

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：遅発影響の発現機序検索。特に視床下部LHサージ制御部位の  
キスペプチンの変化と生殖機能遅発影響について

研究分担者：井上 薫 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
研究協力者：市村亮平 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部  
研究協力者：森川朋美 所属 国立医薬品食品衛生研究所病理部

### 研究要旨

化学物質の臨界期曝露による雌性生殖器の遅発影響について、その発現機序における受容体の役割を明確すること、遅発影響のリスク評価に有用な早期指標を確立することを目指し、(1) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響、(2) 新生児期エストロゲン曝露が LH サージにおよぼす影響、(3) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化、(4) 遅発影響と子宮肥大試験の関連について検討を行った。その結果、(1) ER $\beta$  アゴニストである DPN や ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI の新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響を生じる化学物質は ER $\alpha$  アゴニストに限らない可能性が示唆された。(2) 新生児期に EE あるいは PPT の曝露を受けたラットでは、性周期異常の発現に先行して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出され、遅発影響の発現には排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが重要な役割を持つことが示された。(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。(4) 遅発影響量の EE (20、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の新生児期曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。DPN はごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示された。子宮肥大試験と遅発影響の発現が一致しない場合もあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

### A. 研究目的

化学物質の臨界期曝露による遅発影響は、現行の毒性試験では検出が困難であり、リスク評価上の課題となっている。

先行研究では、生後 0 日の雌性 Wistar Hannover ラットに 0.02~200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) を単回皮下投与すると、遅発影響として 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  以上で用量依存性に性周期 (=排卵) 停止の早期化を起こすことを示し (Takahashi et al., 2013)、その機序に視床下部において生殖機能を制御するキスペプチンの関与が推察された。また、エストロゲン受容体 (ER)  $\alpha$  アゴニストである 4,4',4"- (4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol (PPT)、ER $\beta$  アゴニストである 2,3-bis

(4-Hydroxyphenyl)-propionitrile (DPN) を用いた検討から、遅発影響の発現には ER $\alpha$  が主要な役割を持つことは明らかであるが、ER $\beta$  の関与を完全に否定するには至っていない。

本研究では、遅発影響の発現機序として特に受容体の役割を明確すること、遅発影響のリスク評価に有用な早期指標を確立することを目指し、(1) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響、(2) 新生児期エストロゲン曝露が LH サージにおよぼす影響、(3) ER アゴニストおよびアンタゴニストの新生児期曝露による初期変化、(4) 遅発影響と子宮肥大試験の関連について検討を行った。

## B. 研究方法

### B-1. ER $\alpha$ / $\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

所内で維持している Donryu ラットを使用した。腹ごとの遺伝的影響を平均化するため、自然分娩後 24 時間以内に児動物を全て回収・混合した。雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた後、以下の処置を行った。

実験①：10% DMSO/sesame oil、PPT 10 mg/kg (Tocris Bioscience, UK, CAS No. 263717-53-9)、DPN 10 mg/kg (Tocris Bioscience, CAS No. 1428-67-7) を 1 回皮下投与 (溶媒対照群、PPT 群、DPN 群)、あるいは PPT 10 mg/kg および DPN 10 mg/kg を各 1 回皮下投与 (PPT+DPN 群)。

実験②：Sesami oil (溶媒対照)、ICI 182,780 (ICI, Sigma, CAS No. 129453-61-8) 500 および 5,000  $\mu$ g/kg を 1 回皮下投与。

雌児動物 (30~36 匹/群) は生後 21 日で離乳し、体重、膻開口日齢および性周期の観察 (7 週から 23 あるいは 25 週齢まで) を行った。性周期の判定は、週 5 日膻スミアを採取し 4・5 日周期で定期的に発情が回帰する場合を正常性周期、それ以外を異常性周期に分類した。特に発情前期あるいは発情期が 5 日間連続した場合を持続発情とした。実験①では、性周期の観察後全ての動物を解剖し、雌性生殖器の重量測定および組織学的検索を実施した。

### B-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験①において、10 週齢時に正常性周期を示す動物の中から発情前期の個体を各群 5 匹選抜し、サージピーク時刻である 16:00 における血清黄体形成ホルモン (LH) 濃度測定、視床下部前部および後部における Kiss1 mRNA の発現解析、雌性生殖器の組織学的検索を行った。

実験③：生後 0 日齢の雌性 Donryu ラット (各群 30 匹) に sesame oil (対照群)、EE (0.02、0.2、20  $\mu$ g/kg)、PPT (1,000  $\mu$ g/kg)、DPN (1,000  $\mu$ g/kg) を 1 回皮下投与した。正常性周期を示す 10 週齢時に卵巣を摘出し、その翌週に LH サージの誘起を行った。血清 LH 濃度および視床下部前部/後部 (前腹側室周囲核 (AVPV)/弓状核 (ARC) 相当部位) における Kiss1

mRNA の発現を経時的に解析した。加齢性変化と比較するため、20 週齢の雌ラット (性周期を回帰する middle(N)群、性周期が停止している middle(PE)群) についても同様の検索を実施した。

### B-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

先行研究と合わせて、実験④では Wistar Hannover GALAS ラット (日本クレア、東京)、実験⑤では Donryu ラットを使用した。自然分娩後 24 時間以内に児動物を全て回収・混合し、雌児動物を優先的に 8 匹/腹に割り付けた。

実験④では EE (無影響量; 0.002、0.02  $\mu$ g/kg、遅発影響量; 0.2、20  $\mu$ g/kg、脱雌性化量; 2,000  $\mu$ g/kg) を 1 回皮下投与し、対照群には溶媒である sesame oil を投与した。

実験⑤では 10%DMSO/sesame oil (溶媒対照群)、PPT 1,000  $\mu$ g/kg (PPT 群)、DPN 10,000  $\mu$ g/kg (DPN 群) および ICI 182,780 500  $\mu$ g/kg (ICI 群) を 1 回皮下投与した。PPT および DPN の投与用量は性周期停止の早期化を起こす用量を選択し、ICI 182,780 は予備検討で実施した子宮肥大試験において、EE による子宮重量増加を完全に抑制する用量を用いた。

