

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8）。

(4) 胎児所見

表9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。

4. 新生期新 EE 投与後の視床下部初期変化 (実験 2)

(1) EE 反復経口投与後の視床下部における遺伝子発現

図5に示すように、EE 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では視床下部における *ER α* 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6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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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が、低下の程度に用量間で差は認められなかった。*ER α* mRNA についても、対照群と比較して、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では有意な低値を示し、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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ってい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、対照群との間に有意差は認められなかったが、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 *ER β* 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7）。

図8に示すように、0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の投与群で用量に依存した *Kiss1* の有意な低下が認められた。対照群との間に有意差は認められなかったが、*ER α* も用量に依存した発現低下が認められた。

(2) 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には1日齢における2あるいは10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のEE単回投与翌日の視床下部における *ER α* および *Kiss1* 発現量を示した。*ER α* 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10には5日齢における20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ のEE単回投与翌日の視床下部における *ER α* および *Kiss1* 発現量を示したが、*ER α* および *Kiss1* ともに対照群と比較して有意な低値を示した。

(3) 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11および12に代表例を示すように、*ER α* 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13）。

5. 新生児期エチニルエストラジオール曝露が幼若期卵巣における卵胞発育に及ぼす影響 (実験 3)

(1) 一般状態および発育

一般状態に異常は認められず、体重推移および眼瞼開裂日齢に対照群とEE投与群との間で有意差は認められなかった（図14、表10）。

(2) 23日齢における器官重量 (図15)

EE 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では卵巣が対照群と比較して肉眼でも確認できるほど小さく、卵巣重量および子宮重量は対照群と比較し有意な低下を示した。0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では卵巣重量に有意差はみられなかったが、低値の傾向が認められた。子宮重量については1例に高値 (40.4 mg) を示す個体が認められたため、平均重量

が対照群と同等のレベルとなったが、この 1 例を除くと、有意差はみられなかったが対照群と比較して低下傾向を示していた。下垂体重量については対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。

(3) 発育卵胞数の計測結果 (図 16)

10 日齢の卵巣では early antral 以前の発育段階の卵胞しか認められなかった。対照群と発育卵胞数を比較すると、preantral ステージの卵胞数は同等であったが、それより発育の進んだ early antral ステージの卵胞は、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 日対照群の 65 %程度、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でも減少傾向を示していたが、統計学的有意差はみられなかった (図 16A)。

23 日齢の卵巣では 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群の antral ステージの卵胞数が対照群と比較して有意に減少した。一方、それより以前の発育段階にある卵胞数に有意な変化はみられなかった。0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では標本破損により 2 例のみの計測となったため統計解析は行わなかったが、各段階の卵胞数が低値の傾向を示した。用量相関性は antral ステージのみに認められた (図 16B)。

(4) 卵巣における卵胞発育関連因子 mRNA の発現 (図 17)

10 日齢卵巣では、LHR mRNA 発現が用量依存的な低下傾向を示し、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では対照群との間に有意差が認められた。その他の測定項目に有意な変化はみられなかったが、FSHR および ER β mRNA については 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群で若干の増加傾向が認められた (図 17A)。

LHR mRNA は 23 日齢でも 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群において低値の傾向を示したが対照群との間に有意差はみられなかった。その他の測定項目には対照群と EE 投与群間で有意差はみられなかった (図 17B)。

(5) 卵巣におけるステロイドホルモン合成関連因子 mRNA の発現 (図 18)

10 日齢の卵巣では、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群で StAR mRNA の発現が有意に低下した。また有意差はみられなかったが、同群において P450scc、3 β -HSD ならびに aromatase mRNA が低下傾向を示した。0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でも StAR および P450scc mRNA 発現に同様の傾向が認められたが、3 β -HSD および aromatase mRNA 発現は

対照群とほぼ同レベルであった (図 18A)。

23 日齢卵巣では、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群において P450scc および P450c17 の各 mRNA 発現が対照群と比較し有意な低値を示した。また StAR および 3 β -HSD、Aromatase mRNA についても有意差はなかったが、対照群に対する発現量はそれぞれ約 60、82、69 %と低下していた (図 18B)。

(6) 卵巣における LHR タンパク質の発現 (図 19)

23 日齢卵巣における β -Actin に対する LHR タンパク質の相対発現量が 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群において低下した。

(7) 血清中 E₂ 濃度 (図 20)

23 日齢の血清中 E₂ レベルについて、対照群と EE 投与群との間で有意な差はみられなかった。

6. 性周期回帰停止前の視床下部下垂体性腺軸の変化 (実験 4)

(1) 発育および身体的発達

EE投与群と対照群との間に有意差は認められず、開眼あるいは膣開口の日齢にも投与の影響は認められなかった (データは示さず)。

(2) 性周期の回帰状況 (実験 4)

