

臍帯血、羊水、母体血および母乳におけるコルチゾールとプロ  
ラクチン濃度の周産期要因との関連に関する研究

(Studies on cortisol and prolactin concentrations in umbilical cord blood,  
amniotic fluid, maternal blood, and breast milk related to perinatal factors )

佐野 葉子

臍帯血、羊水、母体血および母乳におけるコルチゾールとプロラクチン濃度の周産期要因との関連に関する研究

(Studies on cortisol and prolactin concentrations in umbilical cord blood, amniotic fluid, maternal blood, and breast milk related to perinatal factors)

佐野 葉子

日本獣医生命科学大学大学院 獣医生命科学研究科

応用生命科学専攻 博士後期課程

(指導教員:田中 実)

## 目次

第1章 緒言	1
第2章 臍帯血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式 および分娩所要時間との相関	
2-1 背景と目的	4
2-2 方法	
2-2-1 検体提供者	5
2-2-2 臍帯血採取	6
2-2-3 コルチゾール濃度の測定	6
2-2-4 プロラクチン濃度の測定	6
2-2-5 統計処理	6
2-3 結果	
2-3-1 臍帯動脈血と臍帯静脈血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較	6
2-3-2 自然分娩と吸引分娩間の臍帯血間のコルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較	
2-3-3 コルチゾールとプロラクチン濃度の分娩所要時間との相関	11
2-4 考察	
14	
第3章 羊水中のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式 および分娩所要時間との相関	
3-1 背景と目的	16
3-2 方法	
3-2-1 検体提供者	17
3-2-2 羊水採取	17
3-2-3 コルチゾール濃度の測定	18
3-2-4 プロラクチン濃度の測定	18
3-2-5 統計処理	18
3-3 結果	

3-3-1	自然分娩と吸引分娩間の臍帯血間のコルチゾールおよび プロラクチン濃度の比較	18
3-3-2	コルチゾールとプロラクチン濃度の分娩所要時間との相関	21
3-4	考察	24
第4章	授乳期の母体血と母乳中のプロラクチン濃度の相関	
4-1	背景と目的	25
4-2	方法	
4-2-1	検体提供者	26
4-2-2	検体採取	26
4-2-3	プロラクチン濃度の測定	27
4-2-4	統計処理	
4-3	結果	
4-3-1	前乳と後乳のプロラクチン濃度の比較	27
4-3-2	母体血と母乳のプロラクチン濃度の相関	30
4-4	考察	32
第5章	総括	34
	謝辞	40
	参考文献	41
	英文要約	53

# 第 1 章

## 緒言

動物が生きていくためには、外部環境および内部環境の変化への適応が必要である。こうした環境要因の中で身体的あるいは心理的に苦痛をともなうものはストレスと呼ばれる。脊椎動物におけるストレス応答は、まず神経系によりストレスが感知され、その情報が視床下部のストレス応答中枢に伝えられ、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (Corticotropin- releasing hormone:CRH) が下垂体門脈血中に分泌される。CRH は下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン (Adrenocortico- tropic hormone:ACTH) 産生細胞に作用し、分泌された ACTH が副腎皮質に作用してグルココルチコイド (ヒトではコルチゾール) が分泌される。こうしたストレス応答系は視床下部-脳下垂体-副腎軸と呼ばれる(1)。コルチゾールはステロイドホルモンの一種で、抹消組織でのタンパク質の分解や肝臓でのアミノ酸からの糖新生の促進等に働く。結果として血糖値が上昇し、ストレスに対応するためのエネルギー源が確保される。

ストレスに応答して分泌が増加するホルモンとしてプロラクチンも知られる(2,3)。プロラクチンは脊椎動物の脳下垂体前葉から分泌されるタンパク質ホルモンである。哺乳動物における作用として乳腺における母乳分泌

の促進作用がよく知られているが、浸透圧調整、免疫機能調整等の多様な生理作用を有している。また、神経系にも作用し、母性行動の誘導、ストレス耐性の増強、生殖行動の抑制等に働く(4, 5, 6)。

哺乳動物の生体内における生命現象の分子レベルでの解明は主にラットやマウスに代表される実験動物をモデルとしておこなわれてきている。しかし実験動物で明らかになった生命現象の仕組みがそのままヒトにあてはまるとは限らない。しかし、ヒトにおける生命現象の分子レベルでの解明には生体組織検体の採取において大きな制約がある。ヒトにおいて比較的検体提供者の負担が少なく採取が容易な組織検体は、血液、尿、新生児の臍帯血、羊水、母乳等である。しかし、このような検体においても研究目的のためだけに採取することは好ましいことではない。そこで本研究では、静岡県富士宮市立病院倫理委員会の承認を受け、産科婦人科に来院した妊産婦から出産直後の羊水と新生児の臍帯血、定期健康診断時に採取した母体血、授乳前後の母乳の提供を受け研究に供した。検体提供者には書面を提示して口頭で研究内容の説明を行い、自筆での署名により承諾を得た。

ヒトにおける分娩時には母体がいわゆる陣痛という大きな痛みのストレスを受けるが、胎児も子宮の収縮による圧迫ストレスを受けていると考えられる。しかし、分娩時における胎児へのストレスとしての影響については充分には解明されていない。そこで本研究は、コルチゾ

