領域 (A) および ARC 領域 (B) における $ER\alpha$ ISH
 $ER\alpha$ mRNA は赤色蛍光として認められる。

(A) 視床下部



(B) 上部領域

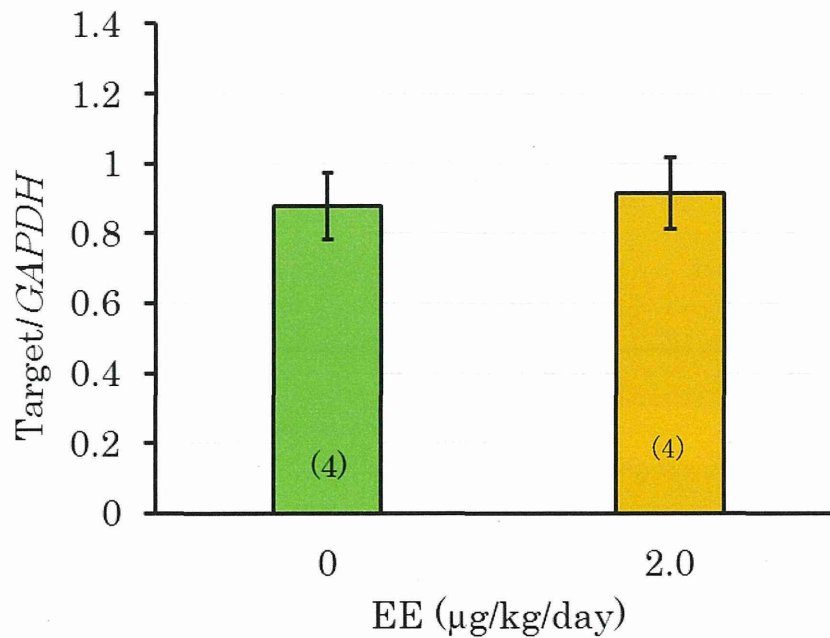
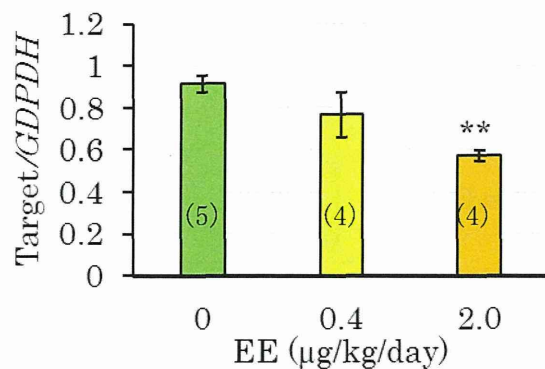
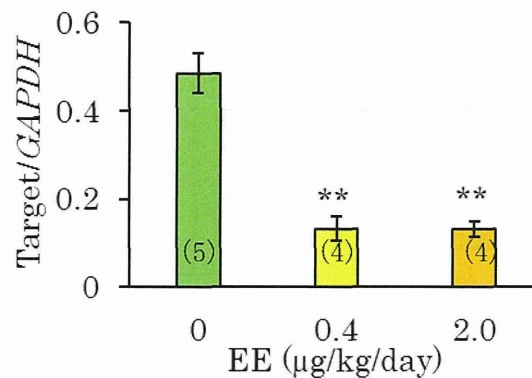


図3. 1日齢から5日間0または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの最終投与後24時間における視床下部(A)あるいはその上部領域(B)における *ERα* mRNA の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M) (N)、**対照群との間に有意差あり (P<0.01)

