

光環境・メラトニンと発達・先天奇形との関連について

加地 隆¹、田中 大²、渡邊 誠二¹、鈴木 礼子³、外崎 敬和¹、藤枝 弘樹¹

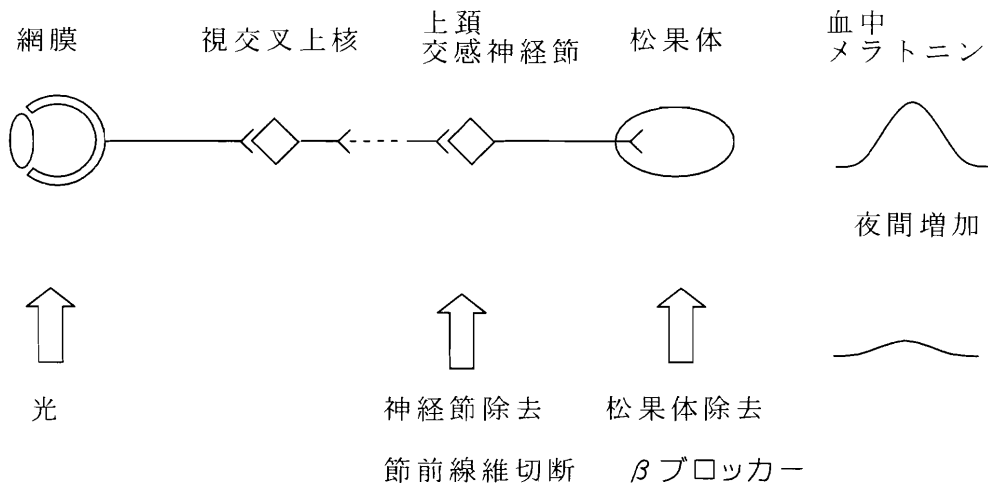
¹弘前大学医学部第2解剖、²高岡整志会病院、³朝日大学歯学部解剖学教室

1.はじめに

私達が毎日暮らしている現代的な生活において、電燈の発明以来、それ以前の時代に比べてずっと明るい環境が普通のこととなっている。しかしながら、そのような明るい環境が人体に無害であるという保証はなく、また、その有害性についての論議がこれ迄に全くなされなかった訳でもない。いずれにしても、紫外線ではない通常の波長の光刺激がもしも生体に悪影響を及ぼす可能性があるならば、それは莫大な数の人々に影響を及ぼす重大な問題であるので、早急にその実態を明らかにし、適切に対処しなければならない。

一方、私共の研究グループが長年にわたり研究してきた松果体は光環境と密接な関係を有する。例えば、松果体ホルモンのメラトニンの合成・分泌は日内暗期に増加する著名な日内変動を示し、暗期の分泌増加は光刺激により抑制されること(図1)、さらに松果体ホルモンは明暗環境と関連して生殖機能の調節に関与することはよく知られている¹⁾。

図1. 哺乳動物のメラトニンリズム調節機構と
夜間の血中メラトニンレベルの低減処置



後者については、特に白イタチ、ゴールデンハムスター、ヒツジなどの、生殖活動に季節変動が見られる動物に関する近年の研究において明瞭に示されている。このような日照時間の変化に応じて季節的生殖周期を示す動物では、松果体ホルモンのメラトニンは外界の日照時間に関する情報をホルモン性情報に変換し、生体はその生殖機能のタイミングを外部環境に合わせるために用いられるという。一方、ヒトやラット・マウスなどのように生殖活動に季節変動の見られない動物では、松果体ホルモンは思春期の発来を抑制するとの古くからの仮説を支持する成績が多く報告され、また、若い成熟雌性ラットにおいては、メラトニンは膈上皮の周期性変化に対して抑制性の作用を及ぼすことが報告されている。しかしながら、生殖活動に季節変動のない動物の思春期以後の生殖活動に対して、松果体除去がどのような影響を及ぼすかについてはまだよくわかっておらず、また種々の動物において、母親の松果体ホルモンが妊娠や胎生期および生後の仔の発達にいかなる影響を及ぼすかについては、まだほとんど検索されないままに残されている。