各群 5 匹の動物について、生後 9 (または 12)、14、21 日に血清卵胞刺激ホルモン (FSH) 濃度測定、生後 14、21 日に視床下部前部/後部における Kiss1 mRNA 発現解析、雌性生殖器の組織学的検索を行った。

### B-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

実験⑥：子宮のエストロゲン感受性に対する新生児期エストロゲン曝露の影響を検討するため、0 日齢の雌性 Donryu ラット 80 匹に EE 0、20、200、2,000  $\mu$ g/kg (20 匹/群) を 1 回皮下投与した。22 日齢にそれぞれ 3~5 匹ずつ EE 0、0.002、0.02、0.2  $\mu$ g/kg を 1 回皮下投与し、その 24 時間における子宮重量を測定した (幼若動物を用いた子宮肥大試験)。

実験⑦：PPT および DPN の in vivo エストロゲン活性を確認するため、Donryu ラットを用いて OVX 成熟動物法 (OECD TG 440) による子宮肥大試験を実施した。

### B-5. 血清ホルモン濃度測定

LH および FSH 濃度は、凍結保存した血清を用いて、National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (National Institutes of Health [NIH], Bethesda, MD) から提供されたラジオイムノアッセイキットを使用して測定した (Taya et al., 1983)。

#### B-6. 遺伝子発現解析

凍結視床下部組織から Isogen (NIPPON GENE CO., LTD, 東京) を用いて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, USA, CA) による逆転写反応後、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystems) を使用して real-time PCR を実施した。Primer および probe は TaqMan Gene Expression Assay として提供されている以下のものを使用した。Kiss-1 metastasis-suppressor (Kiss1): Rn0071\_0914\_ml、KISS1 receptor (Kiss1R): Rn0057\_6940\_ml、FBJ osteosarcoma oncogene (c-fos): Rn00487426\_g1、estrogen receptor alpha (ER alpha): Rn01640372\_ml、estrogen receptor beta (ER beta): Rn00562610\_ml。内部標準には GAPDH を用いた。各遺伝子の発現量は標準曲線より算出し、GAPDH との相対値を求めた。

#### B-7. 統計学的解析

体重、臓器重量、血清ホルモン濃度、子宮腺の数、遺伝子発現量、膣開口日齢および子宮内膜細胞丈は各群の分散を Bartlett の方法で検定し、等分散の場合は一元配置の分散分析、不等分散の場合は Kruskal-Wallis の方法により検定を行った。群間に有意差が認められた場合の多重比較は Dunnett の方法で対照群との間で有意差検定を行った。実験⑦では陽性対照である EE 群を除き、PPT 群、DPN 群を分けて、それぞれ対照群と比較した。正常性周期の割合および病理所見の発生率は Fisher の直接確率法で検定した。

(倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。

### C. 研究結果

#### C-1. ER $\alpha$ / $\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

実験①：膣開口日齢に投与による影響は認められなかった。性周期の観察において、PPT 群では 7 週から異常性周期を示す動物が一部に認められ、10 週以降急激に正常性周期の割合が減少し、19 週以降ではほぼ全例が持続発情を示した (図 1A)。PPT+DPN 群においてもほぼ同様の推移を示した。DPN 群では 11 週まで全例が正常性周期であったが、13 週から性周期の延長や持続発情を示す個体が出現し、15 週以降正常性周期の割合は照群に比べて有意に低下した。最終解剖では、PPT 群、DPN 群、PPT+DPN 群では卵巣重量の有意な低下がみられ、組織学的には黄体の減少/欠失、嚢胞状卵胞が観察された (表 1)。子宮では intraluminal hyperplasia や扁平上皮化生が高頻度に認められ、PPT+DPN 群では子宮内膜限局性過形成が増加傾向を示した。

実験②：膣開口の平均日齢は ICI 群で用量相関性に早まったが (対照群:  $28.0 \pm 0.8$ 、500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群:  $27.6 \pm 0.6$ 、5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群:  $27.3 \pm 0.5$ )、観察期間が生後 27~30 日に限られていたため、膣開口に対する影響は再度検討する必要があると考えられた。ICI 5,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、生後 13 週以降持続発情を示す個体が増え、19 週以降では対照群と比べて正常性周期の割合が有意に低下した (図 1B)。ICI 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、正常性周期の割合は対照群とほぼ同様の推移を示した。

#### C-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験①：サージピーク時 (16:00) の血清 LH 濃度は、統計学的有意差は検出されなかったが、PPT+DPN 群で低値傾向を示した (図 2A)。PPT 群および PPT+DPN 群において、視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現が有意に低下した (図 2B)。視床下部後部 (図 2B) および Kiss1R mRNA (data not shown) の発現に群間差はみられなかった。

実験③：EE 0.02  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群を除いて、LH サージピークが低下する傾向がみられ、対照群がピークに達した 16:00 では、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群および middle-age 群において有意な低値が認め

られた (図 3AB)。PPT および DPN 群においても、対照群に比べサージピークが低下する傾向がみられた (図 3B)。14:00 の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現量は、EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群および middle-age 群で有意に低下しており (図 3C)、16:00 においても、統計学的有意差はないものの同様の傾向がみられた (図 3D)。視床下部後部では Kiss1 mRNA の発現に群間差は認められなかった。また、サージピーク時 (16:00) の視床下部前部および後部における Kiss1R、c-fos、ER $\alpha$ 、ER $\beta$  の発現には有意な変動は認められなかった (data not shown)。

### C-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

実験④：脱雌性化量群では、他群とは異なる FSH 分泌パターンを示し (図 4A)、生後 14 日における卵巣および子宮重量が対照群に比べて有意に低く、21 日においても同様の傾向がみられた (data not shown)。遅発影響量では、生後 14 日の卵巣、子宮重量が若干低下していたが、21 日では対照群とほぼ同等であった。卵巣/子宮/膣の組織学的検索において、脱雌性化量群では卵胞発育の遅延や膣粘膜上皮の角化細胞出現などが観察された (図 4B)。また、生後 21 日において 0.002  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群を除いた群で、子宮腺の数が対照群よりも有意に減少あるいは減少傾向を示した (図 4C)。

