

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 (H25-27 総合研究報告書)

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： 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：	川嶋	潤	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：	森	雅史	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高川	奈帆	麻布大学獣医学部
研究協力者：	高山	尚大	麻布大学獣医学部
研究協力者：	林	美貴成	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

合成エストロゲン(17 α -ethinylestradiol, EE)をモデル化合物として、脳の性分化臨界期におけるエストロゲン活性物質曝露により生じる遅発影響について閾値となる用量を 27~28 週齢まで探索し、さらに遅発影響の最小影響量検出における評価手法の有効性を検討したところ、1 日齢から EE の 5 日間反復経口投与による遅発影響の最小影響量は卵巣の嚢胞状卵胞保有率を増加させる 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ (無影響量 0.016 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) であり、子宮肥大試験では陰性の用量であった。また、この用量を投与した動物を 10 週齢で雄と交配して帝王切開しても、妊娠末期母体重の増加抑制および胎児の発育促進以外に影響は認められず、現行の評価法が遅発影響評価に必ずしも有効ではないことが示唆された。

視床下部におけるキスペプチン(KP)パルス発生部位である弓状核(ARC)を中心に、KP をコードする *Kiss1* 発現と遅発影響との関係を、新生期から検討したところ、無影響量の EE でも新生期 ARC の *Kiss1* mRNA を低下させ、性周期回帰停止を促進する用量ではプラトーに達していることが明らかになった。視床下部 *ER α* mRNA も低下したが性周期早期回帰停止との明確な関係はなかった。10 および 23 日齢では最も発育の進んだ段階の卵胞数が減少し、LH 受容体の発現低下ならびにその下流のステロイドホルモン合成系遺伝子の発現低下が認められたが、血中 E_2 濃度に反映されていなかった。性周期回帰停止前では、これらの遺伝子発現に増加傾向が認められた一方、KP ニューロンは卵巣ホルモンによるフィードバックの減弱を示唆していた。以上の結果から、EE は ARC の *Kiss1* 発現を低下させ、性腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌を変化させて卵胞発育を抑制し、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として用いられている 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てきた。平成 22 年から 24 年度までの研究では、EE の用量あるいは投与日齢と遅発影響との関係を詳細に検討し、EE 投与は原始卵胞の消長に影響を及ぼさないが、性周期の回帰停止をはじめとする遅発影響が出現するまでの期間は EE の用量に逆比例し、成熟雌ラットではエストロゲンの生理的変動幅に相当すると考えられる血中 EE 濃度で、春機発動の遅延が認められ、さら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、性成熟後の性周期回帰停止の促進あるいは乳腺の過形成などの不可逆的な影響が認められることを明らかにした。また、遅発影響の出現時期は EE の用量だけでなく、投与日齢によっても変動し、1 日齢での曝露が 5 あるいは 7 日齢での曝露より早期に遅発影響を出現させることを示した。

本研究では、これまでの研究に基づき、まず、リスク評価に資することを目的として遅発影響の閾値を探索し、さらに現行の評価方法(子宮肥大試験ならびに生殖能力試験)で、遅発影響を検出し得るのかどうかを、最小影響量について検討した(実験 1)。また、EE 投与による遅発影響は視床下部/下垂体/卵巣軸の異常を反映した変化であると考えられることから、投与直後の初発変化を知るために EE が結合して標的遺伝子の発現を制御する *ERα* 遺伝子の視床下部における発現ならびに性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)分泌を上位から直接制御している KP の ARC における遺伝子発現の変化を調べ、さらに KP 受容体の *GPR54*、ならびに *Kndy* ニューロンに局在して KP 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変化を検討した(実験 2)。次いで、視床下部/下垂体/卵巣軸の成立前後の時期

である幼若期について、特に日齢の進行に伴い発育の進んだ卵胞が認められるようになる卵巣の形態および機能の変化を検討した(実験 3)。さらに、春機発動後、性周期の回帰停止前の時期について、視床下部および卵巣の変化を検討するとともに、ARC の *Kndy* ニューロンにより駆動される KP パルスを反映した LH パルス状分泌の変化を検討した(実験 4)。このように本研究では平成 24 年度までに蓄積した EE 曝露と遅発影響との関係に関する知見に基づき、EE 曝露直後から遅発影響出現に至るまでの間の視床下部下垂体卵巣軸の発達を俯瞰して、遅発影響出現のメカニズムを考察した。

B. 研究方法

1. 被験物質の調製

EE (Sigma-Aldrich、純度 98%以上、分子量 296.4) 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

Kiss1 遺伝子の *in situ* hybridization における陰性対照として用いた *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット(*Kiss1*^{-/-})を除き、いずれの実験も日本チャールスリバー株式会社(横浜)より購入した Sprague-Dawley 系ラットを用いた。子宮肥大試験では養母と共に生後 15 日で購入した雌ラットを、生後 21 日に離乳して用いた。その他の実験では、妊娠雌ラット(Crl:CD(SD))あるいは成熟雄ラット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産児を用いた。EE を投与する産児は出生日を 0 日齢とし、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、必要に応じて雄出生児を加えて同腹生児数を 8 匹とした。実

験 1 では上記のほか投与動物を交配試験に供するために、別途購入した成熟雄ラットを用いた。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を用いた。

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。

3. 投与方法

いずれの実験も経口投与した。新生期の経口投与では 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、経口投与した。いずれの実験も対照群にはコーン油 (和光純薬) を 10 mL/kg/day 経口投与した。

4. 投与量

(1) 閾値の探索 (実験 1)

0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 以上の用量で不可逆的影響が認められていることから、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を最高用量に設定し、以下公比 5 で除して、0.016 および 0.0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(2) 子宮肥大試験 (実験 1)

OECD 子宮肥大試験 Phase1 において経口経路でエストロゲン活性が認められ、先行研究において明瞭な遅発影響が認められた 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を最高用量とし、以下公比 25 で除して 0.08 および 0.0032 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を、22 日齢から 3 日間反復投与した。

(3) 生殖能力試験 (実験 1)

閾値の探索で最小影響量と判断された 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(4) 初発影響の検討 (実験 2)

若齢で性周期の回帰が停止する 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 、ならびに性成熟後早期に性周期の回帰が停止する 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。また、さらに低用量での初発影響を調べるために、0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ および 0.016

$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。単回投与後の影響を知るために、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 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ あるいは単回皮下投与で遅発影響を誘発することが確認されている 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 1 日齢に、また 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を 5 日齢に単回投与した。

(5) 幼若期の卵胞発育に及ぼす影響の検討 (実験 3)

初回排卵に遅延が認められる 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ および性成熟後比較的早期に性周期の回帰を停止する 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を 1 日齢から 5 日間反復投与した。

(6) 性周期回帰停止前の時期における視床下部 / 下垂体 / 性腺軸の変化 (実験 4)

視床下部および卵巣の変化は、春機発動後に性周期を回帰した後に連続発情となる 0.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を高用量とし 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ も設定した (実験 4-1)。パルス状 LH 分泌の変化の検討は先行研究において 8 週齢で既に異常な性周期を示す動物が増加し、初回排卵に遅延が認められている 0.4 あるいは 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を設定した (実験 4-2)。

5. 観察方法

(1) 閾値の探索 (実験 1)

投与前後に一般状態を観察し、21 日齢に離乳して 26-27 週齢まで実験に供した。その間、以下に示す観察および測定を行った。

(ア) 体重

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、剖検日にも体重を測定した。

(イ) 眼瞼開裂の観察

12 日齢から毎日眼瞼開裂の有無を観察し、両側の眼瞼が開裂した日を眼瞼開裂日として体重を測定した。

(ウ) 腔開口の観察

4 週齢から毎日腔開口の有無を観察し、腔の開口が認められた動物は体重を測定した。

(エ) 性周期の観察

8 週齢から 4 週間に 1 回、2 週間にわたり、毎日腔垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期の観察は 25 週齢まで継続し、2 週間の観察期間中に 4-5 日で発情を

回復したものを正常周期に、また、連続した発情休止期が全く観察されなかったものを、連続発情に分類し、発情休止期が14日以上継続したものを無発情に、これら以外をその他に分類した。また、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。

(オ) 剖検

性周期の観察を上記の観察期間終了後も継続し、発情期あるいは発情休止期に剖検した。

剖検に際して、まず動物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)を腹腔内投与(1 mL/kg)し、深麻酔下で採血を行い、その後放血致死させた。剖検では脳、下垂体、卵巣、肝臓、副腎、子宮、乳腺、膣を採取し、一部の動物について下垂体、卵巣、肝臓、副腎および子宮の重量を測定した。また、全例について卵管を採取し、排卵検査を行った。重量測定後、卵巣は、リン酸緩衝ホルマリン液、4%パラホルムアルデヒド(PFA)あるいはブアンでの固定もしくは液体窒素を用いた急速凍結を行い、-50℃で保存した。

(カ) 卵巣組織の観察

固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 μmの厚さで薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定はAcuña [Acuña,2009]に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莖膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

(2) 子宮肥大試験(実験1)

(ア) 投与期間中の観察

一般状態を観察し、膣開口の有無を観察した。体重は投与開始日から剖検日まで毎日測定した。

(イ) 剖検

最終投与24時間後の25日齢に剖検を行った。剖検では、まず動物にペントバルビタールナトリウム溶液(ソムノペンチル)を腹腔内投与し、深麻酔下で採血を行い、放血と殺した。卵巣および子宮を膣とともに摘出し、実体顕微鏡下で脂肪を除去した後、膣を子宮頸の外子宮口の位置で切り離した。子宮重量は、子宮内液を含んだ状態でまず

測定し(wet weight)、次に子宮壁の一部を切開し、子宮内液をガーゼで吸い取った後、再度重量を測定した(blotted weight)。また両側卵巣の重量を測定した。

(3) 生殖能力試験(実験1)

(ア) 一般状態、身体的発達の観察および体重測定

投与前後に一般状態を観察し、身体的発達の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た。体重は、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。

(イ) 性周期観察および交配

8週齢から2週間、毎日膣垢を採取して性周期を観察し、上記(1)-エ)に示したように分類し、集計した。10週齢から生殖能力の確認されている雄と交配し、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。

(ウ) 帝王切開

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。

(エ) 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。

(4) 初発影響の検討(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、*Kiss1* KO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 RNeasy Lysis 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%PFA で還流し、脳を採取した。採取した脳はさらに 4%PFA に浸漬し、冷蔵庫内で一晚固定した。

(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

RNeasy Lysis Solution 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) および細胞破砕装置用ビーズ (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砕装置 MS-100R (トミー精工、東京) によって 4000 rpm、4 分で 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) 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 $^{\circ}$ C 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) を添加して攪拌し、12,000 \times g、4 分で 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% エタノールを添加して沈殿物を洗浄し、7,500 \times g、4 分で 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) を添加した。これを 60 分で 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 μ g/mL に調製し、-80 $^{\circ}$ C 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 $^{\circledR}$ 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 $^{\text{TM}}$ 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、ER α 、ER β 、Kiss1、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。使用したプロローブおよびプライマーを表 1 に示す。

ARC および AVPA 領域の確認

ブレインマトリックス (Colonal, ASI INSTRUMENTS) を用いて、4%PFA で固定した 6 日齢無処置雌ラット脳から視床下部と中脳の境界から吻側方向に向かって 6 mm 幅の領域を冠状断に切り出した。これを常法に従いパラフィン包埋し、10 μ m 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 [Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6 $^{\text{th}}$ ed., Elsevier] を参照して、6 日齢雌における ARC が視床下部の尾側 (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 が約 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* の *in situ* hybridization

まず、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 *in situ* hybridization で確認した(図に示さず)。確認の結果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 *in situ* hybridization に供した。*In situ* hybridization 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 in situ* hybridization 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*^{-/-} 雌の脳組織標本を用いた。

視床下部ARCおよびAVPV領域における *ER α* の *in situ* hybridization

上記と同じ条件で pretreatment および protease 処理を行い、*ER α* の *in situ* hybridization 用に設計されたプローブとのハイブリダイゼーションを40で150分間行った。

(5) EE 新生期曝露動物の幼若期卵胞発育(実験3)

(ア) 卵巣の採取

卵巣が受容体を介して性腺刺激ホルモンへの感受性を獲得している10日齢にEE投与動物の一部の動物を剖検して卵巣を採取した。残りの動物は21日齢に離乳後、視床下部-下垂体-性腺軸の発達が進み、外来性の性腺刺激ホルモンに反応し自然排卵することが可能となる23日齢に剖検して卵巣を採取した。

10日齢では低温麻酔下で断頭屠殺し、実体顕微鏡下で卵巣を採取した。23日齢ではペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル)の腹腔内投与による深麻酔下で腹大動脈から採血した後に放血致死させ、卵巣および子宮、下垂体を採取し重量を測定した。

採取した卵巣の片側は形態学的解析のために Bouin 液、リン酸緩衝ホルマリン液または4%PFAで固定した後、常法に従ってパラフィン包埋した。対側の卵巣は遺伝子発現解析のために、10日齢では RNA later (Life

Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) 中で保存し実体顕微鏡下でトリミングした後液体窒素中で急速凍結し、23日齢では液体窒素中で急速凍結し、いずれも-80で保存した。

23日齢に採取した子宮および下垂体はリン酸緩衝ホルマリン液で固定した。採取した血液は氷上に静置後、4、3,000 rpmで15分間遠心分離して血清を得た。得られた血清はホルモン測定のために-50で保存した。