メラトニンは脂溶性のアミンホルモンであり、妊娠中の母親から胎仔へと胎盤を通して移行し得る⁶⁾。メラトニン受容体は、胎生期のラットについてはまだよく調べられていないが、ヒト胎児の脳、およびシベリアハムスターの鼻咽頭、ラトケ嚢、尾動脈や甲状腺に存在することが知られている^{11,12)}。甲状腺ホルモン、ステロイドホルモンやレチノイン酸のような脂溶性のホルモンやホルモン様分子は核受容体スーパーファミリーに属する特異的転写因子に結合し、遺伝子発現を調節する。最近、メラトニンはレチノイン酸受容体に構造が類似するオーファン受容体に対する自然のリガンドであり、これらの核内受容体に結合し、遺伝子発現を調節することが示されている²⁾。甲状腺ホルモンは発達に対して重大な作用を及ぼし、またその成熟動物における分泌はメラトニンにより影響されること、レチノイン酸の妊娠時における投与はマウスやヒトで先天奇形を起すことはよく知られている³⁾。

しかしながら一方、先天性奇形の発生率の増加は適切な治療を受けていない糖尿病の母親においても見られ、酸化ストレスと糖化反応がこれに関与することが示唆されている。そして、松果体と糖尿病の間の関係も示唆されている。近年の研究によると、メラトニンは有効な抗酸化剤であり活性酸素捕捉剤で、DNAを活性酸素による障害から防護できるという¹⁰⁾。メラトニンは種々の方法（化学発癌物質のsafrole, ポルフィリン、60 HZの磁場、ガンマー線照射）により誘発される障害からDNAを防護するという幾つかの報告がある¹⁶⁾。

私共は妊娠や仔の発達過程に及ぼす母親の松果体ホルモンの影響を検索している際に、偶然、松果体除去母ラットからの仔にしばしば無尾症あるいは水腎症（腎嚢胞）などの先天奇形が発生することを見出したので、ここでは、この実験結果を中心として報告する。このような先天奇形の発生増加が、母親の松果体除去のためにメラトニン分泌がなかった

ことに起因するとすれば、同じ様に松果体からのメラトニン分泌を抑制する連続照明環境の下で妊娠動物を飼育することにより、先天奇形がより多く誘発される可能性も十分にあることになる。従って、私共のこの実験結果は、通常の波長の光刺激が実生活の上でも重大な危険性をはらんでいる可能性を示すことにもなり、注目すべき問題提起となり得るであろう。

2. 松果体除去母ラットからの仔における自然発症奇形の発生増加

生後3週で業者から購入または自家繁殖・離乳したラットを、24時間明暗周期(LD 12:12), $24 \pm 2^\circ\text{C}$ のもとで飼育、生後35-40日期に雌性ラットに松果体除去手術または頭蓋内対照手術を施した。正常対照、手術対照および松果体除去ラットは一定期間の後に正常雄性ラットと7日間同居させて交配し、出産仔の匹数、体重や奇形の有無などを調べた。出産仔の多くは出生直後に、また、初期の実験では多くの場合、生後発達を調べた後の15日迄の齢期、一部は生後21-30日期でも剖検に用いた。

表1に示すように、松果体除去母ラットからの出産仔の中7匹に奇形が認められたが、正常および手術対照母ラットからの出産仔の中には奇形をもったものは1匹も認められなかった。奇形の種類としては無尾症、水腎症(透明な液体を含み、薄い壁を有する単一の

表1. 松果体除去母ラットからの仔における自然発症奇形の増加

正常・手術対照群	松果体除去群	Fisher's Exact Test
0/1328	7/1263	$P < 0.006$

奇形の種類と頻度

無尾症 4 (完全欠損 2、索状尾 1、短尾 1)

片側水腎症 2

片側腎低形成 1

(無尾症(完全欠損) + 肛門閉鎖 1 …… 胎生末期での検索)

拡張した嚢胞)、腎低形成で、奇形の発現に性差はなかった。奇形を有する仔は様々な齢期の、一般には異なる母親から出産された。奇形仔を含む1腹の仔数は1腹だけが4匹で、他は11-17匹であり、生下時の体重は前者でのみ重かったが、後者ではほぼ正常範囲であった。全例で1個体に1つの奇形が認められた。しかし、胎生末期に調べた別の実験では、無尾症と肛門閉鎖を合併した個体もあった(渡邊と加地、未発表)。

