

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659026

研究課題名（和文） プロラクチン発現低下を起点としたダイオキシン後世代毒性発症機構の解析

研究課題名（英文） Mechanism underlying reproductive and developmental toxicity by dioxin: the role of a reduction in prolactin as an initial defect

研究代表者

山田 英之 (YAMADA HIDEYUKI)

九州大学・薬学研究院・分子衛生薬学分野

研究者番号：40142351

研究成果の概要（和文）：

高毒性ダイオキシン (2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン; TCDD) が育児母の脳下垂体・プロラクチン(PRL) 低下、並びに児の脳下垂体・成長ホルモン (GH) 低下を介して児の成長停滞を惹起する可能性について研究を行った。妊娠 15 日目の母ラットに TCDD (経口、1 µg/kg) を与えて検討した結果、出生直後の出生児死亡には胎児・新生児の GH 低下が、また出生後の成長遅滞や未成熟の固着には育児母の PRL 低下等の他の要因が寄与する可能性が推定された。

研究成果の概要（英文）：

The role of the damage to maternal prolactin (PRL) and infant growth hormone (GH) in the dioxin-produced retardation of infant growth was investigated in rats. Single oral dose (1 µg/kg) of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) given to pregnant rats at gestational day 15 caused the death or growth retardation of infants. This study suggests that a reduction in infant GH contributes to infant death just after birth, and a reduction in the nursing behaviors of dams due to a reduction in prolactin and other factors contributes to growth delay and sexual immaturity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	300,000	3,000,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：食品衛生学

## 1. 研究開始当初の背景

環境汚染を介して食品を汚染する物質の一つであるダイオキシンは、妊娠母体への曝露によって種々の後世代への影響を惹起する可能性が危惧されている。例えば、動物実験においては出生後の成長障害、生殖機能障

害、学習機能異常、あるいは免疫機能異常などの多岐に亘る障害が観察される。申請者らは、最強毒のダイオキシンと言われる2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ダイオキシン (TCDD) を妊娠ラットに与えた場合、周産期 (出生前後の時期) に児の黄体形成ホルモン

(luteinizing hormone: LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone: FSH) の合成/分泌が抑制されることを見いだした。また、これらの脳下垂体ホルモン低下を起点としてステロイドホルモン生産系が顕著に障害され、これが成長後の交尾不全の原因の一つであることも実証している。さらに我々は、採択研究の計画段階で、LH や FSH に加え、他の脳下垂体ホルモンであるプロラクチン (prolactin: PRL) も TCDD によって変動する可能性を示唆する結果を得た。PRL は母の乳汁分泌や育児行動誘起に必須なホルモンである。また、本ホルモンは胎児や新生児においても徐々に発現増加することから、児の生殖腺の発達に一定の寄与があると推定されている。従って、PRL 増加の抑制が成長や成長後の形質を障害する可能性を想定した。

## 2. 研究の目的

研究計画策定段階の予備的成果から、TCDD は出生児の PRL を抑制する可能性を想定していた。そこで、出生児 PRL の低下に関する時期特異性や程度を詳細に解析し、児の成長遅滞との関連性を明らかにすることを目的とした。また、PRL 抑制の機構解明をも目指す計画を構築した。しかし、研究開始後まもなく、TCDD による PRL 変動は、出生児ではなく、母体に特異的に発生することが明らかとなった。従って、TCDD による PRL への影響については、児よりも母体での低下が問題であり、育児能力減退からの観点から解析する必要が生じた。一方、児では周産期に GH が抑制される事実を新規に発見した。そこで、研究計画を修正し、母 PRL と胎児/新生児 GH 変動の詳細を解析し、児の成長遅滞との関連性を追求することとした。また、PRL と GH 低下の機構解析も実施した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物と処理

Wistar 系ラットを使用し、7-10 週齢の雌を雄 (10-20 週齢) と交配させ、膈内に精子が確認された日を妊娠 0 日目 [gestational day (GD)0] として実験に供した。GD15 に TCDD (1 µg/kg、経口) を投与したのち、一定時間経過後の母子の遺伝子発現状況を検討した。また、児については、胎児期および出生後の成長状況を確認するため、個体数および体重・体長等の測定を行った。

