

200941021A

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成21年度総括・分担研究報告書
研究代表者 山田 英之

平成22(2010)年5月

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟の
インプリンティングとその評価法開発

平成21年度総括・分担研究報告書
研究代表者 山田 英之

平成22(2010)年5月

目次

I. 総括研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングとその 評価法開発	1
研究代表者 山田 英之	

II. 分担研究報告書

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングとその 評価法開発	5
研究代表者／研究分担者 山田 英之	
研究分担者 石井 祐次、石田 卓巳	

III. 成果の刊行に関する一覧表	17
-------------------------	----

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングと その評価法開発

研究代表者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授

研究要旨 内分泌攪乱作用を有する食品汚染物質には生殖や次世代への悪影響が危惧されるものが多い。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) は代表的な例であり、動物での基礎研究からは、胎児や出生後の成長に多くの障害を惹起し得ることが明らかにされている。既に我々は、TCDD は胎児の脳下垂体ゴナドトロピン産生障害を介してステロイドホルモン合成を抑制し、これによって成長後の形質不全を規定することを明らかにしている。本研究では、脳下垂体ゴナドトロピン障害の機構を解明することを一つの目的として研究を行った。作業仮説として、TCDD が胎児期特異的にゴナドトロピン産生を抑制するのは、本ホルモン生産組織である脳下垂体を制御する視床下部で、エネルギー生産や組織の機能発現に必須な成分が減少するためである可能性を構築した。これを検証するため、ラット胎児脳組織のメタボローム解析を実施して組織中成分の網羅的解析を行った結果、上記の仮説を支持する成果が得られた。本研究では、TCDD による胎児ゴナドトロピン低下に酸化ストレスが関与する可能性についても検討を行った。TCDD 曝露胎児脳下垂体のゴナドトロピン低下、並びに精巣ステロイド合成系タンパク質発現低下は、抗酸化性ビタミンである α -lipoic acid (α -LA) によって正常水準にまで回復した。しかし、脳移行性を有する他の3種の抗酸化剤 (ascorbic acid、edaravone および butyl hydroxyanisole) では同様の回復は認められなかった。 α -LA は抗酸化能力以外にも、エネルギー生産や脂肪酸代謝等における必須補酵素としての側面がある。従って、TCDD による胎児ゴナドトロピン障害は酸化ストレスの亢進ではなく、中間代謝系の機能低下が主要な要因であることが示唆された。本研究により、TCDD による胎児脳下垂体ホルモン障害の要因について理解の深化をもたらすと共に、この障害が必須栄養素である α -LA によって消去可能であることが発見された。

研究分担者

石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院
分子衛生薬学分野 准教授
石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院
分子衛生薬学分野 助教

A. 研究目的

ダイオキシンを初めとする種々の環境汚染

物質が生殖や後世代の障害を惹起する可能性が危惧されている。しかし、ヒトや野生生物での障害に関する明確な因果関係や障害の機構は十分に理解されているとは言えない。本研究では、ラットを使用した基礎研究でダイオキシンの次世代への悪影響の機構を解明することを目指した。これらを基盤として、障害診断法や対処法の構築に関する有用情報が

得られることを期待した。

内分泌攪乱物質はホルモン受容体への結合能を有するものが多いが、これに要する濃度は食品汚染物質として体内に摂取される量より高い。従って、ホルモン受容体との結合を介する障害はその可能性を否定はできないが、障害の主因であるとは考え難いと思われる。体内の性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体より遊離するゴナドトロピンによって制御される。当研究室では最近、ダイオキシンの妊娠ラットへの投与によって、胎児脳のゴナドトロピン産生と性ステロイドホルモン合成が障害され、これを起点として、成長後の交尾能力低下が規定されることを明らかにしている。しかし、ダイオキシンがどのような機構で脳下垂体ゴナドトロピンを低下させるかについては不明であり、この疑問は障害対処法や診断法の確立に向けて解決する必要があると考えられた。脳下垂体でのゴナドトロピン合成・分泌には十分なエネルギーや神経伝達物質の供給、あるいは神経回路や周辺組織の成熟等の多くの要素が満足されなければならない。従って、ダイオキシンは上記要因を胎児期特異的に障害して、その結果として脳下垂体ゴナドトロピン合成を抑制する可能性が想定された。一方、古くから、ダイオキシンの毒性には酸化的ストレス亢進の寄与が指摘されている。従って、他の可能性として、ダイオキシンによる脳下垂体ホルモンの低下にも酸化的ストレス上昇が寄与することが考えられた。

これらの背景から、今年度の研究では、最強毒性のダイオキシンと言われる2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いて、以下の検討を実施した。すなわち、1) 脳下垂体ホルモンやステロイド合成系タンパク質の胎児特異的な低下が脳のエネルギー生産や神経伝達等に関与する物質の生産低下に起因する可能性を検証するため、低分子化合物群の存在状況を網羅的に解析した(メタボローム解析)。また、2) TCDDが酸化的ストレス亢進を介してゴナドトロピン障害等を惹起するか否かを明らかにするため、TCDD依存

的なゴナドトロピン低下に与える抗酸化物質の効果について検討を行った。

B. 研究方法

1. メタボローム解析

妊娠Wistarラット(妊娠15日目:GD15)に、TCDD 1 µg/kg/2 mL corn oil またはコントロールとして corn oil を単回経口投与した。GD20 に、母体から雄胎児を取り出し、さらに雄胎児より下垂体と視床下部を採取し、一腹中の全ての雄胎児組織を併せて1サンプルとした。比較のため、成熟雄性ラット(7週齢)にもTCDD(1 µg/kg) または corn oil を単回経口投与し、5日後に下垂体と視床下部を採取した。成獣に関しては一匹あたりの組織、胎児においては一腹の母体に含まれる全雄胎児の組織を併せたものを一回の測定に用いるサンプルとした。

凍結組織を chloroform/methanol (1:2) 混合液中でホモジナイズし、遠心分離後、上清を回収した。残存有機層は更に2度水抽出を繰り返したのち、回収した上清を全て合し、窒素ガスにより溶媒留去後、真空デシケーター内で乾燥した。得られた抽出残渣を *O*-methylhydroxylammonium chloride、並びに *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide と反応させ、極性化合物を誘導体化した。得られた誘導体化合物は gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 分析に供した。

GC-MS 分析で得られたマトリックスデータを、主成分分析(PCA)および直交型部分的最小二乗法(orthogonal partial least-squares to latent structures; OPLS)によりメタボロームパターンを解析した。また、OPLSより得られたS-プロットをもとに有意な変動を示す質量イオン(*m/z*)を抽出し、クロマトグラムへの帰属を行った。マススペクトル中の基準ピークにおいて有意な差が見られたものを、有意に発現が変動する化合物とした。

2. 酸化的ストレスの影響の解析

妊娠Wistarラット(GD15)に、以下の4種の抗酸化物質を静脈投与した: α-lipoic acid (α-LA)、3-*tert*-butyl hydroxyanisole (BHA)、

ascorbic acid (VC) および edaravone。Edaravone は田辺三菱製薬 (株) から供与を受けて使用した。抗酸化物質の投与 30 分後に TCDD を 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 単回経口投与し、GD16 から GD20 にかけて 1 日 1 回、初日と同用量の抗酸化物質を尾静脈内投与した。抗酸化物質の最終投与後に胎児から精巣および下垂体を摘出して実験に供した。

組織中の mRNA 発現量は、既報に従って reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を用いて測定した。精巣のステロイド合成系タンパク質発現はイムノブロット法により解析した。胎児血清中の LH 濃度は Endocrine Technologies 社製キットによる酵素免疫測定法によって定量した。

3. 倫理面への配慮

全ての動物実験は、本学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認の下に、動物の苦痛を排除して実施した。

C. 研究結果

1. TCDD による脳メタボロームの変動とその年齢差

TCDD を妊娠ラットに投与し、雄胎児の脳下垂体および視床下部を取り出し、GC-MS によるメタボローム解析を行った。検出された変動が胎児期特異的であるか否かを知る目的で、成熟雄ラットからも TCDD 後の脳組織を調製して比較検討を行った。GC-MS で得られた各種成分の変動を PCA によってプロファイリングした結果、TCDD は脳下垂体でのメタボロームを殆ど変化させなかった。一方、胎児視床下部では TCDD によってメタボロームパターンが変動することが示唆された。同様の傾向は TCDD を成獣に与えても観察されたが、胎児ほどプロファイルの違いが顕著ではなかった。