図21に示すように、8-9週齢で連続発情を示す動物はいずれの投与群にも認められなかった。しかし、不規則な性周期を回帰する例が EEの用量に依存して増加し、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では4-5日で発情を回帰する正常な性周期を示す例はなかった。

(3) 剖検所見および器官重量

表11に示すように、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では対照群との間に有意差を認める器官はなかったが、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では卵巣および子宮重量が有意な低値を示し、下垂体重量が有意な高値を示した。

(4) 卵巣の組織学的所見

囊胞状卵胞を有する卵巣の代表的組織像を図22に、また、その保有率を図23に示す。10週齢に採取した卵巣では、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群における囊胞状卵胞の保有率は対照群とほぼ同程度であったが、2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では5例全例に観察された (図23A)。0.08あるいは0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を投与して13週齢に卵巣を観察すると、EE投与群では用量に依存して保有率が増加し、0.4

μg/kg/day群では75%の動物に囊胞状卵胞が観察された。(図23B)

(5) 卵巣における遺伝子発現およびLHR発現

図24に示すように、0.4 μg/kg/day群では発育卵胞の卵母細胞に発現する *GDF-9* (図24A) も、顆粒層細胞に発現する *FSHR* (図24B) およびインヒビンの各サブユニット (図24D-F)、ならびに発育卵胞の莢膜およびグラーフ卵胞の顆粒層細胞に発現する *LHR* (図24C) のいずれも対照群と比べて発現が増加し、*LHR* についてはタンパク質レベルでも増加傾向が認められた (図25)。0.08 μg/kg/day群では、これらの遺伝子の発現に有意差は認められなかったが、*LHR* mRNA については増加傾向が認められた。

ステロイドホルモン合成にかかわる因子としては、0.08 μg/kg/day群ではコレステロールの動員からプロゲステロン合成の間に働く *3β-HSD* および *STAR* の発現が有意に増加し、0.4 μg/kg/day群ではプロゲステロン合成からエストロゲン合成にかかわる *3β-HSD*、*P450c17* および *aromatase* の発現が有意に増加した (図26A-5E)。

(6) 視床下部における *Kiss1* および *ERα* 発現

図27および図28にはそれぞれARCおよびAVPVにおける *Kiss1* mRNA および *ERα* mRNA の二重 *in situ* hybridization の代表例を示した。

対照群およびEE投与群において、赤色顆粒で可視化されている *ERα* と青色顆粒で可視化されている *Kiss1* の発現細胞数を数えたところ、ARCでは *Kiss1* 発現細胞数が増加し (図27A)、AVPVでは *Kiss1* 単独あるいは *Kiss1/ERα* 共発現細胞数が共に減少していた (図28A)。

陰性対照とした *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラットの脳組織では、AVPVおよびARCのいずれの部位においても、*ERα* のシグナルである赤色顆粒は認められたが、*Kiss1* のシグナルである青色顆粒は認められなかった (図27Bおよび28B)。子宮では子宮腺に *ERα* のシグナルである赤色顆粒が局在していた (図28C)。

(7) EE曝露動物におけるパルス状LH分泌

図29には血清中LH濃度の個別変動を示し、表12にはパルス解析結果を示す。

いずれの投与群の動物にもLHパルスの発

生が確認されたが、各パラメーターのうち、0.4 μg/kg/day群のAmplitudeが対照群と比べて有意な高値を示した。その他のパラメーターに対照群とEE投与群との間で有意差は認められなかった。

D. 考察

脳の性分化臨界期にエストロゲン活性物質の曝露を受けると、性周期の早期回帰停止や乳腺の過形成等、性成熟後に影響が遅発して現れることを平成24年度までの本研究で明らかにした。本研究では、まずこのような遅発影響に閾値が存在するかどうかを確認した。平成24年度までの研究から、感受性の高い日齢である1日齢に単回投与するより、これを5日間に分割して反復投与する方がより若齢で性周期の回帰を停止することが明らかになったため、閾値は1日齢から5日間の反復経口投与を行って探索することとした。対照群でも性周期が変化し始める25週齢まで観察した結果、0.08 μg/kg/day投与以下の用量では性周期の回帰停止は認められなかった。1日齢にこの用量を単回皮下投与すると、33週齢で発情の回帰を停止する動物が現れてくることから、性周期の早期回帰停止に関する経口投与での閾値は0.08 μg/kg/day付近にあるものと推測される。