(イ) 発育卵胞数の計測

EE投与の卵胞発育に及ぼす影響を知るために、Bouin 固定してパラフィン包埋した卵巣を6 μm 厚の連続切片とし、HE染色を行って発育卵胞数を計測した。計測はすべての切片を対象とし、光学顕微鏡下で観察して卵母細胞の核小体が明瞭に確認できた卵胞を、preantral、early antralならびにantralに分類しそれぞれの数を計測した。各発育段階の卵胞は、Pedersen & Petersによる分類[Pedersen T and Peters H, 1968]でそれぞれ type 4-5b、type 6 および type 7に相当する。各発育段階の卵胞の代表例を図1に示す。

(ウ) Total RNA の抽出

凍結卵巣からの抽出は、細胞破碎装置用ビーズに「ステンレス ϕ 3.2」を用いた他は、前記(4)-ウ) に記した方法で行った。なお、10日齢サンプルについては3個体分の卵巣を1サンプルとした。

(エ) Real-time RT-PCR

前記(4)-ウ) に記した方法で行った。定量解析の対象には幼若期の卵巣を構成する組織に特異的に発現する卵胞発育関連因子をコードする遺伝子、ならびにステロイドホルモン合成を担うタンパク質をコードする遺伝子を選択した。すなわち、卵母細胞に発現する GDF-9、顆粒層細胞に発現する FSH 受容体 (FSHR)、ER β 、インヒビンの各サブユニット (Inhibin α 、 β A、 β B)、ミューラー管抑制ホルモン (AMH) ならびに莢膜細胞に発現する LH 受容体 (LHR) を選択した。またステロイドホルモン合成経路では莢膜細胞でのミトコンドリアへのコレステロールの取り込みを促進する steroidogenic acute regulatory protein (StAR)、ミトコンドリアでコレステロールからプレグネノロンの生成を行う cholesterol

side-chain cleavage enzyme (P450_{scc})、さらに細胞質でプレグネノロンを基質としてテストステロンを生成する酵素である3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD)およびP450_{c17}、ならびに顆粒層細胞でテストステロンを基質として17 β -estradiol (E₂)を生成するaromataseをコードする各mRNAを定量した。使用したプローブおよびプライマーを表1に示す。

(オ) LHR タンパクの定量解析

タンパク質の抽出

凍結した23日齢の卵巣からRIPAバッファ- (0.1% SDS、1% Trion X-100 / Tris-HCl pH8.0)を用いてタンパク質を抽出した。組織重量1gあたり10mLのRIPAバッファ-を加え、RNA抽出時と同様にビーズ式細胞破碎装置によりホモジナイズした。ホモジナイズ後、Benzonase (Novagen, Madison, WI, USA)を1 μ L加え、氷上で15分間インキュベートした。その後15,000g、4℃で15分間遠心分離し、上清を回収しサンプルとなるタンパク溶液を得た。各サンプルのタンパク溶液はDC Protein Assay (Bio Rad, Hercules, CA, USA)によりタンパク濃度を測定した。

Western Blotting

タンパク質10 μ g分のサンプルに水を加えて5 μ Lに合わせ、2 \times サンプルバッファ-を5 μ L加え100℃で5分間インキュベートした。その後、サンプル溶液の全量をポリアクリルアミドゲル(e-PAGEL、アトー、東京)にアプライし、ミニスラブ電気泳動装置(AE-6530P、アトー、東京)を用いて20mAで80分間電気泳動した。電気泳動後、セミドライ式プロットング装置(WSE-4020、アトー、東京)を用いて152mAで30分間通電し、PVDFメンブレン(WSE-4051、アトー、東京)にプロットングした。プロットング終了後、メンブレンを0.1% Tween 20入り3%スキムミルクにより室温で30分間ブロッキングした。一次抗体にはanti-LHR(sc-25828, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)およびanti- β -actin(#4967, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)をそれぞれ1:1000に希釈して用い、4℃で一晩インキュベートした。メンブレンを3%スキムミルク入りPBSで洗浄した後、二次抗体にDako

EnVision⁺ System-HRP Labelled Polymer(Dako, Glostrup, Denmark)を1:2000に希釈して用い、室温で1時間インキュベートした。メンブレンを0.1% Tween 20入りPBSで洗浄し、Liminata Forte Western HRP Substrate (Millipore, Billerica, MA, USA)と室温で5分間反応させた後、ImageQuant LAS 4000 (GEヘルスケアジャパン、東京)により撮影した。撮影した画像は、バンドの発光強度を画像解析ソフトであるImageJにより測定しタンパク質の発現を定量した。LHRの発現量を β -actinの発現量により補正した、相対発現量により比較を行った。

(カ) 血清中 E₂ 濃度測定

田谷らの方法[田谷ら、1985]に従い、23日齢の血清中 E₂ 濃度をラジオイムノアッセイ(RIA)により測定した。RIAの一次抗体にはG. D. Niswender博士(Colorado State University)から供与された抗 E₂ 血清(GDN#244)を用いた。また、標識ホルモンには¹²⁵I標識 E₂(GEヘルスケアジャパン、東京)、二次抗体には抗ヒツジガンマグロブリンロバ血清(AB200K)をそれぞれ用いた。1、5、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、剖検日にも体重を測定した。

(6) 性周期回帰停止前の時期における視床下部/下垂体/性腺軸の解析(実験4)

(ア) 一般状態の観察

投与前後に一般状態を観察し、21日齢に離乳して12-13週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

(イ) 一般状態の観察(実験4-1)

投与前後に一般状態を観察し、21日齢に離乳して12-13週齢まで実験に供した。その間、以下の観察および測定を行った。一般状態を投与前後に観察した。

(ウ) 体重(実験4-1)

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、剖検日にも体重を測定した。

(エ) 眼瞼開裂の観察(実験4-1)

12日齢から毎日開眼の有無を観察し、両側の開眼が認められた日を開眼日として体重を測定した。

(オ) 膣開口の観察 (実験 4-1)

4 週齢から毎日膣開口の有無を観察し、膣の開口が認められた動物は体重を測定した。

(カ) 性周期の観察 (実験 4-1)

8 週齢から 2 週間および 12 週齢から剖検まで、毎日膣垢を採取して、ギムザ染色を行い、性周期を観察した。性周期は、8 週齢から 2 週間、毎日膣垢を採取して観察し、上記(1)-エ) に示したように分類し、集計した。

(キ) 剖検 (実験 4-1)

12 週齢からの性周期観察において、原則として発情期と判断された動物を剖検に供した。動物は、ペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル) 深麻酔下で卵巣および卵管を摘出した後に、4 %PFA による灌流固定を行い、脳は *in situ* hybridization による *Kiss1* 遺伝子および *ER α* 遺伝子の発現解析に供した。子宮、下垂体および卵巣は重量を測定し、右側の卵巣は遺伝子定量解析およびタンパク質解析のために液体窒素を用いた急速冷凍を行い、-80 で保存した。左側の卵巣は組織学的観察に供するために Bouin 液で固定した。

(ク) 卵巣の組織観察

Bouin 固定した卵巣は常法に従ってパラフィン包埋し、4 μ m 厚で薄切して連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) した。作製した全ての切片を観察対象とし、光学顕微鏡下で嚢胞状卵胞および黄体の有無を確認した。嚢胞状卵胞の判定は Acuña [Acuña,2009] に従い、卵母細胞を欠き、大きな卵胞腔を有し、拡大した莢膜細胞層、および単層の内卵胞膜を有する卵胞をひとつでも確認された動物の数を数えた。

(ケ) Total RNA の抽出 (実験 4-1)

凍結卵巣からの抽出は、細胞破碎装置用ビーズに「ステンレス ϕ 3.2」を用いた他は、前記(4)-ウ) に記した方法で行った。

(コ) Real-time RT-PCR (実験 4-1)

前記(4)-ウ) に記した方法で行った。定量解析は、(5)-エ) と同じ mRNA を対象とした。また内在性コントロールとして glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を定量し、*GAPDH* mRNA 発現量で補正した相対発現量を各遺伝子の発現量とした。

(サ) LHR タンパクの定量解析 (実験 4-1)

前記(5)-オ) および に記した方法で行った。

(シ) Double-labeled *in situ* hybridization (実験 4-1)

還流固定した脳は、Brain Blocker を用い、AVPV と ARC が含まれる部位を切り出し、パラフィンブロックとした。これをラット脳アトラス [Paxinos & Watson The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 6th ed., Elsevier] を参照しながら、AVPV は Bregma 0.12 mm から -0.48 mm の領域を、ARC は Bregma -1.80 mm から -3.24 mm の領域を、20 μ m ごとに 10 μ m 厚で薄切して、各サンプル 3 枚の切片を *Kiss1* 及び *ER α* の *in situ* hybridization に供した。

In situ hybridization は、QuantiGene ViewRNA (Affimetrix/Panomics, Santa Clara, CA USA) 用に設計されたプローブを用いて行った。その際、pretreatment による煮沸処理は 20 分間および protease 処理は 40 で 15 分間行い、ハイブリダイゼーションは 40 で 150 分間の条件で行った。*Kiss1* の *in situ* hybridization における陰性対照には、*Kiss1*-/-ラットの脳組織を用いた。

標本は光学顕微鏡下で鏡検し、発現陽性細胞数を求めた。

(ス) 実験 4-2

実験 4-1 と同様の日齢に体重を測定し、一般状態、開眼および膣開口の観察を行った。10 週齢にイソフルランによる吸入麻酔下で卵巣を摘出し、その後 1 週間にわたり膣垢像を観察して卵巣の残存がないことを確認した。卵巣は固定保存して形態観察に供した。14 週齢でイソフルランによる吸入麻酔下で右側頸静脈にカニューレを装着し、翌日、装着したカニューレから 6 分間隔で 100 μ L ずつ 2 時間にわたり血液を採取し血清を分離した。得られた血清は、測定まで -20 で保存した。

(セ) LH のラジオイムノアッセイ

血清中の LH 濃度測定は東京農工大学農学部渡辺 元博士(研究協力者)の協力を得て、米国 National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases から供与された、ラット LH の RIA キットを用いて二抗体法により測定した(第一抗体 anti-rat LH S-10、第二抗体抗ウサギ γ グロブリンヤギ血清 #42-99318)。標識抗原は rat LH-I-5 をクロラミ

NT法により¹²⁵Iで標識して使用し、標準物質にはrat LH-RP-1を用いた。測定値は、研究協力者である名古屋大学農学部末村博士博士および上野山賀久博士の下でパルス解析を行い、パルス頻度、大きさ、ピークレベルおよび基底レベルを算出した。

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、分散の一様性を確認して 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. 新生期 EE(反復経口投与による遅発影響の閾値探索)(実験1)

(1) 投与動物の一般状態および体重増加

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(図2A)。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(図2B)。

眼瞼開裂日齢ならびに腔開口日齢にEE投与群と対照群との間で有意差は認められなかった(表2)。

(2) 性周期(図3、4)

0.08 μg/kg/day 群では観察期間全般にわたり発情周期が不規則な変化を示したが、連続発情を示す個体はなかった(図3)。

発情前期および発情期、発情後期および休止期の日数の割合についても EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった。また、性周期の平均回帰回数においても EE 投与群と対照群の間に有意な差はみられなかった(図4)。

(3) 器官重量(表3)

0.016 μg/kg/day 群では、卵巢重量が対照群と比較し有意(P<0.05)な高値を示したが、用量に依存した変化ではなかった。その他の器官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。

(4) 卵巢の組織学的観察結果(表4)

卵巢における黄体および嚢胞状卵胞の有無を観察した結果、黄体保有率は対照群と EE 投与群との間で有意差は認められなかった。一方、嚢胞状卵胞が認められた動物の割合は 0.08 μg/kg/day 群で有意に増加した。

2. 幼若雌ラットを用いたEEの経口投与による子宮肥大試験(実験1)

体重推移および一般状態に投与の影響は認められなかった(データは示さず)。

表5に示すように、子宮重量は、2 μg/kg/day 群では対照群との間に有意差(p<0.01)が認められたが、0.08 μg/kg/day 以下の投与群では対照群と同様の値であった。卵巢重量についても、2 μg/kg/day 群の値のみが対照群と比較して有意(p<0.01)な低値を示した。

3. 新生期 EE 投与動物の交配試験および胎児観察(実験1)

(1) 性周期の回帰状況および交配成績

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6)。

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例が2回目の交配適期で交尾した以外はEE投与群を含む全例が1回目の適期で交尾し、全例が妊娠した(表6)。

(2) 妊娠期間中の体重推移

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7)。

(3) 帝王切開所見

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 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 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が、低下の程度に用量間で差は認められなかった。*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 *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7)。

図8に示すように、0.016 µg/kg/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、*ERα* 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 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10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。

(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、*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 µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/日対照群の 65 %程度、0.4µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/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 ERβ mRNA については 2 µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/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、3β-HSD ならびに aromatase mRNA が低下傾向を示した。0.4 µg/kg/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、3β-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 µg/kg/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 3β-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 µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/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 µg/kg/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

嚢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 µg/kg/day群における嚢胞状卵胞の保有率は対照群とほぼ同程度であったが、2 µg/kg/day群では5例全例に観察された (図23A)。0.08あるいは0.4 µg/kg/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%の動物に嚢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嚢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以下の用量では嚢胞状卵胞保有率は対照群と同程度であったことから、嚢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嚢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嚢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、嚢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。