ールとプロラクチンの分泌のストレス応答性に着目し、まず、分娩直後の新生児の臍帯血との両ホルモン濃度と分娩様式および分娩時間との相関を調べた。また、羊水中のコルチゾール濃度は分娩直前に上昇し(7)、母体の脱落膜から分泌されるプロラクチンも羊水中に移行している(8)。そこで分娩直後の新生児の羊水の両ホルモン濃度と分娩様式および分娩時間との相関も調べた。

授乳期においてプロラクチンは母体血中に高濃度に分泌されており、母体血中のプロラクチンは母乳中に移行することにより母乳中にも高濃度に分泌されている(9,10,11)。近年、ラットを用いた実験において、授乳期の母乳中のプロラクチンの摂取が成体期の脳機能や栄養状態に影響することが報告され、母乳中のプロラクチンの生理的役割の重要性が注目されている(12,13)。母乳中のプロラクチン濃度を維持するには母体血のプロラクチン濃度を高めることが考えられるが、ヒトにおける母体血と母乳のプロラクチン濃度の関連については充分には明らかになっていない。そこで、授乳期の母体血と母乳のプロラクチン濃度の相関を調べた。

## 第 2 章

### 臍帯血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関

#### 2-1 背景と目的

ヒトの分娩期間は3期に分けられる。第1期は規則的な子宮収縮の開始から子宮頸部の全拡張まで、第2期は子宮頸部の全拡張から分娩まで、第3期は分娩後胎盤が排出されるまでである。第1期と第2期において母体は陣痛によるストレスを被るが(14)、この時期には胎児も子宮の収縮による圧迫ストレスを受けており、分娩時間が長いほどストレスは大きいと考えられる。特に分娩第2期は子宮の断続的収縮の間隔が短く、収縮の圧力も強いのでストレスは大きいと思われる。しかし分娩時間の長さや胎児へのストレスとの関連についての研究はなされていない。

ヒトにおける主要な副腎皮質ホルモンであるコルチゾールはストレスに反応して分泌量が増加するため、その血中濃度はヒト分娩時のストレスマーカーとして用いられている(15)。分泌されたコルチゾールはエネルギー産生の増加や炎症反応の抑制等に働く。脳下垂体ホルモンの一種であるプロラクチンもストレス反応ホルモンとして知られる(16)。プロラクチンの血中濃度は出産前から



授乳中にかけて増加し、乳汁分泌の促進に働くが、その分泌はストレス負荷時にも増加し、ストレス抵抗性の増強にも働く（4）

血液中の種々の成分の分析データは体の生理的状態の診断に役立っている。新生児における臍帯血の採血は新生児への負担がないという利点があり、臍帯血成分の分析データは新生児の生理的状態の把握に役立っている

（17）。特に臍帯血のコルチゾール濃度と分娩形態による新生児へのストレス度との関連との関連については多くの報告がなされている（18-28）。しかし、分娩時間の長さや胎児へのストレスとの関連については報告がない。

本研究では、経膣分娩における分娩時間の長さにおける胎児のストレス度を明らかにするため、ストレス応答ホルモンであるコルチゾールとプロラクチンの分娩後の臍帯血濃度を調べた。

## 2-2 方法

### 2-2-1 検体提供者

平成24年1月から平成25年8月までの期間に妊娠37週日から42週未満の正期産自然分娩33例および自然分娩が困難で吸引分娩をおこなった8例の出産婦から臍帯血検体の提供を受けた。いずれも母体、新生児に合併症はなかった。提供者の年齢は、20歳～42歳であった。

## 2-2-2 臍帯血採取

経膣分娩による胎児娩出後、臍帯を結紮して切断し、臍帯動脈と臍帯静脈からそれぞれ採血を行い、常法どおり遠心分離により血漿を分離した。

## 2-2-3 コルチゾール濃度の測定

コルチゾール濃度は、TFB社のコルチゾールキット：FTAを使用し放射免疫測定法（Radioimmunoassay：RIA）で測定した。

## 2-2-4 プロラクチン濃度の測定

プロラクチン濃度はロシュ・ダイアグノスティック社のエクルーシス試薬プロラクチンⅢを使用し、電気化学発光免疫測定法（Electro Chemiluminescent Immunoassay：ECLIA）で測定した。

## 2-2-5 統計処理

データはSPSS vr15 for Windowsを使用し、T-testおよびスピアマンの順位相関検定法にて統計処理を行った。

## 2-3 結果

### 2-3-1 臍帯動脈血と臍帯静脈血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較

臍帯動脈血と臍帯静脈血では栄養成分等の濃度が異なる

っている。そこでコルチゾールおよびプロラクチンの両血液中の濃度を比較した。コルチゾール濃度の平均値は、臍帯動脈血では  $143.7 \pm 69.2 \text{ ng/ml}$ 、臍帯静脈血では  $148.3 \pm 71.6 \text{ ng/ml}$  であり、プロラクチン濃度の平均値は臍帯動脈血では  $359.4 \pm 131.1 \text{ ng/ml}$ 、臍帯静脈血では  $362.2 \pm 134.3 \text{ ng/ml}$  であった (図 1A, B)。両ホルモン濃度ともに、個人間の濃度には大きな差が見られたが、同一個人における臍帯動脈と臍帯静脈の濃度はほぼ同じであった。臍帯動脈は細く臍帯静脈に巻き付いているため採血が困難であるが、臍帯動脈と臍帯静脈でコルチゾール濃度に差がなかったことから、以後の分析では臍帯静脈の血液検体を用いた。

