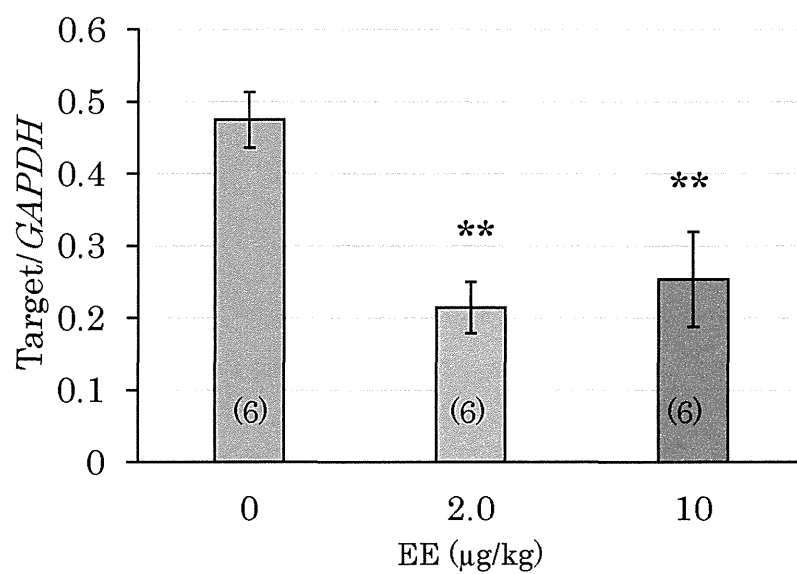


A. *Kiss1* mRNA



B. *ERα* mRNA

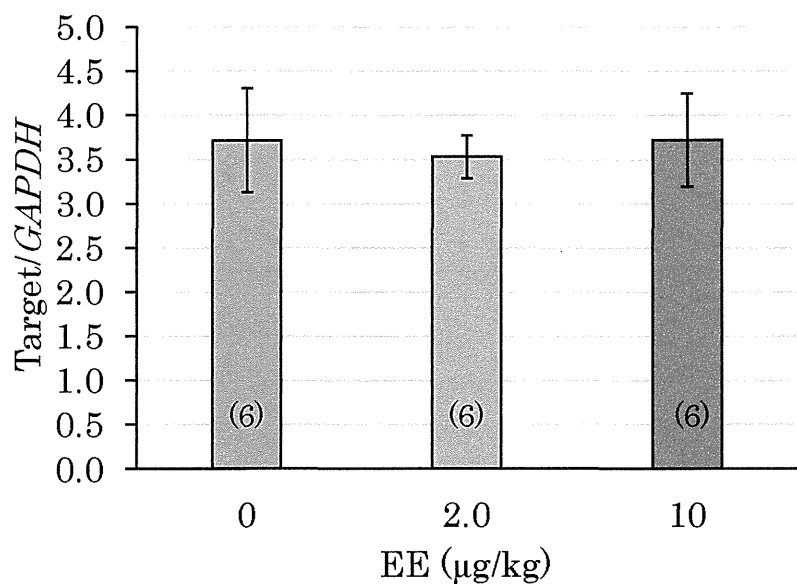
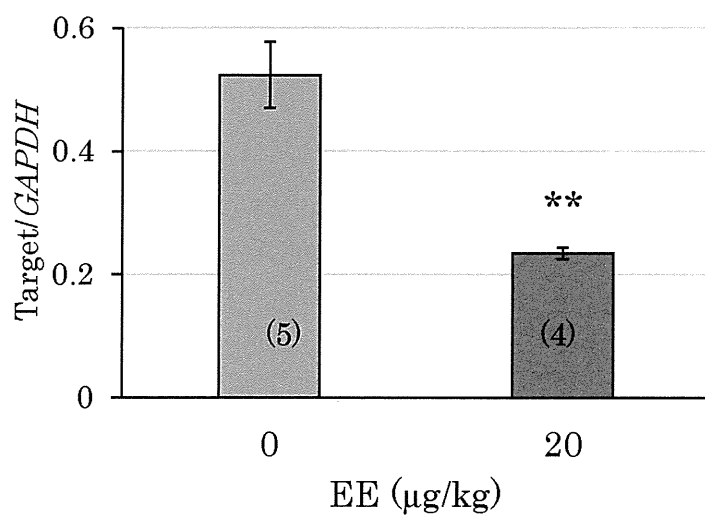


図 9

1 日齢に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 *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

A. *ERα* mRNA



B. *Kiss1* mRNA

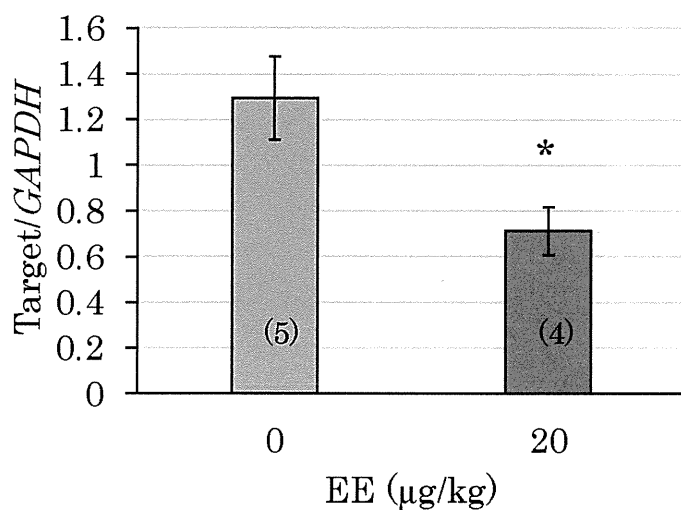


図 10

5日齢に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 *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))。

