

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26461651

研究課題名(和文) 内分泌機能不全に起因するDOHaD学説の実験的検証の試み

研究課題名(英文) An experimental approach for testing the DOHaD hypothesis in endocrine dysfunction

研究代表者

小林 健一 (Kenichi, Kobayashi)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・産業毒性・生体影響研究グループ・主任研究員

研究者番号：00332396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では出生後早期から発育不全を呈する自然発症甲状腺機能低下症の成長遅延症マウスを用いて、内分泌不全に起因するDOHaD学説の実験的検討を試みた。ヤングアダルトから成熟期にかけて代謝系臓器および脂肪を採材し秤量した。成長遅延症マウスはヤングアダルトでは正常兄妹と比べ有意に軽量であった。体成長の遅延は徐々に改善されたが、成熟期において腎は小型のまま、脂肪重量は正常個体と比べて有意に低値を示した。妊娠期から抗甲状腺剤を投与して甲状腺機能低下を誘導して得た児についても、成熟時の脂肪量は正常個体と比較して有意に少ないままであった。今後、血中ホルモン動態や組織学的観察による検討を要する。

研究成果の概要(英文)：The effects of growth defects beginning at fetal/neonatal periods following toxic/endocrine defects on health later in life is unknown. In this study, we used grt mice with congenitally primary hypothyroidism. The mice are characterized by transient growth pause before weaning, but show catch-up growth later in life compared with normal mice. To understand the underlying mechanism of catch-up growth in grt mice, we examined the developmental changes of their main organs and adipose tissues. The changes of tail length and nose-anus length were in parallel with those of body weight. The kidneys and all adipose tissues of grt mice were lighter than of normal ones. These findings suggest that decreased adipose tissue with paradoxical catch-up growth was characterized in grt mice. Similarly, mice with hypothyroidism by adding methimazole also displayed decreased adipose tissues. Adipose-related hormone levels and histological features should be discussed to better clarify the mechanism.

研究分野：生殖発生毒性学

キーワード：DOHaD 低体重 甲状腺機能低下 Catch-up growth

## 1. 研究開始当初の背景

現代社会においては女性を取り巻く環境が大きく変化してきており、母性保護の観点からも一般女性および女性労働者の健康問題を十分に把握し、予防原則に立脚した疾病対策を講じることが急務と考えられる。1986年に「胎児期にプログラミングされた影響が成人になって疾病を引き起こす」という、疫学研究を背景とした「Barker 仮説」が提唱されたが、近年ではさらにこの考えが拡大されて「成人病の発症は胎児期・生後早期の環境に起因する」とする DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) 概念が提唱され、国際的に注目を集めている。米国毒性学会 (SOT) は 2007 年から「胎児期プログラミングと発生毒性に関する国際会議 (PPTOX)」を隔年で開催し、発生毒性研究を重要課題として取り上げ、成人の健康問題・生活習慣病との関連について活発な議論を展開してきている。

これまでの疫学調査研究からは、胎児期の成長抑制による成人での高血圧発症 (Law et al, 2002)、胎児期のテストステロン過多による多嚢胞性卵巣症候群の発症 (Abbott et al, 2002; Xita et al, 2006)、胎児期の低栄養による成人での 2 型糖尿病の発症 (Barker et al, 2002)、胎児期の低体重による高血圧および甲状腺機能低下の発症 (Kajantie et al, 2006) 等々のいくつかの胎児期プログラミング仮説を支持する報告がなされてきている。これに関連した実験的研究として、申請者は先天的自然発症甲状腺機能低下マウスにおいて、児の若齢期から成熟期にかけての発育、下垂体および生殖腺において形成発達異常を認めている (Kobayashi et al, 2007)。

一方、一般環境あるいは労働環境において化学物質ばく露があったとき、それが胎児期プログラミングに影響する可能性が考えられる。実際、申請者は内分泌かく乱化学物質であるポリクロロビフェニル 153 (16, 64mg/kg/日) を器官形成期のラットに投与した結果、血中甲状腺ホルモン値の用量依存的な低下を認めており (Kobayashi et al, 2008)、これが成長後の障害につながる可能性を示した。このような胎児期・新生児期における環境因子の影響に着目した研究は、成人に至ったときの疾病発症のリスクを早期に予知し回避するために、新規かつ重要な視点と考えられる。