3. 松果体除去母ラットからの出産仔数、死産仔数と仔の体重

1腹仔数(生産仔数+死産仔数)は生後約100日での初回出産で、松果体除去母群(平均

値±標準誤差：14.7±0.3)で対照群(12.4±0.4)よりも有意に多く(P<0.001)、2回目以後の出産では有意差は見られなかった。また、非常に出産仔数が少ない場合は松果体除去母群よりも対照群でより多く観察された。松果体除去母ラットから死産仔が多く生まれるという結果は得られなかった。生後約100日の初回出産仔の体重(g)は松果体除去母群(5.11±0.06)で対照群(5.51±0.06)よりも有意の低値を示した(P<0.001)が、2回目以後の出産仔では有意の体重差は見られなかった。

4. 奇形の発生機序および結論

実験結果に示すように、1)奇形の発生は下半身の体幹部に局限していること、2)松果体除去母の方が対照母よりも出産仔数が多いか差がなく、また、死産仔の数も松果体除去母群で多くはないということから、母親の松果体除去によるメラトニンの欠乏状態が胎生期の仔のDNAにランダムな障害を起こし、奇形の発生を誘発するという可能性は考え難い。このように、母親の松果体除去という処置は他の多くの催奇形因子とは、機序において異なっているらしい。また、ヒトの糖尿病の母親からは巨大児が生まれる頻度が高いことが知られているが、本実験結果に示すように、松果体除去母からの出産仔が一般に巨大になるという傾向は見られなかった。従って、本実験で観察された先天奇形の頻度の増加が、一般に松果体除去母ラットにおける糖尿病に起因すると判断する根拠は、少なくとも現時点では乏しいと云えよう。

結果に見られるように、本実験で観察された奇形の原因性変化は、身体の限局した部位(すなわち、尾側中胚葉とくに尾あるいは後腎)の分化過程または分化した細胞に誘発されるのであろう。無尾症と水腎症は本研究では異なる個体に見出されたが、これら両奇形はしばしば合併して発現することが報告されている⁹⁾。また、もっと最近の報告によると、短尾症と腎臓の低形成の合併が、Pax-2遺伝子発現障害を示すDanforth's short tail mutant miceで観察されている⁸⁾。このように、尾と腎臓は発生的に関連性がある。一方、本研究では、下肢の明瞭な発達不全は認められていないものの、尾椎・腎臓の発達障害と肛門の閉鎖不全が観察された。これらは尾側退行という発達障害に部分的に類似している。尾側退行は胚子の最尾方部における中胚葉の量が不十分なために起こる症候群で、ヒトでは糖尿病などに関連し、マウスではT(Brachyury)⁴⁾やWnt^{14,15)}などの遺伝子の異常により同様の表現型が生じる事が報告されている。また、つけ加えて云うと、メラトニン受容体はシベリアハムスター胎仔と成熟ラット両者の尾動脈^{12,17)}に、およびヒトを含む種々の哺乳動物の腎臓¹³⁾に存在が認められている。一方、脊柱の発達はレチノイン酸のアンバランスによって影響をうける。例えば、実験的にレチノイン酸を投与することによって腰椎、仙骨、尾骨の発達不全を起し得ることが知られている³⁾。上述のように、メラトニンの核内受容体は構造的にレチノイン酸受容体と類似しているため、メラトニンがレチノイ

ン酸の受容体を介する機能、および／あるいはT (Brachyury) やWnt遺伝子を含む調節遺伝子の働き、に対して修飾作用を有するかどうかは興味深い課題であろう。

結論的に云うと、松果体ホルモン (メラトニン)、レチノイン酸 (ビタミンAの誘導体) および他のホルモンに関する実験結果から、妊娠中の母親を囲む外部・内部環境は仔の出生前の発達に影響を与え、自然発症奇形の発生頻度を高め得ると考えられる。しかしながら、妊娠中の動物を連続照明環境下で飼育した場合に、本当に松果体除去と同様に奇形の発生頻度が増加するかどうかは、今後更に実験的に確かめる必要がある。また、松果体ホルモンの仮説的抗奇形性作用の機序の解明には更なる検索が必要であり、特に、発達中の細胞における遺伝子発現および成長因子とそれらの受容体関連機構に及ぼすメラトニンの作用について、より多くの詳細な実験的解析が望まれる。

