

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 α アゴニストである PPT、ER β 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相関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 α 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 α 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 α -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 α アゴニストである 4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol (PPT)、ER β アゴニストである 2,3-bis(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) を用いた検討から、ER α 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 β

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 α 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を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 μg を鋳型として High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による cDNA 合成を行い、ABIPRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。KiSS-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn00710914_ml, KISS1 receptor (Kiss1r): Rn00576940_ml。内部標準である GAPDH 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 α 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 sesame oil 5mL/kg (溶媒対照)、ICI 182,780 (ICI) 500 および 5,000 μ 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 μ 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日周期で定期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日間連続した場合は持続発情とした。

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Dunnnett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 μ g/kg から、blotted weight では100 μ 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 μ 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 μ 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变化と考えられた(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 α 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 α より ER β に対して約 70 倍の結合親和性、約 170 倍の転写活性を示し (Meyers et al., 2001)、ER β 選択的アゴニストとして使用されているが、ER α への作用が全くないわけではない。子宮肥大作用には主に ER α 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 α 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 α 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 β 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、雌性生殖器官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、雌性生殖器官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 α 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 α
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 β アゴニストである DPN は、ごく弱いな
がら ER α 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 α 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 17alpha- Ethynylestradiol.
Biol Reprod., **93**, 32, 2015.

- 2) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T,
Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal
exposure to 17alpha-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 α -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

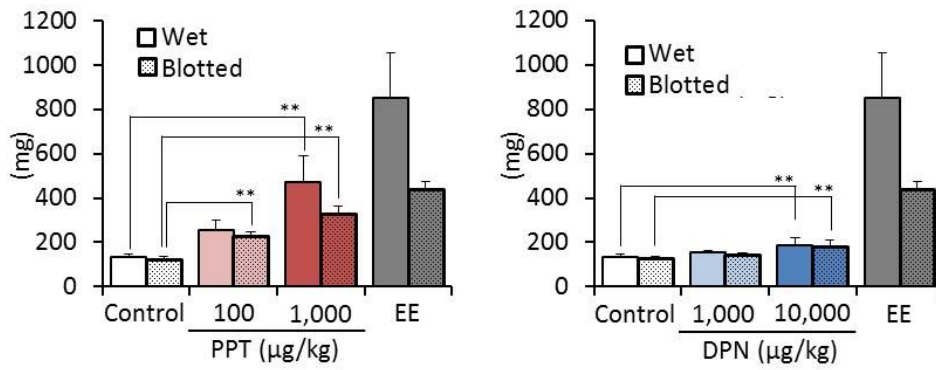
なし

参考文献

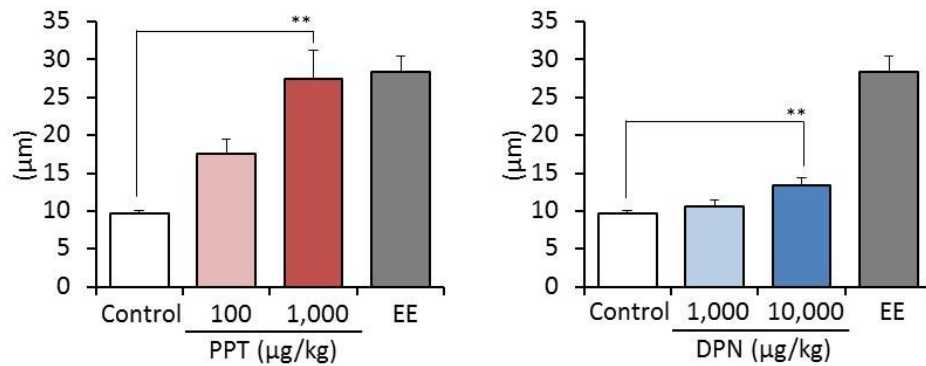
- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S,
Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and
hypothalamic tissue and has functional effects in
the brain after systemic dosing. *Endocrinology*,
149, 5219-5226, 2008.
- 2) Harris HA, Katzenellenbogen JA,
Katzenellenbogen BS. Characterization of the
biological roles of the estrogen receptors,
ERalpha and ERbeta, in estrogen target tissues in
vivo through the use of an ERalpha-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 17alpha- 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, Katzenellen-
bogen 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)