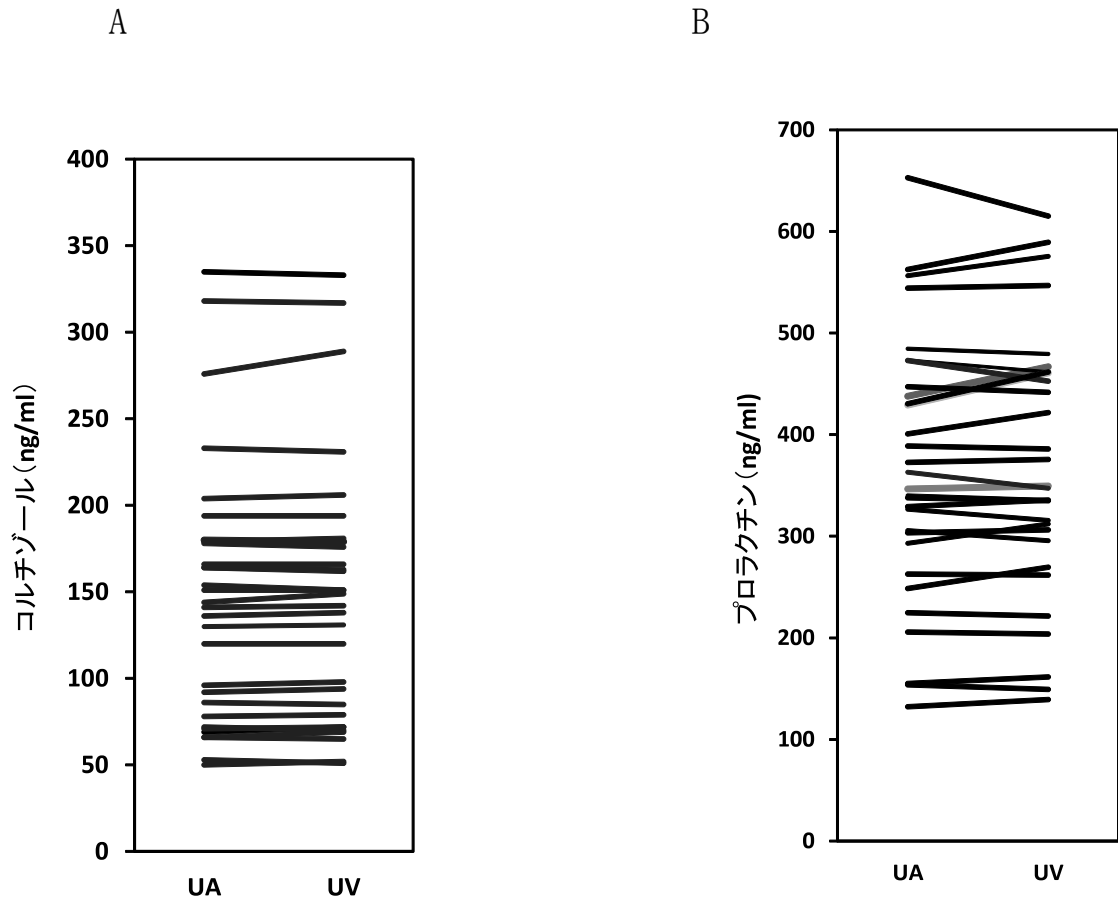


図 1. 臍帯静脈血と臍帯動脈血間のコルチゾール濃度

およびプロラクチン濃度の比較

A:コルチゾール濃度、B:プロラクチン濃度

UA:Umbilical artery blood

UV:Umbilical venous blood

N=33

## 2-3-2 自然分娩と吸引分娩間の臍帯血コルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較

経膣分娩では出産が困難な場合に胎児の吸引による補助分娩が行なわれるが、その頻度は本病院においては年間60～70例ほどである。そこで吸引による補助分娩（吸引分娩）8例の検体が得られた時点で、自然分娩33例との分娩時間、新生児の臍帯血のコルチゾールとプロラクチン濃度の比較を行なった（表1）。両分娩方式の総分娩時間には有意な差はみられず、分娩第2期の長さが吸引分娩は自然分娩よりも平均で約2.5倍長かった。そこで自然分娩と吸引分娩における新生児の臍帯血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度を調べたところ、コルチゾール濃度は正常分娩よりも吸引分娩の方が有意に高かったが、プロラクチン濃度には分娩様式間で有意差はなかった。

