

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890085

研究課題名(和文)胎生期DEHP曝露による仔の栄養状態と海馬・視床下部に及ぼす影響

研究課題名(英文)Effect of fetal exposure to DEHP on nutrition status, hippocampus and hypothalamus in offspring

研究代表者

林 由美 (HAYASHI, Yumi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30632707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)曝露は、新生仔のグルコース濃度を減少させ、低栄養状態を引き起こした。また、グルコースが重要な栄養源となる脳での影響を検討したところ、記憶に関わる因子がDEHP曝露によって変化した。また、離乳後に高脂肪食を摂取すると、記憶に関わる多くの因子が変化しており、食事環境による影響が認められた。これらのことから、胎生期DEHP曝露は低栄養状態を引き起こし、成長後の脳へ影響を与える可能性が考えられた。これらのメカニズムについては更なる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：Exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) during fetal periods decreased glucose concentration in neonatal mice, and lead to malnutrition. In addition, we examined the effect of DEHP on the brain, because glucose is significant source of nutrient. DEHP exposure changed the factors involved in memory. Furthermore, high fat diet also changed more factors, which may indicate that dietary environment effect on memory. Taken together, fetal exposure to DEHP may induce malnutrition in offspring, and effect on the brain during mature stage. We must carry out further research to clarify these mechanisms.

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：衛生 栄養 リスク評価

1. 研究開始当初の背景

日本における低体重児の割合は年々増加しており、2007年には9.7%とOECD加盟国の中でも非常に高い。また、20代女性の約4人に1人がBMI<18.5であり、このような女性は、低体重児出産のリスクが高いと考えられている。近年、胎生期の低栄養状態が生活習慣病のリスクになりうるという概念が注目されるようになり、妊娠期における栄養状態は胎児・新生児期のみならず成長後の健康状態にも重要であると考えられる。

プラスチック可塑剤として用いられているフタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)は、塩化ビニル製品から溶出し食品等を介して体内に入る。妊娠期 DEHP 曝露は、胎仔や新生仔生存数の減少や母マウス血漿中トリグリセライド(TG)を減少させた。通常、妊娠後期にはTGが上昇し、母親の重要な栄養源となる。DEHP 曝露はこのTGを低下させ、母親の低栄養状態を引き起こし、仔の生存数を減少させたと解釈される。しかし、TG以外の栄養素(グルコースやアミノ酸)への影響はまだ検討していない。

胎生期に飢餓状態(低栄養)の中で育った子はエネルギーをできるだけ蓄えるように、俟約遺伝子がプログラミングされる。これは成長後も変わらないため、過栄養状態では逆に生活習慣病などのリスクが高くなると考えられる。胎生期 DEHP 曝露は母マウスの低栄養を招き、胎仔・新生仔数を減少させることから、生存した仔も低栄養となり、将来生活習慣病になる可能性がある。

我々は、胎生期 DEHP 曝露が離乳期から成熟期にかけて摂食行動を変化させることも明らかにした(第82回日本衛生学会で発表)。また、この影響は DEHP がリガンドとなるペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体(PPAR) α を持つマウスのみでみられたことから、PPAR α 依存性の影響と考えられる。すなわち、胎生期に PPAR α のプログラミングに変化が起こり、摂食行動に関わる血漿中レプチン濃度や視床下部の Neuropeptide Y (NPY)に影響を与え、摂食量を変化させたと解された。PPAR α により制御されるグルコースやアミノ酸は脳の重要なエネルギー源であるため、胎生期低栄養が脳に与える影響については摂食行動だけではなく学習や記憶等についても検討が必要である。

DEHPの生殖発達毒性について多くの報告があるが、仔の栄養状態と成長後の脳への影響について報告がない。成長後の影響を加味した DEHP のリスク評価は早急に行うべき重要な課題である。

2. 研究の目的

胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル(DEHP)曝露は、仔の生存数減少と母親の低栄養状態を引き起こす。胎生期低栄養は成長後の生活習慣病リスクを高めると考えられており、DEHPにおいても胎仔・新生児期のみならず、

成長後の影響も加味したリスク評価が必要である。我々の研究から胎生期 DEHP 曝露は離乳後の摂食行動に影響を与えることが示唆された。摂食行動は視床下部で調節されていることから、DEHPは脳へも影響を及ぼしていると思われる。そこで、本研究では胎生期 DEHP 曝露が成長後の脳へ及ぼす影響として、視床下部の摂食行動、海馬の記憶・学習に関して検討する。また、その原因となりうる仔の栄養状態についてグルコース濃度等から評価し、これらの輸送や消費などから仔の栄養状態を決定づけるメカニズムも明らかにする