以上のように、疫学研究に基づく胎児期プログラミング仮説は健康障害リスクの予防にとって重要な意味をもつが、未だに実験的に確認の得られた例は少なく、実験動物を用いた実証研究が待たれている状況である。

## 2. 研究の目的

本研究では、DOHaD 概念に基づく胎児期 / 新生児期のホルモン不全の影響を検証し、ヒト

の健康障害の予防対策に寄与しうる基盤情報を得ることを目的とする。甲状腺ホルモンは種を超えて発生段階の初期から様々な組織・器官に作用し、代謝系・生殖系・神経系・免疫系の恒常性維持に極めて重要な役目を果たしていることから、特に甲状腺機能異常と疾病の因果関係に焦点を当てた研究を企画した。

本研究では、先天性甲状腺機能低下モデルマウスおよび抗甲状腺剤投与して作製した実験的甲状腺機能低下マウスを用いて、胎児期 / 新生児期からの甲状腺機能低下に起因する成長抑制が成熟期以降にもたらす影響を調べることを目的とする。

## 3. 研究の方法

1) 表現型が安定し、離乳前から成長遅延を呈することが報告されている先天性甲状腺機能低下マウス (growth-retarded mouse, *grt*) の雄個体を使用し、ヤングアダルトから成熟期にかけての成長変化について、併せて代謝系の臓器 (肝、腎) および脂肪 (後腹膜、腎周囲、精巣上体周囲、腰部皮下、鼠径部皮下) の発達について調べた。

2) 甲状腺機能低下による成熟期以降への影響が 1) で調べた特定な変異マウス系統のみならず、一般的な現象なのかを確認するために抗甲状腺剤 (メチマゾール、MMI) を投与することにより、実験的甲状腺機能低下マウスを作製し、同様の項目について検索した。

実験的クレチン症モデル動物を作製し、雌性 ICR マウスの妊娠 10 日以降、離乳を経て得られた児の採材時までの期間、継続して MMI を 0.05% の用量で飲水投与した。対照群は水道水を投与した。自然分娩の後、生後 1 日において間引き調整を行った (雄: 雌 = 4 : 4、児数が 8 匹以下の場合には間引きをせず)、離乳までの期間、母動物および児の体重を計測した。離乳後も引き続き児の体重計測を行った。雄の児を 2 ヶ月齢および 10 ヶ月齢において剖検し、1) と同様の項目について検索した。

正常群 (対照群) と変異群 (曝露群) との各項目間の統計解析は、スチューデントの t 検定あるいはウェルチの t 検定を用いた。本研究は、独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所動物実験委員会の承認を受け、指針および機関内規程に準拠し、安全性を十分に配慮して行った。

## 4. 研究成果

本研究は、2 種類の甲状腺機能低下マウスを用いて、胎児期 / 新生児期からの甲状腺機能低下に起因する成長不全の成熟後の影響について齢を追って調べた。

1) 2 ヶ月齢の *grt* マウスでは、体重、尾長

および体長において正常マウスと比べ有意に低値を示したが、18 ヲ月齢における両マウスにおいて、尾長に差は見られず、体重および体長では差があるものの比較的小さく（それぞれ約 13%、3%）成長の改善が認められた。BMI は 18 ヲ月齢に至るまで低値を示した（図 1）。また、2 ヲ月齢の grt マウスでは、肝重量、腎重量および脂肪重量は、正常マウスと比べ有意に低値であった。18 ヲ月齢において、grt マウスの腎重量は正常マウスの約 6 割にとどまっていた（図 2）。2 ヲ月齢の精巣重量は、正常マウスと比べ grt マウスでは有意な低値を示したが、反対に 10 ヲ月齢以降では、高値を示した。精巣上体重量は、2 ヲ月齢では正常マウスと比べ有意に低値を示したが、10 ヲ月齢以降では追いついた（図 3）。grt マウスでは、18 ヲ月齢に至るまですべての脂肪重量は正常マウスと比べ有意に低値を示した（図 4）。