次に、TCDD 依存的に変動する成分の特定を行うため、メタボローム変動を脳下垂体と視床下部について個別に OPLS 法によって解析した。その結果、有意な変動が推定される成分は、成獣の脳下垂体と視床下部には検出されず、また胎児の脳下垂体にも殆ど存在しなかった。唯一、胎児の視床下部では多くの成分が TCDD 依存的

に減少することが示唆された。TCDD 依存的に変動する化合物を推定した結果、胎児視床下部では、エネルギー生産に関与する有機酸や糖類、並びにアミノ酸などが TCDD によって低下することが推定された。これらの結果から、TCDD は脳下垂体の制御器官である視床下部において種々の成分を減少させ、その影響は胎児において顕著であることが示唆された。

2. TCDD の脳下垂体ゴナドトロピン低下作用における酸化的ストレスの寄与

次に本研究では、TCDD が酸化的ストレス亢進を介して精巣ステロイド合成系タンパク質や脳下垂体ゴナドトロピン発現を障害する可能性を検討した。検討は、抗酸化物質である 2 種のビタミン [α -lipoic acid (α -LA) および ascorbic acid (VC)]、酸化的ストレス改善薬 edaravone および古くから知られる抗酸化剤の 3-*tert*-butyl hydroxyanisole (BHA) の障害保護作用の有無を調べることによって実施した。既報の成績と一致して、TCDD 曝露母ラットの胎児の精巣では、性ステロイド合成の律速過程に関与する cholesterol transporter である steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) 等の mRNA が対照群と比較して有意に低下した。しかし、母ラットに TCDD に加えて α -LA を併用した場合には、この低下が完全に回復した。しかし、他の 3 種の抗酸化剤は保護効果を示さなかった。

胎児の脳下垂体ホルモンについても同様な成績が得られた。胎児脳下垂体 LH および follicle-stimulating hormone (FSH) は、それらの β -サブユニット mRNA が TCDD の母体曝露によって低下した。しかし、これらの減少は、母体に α -LA を併用処理することによって完全に回復した。他の 3 種の抗酸化物質には保護効果は観察されなかった。これらの成績は、これまでの推定とよく一致している。すなわち、胎児精巣のステロイド合成系低下は視床下部ゴナドトロピン減少に起因するものであり、これの α -LA による改善はステロイド合成系障害の改善に直結することが示された。 α -LA の胎児 StAR および CYP17 発現における保護効果

には用量依存性があることも確認された。また、脳下垂体 mRNA 変動と一致して、TCDD 曝露胎児では血清中の LH の水準が低下することが確認され、これは α -LA の併用で対照レベルへ復帰した。胎児精巣の StAR および CYP17 タンパク質発現低下も α -LA の併用で回復した。

D. 考 察

ゴナドトロピン合成と分泌には、gonadotropin-releasing hormone (GnRH) が重要な役割を演じる。本ホルモンは視床下部からの神経を介して脳下垂体を刺激し、LH や FSH 等の合成・分泌を促進する。従って、視床下部 GnRH 神経の成熟がゴナドトロピン制御には不可欠な要因となる。これと関連して、GnRH 神経の成熟等、視床下部の発達のためにはこの領域に十分なエネルギーが供給されることや他の神経伝達物質の神経の共発育やそれらとのクロストークが必要と考えられている。これらの背景情報を基に、本研究では脳下垂体に加えて、視床下部にも注目して、低分子化合物群の網羅的な解析を実行した。解析の結果、胎児視床下部のメタボロームは TCDD の母体曝露によって変動し、多くの成分が減少することを見いだした。低下する物質群はエネルギー生産に関わる有機酸や糖類等が推定された。これに対し、成熟ラットにおける視床下部メタボロームの変化は顕著ではなかった。この結果は、TCDD 依存的な脳下垂体ゴナドトロピン変動が胎児特異的に出現することと見かけ上一致している。従って、胎児ゴナドトロピンの障害は、その上流の機構として、視床下部のエネルギー生産性物質や神経伝達物質等の低下に起因する可能性が考えられた。

今年度の研究では、胎児ゴナドトロピン障害が TCDD による酸化的ストレス亢進に起因する可能性についても検討を加えた。その結果、使用した 4 種の抗酸化剤のうち、 α -LA のみが保護効果を示した。他の 3 種が効果を示さない理由として、脳移行性の問題が考えられる。しか

し、用いた抗酸化剤には一定の脳移行性が確認されている。従って、VC、edaravone および BHA がその脳移行性の低さによって保護効果を示さなかったとは考え難い。むしろ、 α -LA は抗酸化作用以外の機構で胎児のゴナドトロピン障害や精巣のステロイド合成障害を回復させると考えられた。 α -LA には抗酸化物質としての性質以外に、アセチル CoA 合成等に関する補酵素としての重要な側面がある。前述の通り、TCDD の胎児ゴナドトロピン障害性は視床下部のメタボローム抑制が原因である可能性がある。これを合わせて考えて、 α -LA は補酵素作用に基づいて保護効果を現すものと推定された。

一般に、ダイオキシンの毒性は転写因子である AhR の活性化を通して発現すると考えられている。本研究でも、この可能性について検討を加えたが、胎児視床下部および脳下垂体の CYP1A1 誘導は α -LA では抑制されなかった。従って、胎児ゴナドトロピン障害には AhR 活性化による機構は寄与しないとも考えられる。しかし、これを結論づけるには詳細な検討を要する。何故なら、胎児ゴナドトロピン障害にも AhR 活性化に端を発する機構が関与するものの、 α -LA は AhR 活性化以降の下流の機構を改善する可能性が否定できない。今後、 α -LA がどのような機構で保護効果を惹起するかを解明することが重要な課題と考えられる。

E. 結 論

1. TCDD による胎児脳下垂体ゴナドトロピンと生殖腺ステロイド合成への障害が、必須栄養素である α -LA によって消去できることを見出した。
2. TCDD による胎児ゴナドトロピン障害は、視床下部での生理的代謝プロセスを損傷する機構によって出現する可能性が考えられた。

F. 健康危険情報

特に新規な情報はなし。

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

胎児への食品汚染物質曝露による性未成熟のインプリンティングと
その評価法開発

研究代表者 山田 英之 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 教授
研究分担者 石井 祐次 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 准教授
研究分担者 石田 卓巳 九州大学大学院薬学研究院 分子衛生薬学分野 助教

研究要旨 内分泌攪乱作用を有する食品汚染物質の後世代への影響とその機構については不明な点が多く残っている。我々はこれまでに、代表的な内分泌攪乱物質である 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を対象として機構解析研究を行ってきた。その結果、TCDD は妊娠ラットへの投与によって胎児の脳下垂体ゴナドトロピン産生を障害し、これが原因で胎児のステロイドホルモン合成が抑制され、ひいては成長後の形質不全が規定（インプリント）されることを明らかにしている。しかし、TCDD がどのような機構で胎児脳下垂体ホルモンを抑制するかは全く不明である。そこで本研究では、TCDD が胎児期特異的にゴナドトロピン産生を抑制するのは、本ホルモン生産組織である脳下垂体を制御する視床下部で、エネルギー生産や組織の機能発現に必須な成分が減少する可能性に注目してメタボローム解析を実施した。その結果、TCDD 曝露母ラット中の胎児では、ほぼ視床下部特異的に種々の組織成分が低下することを見出した。同様な変化は成熟動物では観察されず、ゴナドトロピン変動と一致する成績が得られた。このことから、TCDD のゴナドトロピン抑制は、少なくとも一部は上記の仮説機構によって惹起されることが支持された。本研究では、TCDD による胎児ゴナドトロピン低下に酸化的ストレスが関与する可能性についても検討を行った。TCDD 曝露胎児脳下垂体のゴナドトロピン低下、並びに精巣ステロイド合成系タンパク質発現低下は、抗酸化性ビタミンである α -lipoic acid (α -LA) によって正常水準にまで回復した。しかし、脳移行性を有する他の3種の抗酸化剤 (ascorbic acid, edaravone および butyl hydroxyanisole) では同様の回復は認められなかった。 α -LA は抗酸化能力以外にも、エネルギー生産や脂肪酸代謝等における必須補酵素としての側面がある。従って、TCDD による胎児ゴナドトロピン障害は酸化的ストレスの亢進ではなく、中間代謝系の機能低下が主要な要因であることが示唆された。