嚢胞状卵胞は、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週齢に卵巣の嚢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ため、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 ER α と ER β 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 ER α 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 $ER\alpha$ の発現低下も認められた。 $ER\alpha$ 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 $ER\alpha$ の発現に投与の影響は認められなかった。 $ER\alpha$ 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 $ER\alpha$ 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、 $ER\alpha$ 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 $ER\beta$ 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 $inhibin-\alpha$ 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ロジオール (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 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ロ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ロジオール曝露が幼若期の卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現に及ぼす影響」(第 40 回日本毒性学会、2013 年 6 月、千葉市)

G . 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
該当無し
2. 実用新案登録
該当無し
3. その他
無し

参考文献

Aatsinki JT, Pietilä EM, Lakkakorpi JT, Rajaniemi HJ. Expression of the LH/CG receptor gene in rat ovarian tissue is regulated by an extensive alternative splicing of the primary transcript. *Molecular Cellular Endocrinology* 84,127-135 (1992)

Akieda-Asai S, Ohta R, Shirota M, Jaroenporn S, Watanabe G, Taya K. Endocrinological differences between Hatano high- and low-avoidance rats during early two-way avoidance acquisition. *Experimental Animals* 60, 509-516 (2011)

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

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

Bandiera S and Dworschak C. Effects of Testosterone and Estrogen on Hepatic Levels of Cytochromes P450 2C7 and P450 2C11 in the Rat. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 296, 286-295 (1992)

- Banu SK, Samuel JB, Arosh JA, Burghardt RC, Aruldhas 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, Diaz-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, Shiota 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, Shiota 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)
- Brotans 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 Pepling M. Neonatal Genistein Treatment Alters Ovarian Differentiation in the Mouse: Inhibition of Oocyte Nest Breakdown and Increased Oocyte Survival. *Biology of Reproduction* **74**, 161-168 (2006)
- Jefferson WN, Patisaul HB Williams CJ. Reproductive consequences of developmental phytoestrogen exposure. *Reproduction* **143**, 247-260 (2012)
- Hu J, Du G, Zhang W, Huang H, Chen D, Wu D, Wang X. Short-term neonatal/prepubertal exposure of dibutylphthalate (DBP) advanced pubertal timing and affected hypothalamic kisspeptin/GPR54 expression differently in female rats. *Toxicology* **314**, 65-75 (2013)
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay to Screen Compounds for in Vivo Estrogenic Responses: Phase 1. *Environmental Health Perspectives* **109**, 785-794 (2001)
- Kelly PA, Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Shirota M, Edery M, Dusanter-Fourt I, Djiane J. Purification, cloning, and expression of the prolactin receptor. *Biology of Reproduction* **40**, 27-32 (1989)
- Kenny HA, Woodruff TK. Follicle size class contributes to distinct secretion patterns of inhibin isoforms during the rat estrous cycle. *Endocrinology* **147**, 51-60 (2006)
- Kezele P, Skinner MK. Regulation of Ovarian Primordial Follicle Assembly and Development by Estrogen and Progesterone: Endocrine Model of Follicle Assembly. *Endocrinology* **144**, 3329-3337 (2003)
- Kimura F, Funabashi T. Two subgroups of gonadotropin releasing hormone neurons control gonadotropin

- secretion in rats. *News of Physiological Sciences* **13**,225-231 (1998)
- Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* **148**: 1968-1976 (2007)
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**, 4252-4263 (1998)
- Kurian JR, Olesen KM, Auger AP. Sex differences in epigenetic regulation of the estrogen receptor-promoter within the developing preoptic area. *Endocrinology* **151**, 2297–2305 (2010)
- Lei L, Shiyong J, Kelly EM, Woodruff TK. The Interactions Between the Stimulatory Effect of Follicle-Stimulating Hormone and the Inhibitory Effect of Estrogen on Mouse Primordial Folliculogenesis. *Biology of Reproduction* **82**, 13–22 (2010)
- Mazaud Guittot S, Guigon CJ, Coudouel N, Magre S. Consequences of fetal irradiation on follicle histogenesis and early follicle development in rat ovaries. *Biology of Reproduction* **75**, 749–759 (2006)
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiological Reviews* **88**, 91-124 (2008)
- McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ. Müllerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction* **64**, 293-298 (2001)
- McLachlan JA, Tilghman SL, Burow ME, Bratton MR. Environmental signaling and reproduction: A comparative biological and chemical perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology* **354**, 60-62 (2012)
- Melinda E, Wilson R, Handa J. Ontogeny of Gene expression in the gonadotroph of the developing female rat. *Biology of Reproduction* **56**, 563-568 (1997)
- Mena MA, Arriaza CA, Tchernitchin AN. Early postnatal androgenization imprints selective changes in the action of estrogens in the rat uterus. *Biology of Reproduction* **46**, 1080-1085 (1992)
- Mineshige T, Kamiie J, Sugahara G, Yasuno K, Aihara N, Kawarai S, Yamagishi K, 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 17 β -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, Slaughter 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, Ederly M, Djiane J, Kelly PA. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Molecular Endocrinology* 4, 1136-1143 (1990)
- Soga T, Kitahashi T, Clarke IJ, Parhar IS. Gonadotropin-inhibitory hormone promoter-driven enhanced green fluorescent protein expression decreases during aging in female rats *Endocrinology* 155, 1944-1955 (2014)
- Sokka T, Huhtaniemi I. Ontogeny of gonadotrophin receptors and gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal rat ovary. *Journal of Endocrinology* 127, 297-303 (1990)
- Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor mRNA. *Endocrinology* 130, 1738-1740 (1992)
- Sokka TA, Huhtaniemi IT. Functional maturation of the pituitary-gonadal axis in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction* 52, 1404-1409 (1995)
- Sokka TA, Hämäläinen TM, Kaipia A, Warren DW, Huhtaniemi IT. Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biology of Reproduction* 55, 663-670 (1996)
- Shirwalkar H, Modi DN, Maitra A. Exposure of adult rats to estradiol valerate induces ovarian cyst with early senescence of follicles. *Molecular Cellular Endocrinology* 272, 22-37 (2007)
- Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Delayed effects of neonatal exposure to 17 α -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reproductive Toxicology* 40, 16-23 (2013)
- Takumi K, Iijima N, Iwata K, Higo S, Ozawa H. The effects of gonadal steroid manipulation on the expression of Kiss1 mRNA in rat arcuate nucleus during postnatal development. *Journal of Physiological Sciences* 62, 453-460 (2012)
- Tena-Sempere M. Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function. *International Journal of Andrology* 33, 360-368 (2010)
- Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4, 19 (2006)

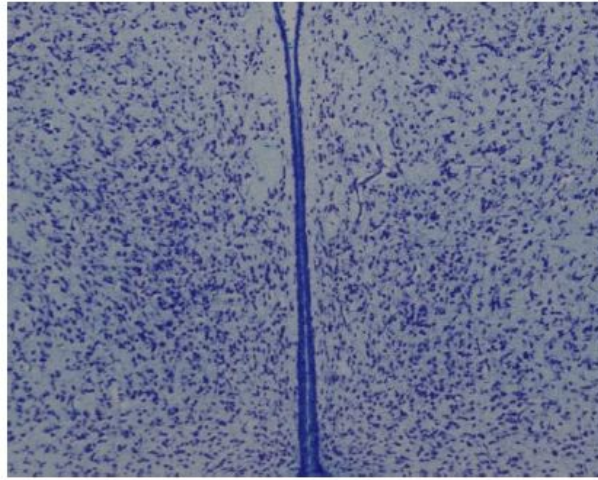
- Tingen C, Kim A, and Woodruff TK. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Molecular Human Reproduction* 15, 795–803 (2009)
- Topper VY, Walker DM, Gore AC. Sexually dimorphic effects of gestational endocrine-disrupting chemicals on microRNA expression in the developing rat hypothalamus. *Molecular and Cellular Endocrinology* 414, 42-52 (2015)
- Toran-Allerand CD. Gonadal hormones and brain development: implications for the genesis of sexual differentiation. *Annual New York Academy of Sciences* 435, 101-111 (1984)
- Tsai-Morris CH, Buczko E, Wang W, Xie XZ, Dufau ML. Structural organization of the rat luteinizing hormone (LH) receptor gene. *Journal of Biological Chemistry* 266, 1355-11359 (1991)
- Umekita Y, Souda M, Hatanaka K, Hamada T, Yoshioka T, Kawaguchi H, animoto A. Gene expression profile of terminal end buds in rat mammary glands exposed to diethylstilbestrol in neonatal period. *Toxicology Letter* 205, 15-25 (2011)
- Usuda K, Nagaoka K, Nozawa K, Zhang H, Taya K, Yoshida M, Watanabe G. Neonatal exposure to 17 α -ethinyl estradiol affects kisspeptin expression and LH surge level in female rats. *Journal of Veterinary Medical Sciences* 76, 1105-1110 (2014)
- Uzumcu M, Kuhn PE, Marano JE, Armenti AE, Passantino L. Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *Journal of Endocrinology* 191, 549–558 (2006)
- Vannier B, Raynaud JP. Long-term effects of prenatal oestrogen treatment on genital morphology and reproductive function in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility* 59, 43-49 (1980)
- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiazzo VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Developmental exposure to Bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149, 5848-5860 (2008)
- Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 141, 3814-3820 (2000)
- Visser JA, de Jong FH, Laven JS, Themmen AP. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 131,1-9 (2006)
- Walker DM, Kirson D, Perez LF, Gore AC. Molecular profiling of postnatal development of the hypothalamus in female and male rats. *Biology of Reproduction* 129, 1-12 (2012)
- Wang C and Roy SK. Development of Primordial Follicles in the Hamster: Role of Estradiol-17 β . *Endocrinology* 148, 1707–1716 (2007)
- Watanabe C, Kuwagata M, Yoshimura S, Azegami J, Kojima K, Ono H, Nagao T. An improved technique for repeated gavage administration to rat neonates. *Congenital Anomalies (Kyoto)* 43, 177-179 (2003)
- Wu J, Nayudu PL, Kiesel PS, Michelmann HW. Luteinizing hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. *Biology of Reproduction* 63, 320-327 (2000)
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M. Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183, 93-115 (2003)
- Yasuno K, Sakashita H, Araki S, Kobayashi R, Sakurada Y, Shiota M, Kamiie J, Shiota K . Cutaneous hybrid cyst in a Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicologic Pathology* 25, 175-178 (2012)
- Yeh J, Kim B. Increasing blunting of inhibin responses to dynamic ovarian challenge is associated with reproductive aging in the rat. *Reproductive Sciences* 14, 10-19 (2007)
- Yoshida H, Takakura N, Kataoka H, Kunisada T, Okamura H, Nishikawa SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology* 184, 122-137 (1997)
- Yoshida M, Takahashi M, Inoue K, Hayashi S, Maekawa A, Nishikawa A. Delayed adverse effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol and their dose dependency in female rats. *Toxicologic Pathology* 39, 823-834 (2011)

Yoshida M, Watanabe G, Shiota M, Maekawa A, Taya K. Reduction of primordial follicles caused by maternal treatment with busulfan promotes endometrial adenocarcinoma development in donryu rats. *Journal of Reproduction and Development* 51, 707-714 (2005)

Zhang FP, Poutanen M, Wilbertz J, Huhtaniemi I. Normal prenatal but arrested postnatal sexual development of luteinizing hormone receptor knockout (LuRKO) mice. *Molecular Endocrinology* 15, 172-183 (2001)

Zhuang XL, Fu YC, Xu JJ, Kong XX, Chen ZG, Luo LL. Effects of genistein on ovarian follicular development and ovarian life span in rats. *Fitoterapia*. 81, 998-1002 (2010)

A.



B.