表 1. 自然分娩と吸引分娩の臍帯血中コルチゾール濃度とプロラクチン濃度および分娩時間の比較

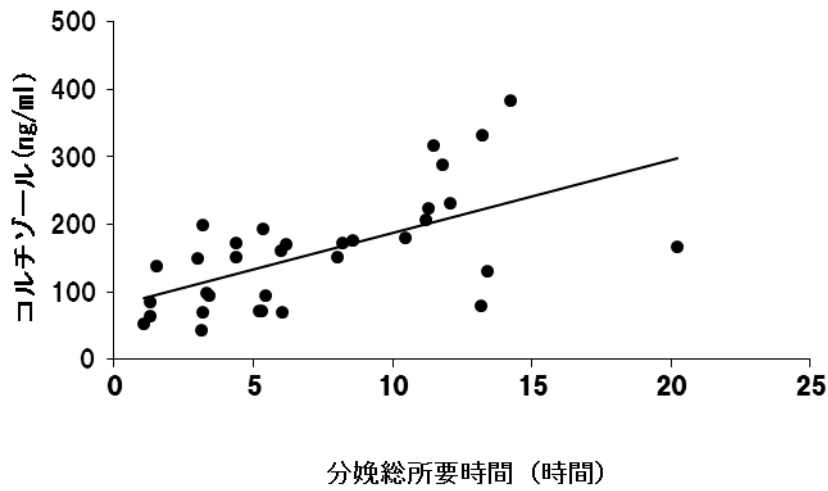
	自然分娩(n=33)	吸引分娩(n=8)
コルチゾール(ng/ml)	157.2 ± 84.4	232.1 ± 90.8*
プロラクチン(ng/ml)	398.8 ± 147.9	421.1 ± 108.3
分娩総所要時間(時間)	7.4 ± 4.7	7.3 ± 3.4
分娩第2期所要時間(分)	19.1 ± 14.4	49.3 ± 20.6**

\*P<0.05 , \*\*P<0.01

### 2-3-3 コルチゾールとプロラクチン濃度の分娩所要時間との相関

自然経膾分娩におけるコルチゾールとプロラクチンの臍帯静脈血濃度と分娩所要時間との相関を調べたところ、コルチゾール濃度は分娩第1期から第3期までの総分娩所要時間と正の相関があり（図2-A）、胎児が子宮内での圧迫を強く受ける分娩第2期の所要時間とより強い相関があった（図2-B）。、臍帯血のプロラクチン濃度も分娩第1期から第3期までの総分娩所要時間と（図3-A）、分娩第2期の所要時間ともに弱い正の相関であり（図3-B）、分娩第2期の所要時間のほうが相関が強かった。