脱雌性化量の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現は、生後 14 および 21 日ともに対照群に比べて著しく低かった (図 4D)。視床下部後部においても、生後 14 日における発現量が対照群に比べて半減しており、雄と類似した発現パターンを示した。無影響量および遅発影響量では、生後 14 および 21 日の視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、生後 21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられた。視床下部後部においては、両日齢とも対照群と差はなかった。Kiss1R については、視床下部の部位、日齢に関わらず、mRNA 発現量に群間差は認められなかった (data not shown)。

実験⑤：PPT および DPN 群では生後 14 日において、卵巣の相対重量の有意な低値がみられたが、血清 FSH 濃度 (図 5A)、卵巣/子宮

/膣の組織像、子宮腺の数 (図 5B)に投与による影響はみられなかった。

視床下部前部では、PPT 群で Kiss1 mRNA 発現レベルがやや低い傾向がみられたものの、生後 14 および 21 日ともに、対照群との間に統計学的有意差はなかった (図 5C)。視床下部後部における Kiss1 mRNA 発現および Kiss1R の発現についても群間差は認められなかった (data not shown)。

### C-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

実験⑥：EE 2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では子宮重量が顕著に低下しており、子宮の発達異常が疑われた。遅発影響量である EE 20、200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響を認めなかった (図 6)。

実験⑦：陽性対照 (EE) 群の子宮重量は溶媒対照群に比べて顕著に増加し、子宮内膜上皮細胞丈の増加も明らかであった。PPT 群の子宮重量は、wet weight では 1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から、blotted weight では 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  から有意な増加を示した (図 7A)。同様に、子宮内膜上皮細胞丈も用量依存性に増加し、1,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  において統計学的有意差が認められた (図 7B)。DPN 群では、PPT 群に比べて増加の程度は小さいが、10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められた。

## D. 考察

### D-1. ER $\alpha/\beta$ アゴニストおよび ER $\alpha$ アンタゴニストの新生児期曝露による遅発影響

PPT より作用は弱いものの、DPN 群においても性周期停止の早期化が認められた。PPT+DPN 群における性周期の停止の発現時期および頻度は、PPT 群とほぼ同等であり、DPN を併合投与したことによる加算、相乗効果は明らかではなかった。DPN は ER $\beta$  選択的アゴニストとして使用されているが (Meyers et al., 2001)、ER $\alpha$  への作用が全く無いとは限らない。実験⑦においてもごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示され、DPN の新生児期曝露による性周期停止の早期化に、DPN の ER $\alpha$  アゴニスト作用が関与した可能性を否定することはできなかった。最終解剖で認められた生殖器の組織学的変化は、先行研究 (Takahashi et al., 2013) と同様に性周期停止の

早期化に付随する二次的変化と考えられた。

ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI の新生児期曝露は遅発影響として性周期停止の早期化を起こすことが確認された。これは Pinilla らの報告と一致する (Pinilla et al., 2002)。ICI は ER $\alpha$  のアンタゴニストだが、特定の条件下ではアゴニスト作用を示すとの報告もある (Robertson et al., 2001; Alfinito et al., 2008)。新生児ラットの視床下部では、ICI がアゴニストとして働いた可能性も考えられるが、詳細な機序についてはさらに検討が必要である。

#### D-2. 新生児期エストロゲン曝露が LH サージに及ぼす影響

実験③において、新生児期に EE 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の曝露を受けた雌ラットでは、加齢ラットと同様に、LH サージピークの低下および視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められ、視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出された。視床下部の変化は性周期異常の発現に先行して生じており、排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが新生児期 EE 曝露の標的の一つであることが示唆された。

高用量の PPT、DPN を用いた検討では (実験①)、LH サージの低下傾向 (PPT+DPN 群)、発情前期の視床下部前部における Kiss1 mRNA 発現低下 (PPT 群および PPT+DPN 群) が認められ、EE の場合と同様に排卵誘起機能が減弱していることが推測された。DPN 10  $\text{mg}/\text{kg}$  や EE 0.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  においても遅発影響として性周期停止の早期化が認められているが、LH サージおよび Kiss1 mRNA 発現への影響は乏しかった。これらの群では性周期停止が起こる時期が比較的遅く、視床下部の変化が顕在化するのには性周期停止が起こる 2~3 週前に限られるのではないかと推測される。

#### D-3. ER アゴニストおよびアンタゴニスト新生児期曝露による初期変化

実験④において、視床下部前部では最も低い用量から Kiss1 mRNA の発現低下がみられ、AVPV の Kiss1 発現ニューロンが EE に対して非常に高い感受性を持つことが示された。視床下部後部における Kiss1 mRNA 発現は、無影響量および遅発影響量では変化がみられず、

ARC は AVPV より影響を受けにくいことが示唆された。

脱雌性化量では、視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現が低いまま維持され、視床下部後部においても生後 14 日の Kiss1 mRNA 発現が雄と同レベルに低下していた。これに伴い FSH 分泌抑制、卵胞および子宮腺の発達抑制、臍上皮の組織学的変化が生じていると考えられ、20~2,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の間に脱雌性化の閾値が存在すると推測された。

無影響量および遅発影響量群においても、生後 14 および 21 日の視床下部前部の Kiss1 mRNA 発現は対照群に比べて大きく低下していたが、21 日では対照群の発現レベルに近づく傾向がみられ、脱雌性化に至らない用量では、Kiss1 mRNA の発現低下は発達期における一時的な変化であると推測された。