一方、0.08 μg/kg/day投与では、27-28週齢の観察で卵巣に囊胞状卵胞を保有する動物の割合が有意に増加していた。0.016 μg/kg/day以下の用量では囊胞状卵胞保有率は対照群と同程度であったことから、囊胞状卵胞の保有に関する閾値は0.016 μg/kg/dayと考えられる。これまでの研究でも性周期の回帰が停止する用量で囊胞状卵胞の保有率が増加していたが、性周期に著変の認められない用量でも囊胞状卵胞の保有率が増加することが本研究で明らかになった。その他の観察項目にはEE投与の影響と考えられる変化は認められなかったことから、囊胞状卵胞の保有率増加が最も低用量のEEで誘発される遅発影響であると考えられる。

囊胞状卵胞は、加齢に伴い対照群の卵巣にも観察されるようになる。本研究で、閾値の探索以外を目的とした実験で13週齢に卵巣の囊胞状卵胞の保有率を調べたが、0.08

μg/kg/day は対照群と差のない値であったことから、加齢に伴い増加する嚢胞状卵胞の形成が EE 投与により促進されたものと理解された。

子宮肥大試験は *in vivo* によるエストロゲン活性のバイオアッセイであり、種々の物質がこの試験でエストロゲン活性を評価されている。本研究では 0.08 μg/kg/day の EE で嚢胞状卵胞の保有率が増加したが、この用量を、OECD テストガイドラインに従った幼若雌ラットを用いる子宮肥大試験に適用したが、子宮重量は溶媒を投与した陰性対照と全く変わらず、遅発影響の閾値は子宮肥大試験の閾値より低いことが明らかになった。従って、遅発影響を誘発するエストロゲン活性の検出に、子宮肥大試験は必ずしも有効ではないことが示唆された。

生殖毒性試験では一般的に 10 週齢付近で交配を行って、交尾までの同居日数、交尾率、妊娠率、着床率、胚及び胎児の生存率などから生殖能力に及ぼす影響を評価する。0.08 μg/kg/day 投与を受けた動物は性周期を回帰しているので、生殖能力を確認した結果、交尾、および妊娠率に影響は認められなかった。また、黄体数も対照群と同様であったことから、この時期の排卵数は正常であったと考えられる。従って、嚢胞状卵胞を形成する用量でも少なくとも若齢では生殖能力には異常のないことが確認された。しかし、胎児胎盤重量が母体重に反映される妊娠末期における母体重増加が EE 投与群で低下していた。胎児の外表および骨格に異常は認められなかったが、EE 投与群では胎児体重が有意に増加し骨化の促進が認められた。これらの成績は、EE 投与群における胎児の発育促進と母体重の増加抑制を示唆するものである。胎児の発育促進は通常は悪影響とはされないが、母体重の増加が抑制されている中での発育促進については、母動物のエネルギー代謝などへの影響の可能性も排除できない。本研究では生殖内分泌を中心に検索を行ったため、一般毒性学的観点からの詳細な解析は行わなかったが、卵巣に形態学的変化を生じさせる用量の EE が、妊娠期間中の全身状態に影響を及ぼす可能性があるかどうかは今後検討する必要がある。

閾値探索の研究から明らかになったように、新生児期の EE 投与は生殖内分泌機能に対する加齢性の変化を促進していることが伺える。EE は ER への結合を起点として、標的とする遺伝子の転写を調節しているものと考えられる。本研究では、脳の性分化、すなわち性成熟後の性腺刺激ホルモン分泌パターンを決定する時期に限定して EE を投与したことから、性腺刺激ホルモン分泌を制御する GnRH を分泌する視床下部における初発影響を検索した。検索の対象には、EE と直接結合する ERα と ERβ ならびに GnRH を上位から直接制御している KP とその受容体である GPR54 を選択した。また、ARC におけるパルスの発生に関与しているニューロキニン B およびその受容体ならびにダイノルフィンとその受容体も解析対象に加え、これらをコードする遺伝子の発現を定量解析した。その結果、最も顕著な変化は、視床下部における *Kiss1* 遺伝子の発現低下であった。*Kiss1* は KP をコードする遺伝子であるが、1 日齢における単回投与でも 24 時間後には視床下部の *Kiss1* 発現が低下し、これには EE との結合により標的遺伝子の転写を調節する ERα の発現低下を伴っていなかったことから、*Kiss1* 発現低下が初発影響の一つであると考えられる。

雌動物では KP は ARC と AVPV の両神経核に局在するが、AVPV では春機発動が近くなるまで発現が増加することはないと報告されている。本研究で行った *in situ hybridization* でも 6 日齢の AVPV に *Kiss1* は発現していないことが確認された。さらに ARC では EE 投与群における発現細胞の減少が確認されたことから、EE 投与による *Kiss1* の発現低下は ARC に限定された変化であると考えられる。従って、新生期 EE 投与による初発変化は ARC における *Kiss1* の発現低下と考えられる。