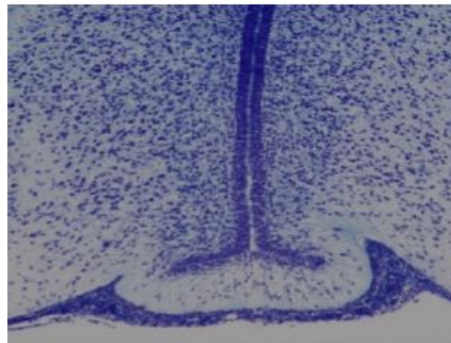


図 1

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

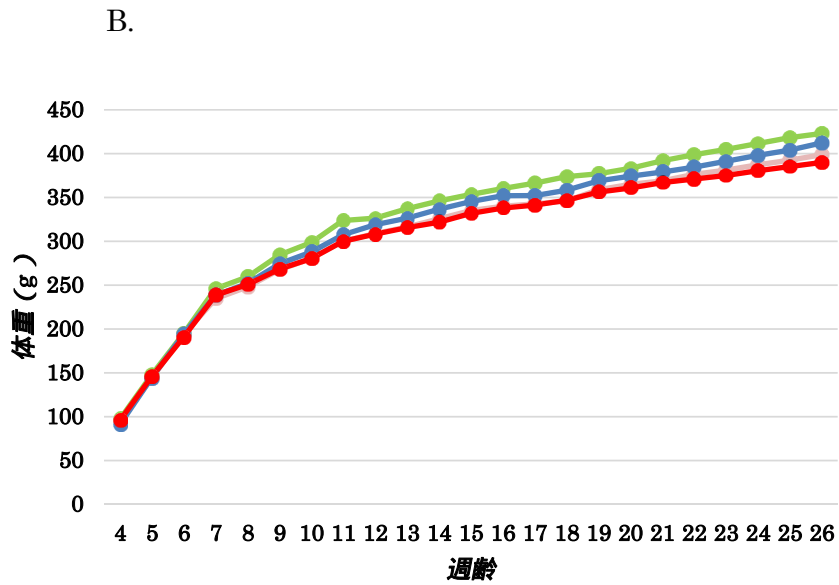
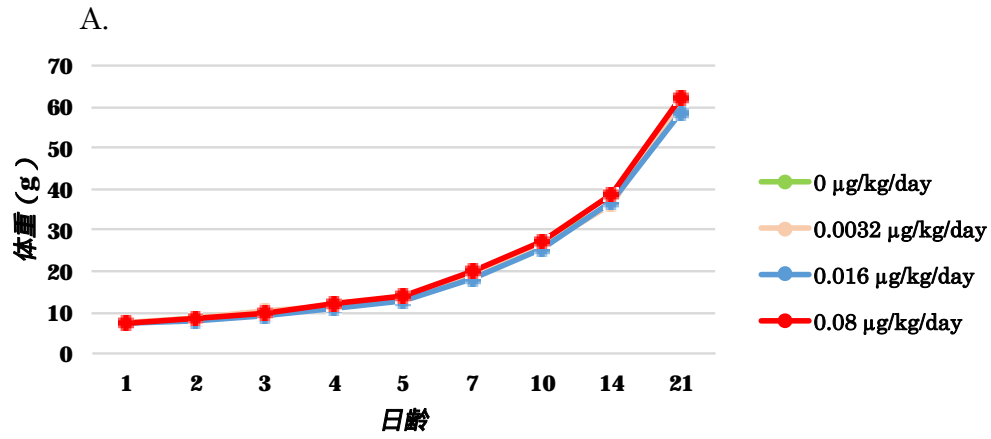
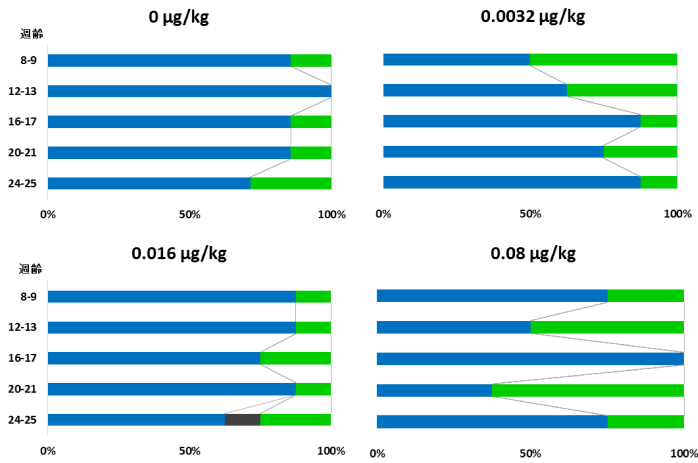


図2 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの離乳前(A)および離乳後(B)の体重推移



■ 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

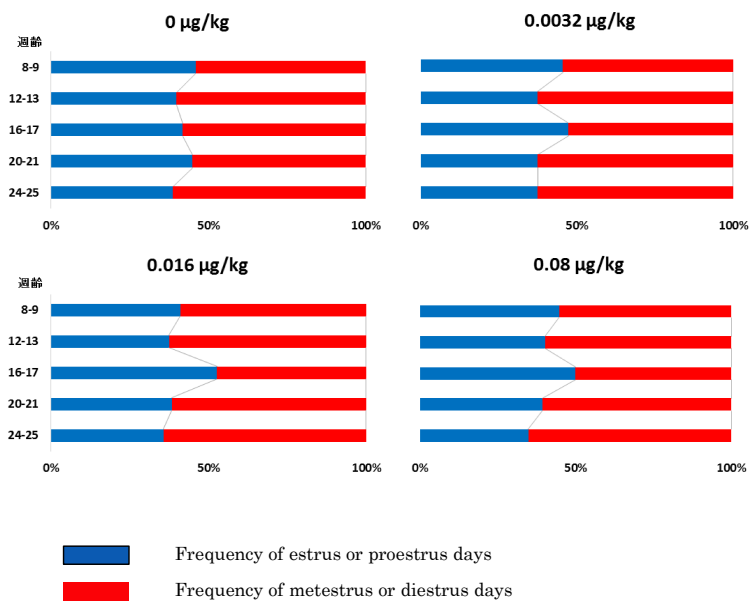
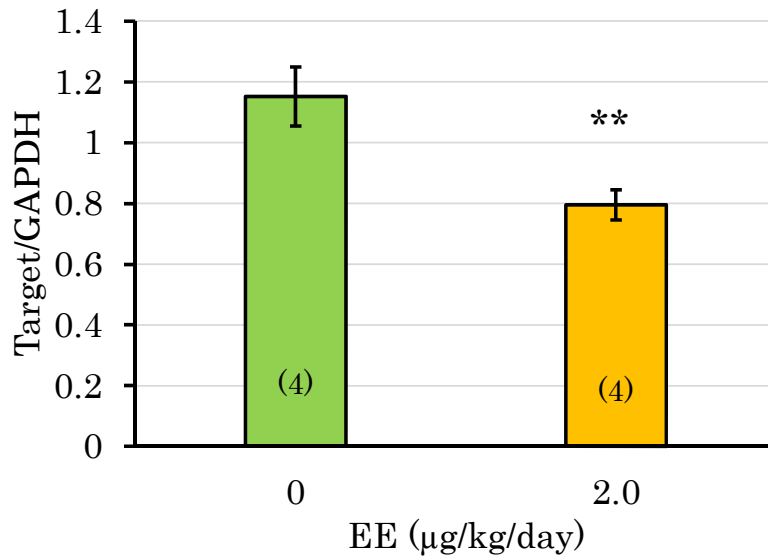


図4 1日齢から5日間エチニルエストラジオールを反復経口投与した雌ラットの発情期あるいは発情前期の割合

A. 視床下部



B. 上部領域

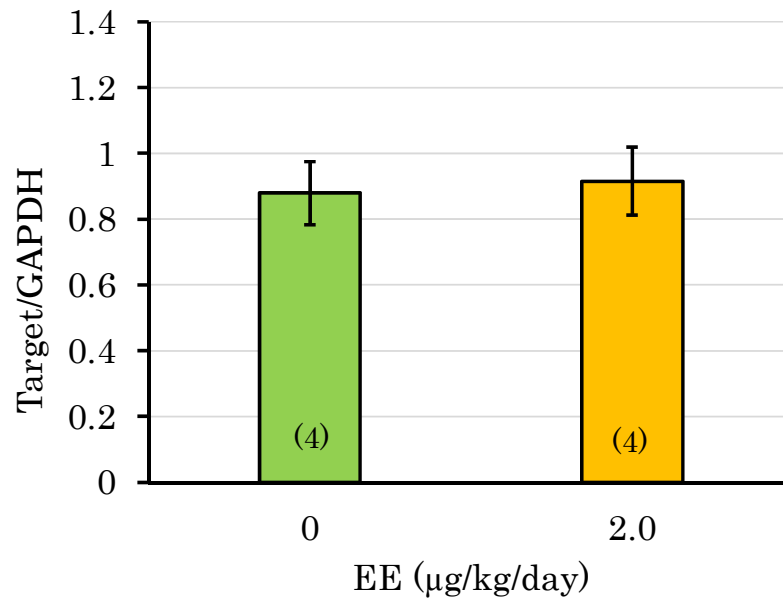
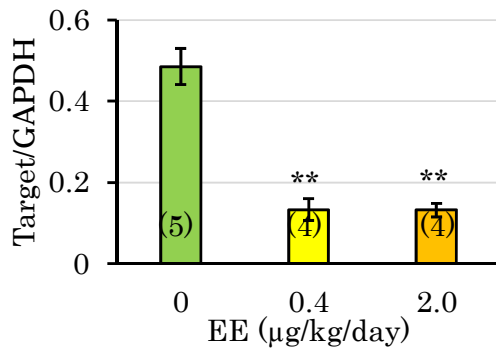


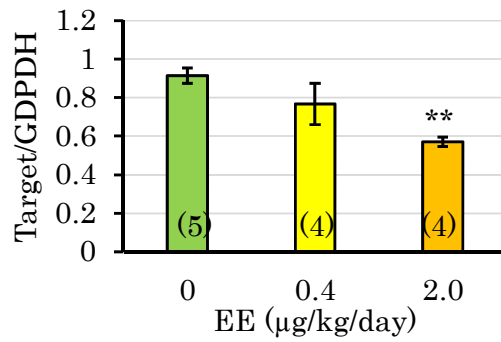
図 5

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 ER mRNA の GAPDH mRNA に対する相対発現量 (平均 ± 標準誤差, (N)). **P<0.01

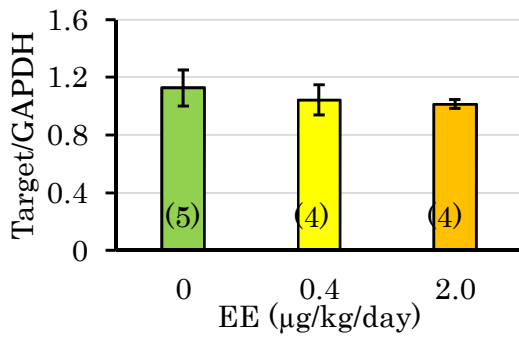
(A) *Kiss1* mRNA



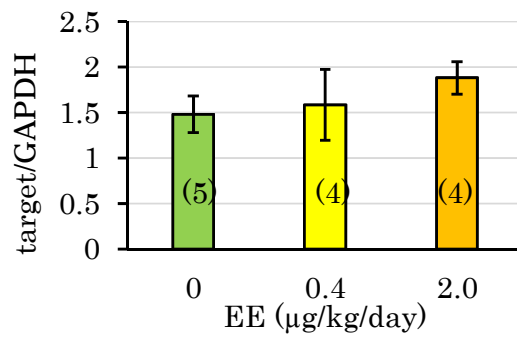
(B) *ERα* mRNA



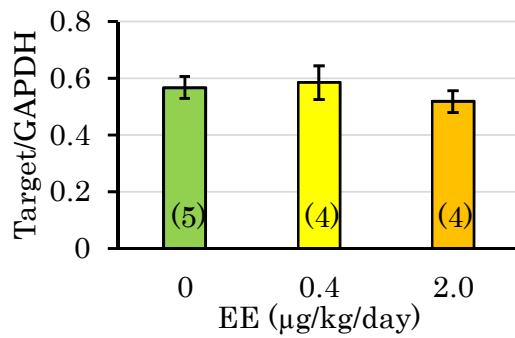
(C) *Pdyn* mRNA



(D) *Oprk1* mRNA



(E) *Tac2* mRNA



(F) *Tacr3* mRNA

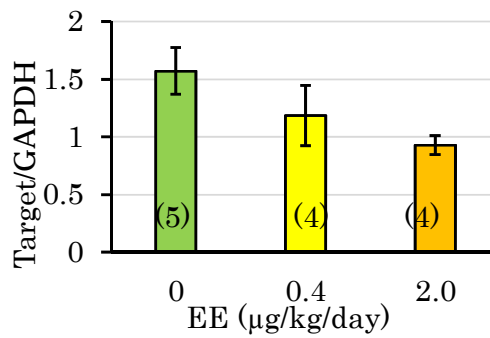


図 6

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(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)), ** $P < 0.01$)

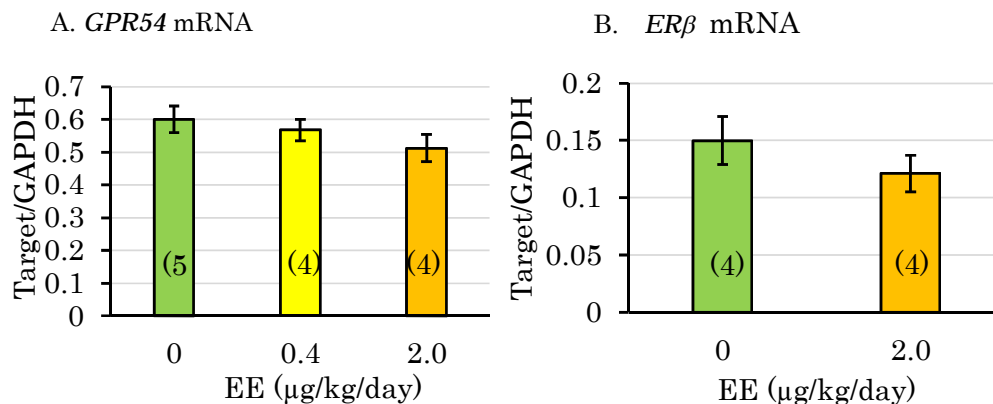


図 7

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)

