

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：	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：	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 α -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 α 受容体(ER α)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 μ 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 α* 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 κ 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回の投与用量が 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(Crl: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(*Kiss1*KO)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 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日齢から膣開口の有無を調べ、8週齢から2週間、毎日膣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、膣垢を観察し

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、KissJKO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。

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、ER α 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。

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 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 μ L 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 \times g、4 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 \times g、4 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 \times g、4 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 μ L 添加した。これを 60 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 で保存した。

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 ER α および ER β 、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 ER α および ER β 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 μ g/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。

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)。

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、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 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。

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、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、と同じ条件で行った。

(4) *ERα* 遺伝子発現の観察

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。

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 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、分散の一樣性を確認して 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、Dunnett 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)

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、一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、卵巣に嚢胞状卵胞を有

する動物が増加したことによるものである。嚢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、嚢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ため、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 17 α -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 17 α -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 真理子、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 真理子「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 真理子「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-Ozuyisal 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)
- Barraclough 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)
- Brotons 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)
- Downs 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, Grijters 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 17 α -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 Peplig 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, Shiota M, Shiota 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, Shirota M, Kamiie J, Shirota 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)

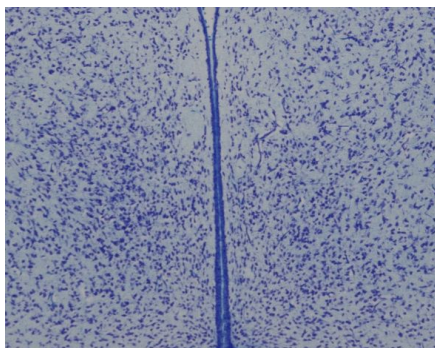
Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* **39**, 823-834 (2011)

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

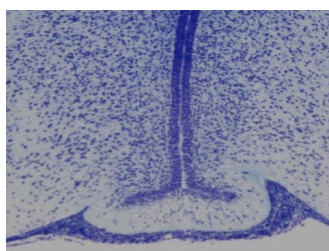
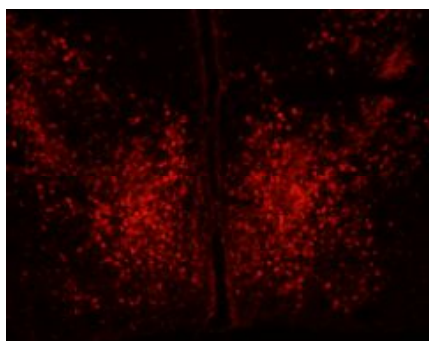


図1 . 6日齢雌ラットの視床下部における AVPV (A)および ARC (B) (KB 染色)

(A) AVPV



(B) ARC

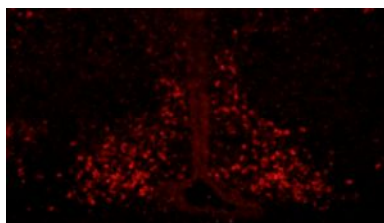
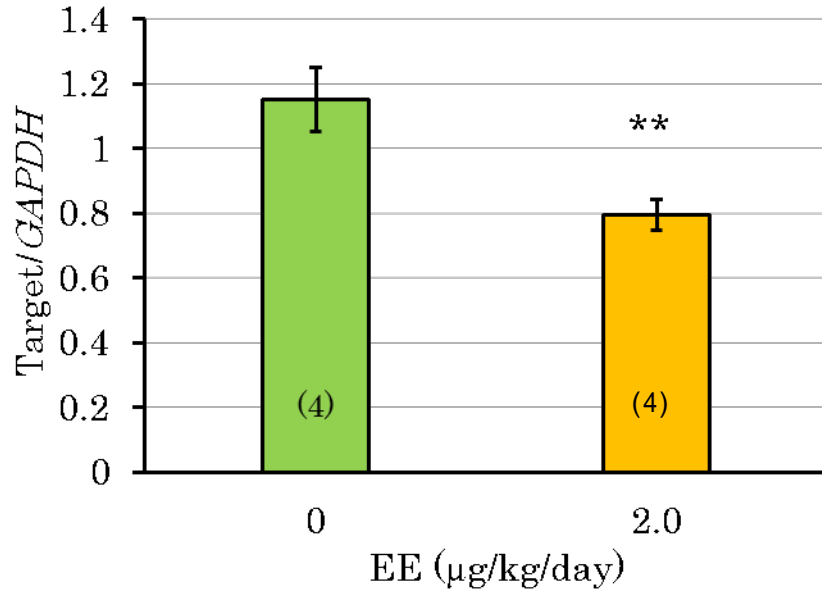