Kiss1 の発現低下は、性周期の早期回帰停止をもたらす用量では用量間で差の認められないレベルまで低下していたが、嚢胞状卵胞の形成を促進させる用量以下では用量反応関係が認められた。遅発影響に関する無影響量である 0.016 μg/kg/day でも対照群との間に有意差が認められ、無影響量は得られなかったが、投与動物の体重を考慮すると、閾値は 1 日あたりフェムトモルレベルの経口摂取と推測さ

れ、この時期は外来性エストロゲンに対して極めて高い感受性を有していることが明らかになった。

反復投与後の視床下部では、用量に依存した *ERα* の発現低下も認められた。*ERα* は 6 日齢でも ARC および AVPV のいずれにおいても発現している。しかし、*in situ hybridization* ではいずれの神経核でも *ERα* の発現に投与の影響は認められなかった。*ERα* の発現低下は視床下部より上部の領域では認められなかったことから、部位は特定できなかったが、視床下部に限定された変化であることは明らかである。

EE は *ERα* 遺伝子の転写を促進することが知られているが、投与 24 時間後の視床下部では発現が低下していた。0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の反復投与でも低下傾向が認められているにもかかわらず、1 日齢の 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回投与では対照群あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群と同等の発現量であったことから、*ERα* の発現低下は、反復投与によりダウンレギュレーションが作動したものと推測された。

KP の受容体である *GPR54* あるいは EE が結合するもう一つの受容体である *ERβ* については視床下部での発現に EE 投与の影響は認められなかった。一方、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* にみられた顕著な発現変化ではないが、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と考えられる。GnRH パルスの発生開始時期は明らかではないが、10 日齢前後に持続的に上昇する血中性腺刺激ホルモン濃度に影響を及ぼす可能性は否定できない。実際、本研究で EE 投与群の 10 日齢および 23 日齢における卵胞に遅滞が認められた。LHR の発現も低下し、また、LH により刺激されるステロイドホルモン合成系の酵素遺伝子も発現が抑制されていた。これらの事実を合わせると、EE はキスペプチンパルス発生部位である弓状核 Kndy ニューロンに対して、まず GnRH パルスの発生に抑制的に作用し、その結果性腺刺激ホルモン分泌が低下し、

幼若期の卵胞発育が遅滞し、平成 24 年度までの研究で報告したように、初回排卵が遅延するものと考えられる。

初回排卵を経て、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でも不正ながら性周期を回帰している 12-13 週齢に視床下部 ARC および AVPV における *Kiss1* の発現を調べると、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では対照群と同様の発現であったが、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では ARC における発現が増え、AVPV における発現が低下していた。成熟動物で AVPV の KP は卵巣からの性ステロイドによる正のフィードバックを受け、ARC は負のフィードバックを受けていることから、観察された変化は卵巣からのフィードバックの減弱を示唆するものと考えられる。実際、この群では子宮重量が低下し、血中エストロゲン濃度の低下が示唆される。しかし、卵巣では、LHR およびステロイドホルモン合成系の遺伝子に発現増加が認められている。これは、ステロイドホルモンの合成促進よりむしろ卵巣組織の構成成分が変化したことによるものと考えられる。すなわち、この群の卵巣では既に 75% に嚢胞状卵胞が観察されまた、黄体が減り、卵巣組織に占める卵胞の割合が大きくなっている。そのため、発育卵胞に発現する *GDF-9*、あるいは顆粒層細胞に発現する *inhibin-α* も含めて発現が増加したものと考えられる。

0.4 あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の EE を反復投与して発情の回帰停止前に卵巣を摘出して 14 週齢で頻回採血を行って LH パルスを調べた。その結果、0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群でパルスの Amplitude が対照群と比べて有意に増大し、パルス発生部位である ARC における *Kiss1* の発現と一致する結果となった。2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 群では Amplitude は対照群と同様であったが、平均の LH 濃度が低下の傾向を示していた。LH パルスの変化に必ずしも EE の用量に応じた変化が認められなかったのは、性周期の回帰停止時期の違いによるものかもしれない。

以上のように本研究では EE 投与直後から新生期、幼若期、性周期回帰停止前と時期を分けて、視床下部/下垂体/卵巣軸の変化を検索した。性周期回帰停止は AVPV における KP の放出停止による変化であるが、初発影響は ARC における *Kiss1* の発現低下であることが明らかになった。エストロゲン N 活性に対

して極めて感受性の高い *Kiss1* の発現低下を起点として、幼若期には卵胞発育を遅滞させて初回排卵の遅延が起こり、性周期の回帰が始まると、既に報告されているように性腺刺激ホルモンサージが低くなり、排卵を逃れた卵胞が嚢胞状になって卵巣に残存していくものと考えられる。このように新生期 EE 投与は、視床下部下垂体性腺軸の正常な発達をかく乱することにより、遅発影響をもたらすが、閾値が存在することが本研究より明らかになった。