A. 研究目的

ダイオキシンを初めとする種々の環境汚染物質が性ステロイドホルモン様作用、ないしこれに拮抗する作用を有することは広く知られている。この‘内分泌攪乱物質’としての性

質を通して、ヒトや野生生物の生殖が攪乱されるとの説が一般的である。しかし、このような作用が、生殖や後世代への障害性に直結するか否かは、殆ど理解されていない。従って、環境汚染物質の後世代影響への対策を講

じるには、先ず、生殖障害の機構を解明することが喫緊の課題と考えられる。

内分泌攪乱物質は性ステロイドホルモン受容体への結合能を有するものが多いが、これに要する濃度は食品汚染物質として体内に摂取される量より高く、このような結合性が障害の主因であるとは考え難いと思われる。体内の性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体より遊離するゴナドトロピンによって制御される。当研究室では最近、ダイオキシンが性ホルモンに模倣した性質を通してではなく、上位制御因子である黄体形成ホルモン (luteinizing hormone: LH) 等のゴナドトロピンを障害して重篤な後世代影響をもたらすことを実証した (1)。すなわち、微量ダイオキシン (1 µg/kg) の妊娠ラットへの投与によって、胎児脳のLH産生が障害され、これを起点として、成長後の交尾能力低下が規定される (インプリントされる) ことを明らかにしている。胎児のLH低下が重大である根拠は、ダイオキシン曝露胎児に、不足LHを人為的に補給することによって、交尾障害が回復する事実から明らかである (1)。しかし、ダイオキシンがどのような機構で脳下垂体LHを低下させるかについては不明であり、この疑問は障害対処法や診断法の確立に向けて解決する必要がある。ダイオキシンによる脳下垂体LH等の障害は、胎児後期から出生直後の一時期に特異的である (2) (詳細は未発表成績)。脳下垂体でのゴナドトロピン合成・分泌には十分なエネルギーや神経伝達物質の供給、あるいは神経回路や周辺組織の成熟等の多くの要素が満足されなければならない (3, 4)。従って、ダイオキシンは上記要因を胎児期特異的に障害して、その結果として脳下垂体ゴナドトロピン合成を抑制する可能性がある。

古くから、ダイオキシンの毒性には酸化的ストレス亢進の寄与が指摘されている (5-7)。ダイオキシンによる生殖毒性にも酸化的ストレスの関与を疑う研究成果が発表されている (8-10)。従って、他の可能性として、ダイオキシンによる脳下垂体ホルモンの低下にも酸化的ストレス上昇が寄与することが考えら

れた。

これらの背景から、今年度の研究では、最強毒性のダイオキシンと言われる2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)を用いて、以下の検討を実施した。すなわち、1) 脳下垂体ホルモンやステロイド合成系タンパク質の胎児特異的な低下が脳のエネルギー生産や神経伝達等に関与する物質の生産低下に起因する可能性を検証するため、メタボローム (低分子化合物群の存在状況) 解析を実施した。また、2) TCDDが酸化的ストレス亢進を介してゴナドトロピン障害等を惹起するかどうかを明らかにするため、TCDD依存的なゴナドトロピン低下に与える抗酸化物質の効果について検討を行った。

B. 研究方法

1. メタボローム解析

妊娠Wistarラット (妊娠15日目:GD15) に、TCDD 1 µg/kg/2 mL corn oil またはコントロールとして corn oil を単回経口投与した。GD20 に、母体から雄胎児を取り出し、さらに雄胎児より下垂体と視床下部を採取し、一腹中の全ての雄胎児組織を併せて1サンプルとし、液体窒素により凍結させたのち、使用まで-80°Cにて保存した。比較のため、成熟雄性ラット (7週齢) にもTCDD (1 µg/kg) または corn oil を単回経口投与し、5日後に下垂体と視床下部を採取し、液体窒素により凍結させたのち、使用まで-80°Cにて保存した。

凍結組織をエッペンドルフチューブに移し、50 mM arabinose 0.6 µL を内部標準として添加した。これに chloroform/methanol (1:2) 混合液を 300 µL 添加し、マイクロホモジナイザーでホモジナイズした (4°C, 1.5 分)。ホモジナイズ液に精製水 100 µL 加え、再度ホモジナイズした (4°C, 1 分)。遠心分離 (12,000 × *g*, 10 分) を行い、上清を回収した。残存有機層に chloroform/methanol (1:2) 混合液 300 µL および精製水 100 µL 加え、ホモジナイズした (4°C, 1 分)、遠心分離後 (12,000 × *g*, 10 分)、上清を回収した。最後に chloroform/精製水 (1:1) 混合液 200 µL を添加後、2回目と同様

に抽出処置を行った。回収した上清を全て合し、窒素ガスにより溶媒留去後、シリカゲルと五酸化ニリン存在下に真空デシケータ内に一晚放置した。本実験においては、成獣に関しては一匹あたりの組織、胎児においては一腹の母体に含まれる全雄胎児の組織を併せたものを一回の測定に用いるサンプルとした。

得られた抽出残渣に *o*-methylhydroxylammonium chloride (30 mg/mL pyridine) を 50 μ L 添加し、加温した (37°C、2 時間)。その後、窒素ガスにて pyridine を留去し、*N, O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide 20 μ L と pyridine 10 μ L を添加し、再度、加温した (37°C、2 時間)。得られた誘導体化合物は gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) 分析に供した。GC-MS 分析は以下に示す条件で行った：装置、島津製作所社製 GCMS-QP2010；カラム、キャピラリーカラム 30 m (5MS; RESTEK 社)；イオン化方法、エレクトロスプレー；イオン化電圧、70 eV；注入口温度、280°C；カラム温度、80°C (0-5 分), 80-320°C (5-30 分), 320°C (30-40 分)。得られた代謝物のピークはマスフラグメンテーションパターンをライブラリーと比較し、構造の推定を行った。

メタボロームパターンの変動は以下のように解析した。GC-MS 分析で得られたマトリックステータを、SIMCA-P+ (UMETRICS 社) ソフト

ウェアを用いた主成分分析 (PCA) (11) および直交型部分的最小二乗法 (orthogonal partial least-squares to latent structures; OPLS) により解析した。また、OPLS より得られた S-プロットをもとに有意な変動を示す質量イオン (m/z) を抽出し、クロマトグラムへの帰属を行った。この結果として、マススペクトル中の基準ピークにおいて有意な差が見られたものを、有意に発現が変動する化合物とした (12, 13)。

2. 酸化的ストレスの影響の解析

妊娠 Wistar ラット (GD15) に、4 種の抗酸化物質のいずれかを下記の用量で静脈投与した： α -lipoic acid (α -LA: 20 mg/kg/200 μ L)、3-*tert*-butyl hydroxyanisole (BHA: 500 mg/kg/200 μ L)、ascorbic acid (VC: 200 mg/kg/200 μ L) および edaravone (3 mg/kg/200 μ L)。Edaravone は田辺三菱製薬(株)から供与を受けて使用した。抗酸化物質の投与 30 分後に TCDD を 1 μ g/kg/2 mL 単回経口投与した。そののち、GD16 から GD20 にかけて 1 日 1 回、初日と同用量の抗酸化物質を尾静脈内投与し、最終投与 30 分後に胎児から精巣および下垂体を摘出した。摘出した臓器は、液体窒素で凍結させたのち、使用するまで -80°C に保存した。

