

201035016A

厚生労働省科学研究費補助金
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22年度総括・分担研究報告書
研究代表者 山田 英之

平成23（2011）年5月

厚生労働省科学研究費補助金
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22年度総括・分担研究報告書
研究代表者 山田 英之

平成23（2011）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	6
研究代表者/研究分担者 山田 英之	
研究分担者 石井 祐次、武田 知起	

III. 成果の刊行に関する一覧表	19
-------------------------	----

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 食品汚染物質が臨界期の胎児・新生児の脳下垂体ゴナドトロピンの障害を介して性未成熟を固着させる可能性に注目し、ゴナドトロピン障害の時期特異性と機構等についてラットを用いた検討を行った。研究の結果、以下の成果が得られた。1) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は胎児期後期から出生直後の一時期にかけて脳下垂体ゴナドトロピン、並びに精巣ステロイドホルモン合成系を低下させた。2) 新規に構築した液体クロマトグラフィー／質量分析法により、TCDD曝露胎児の精巣 testosterone 含量は顕著に低下することが確認された。3) 培養脳下垂体を用いた検討から、TCDD は脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子発現を胎児期特異的かつ直接的に抑制し得ることが示唆され、上記の 1)と 2)の機構には、少なくとも一部は TCDD による脳下垂体機能の直接的作用によって説明可能と考えられた。4) 胎児期の一過性のゴナドトロピン／性ステロイド低下が成熟後にまで継続する遺伝子発現変動をもたらす可能性の検証のため、視床下部と脳下垂体のマイクロアレイ解析を実施し、gonadotropin-releasing hormone を含む多くの遺伝子変動が把握できた。5) TCDD と同様な機構で後世代毒性を惹起する食品汚染物質の検索のため、6 物質につき検討を加えた。その結果、性腺のステロイド合成系低下を惹起する物質は存在したが、胎児脳下垂体ゴナドトロピンを標的として障害を引き起こす物質は見い出せなかった。以上の研究成果を総合して、食品汚染物質の中には、臨界期の生殖腺ステロイド合成を低下させて後世代毒性を惹起するものがあり、機構的には、脳下垂体ゴナドトロピン障害を起点にするタイプと生殖腺を直接障害するタイプの少なくとも2種が存在すると考えられた。

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

武田 知起 九州大学大学院薬学研究院
分子衛生薬学分野 助教

ドトロピンの低下が、脳下垂体制御組織である視床下部の発育や活動の抑制に基づく可能性を想定して研究を実施した。すなわち、TCDD が視床下部のメタボロームを障害して内分泌を抑制する機構について検証を実施し、推定を支持する成績を得た。また、胎児ゴナドトロピン低下を解消する方策について検討を行い、ビタミン様物質である α -リポ酸に優れた障害消去作用があることを見いだした。

A. 研究目的

平成21年度の研究では、最強毒性のダイオキシンである 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用い、これによる胎児脳下垂体ゴナ

昨年度の研究によって、視床下部メタボロー

ムの障害が、脳下垂体ホルモン生産を引き起こす要因の一つであることが示唆されたが、このことのみから、TCDDの脳下垂体への直接作用を否定するのは尚早である。そこで本年度の研究では、より精密に毒性発現の機構を解析する目的で、TCDDがゴナドトロピン遺伝子発現に直接的に影響し得るか否かについて、培養胎児脳下垂体を用いた解析を実施した。

既に当研究室では、ダイオキシンの母体曝露が胎児の性ステロイド合成を障害することを明らかにしているが、障害が発生する時期については詳細には調べていない。そこで本年度は、この情報の収集も行った。ダイオキシンは胎児期の性ステロイド合成障害を端緒として成長後の交尾能力不全を惹起する。この場合、脳遺伝子の何が変調しているかを知れば、胎児期の性ステロイド刺激と脳分化の関連性についての重要な知見となる。そこで本研究では、この問題にも焦点を当て、TCDD曝露母から出生した児の成長後の脳遺伝子発現状況についてマイクロアレイ解析を実施した。

本研究は、TCDDの後世代毒性だけに注目したものではなく、種々の食品汚染物質による胎児発達障害やその評価法構築を目指すものである。TCDDと同様に胎児脳下垂体-性腺系への障害を有するものがあるか否かは重要な問題と考えられるので、今年度はTCDD以外の6種の物質について併せて検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

全ての実験はWistar系ラットを購入して使用した。妊娠ラットは雌雄の成熟ラットを交配させ、膣内に精子が確認された日を妊娠0日目(GD0)として実験に供した。TCDDを投与するin vivo実験では、GD15の妊娠ラットに、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。雄胎児あるいは出生児より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。

2. 脳下垂体培養

薬物未処理の妊娠ラットのGD20胎児あるい

は出生7日後(PND7)の新生児より脳下垂体を摘出した。組織は、血清未添加培地中で、37°C、1時間予備培養した。組織を新しい培地に移し、処理薬剤を添加後、37°Cで24時間培養した。培養後、total RNAを抽出し、mRNA発現解析を行った。

3. mRNAおよびタンパク質発現量解析

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。一部の実験では、リアルタイムPCR法を用いて解析した。精巣・性ステロイド合成系タンパク質の発現は、Western blotting法を用い、既報の手順で解析した。ゴナドトロピンの血清中濃度は、市販の酵素免疫測定キットを用いて測定した。

4. マイクロアレイ解析

TCDD処理した妊娠Wistar ラット(GD15、1 µg/kg)から出生したPND70の雄ラットより視床下部と脳下垂体を摘出した。total RNAを抽出し、これより一本鎖cDNAを合成した。次いで、DNA polymerase および ribonuclease Hを加えて反応させ、二本鎖cDNAを合成した。T7 RNA polymeraseを用いてビオチン標識cRNAを合成したのち、これを用いてハイブリダイゼーション反応を行った。その後、チップを洗浄し、二次蛍光化処理を行ったのち、蛍光シグナルを検出した。1.2-1.3倍の変動が有意に認められた遺伝子を抽出し、クラスタリング解析を行った。

5. テストステロン含量測定

胎児精巣ホモジネートに終濃度 1M となるようにNaOHを加えたのち、60°Cで1時間加温した。加熱終了後、少過剰のHClを加えて酸性としたのち、NaHCO₃で中和し、*n*-hexane-ethyl acetate (3:2, v/v)で抽出した。抽出液を窒素気流下に溶媒留去後、残差をmethanolに溶解し、その一部を飛行時間型質量分析計(TOF-MS)を装着した超高速液体クロマトグラフ(UPLC)に注入した。検量線は分析対象精巣のホモジネートにtestosterone-d₃体を添加後、上記と同様に操作して作成した。分析はWaters社製Acquity UPLC-TOF-MSシステムを用いて実施した。

C. 研究結果

1. 生殖腺ステロイドホルモン合成に与えるTCDDの影響と周産期特異性

GD15の妊娠ラットにTCDD (1 µg/kg、経口) を投与後、胎児および新生児の精巣ステロイド合成系タンパク質mRNAの発現状況を解析した。その結果、ステロイドホルモン合成の律速過程に関与する steroidogenic acute-regulatory protein (StAR) および性ステロイドの合成に必要な酵素の一つである cytochrome P450 17 (CYP17) の mRNA は、出生前後の一時期にのみ TCDD によって低下し、PND4には正常水準に復帰することが明らかとなった。同様の変化はタンパク質発現量においても認められた。生殖腺ステロイド合成は脳下垂体から分泌される luteinizing hormone (LH) と follicle-stimulating hormone (FSH) を構成するサブユニットのうち、β-サブユニット mRNA は TCDD 母体曝露 (GD15) によって、やはり周産期特異的に減少した。mRNA 変動と符合して、LH/FSH の胎児や新生児血清中レベルは TCDD 母体曝露で有意に減少し、変化が生じる時期も mRNA 変動の時期とほぼ一致した。

2. TCDDが胎児精巣テストステロン含量に及ぼす影響

新規に UPLC-TOF-MS 法を構築して、検討を行った。構築した方法では、testosterone-d₃ を胎児精巣に添加して得た検量線は、定量が望まれる濃度範囲で良好な直線性を示した。この方法を用いて、GD15での TCDD 母体曝露 (1 µg/kg、経口投与) が GD20 胎児の精巣 testosterone 含量に及ぼす影響を解析した。その結果、予想通り、TCDD は胎児精巣の含量を顕著に低下させることが判明し、前述のゴナドトロピン低下や性腺ステロイド合成系の低下とよく一致する結果が得られた。