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

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、高松市)
- 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-Ozuyal 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, Dhillon 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)
- 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, Dessì-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, Shiyng 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 dichlorodiphenyl -trichloroethane. *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, Messenger S, Chatzidaki EE, Thresher RR, Acierno JS Jr, Shagoury JK, Bo-Abbas Y, Kuohung W, Schwinof KM, Hendrick AG, Zahn D, Dixon J, Kaiser UB, 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, Shiota 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)
- Shiorta M, Kawashima J, Nakamura T, Ogawa Y, Kamiie J, Yasuno K, Shiota K, Yoshida M. Delayed effects of single neonatal subcutaneous exposure of low-dose 17 α -ethynylestradiol on reproductive function in female rats. *Journal of Toxicological Science* 37, 681-690 (2012)
- Shiorta M, Soda S, Katoh C, Asai S, Sato M, Ohta R, Watanabe G, Taya K, Shiota K. Effects of reduction of the number of primordial follicles on follicular development to achieve puberty in female rats. *Reproduction* 125, 85-94 (2003)
- Shiorta M, Kurohmaru M, Hayashi Y, Shiota 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)
- Shiorta 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)

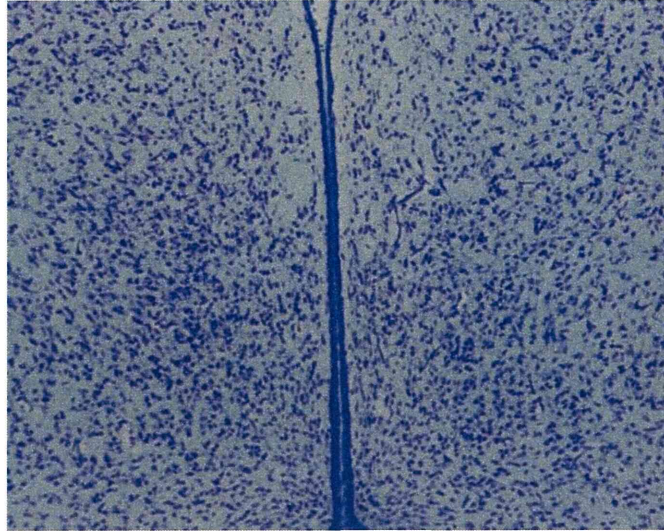
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15, 795–803 (2009)
- Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing 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, Shirota 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.



B.

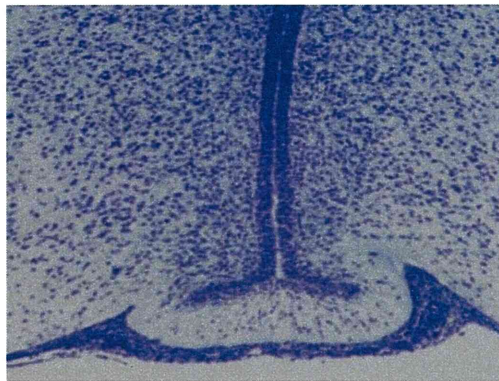
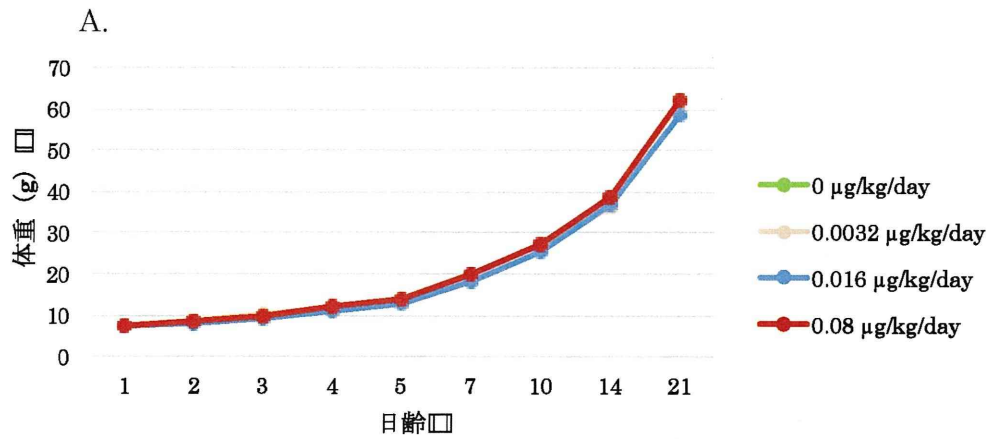


図 1

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



B.