組織中の mRNA 発現量は、既報に従って reverse transcription-polymerase chain

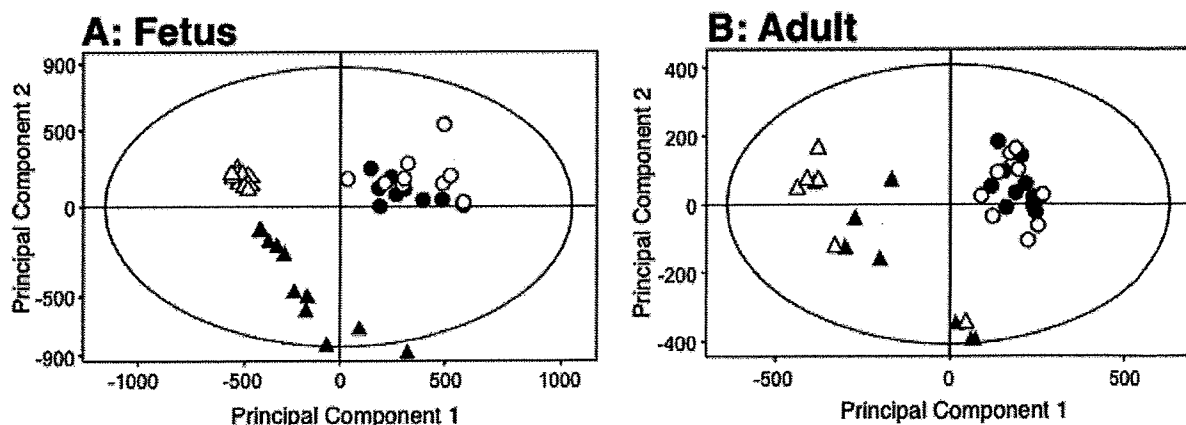


図 1. TCDD によるメタボローム変化の多変量解析 (PCA)

胎児 (A) および成獣 (B) のメタボロームを TCDD 処理の有無で解析：丸シンボルは脳下垂体、三角シンボルは視床下部。A, B とも、黒シンボルは対照群であり、白シンボルが TCDD 処理群。胎児の実験では、妊娠ラット (GD15) に TCDD を投与し、GD20 の胎児を解析 (使用母親数 = 8-10)。成獣実験では TCDD 処理 5 日後の組織を使用して解析 (N = 6-10)。

reaction (RT-PCR)を用いて測定した(2, 14)。精巢のステロイド合成系タンパク質発現はイムノブロッティング法により解析した(1, 2)。胎児血清中の LH 濃度は Endocrine Technologies 社製キットによる酵素免疫測定法によって定量した。

3. 倫理面への配慮

全ての動物実験は、本学の動物実験倫理審査委員会の審査を受け、その承認の下に、動物の苦痛を排除して実施した。

C. 研究結果

1. TCDD による脳メタボロームの変動とその年齢差

TCDD を妊娠ラット (GD15) に投与し、GD20 雄胎児の脳下垂体および視床下部を取り出し、GC-MS によるメタボローム解析を行った。脳下垂体のゴナドトロピン合成・分泌は視床下部の制御を受けるため、解析に当たっては上記の2種の脳領域を対象とした。また、検出された変動が胎児期特異的であるか否かを知る目的で、

成熟雄ラットからも TCDD 投与5日後の脳組織を調製して比較検討を行った。GC-MS で得られた各種成分の変動を PCA によってプロファイリングした結果を図1に示す。先ず、脳下垂体では胎児と成獣のいずれにおいても、対照群と TCDD 処理群の主成分ドットが近接領域に密集しており(パネルAとBの白および黒丸の比較)、TCDD はこの組織でのメタボロームを殆ど変化させないことが示唆された。一方、胎児の視床下部では、対照群(黒三角)と TCDD 処理群(白三角)の主成分ドットが明らかに乖離していた(パネルA)。このことは、胎児視床下部では TCDD によってメタボロームパターンが変動することを示唆する。同様の傾向は TCDD を成獣に与えても観察されたが(パネルB)、この場合は対照群と TCDD 処理群のドットが一部重複しており、胎児ほどプロファイルの違いが顕著ではなかった。

次に、TCDD 依存的に変動する成分の特定を行うため、メタボローム変動を脳下垂体と視床下部について個別に OPLS 法によって解析した。

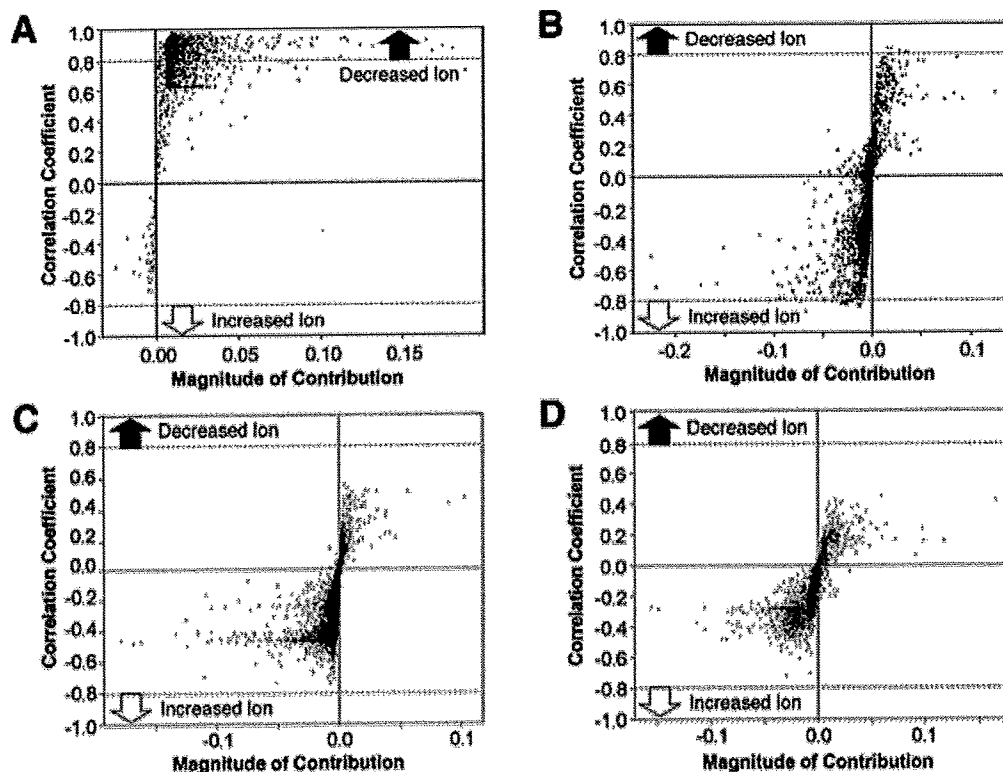


図2. TCDD によって変動するフラグメントイオン
A: 胎児視床下部; B: 胎児脳下垂体; C: 成獣視床下部; D: 成獣脳下垂体
GC-MS データを一旦 OPLS によって対照群と TCDD 群とに特徴付けした(図は未掲載)。これを基に、TCDD によって変動するイオンを抽出し、変動への寄与とその相関係数によってプロット。各ドットはある質量を有する単一イオンを示す。

表 1. TCDD によって変動する推定組織成分

Tissue	Cellular components altered by TCDD				
	↓↓ ^a	↓ ^a	↑ ^a	↑↑ ^a	
Hypothalamus	Alanine	Ascorbic acid	None	None	
	Aspartic acid	Citric acid			
	Fumaric acid	Glycine			
	GABA	Malic acid			
	Glutamine	Serine			
	Glycerol	Valine			
	Isoleucine	Galactose			
	Lactic acid	Inositol			
	Phenylalanine	Ribitol			
	Threonine	Myo-inositol			
	Pituitary	Proline	Fructose	Alanine	None
		Threonine			

変動の程度：下向き二重矢印（低下）および上向きに重矢印（増加）：対照群の2倍以上の変化を示す物質。下向き一本矢印（低下）および上向き一本矢印（増加）：対照群の2倍以内の変動を示す物質。

TCDD によって変動する成分の質量情報を変動に対する寄与と寄与の確かさの関連性で表現した S-プロットを図 2 に示す。相関係数 0.8

以上（減少成分）および-0.8 以下（増加成分）で変動への寄与が強いと疑われる成分は、成獣の脳下垂体と視床下部には検出されず、また胎児の脳下垂体にも殆ど存在しなかった。唯一、胎児の視床下部では多くの成分が TCDD 依存的に減少することが示唆された。質量情報等を基に、TCDD 依存的に変動する化合物を推定した結果を表 1 に示す。胎児視床下部では、エネルギー生産に関与する有機酸や糖類、並びにアミノ酸などが TCDD によって存在水準が低下するものと推定された。また神経伝達に関わる γ -aminobutyric acid (GABA) も胎児視床下部において低下することが示唆された。これらの結果から、TCDD は脳下垂体を制御する視床下部において、種々の成分を減少させることが示唆され、しかもその影響は胎児において顕著であった。