A



B

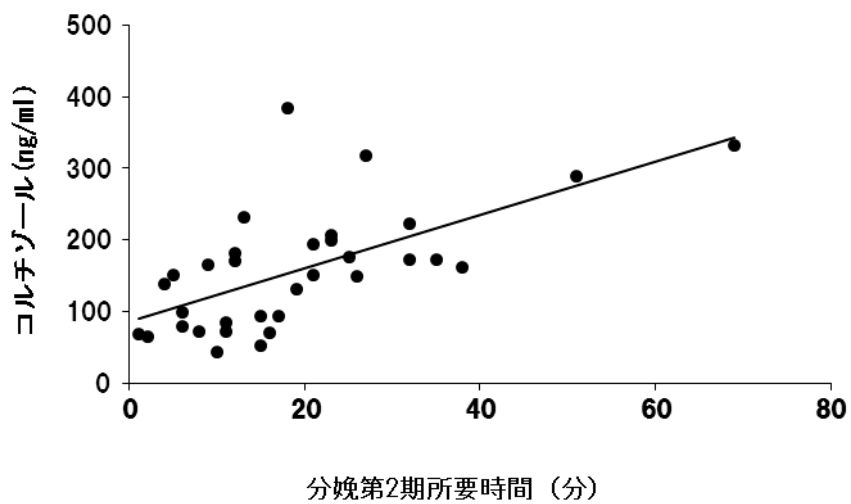


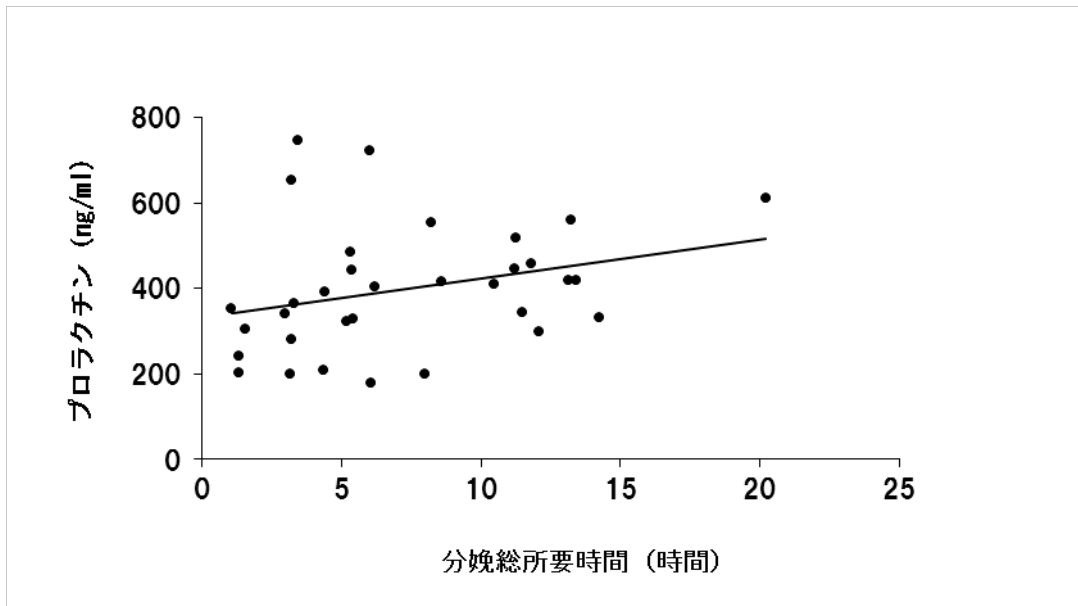
図 2 . 分娩所要時間と臍帯血のコルチゾール濃度の相関

A: 分娩総所要時間 (N=33, R=0.6022, P<0.05)

B: 分娩第2期所要時間 (N=33, R=0.6334, P<0.05)



A



B

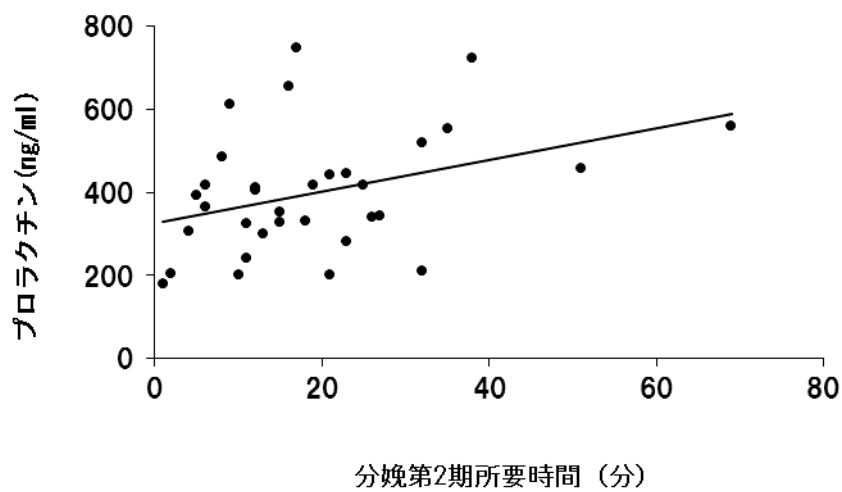


図 3 . 分娩所要時間と臍帯血のプロラクチン濃度の相関

A: 分娩総所要時間 (N=33, R=0.2893, P<0.05)

B: 分娩第2期所要時間 (N=33, R=0.3726, P<0.05)

## 2 - 4 考 察

臍帯動脈と臍帯静脈のコルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較を行ったところ、個体間ではばらつきがあったが同一個人では両ホルモン濃度ともにほぼ同レベルであった。臍帯血のコルチゾール濃度は母体血の濃度とは関連しないという報告があり(19,29)、臍帯血のプロラクチン濃度も母体血の濃度とは関連のないことが報告されている(30)。したがって臍帯血の両ホルモンは胎児由来であり、臍帯血の両ホルモン濃度に大きな個体差がみられることは、個々の分娩所要時間の長さ等の相違による胎児へのストレス度の相違を反映している可能性がある。

胎児の吸引分娩と自然分娩におけるコルチゾールとプロラクチンの臍帯血濃度を調べると、プロラクチン濃度には有意な差はなかったが、コルチゾール濃度は吸引分娩のほうが自然分娩の場合よりも有意に高かった。このことは、吸引分娩では分娩第2期の時間が自然分娩の場合より長かったことによる胎児へのストレスの大きさを反映していると考えられる。

自然分娩における分娩総所要時間とコルチゾールおよびプロラクチン濃度との関係を見ると、コルチゾール濃度には正の相関が認められた。特に子宮収縮の間隔が短く、強さも大きい分娩第2期の長さとはより強い相関があった。したがって分娩時間が長いほど胎児も強いストレ

スを受けていると考えられる。また、プロラクチン濃度も分娩所要時間との相関はみられたがコルチゾール濃度よりも相関が弱かった。プロラクチン濃度もコルチゾール濃度と同様に分娩第2期の方が相関が強かった(図3A, B)。プロラクチンの分泌のストレス応答は一過性であるため(4)、測定時の濃度の個体差が大きく、また分娩第2期の強いストレスに対する応答性も弱くなっていると考えられる。

## 第 3 章

### 羊水中のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関

#### 3-1 背景と目的

羊水は胎児を包んでいる羊膜腔を満たす液体であり、胎児の運動や成長、そして機械的衝撃や温度変化からの保護に必須の働きをしている(31)。羊水中には電解質、アミノ酸、糖、蛋白質、脂肪、尿素等の生体成分が含まれており、その供給源は胎児の尿、消化管系、呼吸器系、臍帯、胎盤等である(32)。羊水中の蛋白質成分として、アルブミン、グロブリンを初め、アミラーゼ、γ-トランスぺプチダーゼ等の酵素類、上皮成長因子、インスリン様成長因子 II 等の成長因子(33, 34)やサイトカイン(35)等の生理活性物質が存在する。しかし、各蛋白質成分の濃度は母体血および臍帯の濃度とは異なっており、羊水独自の調節機構が働いている(31, 34)。