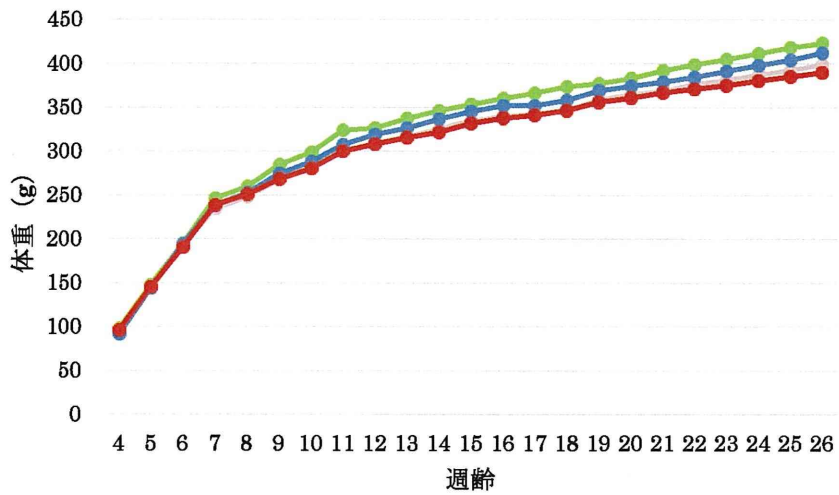
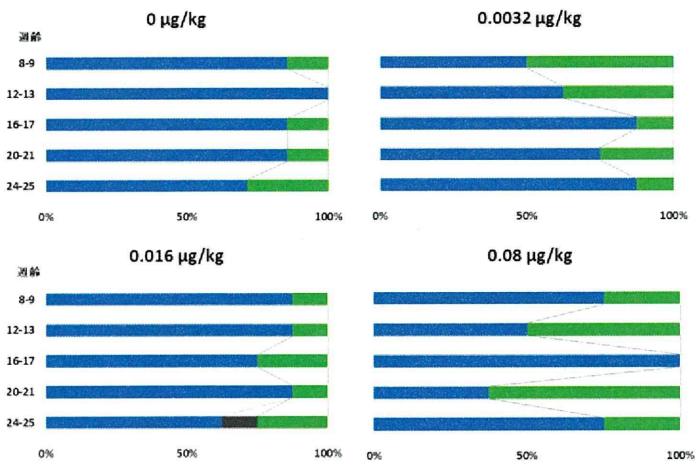
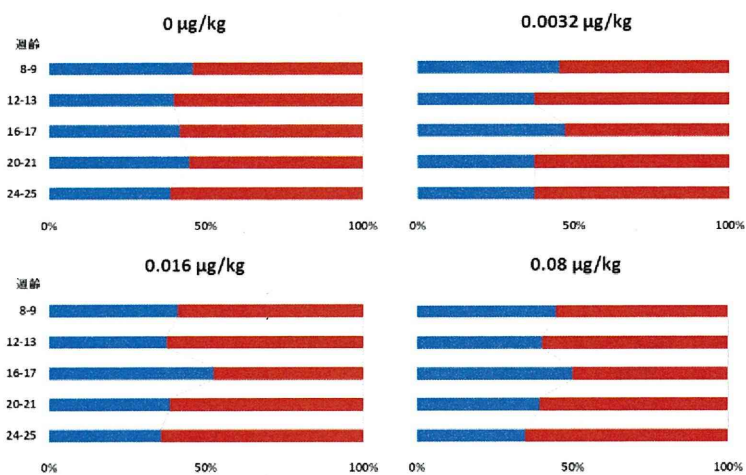


図2 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの離乳前 (A) および離乳後 (B) の体重推移



■ Frequency of animals revolving estrus at 4 to 5-day intervals
 ■ Frequency of animals revolving estrus at irregular intervals

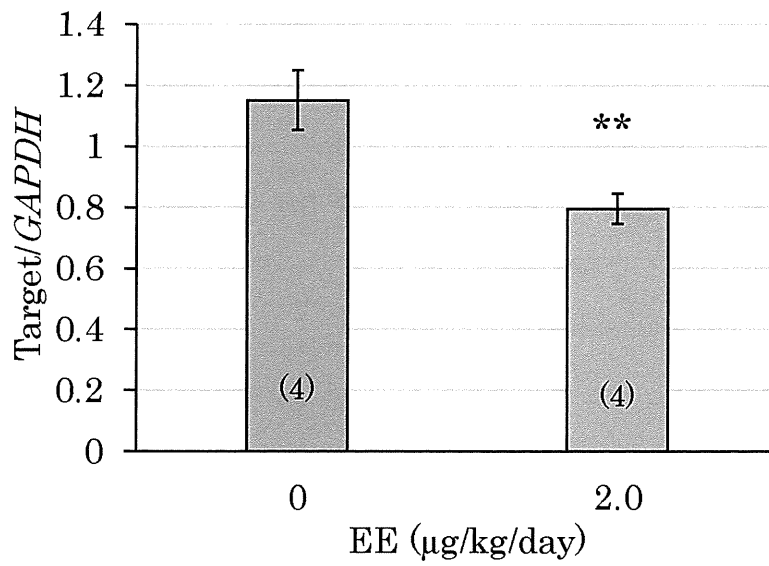
図3 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの25週齢までの性周期