PPT、DPN、ICI の新生児期曝露 (実験⑤) では、生後 14 および 21 日の Kiss1 mRNA レベルに群間差は認められなかった。EE では無影響量でも Kiss1 mRNA の発現低下が認められたこと、性周期の早期停止を起こす用量の PPT、DPN では Kiss1 mRNA 発現に影響がなかったことから、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は性成熟後の性周期停止と直接リンクせず、遅発影響の早期指標には適さないと考えられた。EE では先行研究においても生後 14 日における Kiss1 mRNA の発現低下が認められており (Takahashi et al., 2014)、発達期キスペプチンニューロンに対する作用は遅発影響を起こす物質の中でも異なることが示唆された。

#### D-4. 遅発影響と子宮肥大試験の関連

新生児期にエストロゲン曝露を受けたマウス・ラットでは、子宮のエストロゲン反応性や ER $\alpha$  発現が変化すると報告がある (Newbold et al., 2004; Takahashi et al., 2014)、今回の実験条件では、遅発影響量の EE (20, 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) の新生児期曝露は、性成熟前の子宮エストロゲン反応性に明らかな影響をおよぼさないことが示された。

実験⑦において、DPN 群では程度は小さいものの、10,000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  群において子宮重量および子宮内膜上皮細胞丈の有意な増加が認められ、in vivo エストロゲン活性を有することが

示された。したがって高用量の DPN はごく弱いながら ER $\alpha$  作用を示すと考えられた。

EE、PPT、DPN および ICI の性周期への影響と照合すると、DPN や ICI のように子宮肥大試験が弱陽性あるいは陰性であっても EE や PPT と同様に性周期停止の早期化を起こすこともあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

## E. 結論

(1) ER $\beta$  アゴニストである DPN や ER $\alpha$  アンタゴニストである ICI 182,780 の新生児期曝露により性周期停止の早期化が認められ、遅発影響を生じる化学物質は ER $\alpha$  アゴニストに限らない可能性が示唆された。

(2) 新生児期に EE あるいは PPT の曝露を受けたラットでは、性周期異常の発現に先行して視床下部における排卵制御機能が減弱している可能性が見出され、遅発影響の発現には排卵制御に関わる AVPV のキスペプチンニューロンが重要な役割を持つことが示された。

(3) EE の新生児期曝露では、発達期の視床下部前部における Kiss1 mRNA の発現低下が認められたが、PPT、DPN、ICI の新生児期曝露では Kiss1 mRNA の発現に影響はなく、発達期における Kiss1 mRNA の発現低下は遅発影響の発現とは直結しないと考えられた。

(4) 遅発影響量の EE (20, 200  $\mu$ g/kg) の新生児期曝露では、性成熟前における子宮のエストロゲン反応性に明らかな影響は認められなかった。DPN は、ごく弱いながら ER $\alpha$  作用を有することが示された。子宮肥大試験と遅発影響の発現が一致しない場合もあり、子宮肥大試験の結果を遅発影響の予測に用いるのは難しいと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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 $\alpha$ -ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, 40, 16-23, 2013.
- 2) Matsuo S, Takahashi M, Inoue K, Tamura K, Irie K, Kodama Y, Nishikawa A, Yoshida M. Thickened area of external granular layer and

Ki-67 positive focus are early events of medulloblastoma in Ptch1<sup>+/+</sup> mice. *Exp Toxicol Pathol.*, 65, 863-73, 2013.

- 3) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, 39, 775-784, 2014.
- 4) Ichimura R, Takahashi M, Morikawa T, Inoue K, Kuwata K, Usuda K, Yokosuka M, Watanabe G, Yoshida M.: The Critical Hormone-Sensitive Window for the Development of Delayed Effects Extends to 10 Days after Birth in Female Rats Postnatally Exposed to 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol. *Biol Reprod.*, 93, 32, 2015.
- 5) Takahashi M, Ichimura R, Inoue K, Morikawa T, Watanabe G, Yoshida M.: The impact of neonatal exposure to 17 $\alpha$ -ethynylestradiol on the development of kisspeptin neurons in female rats. *Reprod. Toxicol.*, 60, 33-38, 2016.

### 2. 学会発表

- 1) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod Dhakal, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: EE の臨界期曝露による遅発影響が LH サージおよび kiss1 mRNA 発現に及ぼす影響: 第 30 回日本毒性病理学会 (2014. 1)
- 2) 高橋美和: 遅発性影響のメカニズムに迫る-神経内分泌側面から-: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 3) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, Pramod DHAKAL, 井上薫, 前田潤, 吉田緑, 渡辺元: Ethynyl estradiol 臨界期曝露による遅発影響に先行する視床下部キスペプチンニューロンの異常: 第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014.7)
- 4) 高橋美和, 立野知世, 石田雄二, 井上薫, 吉田緑: ヒト肝細胞キメラマウス(PXB マウス)における卵胞発育不全: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 5) 市村亮平, 高橋美和, 森川朋美, 井上薫, 白田賢人, 渡辺元, 吉田緑: Ethynyl estradiol の新生児期曝露による遅発影響の感受期の検索: 第 31 回日本毒性病理学会学術集会 (2015.1)
- 6) 高橋美和, 市村亮平, 井上薫, 森川朋美, 渡辺元, 吉田緑: 17 $\alpha$ -ethynylestradiol (EE) 新生児期曝露による発達期視床下部の kiss1 発現低下: 第 42 回日本毒性学会学術年会 (2015.6)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 参考文献