*または** $P < 0.05$ または 0.01

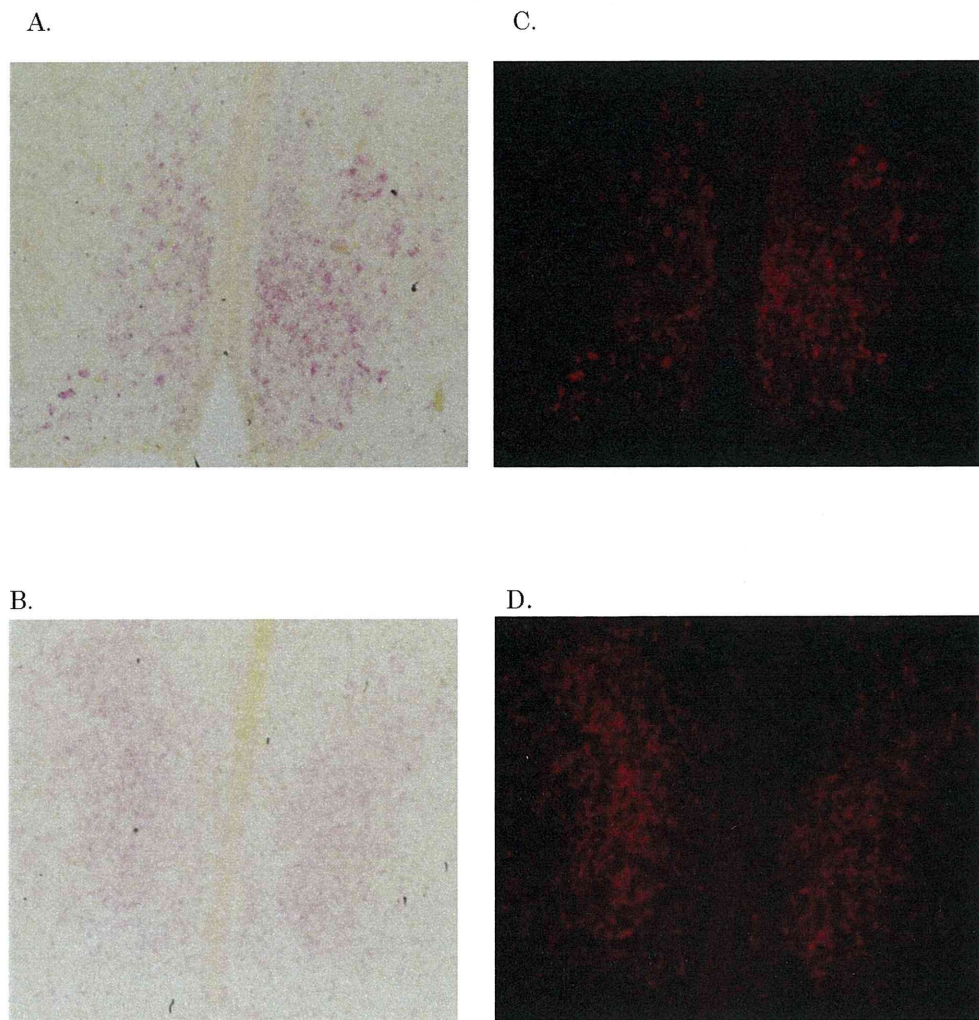
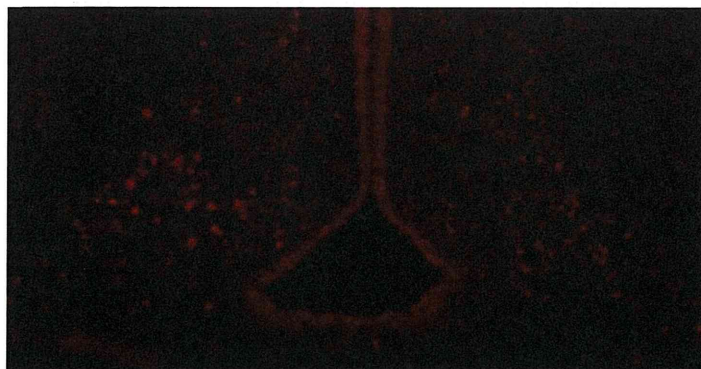


図 11

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6日齢雌ラットのAVPV領域における *ERα* mRNA の発現

コーン油を投与した対照群 (A および C) ならびに 2 μg/kg/day 投与群(B および D)の明視野 (A および B) および暗視野 (C および D) 像で、*ERα* mRNA は赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

A.



B.

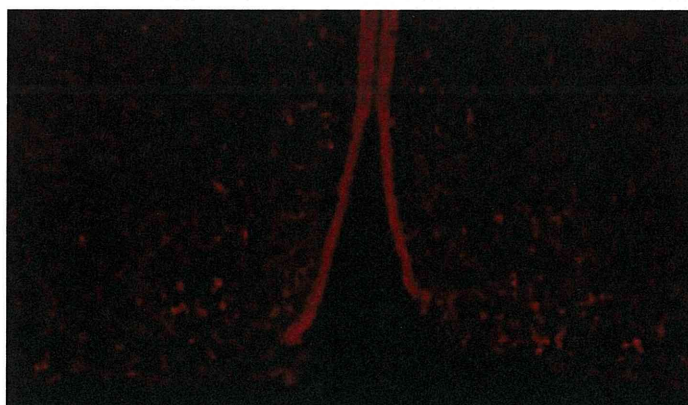


図 12

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 6 日齢雌ラットの ARC 領域における *ERα*mRNA の発現