■ Frequency of estrus or proestrus days
 ■ Frequency of metestrus or diestrus days

図4 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの発情期あるいは発情前期の割合

A. 視床下部



B. 上部領域

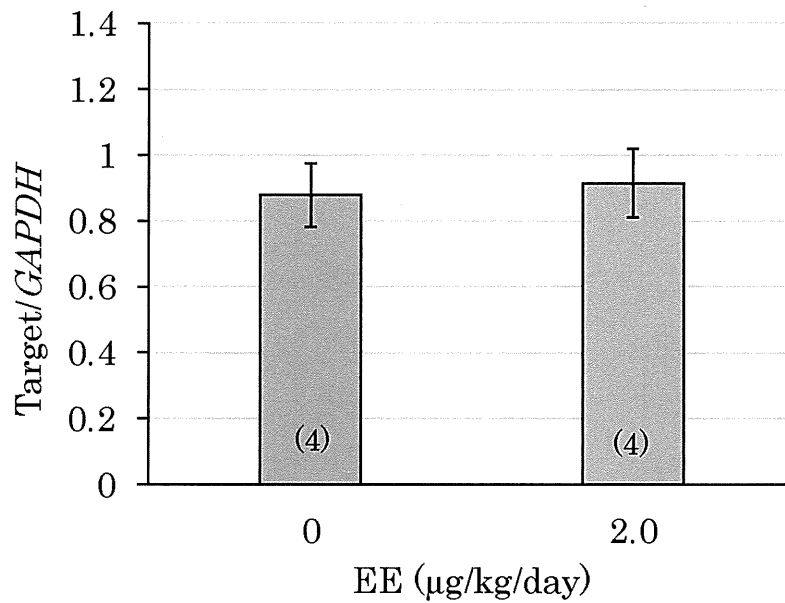
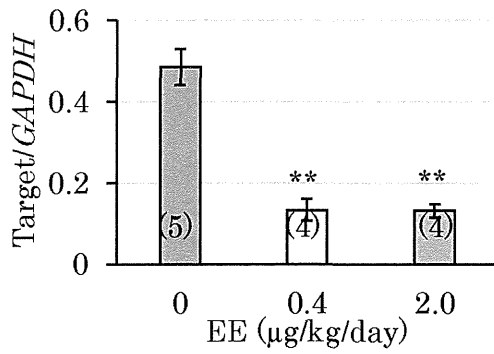


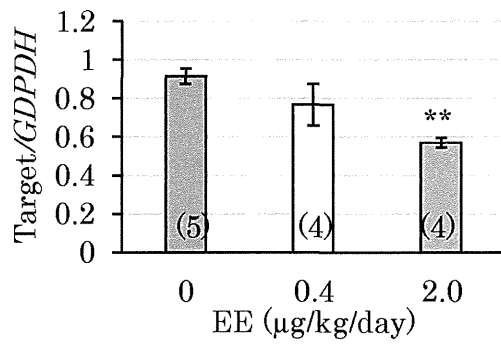
図 5

1 日齢から 5 日間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±標準誤差, (N))。**P<0.01

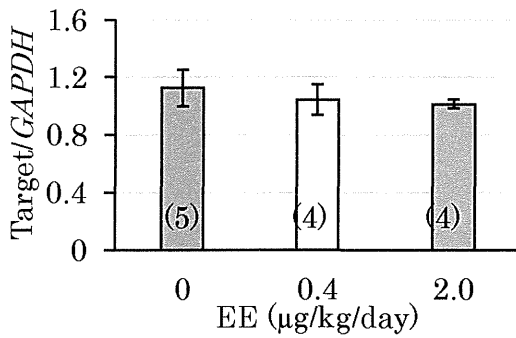
(A) *Kiss1* mRNA



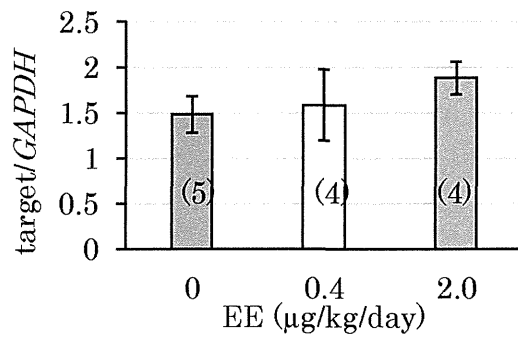
(B) *ERα* mRNA



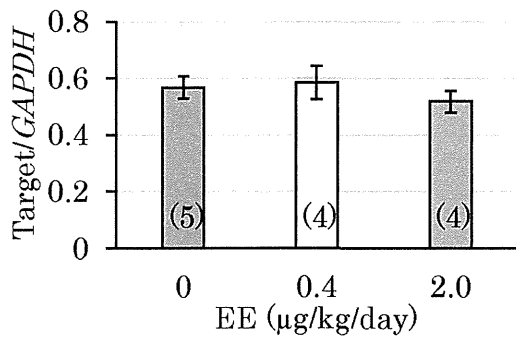
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Oprk1* mRNA