### (2) 行動薬理学的試験

母ラットの育児能力は、30 分間の母子隔離後、母ラットの子を舐める作業の時間 (licking: 8 乳児/母) を指標として解析した。成長後 (5 週齢) の児の学習記憶能力は、Y-字迷路への進入頻度を指標に検討した。

### (3) 遺伝子発現解析

脳下垂体ホルモンや各種酵素等の mRNA

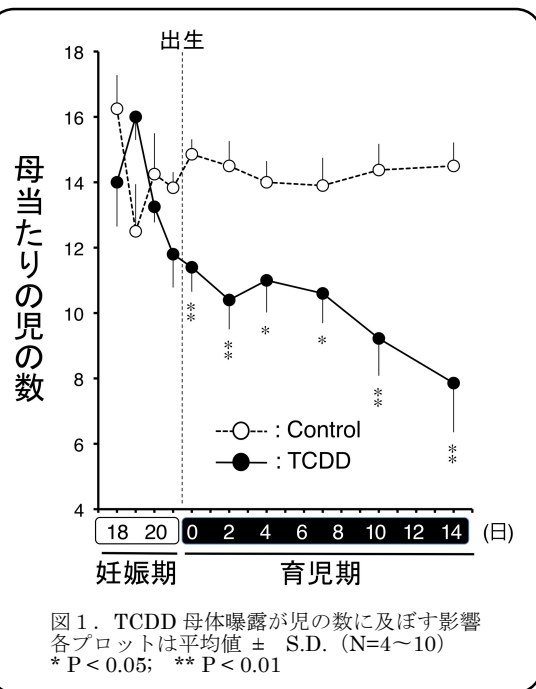
の発現は、リアルタイム RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 法によって測定した。血液中ホルモン水準は酵素免疫測定法により定量した。

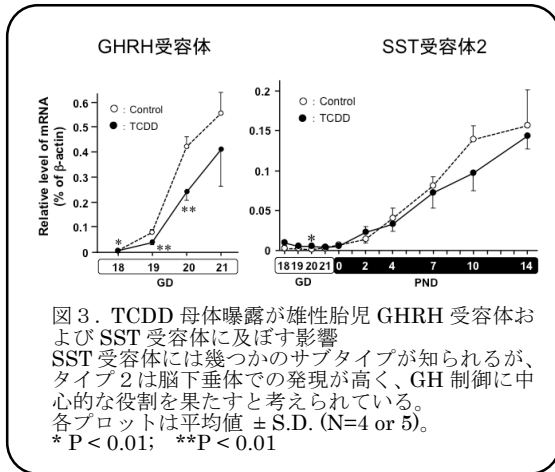
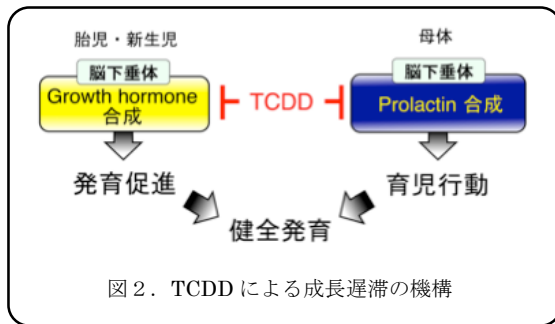
## 4. 研究成果

TCDD 処理母の児の数は、胎児期 (帝王切開による確認) では対照群と有意差はないが、出生後 (postnatal day: PND) は有意に減少した (図 1)。生存児の性比は PND0~14 間で差異はなく、死亡児には雌雄が同様の割合で含まれるものと考えられた。TCDD は児の体重と体長にも影響を与え、出生直前の GD21 から PND10 にかけて有意な減少を惹起した。また、TCDD 曝露母から出生した児は成長後の学習記憶能力が雌雄共に有意に低下し、TCDD の影響は形態のみならず、中枢機能の発達にも及ぶことが示唆された。

出生後の児の死亡や成長抑制と見かけ上一致して、母ラット脳下垂体の PRL mRNA 水準は妊娠期の TCDD 曝露によって有意に低下した。PRL 低下は血中ホルモン水準の分析からも確認された。一方、TCDD は胎児や出生児の PRL に対しては、脳下垂体 mRNA と血中ホルモンレベルのいずれにも殆ど影響を与えなかった。一方、胎児/新生児では脳下垂体 GH mRNA が GD20~PND14 にかけて有意に低下することが見いだされた。特に、GD20~PND0 では、血中 GH 濃度は対照群の 1/2~1/10 までに顕著に抑制された。従って、TCDD 曝露母の児の数が、胎児期には有意な変動が認められないのに、出生後に脱落するのは、周産期児の GH 低下も寄与すると推定された (図 2)。