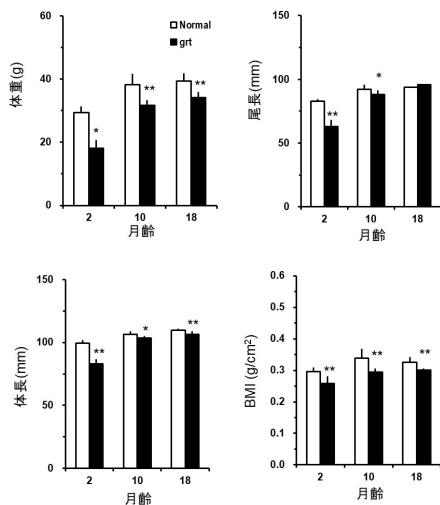


図 1 体重、尾長、体長および BMI の変化 図中\*は正常群との差を示す (\*p<0.05, \*\*p<0.01)。

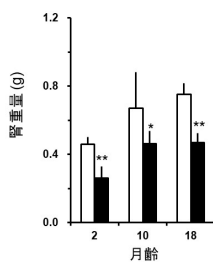


図 2 腎重量の変化 図中\*は正常群との差を示す (\*p<0.05, \*\*p<0.01)。

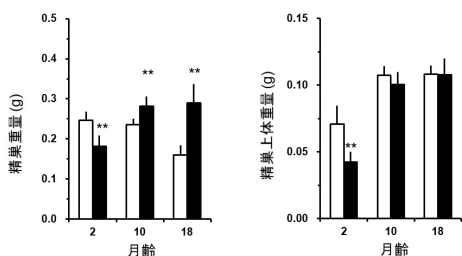


図 3 精巣および精巣上体重量の変化 図中\*は正常群との差を示す (\*\*p<0.01)。

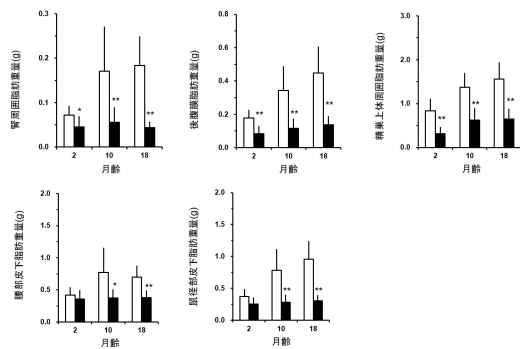


図 4 各部位における脂肪重量の変化 図中\*は正常群との差を示す (\*p<0.05, \*\*p<0.01)

2) 母動物の体重は、MMI 投与翌日以降授乳 17 日に至るまで対照群と比べ明らかな低値を示したが、授乳 18 日以降は対照群と同程度であった（図 5）。雄の児体重は生後 1 日において同程度であったが、生後 4、7、14 および 21 日において、MMI 群は対照群と比べ有意に低下していた。雌の児については雄と同様な傾向を示した（図 6）。3 週齢以降、最終採材時まで体重測定を継続的に行った結果、対照群と比較して雄の MMI 群では約 70%、雌では約 84%までの改善がみられた（図 7）。

2 ヲ月齢および 10 ヲ月齢の MMI 群では、体重、尾長および体長において対照群と比べ有意な低値を示した。10 ヲ月齢における両マウスにおいて、尾長および体長では有意差があるもののその差はそれぞれ約 6%と僅かな差であり、longitudinal growth は catch-up したと考えられた。MMI 群の BMI は 10 ヲ月齢に至るまで低値を示した（図 8）。MMI 群のすべての部位の脂肪重量はすべて 2 ヲ月齢および 10 ヲ月齢において対照群と比べ有意に低値を示した（図 9）。

以上の結果から、妊娠 10 日からの MMI の投与は甲状腺機能低下に起因する成長抑制をもたらし、2 ヲ月齢では本実験で対象とした臓器重量は対照群と比べ全項目において有意に低値を示した。MMI 群の尾長および体長は 10 ヲ月齢で改善が認められたが、すべての部位の脂肪重量は対照群と比べ低値であった。MMI 群の腎は、2 ヲ月齢では対照群と比べて小型で発達が十分でなかったが、10 ヲ月齢では対照群より小型である傾向はあるものの差はなかった（データ未掲載）。grt マウスでは腎の発達は著しく抑制されており、18 ヲ月齢においても正常マウスと比べて約 60%の重量であった。grt マウスでは成長遅延の改善があっても、腎重量の低下は不可逆的であった。MMI 群の精巣は、10 ヲ月齢ではやや小型であったが、対照群と比較して重量に差はなかった。grt マウスで見られた成熟期以降における精巣重量の増大は、MMI 群では grt マウスほどの程度ではないものの、増大に向かいそうな傾向がみられた。MMI 群の精巣上体は 10 ヲ月齢に至るまで、有意に低下していた（データ未掲載）。雌の臓器発達についても雄と同様、解析中である。