- 1) Alfinito PD, Chen X, Atherton J, Cosmi S, Deecher DC. ICI 182,780 penetrates brain and hypothalamic tissue and has functional effects in the brain after systemic dosing. *Endocrinology*, **149**, 5219-5226, 2008.
- 2) Meyers MJ, Sun J, Carlson KE, Marriner GA, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA. Estrogen receptor-beta potency-selective ligands: structure- activity relationship studies of diarylpropionitriles and their acetylene and polar analogues. *J Med Chem.*, **44**, 4230-4251, 2001.
- 3) Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Haseman J. Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol.*, **18**, 399-406, 2004.
- 4) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS (TG440): Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties, 2007.
- 5) Pinilla L, Barreiro ML, Gonzalez LC, Tena-Sempere M, Aguilar E. Comparative effects of testosterone propionate, oestradiol benzoate, ICI 182,780, tamoxifen and raloxifene on hypothalamic differentiation in the female rat. *J Endocrinol.*, **172**, 441-448, 2002.
- 6) Robertson JA, Zhang Y, Ing NH. ICI 182,780 acts as a partial agonist and antagonist of estradiol effects in specific cells of the sheep uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **77**, 281-287, 2001.
- 7) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M. Early indicators of delayed adverse effects in female reproductive organs in rats receiving neonatal exposure to 17alpha-ethynylestradiol. *J Toxicol Sci.*, **39**, 775-784, 2014.
- 8) Takahashi M, Inoue K, Morikawa T, Matsuo S, Hayashi S, Tamura K, Watanabe G, Taya K, Yoshida M.: Delayed effects of neonatal exposure to 17alpha- ethynylestradiol on the estrous cycle and uterine carcinogenesis in Wistar Hannover GALAS rats. *Reprod Toxicol.*, **40**, 16-23, 2013.
- 9) Taya K, Mizokawa T, Matsui T, Sasamoto S.: Induction of superovulation in prepubertal female rats by anterior pituitary transplants. *J Reprod Fertil.*, **69**, 265-270, 1983.

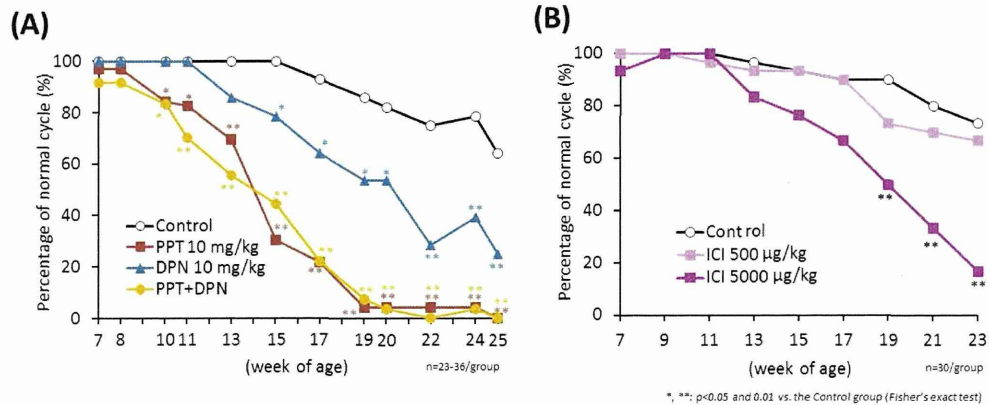


図1. PPTおよびDPN (A)、ICI 182,780 (B) 新生児曝露ラットにおける正常性周期の割合の推移

表1. PPTおよびDPN新生児期曝露ラットの26週齢における卵巣・子宮重量と組織所見

Organs	Findings	Group	Control	PPT	DPN	PPT+DPN
	No. of animals examined		28	23	28	27
Ovary	Absolute weight (mg)		71.4 ± 18.6 <sup>a</sup>	43.5 ± 9.9 <sup>**</sup>	54.1 ± 16.1 <sup>*</sup>	40.2 ± 6.9 <sup>**</sup>
	Relative weight (mg%)		24.2 ± 6.9	13.4 ± 3.5 <sup>**</sup>	17.0 ± 6.1 <sup>*</sup>	12.2 ± 2.4 <sup>**</sup>
	Loss or marked decrease of CL		5 (17.9 %)	22 (95.7 %) <sup>##</sup>	15 (53.6 %) <sup>#</sup>	26 (96.3 %) <sup>##</sup>
	Follicular cyst		7 (25.0 %)	23 (100 %) <sup>##</sup>	26 (92.9 %) <sup>##</sup>	27 (100 %) <sup>##</sup>
Uterus	Absolute weight (g)		0.79 ± 0.33	0.72 ± 0.06	0.83 ± 0.23	0.79 ± 0.10
	Relative weight (g%)		0.26 ± 0.12	0.22 ± 0.03	0.26 ± 0.07	0.24 ± 0.03
	Focal hyperplasia		0 (0 %)	2 (8.7 %)	1 (3.6 %)	4 (14.8 %)
	Intraluminal hyperplasia		4 (14.3 %)	21 (91.3 %) <sup>##</sup>	13 (46.4 %) <sup>#</sup>	22 (81.5 %) <sup>##</sup>
	Squamous cell metaplasia		3 (10.7 %)	22 (95.7 %) <sup>##</sup>	13 (46.4 %) <sup>##</sup>	22 (81.5 %) <sup>##</sup>

a: mean ± SD  
 CL: corpus luteum  
 \*, \*\*: p<0.05 and 0.01 vs. the control group (Dunnett's test)  
 #, ##: p<0.05 and 0.01 vs. the control group (Fisher's exact test)



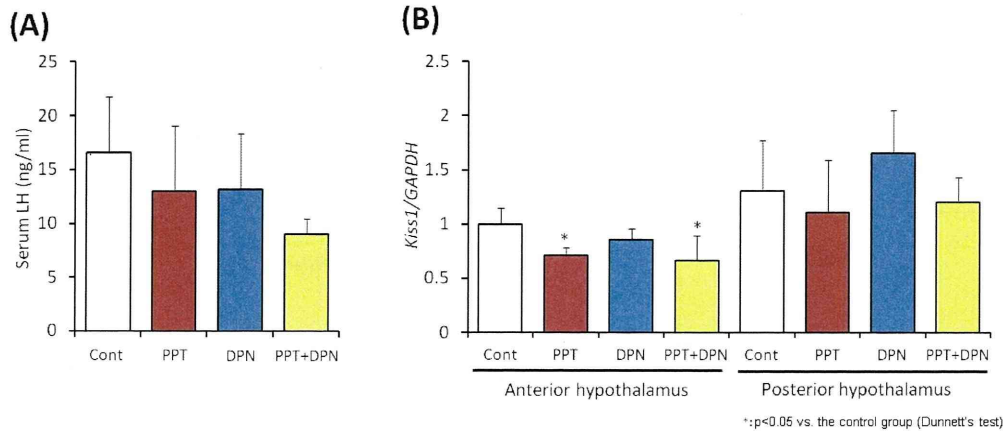


図2. PPTおよびDPNの新生児曝露を受けたラットの発情前期(16:00)における血清LH濃度 (A)、視床下部Kiss1 mRNA発現 (B)