5.補足

この論文では、松果体除去と同様に夜間の血中メラトニンレベルの著しい低下を引き起こす因子として光刺激のみを取り上げた。しかし、松果体の夜間におけるメラトニン合成・分泌の増加は、上頸交感神経節由来の節後神経終末から放出されるノルエピネフリンの、主として β 受容体を介する作用によるN-acetyltransferaseの活性増加によって引き起こされ、その上頸交感神経節のニューロンは視床下部中枢から脳幹を下行する神経経路から節前線維を介して調節をうける事が明らかにされている^{1,7)} (図1)。このように、 β ブロッカーの連続投与や上頸交感神経節除去、その節前線維切断、あるいは視床下部中枢を連続的に抑制する処置なども夜間の血中メラトニンレベルの増加を抑える。従って、このような各種の処置もまた、先天奇形の発生を誘発する危険因子となり得る事を付記し、あわせて注意を喚起したい。

(この研究は文部科学省研究助成金、萌芽的研究 13877001-00、による助成をうけた)

参考文献 (詳細については私共の原著5) を参照されたい)

- 1) Arendt J (1985) Mammalian pineal rhythms. *Pineal Res Rev* 3, 161-213.
- 2) Carlberg C, Wiesenberg I (1995) The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship. *J Pineal Res* 18, 171-8.
- 3) Gilbert SF (2000) *Developmental Biology*, 6th edn. Sinauer Associates, Sunderland.
- 4) Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H (1990) Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 343, 617-22.

- 5) Kachi T, Tanaka D, Watanabe S, Suzuki R, Tonosaki Y (2004) Increased incidence of spontaneous malformations in pups and increased litter size from pinealectomized dams. *Anat Sci Int* 79, 62-71.
- 6) Klein DC (1972) Evidence for the placental transfer of ^3H -acetylmelatonin. *Nat New Biol* 237, 117-18.
- 7) Klein DC (1985) Photoneural regulation of the mammalian pineal gland. In: Photoperiodism, melatonin and the pineal. Ciba Foundation Symposium 117. Pitman, London, 38-56.
- 8) Phelps DE, Dressler GR (1993) Aberrant expression of Pax-2 in Danforth's short tail (SD) mice. *Dev Biol* 157, 251-8.
- 9) Ratcliffe HL, King HD (1941) Developmental abnormalities and spontaneous diseases found in rats of the mutant strain, stub. *Anat Rec* 81, 283-305.
- 10) Reiter RJ, Guerrero JM, Garcia JJ, Acuña-Castroviejo D (1994) Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Ann NY Acad Sci* 719, 410-24.
- 11) Reppert SM, Weaver DR, Rivkees SA, Stopa EG (1988) Putative melatonin receptors in a human biological clock. *Science* 242, 78-81.
- 12) Rivkees SA, Reppert SM (1991) Appearance of melatonin receptors during embryonic life in Siberian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Brain Res* 568, 345-9.
- 13) Song Y, Lee PJP, Chan CWY et al (1996) Recent advances in renal melatonin receptors. In: Melatonin: A Universal Photoperiodic Signal with Diverse Actions. *Frontiers in Hormone Research*, Vol. 21. (Tang PL, Pang SF, Reiter RJ, eds). Karger, Basel, 115-22.
- 14) Stark K, Vainio S, Vassileva G, McMahon AP (1994) Epithelial transformation of metanephric mesenchyme in the developing kidney regulated by Wnt-4. *Nature* 372, 679-683.
- 15) Takada S, Stark KL, Shea MJ, Vassileva G, McMahon JA, McMahon AP (1994) Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes & Dev* 8, 174-189.
- 16) Tan D-X, Poeggeler B, Reiter RJ et al. (1993) The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett* 70, 65-71.
- 17) Viswanathan M, Laitinen J, Saavedra JM (1990) Expression of melatonin receptors in arteries involved in thermoregulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 6200-3.