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、*ERα* mRNA は赤色蛍光として認められる。

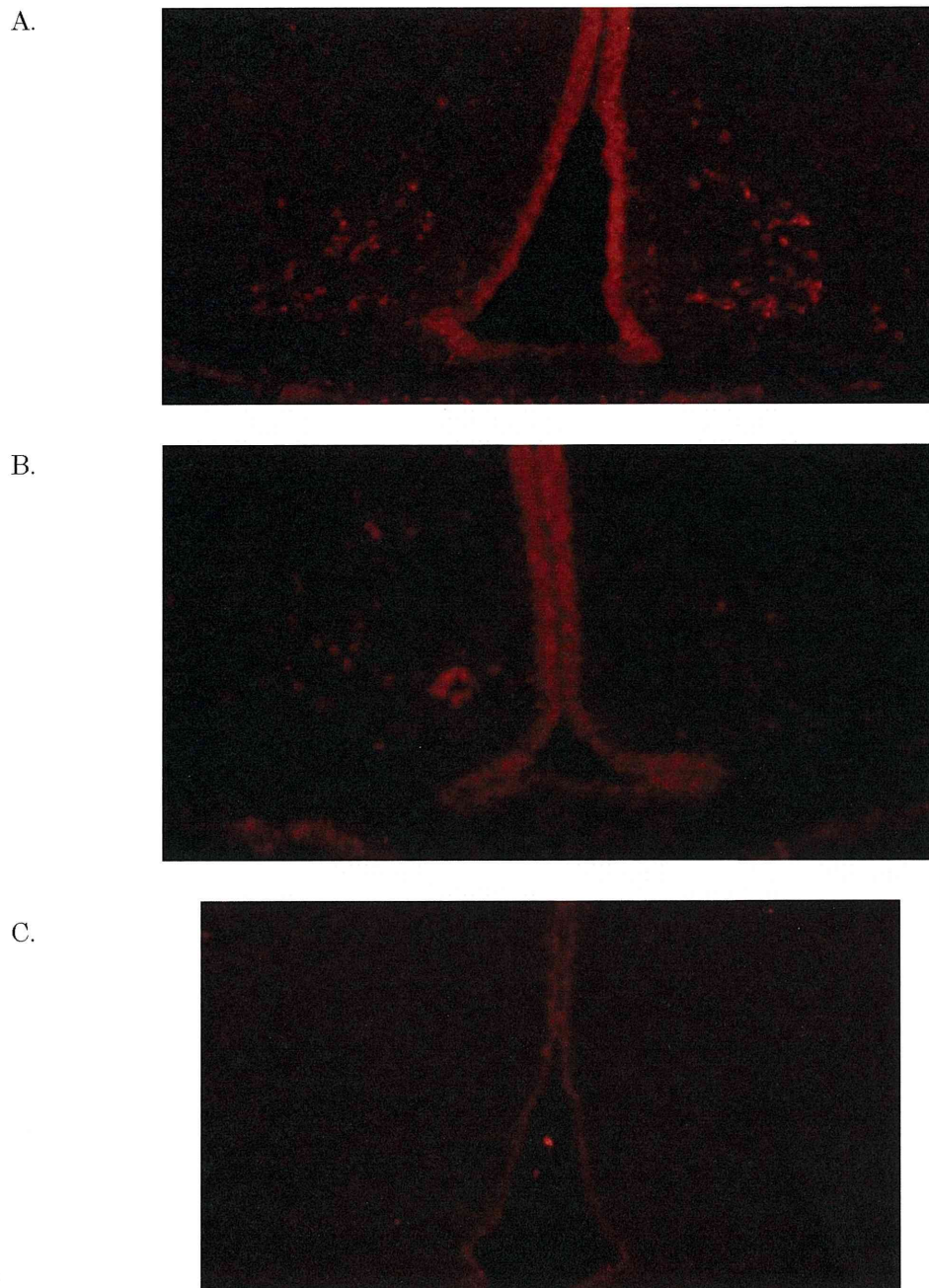


図 13

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* mRNA の発現
コーン油を投与した対照群 (A) ならびに 2 µg/kg/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。

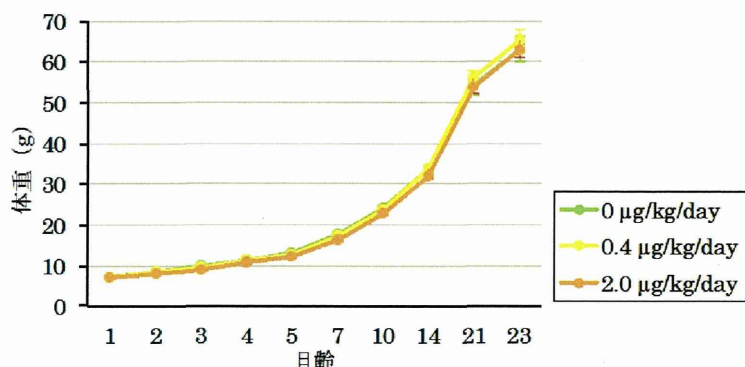


図 14
1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの23日齢までの体重推移

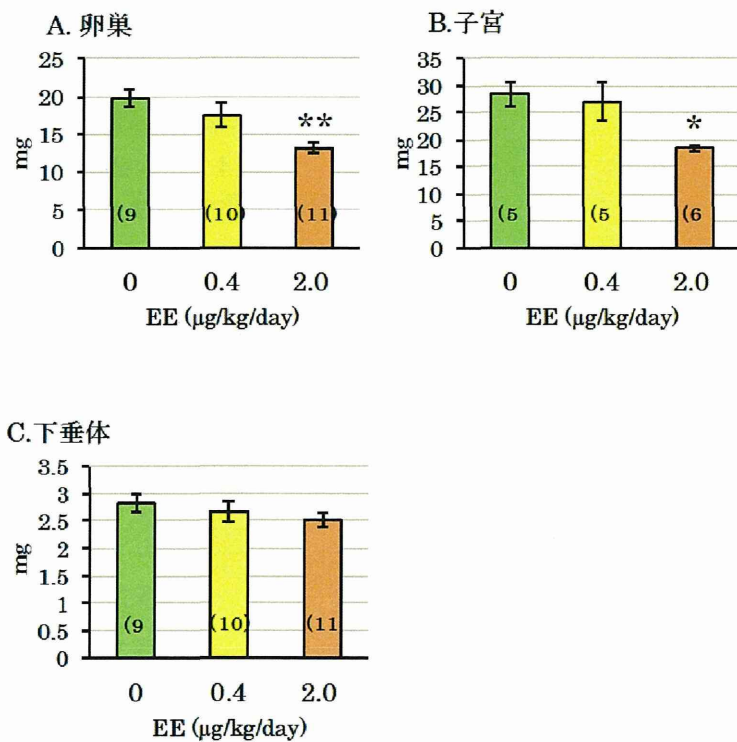


図 15
1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの23日齢における器官重量 (平均±標準誤差, N)。**p<0.01

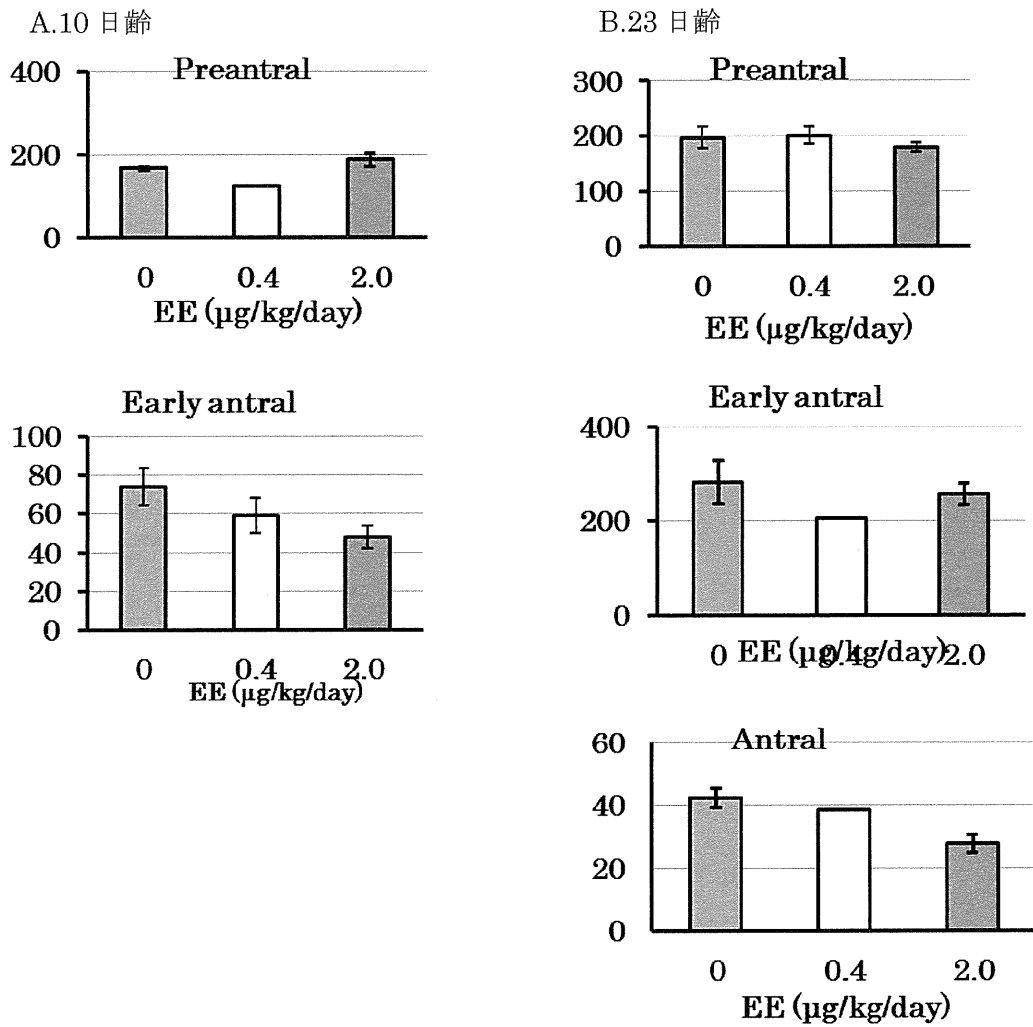


図 16
1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの雌ラットの
10日齢あるいは23日齢の卵巢で数えられた発育卵胞数(平均±標準誤差, N)。