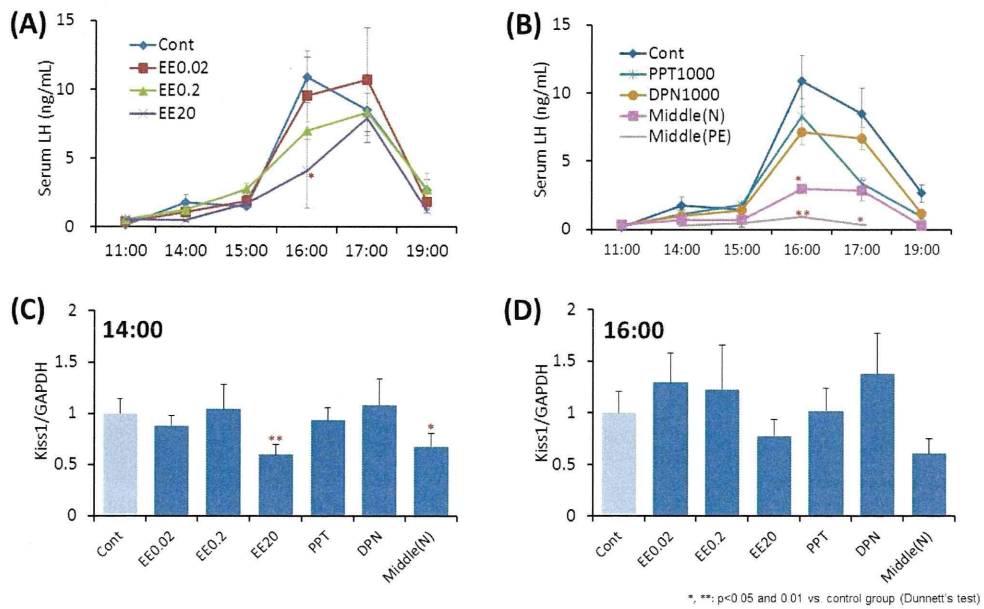


図3. 新生児期エストロゲン曝露ラットおよび加齢ラットにおけるLHサージ (A, B)と14:00 (C)および16:00 (D)の視床下部前部におけるKiss1 mRNA発現

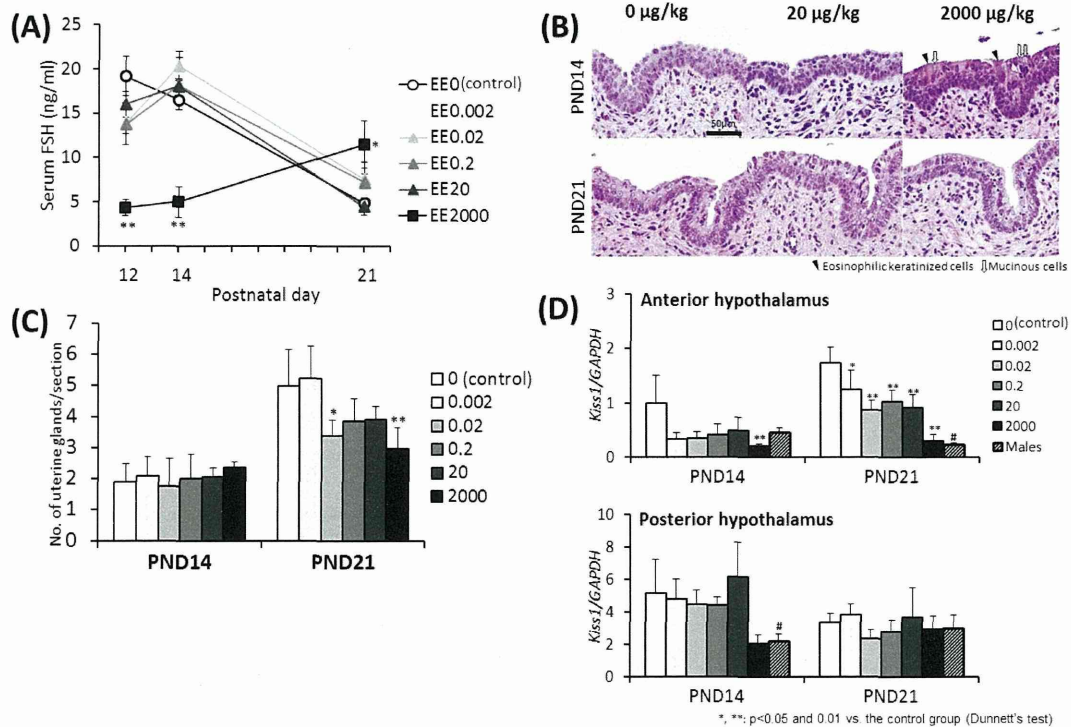


図4. EE新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度(A)、膣の組織像(B)、子宮腺の数(C)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現(D)

