

分担研究報告書

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin の子育て能力への影響およびその機構解析

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

研究協力者 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 我々はこれまでに、2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の妊娠ラットへの曝露が、胎児脳下垂体において黄体形成ホルモンおよび成長ホルモンの合成を低下させ、これらが出生後の発育障害の一端を担うことを明らかにしつつある。しかし、研究を進める中で、これらのみで全ての障害性が説明できないこともわかってきた。そこで本年度は、母体の育児への影響が、出生児の発育障害に寄与するとの新たな可能性に着目した研究を実施した。まず、育児に必須のホルモンである prolactin の発現状況を妊娠期から育児期にかけて解析した結果、妊娠ラットへの TCDD 曝露は、育児期の母ラットにおいて本ホルモンのレベルを低下させることが明らかになった。また、これと合致して、TCDD は育児期の母体において育児行動を抑制した。しかし、TCDD 曝露母に prolactin を補給することで、これがほぼ正常水準に改善した。さらに、母体の育児行動の回復と符合して、TCDD 依存的な出生児の低体重や学習記憶障害も母体への prolactin 補給によって改善ないし改善傾向を示した。一方、芳香族炭化水素受容体 (AHR) の欠損ラットでは、上記の育児能への影響は全く観察されなかった。以上の成果から、TCDD が AHR を介して育児母の prolactin レベルを低下させ、育児抑制ひいては児の発育障害を惹起するとの新たな機構が見出された。

A . 研究目的

妊娠期のダイオキシン曝露によって出生児に生じる発育障害は、低用量で発現し、長期間にわたり障害が残るため問題が大きい (1)。我々は、ラットを用いたこれまでの一連の研究により、本障害の一端が胎児脳下垂体における黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) および成長ホルモン (growth hormone; GH) の合成低下に起因することを報告してきた (2-5)。しかし、研究を進める中で、1) 離乳期まで継続する出生児の低体重は、胎児の LH/GH 発現低下のみでは説明できないこと、ならびに 2) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) の妊娠期曝露は、胎児の生存数には影響を与えないが、乳児期の進行に伴って死亡率を高めること、などがわかってきた。これらの事実を受け、我々は最近、乳

児の発育や生存確率を高めるために必要不可欠である母体の育児に着目した取り組みを実施している。本年度は、それらの研究成果について報告する。

育児能力を付与するために最も重要であるのが、prolactin と呼ばれる脳下垂体ホルモンである (6)。そこでまず、妊娠ラットへの TCDD 曝露が、育児期に本ホルモンレベルに影響を与えるか否かを調査した。その結果、通常は育児期において高まる prolactin 上昇が、TCDD によって抑制される事実が判明した。この事実に着目し、本研究ではさらに、母体の育児能力と出生児の体重および学習記憶能力を指標として、TCDD による影響と母体への prolactin 補給による効果を検証した。多くのダイオキシン毒性発現は、aryl hydrocarbon receptor (AHR) の活性化が重

要である (7)。そこで、母体の prolactin 低下に対する AHR の寄与を明らかにするため、AHR 欠損 (AHR-KO) ラットを用いた検討を実施した。

B . 研究方法

1. 動物実験

雌雄の Wistar 系ラットを一晩交配し、翌朝膈内に精子が確認された場合、その日を妊娠 0 日目とした。妊娠 15 日目に、TCDD (1 μ g/kg/2 mL コーン油) を単回経口投与した。対照群には、コーン油のみを投与した。妊娠 18 日目から 21 日目、ならびに出産 0 日後から 14 日後の母体より脳下垂体および血液を採取した。

Prolactin 補給実験では、上記と同様に TCDD を処理した母ラットの出産日において、浸透圧ポンプを装着したカテーテルを側脳室内に留置した。浸透圧ポンプ (排出速度: 0.5 μ L/時間、2 週間) には、50 ng/ μ L prolactin 溶液あるいは溶媒として saline のみを充填した。出産 2 日後、4 日後、7 日後および 10 日後に、出生児の体重を測定すると共に、育児行動試験を実施した。出生児は、8 週齢から 10 週齢時に Y 字迷路試験を実施した。

AHR-KO ラットの解析では、児の AHR 遺伝子型の影響を排除するため、全ての児が AHR ヘテロ欠損型となるように妊娠ラットを作成した。すなわち、野生型 (WT) 雌 x AHR-KO 雄あるいは AHR-KO 雌 x WT 雄での交配により、WT および KO の妊娠ラットを作成した。同様に、TCDD 処理をしたのちに出産した母体について、出産 7 日後に育児行動試験を行うと共に、血液を採取した。