2. TCDD の脳下垂体ゴナドトロピン低下作用における酸化ストレスの寄与

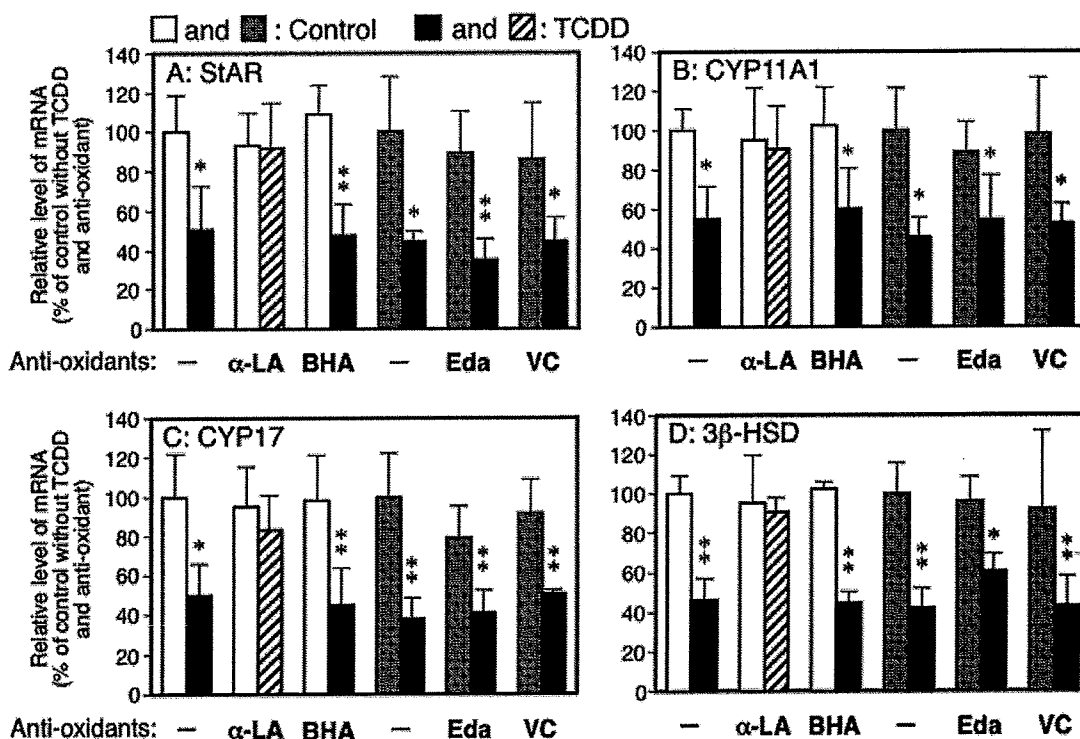


図 3. TCDD による胎児・性ステロイド合成系 mRNA の低下とそれに及ぼす抗酸化剤の効果
TCDD 曝露 (GD15) 母ラットに抗酸化物質を併用処理 (GD15-20) し、GD20 胎児の mRNA を解析。mRNA 水準は β -actin mRNA で標準化。各バーは母ラット 3 匹の平均値 \pm 標準偏差 (一腹中の雄胎児 2 匹を分析後、値を平均して解析単位とした)。白バーの対照群には、dimethyl sulfoxide ないしこれに溶解した抗酸化剤とコーン油 (TCDD 溶解用溶剤) を投与。灰色バーの対照群には、NaCl 溶液ないしこれに溶解した抗酸化物質とコーン油を投与。有意差：*P < 0.05; **P < 0.01。

次に本研究では、TCDD が酸化ストレス亢進を介して精巣ステロイド合成系タンパク質や脳下垂体ゴナドトロピン発現を障害する可能性を検討した。若し、酸化ストレスが重要な役割を演じるのであれば、障害が抗酸化剤に消滅ないし軽減されるはずである。本研究では、抗酸化物質として2種のビタミン [α -lipoic acid (α -LA) および ascorbic acid (VC)]、酸化ストレス改善薬 edaravone および古くから知られる抗酸化剤の 3-*tert*-butyl hydroxyanisole (BHA) の合計4種を用いて検討を加えた。胎児精巣のステロイド合成系タンパク質発現について検討した結果を図3に示す。既報の成績と一致して、TCDD 曝露 (GD15) 母ラットの胎児 (GD20) では、性ステロイド合成の律速過程に関与する cholesterol transporter である steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) の mRNA が対照群と比較して有意に低下した。しかし、母ラットに

TCDD に加えて α -LA を併用した場合には、この低下が完全に回復した (図3A)。しかし、他の3種の抗酸化剤は保護効果を示さなかった。同様な結果は、性ステロイド合成酵素である cytochrome P450 11A1 (CYP11A1)、CYP17 および 3β -hydroxysteroid dehydrogenase の mRNA についても観察された。すなわち、これらの mRNA の胎児精巣での発現は TCDD によって抑制され、それらは α -LA の併用によってのみ正常水準に復帰した (図3B-D)。

胎児の脳下垂体ホルモンについても同様な成績が得られた。胎児脳下垂体 LH およびもう一種のゴナドトロピンである follicle-stimulating hormone (FSH) は、それらの β -サブユニット mRNA が TCDD の母体曝露によって低下する。しかし、これらの減少は、母体に α -LA を併用処理することによって完全に回復した (図4A, B)。他の3種の抗酸化物質には保護効果は観察されなかった (図4A, B)。こ

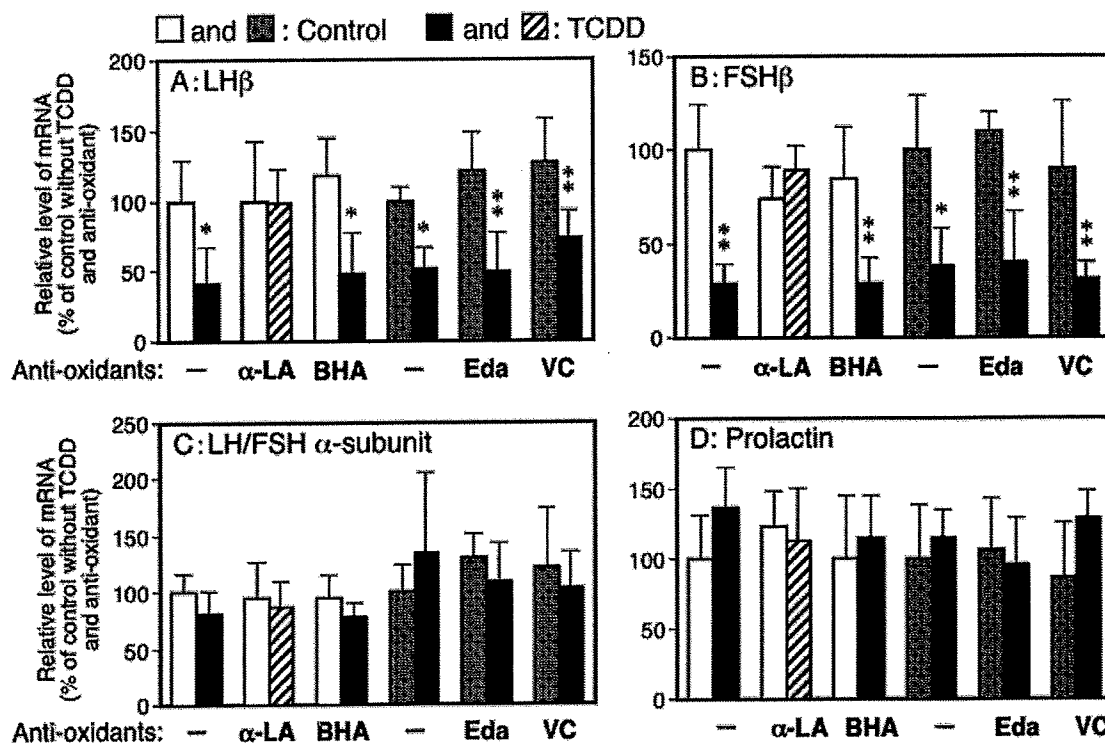


図4. TCDD による胎児・脳下垂体ホルモン mRNA の低下とそれに及ぼす抗酸化剤の効果
TCDD 曝露 (GD15) 母ラットに抗酸化物質を併用処理 (GD15-20) し、GD20 胎児の mRNA を解析。mRNA 水準は β -actin mRNA で標準化。各バーは母ラット3匹の平均値±標準偏差 (一腹中の雄胎児脳下垂体をプールして分析して解析単位とした)。白バーと灰色バーの対照群の処理方法については図3の脚注を参照。有意差: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