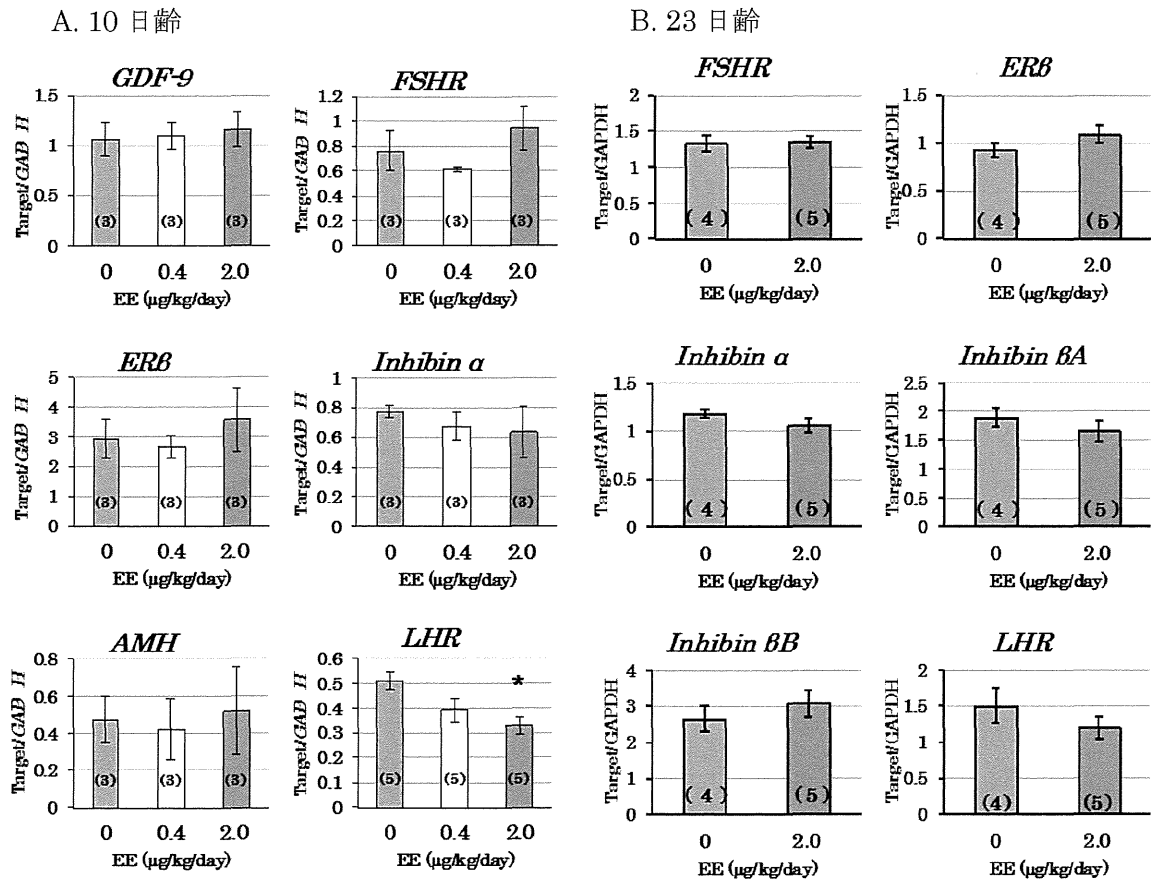


図 17

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雌ラットの 10 日齢 (A) あるいは 23 日齢 (B) の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (平均±標準誤差, N)。* $p < 0.05$

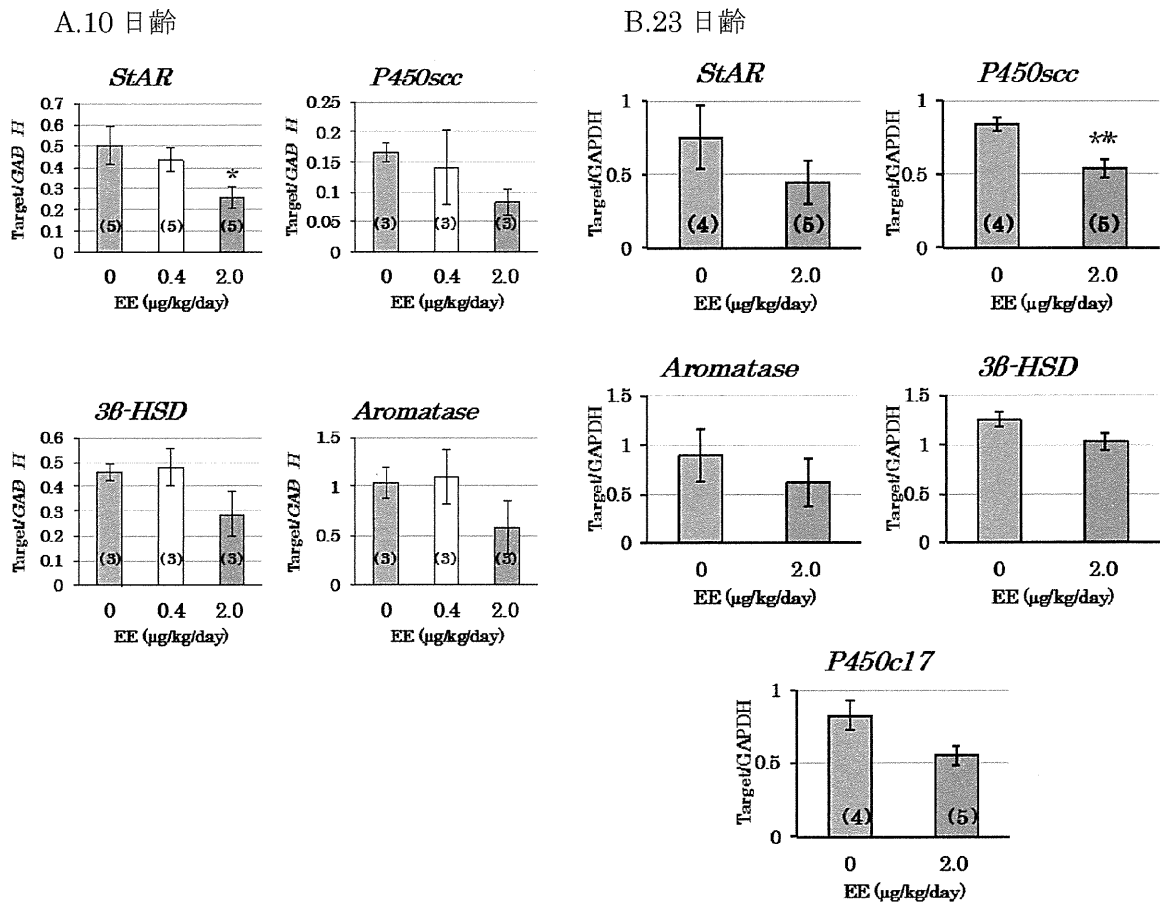
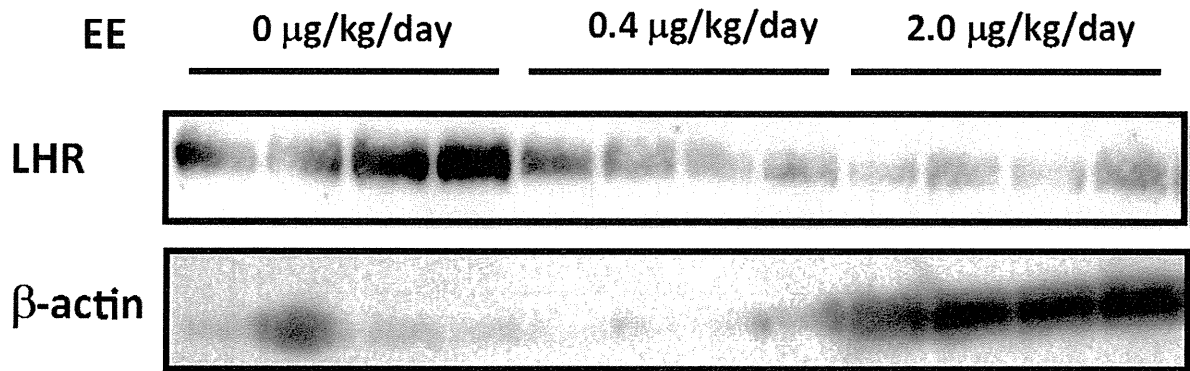