図2 . 6日齢雌ラットの AVPV 領域 (A) および ARC 領域 (B) における ER ISH
 $ER\alpha$ mRNA は赤色蛍光として認められる。

(A) 視床下部



(B) 上部領域

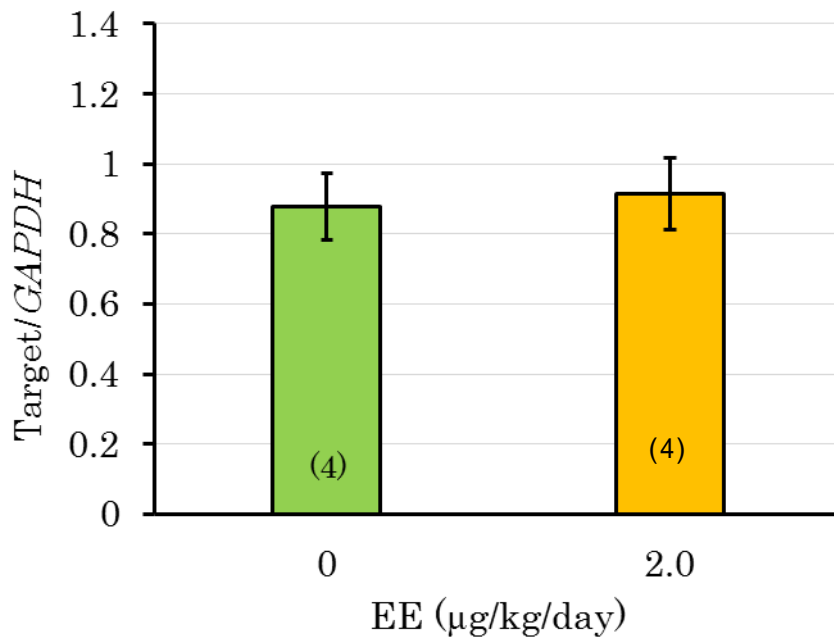
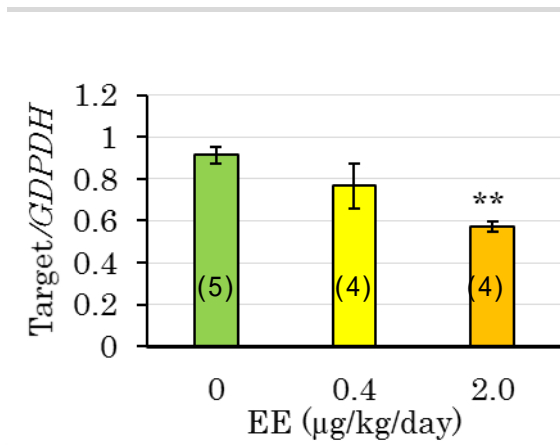
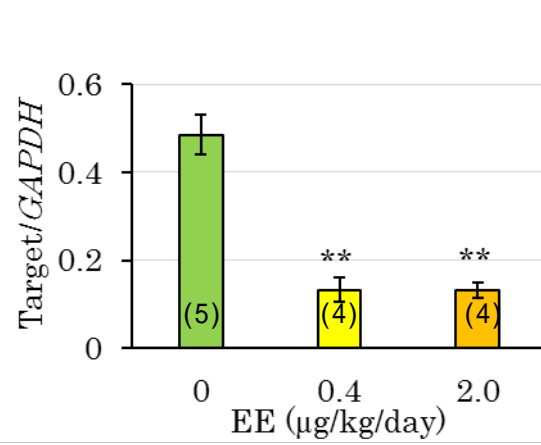