3. 脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響

TCDD が胎児のゴナドトロピン遺伝子発現を直接的に障害するか否かを知るため、薬物未処理母ラット (GD20) の胎児から脳下垂体を

単離して組織培養し、これに TCDD を添加してその効果を調べた。その結果、雌雄胎児の LH/FSH β-サブユニットの基礎発現は TCDD 添加による影響を受けなかった。しかし、gonadotropin-releasing hormone (GnRH) の刺激下に惹起される LHB の誘導発現は TCDD 添加によって有意に抑制された。TCDD による LHB/FSHβ 発現低下は周産期特異性と一致して、薬物未処理母から出生した児 (PND7) では、TCDD の影響が消失した。すなわち、PND7 児の脳下垂体では、GnRH による LH/FSHβ-サブユニット発現増加は TCDD で抑制されなかった。このように、培養脳下垂体でも in vivo と同様な年齢特異性で TCDD の影響が認められ、少なくとも一部の機構として、TCDD は脳下垂体に直接作用して LH/FSH 発現抑制を惹起する可能性が示唆された。

4. 成熟後にまで発現異常が継続する遺伝子の同定

TCDD 母体曝露によって発現異常がインプリントされる遺伝子の探索を行った。すなわち、TCDD 処理妊娠ラットより出生・成長した雄児 (PND70) から脳下垂体と視床下部を単離し、遺伝子発現状況をマイクロアレイ法によって解析した。その結果、視床下部では 148 種もの遺伝子が対照と比較して 1.2 倍以上の有意な高発現、ないし 0.8 以下の有意な低発現を示すことが判明した。低下するものの中には交尾行動に必須とされる GnRH が含まれており、性行動不全の形質とよく一致した。脳下垂体遺伝子発現についても、視床下部より数は少ないが、78 種の遺伝子の発現が有意に変動していた。

5. TCDD以外の内分泌攪乱物質が胎児脳下垂体-性腺系へ及ぼす影響

内分泌攪乱作用が知られるものの中から、鉛 [Pb(OAc)₂]、カドミウム (CdCl₂)、アトラジン (atrazine)、フタル酸エステル [diethylhexyl phthalate (DEHP)]、ペルメトリン (*cis*-permethrin) および臭素化難燃剤 [2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE47)] を GD15 妊娠ラットに単回経口投与したのち、

GD20胎児の精巣StARおよび脳下垂体LHB mRNA発現状況を観察した。その結果、DEHPは有意なStAR発現抑制を示し、本物質は胎児の性ステロイド合成を抑制して、TCDDと同様な発達障害を引き起こす可能性が示唆された。しかし、DEHPは脳下垂体LHBには有意な効果を示さず、障害の機構はダイオキシンとは異なると推定された。DEHP以外の化合物では、精巣StARには有意な効果を示さなかった。

D. 考察

TCDDの母体曝露が生殖腺のステロイドホルモン合成系へ及ぼす影響について検討した結果、GD20からPND2にかけての一時期に精巣StARとCYP17が低下することが判明した。これとよく符合して、胎児精巣のtestosterone含量が顕著に低下することも併せて実証することができた。性腺ステロイド合成は脳下垂体LH/FSHによって制御される。これらのホルモンもTCDD依存的に抑制されることから、性腺のステロイド合成低下がゴナドトロピン抑制に起因するとの推定もよく支持された。周産期の胎児・新生児は、合成した性ステロイドで自身を刺激することがその後の性成熟や脳分化に必須と考えられている。従って、一過性の障害とは言え、性未成熟等をインプリントする重大な影響と考えられた。

脳下垂体培養系での検討から、TCDDはGnRHによって誘導されるゴナドトロピン発現を有意に抑え、これはLHBに特異的であった。また、この効果はPND7の脳下垂体では生起せず、TCDDのin vivo作用における年齢差とも合致する結果であった。従って、TCDDは脳下垂体内の遺伝子発現機構に影響してLH/FSHを抑制する機構が推定された。GnRHは脳下垂体組織表面の受容体に結合後、protein kinase (PK)AおよびPKC経路を活性化してLH/FSH発現増加をもたらす。しかし、PKA/PKC経路は α -サブユニットの制御にも関わる。より詳細な機構解明のためには、PKA/C経路の末端に位置し、 β -サブユニット制御に特異的に関与する因子のTCDDによる障害を明らかにする必要がある。一方、LHB/FSHBは脳下垂体の細胞のうち、

gonadotrophでのみ生産されるが、 α -サブユニットはthyrotrophでも作られる。従って、gondotrophの成熟やこの細胞に特異的なゴナドトロピン制御機構が障害を受ける可能性がある。

本研究のマイクロアレイ法での解析から、成熟後(PND70)の脳下垂体とその制御組織である視床下部において多くの遺伝子発現が変動することが確認された。特に、視床下部でのGnRH低下は交尾行動不全との関連性で注目される。GnRHは脳下垂体ゴナドトロピン発現制御と共に、性行動惹起に不可欠なホルモンでもある。従って、これの発現が抑制されれば、交尾不全形質が定着しても不思議ではない。ただ、これ以外にも脳下垂体や視床下部で多くの遺伝子の発現変動が見いだされたので、それら遺伝子の変動の意義付け研究が必要である。

TCDD以外の内分泌攪乱物質6種を用いた解析では、DEHPのみに胎児・性腺ステロイドホルモン合成系(StAR)の抑制が見いだされた。従って、この物質は胎児期の曝露によって成長不全や成長後の形質不全を引き起こす可能性がある。ただ、DEHPでは脳下垂体ゴナドトロピンへの障害性は観察されず、性腺への影響の機構はダイオキシンとは明らかに異なっていた。

今回の研究で、周産期のTCDD曝露が成長後のGnRH水準を低下させることが判明した。胎児・新生児の性腺ステロイドホルモン低下を引き起こすのであれば、その機構は異なっても、結果としてGnRH低下を引き起こす可能性がある。このホルモンは交尾等の形質発現に重要であることから、成長後のこのホルモン水準を測定することによって、性未成熟か否かの判定を下すことができるかもしれない。また、周産期のTCDD曝露がどのような機構で成長後のGnRH低下を惹起するかの機構解析を含めて、研究継続が必要である。

E. 結論

1. TCDDは周産期の胎児/新生児の脳下垂体LHおよびFSHを一過性に低下させ、これを起点として、性腺ステロイド合成を抑制す

る。この障害を基に成長後にまで継続する脳遺伝子の発現変動と性未成熟を固着させるものと推定される。

2. TCDDは脳下垂体内の遺伝子発現に直接作用してLHβサブユニットの誘導発現を抑制する。胎児期・新生児期に特異的なLHの抑制は、少なくとも一部はこの機構で説明可能と推定される。

3. TCDD以外にも、DEHPに性腺ステロイド合成系の発現抑制作用が見いだされた。しかし脳下垂体ゴナドトロピン抑制を起点として効果を出現させるものは無かった。

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 武田 知起 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 食品汚染物質が臨界期の胎児・新生児の脳下垂体ゴナドトロピンの障害を介して性未成熟を固着させる点に注目し、ゴナドトロピン障害の時期特異性と機構等についてラットを用いた検討を行った。2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)は胎児期後期から出生直後の一時期にかけて脳下垂体ゴナドトロピンの luteinizing hormone および follicle-stimulating hormone を低下させ、これと連動して生殖腺のステロイドホルモン合成系の発現低下をもたらした。このこととよく符合して、TCDD曝露胎児の精巣 testosterone 含量は顕著に低下することが確認された。培養脳下垂体を用いた検討から、TCDDは脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子発現を胎児期特異的かつ直接的に抑制し得ることが示唆された。胎児期の一過性のゴナドトロピン/性ステロイド低下が成熟後にまで継続する遺伝子発現変動をもたらす可能性の検証のため、マイクロアレイ解析を実施し、視床下部と脳下垂体の多くの遺伝子変動を把握した（前者の方がより顕著）。抑圧される遺伝子の中には交尾行動惹起に必要とされる gonadotropin-releasing hormone が含まれることが見いだされた。また、TCDDと同様な機構で後世代毒性を惹起する食品汚染物質の検索のため、6物質につき検討を加えた。その結果、性腺のステロイド合成系低下を惹起する物質は存在したが、胎児脳下垂体ゴナドトロピンを標的として障害を引き起こす物質は見い出せなかった。以上の研究成果を総合して、食品汚染物質の中には、臨界期の生殖腺ステロイド合成を低下させて後世代毒性を惹起するものがあり、機構的には、脳下垂体ゴナドトロピン障害を起点にするタイプと生殖腺を直接障害するタイプの少なくとも2種が存在すると考えられた。