3. 研究の方法

(1)胎仔・新生仔栄養状態とそのメカニズム
12週齢の雌雄 129/sv 野生型、Ppara-null、ヒト型 PPAR α マウスを用いる。DEHP 0、0.01、0.05、0.1%を餌に混ぜ自由摂取させる。4週間後、同遺伝子、同投与量のマウスを交配させ、プラグにより妊娠日を確認する。妊娠18日目、生後2日目または生後21日目に母および仔を解剖し、血液を採取する。また、胎仔・新生仔から褐色脂肪細胞、胎仔母マウスから胎盤を採取する。

測定項目

胎仔および新生仔の血清中グルコース濃度をキットを用いて測定する。

仔のグルコース濃度に関与している因子の測定を行う。

- ・供給源：母マウスの血漿中グルコース濃度

- ・輸送：胎盤の Glucose transporter (GLUT)-mRNA 発現量 (定量リアルタイム PCR)

- ・消費：褐色脂肪細胞の Uncoupling protein (UCP) 1 と PPAR γ -mRNA (定量リアルタイム PCR)

- ・胎仔、新生仔の血清中 TG 濃度をキットを用いて測定する。

(2)摂食行動および記憶・学習行動への影響
・0および0.05%DEHPを上述の方法で妊娠前から出産後21日目まで母親を介して曝露を続ける。離乳後は高脂肪食負荷による反応性についても検討するため、普通食または高脂肪食を8週間自由摂取させた後、海馬および視床下部を採取する(図1)。

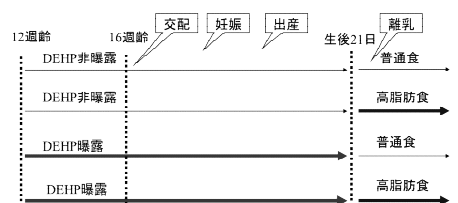


図1 動物実験

測定項目

摂食調節に関わっている視床下部の cAMP responsive element binding protein (CREB)、ア

ミノ酸によって制御されている摂食調節因子として mTOR の mRNA 発現量を定量リアルタイム PCR 法で測定する。

海馬の GABA やグルタミン酸、またそれらの受容体の mRNA およびタンパク発現量を定量リアルタイム PCR により測定する。

4. 研究成果

(1) 妊娠期 DEHP 曝露は新生仔野生型マウスの血清中グルコース濃度を有意に減少させた(図 2)。また、ヒト型 PPAR α マウスにおいても減少傾向を示した。妊娠期 0.10% DEHP 曝露は野生型新生仔生存数を減少させることから、生後 21 日目のサンプリングが出来なかった。生後 21 日目仔マウスの血漿中グルコース濃度には有意な変化は認められなかった。

胎生期 DEHP 曝露は仔のグルコース濃度を減少させたことから、その原因について検討した。まず、供給源である母親のグルコース濃度を測定したところ妊娠 18 日目、出産後 2 日目の母マウスのグルコース濃度に有意な差は見られなかった(図 3)。

次に、母から仔へのグルコース輸送に関わる因子として胎盤の Glucose transporter (GLUT)-1,3 を測定した。ヒト型 PPAR α マウス 0.05% 曝露で GLUT1 が上昇し、KO マウス 0.05% 曝露で GLUT3 が減少したが、濃度依存的な影響は認められなかった(図 4)。

最後にグルコース消費に関わる褐色脂肪細胞の Uncoupling protein (UCP) 1 と PPAR γ -mRNA を定量リアルタイム PCR にて測定した。胎仔・新生仔とも褐色脂肪細胞の UCP および PPAR γ に有意な変化は認められなかった(図 5)。

以上の結果から、胎生期 DEHP 曝露は仔の栄養源として重要なグルコース濃度を有意に減少させた。しかしながら、グルコースの供給、輸送、消費に関わる因子に変化は認められず、グルコース減少メカニズムは不明であり、今後さらなる検討が必要である。