図3. 1日齢から5日間0または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの最終投与後24時間における視床下部(A)あるいはその上部領域(B)におけるER mRNAのGAPDH mRNAに対する相対発現量(平均±S.E.M)(N) **対照群との間に有意差あり(P<0.01)

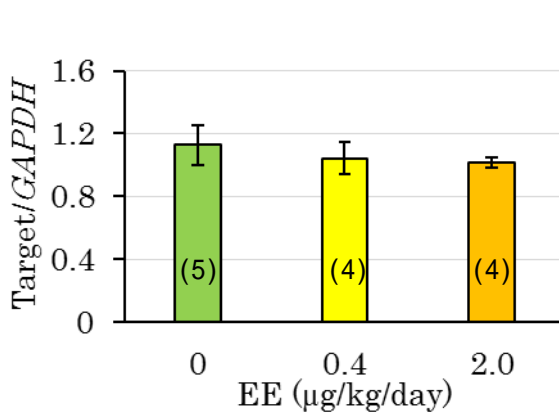
(A) *ER* mRNA



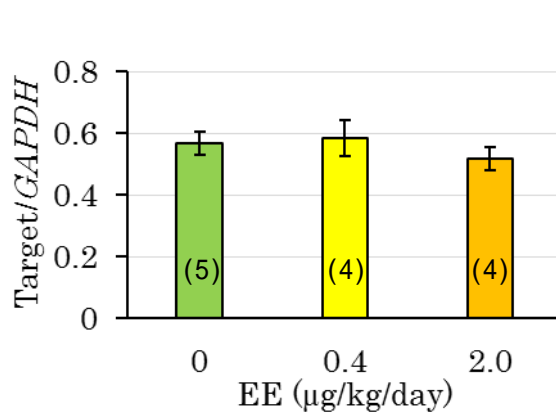
(B) *Kiss1* mRNA



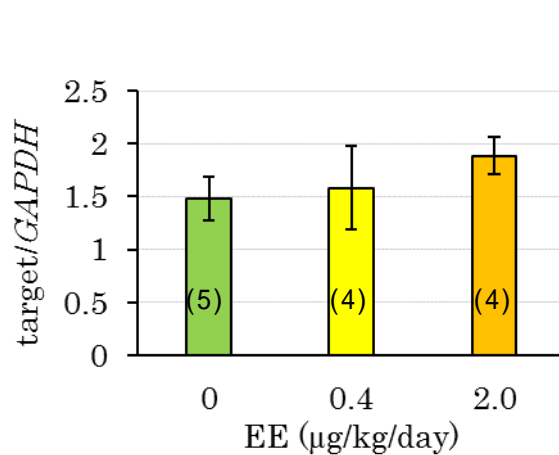
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Tac2* mRNA