図 18

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雌ラットの10日齢(A)あるいは23日齢(B)の卵巣におけるステロイドホルモン合成関連遺伝子の発現(平均±標準誤差, N)。*または** $p < 0.05$ または 0.01

A. LHR と β -actin の Western blotting



B. LHR の β -actin に対する相対発現量 (平均 \pm 標準偏差)

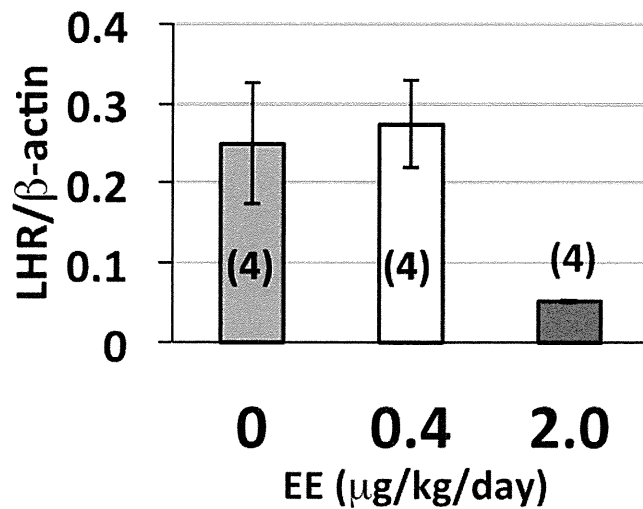


図 19

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雌ラットの23日齢卵巣における Luteinizing hormone (LH) 受容体タンパク質の発現

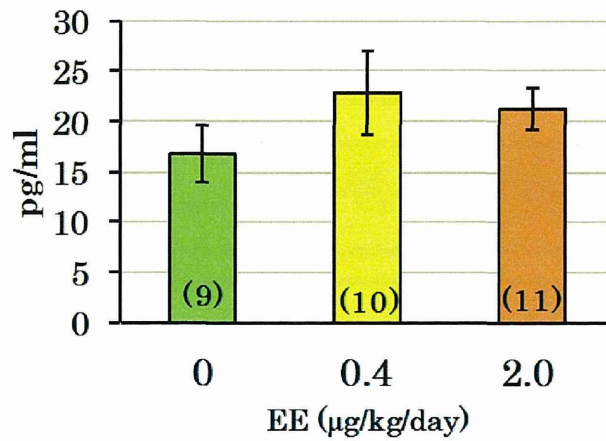


図 20

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23日齢における血清中エストロゲン濃度(平均±標準誤差, (N))

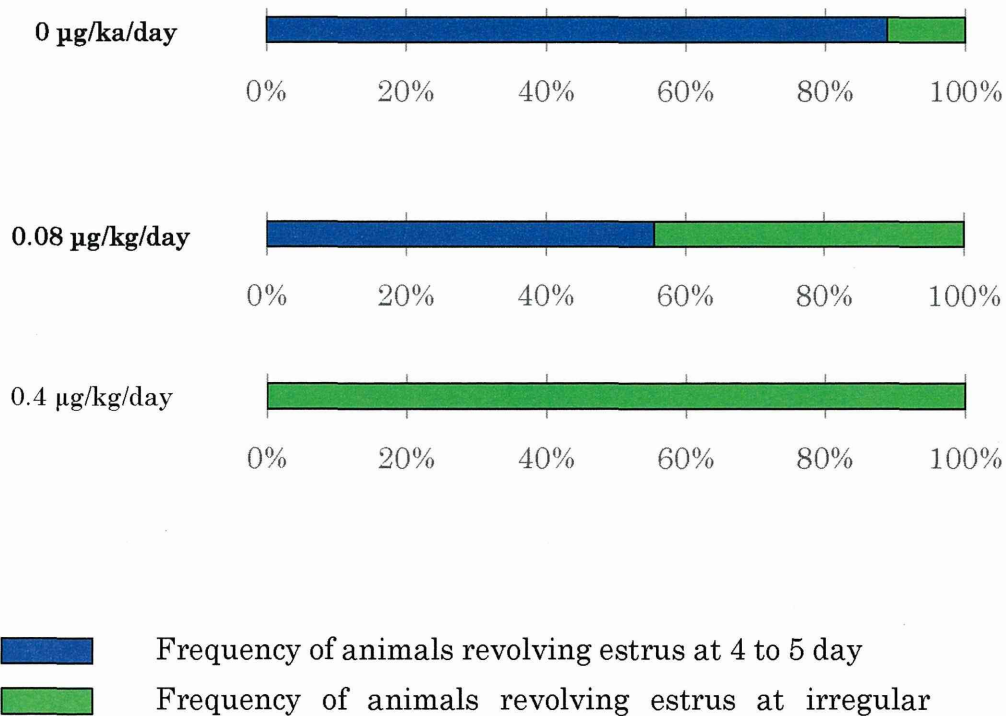


図 21 1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの8~9週齢の性周期

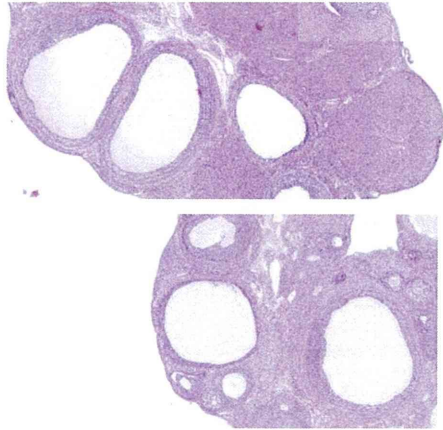
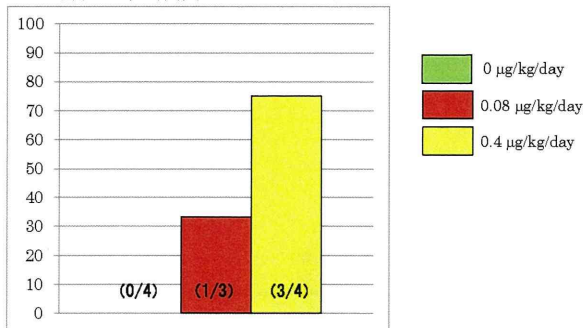