また、妊娠期野生型母マウスの血漿中 TG が DEHP 曝露で減少していたことから、その胎仔の TG を測定した。血清中 TG は 0.01% および 0.1% 曝露群で Control 群に比べ高値を示したが、濃度依存的な影響ではなかった(図 6)。また、肝臓中 TG は有意な差は認められなかった。胎生期 DEHP 曝露は生存数を減少させることから、仔の測定は生存仔でのみ解析を行った。その結果、仔の影響が現れなかったのかもしれない。

(2) 胎生期 DEHP 曝露による低栄養環境下が成長後の摂食行動や記憶・学習機能に与える影響について解析を行った。

摂食調節に関与している因子として、cAMP responsive element binding protein 1 (Creb1) と mTOR の mRNA 発現量を測定した。これらは DEHP 曝露による影響を受けなかった(図 7)。

記憶・学習行動への影響として、海馬の activating transcription factor 4、glutamate

receptor(NMDA)1、2A、2B、dopamine receptor D (Drd) 1A、2、nerve growth factor (Ngf)、brain derived neurotrophic factor (Bdnf)、glutamate decarboxylase(Gad) 1、2、gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit alpha(Gabra) 1、2、3、5、6 の mRNA 発現量、野生型マウスの海馬グルタミン酸および GABA 濃度を測定した(図 8)。記憶・学習機能に関わる遺伝子発現量は、DEHP 曝露により、ヒト型普通食群で NMDA2A の増加が見られたがのみであった。一方、高脂肪食摂取は NMDA1、NMDA2B、Drd1a を減少させた。NMDA2A および 2B は発現のバランスが重要であると考えられるため、その比をみたところ、野生型普通食群において DEHP 曝露によって減少した。また、グルタミン酸と GABA 関連遺伝子発現量は、DEHP 曝露により GAD1、GABRA6 のみで変化した(図 9)。一方、高脂肪食摂取では GAD1、2、GABRA1、2、5、6 で影響が見られており、高脂肪食による影響の方が大きいと考えられる。野生型マウスのグルタミン酸および GABA 濃度に有意な差は見られなかった。

以上の結果から、記憶・学習行動への影響は DEHP 曝露による影響よりも高脂肪食摂取による影響を強く受けていると考えられた。しかしながら、NMDA2A/NMDA2B は野生型マウスにおいて DEHP 曝露で減少していることから、何らかの影響を与えているのかもしれない。また、摂食行動促進メカニズムについては本研究では明らかになっておらず、更なる検討が必要である。

胎生期 DEHP 曝露は低栄養状態を招き、成長後の脳へ影響を与える可能性が考えられる。しかしながらそのメカニズムは依然不明のままである。現在、妊娠期化学物質曝露による次世代影響に関して大規模な疫学調査も行われており、動物実験とヒトでの調査から、今後は次世代影響も加味した化学物質のリスク評価を行っていく必要がある。

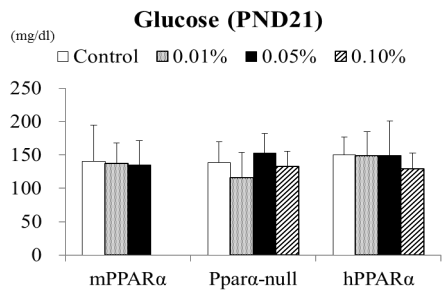
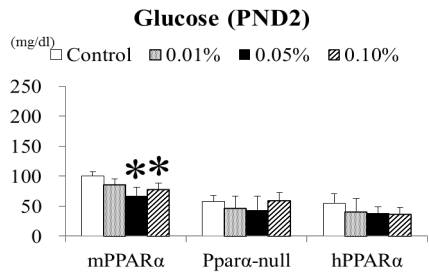


図2 グルコース濃度 (新生仔・生後 21 日目)

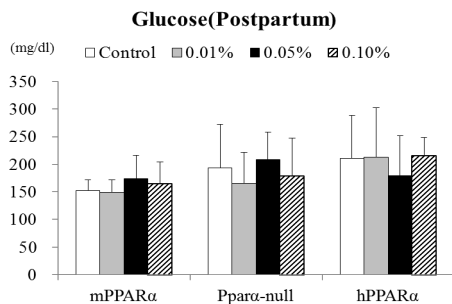
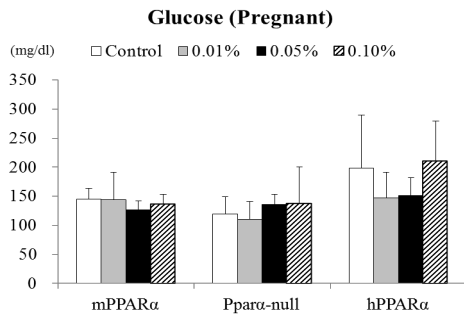