(E) *Tac2* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

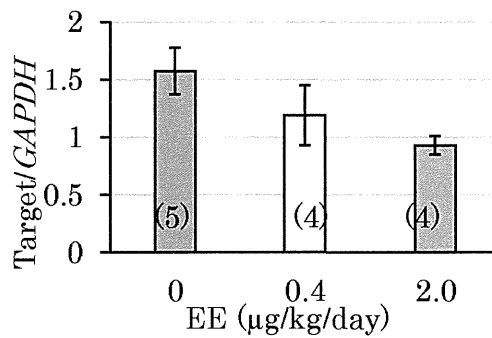


図 6

1日齢から5日間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(*Kiss1* (A)、*ERα* (B)、プロダイノルフィン (*Pdyn*) (C)、その受容体(κオピオイド受容体)をコードする *Oprk1* (D)、ニューロキニンBをコードする *Tac2* (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±標準誤差, (N)). **P<0.01

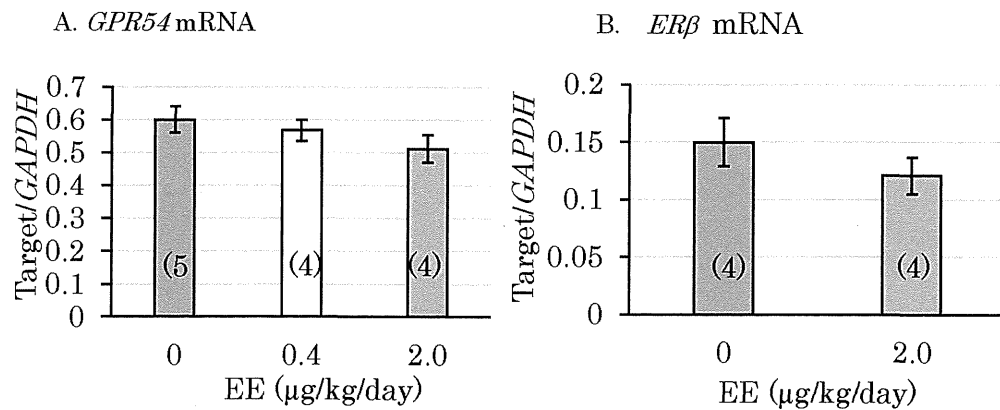


図 7

1 日齢から 5 日間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 (N,平均±標準誤差)。

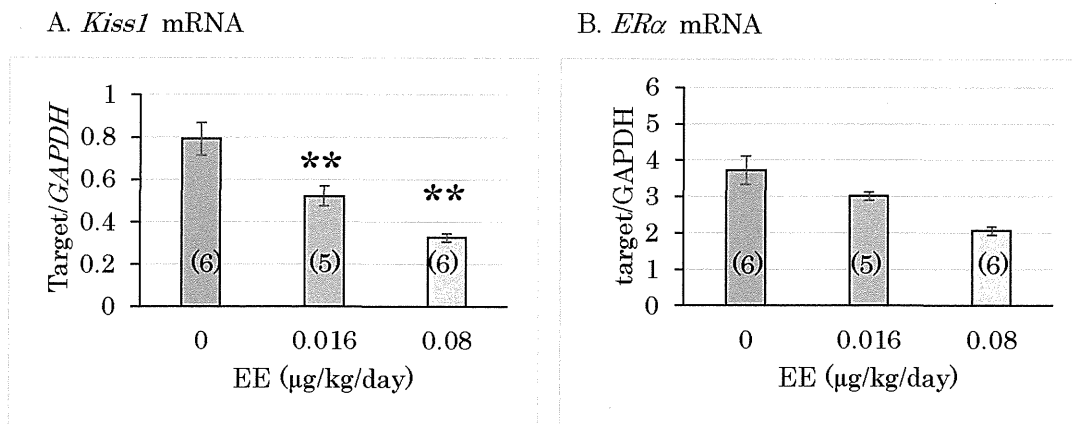


図 8

1 日齢から 5 日間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 *Kiss1* mRNA (A)および *ERα* mRNA (B)の *GAPDH* mRNA に対する相対発現量 (平均±標準誤差, (N))。**p<0.01