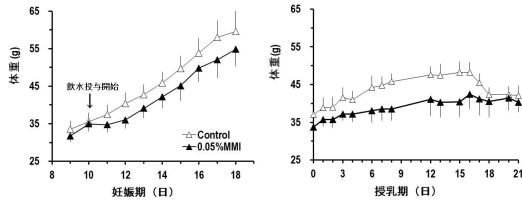


図5 MMIを飲水投与した母動物の妊娠期および授乳期における体重変化

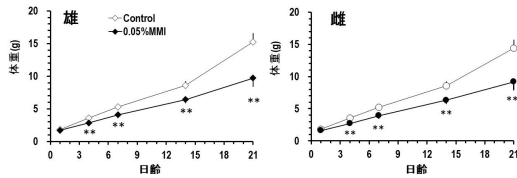


図6 授乳期の動物の体重変化 図中\*対照群との差を示す (\*\*p<0.01)

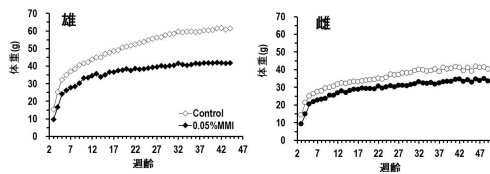


図7 体重の経齢変化

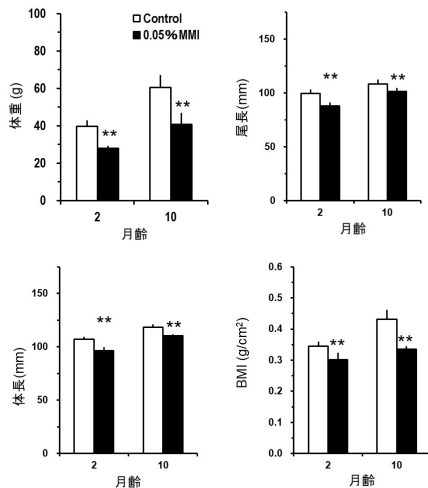


図8 体重、尾長、体長およびBMIの変化 図中\*対照群との差を示す (\*\*p<0.01)

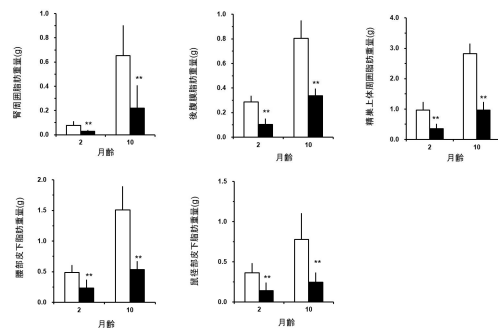


図9 各部位における脂肪重量の変化 図中\*対照群との差を示す (\*\*p<0.01)

### 3) 今後の課題

これまで低栄養における胎児期/新生児期に起因する低出生体重・生後早期の成長抑制後に成熟期以降の生体影響に関する研究が注目されてきた背景のもと、本研究は化学物質による内分泌機能異常、とりわけ胎児期/新生児期からの甲状腺機能低下に起因する成長遅延が成熟後にもたらす影響の視点から実験を着手した。本実験の結果から、grtマウスとMMI群マウスでは、腎や精巣をはじめとした臓器において、両マウス間で発達の程度に違いがあることが観察された。両マウスにおいて系統、甲状腺機能低下の程度等異なる要因がその理由の一因であると考えられる。しかしながら、甲状腺機能低下による生後早期からの成長抑制は、成熟後の代謝系臓器、脂肪の発達に影響をおよぼしていることが明らかであった。研究開始前は、成熟後の体成長の catch-up に伴い、各臓器重量も catch-up するものと想定していたが、腎や脂肪組織の小型化が不可逆的であったという予想外の現象を観察した。また、今回 MMI 投与によって実験的モデルを作製したが、動物種や系統の選択、MMI への抵抗性(ラットと比べてマウスの方が MMI に対する抵抗性が高い)、用量設定、曝露期間、休薬期間をさむ等、異なる実験条件下によって catch-up の様式が変わってくると予想された。実験に使用する各種動物の特性を十分に知ることが必要であるとともに、D0HaD 実験を行う上で、より精度の高い実験条件の確立が求められるであろう。