2. リアルタイム RT-PCR 法

脳下垂体より total RNA を抽出したのち、PrimeScript RT reagent kit with gDNA Eraser (タカラバイオ社) を用いて cDNA を合成した (8)。これを鋳型とし、Fast SYBR Green Master Mix (Life Technologies

社) を用いて目的タンパク質の mRNA 発現変動を解析した。解析は、ターゲット mRNA の threshold cycle (Ct) 値を β -actin mRNA の Ct 値で補正した。

3. Enzyme immunoassay (EIA)

血清 prolactin 濃度は、市販のキットを用いて、添付説明書に従って測定した。血清は、添付の EIA buffer にて 10 倍希釈したのちに測定に用いた。

4. 育児行動試験

既報 (9) を参考にして育児行動試験を行った。児を 30 分間母から分離したのち、母ラットのケージに戻して試験を開始し、30 分間における licking 行動の実施時間を育児行動の指標として計測した。

5. Y 字迷路試験

出生雄児の 8~10 週齢に週一回、計 3 回試験を行った。最初のアームにラットを入れた時点で試験を開始し、Y 字迷路内を自由に行動させ、5 分間の各アームへの侵入を順に記録した。3 つの異なるアームに連続して侵入することを交替行動 (alternation behavior) と定義し、以下の式により交替行動率 (%) を算出し、短期記憶能力の指標として評価した。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、「九州大学動物実験規則」第 12 条第 4 号に基づき、動物実験委員会による実験計画の承認のもとに、動物の苦痛を可能な限り軽減して実施した。動物実験承認番号: A26-025-1 および A26-151-3。遺伝子組換え実験は、「九州大学遺伝子組換え実験安全管理規則」第 10 条第 2 項の規定に基づき、委員会の承認を得て行った (承認番号: 26-4)。

C. 研究結果

まず、妊娠期の TCDD 曝露が、妊娠期から育児期の prolactin 発現レベルに及ぼす影響を解析した。その結果、妊娠期に

おいては変動が観察されなかったが、TCDD は出産後に上昇する prolactin mRNA 発現上昇を有意に抑制した (Fig. 1A)。これと合致して、血清 prolactin 濃度も、TCDD によって育児期に低下することが確認された (Fig. 1B)。

育児に必須である prolactin レベルの低下を支持して、TCDD は育児期母体において代表的な育児行動である licking の実施時間を減少させた (Fig. 2)。しかし、低下する prolactin を TCDD 曝露母体に補給したところ、これらがほぼ正常水準にまで改善した (Fig. 2)。さらに、育児行動への影響と符合して、TCDD 母体曝露によって起こる出生児の低体重および学習記憶能力低下も、育児母体への prolactin 補給によって改善ないし改善傾向を示した (Fig. 3)。TCDD 依存的な出生児の体重増加率の抑制に関しては、育児期母体への prolactin 補給によって正常水準に改善した (Fig. 3B)。

WT 妊娠ラットへの TCDD 曝露によって起こる育児期の prolactin レベル低下は、AHR-KO ラットへの同処理によっては全く観察されなかった (Fig. 4A)。これと合致して、TCDD 依存的な licking 行動の抑制も、AHR 欠損によって消失した (Fig. 4B)。

D. 考察

本研究では、妊娠期の TCDD 曝露によって育児期の母体への影響を通して出生児の発育に悪影響が生じるとの新たな可能性を検討するため、育児能力付与に最も重要な脳下垂体ホルモンである prolactin に着目した解析を実施した。その結果、TCDD は育児期の母体において一過的に prolactin レベルを低下させる事実が判明した。更に、TCDD 曝露母体の側脳室内に prolactin を補給した結果、TCDD の妊娠期曝露によって減少する育児母体の licking の実施時間がほぼ正常水準に改善

することが明らかとなった。これと符合して、育児期母体への prolactin 補給は、出生児の低体重および学習記憶能力低下に対しても改善ないし改善傾向を示した。以上の結果より、TCDD による育児母体の prolactin 低下を介した育児能力の減退が、出生児の成熟抑制の一端を担うとの新規毒性機構が実証された。