図3 グルコース濃度 (母マウス)

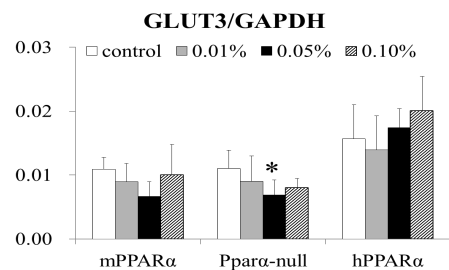
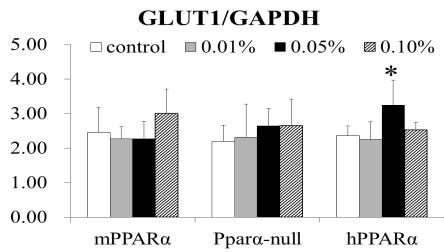


図4 胎盤遺伝子発現量

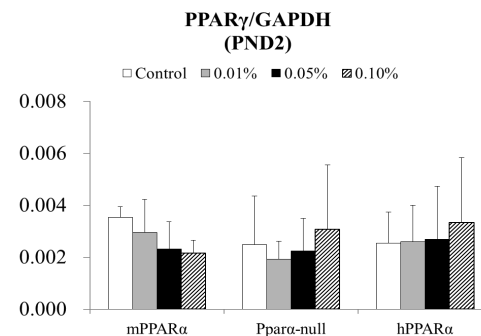
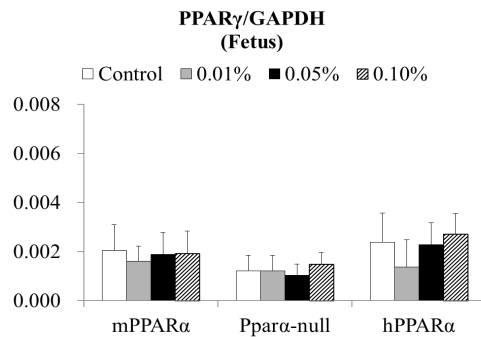
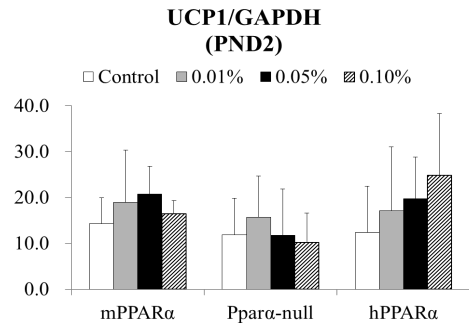
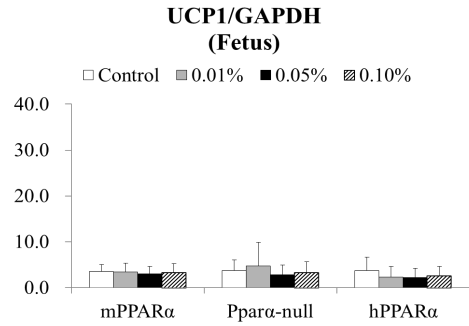


図5 褐色脂肪細胞遺伝子発現量 (胎仔・新生仔)

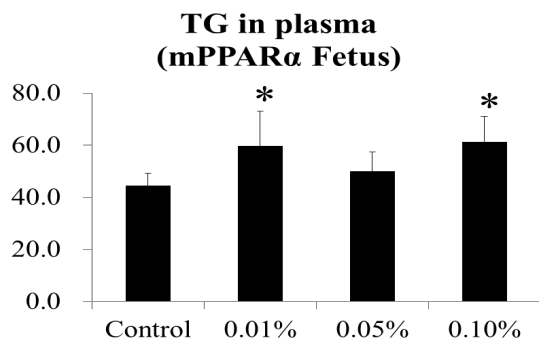


図6 血清中 TG 濃度 (胎仔 野生型)