今回の実験条件下においては、マクロな現象をとらえることは出来たが、体成長の catch-up に関わる機序を説明できるまでには至らなかった。継続して脂肪細胞が catch-up にもたらす関係に着目し、脂肪細胞ホルモンの動態、細胞形態を解析中である。研究開始時にはとりわけ着目しなかった筋組織の発達、骨成長に関わる因子(成長因子等)の変化、さらには catch-up に関わる遺伝子群の同定を行うことによりその機序解明と catch-up にともなう生体への機能異常の解明に向けての知見の収集ができると考えている。本研究では化学物質による内分泌機能異常に起因した低出生体重・生後早期の成長抑制を経た成熟後の生体影響に焦点を当ててきた。今後、他の化学的要因や物理的要因による低出生体重へのリスクも検討も必要であると考えられ、本研究ではその基礎的知見の一部が得られたと考えている。

### 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)

〔雑誌論文〕(計1件)

小林健一・生殖毒性が疑われる産業化学物質について. 安全と健康 16, 60-61, 2015.

〔学会発表〕(計12件)

小林健一、久保田久代、北條理恵子、宮川宗之・発達段階期の抗甲状腺剤曝露がラットの精巣発達へ及ぼす影響．第 44 回日本毒性学会 (2015 年 6 月、金沢)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・はたらく女性の健康を考える．平成 30 年度安衛研一般公開 (2016 年 4 月、川崎)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・成熟雄マウスへのニッケル投与が精巣機能へおよぼす影響．第 43 回日本毒性学会学術年会 (2016 年 6 月、大阪)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・マウス甲状腺機能低下モデルを用いた DOHaD 学説の実験的検討．第 5 回日本 DOHaD 研究会学術集会、(2016 年 7 月、東京)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・先天性内分泌不全マウスモデルによる DOHaD 学説の実験的検討．第 56 回日本先天異常学会学術集会、(2016 年 7 月、姫路)

Katsumi Ohtani, Mohsen Vige, Kenichi Kobayashi. The evaluation of morphological effect on sperm in the 1-bromopropane-given rat by utilizing dark field image. 52nd European Congress of the European Societies of Toxicology (September 2016, Seville, Spain)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・成熟雄マウスへのニッケル曝露が精巣へおよぼす影響．第 87 回日本衛生学会学術総会 (2017 年 3 月、宮崎)

大谷勝己、ヴィージェモーセン、小林健一・暗視野画像を利用した 1, 2 - ジクロロプロパンの精子形態異常解析．第 87 回日本衛生学会学術総会 (2017 年 3 月、宮崎)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・はたらく女性の健康を考える．平成 29 年度安衛研一般公開 (2017 年 4 月、川崎)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・ニッケル曝露がマウス精巣へおよぼす影響．第 57 回日本先天異常学会学術集会 (2017 年 8 月、東京)

大谷勝己、小林健一、ヴィージェモーセン・コンピュータ精子画像解析法 (CASA) における暗視野画像を利用した 1-プロモプロパンのラット精子形態の影響解析．環境ホルモン学会第 20 回研究発表会．(2017 年 12 月、神戸)

小林健一、柳場由絵、大谷勝己・成熟期マウスへのクロム曝露が精巣へおよぼす影響．第 88 回日本衛生学会学術総会 (2018 年 3 月、

東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林健一 (Kenichi, Kobayashi)  
独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・主任研究員  
研究者番号：00332396

### (2) 研究分担者

久保田久代 (Hisayo, Kubota)  
独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・上席研究員  
研究者番号：90333377