(E) *Oprk1* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

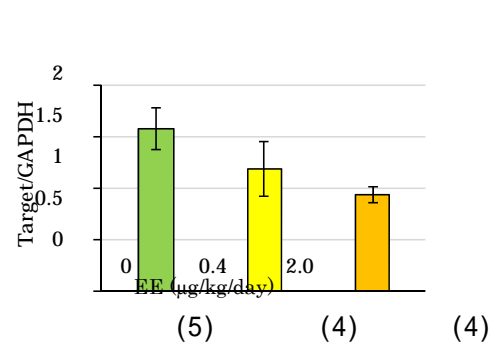
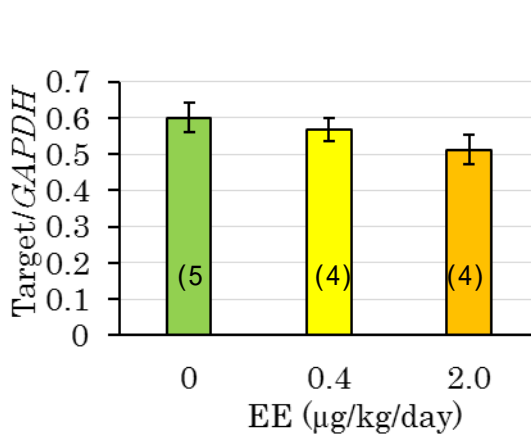


図4. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間におけるmRNA(*ERα* (A)、*Kiss1* (B)、プロダイノルフィン (*Pdyn*) (C)、オピオイド受容体 (*Oprk1*)、ニューロキニンBをコードする *Tac3* (E)ならびにその受容体をコードする *Tacr3* (F))の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±S.E.M.) . (N) **対照群との間に有意差あり (P<0.01)

(A) *GPR54* mRNA



(B) *ERβ* mRNA

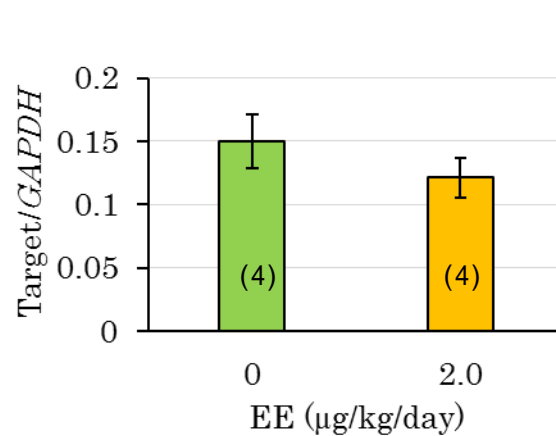
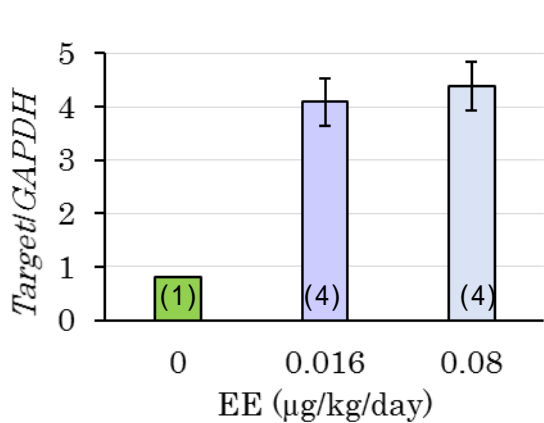


図5. 1日齢から5日間0、0.4または2 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *GPR54* mRNA(A)および *ERβ* mRNA(B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