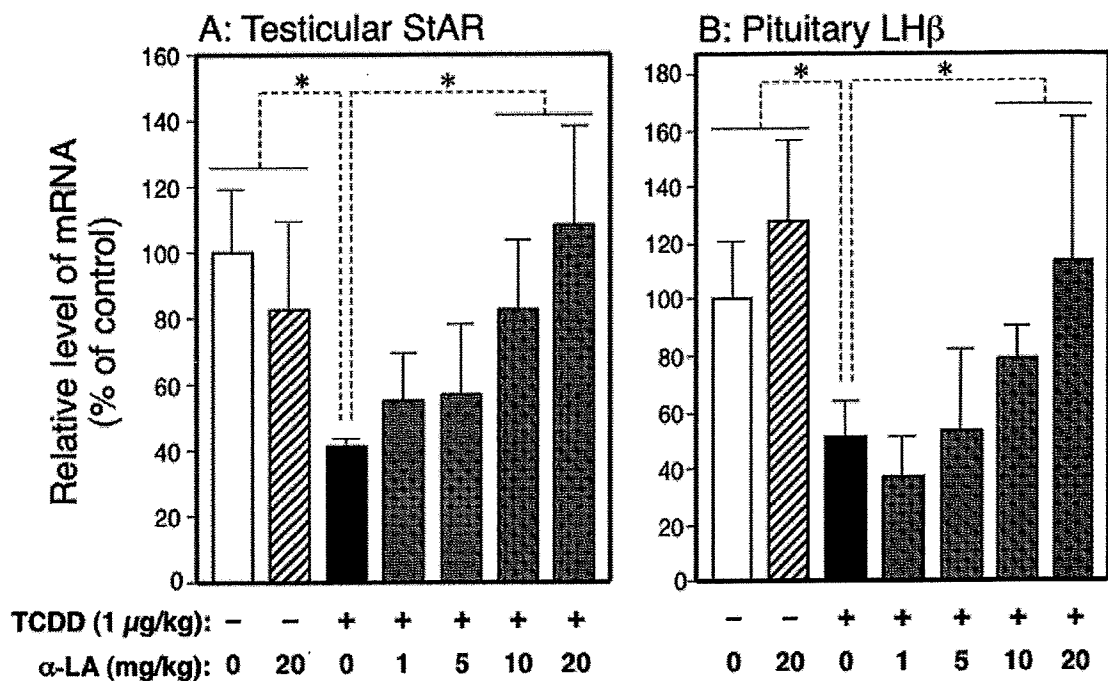


図5. TCDDによる胎児 StAR (A)および LHβ (B) mRNA 発現低下に対するα-LA 保護効果の用量依存性

Aの実験では、一腹中2匹の胎児のデータを平均し、3匹の母親の結果として表示(平均値±標準偏差)。Bの実験では、一腹中の雄胎児の脳下垂体をプールして分析し、3匹の母親の数値として表示(平均値±標準偏差)。有意差:P < 0.05。

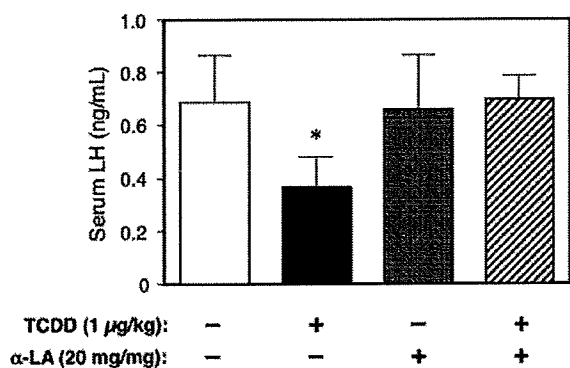


図6.胎児血清 LH ホルモン水準減少に対するα-LAの保護作用

各バーは3匹の母ラットの平均値±標準偏差(一腹中2匹の胎児のデータを平均したものが解析単位)。対照群からの有意差:P < 0.05

これらの成績は、これまでの推定とよく一致している。すなわち、胎児精巣のステロイド合成系低下は視床下部ゴナドトロピン減少に起因するものであり、これのα-LAによる改善はステロイド合成系障害の改善に直結することが示された。脳下垂体ホルモンでも、LH/FSHのα-サブユニットと prolactin については、TCDDによって変動せず、またα-LAを併用しても対

照群との間に有意差は認められなかった(図4 C, D)。α-LAの胎児 StAR および CYP17 発現における保護効果の用量依存性を図5に示す。α-LAは、10 mg/kg以上の投与量でどちらの発現も回復させ、20 mg/kgではほぼ完全に発現を対照水準へ復帰させた。

上記のα-LAの保護効果は mRNA 発現を指標に検討したものであるが、タンパク質レベルでの解析によっても同様な成績が納められた。例えば、脳下垂体 mRNA 変動と一致して、TCDD 曝露胎児では血清中の LH の水準が低下することが確認され、これはα-LAの併用で対照レベルへ復帰した(図6)。また、胎児精巣の StAR および CYP17 タンパク質発現は TCDD の母体曝露で低下し、これらもα-LAの併用で回復した(図7)。

ダイオキシンによる毒性の多くには芳香族炭化水素受容体(aryl hydrocarbon receptor: AhR)の活性化が関与すると言われている(15-17)。TCDDによる脳下垂体ゴナドトロピン低下にも AhR が関与するか否かは興味のある問題である。AhRの活性化は多くの遺伝子の

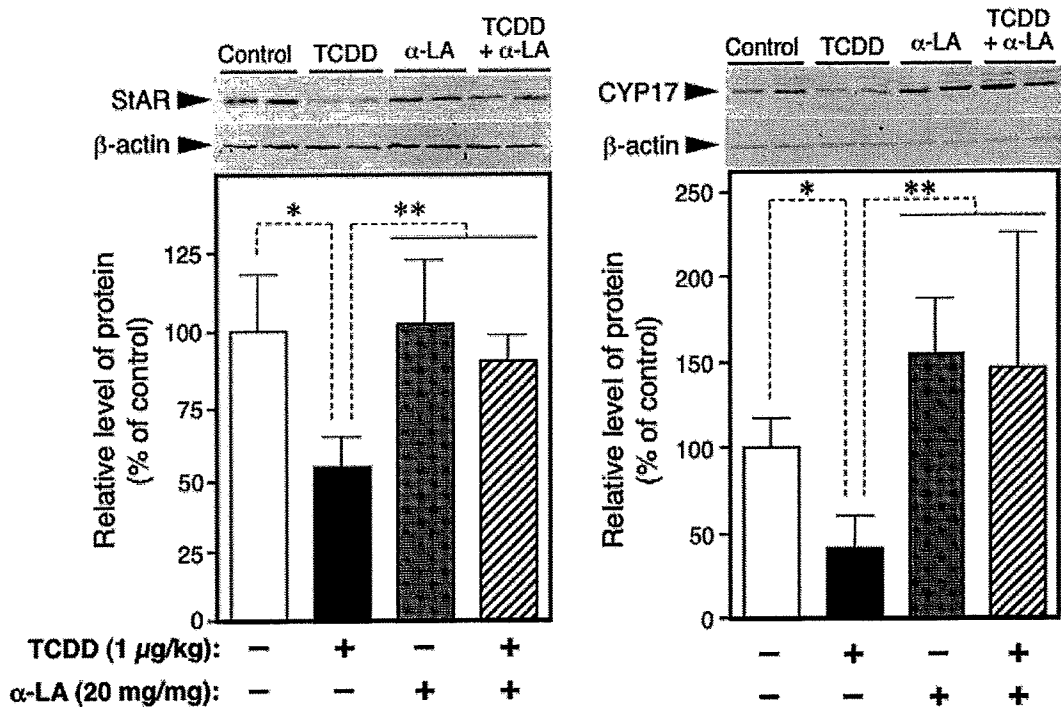


図7. α -LAによるTCDD依存的な胎児StARおよびCYP17タンパク質発現低下の回復
妊娠ラットをTCDD (GD15)および α -LA (GD15-20)で処理したのち、GD20胎児の精巢
を試料としてイムノブロッティングで解析。バンド強度を β -アクチン量で標準化し
たのち数値化。各バーは3匹の母親（一腹の胎児の精巢をプールして分析）の平均値
±標準偏差。有意差：* $P < 0.05$ ； ** $P < 0.01$