羊水にはコルチゾールとプロラクチンも含まれている。母体血のコルチゾール濃度は羊水の濃度と正の相関があり母親の情緒的不安度が大きい場合には相関度がより高いことが報告されている(36)。また、出産前の母親へのストレスと母体血および羊水のコルチゾール濃度の増加が、出産後の子の低体重および不安度等の情緒安定性に影響することが示唆されている(37)。

羊水中のプロラクチンは子宮の脱落膜で産生され(38, 39)、卵膜を経て羊水中に移行することが知られている。したがって羊水のプロラクチン分泌は母体血および臍帯血のプロラクチン分泌とは独立した調節を受けており、妊娠末期における羊水のプロラクチン濃度は母体血の濃度よりも10以上高い(40, 41)。しかし羊水中のプロラクチンの生理的役割についての研究はほとんどなされていない。

本研究では羊水中のコルチゾールおよびプロラクチンの分娩時のストレス応答への関与を明らかにするため、羊水中の両ホルモン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関を調べた。

### 3-2 方法

#### 3-2-1 検体提供者

平成24年1月から平成25年8月までの期間に妊娠37週日から42週未満の正期産自然分娩20例および自然分娩が困難で吸引分娩をおこなった6例の出産婦から羊水検体の提供を受けた。いずれも母体、新生児に合併症はなかった。提供者の年齢は20歳～42歳であった。

#### 3-2-2 羊水採取

羊水は経膈分娩時に自然破水あるいは人工破水した時点で母体血液が混入しないように5mlをシリンジで採取

し、測定時まで 4℃で保存した。

### 3-2-3 コルチゾール濃度の測定

コルチゾール濃度は、TFB社のコルチゾールキット：FTAを使用し放射免疫測定法（Radioimmunoassay：RIA）で測定した。

### 3-2-4 プロラクチン濃度の測定

プロラクチン濃度はロシュ・ダイアグノスティック株式会社のエクルーシス試薬プロラクチンⅢを使用し電気化学発光免疫測定法（Electro Chemiluminescent Immunoassay：ECLIA）で測定した。

### 3-2-5 統計処理

データはSPSS vr15 for Windowsを使用し、T-testおよびスピアマンの順位相関にて統計処理を行った。

## 3-3 結果

### 3-3-1 自然分娩と吸引分娩間の羊水のコルチゾールおよびプロラクチン濃度の比較

第2章で記述した胎児の吸引による補助分娩（吸引分娩）8例のうち6例から羊水検体が得られた。そこで自然分娩20例との分娩時間、新生児の羊水中のコルチゾール濃度およびプロラクチン濃度の比較を行なった（表2）。

コルチゾール濃度およびプロラクチン濃度ともに正常分娩よりも吸引分娩の方が有意に高かった。

表 2. 自然分娩と吸引分娩間の羊水中コルチゾール、プロラクチン濃度および分娩時間の比較

	自然分娩(n=20)	吸引分娩(n=6)
コルチゾール(ng/ml)	408.0 ± 245.9	1256 ± 518.0**
プロラクチン(ng/ml)	950.7 ± 389.3	1284 ± 365.4*
分娩総所要時間(時間)	6.4 ± 4.1	10.8 ± 4.6*
分娩第2期所要時間(分)	15.4 ± 12.9	58.8 ± 29.4**

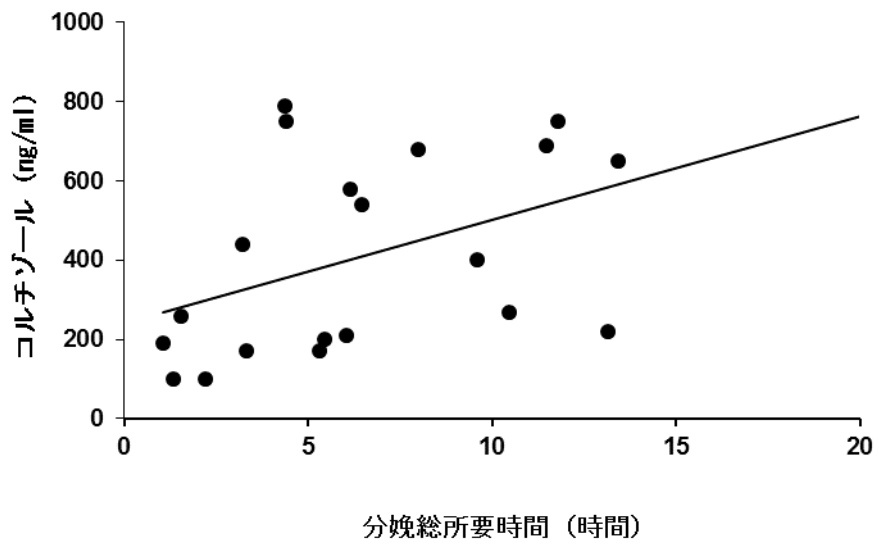
\*P<0.05, \*\*P<0.01



### 3-3-2 コルチゾールとプロラクチン濃度の分娩所要時間との相関

自然経膣分娩におけるコルチゾールとプロラクチンの羊水中濃度と分娩所要時間との相関を調べたところ、コルチゾール濃度は分娩第1期から第3期までの総分娩所要時間と正の相関があり（図4-A）、分娩第2期の所要時間との相関はより強かった（図4-B）。一方、羊水中のプロラクチン濃度には総分娩所要時間および分娩第2期の所要時間のいずれとも相関はみられなかった（図5A, B）。