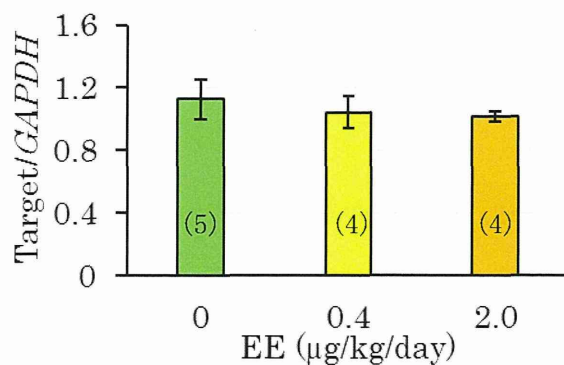
(A) *ERα* mRNA



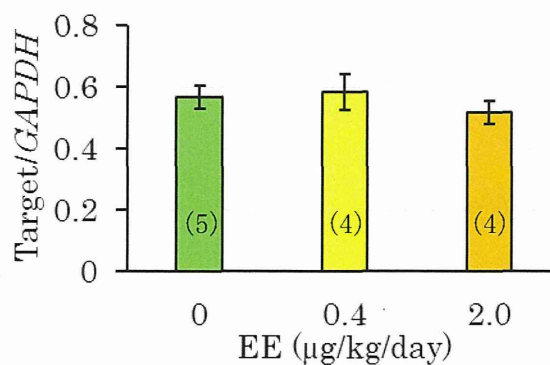
(B) *Kiss1* mRNA



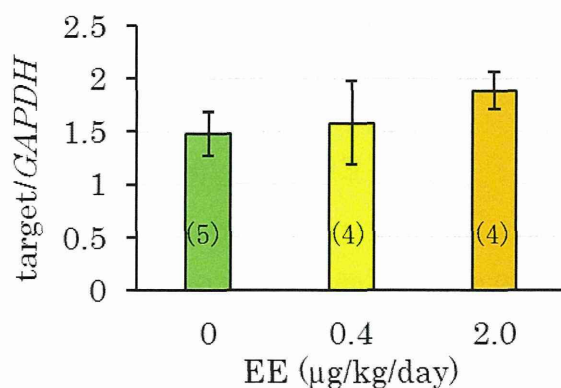
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Tac2* mRNA



(E) *Oprk1* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

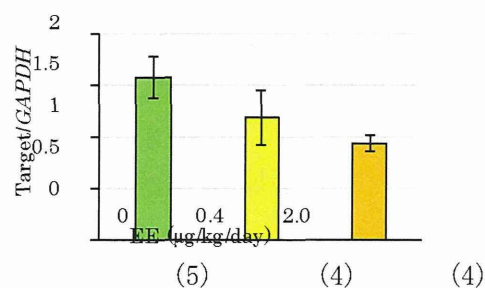


図4. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間におけるmRNA(*ERα* (A)、*Kiss1* (B)、プロダイノルフィン (*Pdyn*) (C)、κオピオイド受容体 (*Oprk1*)、ニューロキニンBをコードする *Tac2* (D)ならびにその受容体をコードする *Tacr3* (F))の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M)。(N)、**対照群との間に有意差あり (P<0.01)

(A) *GPR54* mRNA

(B) *ERβ* mRNA

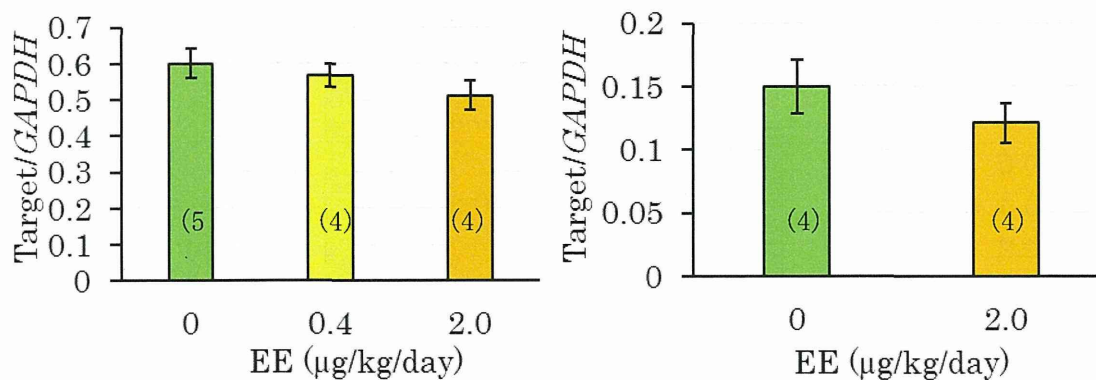


図5. 1日齢から5日間0、0.4または2 $\mu\text{g/kg/day}$ のエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *GPR54* mRNA(A)および *ERβ* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 \pm S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA