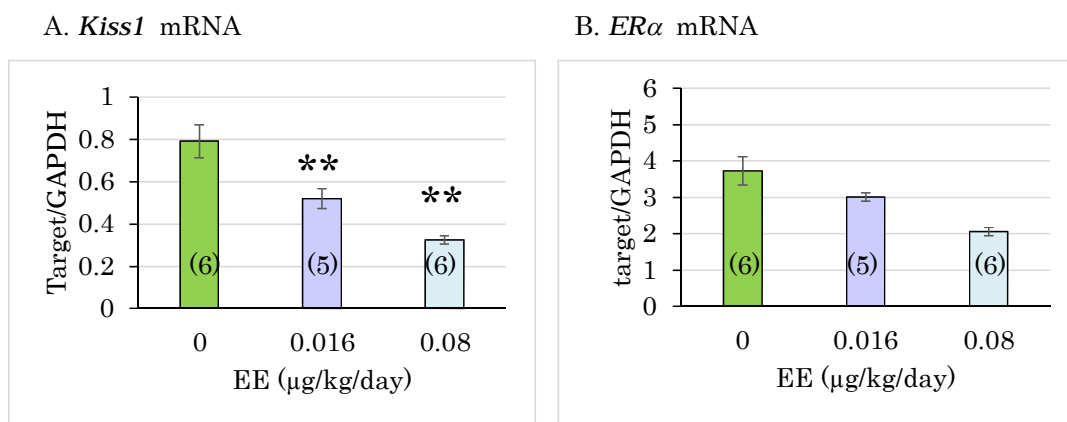
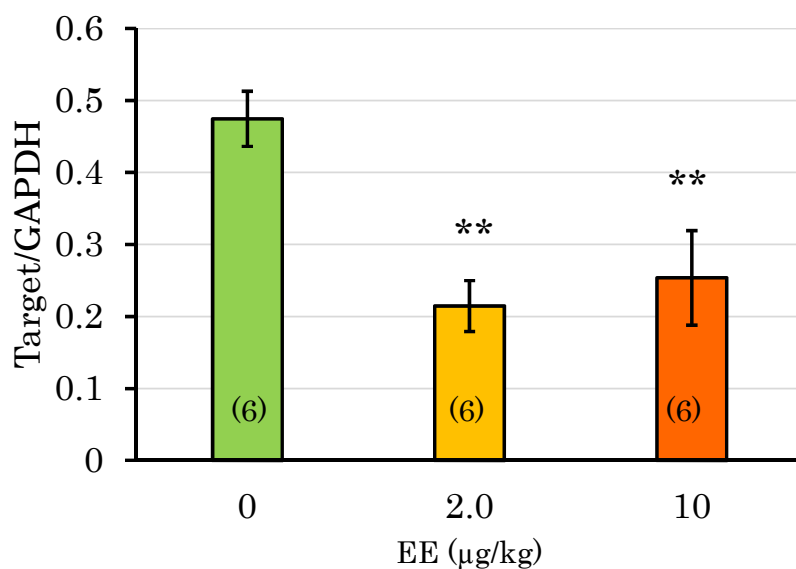


図 8

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

A. *Kiss1* mRNA



B. *ERα* mRNA

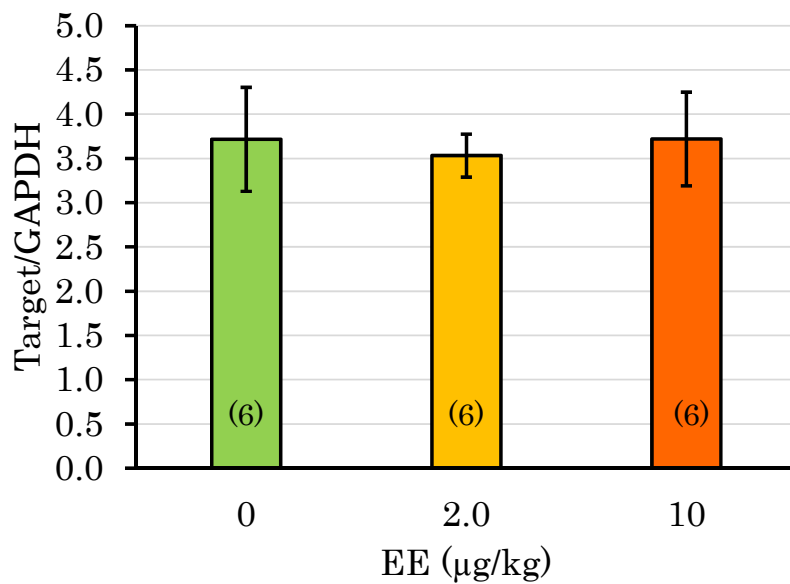
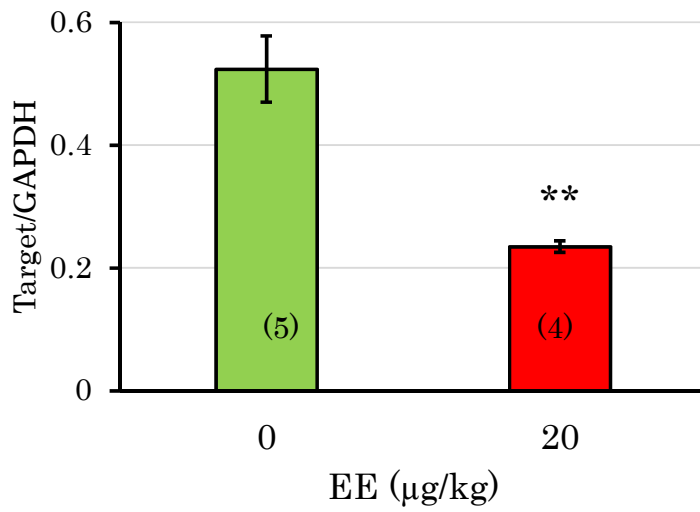


図 9

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

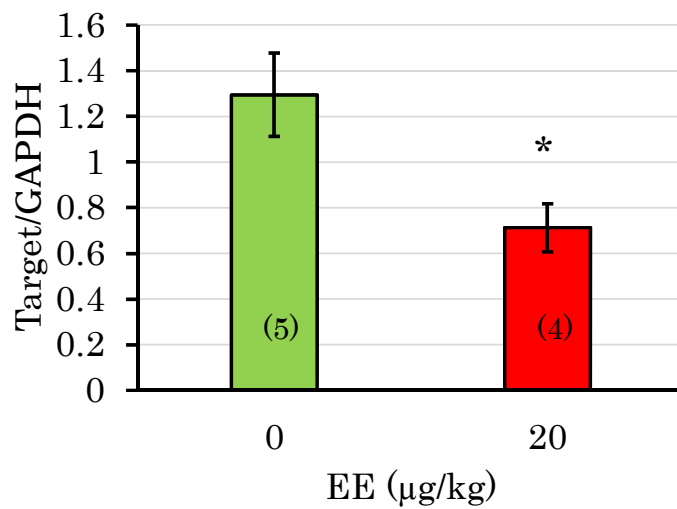


図 10

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

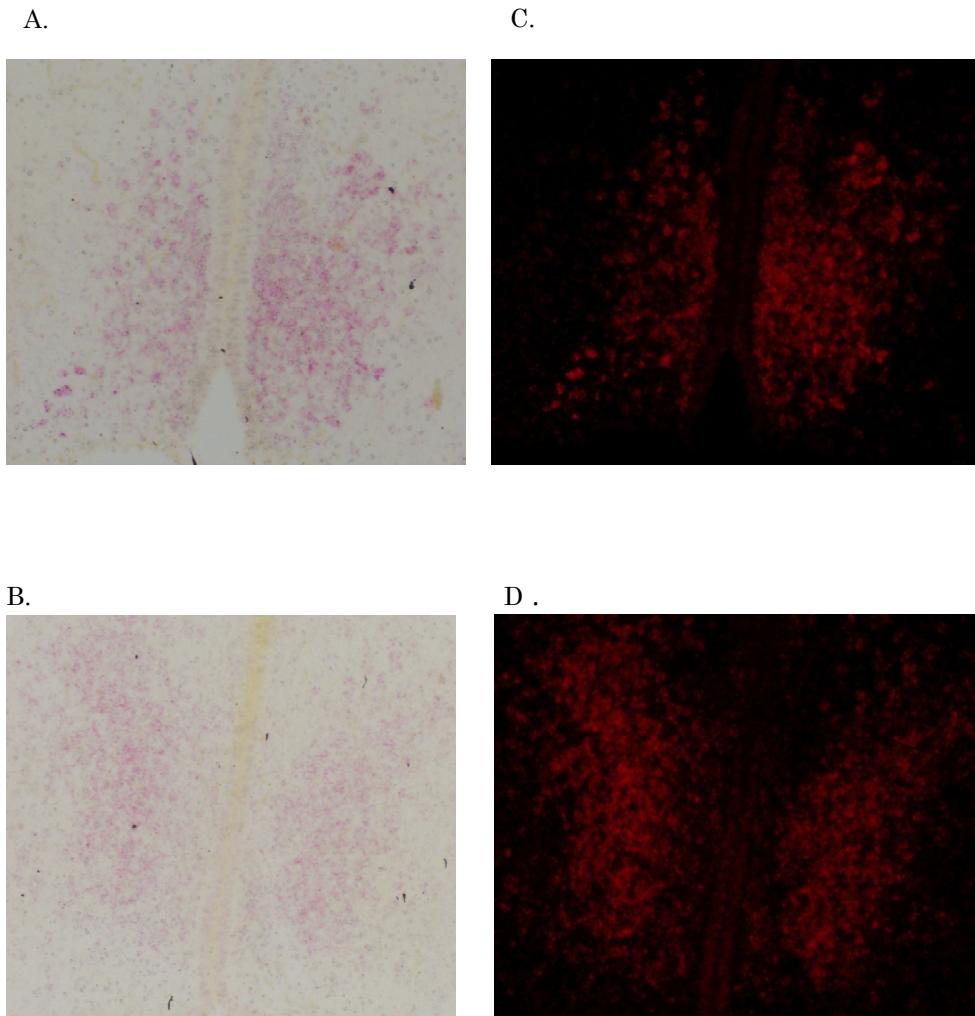
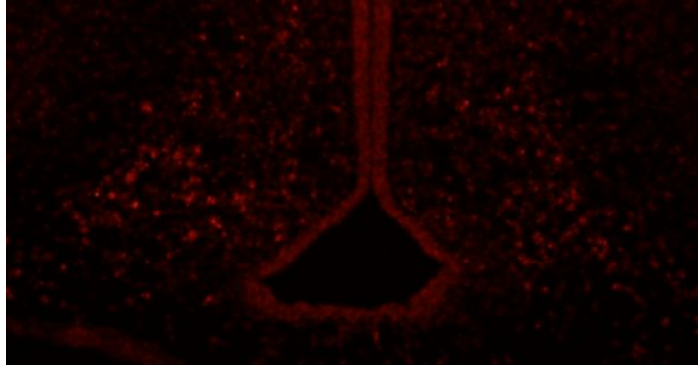


図 11

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 $ER\alpha$ 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 $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 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、 $ER\alpha$ mRNAは赤色顆粒または赤色蛍光として認められる。

A.



B.

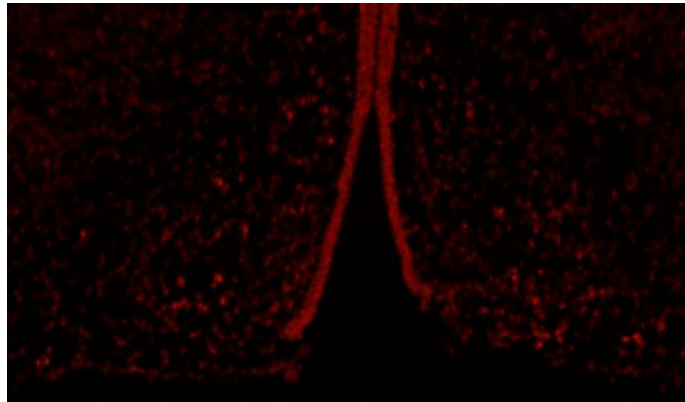
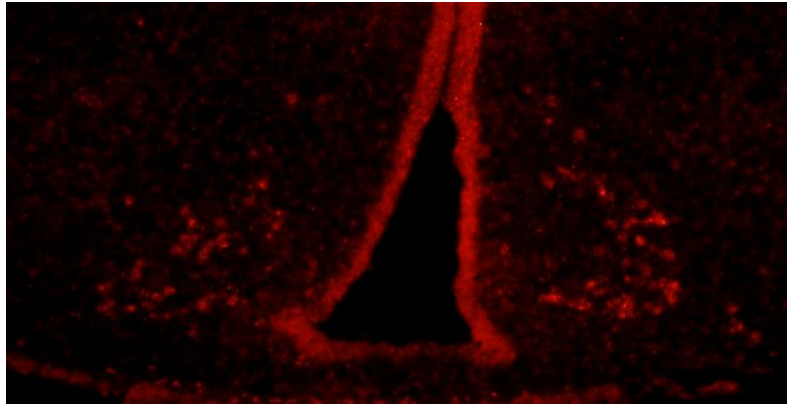


図 12

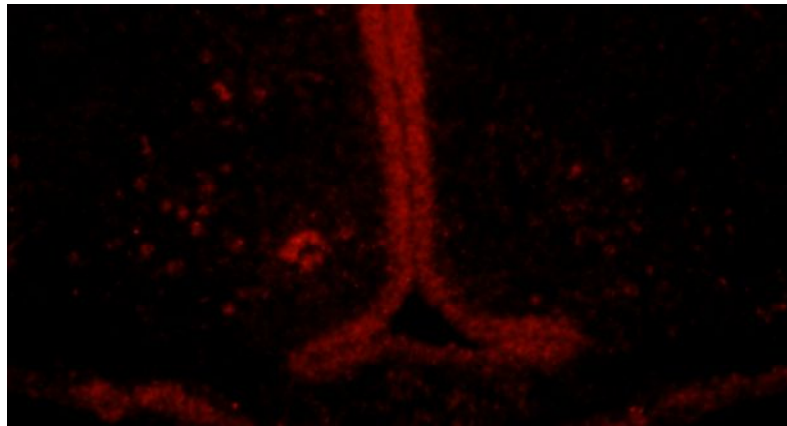
1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した6日齢雌ラットのARC領域における $ER\alpha$ mRNA の発現

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、 $ER\alpha$ mRNA は赤色蛍光として認められる。

A.