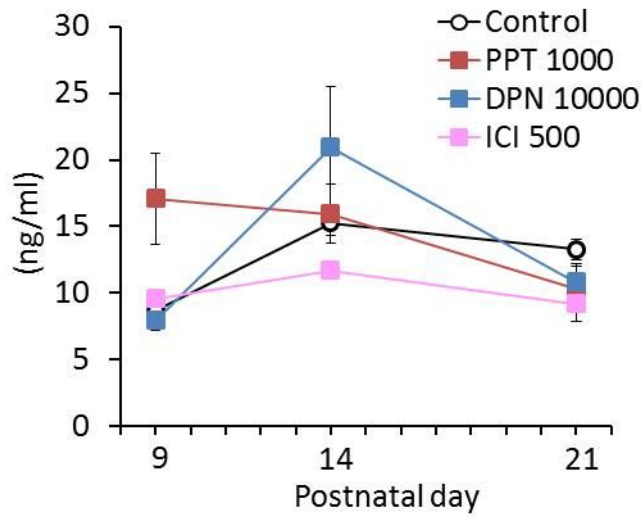
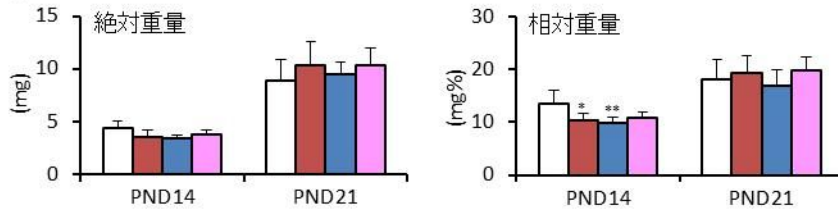
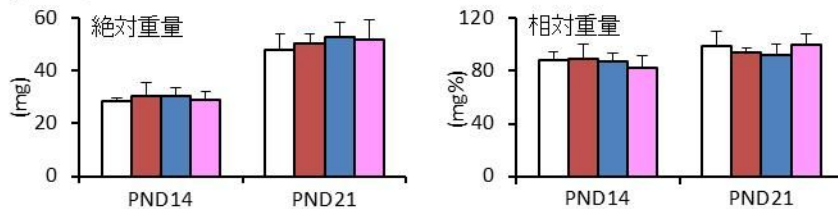


図2. 血清FSH濃度

(A) 卵巣重量



(B) 子宮重量



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

図3. 卵巣 (A)および子宮重量 (B)