(B) *Kiss1* mRNA

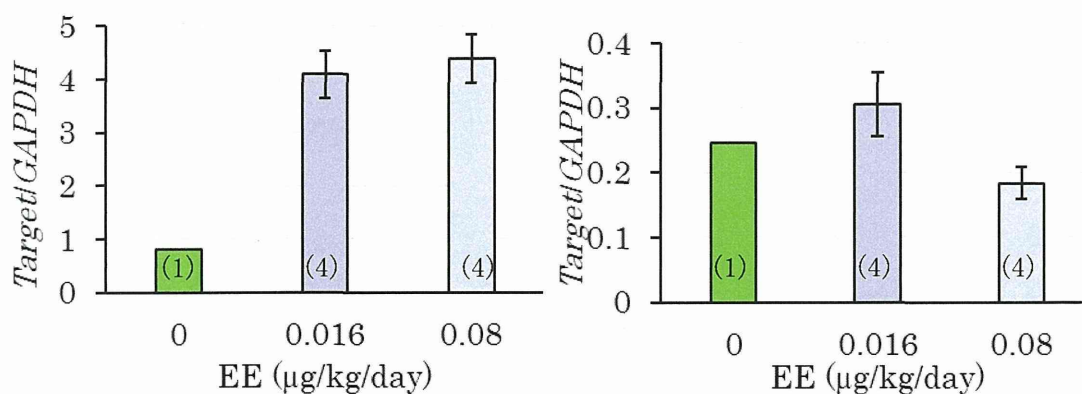
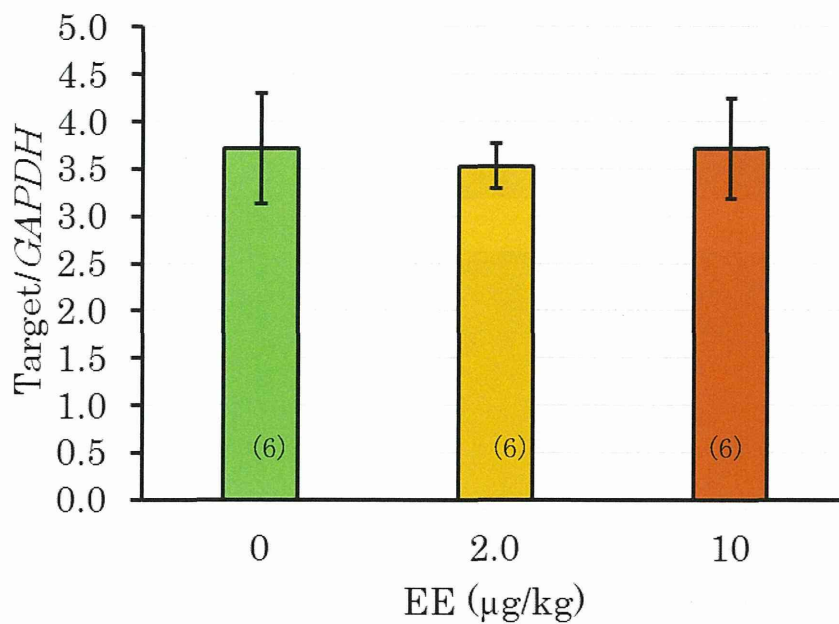


図6. 1日齢から5日間0、0.016または0.08 $\mu\text{g/kg/day}$ のエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (0 $\mu\text{g/kg/day}$ 群を除き、平均 \pm S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