図 22

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卵巣にみられた囊胞状卵胞の代表的画像

A. 13 週齢における保有率



B. 10 週齢における保有率

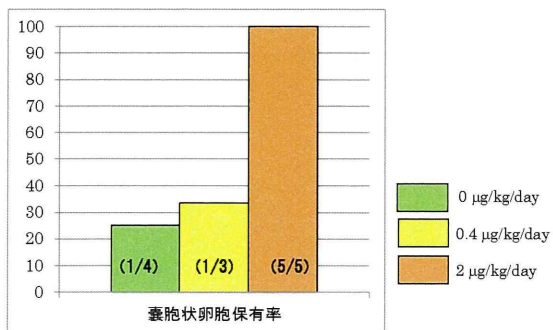


図 23

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 13 週齢の卵巣における囊胞状卵胞保有率

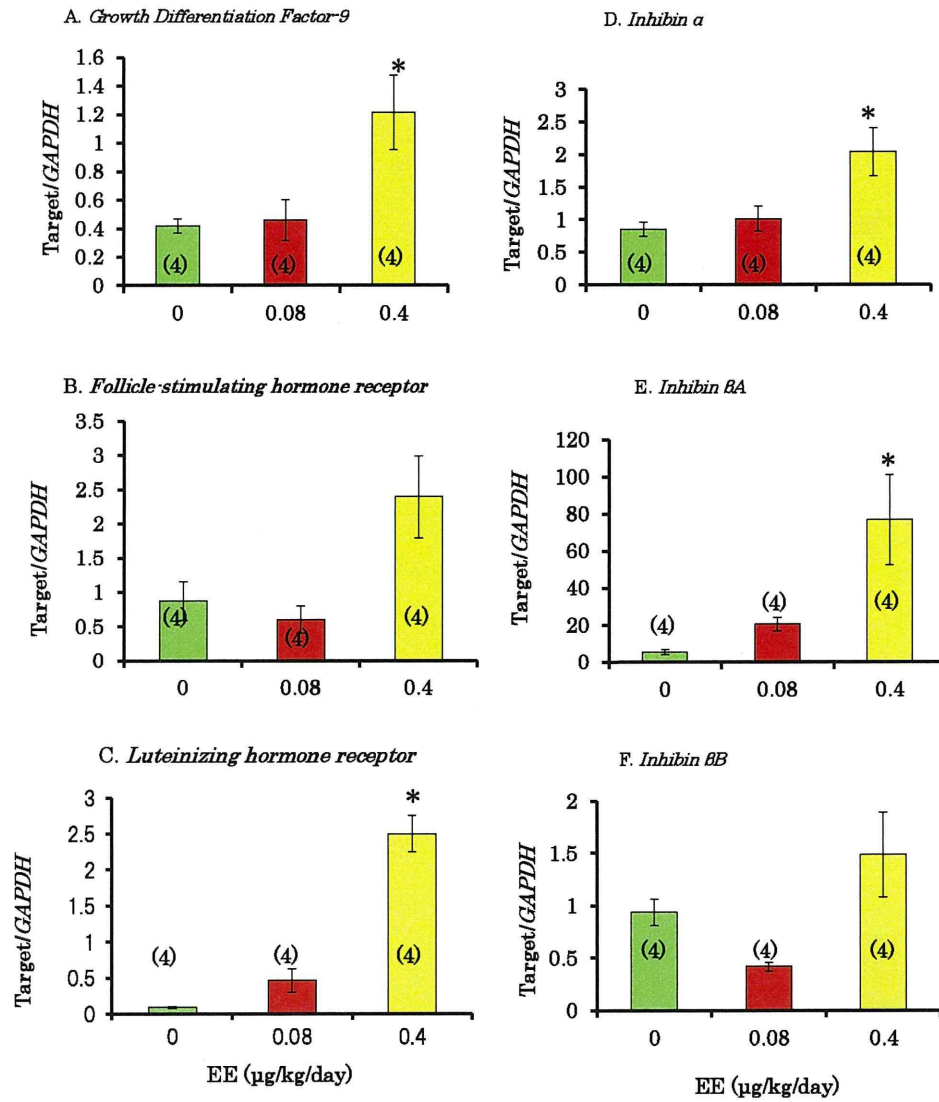
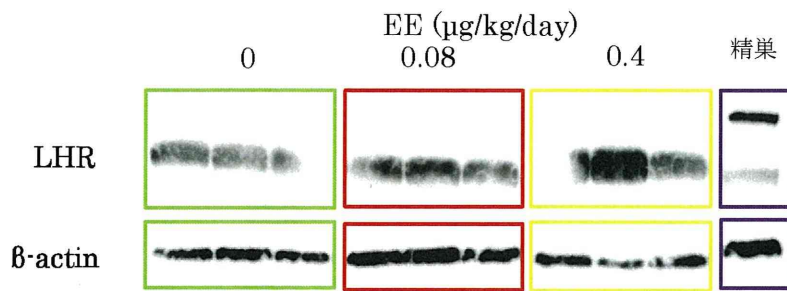


図 24 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオールの (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (平均±標準誤差, (N)). * $p < 0.05$

A. LHR と β -actin の Western blotting



B. LHR の β -actin に対する相対発現量(平均 \pm 標準誤差, (N))

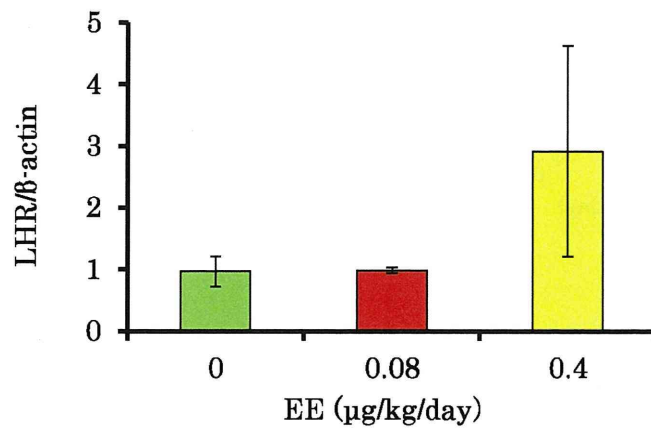


図 25 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における luteinizing hormone 受容体(LHR)タンパク質の発現