Prolactin 補給は、出生児の低体重や学習記憶能力低下に対しては完全とまでは至らなかった。一方、出生後の体重増加率は、同処理によってほぼ正常レベルにまで改善した事実から、少なくとも出生以降に継続する低体重については、prolactin 減少に基づく母体の育児不良が主因であると考えられる。先に述べたように、我々はこれまでに、胎児の GH/LH 低下が発育障害に寄与することを見出している (2-5)。これらを合わせて考えると、TCDD は育児母体 prolactin ならびに胎児 GH/LH の両者を標的として種々の出生児発育障害を惹起するとの機構が推定される。今後、母児への複合的な影響に着目して更なる展開を図ることが、ダイオキシン次世代障害の全容解明に向けて重要と考えられる。

本研究では、ダイオキシン毒性発現に重要と考えられている AHR が、prolactin 低下に基づく育児行動の抑制にも重要な役割を演じることを見出した。現在のところ、TCDD が AHR 依存的に prolactin 遺伝子の発現を低下させる機構は不明であるが、TCDD による prolactin レベルの低下は、育児期の発現上昇のみを一過的に抑制していることから、普遍的な機構に基づくとは考えにくい。育児期の prolactin 発現増加には、児による乳房吸引 (10) や鳴声 (11) 等の児が母に与える刺激に加えて、母親自身の生理活性物質やシグナル伝達系の変化に基づく prolactin 産生細胞への影響 (12) の寄与が示唆されている。我々は昨年度、胎児の GH/LH 低下は胎児自身の AHR 活性化が重要であること

を報告している（平成 27 年度分担研究報告書）。これと関連して、本研究においては児の AHR 遺伝子型には関係なく、母親の AHR 依存的に prolactin 低下が起こることが確認された。これらのことから、少なくとも TCDD 依存的な児の GH/LH 低下（発育障害）に基づく母体への刺激の不足が、prolactin 低下の主因ではないものと推定される。今後、育児期母体に特異的な生理活性物質の変動に着目した解析を行うことが、prolactin 低下の機構解明に向けて重要であろう。

E. 結論

妊娠期の TCDD 曝露は、育児期母体の AHR 活性化に基づいて prolactin レベルを低下させ、育児行動の抑制ひいては出生児の成熟抑制の一因を担うとの新規機構が明らかになった。

F. 研究発表

1. 日本薬学会第 136 年会（仙台、2017 年 3 月 27 日）
2. 第 43 回日本毒性学会学術年会（名古屋、2016 年 6 月 29 日）
3. 第 33 回日本薬学会九州支部大会（鹿児島、2016 年 12 月 3 日）。

G. 知的財産権の出願・登録状況

特になし。

H. 参考文献

- 1) Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL. *Crit Rev Toxicol*, **23**: 283-335 (1993).
- 2) Mutoh J, Taketoh J, Okamura K, Kagawa T, Ishida T, Ishii Y, Yamada H. *Endocrinology*, **147**: 927-936 (2006).
- 3) Takeda T, Matsumoto Y, Koga T, Mutoh J, Nishimura Y, Shimazoe T, Ishii Y, Ishida T, Yamada H. *J Pharmacol Exp Ther*, **329**: 1091-1099 (2009).
- 4) Hattori Y, Takeda T, Taura J, Ishii Y,

Yamada H. *Endocrine*, **47**: 572-580 (2014).

- 5) Taura J, Takeda T, Fujii M, Hattori Y, Ishii Y, Kuroki H, Tsukimori K, Uchi H, Furue M, Yamada H. *Toxicol Appl Pharmacol*, **281**:48-57 (2014).
- 6) Rosenblatt JS, Mayer AD, Giodano AL. *Psychoneuroendocrinology*, **13**: 29-46 (1988).
- 7) Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. *Toxicol Appl Pharmacol*, **140**: 173-179 (1996).
- 8) Matsumoto Y, Ishida T, Takeda T, Koga T, Fujii M, Ishii Y, Fujimura Y, Miura D, Wariishi H, Yamada H. *J Toxicol Sci*, **35**: 365-373 (2010).
- 9) Nephew BC, Bridges RS. *Stress*, **14**: 677-684 (2011).
- 10) Lee LR, Haisenleder DJ, Marshall JC, Smith MS. *Mol Cell Endocrinol*, **64**: 243-249 (1989).
- 11) Hashimoto H, Saito TR, Furudate S, Takahashi KW. *Exp Anim*, **50**: 307-312 (2001).
- 12) Frawley LS, Boockfor FR. *Endocr Rev*, **12**: 337-355 (1991).