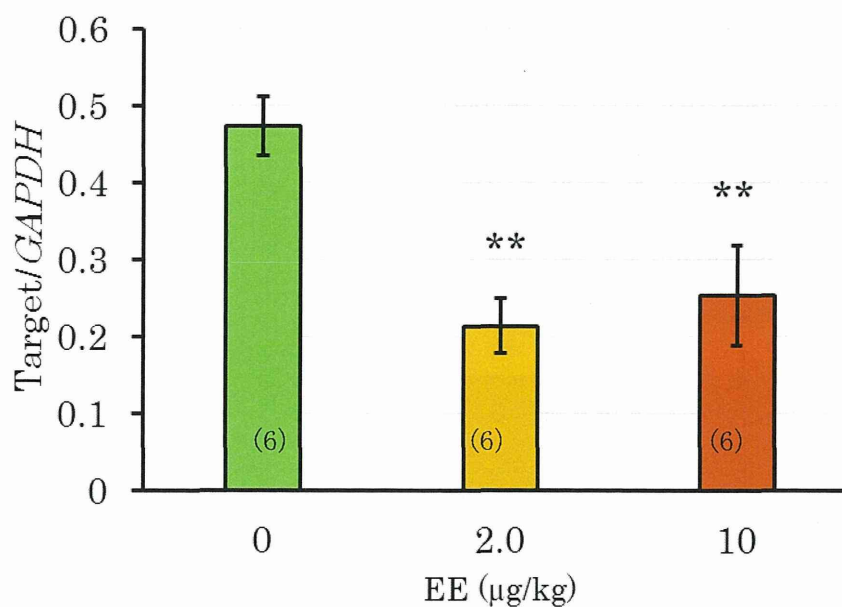


図7. 1日齢に0、2または10 μg/kgのエチニルエストラジオール(EE)を単回経口投与した雌ラット視床下部の投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M) (N)、**対照群との間に有意差あり (P<0.01)

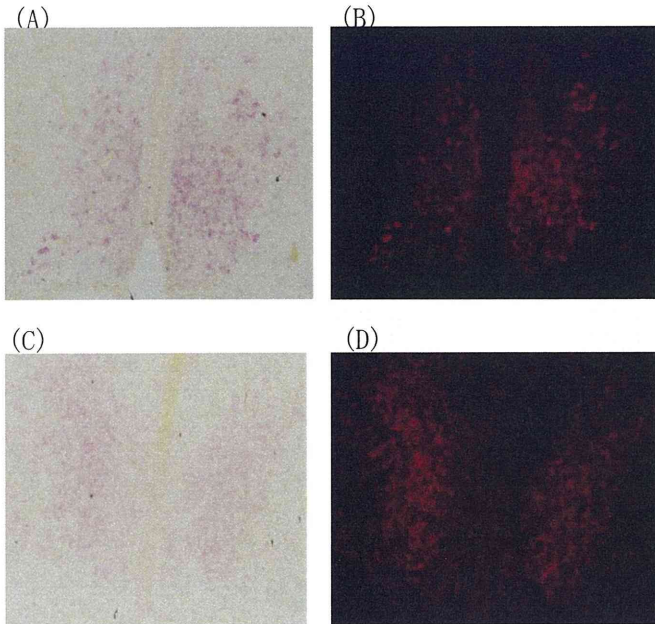


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$ ISH (代表例)
 コーン油を投与した対照群 (AおよびB) ならびに $2\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野 (AおよびC) および暗視野 (BおよびD) 像で、 $ER\alpha$ mRNA は赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

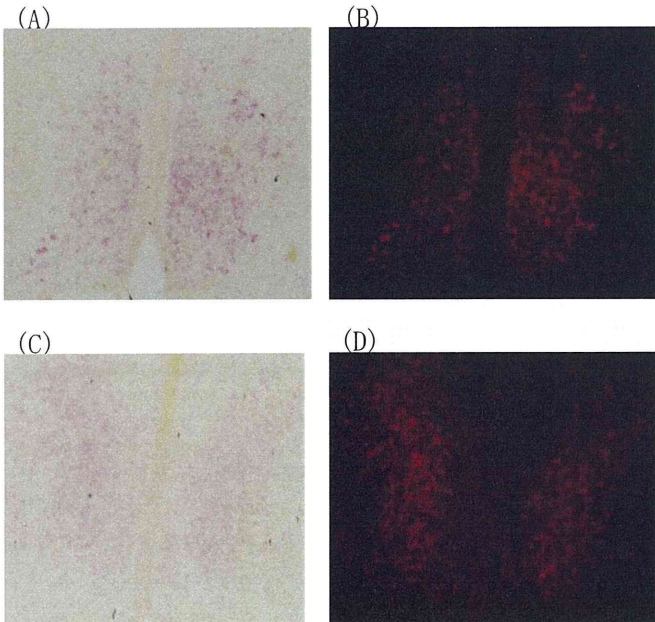


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$ ISH (代表例)
 コーン油を投与した対照群 (AおよびB) ならびに $2\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野 (AおよびC) および暗視野 (BおよびD) 像で、 $ER\alpha$ mRNA は赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