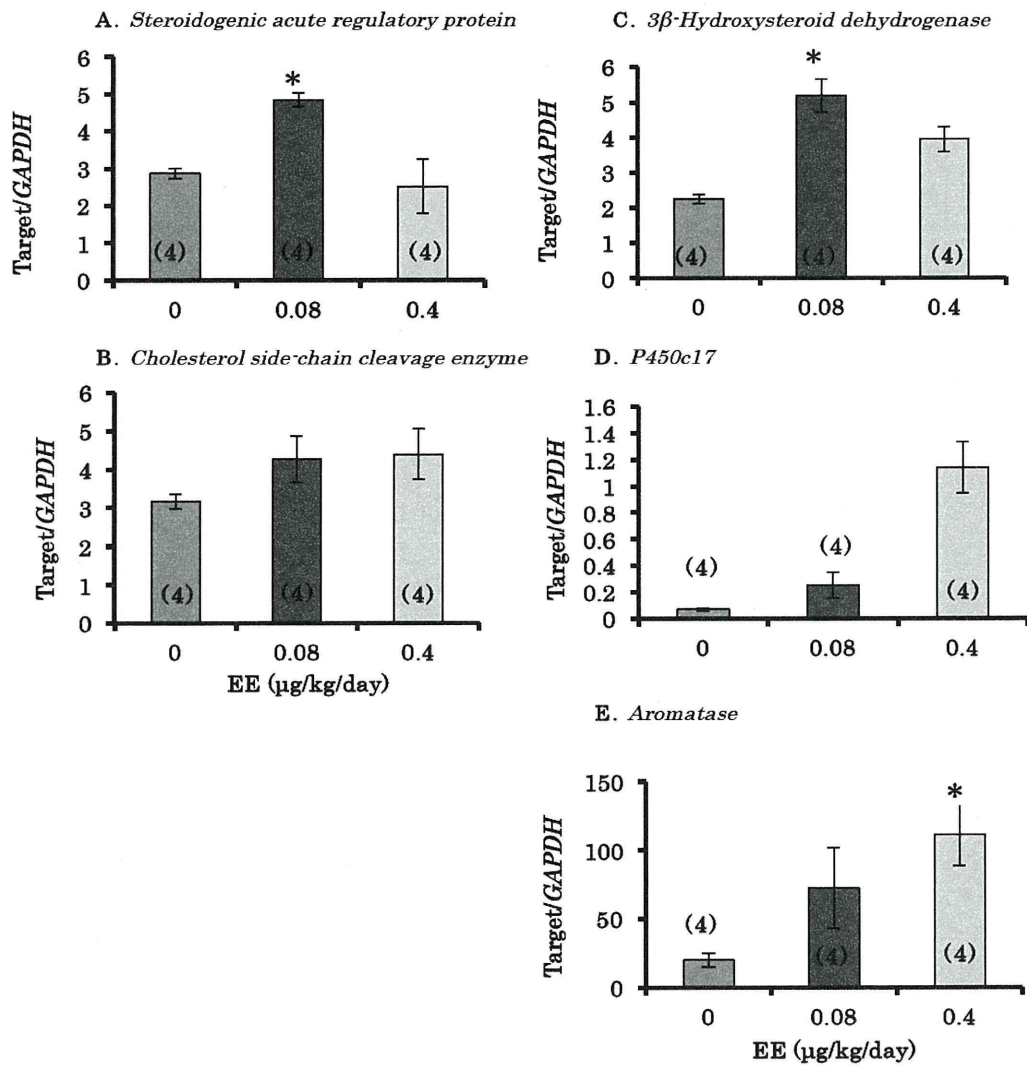


図 26

図 26
 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 13 週齢卵巣におけるステロイドホルモン合成関連遺伝子の発現 (平均±標準誤差, (N))。 * p<0.05

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



<i>Kiss1</i> expressing cells	1032	953	1838
Co-expression with <i>ERα</i>	433	616	552

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット (陰性対照)

Kiss1 ^{-/-}

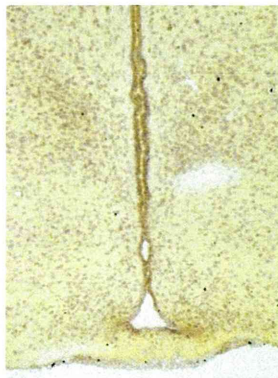
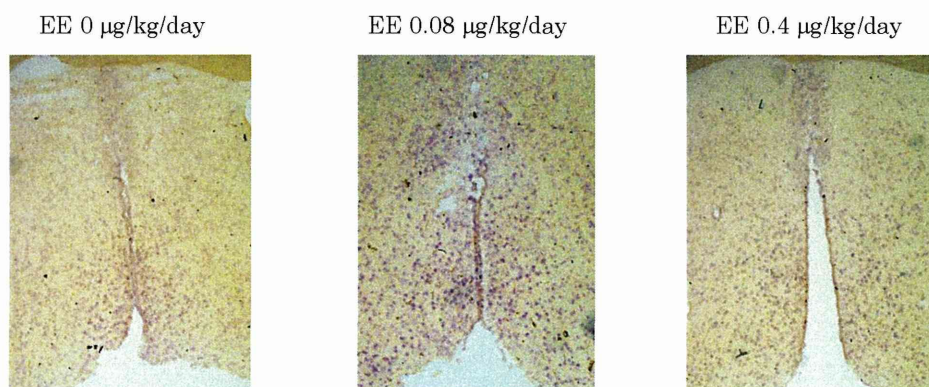


図 27 視床下部弓状核(ARC)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ERα*, 赤色顆粒)の double-labeled *in situ* hybridization

A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



	EE 0 μg/kg/day	EE 0.08 μg/kg/day	EE 0.4 μg/kg/day
<i>Kiss1</i> expressing cells	41	20	21
Co-expression with <i>ERα</i>	30	8	12

B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット
(*Kiss1* の陰性対照)

C. 成熟ラットの子宮 (*ERα* の陽性対照)

Kiss1 ^{-/-}

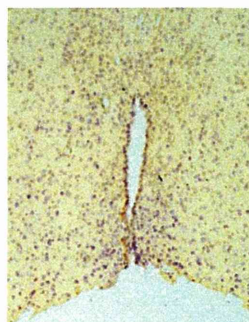


図 28 視床下部前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ERα*, 赤色顆粒) の double-labeled *in situ* hybridization

B は *Kiss1* の陰性対照, C は *ERα* の陽性対照

EE
($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$)