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内分泌攪乱物質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遥かに高い場合が多い (1)。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、障害の主因ではないかもしれない。体内の性ホルモンやその受容体の合成は、脳下垂体から分泌されるゴナドトロピンによって制御される。当研究室では、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系タンパク質の発現が障害され (2,3)、これを起点として成長後の交尾能力が低下することを明らかにしている (4)。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る。また、胎児期の障害が何故、成長後にまで継続する性未成熟を引き起こすかについても多くが謎のままである。

平成21年度の研究では、最強毒性のダイオキシンである2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) を用い、これによる胎児脳下垂体ゴナドトロピンの低下が、脳下垂体制御組織である視床下部の発育や活動の抑制に基づく可能性を想定して研究を実施した。すなわち、TCDDが視床下部のメタボロームを障害して内分泌を抑制する機構について検証を実施し、推定を支持する成績を得た。また、胎児ゴナドトロピン低下を解消する方策について検討を行い、ビタミン様物質である α -リポ酸に優れた障害消去作用があることを見いだした。

昨年度の研究によって、視床下部メタボロームの障害が、脳下垂体ホルモン生産を引き起こす要因の一つであることが示唆されたが、このことのみから、TCDDの脳下垂体への直接作用を否定するのは尚早である。そこで本年度の研究では、より精密に毒性発現の機構を解析する目的で、TCDDがゴナドトロピン遺伝子発現に直接的に影響し得るか否かについて、培養胎児脳下垂体を用

いた解析を実施した。

一般に、胎児の適正な性分化や脳分化には、周産期（胎児期後期から出生直後にかけての時期）を含む一時期に性ステロイドを生産し、それによって自身を刺激することが必要と考えられている (5)。前述の通り、当研究室では、ダイオキシンの母体曝露が胎児の性ステロイド合成を障害することを明らかにしているが、障害が発生する時期については詳細には調べていない。そこで本年度は、この情報の収集も行った。

胎児期の一過性の性ステロイドによる刺激が成長後の何を規定するかについては、発生生殖学の重要な課題の一つであり、このうち多くの研究がなされる領域と思われる。ダイオキシンによる発達障害はこれを解析する有用な事例とも考え得る。すなわち、ダイオキシンは胎児期の性ステロイド合成障害を端緒として成長後の交尾能力不全を惹起する。この場合、脳遺伝子の何が変わっているかを知れば、胎児期の性ステロイド刺激と脳分化の関連性についての重要な知見となる。本研究では、この問題にも焦点を当て、TCDD曝露母から出生した児の成長後の脳遺伝子発現状況についてマイクロアレイ解析を実施した。

本研究は、TCDDの後世代毒性だけに注目したものではなく、種々の食品汚染物質による胎児発達障害やその評価法構築を目指すものである。TCDDと同様に胎児脳下垂体-性腺系への障害を有するものがあるか否かは重要な問題と考えられるので、今年度は6種の物質について併せて検討を行った。

B. 研究方法

1. 動物実験

全ての実験はWistar系ラットを購入して使用した。妊娠ラットは雌雄の成熟ラットを交配させ、膈内に精子が確認された日を妊娠0日目 (GD0) として実験に供した。TCDDを投与するin vivo実験では、GD15の妊娠ラットに、TCDD 1 μ g/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。雄胎児あるいは出生児より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。TCDD以外の食品汚染物質の投与条件については、結果の項に記述する。

2. 脳下垂体培養

薬物未処理の妊娠ラットのGD20胎児あるいは出生7日後 (PND7) の新生児より脳下垂体を摘出した。組織は、penicillin (100 I.U./mL)、streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、sodium bicarbonate (2.2 mg/mL)および1 mM sodium pyruvate を含む血清未添加 Dulbecco's Modified Eagle (DME) 100 μL 中で、 37°C 、1時間予備培養した ($5\% \text{CO}_2$)。組織を新しいDME培地に移し、処理薬剤を添加後、 37°C で24時間培養した。培養後、total RNAを抽出し (6)、mRNA発現解析を行った。組織処理薬剤はdimethyl sulfoxideないしPBSに溶解して添加した (添加容量は培地容量の0.5%)。

3. mRNAおよびタンパク質発現量解析

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 (2, 6)。一部の実験では、リアルタイムPCR法を用いて解析した (7)。精巣・性ステロイド合成系タンパク質の発現は、Western blotting法を用い、既報の手順で解析した (2, 4, 6)。ゴナドトロピンの血清中濃度は、市販の酵素免疫測定キットを用いて測定した (Endocrine Tech., Newark, USA)。

4. マイクロアレイ解析

TCDD処理した妊娠 Wistar ラット (GD15、1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) から出生した PND70 の雄ラットより視床下部と脳下垂体を摘出した。これらをただちに RNAlater RNA stabilization Reagent (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) に浸潤し、RNeasy Mini Kits (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した (2, 6)。得られた RNA は、電気泳動後のリボソーム 18S/28S RNA のバンド比から品質を確認して以下の操作に使用した。

ビオチン標識 cRNAは、Illumina TotalPrep RNA Amplification Kit (Ambion, Austin, USA) を用いて調製した。Total RNA (250 ng) より一本鎖 cDNA を合成し (42°C 、2 時間)、DNA polymerase および ribonuclease Hを加えて 16°C で 2 時間反応させ、二本鎖 cDNA を合成した。カラム精製を行ったのち、T7 RNA polymerase を用いてビオチン標識 cRNA を合成した (37°C 、14 時間)。各 cRNA (1500 ng) を RatRef12-v1 (Illumina, San Diego, USA) に付し、ハイブリダイゼーション反応を行った (58°C 、19 時間)。その後、チップを洗浄し、二次蛍光処理を行ったのち、Bead Array Reader (Illumina) を用いて蛍光シグナルを検出した。解析は、マイクロアレイデータ解析専用ソフト「GeneSpring」を用いて行った。各群とも 3 サンプルのデータの中央値を用いて解析した。なお、シグナル値がアレイ全体の 10% 未満の遺伝子は解析対象外とした。1.2-1.3 倍の変動が有意に認められた遺伝子を抽出し ($p < 0.05$)、クラスタリング解析を行った。

5. テストステロン含量測定

胎児精巣ホモジネート [10 mg/30 μL phosphate-buffered saline (PBS)] 120 μL に終濃度1M となるようにNaOHを加えたのち、 60°C で1時間加温した。加熱終了後、少過剰のHClを加えて酸性としたのち、 NaHCO_3 で中和し、*n*-hexane-ethyl acetate (3:2、v/v) 320 μL づつで3回抽出した。抽出液を合して窒素気流下に溶媒留去後、残差をmethanol 50 μL に溶解し、その10 μL を飛行時間型質量分析計 (TOF-MS)を装着した超高速液体クロマトグラフ (UPLC)に注入した。検量線は分析対象精巣のホモジネート 120 μL に testosterone- d_3 体を添加後、上記と同様に操作して作成した。分析には Waters 社製 Acquity UPLC-TOF-MS システムを用い、UPLCは以下の条件で行った:カラム、BEH C18 (1.0 x 100 mm、粒径1.7 μm 、Waters社製); カラム温度、 40°C ; 移動層、0.1% formic acid 中の acetonitrile濃度変更プログラム [10%