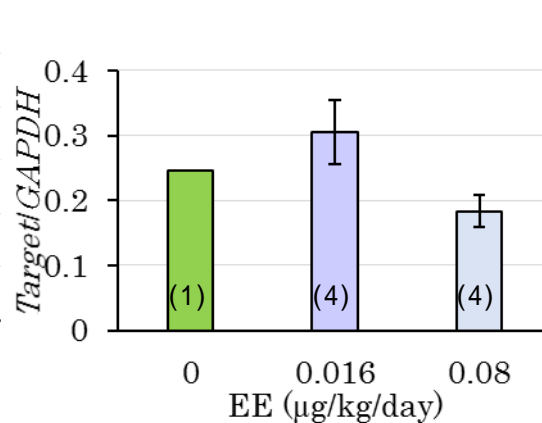
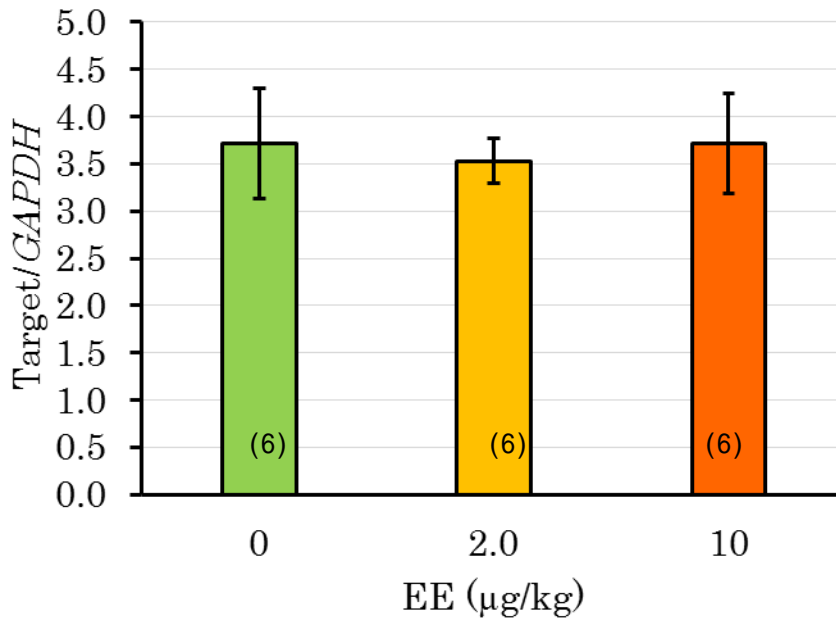


図6. 1日齢から5日間0、0.016または0.08 μg/kg/dayのエチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラット視床下部の最終投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (0 μg/kg/day 群を除き、平均 ± S.E.M) (N)

(A) *ERα* mRNA



(B) *Kiss1* mRNA

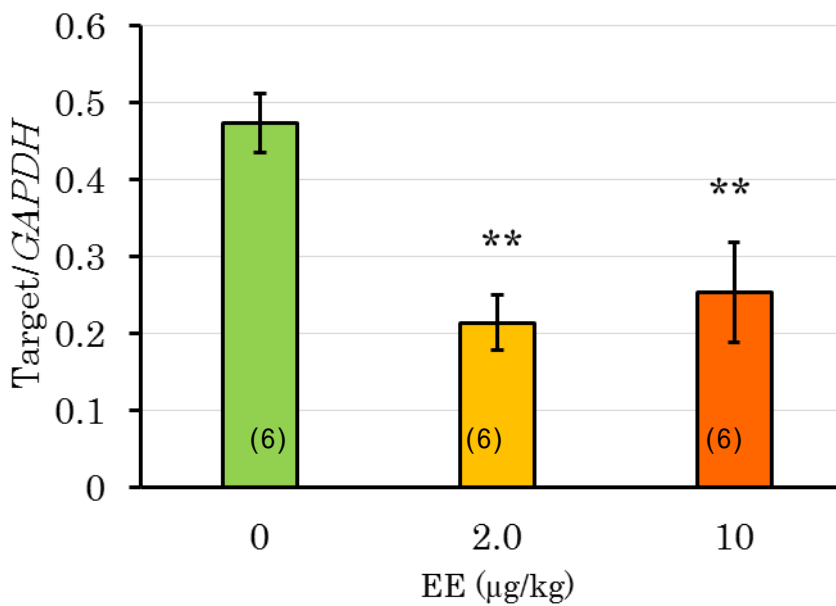


図7. 1日齢に0、2または10 μg/kgのエチニルエストラジオール(EE)を単回経口投与した雌ラット視床下部の投与後24時間における *ERα* mRNA (A)および *Kiss1* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均 ± S.E.M)

(N) **対照群との間に有意差あり (P<0.01)