発現増加をもたらすが、CYP1A1の誘導はその代表例である。若し、胎児ゴナドトロピン抑制にAhRが関与するとすれば、LH/FSH障害回復効果を有する α -LAはTCDDのCYP1A1誘導能をも抑制する可能性がある。これを検証した結果(図8)、胎児脳下垂体と視床下部のCYP1A1 mRNAはいずれもTCDD母体曝露によって増加した。しかし、 α -LAはこれらの誘導を抑制することはできなかった。従って、TCDDによる胎児脳下垂体ゴナドトロピンの抑制にはAhR活性化以外の機構が重要と推察された。

D. 考察

本研究では、先ずTCDDによる脳下垂体ゴナドトロピンの抑制機構とその胎児期特異性を明らかにするため、メタボロームの解析を実施した。ゴナドトロピン合成と分泌には、gonadotropin-releasing hormone (GnRH)が重要な役割を演じる。本ホルモンは視床下部からの神経を介して脳下垂体を刺激し、LHやFSH等の合成・分泌を促進する。従って、視床下部

GnRH神経の成熟がゴナドトロピン制御には不可欠な要因となる。これと関連して、GnRH神経の成熟等、視床下部の発達のためにはこの領域に十分なエネルギーが供給されることや他の神経伝達物質の神経の共発育やそれらとのクロストークが必要と考えられている(3,4)。これらを考慮して、本研究では脳下垂体のみならず視床下部にも注目して、低分子化合物群の網羅的な解析を実行した訳である。解析の結果、胎児視床下部のメタボロームはTCDDの母体曝露によって変動し、多くの成分が減少することを見いだした。低下する物質群には、エネルギー生産に関わる有機酸や糖類等に加えてGABAも推定された。これに対し、成熟ラットにおける視床下部メタボロームの変化は顕著ではなかった。この結果は、TCDD依存的な脳下垂体ゴナドトロピン変動が胎児特異的に出現することと見かけ上一致している。従って、胎児ゴナドトロピンの障害は、その上流の機構として、視床下部のエネルギー生産性物質や神経伝達物質等の低下に起因する可能性が考えられた。

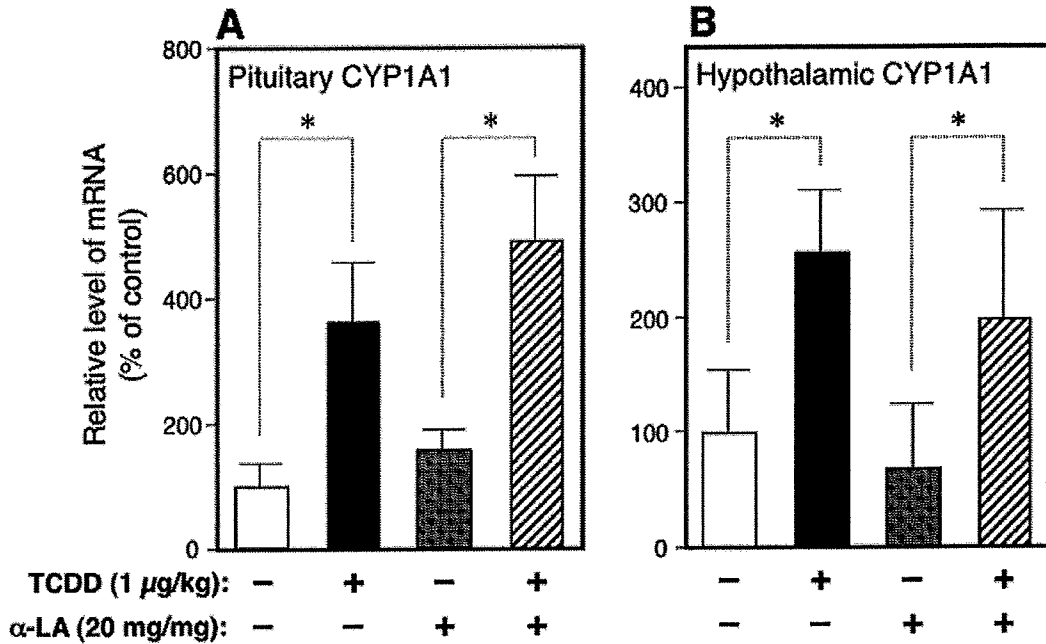


図8. TCDD による胎児脳下垂体 (A)および視床下部 (B)の CYP1A1 誘導とそれに及ぼす α -LA の効果

TCDD (GD15) および α -LA (GD15-20) 処理した妊娠ラット中の胎児 (GD20) の脳 CYP1A1 mRNA を分析。各バーは3匹の母ラットの平均値±標準偏差 (一腹の胎児の脳部位をプールして分析し、解析単位とした)。有意差: $P < 0.05$ 。

末梢組織では、ダイオキシンによってエネルギー生産/利用系が障害を受けることが知られている (18)。また、胎児脳における解糖系やトリカルボン酸経路はかなり未成熟である (19, 20)。胎児脳のメタボロームがダイオキシンに対して感受性が高く、この障害によって後続の障害を惹起する可能性は更なる検討を要する。

今年度の研究では、胎児ゴナドトロピン障害が TCDD による酸化ストレス亢進に起因する可能性についても検討を加えた。その結果、使用した4種の抗酸化剤のうち、 α -LA のみが保護効果を示した。他の3種 (VC, edaravone および BHA) は無効であった。上記の3種が効果を示さない理由として、脳移行性の問題が考えられる。しかし、VC, edaravone および BHA には一定の脳移行性が確認されている (21-26)。また、edaravone は酸化ストレスに起因する脳障害に対して効果が期待される薬剤である (27)。従って、VC, edaravone および BHA がその脳移行性の低さによって保護効果を示さなかったとは考え難い。むしろ、 α -LA は抗酸

化作用以外の機構で胎児のゴナドトロピン障害、ひいては精巣のステロイド合成障害を回復させると考える方が自然であろう。これとの関連で、 α -LA には抗酸化物質としての性質以外に、補酵素としての重要な側面がある (28)。すなわち、本ビタミンはアセチル CoA 合成や α -ケトグルタル酸からスクシニル CoA への変換 (トリカルボン酸経路中の反応) における補酵素として必須である。前述の通り、TCDD の胎児ゴナドトロピン障害性は視床下部のメタボローム抑制が原因である可能性がある。 α -LA はエネルギー生産等の中間代謝に必要な物質であり、この作用に基づいて保護効果を現すとの推定は、得られた成績を合理的に説明できるように思われる。

一般に、ダイオキシンの毒性は転写因子である AhR の活性化を通して発現すると考えている研究者が多い (15-17)。本研究でも、CYP1A1 誘導を指標にしてこの可能性について検討を加えたが、胎児視床下部および脳下垂体の CYP1A1 誘導は α -LA では抑制されなかった。単純に解釈すると、胎児ゴナドトロピン障害には

AhR 活性化による機構が寄与しないと考えられる。これも一つの可能性であるが、結論を得るには詳細な検討を要する。例えば、胎児ゴナドトロピン障害にも AhR 活性化に端を発する機構が関与し、 α -LA は AhR 活性化以降の下流の機構を改善するのかもしれない。今後、 α -LA がどのような機構で保護効果を惹起するかを解析することが重要な課題と考えられる。

E. 結論

1. TCDD による胎児脳下垂体ゴナドトロピンと生殖腺ステロイド合成への障害が、必須栄養素である α -LA によって除去できることを見出した。
2. TCDD による胎児ゴナドトロピン障害は、視床下部での生理的代謝プロセスを損傷する機構によって出現する可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., and Yamada, H., Maternal exposure to dioxin reduces hypothalamic but pituitary metabolome in fetal rats: a possible mechanism for a fetus-specific reduction in steroidogenesis. *J. Toxicol. Sci.*, in press.