(0-3分)、10→100% (3-18分)、100% (18-20分
および10% (20-23分)] ; 流速、0.2 mL/分。
TOF-MSは以下の条件で測定した:イオン化
様式、エレクトロスプレー法; キャピラ
リー電圧 (陽イオン様式)、3.5 kV; コリ
ジョンガス、argon (封入圧、 $6.82-7.03 \times 10^7$
mbar) ; コーン電圧、50V; 増幅電圧、
500V; コリジョンエネルギー、10 eV。質
量検出の標準化にはleucine enkephalin [200
pg/ μ L methanol-0.1% formic acid (1:1, v/v)]を
使用し、これを5 μ L/分の速度で吸引させ、
検出質量をm/z 557.2802に調整した。試料部
位温度は120°C、また溶媒除去条件はチッ素
気流下 (600 L/時)、350°Cに設定した。

C. 研究結果

1. 生殖腺ステロイドホルモン合成に与える TCDDの影響と周産期特異性

TCDDの母体曝露によって胎児・新生児の
性ステロイド合成が障害されることは以前
の研究から分かっていた。しかし、障害の
時期特異性は詳細には解析していなかつた
ので、この点の検討を行った。GD15の妊娠
ラットにTCDD (1 μ g/kg、経口)を投与後、胎

児および新生児の精巣ステロイド合成系タ
ンパク質mRNAの発現状況を解析した (図
1)。その結果、ステロイドホルモン合成の律
速過程に 関与する steroidogenic
acute-regulatory protein (StAR)および性ステ
ロイドの合成に必須な酵素の一つである
cytochrome P450 17 (CYP17)のmRNAは、出
生前後の一時期 (周産期) にのみTCDDによ
って低下し、出生後4日 (PND4) 辺りには
正常水準に復帰することが明らかとなった。
同様の変化はタンパク質発現量においても
認められ、TCDDによるStARの発現低下は
GD20、21およびPND2のみに限定され、
PND4以降では対照と同じ水準であった (図
2)。

生殖腺ステロイド合成は脳下垂体から分
泌される luteinizing hormone (LH) と
follicle-stimulating hormone (FSH) のゴナド
トロピンによって制御される。これらを構
成する2種のサブユニットのうち、脳下垂
体の β -サブユニットmRNAはTCDD母体曝
露 (GD15) によって、やはり周産期特異的
に減少した (図3)。 α -サブユニット (α GSU)
や他の脳下垂体ホルモンである thyroid-

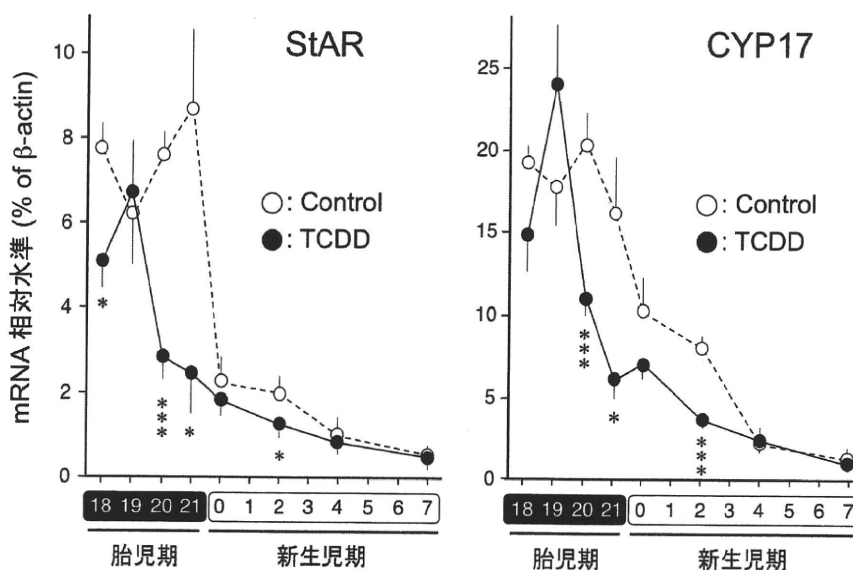


図1. TCDDの母体曝露が周産期児の精巣ステロイド合成系 mRNAの発現に及ぼす影響
各ドットは平均値 \pm S.E.M. (N=4~8; 母体数) * P < 0.05; *** P < 0.001

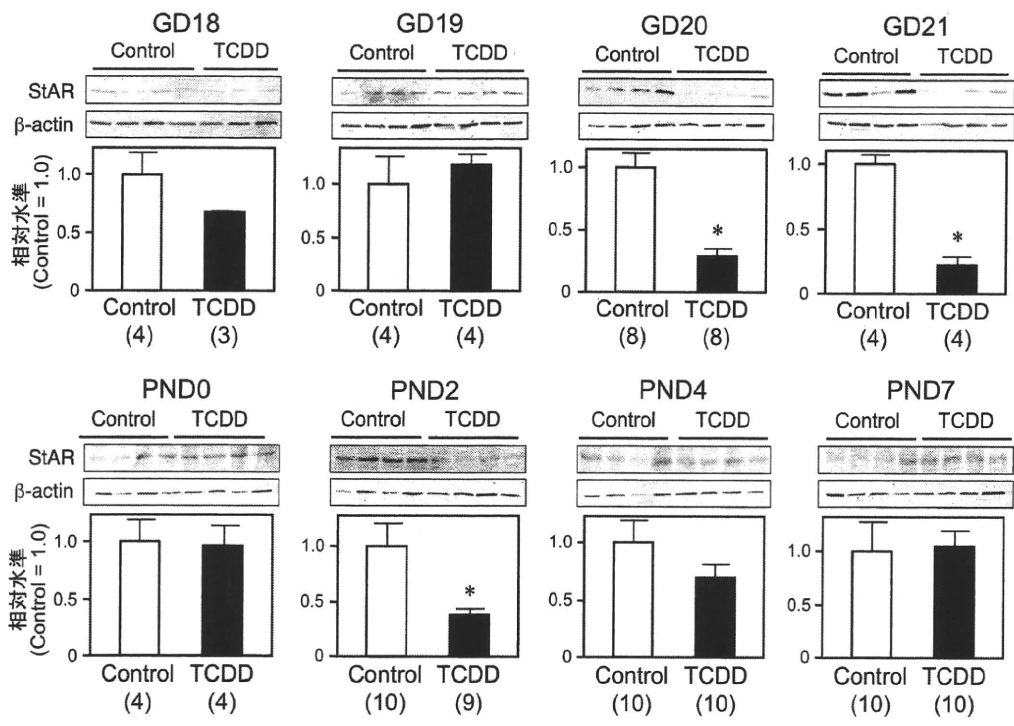


図2. TCDD 母体曝露が周産期児の精巣 StAR タンパク質発現に及ぼす影響
棒グラフは平均値 ± S.E.M. [N (母体数) は図中の括弧内に表示] * P < 0.05

stimulating hormone (TSH) のβ-サブユニットには有意な変化は認められなかった (図3)。mRNA変動と符合して、LH/FSHの胎児や新生児血清中レベルはTCDD母体曝露で有意に減少し、変化が生じる時期もmRNA変動の時期とほぼ一致した (図4)。これらの成績は、TCDDが周産期児のLH/FSH抑制を起点として性ステロイド合成系の発現を低下させるとの推定をよく支持した。