B.



C.

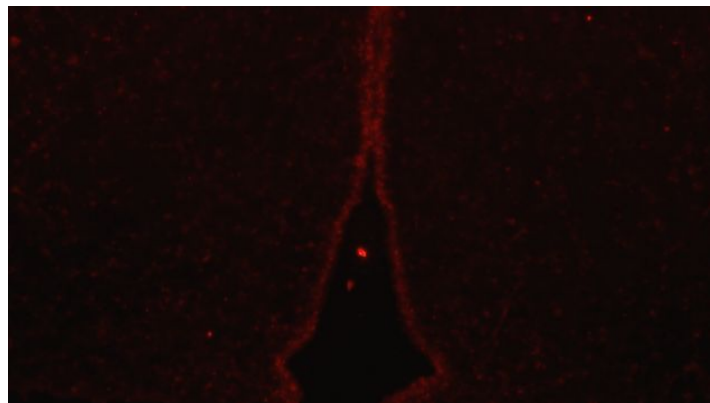


図 13

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。

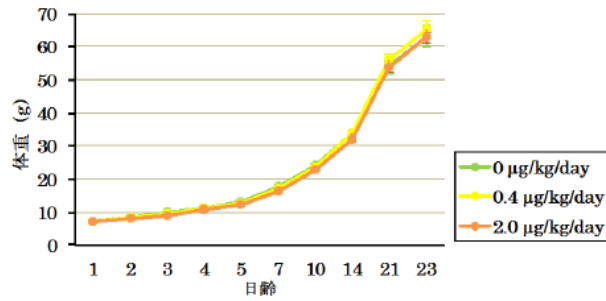


図 14
1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの 23 日齢までの体重推移

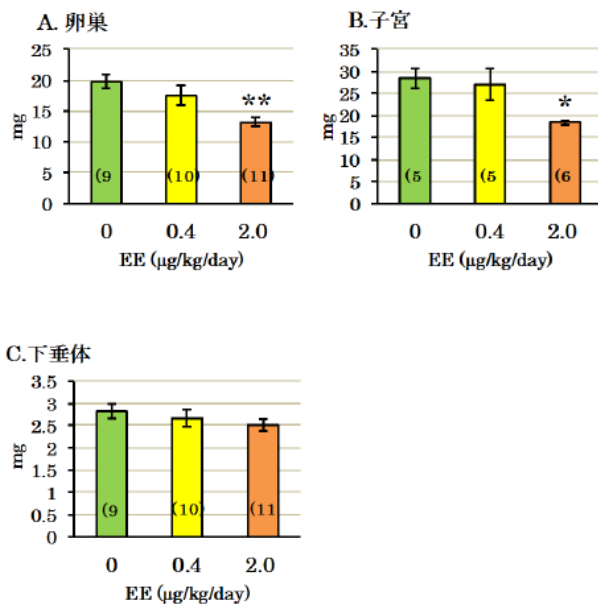


図 15
1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの 23 日齢における器官重量 (平均±標準誤差, N)。**p<0.01

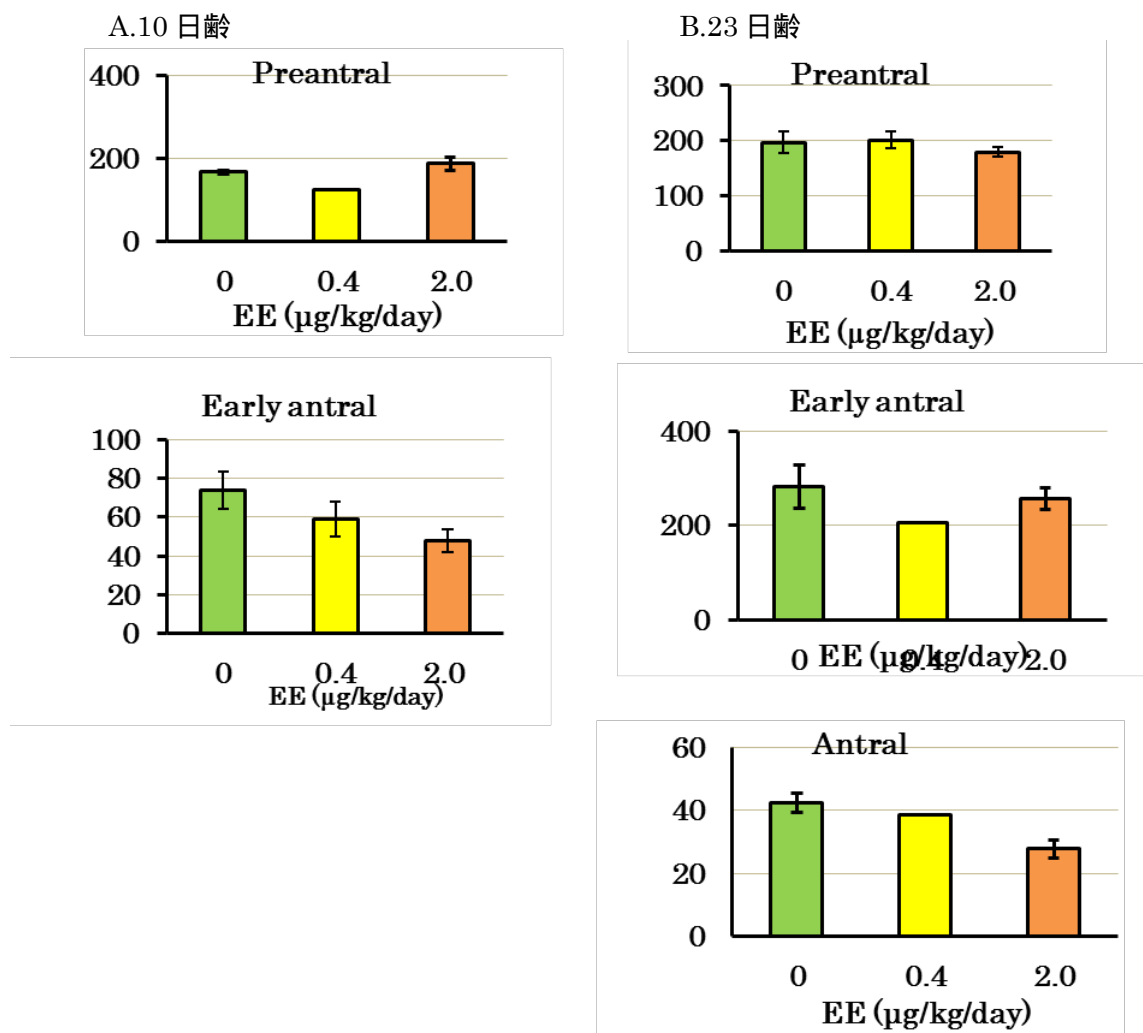


図 16
 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの雌ラットの
 10日齢あるいは23日齢の卵巣で数えられた発育卵胞数(平均±標準誤差, N)

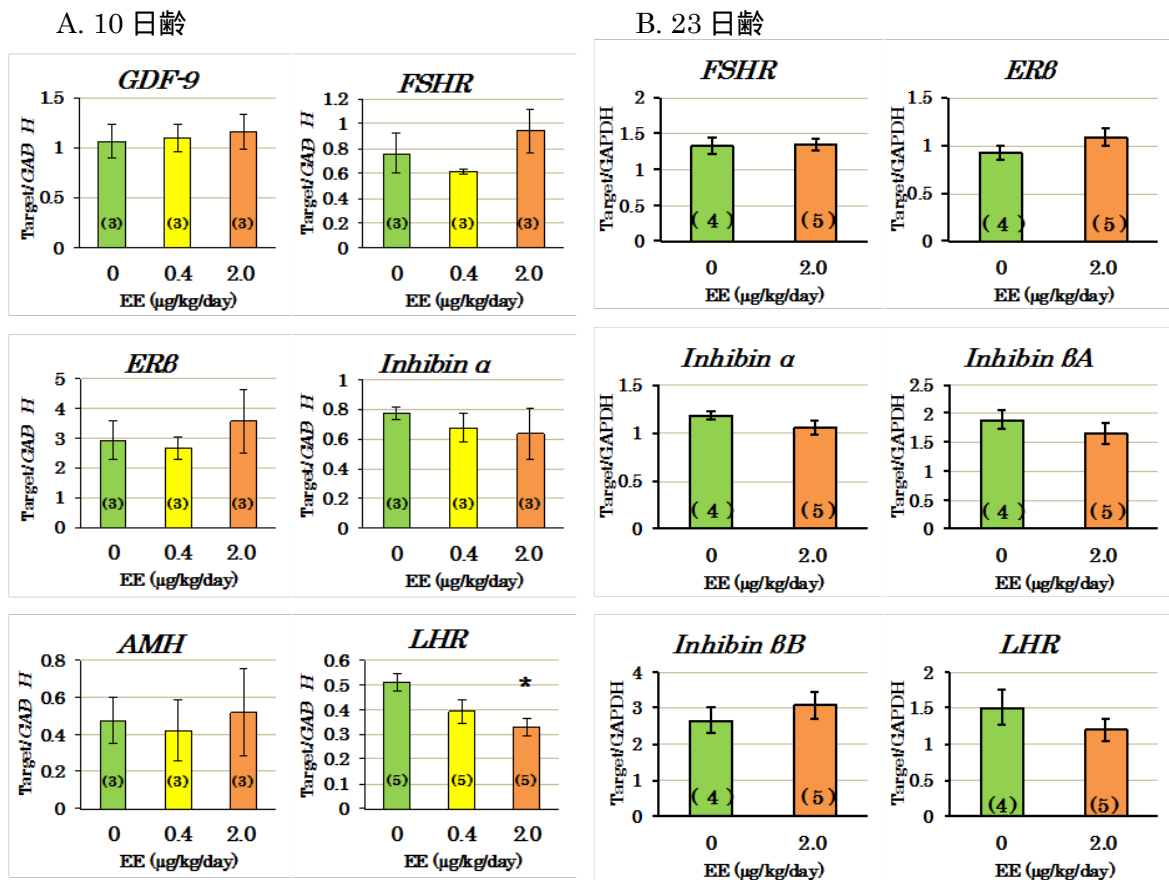


図 17

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 \pm 標準誤差, N). * $p < 0.05$

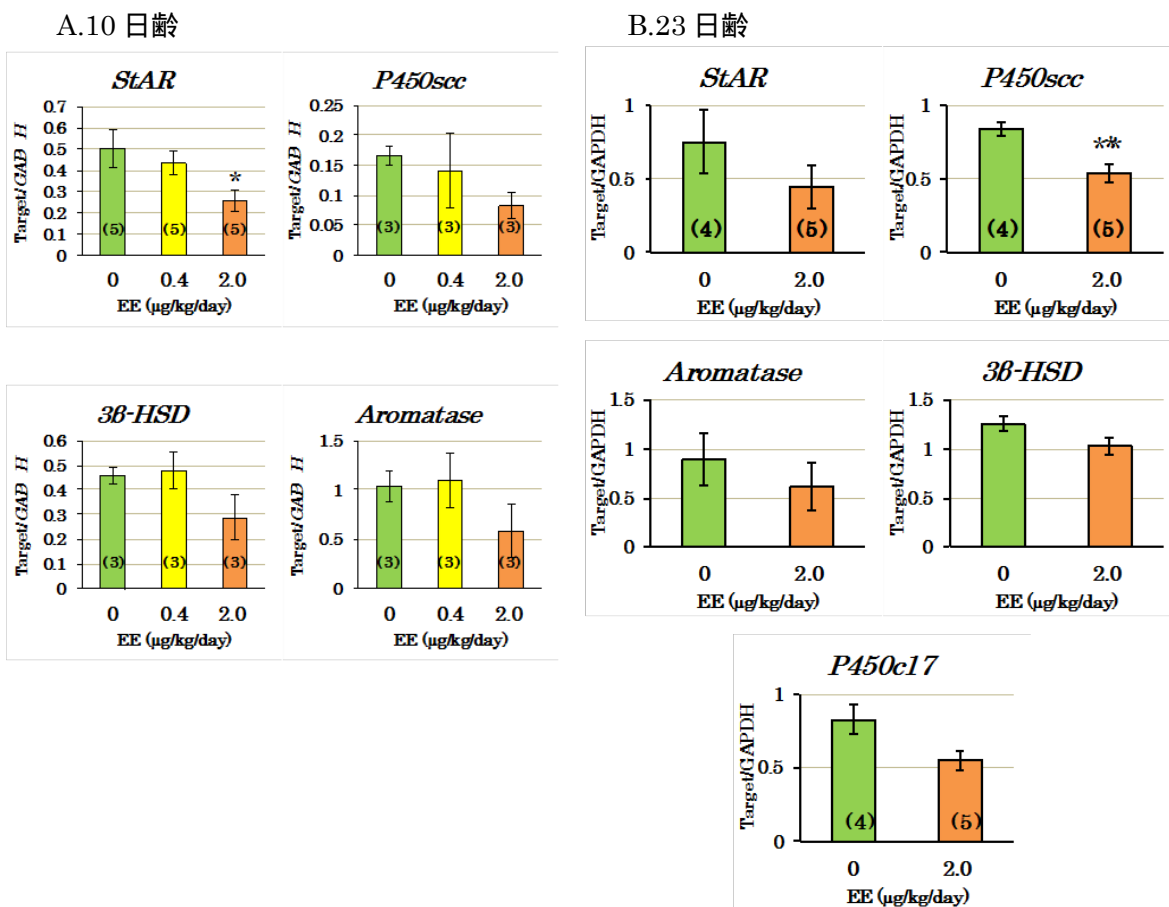
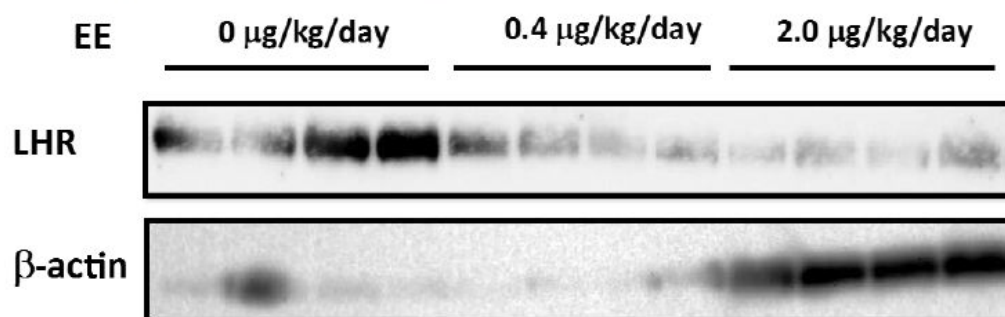