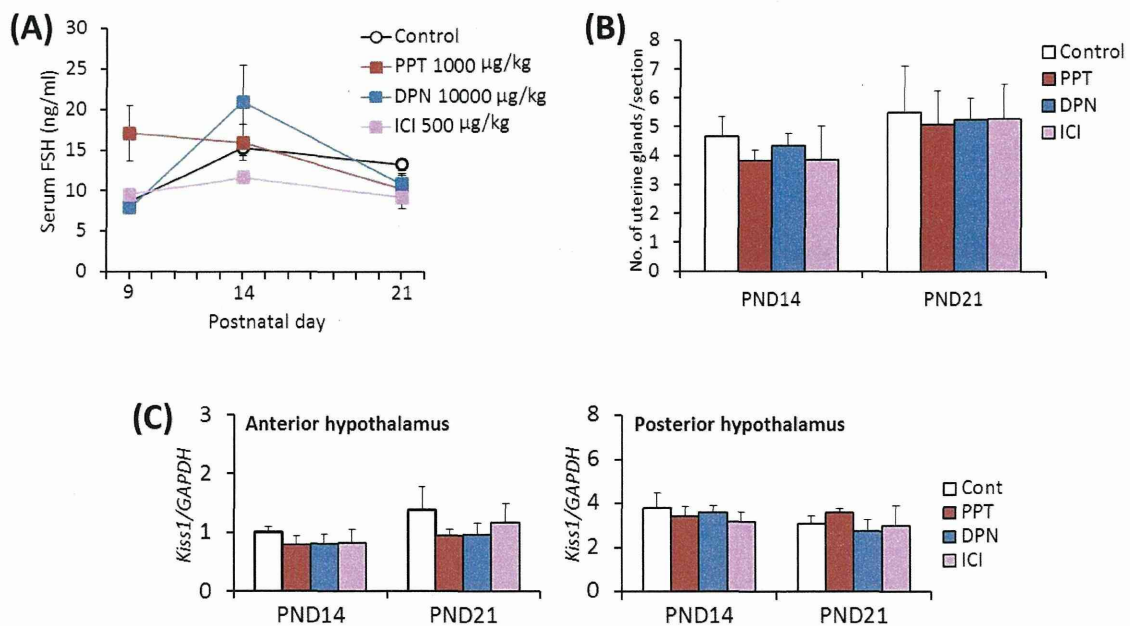


図5. PPT、DPN、ICI新生児期曝露ラットにおける離乳前の血清FSH濃度(A)、子宮腺の数(B)、視床下部前部/後部におけるKiss1 mRNA発現(C)

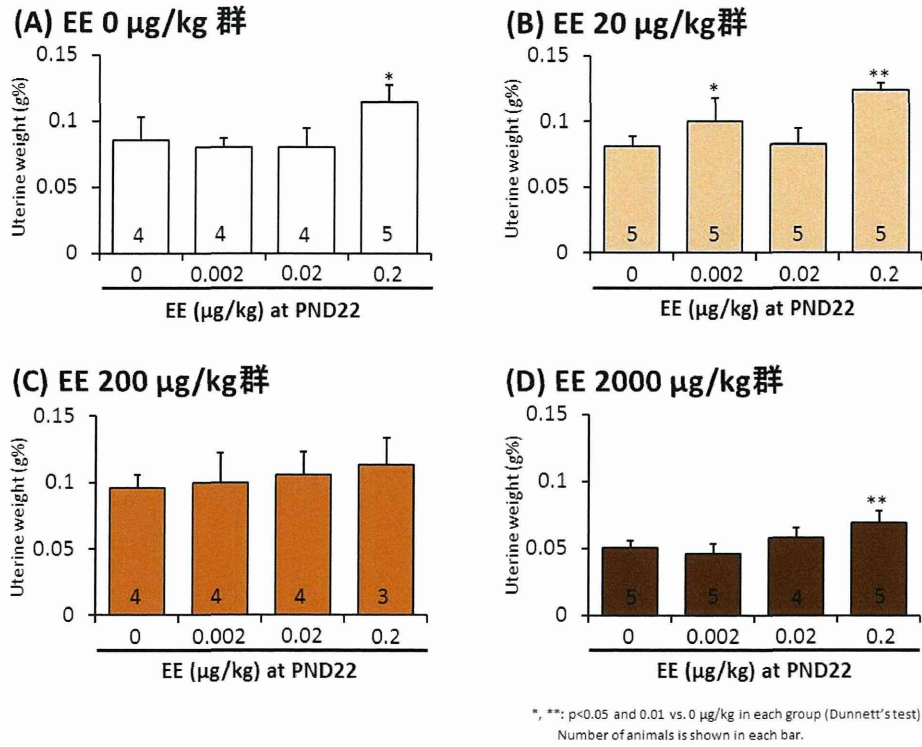


図6. EEの新生児期曝露を受けたラットによる子宮肥大試験

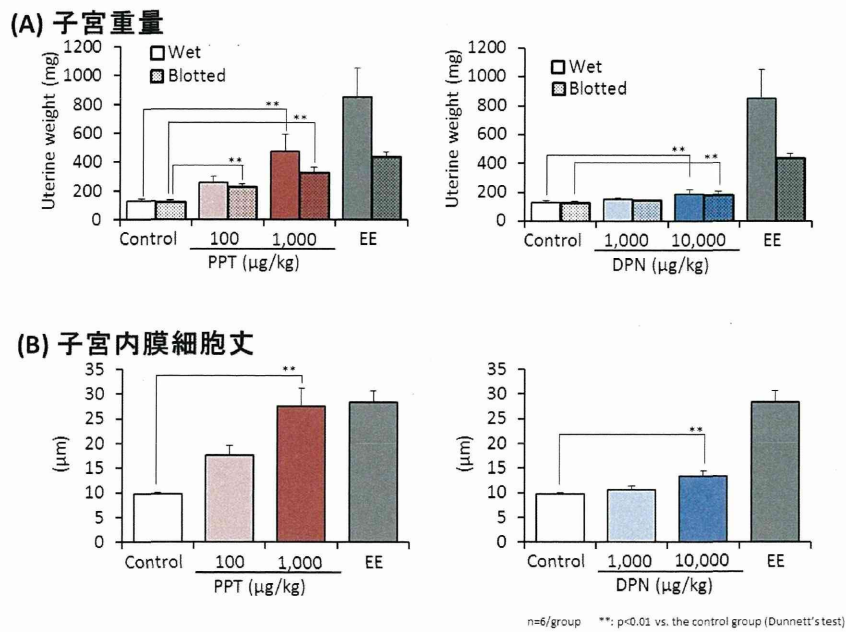


図7. PPTおよびDPNの子宮肥大試験における子宮重量 (A) および子宮内膜細胞丈 (B)