2. TCDDが胎児精巣テストステロン含量に及ぼす影響

TCDDによる生殖腺ステロイド合成系タンパク質の発現抑制は、当然の帰結として性ステロイドホルモンの生産量を低下さ

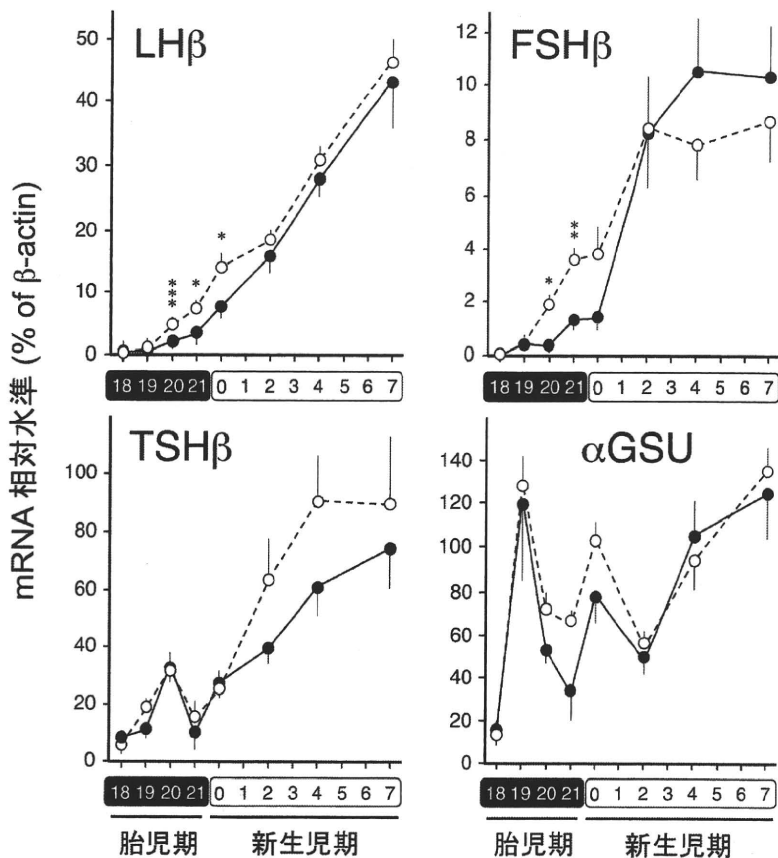


図3. TCDD 母体曝露が周産期児の脳下垂体ホルモン mRNA 発現に及ぼす影響: TCDD 処理群 (●)、対照群 (○)
各ドットは平均値 ± S.E.M. (N=4~10; 母体数)
* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

せるはずである。しかし、この点はまだ確認していなかったため、新規にUPLC-TOF-MS法を構築して、検討を行った。Testosterone標準品のMSスペクトルでは、 m/z 289.2168に分子イオンピーク ($M^+ + 1$)が認められ (図5A)、図中に推定解裂を示すフラグメントイオンも観察された。GD20胎児から調製した精巣ホモジネートを実験方法の項に記載の方法で抽出し、抽出物をUPLC-TOF-MSに付しても、標準品と同一のスペクトル (図5B)を示すピークが観察された。分子イオンピーク等の主なイオンを検出してクロマトグラムを作成すると、標品と一致する保持時間 (11.2分) に明瞭なピークが観察された (図6)。Testosterone- d_3 を胎児精巣に添加して得た検量線は、少なくとも1.1~17.5 pg/mg 精巣間で良好な直線性を示した (グラフ未掲載)。これらのことから、本研究で構築した方法で胎児精巣のtestosterone含量は測定可能であると考えられた。そこでこの方法を用いて、GD15でのTCDD母体曝露 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、経口投与) がGD20胎児の精巣testosterone含量に及ぼす影響を解析した。その結果、予想通り、TCDDは胎児精巣の含量を顕著に低下させることが判明し (図7)、前記1項記載のゴナドトロピン低下や性腺ステロイド合成系の低下とよく一致する結果が得

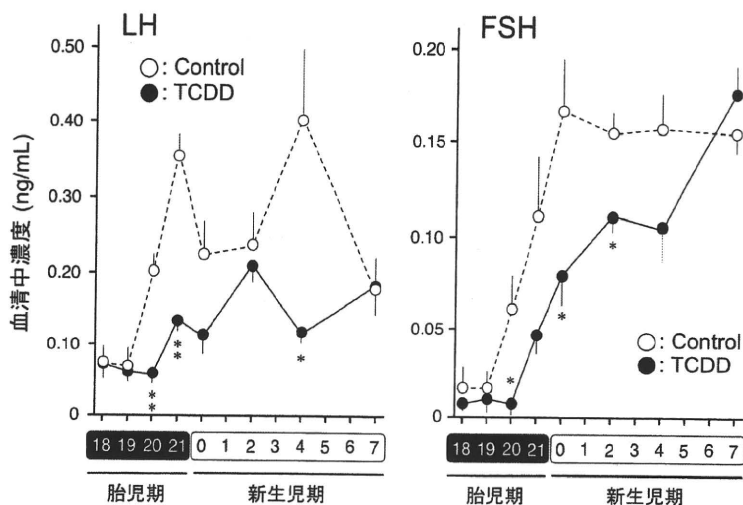


図4. TCDD 母体曝露が周産期児の血清ゴナドトロピン水準に及ぼす影響
各ドットは平均値 ± S.E.M. (N=3~4; 母体数)
* P < 0.05; ** P < 0.01

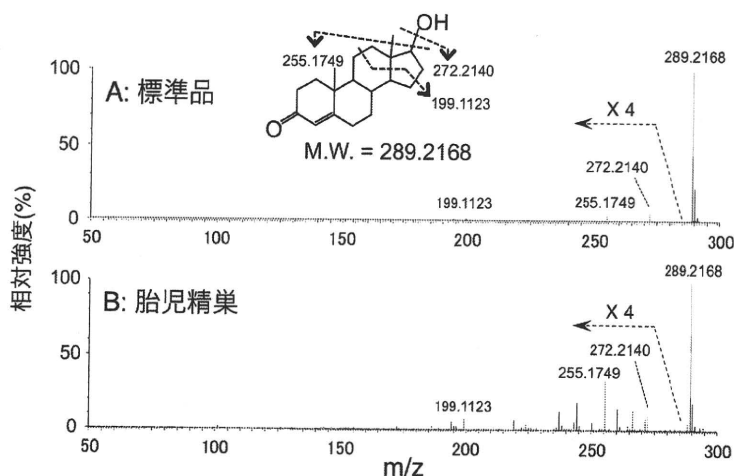


図5. Testosterone の標品 (A)と精巣ホルモン(B)の MS スペクトル

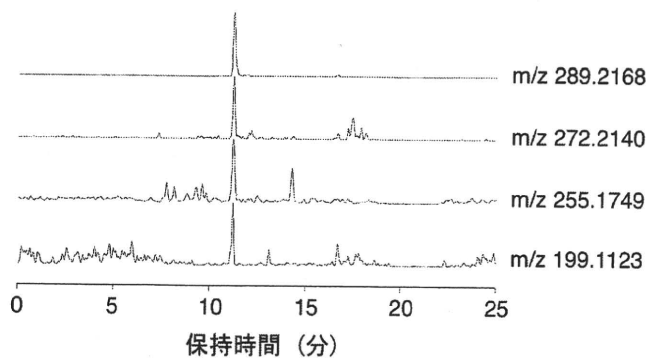


図6. 胎児精巣 testosterone の single ion monitoring 分析

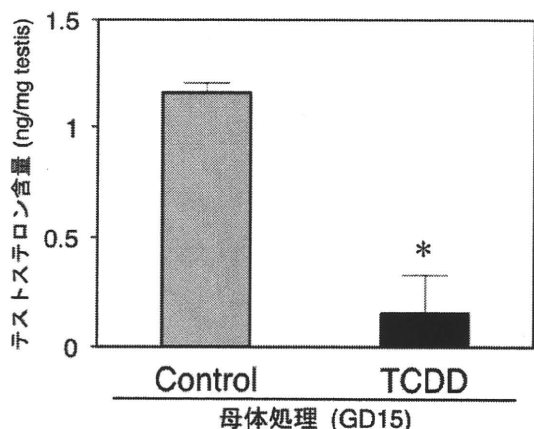


図7. TCDD 母体曝露による胎児精巣 testosterone 含量の変動
一腹の雄胎児精巣をプールし、これを一サンプルとし分析。各棒グラフは平均値 ± S.E.M. (N=5; 母体数)。* P < 0.05

られた。

3. 脳下垂体ゴナドトロピン遺伝子発現に及ぼすTCDDの影響

TCDDが胎児のゴナドトロピン遺伝子発現を直接的に障害するか否かを知るため、薬物未処理母ラット (GD20) の胎児から脳下垂体を単離して組織培養し、これにTCDDを添加してその効果を調べた。その結果、雌雄胎児のLH/FSH β-サブユニット、α-サブユニット (LHとFSHとで共通) および

prolactinの基礎発現はいずれもTCDD添加による影響を受けなかった (図8)。ゴナドトロピン発現には視床下部から脳下垂体へ投射する神経から分泌される gonadotropin-releasing hormone (GnRH)の刺激が必要である。事実、培養胎児脳下垂体にGnRHを添加すると、LHβ等のゴナドトロピン発現が増加した (図9A)。このうち、LHβの誘導発現のみはTCDD添加によって顕著ではないが有意に抑制された (図9A)。