A



B

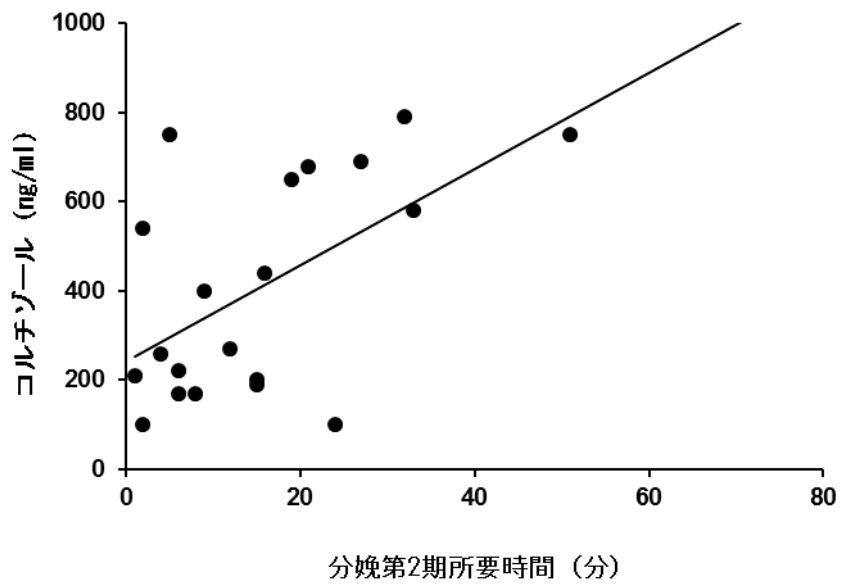
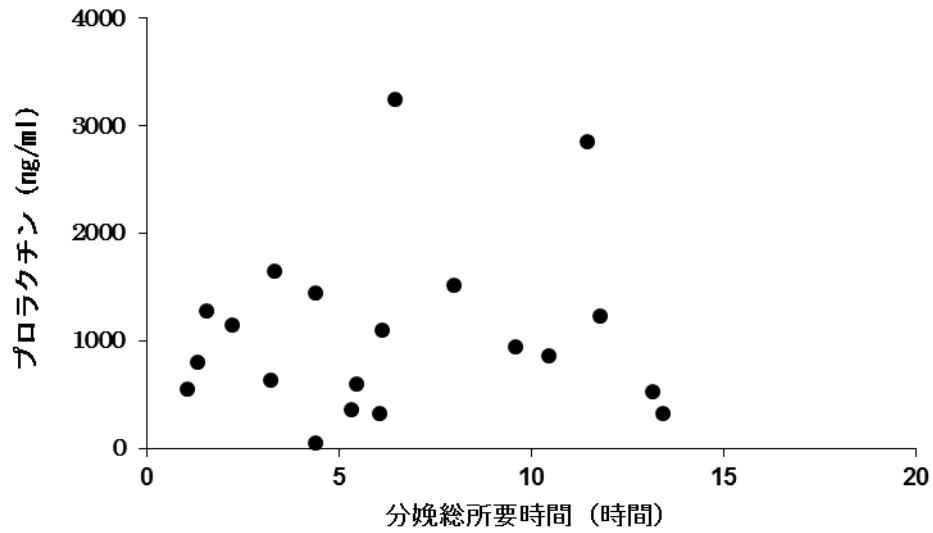


図4. 分娩所要時間と羊水中のコルチゾール濃度の相関

A: 分娩総所要時間 (N=20, R=0.4251, P<0.05)

B: 分娩第2期所要時間 (N=20, R=0.5672, P<0.05)

A



B

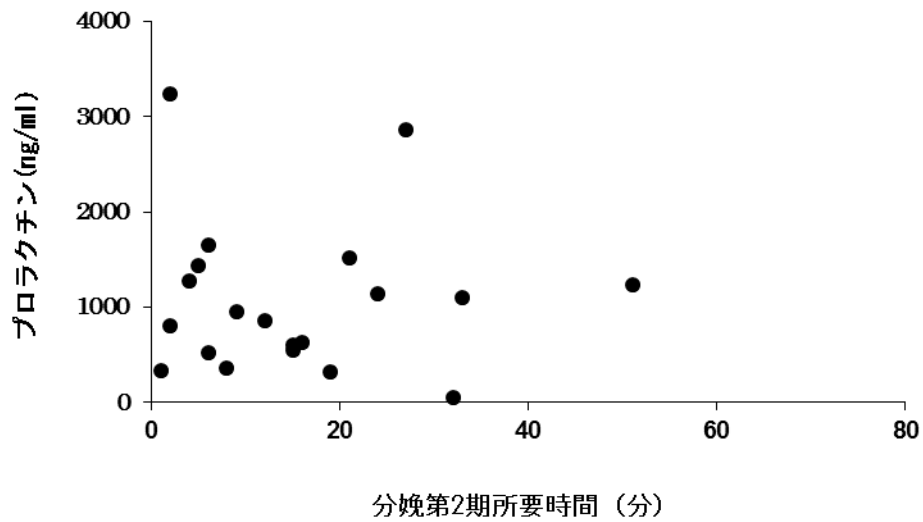


図 5 . 分娩所要時間と羊水中のプロラクチン濃度の相関

A: 分娩総所要時間 (N = 20, R = 0.0200)