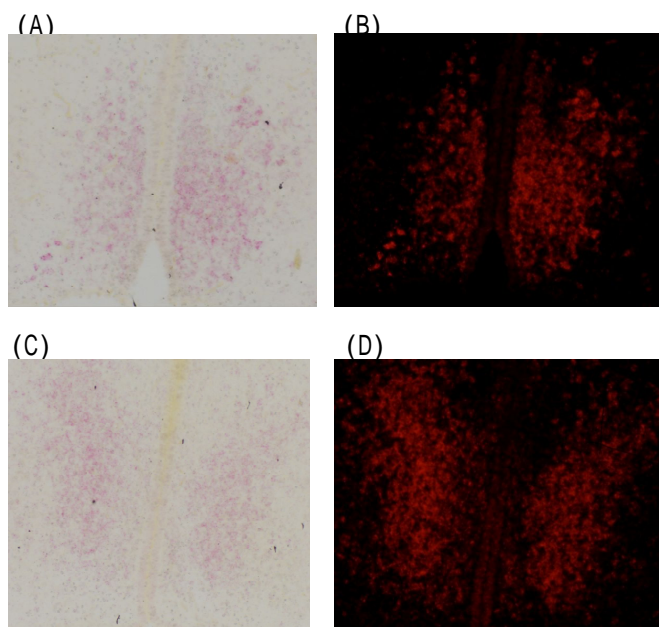


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$ ISH(代表例) コーン油を投与した対照群(AおよびB)ならびに $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野(AおよびC)および暗視野(BおよびD)像で、 $ER\alpha$ mRNAは赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

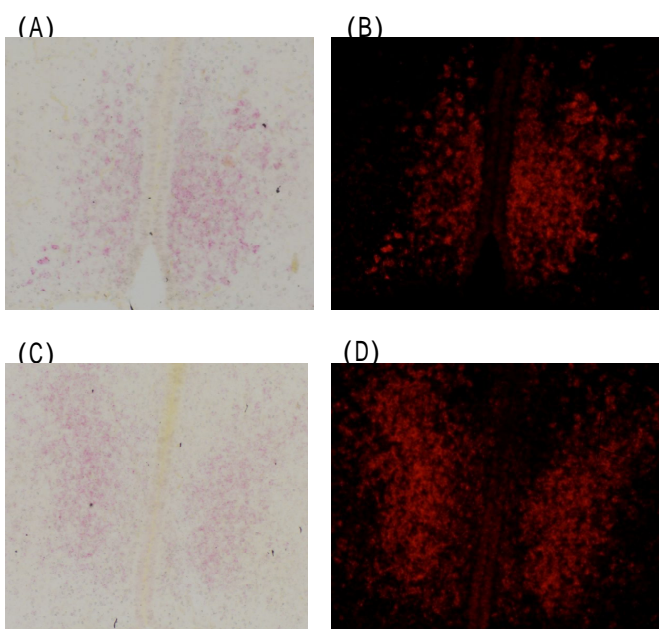


図9. エチニルエストラジオール(EE)を1日齢から5日間反復経口投与した6日齢雌ラットのAVPV領域における $ER\alpha$ ISH(代表例) コーン油を投与した対照群(AおよびB)ならびに $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(CおよびD)の明視野(AおよびC)および暗視野(BおよびD)像で、 $ER\alpha$ mRNAは赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

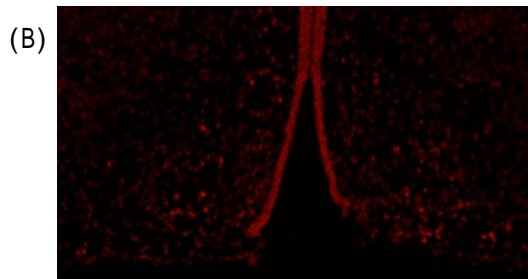
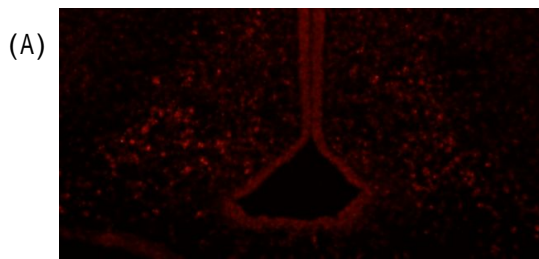