今年度の研究でも認められたように、TCDDによるLHβ/FSHβ発現低下は周産期の胎児や新生児に限定される (1項参照)。これと一致して、薬物未処理母から出生した児 (PND7) では、胎児で認められたTCDDの影響が消失した。すなわち、PND7児の脳下垂体を取り、これをGnRH存在下に培養すると、LH/FSHのα-とβ-サブユニットおよび prolactinの各mRNAはいずれも有意に発現増加するものの、この誘導発現をTCDDは抑制できなかった (図9B)。このように、培養脳下垂体でもin vivoと同様な年齢特異性でTCDDの影響が認められ、少なくとも一部の機構として、TCDDは脳下垂体に直接作用してLH/FSH発現抑制を惹起する可能性が示唆された。

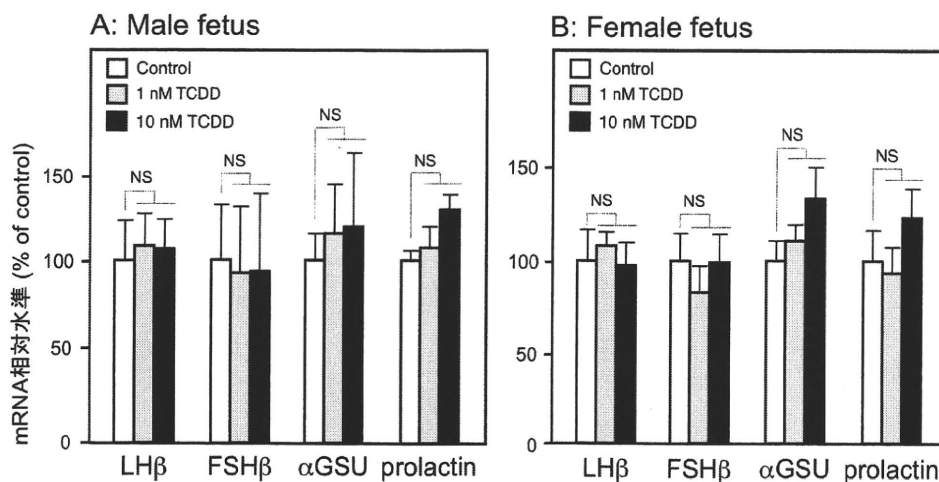


図8. 培養脳下垂体のゴナドトロピン基礎発現に及ぼす TCDD の効果
mRNA 量は β-actin mRNA 発現量で標準化補正。各棒グラフは平均値 ± S.E.M. (N=3; 別母体の胎児を使用)。N.S.: 有意差なし。

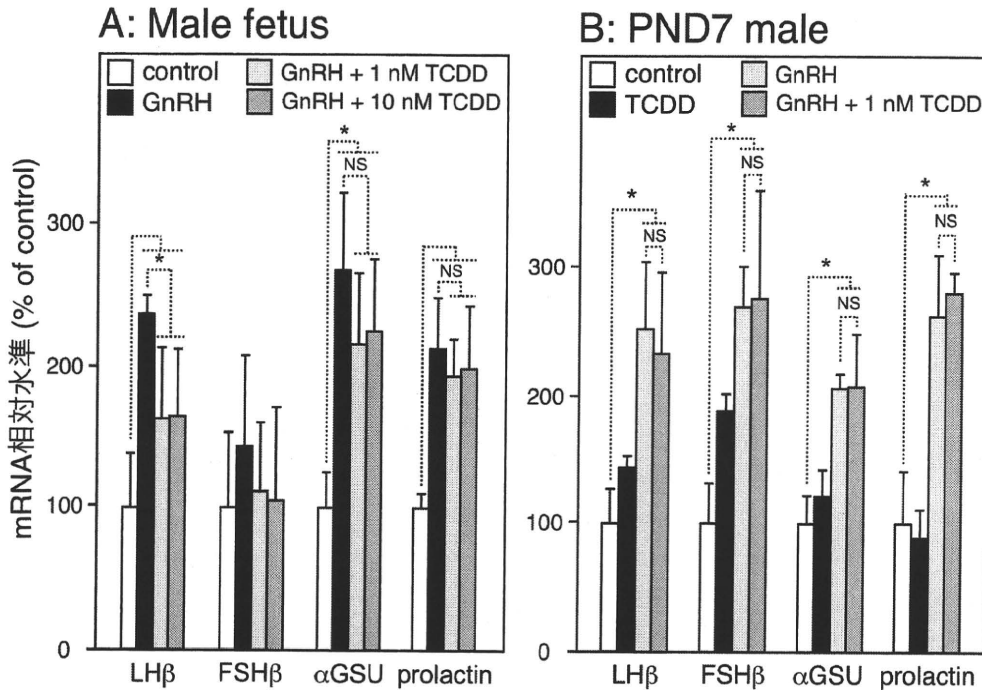


図9. 培養脳下垂体のゴナドトロピン誘導発現に及ぼす TCDD の効果
mRNA 量は β -actin mRNA 発現量で標準化補正。各棒グラフは平均値 \pm S.E.M.
(N=3; 別母体の胎児を使用)。* P < 0.05、N.S.: 有意差なし。

4. 成熟後にまで発現異常が継続する遺伝子の同定

TCDDによる周産期に一過性のゴナドトロピン低下が成長後の性行動不全等の性未成熟を固着させる原因であることが、我々の以前の研究で実証されている(4)。性未成熟は、遺伝子の発現異常固着を通して惹起されると考えるのは自然な推論かと思われる。そこで次に我々は、TCDD母体曝露によって発現異常がインプリントされる遺伝子の探索を行った。すなわち、TCDD処理妊娠ラットより出生・成長した雄児(PND70)から脳下垂体と視床下部を単離し、遺伝子発現状況をマイクロアレイ法によって解析した。その結果(図10)、視床下部では148種もの遺伝子が対照と比較して1.2倍以上の有意な高発現、ないし0.8以下の有意な低発現を示すことが判明した。これらのうちのどれが性未成熟に強い寄与をするかは今後の課題であるが、低下するものの中にはGnRHが含まれていた。本ホルモンはゴナドトロピン制御に重要である一方、性行動を

制御する因子の一つでもある。従って、GnRHが成長後に低下することは、性行動不全の形質とよく一致した。脳下垂体遺伝子発現についても、視床下部より数は少ないが、78種の遺伝子の発現が有意に変動していた(0.8以下あるいは1.2倍以上)(図10)。この中には、ダイオキシン類による誘導が古くから知られるNAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) や CYP1B1 も含まれた。

5. TCDD以外の内分泌攪乱物質が胎児脳下垂体-性腺系へ及ぼす影響

内分泌攪乱作用が知られるものの中から、鉛 [Pb(OCOCH₃)₂]、カドミウム (CdCl₂)、アトラジン (atrazine)、フタル酸エステル [diethylhexyl phthalate (DEHP)]、ペルメトリン (cis-permethrin) および臭素化難燃剤 [2,2',4,4'-tetrabromodiphenylether (BDE47)] (図11) をGD15妊娠ラットに単回経口投与したのち、GD20胎児の精巣StARおよび脳下垂体LH β mRNA発現状況を観察した。各化