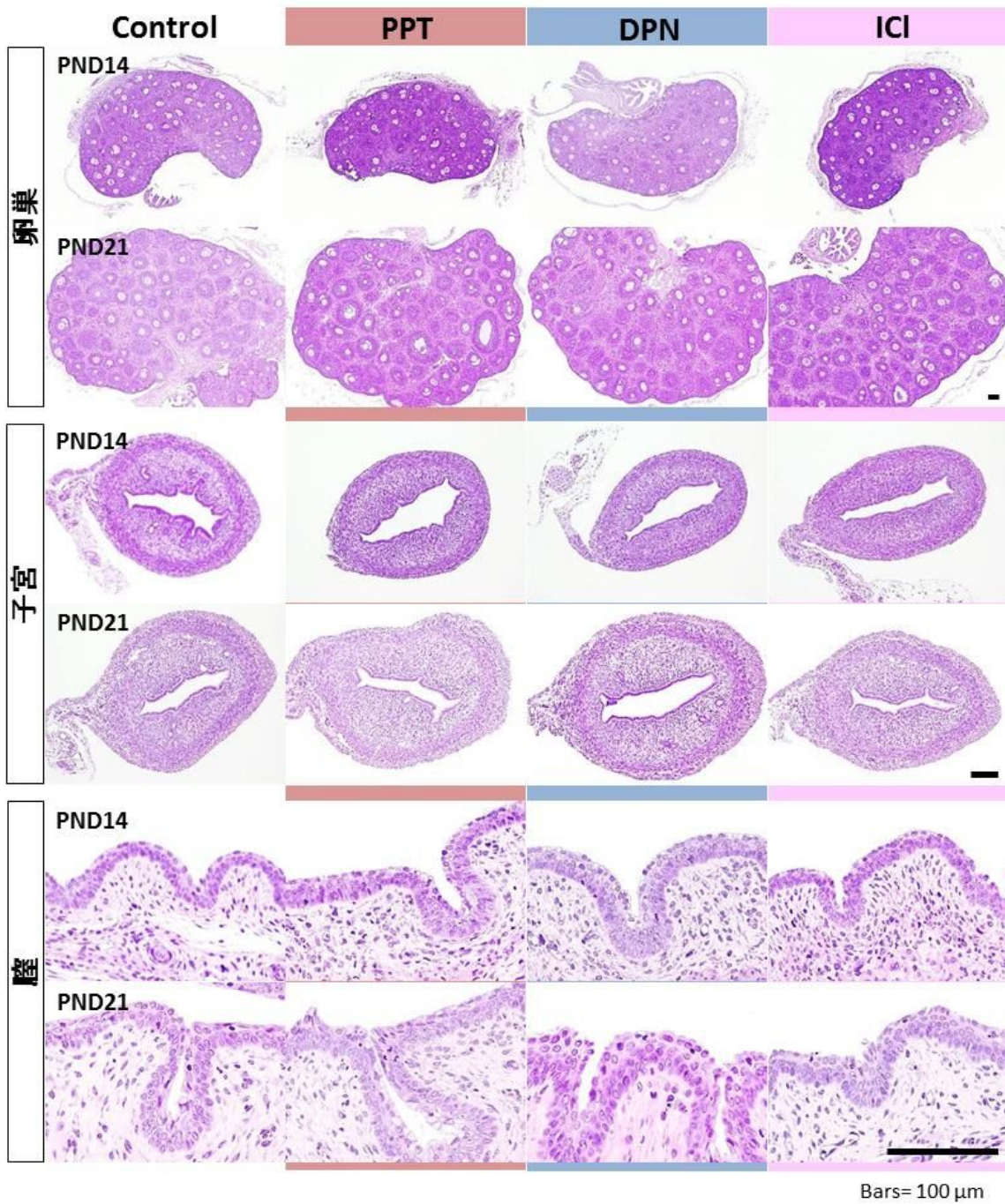


図4. 生後14および21日における卵巣・子宮・膣の組織像

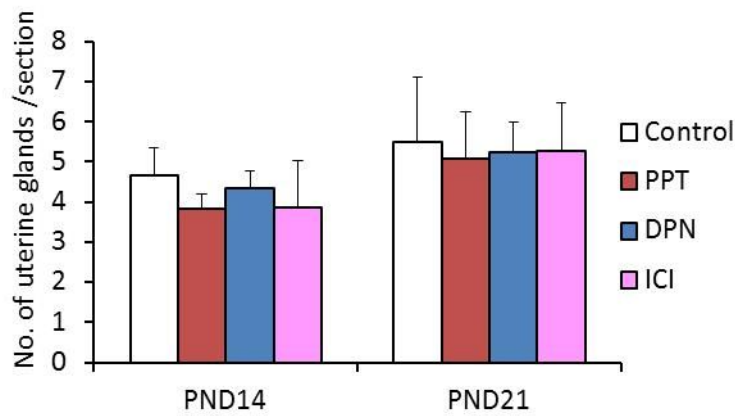


図5. 生後14および21日における子宮腺の数

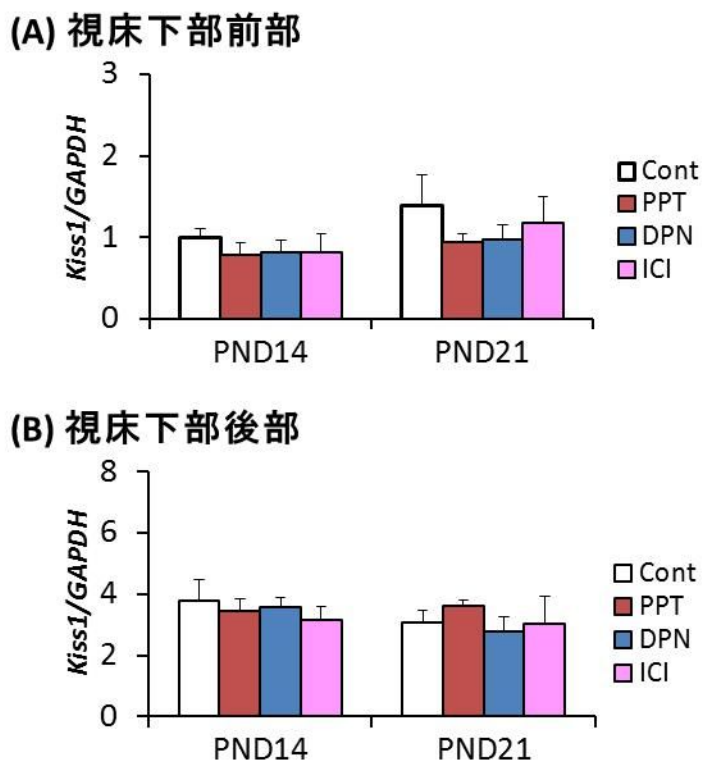


図6. 視床下部前部 (A) および後部 (B) における Kiss1 mRNA発現