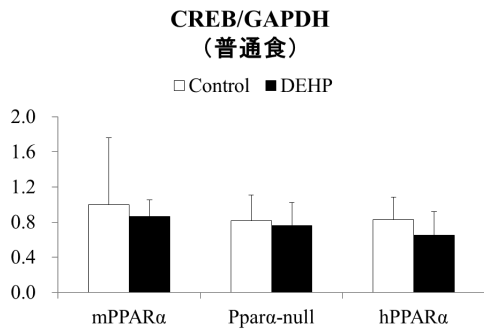
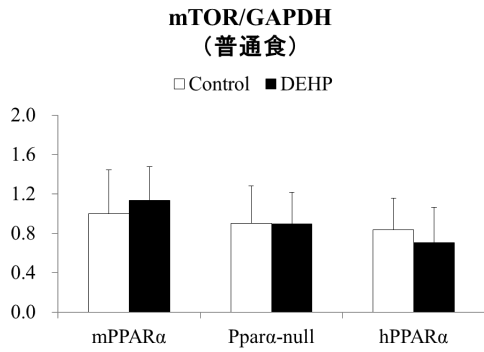


図7 視床下部遺伝子発現量

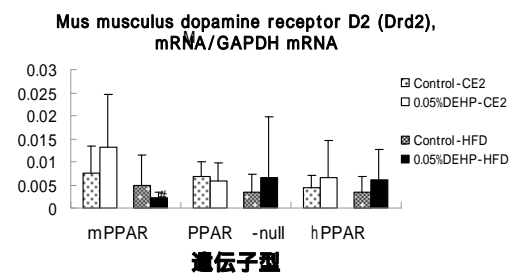
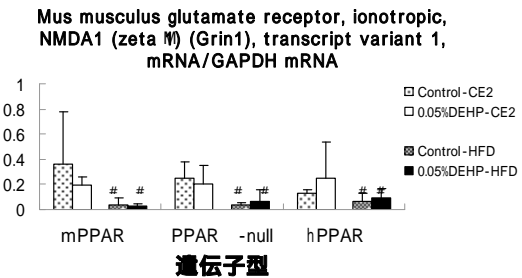
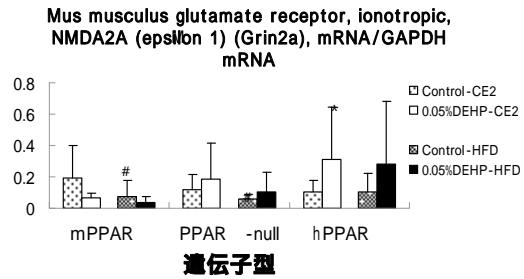
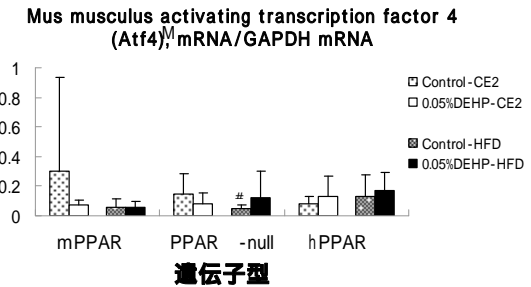
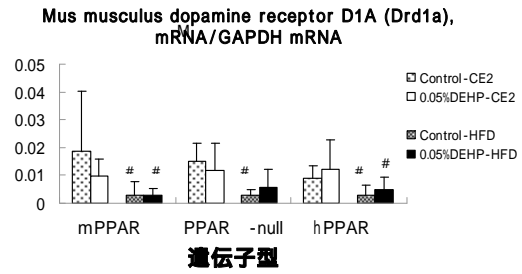
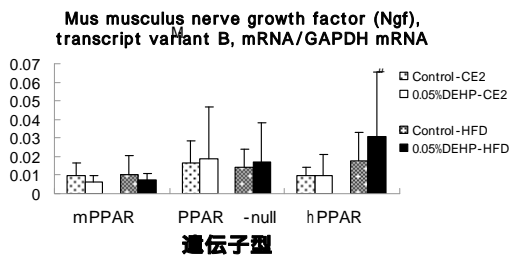
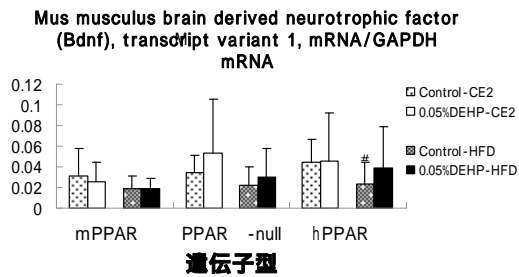
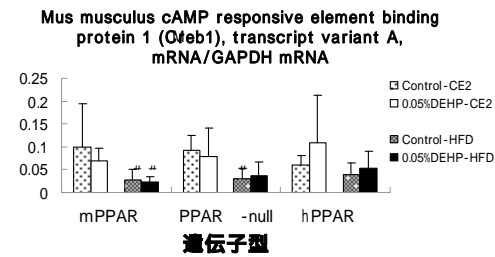
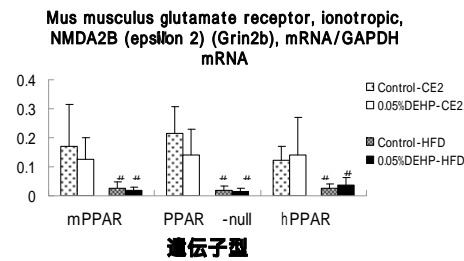