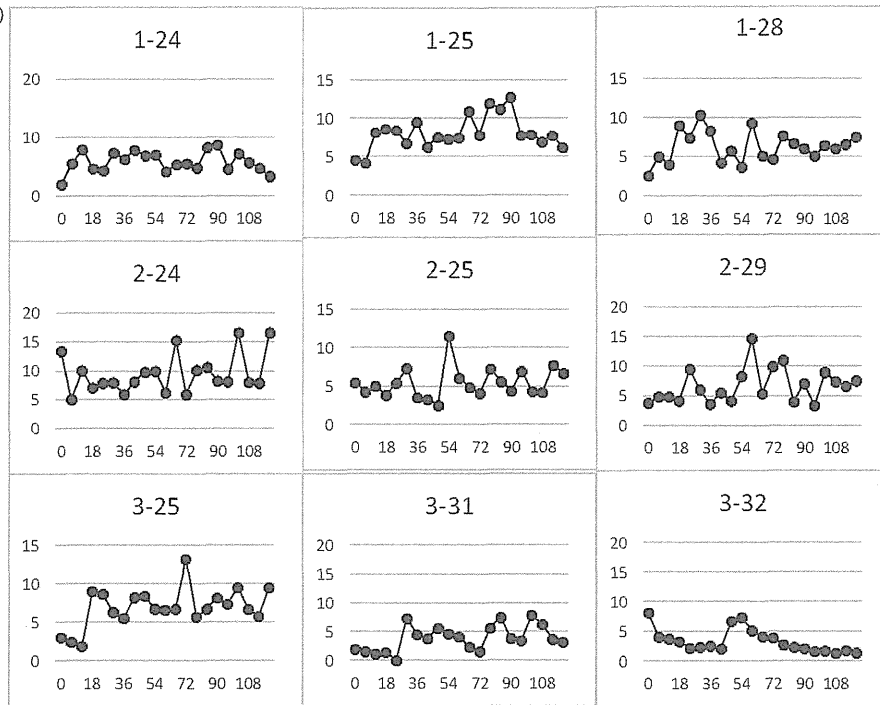


表1 リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ

ターゲット	Accession No.			配列 (5'→3')
<u>Receptors</u>				
<i>Estrogen α receptor (ERα)</i>	NM 012689	プライマー	F	GAAAGGCGGGATACGAAAAGA
			R	TCTGACGCTTGTGCTTCAACA
<i>Estrogen β receptor (ERβ)</i>	NM 012754	プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
		プローブ		CGCCGAGGAGGGAG
<i>Luteinizing hormone receptor (LHR)</i>	NM 012978	プライマー	F	CCGTCAGGGTGTAGACAGAGAGT
			R	CGGTGCAGCTGGCTTCTT CACTGGCAAACACAG
<i>Kisspeptin receptor (GPR54)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00576940_m1)			
<i>Opioid receptor, kappa 1 (Oprk1)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan system (Rn01448892_m1)			
<i>Tachykinin receptor 3 (tac3)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan system (Rn00566955_m1)			
<u>Steroidogenic factors</u>				
<i>Steroidogenic acute regulatory protein (StAR)</i>	NM 031558	プライマー	F	GGCATGGCCACACACTTTG
			R	AGTGGATGAAGCACCATGCA
<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)</i>	J 05156	プライマー	F	TCCCAGCGTTTCATCGA
		プローブ		GAAATAAGTCTGGAGGCATGTTGA CCGTCTACCAGATGTT
<i>Steroid 17α-hydroxylase (P450c17)</i>	NM 012753	プライマー	F	TGGCTTTGGTGGTGACAATC
		プローブ	R	TGAAAGTTGGTGTTCGGCTGAAG ATCCAAAAGGAGATTGACCA
<i>Aromatase</i>	M 33986	プライマー	F	GAAACGGTCCGCCCTTTCT
		プローブ	R	TGGATTCCACACAGACTTCTACCA ATGAAAGCTCTGACGGGC
<i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)</i>	L 17138	プライマー	F	AAGTATGCAATGTGCCACCATTT
		プローブ	R	GCAAAAAGATGGCCGAGAA CATTGGCTGCCAGCAC
<u>Growth factors, hormones and neurotransmitters</u>				
<i>Growth differentiation factor (GDF)-9</i>	AF 099912	プライマー	F	AGCTCAAATGGGACAACCTGGAT
		プローブ	R	GGGACAGTCCCCTTTACAGTACCT CCCCGCACAGATAC
<i>Inhibin/activin βA</i>	M 37482	プライマー	F	CCCAGAGGTGCTGCTATGT
		プローブ	R	CATTGCTCCCTCTGGCTATCA CTTGGGCACTCACCTCACAATAGTTGG
<i>Inhibin/activin βB</i>	NM 080771	プライマー	F	CCCTGGGCCGGTGAA
		プローブ	R	CGTCATCAAAGTAGAGCATAGACATAGA TTGCTGCATCCCCACCAAGCTGAG
<i>Anti Mullerian Hormone</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System(Rn00563731_g1)			
<i>Kisspeptin (Kiss1)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00710914_m1)			
<i>Prodynorphin (Pdyn)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00571351_m1)			
<i>Neurokinin B (tac3)</i>	Designed primers and probe for use on TaqMan System (Rn00569758_m1)			

表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眼瞼開裂日齢および体重(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
N	7	8	8	8
眼瞼開裂(日齢)	13.1 ± 0.3	13.5 ± 0.3	13.3 ± 0.3	13.3 ± 0.3
体重(g)	34.0 ± 1.8	34.9 ± 2.6	35.2 ± 1.4	35.4 ± 1.8
膣開口(日齢)	34.3 ± 0.7	33.6 ± 0.8	34.0 ± 0.6	33.4 ± 0.4
体重(g)	149 ± 4.8	140 ± 5.0	142 ± 4.0	140 ± 3.2

^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を反復経口投与した雌ラットの27-28週齢における器官重量(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
N	3	4	4	4
体重(g)	429 ± 18	404 ± 12	416 ± 21	379 ± 19
下垂体(mg)	22.9 ± 4.5	18.0 ± 1.8	17.8 ± 1.4	18.7 ± 0.8
卵巣(mg)	69.8 ± 4.0	84.3 ± 7.1	106 ± 7.0*	83.7 ± 9.6
子宮(mg)	789 ± 69	464 ± 130	705 ± 42	678 ± 59
肝臓(g)	12.8 ± 1.4	11.5 ± 0.7	12.3 ± 1.2	11.5 ± 0.8
副腎(mg)	78.5 ± 9.1	70.7 ± 2.9	65.7 ± 4.6	74.1 ± 4.9

^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を反復経口投与した雌ラットの27-28週齢における排卵率および卵巣所見

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.016	0.08
排卵率	3/7	6/8	3/8	4/8
嚢胞状卵胞保有率	2/7	2/8	2/8	6/8*
黄体形成率	7/7	7/8	6/8	8/8

^a corn oil 10 mL/kg/day

*p<0.05

表5 エチニルエストラジオールの幼若雌ラットを用いる子宮肥大試験成績(平均±標準誤差)

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.0032	0.08	2
N	5	4	5	5
剖検時体重(g)	59.0 ± 0.4	58.8 ± 0.5	59.6 ± 1.3	57.0 ± 1.6
卵巣重量(mg)	17.2 ± 0.5	14.4 ± 0.9	14.9 ± 0.8	12.7 ± 1.0**
Blotted 子宮重量(mg)	29.4 ± 2.3	27.2 ± 2.7	24.3 ± 3.1	70.7 ± 4.7**

^a corn oil 10 mL/kg/day

**p<0.01