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：	東村	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 $\alpha$ -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 $\alpha$*  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  $\kappa$  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 回の投与液量が 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*<sup>-/-</sup>)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 では上記のほかに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°C 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) 膣開口の観察

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。

##### (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



回帰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日以上連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°C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。

#### (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 RNAlater® Solution (Thermo Fisher Scientific, CA, USA) に浸漬し、冷蔵保存した。遺伝子発現の観察あるいは脳の部位特定に供する動物は、冷却麻酔下でリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) により全身還流を行い放血後、4%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、冷蔵庫内で一晩固定した。

(ウ) 視床下部における性腺刺激ホルモン放出ホルモン関連遺伝子発現の定量

反復経口投与および単回経口投与の動物について実施した。

#### ① 視床下部および上部領域の切り出し

RNAlater 中に保存した脳は実体顕微鏡下で、ブレインマトリックス (RODENT BRAIN MATRIX Rat, 200-400 g, Colonal, ASI INSTRUMENTS, USA) を用いて視床下部と中脳との境界から視交叉までを含む領域を切り出し、次に乳頭体の左右の隆起を境界として外側領域を切り落として、さらに冠断面より前交連から視床下部領域とそれより上部の領域とに分割して、ER $\alpha$  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。

#### ② 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) および細胞破碎装置用ビーズ (ジルコニア 2.0 $\phi$ 、トミー精工、東京) とともに入れ、冷却型ビーズ式細胞破碎装置 MS-100R (トミー精工、東京) によって 4000 rpm、4°C 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°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°C 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°C 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°C 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  $\mu$ g/mL に調製し、-80°C で保存した。

#### ③ Real-Time RT-PCR

逆転写に先立ち、total RNA 溶液を deoxyribonuclease I (Amplification Grade、Life Technologies Corporation) で処理しゲノム DNA を除去した。逆転写のプライマーにはランダムプライマーを用い、Taqman® Reverse Transcription Reagents (Life Technologies Corporation) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として StepOne™ Real Time PCR System (Life Technologies Corporation) を用い、TaqMan プローブ法による real-time PCR を行った。

定量解析の対象には、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ 、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  $\kappa$  オピオイド受容体をコードする *Opioid receptor kappa 1 (Oprk1)*、NKB をコードする *Tac3*、ならびに NKB 受容体をコードする *Tacr3* を選択した。各遺伝子の発現量は GAPDH mRNA で補正した相対発現量として求めた。使用したプローブおよびプライマーを表 1 に示す。

#### ① 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  $\mu$ 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<sup>th</sup> 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)。

## ② 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  $\mu\text{m}$  間隔で 10  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  間隔で 10  $\mu\text{m}$  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  $^{\circ}\text{C}$ 、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  $^{\circ}\text{C}$  で 150 分間行い、陰性対照には、10 日齢の *Kiss1*<sup>-/-</sup> 雌の脳組織標本を用いた。

## ④ 視床下部 ARC および AVPV 領域における *ER $\alpha$* の *in situ* hybridization

上記③と同じ条件で pretreatment および protease 処理を行い、*ER $\alpha$*  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$ 、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  $^{\circ}\text{C}$  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  $\mu\text{m}$  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  $\phi$ 3.2」を用いた他は、前記(4)-ウ) ②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) ③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 $\beta$ 、インヒビンの各サブユニット (Inhibin  $\alpha$ 、 $\beta$ A、 $\beta$ 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 (P450sc), さらに細胞質でプレゲネ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 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ -HSD) および P450c17、ならびに顆粒層細胞でテストステロンを基質として17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) 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

##### ① タンパク質の抽出

凍結した23日齢の卵巣から RIPA バッファー (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10 mLの RIPA バッファーを加え、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  $\mu$ L 加え、氷上で15分間インキュベートした。その後15,000 g、4  $^{\circ}$ C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。

##### ② Western Blotting

タンパク質10  $\mu$ g 分のサンプルに水を加えて5  $\mu$ L に合わせ、2 $\times$ サンプルバッファーを5  $\mu$ L 加え100  $^{\circ}$ C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20 mA で80分間電気泳動した。電気泳動後、セミドライ式ブロットング装置 (WSE-4020、アトー、東京) を用いて152 mA で30分間通電し、PVDFメンブレン (WSE-4051、アトー、東京) にブロットングした。ブロットング終了後、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- $\beta$ -actin (#4967, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) をそれぞれ1:1000に希釈して用い、4 $^{\circ}$ C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<sup>+</sup> 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、Limnata 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 $\beta$ -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 E<sub>2</sub> 濃度測定

田谷らの方法[田谷ら、1985]に従い、23日齢の血清中 E<sub>2</sub> 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 E<sub>2</sub> 血清 (GDN#244) を用いた。また、標識ホルモンには<sup>125</sup>I 標識 E<sub>2</sub> (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 *ERα* 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、 $-80^{\circ}\text{C}$  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、 $4\ \mu\text{m}$  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。

(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  $\phi 3.2$ 」を用いた他は、前記(4)-ウ) ②に記した方法で行った。

(コ) Real-time RT-PCR (実験 4-1)

前記(4)-ウ) ③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) ①および②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, 6<sup>th</sup> 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、 $20\ \mu\text{m}$  ごとに  $10\ \mu\text{m}$  厚で薄切して、各サンプル 3 枚の切片を *Kiss1* 及び *ERα* 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  $40^{\circ}\text{C}$  で 15 分間行い、ハイブリダイゼーションは  $40^{\circ}\text{C}$  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  $100\ \mu\text{L}$  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  $-20^{\circ}\text{C}$  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  $\gamma$  グロブリンヤギ血清 #42-99318)。標識抗原は rat LH-1-5 をクロラミ

ンT法により  $^{125}\text{I}$  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東村博子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膣開口日齢に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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  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