図8 海馬遺伝子発現量

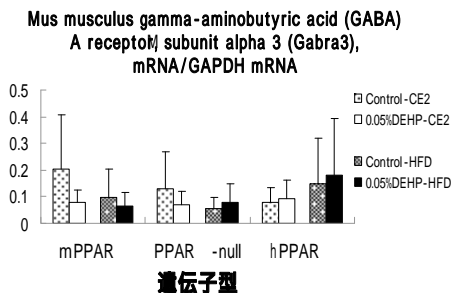
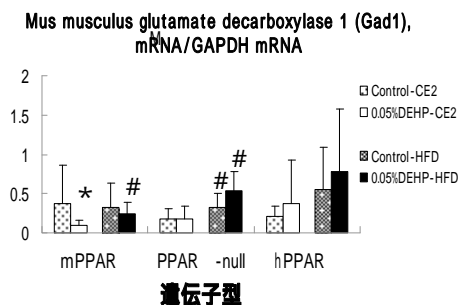
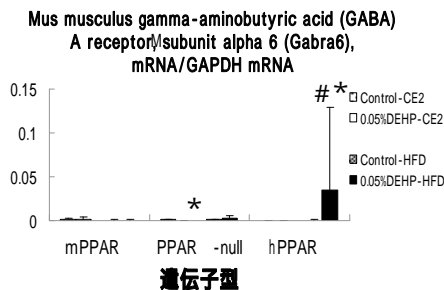
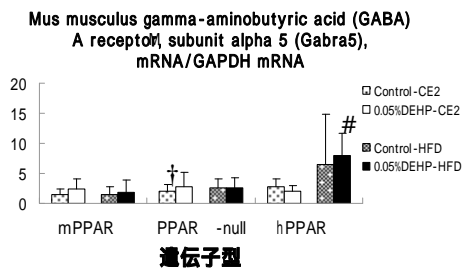
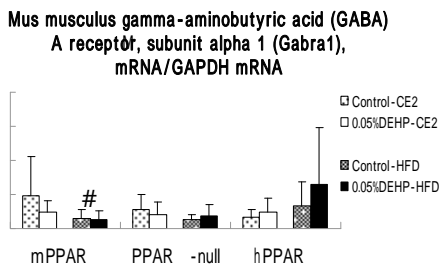


図9 GABA 関連遺伝子発現量

: 同遺伝子型同曝露量 CE-2 摂取群と比較して有意差あり
* : 同遺伝子型同餌摂取 Control 群と比較して有意差あり
† : 同曝露量同餌摂取系統間比較 mPPAR 群と比較して有意差あり

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計4件)

林由美他、「フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露による胎生期・発達期毒性」第41回日本毒性学会学術年会(2014年7月2-4日、神戸)

Hayashi Yumi et al. 「Exposure to DEHP in the pregnant mice may suppress the amount of food intake of offspring in the development stage」The XIII International Congress of Toxicology. (2013年6月30-7月4日、韓国)

林由美他、「胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露による低栄養と生活習慣病および脳への影響」第2回日本DOHaD研究会・学術集会(2013年6月7-8日、東京)

林由美他、「胎生期フタル酸ジ-2-エチルヘキシル曝露がレプチンに及ぼす影響」環境ホルモン学会(2012年12月18-19日、東京)

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 由美 (HAYASHI Yumi)

名古屋大学・大学院医学系研究科 助教

研究者番号：30632707