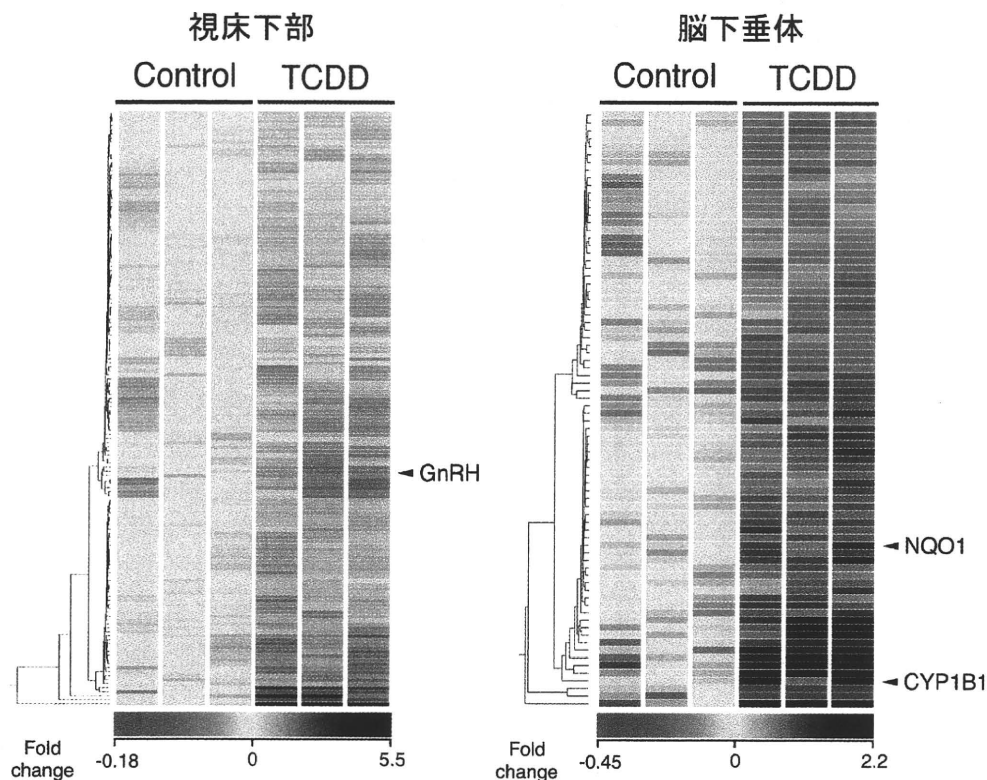


図10. TCDD処理 (GD15) 母ラットから出生した児の成長後 (PND70) の遺伝子変動状況
各群とも3匹ずつのラットを解析。

化合物の溶解用溶媒および投与量は図11中に示す。実験の結果、DEHPは使用した2用量のいずれにおいても有意なStAR発現抑制を示した (図12)。従って、DEHPは胎児の性ステロイド合成を抑制して、TCDDと同様な発達障害を引き起こす可能性が示唆された。ただ、今回の実験ではかなりの高用量を用いており、より低用量での追加検討が必要と思われた。また、DEHPは脳下垂体LHBには有意な効果を示さず (図12)、障害の機構はダイオキシンとは異なると推定された。DEHP以外の化合物では、アトラジンがLHB発現を有意に増加させたが (約1.7倍)、精巣StARには有意な効果を示さなかった。それ以外には、StARおよび

LHBの発現を変動させるものは見い出せなかった (図表省略)。

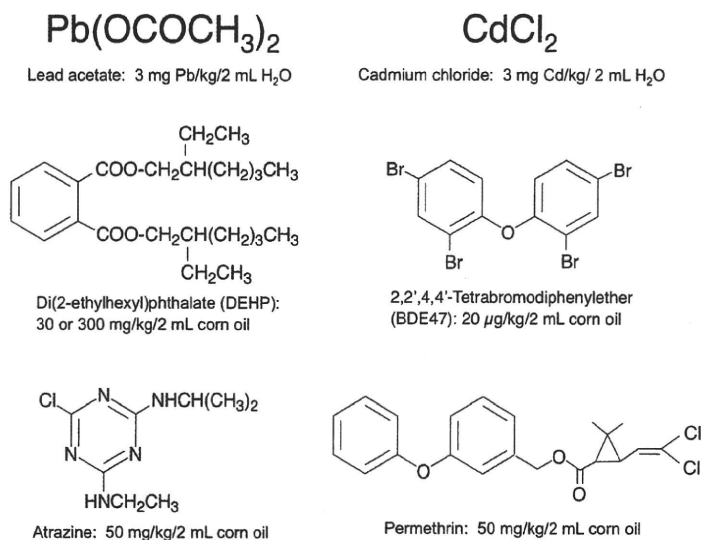


図11. 胎児脳下垂体-性腺系への影響を調査した内分泌攪乱物質

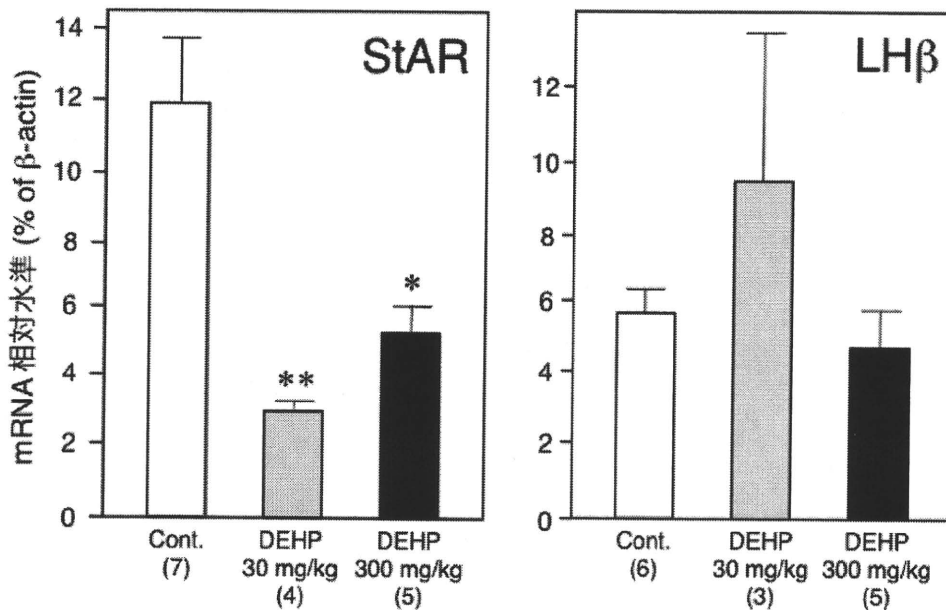


図12. DEHPの胎児精巣 StAR および脳下垂体 LHβ 発現に及ぼす影響
各棒グラフは平均値 ± S.E.M. [N (母体数) は図中に表示]。
* P < 0.05 ; ** P < 0.01

D. 考 察

TCDDの母体曝露が生殖腺のステロイドホルモン合成系へ及ぼす影響について検討した結果、GD20からPND2にかけての一時期に精巣StARとCYP17が低下することが判明した。これとよく符合して、胎児精巣のtestosterone含量が顕著に低下することも併せて実証することができた。性腺ステロイド合成は脳下垂体LH/FSHによって制御される。これらのホルモンもTCDD依存的に抑制されることから、性腺のステロイド合成低下がゴナドトロピン抑制に起因するとの推定もよく支持された。周産期の胎児・新生児は、合成した性ステロイドで自身を刺激することがその後の性成熟や脳分化に必須と考えられている (8)。従って、一過性の障害とは言え、性未成熟等をインプリントする重大な影響と考えられた。

LH/FSHの低下はこれらのβ-サブユニットの合成低下に基づくと考えられるが、何故α-サブユニットや他の脳下垂体ホルモンには無影響ないし弱い効果で、β-サブユニットのみが特異的に障害されるかの理由は不明である。LHやFSHサブユニットの合成促進には視床下部から投射される神経より

GnRHが分泌されることが必要である。一つには、TCDDはGnRHの量を低下させてLH/FSH低下を惹起するとも考え得る。しかし、我々の以前の研究から、TCDDは胎児のGnRH発現に影響しないことが確認されており (2)、上記の機構は考え難い。今年度の脳下垂体培養系での検討から、TCDDはGnRHによって誘導されるゴナドトピン発現を有意に抑え、これはLHβに特異的であった。また、この効果はPND7の脳下垂体では生起せず、TCDDのin vivo作用における年齢差とも合致する結果であった。従って、TCDDは脳下垂体内の遺伝子発現機構に影響してLH/FSHを抑制する機構が推定された。GnRHは脳下垂体組織表面の受容体に結合後、protein kinase (PK)AおよびPKC経路を活性化してLH/FSH発現増加をもたらす (9)。事実、PKAおよびPKC経路の活性化剤でもLHβ遺伝子発現は促進されるが、これらもTCDDによって有意に抑制された(データ未掲載)。しかし、PKA/PKC経路はα-サブユニットの制御にも関わる。より詳細な機構解明のためには、PKA/C経路の末端に位置し、β-サブユニット制御に特異的に関与する因子のTCDDによる障害を明らかにする必要