育児期の母ラットの PRL が TCDD 依存的





に低下したことから、母の子育て能力減退が予想された。これを確認するため、licking を指標として(研究方法参照)、PND2、4、7および10の母の育児行動を解析した。その結果、妊娠中にTCDD曝露を受けた母ラットでは、licking 時間が有意に短縮され(PND4および7)、子への養育活動が低下することが強く示唆された。このことから、TCDD 処理母から出生・生存した児に低体重や成長遅滞が起こるのは、乳汁摂取や養育不十分が寄与する可能性が考えられ、これは母のPRL低下によって発生するものと推定された(図2)。

GHはGH遊離促進ホルモン(GH releasing hormone: GHRH)によって正に、またソマトスタチン(somatostatin: SST)によって負に制御される。そこでTCDDによる周産期児のGH低下の機構を明らかにするため、GHRHおよびSST変動の有無を解析した。しかし、GD18~21の胎児の視床下部GHRHおよびSST mRNAレベルはTCDD処理によって変動しなかった。しかし、脳下垂体のGHRH受容体mRNAは有意に低下したこと(図3)、TCDDによる本受容体発現低下がGH抑制に寄与するものと推定された。SST受容体には変化は認められなかった(図3)。GHRH mRNAの同様な変化は、雌胎児においても認められた(未掲載)。

PRL発現にはPRL遊離促進ホルモン(PRL releasing hormone: PRLRH)による発現促進、あるいは逆にドパミンによる発現抑制が重要な制御機構と考えられている。しかし、育児母・視床下部のPRLRHおよび脳下垂体の

PRLRH受容体のmRNAはTCDDによって変動しなかった。PRLの発現促進因子として知られるキスペプチンおよびサイトロピン遊離促進ホルモンにも有意な変動を示さなかった。また、ドパミンの合成や代謝に関わる酵素群、すなわちチロシン水酸化酵素、ドーパ脱炭酸酵素、ドパミンβ-水酸化酵素およびフェニルエタノールアミンN-メチル基転移酵素のmRNA水準は、いずれもTCDD曝露によって変化しなかった。更に、ドパミンの作用発現に必須なD2受容体のmRNA発現にも変動は認められなかった。従って、育児母のPRLが低下する機構は、上記の制御因子の変動では説明できなかった。今後、マイクロアレイ解析によって、PRL抑制に直結する変動遺伝子の探索を行うなど、更なる解析を行う必要がある。

## 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)

- ① 藤井美彩紀, 武田知起, 田浦順樹, 島添隆雄, 石井祐次, 内博史, 月森清巳, 古江増隆, 山田英之, TCDDによる発達障害の分子機構: 母体 prolactin および児の成長ホルモン低下を介する機構. 日本薬学会九州支部大会, 福岡, 2011年12月.
- ② 藤井美彩紀, 武田知起, 田浦順樹, 島添隆雄, 石井祐次, 内博史, 月森清巳, 古江増隆, 山田英之, TCDD母体曝露による児の発育への影響とその機構. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 金沢, 2011年10月.
- ③ 藤井美彩紀, 武田知起, 田浦順樹, 石井祐次, 山田英之, TCDD曝露による母体 prolactin および oxytocin の低下: 児の発達障害の機構. 日本薬学会第113年会(発表認定、会は震災のため中止), 静岡, 2011年3月.
- ④ 藤井美彩紀, 武田知起, 石井祐次, 山田英之, TCDD母体曝露による児の発達障害: prolactin 低下を介する機構. フォーラム2011: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 金沢, 2010年9月. (若手優秀研究者賞受賞)

[その他]

ホームページ等

<http://eisei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 英之 (YAMADA HIDEYUKI)

研究者番号：40142351

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
石田 卓巳 (ISHIDA TAKUMI)

研究者番号：10301342  
(H22)

武田 知起 (TAKEDA TOMOKI)

研究者番号：60596831  
(H22, 23)