図 10. エチニルエストラジオール(EE)を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した 6 日齢雌ラットの ARC 領域における *ERα* ISH (代表例)
コーン油を投与した対照群 (A) ならびに 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(B)の暗視野 (B および D) 像で、*ERα* mRNA は赤色蛍光として認められる。

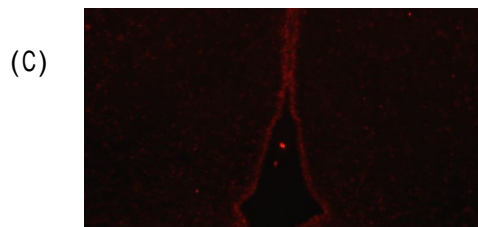
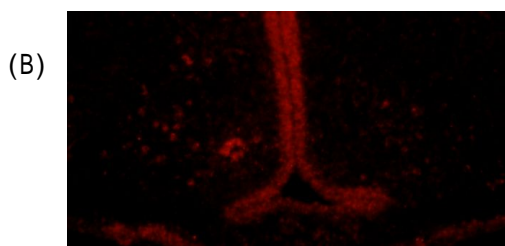
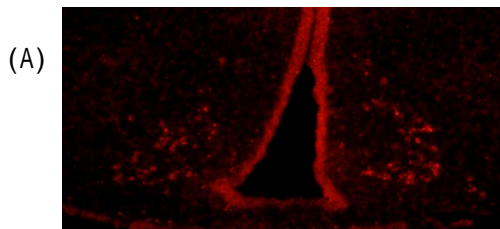


図 11. エチニルエストラジオール(EE)を 1 日齢から 5 日間反復経口投与した 6 日齢雌ラットならびに 10 日齢の *Kiss1* ノックアウトラットの ARC 領域における *Kiss1* ISH (代表例)
コーン油を投与した対照群 (A) ならびに 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群(B)の暗視野像で、*Kiss1* mRNA は赤色蛍光として認められるが、ノックアウトラットの ARC 領域 (C) に蛍光は認められない。

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	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 (μg/kg/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 (μg/kg/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

表 5

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末期胎児所見

EE ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of males	6.4 \pm 1.5	5.7 \pm 1.4
Number of females	7.0 \pm 1.8	6.0 \pm 1.5
Sex ratio (male %)	52.1 \pm 3.5	51.4 \pm 4.0
Feral body weight (g)	3.6 \pm 0.1	3.9 \pm 0.1*
Placental weight (g)	\pm	\pm
External abnormality (edema)	0	1
Skeletal anomalies	0	0
Skeletal variations	2	2
Absence of the 13 th rib	0	1
Short 13 th rib	1	0
Lumbar rib		1
Variation in number of lumbar vertebrae	1	0
Frequency of fetuses with ossified bones (%)		
Right forelimb phalanx (V)	19.4 \pm 7.6	48.8 \pm 7.8*
Left forelimb phalanx (V)	17.4 \pm 6.4	39.8 \pm 8.8
Starnebra (II)	98.9 \pm 1.0	100 \pm 0
Starnebra (III)	98.9 \pm 1.0	100 \pm 0
Starnebra (IV)	96.7 \pm 3.1	98.5 \pm 1.4
Starnebra (V)	41.1 \pm 13.0	76.8 \pm 6.5
Starnebra (VI)	24.8 \pm 11.0	57.2 \pm 11.3
Number of ossified caudal and sacral vertebrae	7.69 \pm 0.24	8.37 \pm 0.09*

^a corn oil 10 mL/kg/day

* p<0.05