がある。一方、LHB/FSHBは脳下垂体の細胞のうち、gonadotrophでのみ生産されるが、 α -サブユニットはthyrotrophでも作られる(10, 11)。従って、gonadotrophの成熟やこの細胞に特異的なゴナドトロピン制御機構が障害を受ける可能性がある。これも含め、今後の解析が待たれる。

周産期の脳下垂体-性腺系への障害が成長後にまで継続するどのような障害を引き起こすかは、重要な課題である。本研究のマイクロアレイ法での解析から、成熟後(PND70)の脳下垂体とその制御組織である視床下部において多くの遺伝子発現が変動することが確認された。特に、視床下部でのGnRH低下は交尾行動不全との関連性で注目される。前述の通り、GnRHは脳下垂体ゴナドトロピン発現制御に重要な役割を果たすが、性行動惹起に不可欠なホルモンでもある(12, 13)。従って、これの発現が下げ止まれば、交尾不全形質が定着しても不思議ではない。脳下垂体や視床下部での発現変動が見いだされたものの多くは機能が不明で、従って変動の毒性学的意義も分からない。今回の研究成果を端緒として、変動が見いだされた遺伝子の変動の意義付け研究が必要である。

TCDDのラットでの半減期は12~31日程度と考えられている(14)。仮に半減期を20日とし、それが胎児から成長過程の児においても同一と仮定すると、PND70では初期曝露量の1/3.5(=70/20)にまで減少すると概算できよう。母体処理で脳下垂体LHBの有意な減少を引き起こすのに要する最小用量は0.25 μg TCDD/kgであり(当研究室の未発表データ)、今回の実験で使用した用量(1 $\mu\text{g}/\text{kg}$)の1/4である。また、 ^{14}C -TCDDを用いたラット体内動態に関する最近の検討の結果では、TCDDの体内貯留性は胎児の方が成獣よりも高かった(15)。従って、今回の実験条件では、PND70においてもまだ、効果を発現するのに必要な量のTCDDが残存していた可能性は否定できない。

TCDD以外の内分泌攪乱物質6種を用いた解析では、DEHPのみに胎児・性腺ステロイドホルモン合成系(StAR)の抑制が見いだされた。従って、この物質は胎児期の曝露によって成長不全や成長後の形質不全を引き起こす可能性がある。ただ、DEHPでは脳下垂体ゴナドトロピンへの障害性は観察されず、性腺への影響の機構はダイオキシンとは明らかに異なる。DEHPの実験は2用量を使用したか、少ない方でもまだなおかなりの高用量であり、障害に必要な最小用量に関する研究が必要と思われる。

今回の研究で、周産期のTCDD曝露が成長後のGnRH水準を低下させることが判明した。胎児・新生児の性腺ステロイドホルモン低下を引き起こすものであれば、その機構は異なっても、結果としてGnRH低下を引き起こす可能性がある。このホルモンは交尾等の形質発現に重要であることから、成長後のこのホルモン水準を測定することによって、性未成熟か否かの判定を下すことができるかもしれない。また、周産期のTCDD曝露がどのような機構で成長後のGnRH低下を惹起するかの機構解析を含めて、研究継続が必要である。

E. 結 論

1. TCDDは周産期の胎児/新生児の脳下垂体LHおよびFSHを一過性に低下させ、これを起点として、性腺ステロイド合成を抑制する。この障害を基に成長後にまで継続する性未成熟がインプリントされる。
2. TCDDは脳下垂体内の遺伝子発現に直接作用してLHBサブユニットの誘導発現を抑制する。胎児期・新生児期に特異的なLHの抑制は、少なくとも一部はこの機構で説明可能と推定される。
3. 胎児期のTCDD曝露は、成長後の視床下部において、百数十遺伝子の発現を変動させる。これらの遺伝子うちの少なくとも一部は成熟形質の発現や維持に

寄与するものと考えられ、その発現変動を通して、性未成熟の形質が出現するものと推定される。特に、視床下部 GnRHの低下は、その交尾行動発現における役割から、注目に値する。

4. TCDD以外にも、DEHPに性腺ステロイド合成系の発現抑制作用が見いだされた。しかし脳下垂体ゴナドトロピン抑制を起点として効果を出現させるものは無かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeda, T., Yamamoto, M., Himeno, M., Takechi, S., Yamaguchi, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H., 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin potentially attenuates the gene expression of pituitary gonadotropin β -subunits in a fetal age-specific fashion: a comparative study using cultured pituitaries. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 221-229 (2011).

2. 学会発表

1. 武田知起, 藤井美彩紀, 田浦順樹, 山本緑, 姫野 勝, 石井祐次, 山田英之, ダイオキシン母体曝露による性行動障害をインプリントする遺伝子の解析. 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡: 災害で中止-発表認定)
2. 古賀貴之, 木庭彰彦, 喜多知美, 武田知起, 石井祐次, 山田英之, TCDD母体曝露におけるラット胎児・性ステロイドホルモン含量への影響. 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡: 災害で中止-発表認定)
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131年会 (2011年3月, 静岡: 災害で中止-発表認定)
4. 田浦順樹, 武田知起, 藤井美彩紀, 石井祐次, 山田英之, 内分泌攪乱物質の妊娠期曝露による胎児・性ホルモン合成系障害. 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡: 災害で中止-発表認定)
5. 木庭彰彦, 古賀貴之, 武田知起, 石井祐次, 山田英之, ダイオキシン曝露によるメタボローム変動の解析. 日本薬学会第131年会 (2011年3月, 静岡: 災害で中止-発表認定)
6. 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2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010年9月, 東京) (若手優秀研究

者賞受賞)

7. 田浦順樹, 武田知起, 藤井美彩紀, 石井祐次, 黒木広明, 月森清巳, 古江増隆, 山田英之, ダイオキシン類による胎児・性ホルモン合成障害: 2,3,7,8-TCDDと2,3,4,7,8-PenCDF間の比較. フォーラム2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (2010年9月, 東京)
8. Takeda, T., Fujii, M., Taura, J., Yamamoto, M., Himeno, M., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., The mechanism of defects in sexual behavior by maternal exposure to dioxin: focusing on gene expression in the pituitary and hypothalamus. 9th International ISSX Meeting (Sep., 2010, Istanbul, Turkey).
9. Koga, T., Takeda, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H., Dioxin-induced disorders in fetal steroidogenesis and gonadotropin formation: minor contribution of oxidative stress to the damages and the protective effect of a vitamin, α -lipoic acid. 9th International ISSX Meeting (Sep., 2010, Istanbul, Turkey).
10. Yamada, H., Reproductive and developmental toxicity of dioxin through damage on fetal gonadotropins. 2010 Spring International Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, (April, 2010, Daegu, Korea).

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

H. 参考文献

1. Janosék, J., Hilscherová, K., Bláha, L., and Holoubek, I., Environmental xenobiotics and nuclear receptors - Interactions, effects and in vitro assessments. *Toxicol. In Vitro*, 20: 18-37 (2006).
2. Mutoh, J., Taketoh, J., Okamura, K., Kagawa, T., Ishida, T., Ishii, Y., and Yamada, H., Fetal pituitary gonadotropin as an initial target of dioxin in its impairment of cholesterol transportation and steroidogenesis in rats. *Endocrinology*, 147: 927-936 (2006).
3. Taketoh, J., Mutoh, J., Takeda, T., Ogishima, T., Takeda, S., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H., Suppression of fetal testicular cytochrome P450 17 by maternal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin: a mechanism involving an initial effect on gonadotropin synthesis in the pituitary. *Life Sci.*, 80: 1259-1267 (2007).
4. Takeda, T., Matsumoto, Y., Koga, T., Mutoh, J., Nishimura, Y., Shimazoe, T., Ishii, Y., Ishida, T., and Yamada, H.,