図 18

1 日齡から 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 日齡 (A) あるいは 23 日齡 (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)

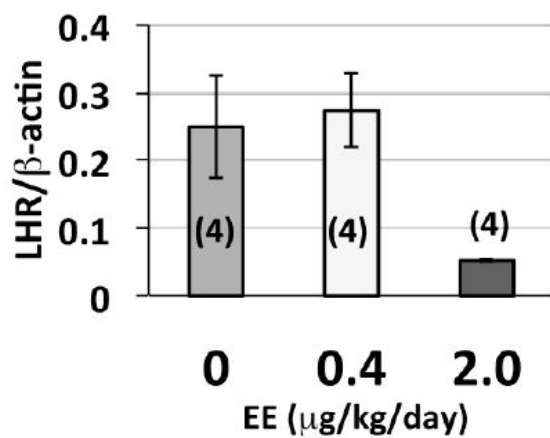


図 19

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

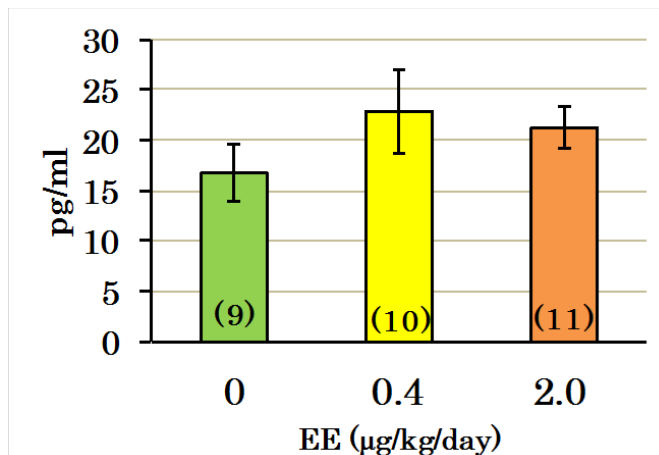


図 20 1日齢から5日間エチニルエストラジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの23日齢における血清中エストロゲン濃度(平均±標準誤差, (N))

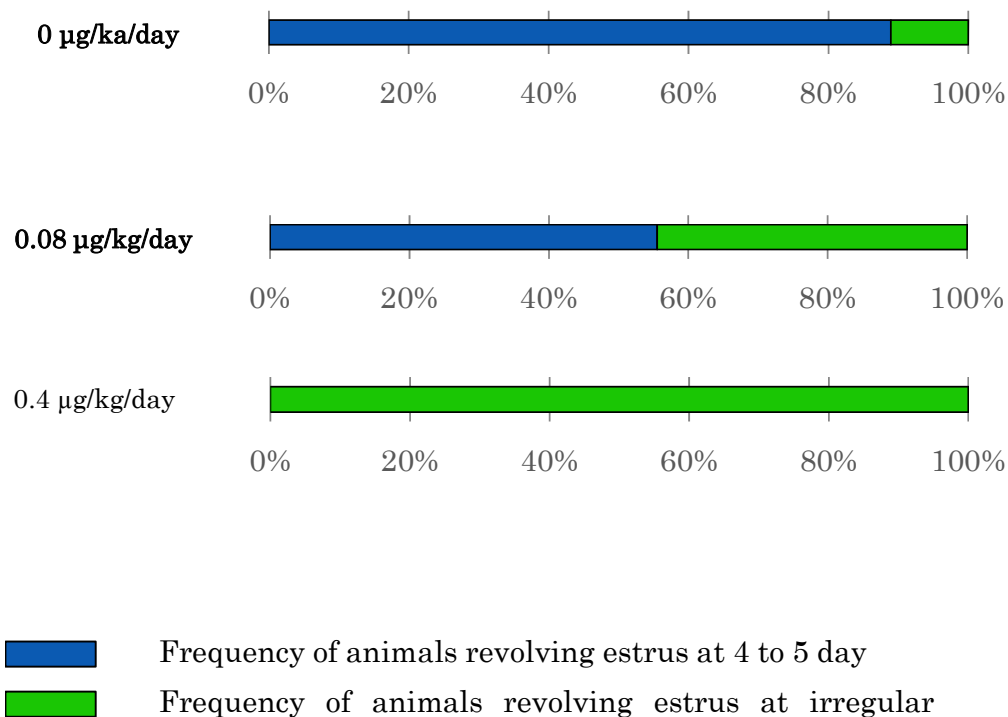


図 21 1日齢から5日間エチニルエストラジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの8~9週齢の性周期

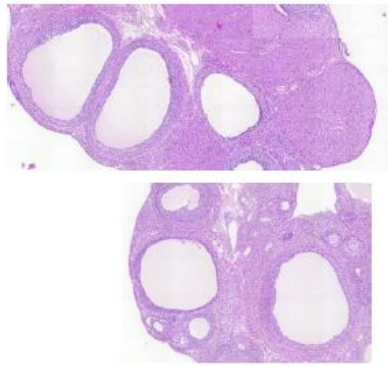


図 22
1日齢から5日間エチルエストロジオール(EE)を反復経口投与した雌ラットの卵巣にみられた
囊胞状卵胞の代表的画像

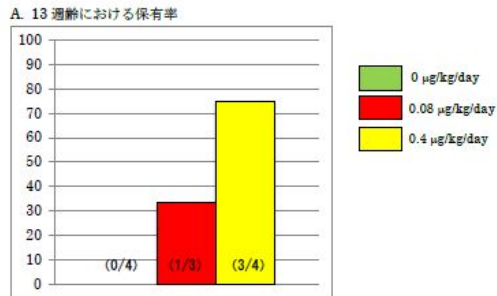


図 23
1日齢から5日間エチルエストロジオールの反復経口投与を受けた雌ラットの13週齢の卵巣に
おける囊胞状卵胞保有率

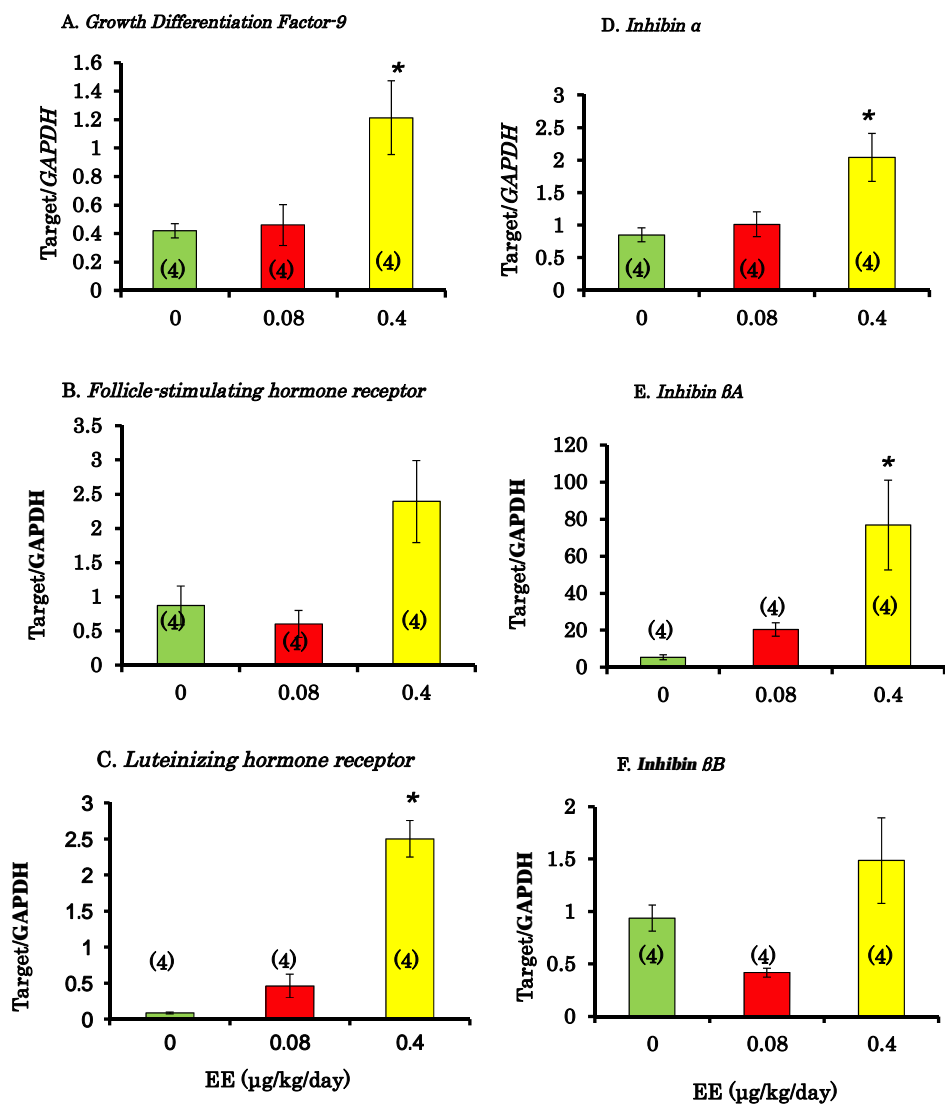
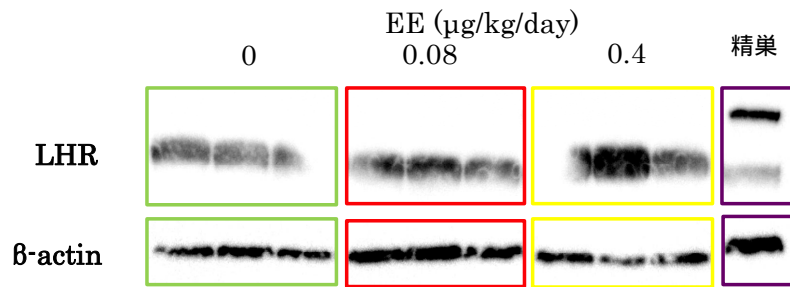


図 24 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオールの (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における卵胞発育関連遺伝子の発現 (平均 \pm 標準誤差, (N)), * $p < 0.05$

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))

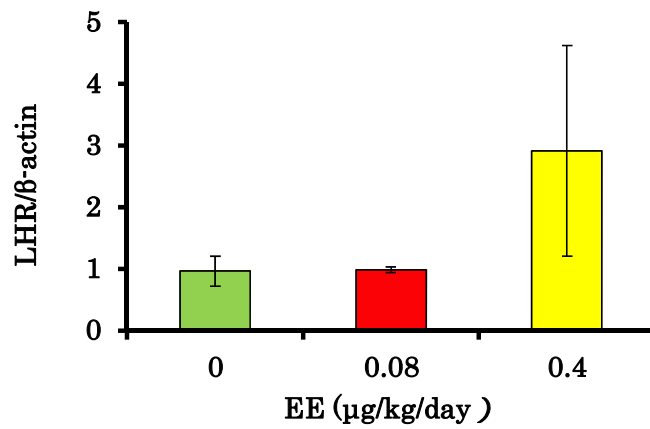


図 25 1 日齢から 5 日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた雌ラットの 13 週齢卵巣における luteinizing hormone 受容体(LHR)タンパク質の発現