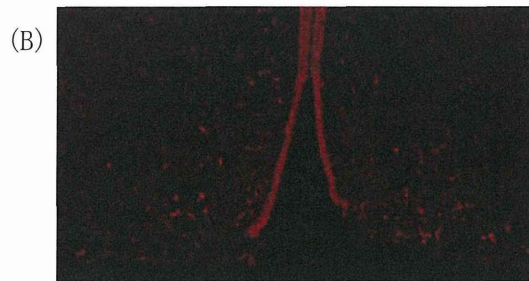
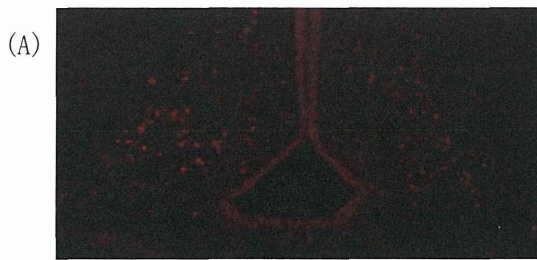


図 10. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのARC領域における *ERα* ISH (代表例) コーン油を投与した対照群 (A) ならびに $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(B)の暗視野 (BおよびD) 像で、*ERα* mRNA は赤色蛍光として認められる。

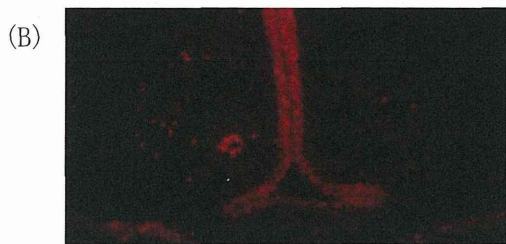
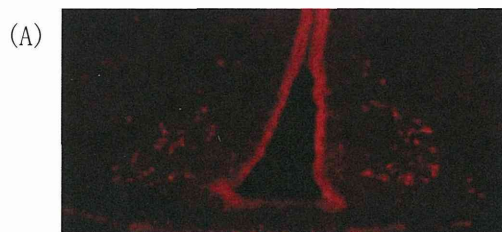


図 11. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットならびに10日齢の *Kiss1* ノックアウトラットのARC領域における *Kiss1* ISH (代表例) コーン油を投与した対照群 (A) ならびに $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(B)の暗視野像で、*Kiss1* mRNA は赤色蛍光として認められるが、ノックアウトラットのARC領域 (C) に蛍光は認められない。

表1 リアルタイム PCR 用に合成したプライマーおよびプローブ

ターゲット	Accession			配列 (5' ⇒3')
ER α	NM 012689	プライマー	F	GAAAGGCGGGATACGAAAAGA
			R	TCTGACGCTTGTGCTTCAACA
		プローブ		CGCCGAGGAGGGAG
ER β	NM 012754	プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
			R	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
		プローブ		TTATGAAGTAGGAATGGTCAAGTG

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8-9週齢における性周期の型および10週齢からの交配成績

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Estrous cycle	6	5
Regular cycle	6	5
Irregular cycle	1	1
Fertility		
Copulated	7	6
Pregnant	7	6

^a corn oil 10 mL/kg/day

表 3

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妊娠期間中における体重推移（平均±標準誤差）

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Body weight (g)		
Gestational day 0	289.6 ± 4.9	267.0 ± 6.4*
day 7	334.1 ± 5.5	312.0 ± 5.1*
day 14	369.7 ± 4.8	349.7 ± 4.7*
day 20	457.0 ± 4.7	421.8 ± 6.3*
Body weight gain (g)		
Gestational day 0-7	44.6 ± 3.5	45.0 ± 3.0
day 7-14	35.6 ± 2.6	37.7 ± 2.3
day 14-20	87.3 ± 3.6	72.2 ± 2.3*

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

表 4

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帝王切開所見

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of corpus luteum	15.0 ± 0.6	13.8 ± 0.6
Number of implantation sites	14.7 ± 0.7	12.7 ± 2.0
Implantation index (%)	98.0 ± 1.9	92.0 ± 5.2
Pre-implantation loss	0.3 ± 0.3	1.2 ± 0.7
Number of live fetuses	13.4 ± 2.2	11.7 ± 1.8
Survival rate (%)	92.8 ± 6.7	92.9 ± 10.1
Post-implantation loss	1.3 ± 1.2	1.0 ± 1.4
Placental remnant	1.0 ± 0.3	1.0 ± 1.4
Dead fetus	0.3 ± 0.5	0