2. 学会発表

1. 山田英之, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 石田卓巳, ダイオキシンによる胎児・性ホルモン合成失調の分子機構. 第2回博多シンポジウム: 内・外環境と生物応答, 2009年10月(福岡).
2. 古賀貴之, 武田知起, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之, ダイオキシンによる胎児・性ホルモン合成障害の対処法確立に向けた検討. 第2回博多シンポジウム: 内・外環境と生物応答, 2009年10月(福岡).
3. Koga, T., Takeda, T., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Restoration by α -lipoic acid of dioxin-induced attenuation in the fetal expression of steroidogenic proteins and

gonadotropins. HORIBA/CDBIM Symposium: 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease, Oct. 2009 (Tokyo).

4. 古賀貴之, 武田知起, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之, ダイオキシンの急性毒性およびラット胎児・性ホルモン合成障害に対する α -リポ酸の効果. フォーラム 2009: 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2009年11月(沖縄).
5. 石田卓巳, 松本悠揮, 武田知起, 古賀貴之, 石井祐次, 山田英之, ダイオキシン胎児期曝露に伴うステロイドホルモン合成阻害機構の解析. 第26回日本薬学会九州支部大会, 2009年12月(福岡).
6. 古賀貴之, 武田知起, 石井祐次, 石田卓巳, 山田英之, ダイオキシンによるラット胎児脳下垂体-生殖腺機能に対する α -リポ酸の効果. 日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山.

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

H. 参考文献

1. Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Maternal exposure to dioxin disrupts gonadotropin production in fetal rats and imprints defects in sexual behavior. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 929: 1091-1099 (2009).
2. Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H., Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxins in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology*, 147: 927-936 (2006).
3. Schneider, J.E., Energy balance and reproduction. *Physiol. Behav.*, 81: 289-317 (2004).
4. Schwarz, J.M., and McCarthy, M.M., Cellular mechanism of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 109: 300-306 (2008).
5. Stohs, S.J., Hassen, M.Q., and Murray, W.J.,

- Lipid peroxidation as a possible cause of TCDD toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 111: 854-859 (1983).
6. Stohs, S.J., Hassen, M.Q., and Murray, W.J., Effects of BHA, d-alpha-tocopherol and retinol acetate on TCDD-mediated changes in lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity and survival. *Xenobiotica*, 14: 533-537 (1984).
 7. Ishida, T., Hori, M., Ishii, Y., Oguri, K., and Yamada, H., Effects of dioxins on stress-responsive systems and their relevance to toxicity. *J. Dermatol. Sci.*, 1: S105-112 (2005).
 8. Hassoun, E.A., Walter, A.C., Alsharif, N.Z., and Stohs, S.J., Modulation of TCDD-induced fetotoxicity and oxidative stress in embryonic and placental tissues of C57BL/6J mice by vitamin E succinate and ellagic acid. *Toxicology*, 124: 27-37 (1997).
 9. Latchoumycadane, C., and Mathur, P., Induction of oxidative stress in rat epididymal sperm after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Arch. Toxicol.*, 76: 113-118 (2002).
 10. Latchoumycadane, C., Chitra, C., and Mathur, P., Effects of vitamin E on reactive oxygen species-mediated 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in rat testis. *J. Appl. Toxicol.*, 22: 345-351 (2002).
 11. Trygg, J., Holmes, E., and Lundstedt, T., Chemometrics in metabolomics. *J. Proteome Res.*, 6: 469-479 (2007).
 12. Fujiwara, M., Arifuku, K., Ando, I., and Nemoto, T., Pattern recognition analysis for classification of hypertensive model rats and diurnal variation using ¹H-NMR spectroscopy of urine. *Anal. Sci.*, 21: 1259-1262 (2005).
 13. Pongsuwan, W., Fukusaki, E., Bamba, T., Yonetani, T., Yamahara, T., and Kobayashi, A., Prediction of Japanese green tea ranking by gas chromatography/mass spectrometry-based hydrophilic metabolite fingerprinting. *J. Agr. Food Chem.*, 55: 231-236 (2007).
 14. Ishida, T., Kan-o, S., Mutoh, J., Takeda, S., Ishii, Y., Hashiguchi, I., Akamine, A., and Yamada, H., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced change in intestinal function and pathology: evidence for the involvement of arylhydrocarbon receptor-mediated alteration of glucose transportation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 205: 89-97 (2005).
 15. Poland, A., and Knutson, J.C., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 22: 517-554 (1982).
 16. Fernandez-Salguero, P.M., Hilbert, D.M., Rudikoff, S., Ward, J.M., and Gonzalez, F.J., Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-induced toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 140: 173-179 (1996).
 17. Mimura, J., and Fujii-Kuriyama, Y., Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta*, 1619: 263-268 (2003).
 18. Ishii, Y., and Oguri, K., Liver proteins that are sensitive to a dioxin-like toxic compound coplanar polychlorinated biphenyl, 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *J. Health Sci.*, 48: 97-105 (2002).
 19. Leong, S.F., and Clark, J.B. Regional development of glutamate dehydrogenase in the rat brain. *J. Neurochem.*, 43: 106-111 (1984).
 20. Buerstatte, C.R., Behar, K.L., Novotny, E.J., and Lai, J.C., Brain regional development of the activity of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in the rat. *Brain Res. Dev. Brain Res.*, 125, 139-145 (2000).
 21. Martin, G.R., and Mecca, C.E., Studies on the distribution of L-ascorbic acid in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.*, 93: 110-114 (1961).
 22. Taylor, M.J., Sharma, R.P., and Bourcier, D.R., Tissue distribution and pharmacokinetics of ³H-butylated hydroxyanisole in female mice. *Agents Act.*, 15: 454-458 (1984).
 23. Ahmed, A.E., Ansari, G.A., Dencker, L., and Ullberg, S., Differential distribution of placental transport of 2- and 3-*t*-[methyl-¹⁴C]butylated-4-hydroxyanisole (BHA) in pregnant mice. *Fund. Appl. Toxicol.*, 16: 356-366 (1991).
 24. 小松貞子, 中井弘司, 尾畑莉恵, 飯田成宇, ラットにおける 3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186)の体内動態に関する研究 (3); 胎仔および乳汁中への移行性. *薬物動態*, 11: 492-498 (1996).
 25. Simán, C., and Eriksson, U.J., Vitamin C supplementation of the maternal diet reduces

- the rate of malformation in the offspring of diabetic rats. *Diabetologia*, 40: 1416-1424 (1997).
26. Cheng, H.T., New, L.S., Neo, A.H., Goh, C.W., Browne, E.R., and Chan, E.C., Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Res.*, 1251: 80-86 (2009).
27. Higashi, Y., Edaravone for the treatment of acute cerebral infarction: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress. *Expert Opin. Pharmacother.*, 10: 323-331 (2009).
28. Packer, L., Roy, S., and Sen, C.K., α -Lipoic acid: a metabolic antioxidant and potential redox modulator of transcription. In *Antioxidants in Disease Mechanisms and Therapy*, Adv Pharmacol Vol 38, Part I: Natural Antioxidants (Sites H, ed). San Diego: Academic Press, 79-101 (1997).

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	なし						

雑誌

著者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsumoto, Y., Ishida, T., Takeda, T., Koga, T., Fujii, M., Ishii, Y., Fujimura, Y., Miura, D., Wariishi, H., and Yamada, H.	Maternal exposure to dioxin reduces hypothalamic but pituitary metabolome in fetal rats: a possible mechanism for a fetus-specific reduction in steroidogenesis.	J. Toxicol. Sci.	印刷中		2010