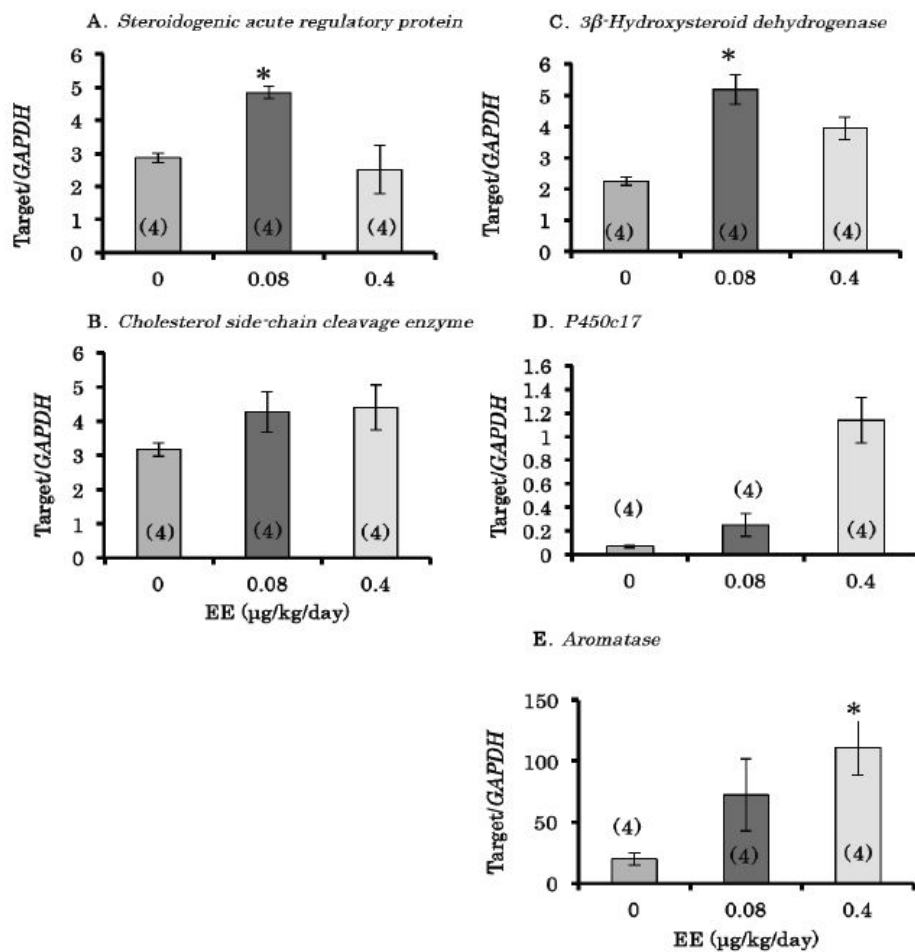
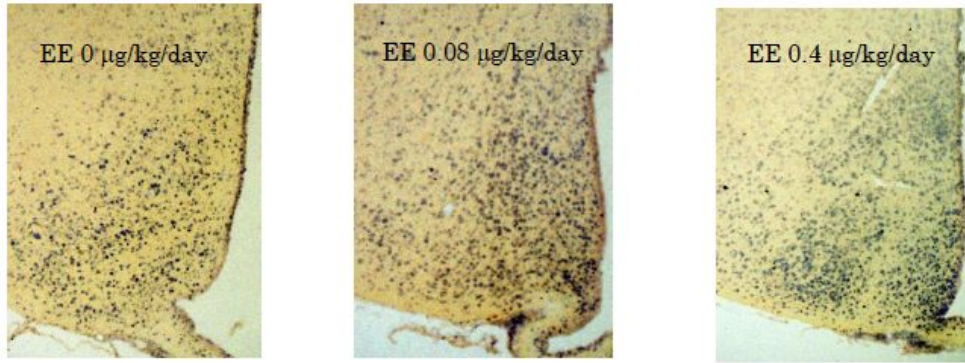


図 26

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

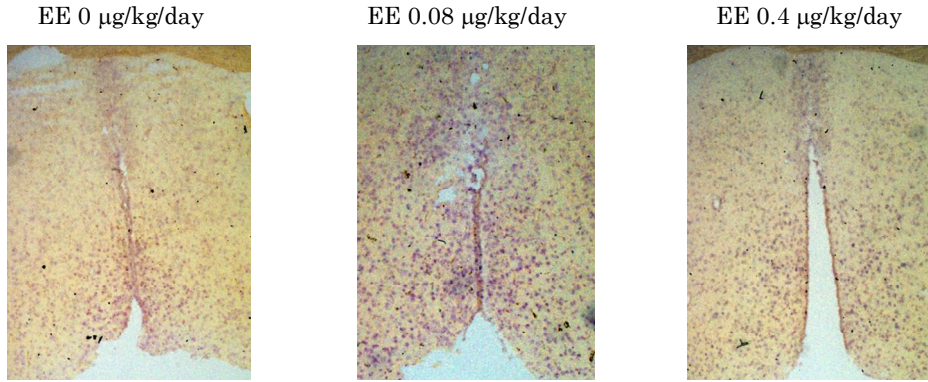
B. *Kiss1* 遺伝子ノックアウトラット (陰性対照)

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

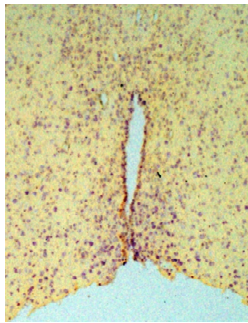
A. 1日齢から5日間エチニルエストラジオール (EE) の反復経口投与を受けた13週齢雌ラット



<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)

Kiss1 ^{-/-}



C. 成熟ラットの子宮 (*ERα* の陽性対照)

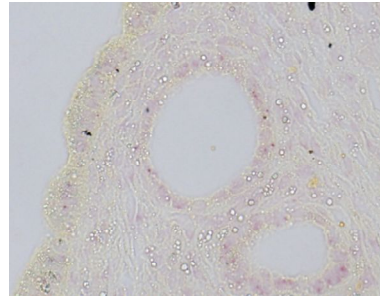


図 28 視床下部前腹側脳室周囲核(AVPV)における *kiss1* 遺伝子 (青色顆粒) およびエストロゲン α 受容体 (*ERα*, 赤色顆粒) の double-labeled *in situ* hybridization

B は *Kiss1* の陰性対照、C は *ERα* の陽性対照

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

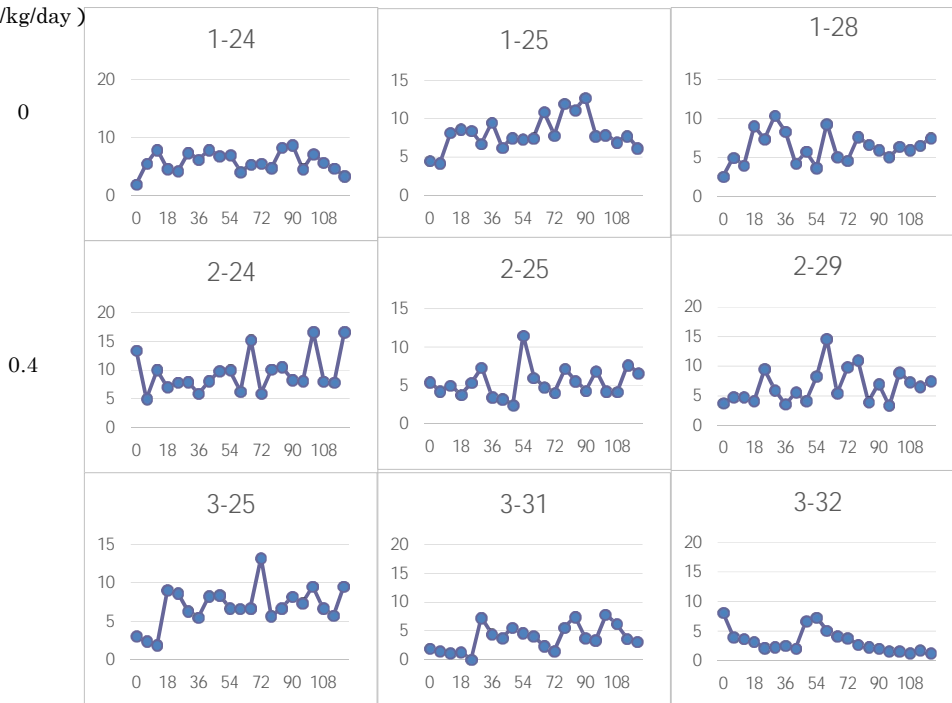


表1 リアルタイム PCR に用いたプライマーおよびプローブ

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
		プローブ		CGCCGAGGAGGGAG
		プライマー	F	CCTGCCGACTTCGCAAGT
<i>Estrogen β receptor (ERβ)</i>	NM 012754		R	CCACACCGTTCTCTCCTGGAT
		プローブ		TTATGAAGTAGGAATGGTCAAGTG
<i>Luteinizing hormone receptor (LHR)</i>	NM 012978	プライマー	F	CCGTCAGGGGTGTAGACAGAGAGT
			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
		プローブ		AGATGCCTGAGCAAAG
<i>Cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc)</i>	J 05156	プライマー	F	TCCCAGCGGTTTCATCGA
			R	GAAATAAGTCTGGAGGCATGTTGA
		プローブ		CCGCTTACCAGATGTT
<i>Steroid 17α-hydroxylase (P450c17)</i>	NM 012753	プライマー	F	TGGCTTTGGTGGTGCACAATC
			R	TGAAAGTTGGTGTTCGGCTGAAG
		プローブ		ATCCAAAAGGAGATTGACCA
<i>Aromatase</i>	M 33986	プライマー	F	GAAACGGTCCGCCCTTTCT
			R	TGGATTCCACACAGACTTCTACCA
		プローブ		ATGAAAGCTCTGACGGGC
<i>3β-hydroxysteroid dehydrogenase (3β-HSD)</i>	L 17138	プライマー	F	AAGTATGCAATGTGCCACCATTT
			R	GCAAAAAGATGGCCGAGAA
		プローブ		CATTGGCTGCCAGCAC
<u>Growth factors, hormones and neurotransmitters</u>				
<i>Growth differentiation factor (GDF)-9</i>	AF 099912	プライマー	F	AGCTCAAATGGGACAACCTGGAT
			R	GGGACAGTCCCCTTTACAGTACCT
		プローブ		CCCCGCACAGATAC
<i>Inhibin/activin βA</i>	M 37482	プライマー	F	CCCAGAGGTGCCTGCTATGT
			R	CATTGCTCCCTCTGGCTATCA
		プローブ		CTTGGGCACTCACCTCACAATAGTTGG
<i>Inhibin/activin βB</i>	NM 080771	プライマー	F	CCCTGGGCGCGTGAA
			R	CGTCATCAAAGTAGAGCATAGACATAGA
		プローブ		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

表6 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 (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of animals determined	7	6
Estrous cycle		
Regular cycle	6	5
Irregular cycle	1	1
Fertility		
Copulated	7	6
Pregnant	7	6

^a corn oil 10 mL/kg/day

表7 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8 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9 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妊娠末期胎児所見

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08
Number of dams examined	7	6
Number of males	6.4 ± 1.5	5.7 ± 1.4
Number of females	7.0 ± 1.8	6.0 ± 1.5
Sex ratio (male %)	52.1 ± 3.5	51.4 ± 4.0
Feral body weight (g)	3.6 ± 0.1	3.9 ± 0.1*
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 ± 7.6	48.8 ± 7.8*
Left forelimb phalanx (V)	17.4 ± 6.4	39.8 ± 8.8
Starnebra (II)	98.9 ± 1.0	100 ± 0
Starnebra (III)	98.9 ± 1.0	100 ± 0
Starnebra (IV)	96.7 ± 3.1	98.5 ± 1.4
Starnebra (V)	41.1 ± 13.0	76.8 ± 6.5
Starnebra (VI)	24.8 ± 11.0	57.2 ± 11.3
Number of ossified caudal and sacral vertebrae	7.69 ± 0.24	8.37 ± 0.09*

^a corn oil 10 mL/kg/day

* p<0.05

表 10 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（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	9	10	11
眼瞼開裂（日齢）	13.6 ± 0.5	13.5 ± 0.9	13.4 ± 0.7

表 11 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
13週齢における器官重量（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.08	0.4
N	9	10	9
Pituitary (mg)	13.8 ± 1.1	17.1 ± 1.0	21.3 ± 3.6**
Ovaries (mg)	94.4 ± 18.6	98.3 ± 14.7	57.8 ± 6.1**
Uterus (mg)	525 ± 56	493 ± 19	441 ± 93**

^a corn oil 10 mL/kg/day

** p<0.01

表 12 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
14週齢におけるパルス状 LH 分泌のパラメーター（平均±標準偏差）

EE (μg/kg/day)	0 ^a	0.4	2
N	3	3	3
Mean LH	6.72 ± 1.22	7.20 ± 2.06	4.91 ± 1.88
Basal LH	5.36 ± 1.12	5.56 ± 1.88	3.64 ± 1.77
Frequency	4.0 ± 0.0	5.0 ± 1.0	3.3 ± 1.2
Amplitude	3.65 ± 0.28	5.35 ± 1.18*	4.16 ± 0.32

動物は10週齢で両側卵巣を摘出し、13週齢で装着した頸静脈カニューレから頻回採血した。

^a corn oil 10 mL/kg/day

* p<0.05