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

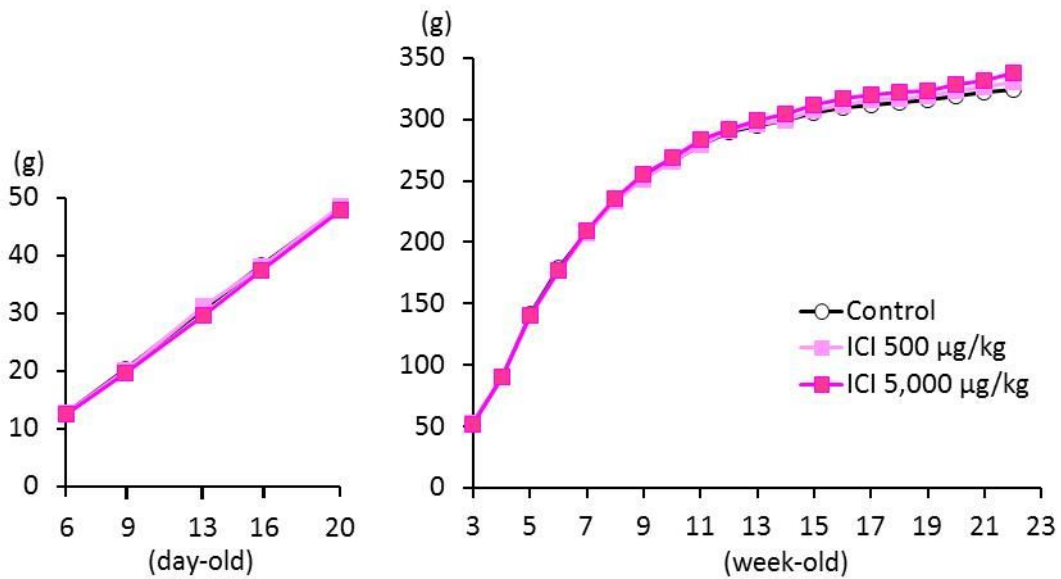


図7. ICI新生児期投与後の体重推移

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)

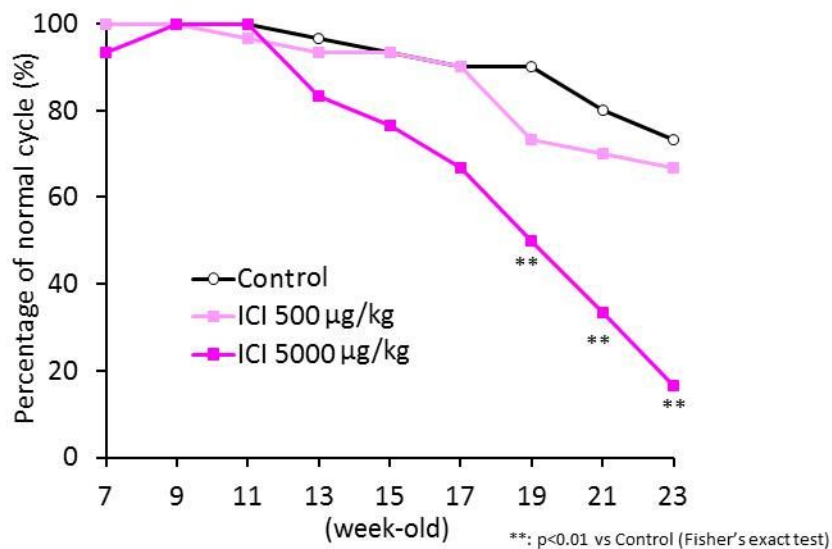


図8 正常性周期を示す動物の割合