B 分娩第2期所要時間 (N = 20, R = 0.0943)

### 3 - 4 考 察

経膈自然分娩では分娩前に母体血および羊水のコルチゾール濃度が増加するが、帝王切開による分娩では増加しない(7, 42)。自然分娩における羊水のコルチゾール濃度の増加は分娩時のストレスへの応答であると考えられる。経膈分娩において出産が困難な場合に胎児の吸引分娩が行なわれる。両分娩様式におけるコルチゾールとプロラクチンの羊水中の濃度を調べたところ、いずれも吸引分娩のほうが自然分娩よりも有意に高かった。また、自然分娩における両ホルモン濃度と分娩所要時間との相関を調べたところ、コルチゾール濃度には正の相関がみられ、臍帯血濃度の場合と同様に分娩第2期の所要時間とより高い相関があった。したがって羊水中のコルチゾール濃度の増加は長い分娩時間による胎児の受けるストレスの大きさを反映していると考えられる。一方、プロラクチン濃度には分娩所要時間との相関はみられなかった。羊水中のプロラクチンは母体子宮の脱落膜由来であり(38, 39)、その産生および分泌の仕組みはよくわかっていないが、ストレスに対する応答性はないと推測される。

## 第 4 章

### 授乳期の母体血と母乳中のプロラクチン濃度の相関

#### 4-1 背景と目的

母乳にはタンパク質、アミノ酸、糖、脂質、ビタミン、ミネラル等の栄養物質に加えて、プロラクチン、レプチン、アディポネクチン、グレリン、インスリン等のホルモンも含まれている(43-46)。特にプロラクチンは授乳期の母体血液中の濃度に匹敵するほどの高濃度に含まれている(43)。ラットにおける実験では、授乳期の母体血中に放射性標識をしたプロラクチンを注入すると、すみやかに母乳中に移行し(47)、移行したプロラクチンの16%は新生児の消化管から吸収されて血液中に移行していることが報告されている(48)。授乳期において、母体血中のプロラクチンは乳腺の上皮細胞におけるトランスサイトシスによって母乳中に移行することが明らかにされている(49,50)。

脳下垂体からのプロラクチンの分泌はドーパミンによって強く抑制される(5)。授乳期の母親ラットにドーパミン作動薬であるブロモクリプチンを投与して母乳中へのプロラクチン分泌を抑制すると、その母乳で育った子の成体期における不安行動が増し母性行動が乏しくなる

という報告がある(12)。また最近、母乳プロラクチンの欠乏が成体期におけるレプチン抵抗性、甲状腺機能の低下、肥満、不安行動の誘発に影響するとの報告がなされている(51-54)。このような知見は母乳プロラクチンが成体期にエピジェネティックな作用を及ぼすことを示唆しており(13,55)、母乳中のプロラクチンの生理的重要性を支持している。

母乳中のプロラクチン濃度は分娩後数日間の授乳期に著しく増加するが(56,57)、母乳中のプロラクチン濃度と母体血のプロラクチン濃度の関連についてはよくわかっていない。

本研究ではヒトにおける母乳中のプロラクチン濃度と母体血のプロラクチン濃度との相関を調べた。

## 4-2 方法

### 4-2-1 検体提供者

平成24年1月から平成25年8月までの期間に妊娠37週日から42週未満の正期産で自然分娩し、本研究への協力の同意を得た71名で母親より母体血および母乳検体の提供を受けた。提供者の年齢は20～42歳で初産婦が37名、経産婦が34名であった。

### 4-2-2 検体採取

血中のプロラクチン濃度は気分の抑鬱あるいは高揚状

態で変化することが知られているため(58)、母親からの血液検体の採取は気分の状態の変化の少ない早朝の午前6:00から8:00の間に行なった。出産後4日目の母体血を採取後、遠心分離により血漿を分離し、測定時まで5℃で保存した。また、同日の午後における乳児への授乳直前の母乳(前乳)および授乳直後の母乳(後乳)を乳首より吸引採取し、測定時まで-30℃で保存した。

#### 4-2-3 プロラクチン濃度の測定

血漿および母乳のプロラクチン濃度はロシュ・ダイアグノスティック株式会社のエクルーシス試薬プロラクチンⅢを使用し電気化学発光免疫測定法(Electro Chemiluminescent Immunoassay :ECLIA)で測定した。

#### 4-2-4 統計処理

データはSPSS vr15 for Windowsを使用し、T-testおよびスピアマンの順位相関にて統計処理を行った。

### 4-3 結果

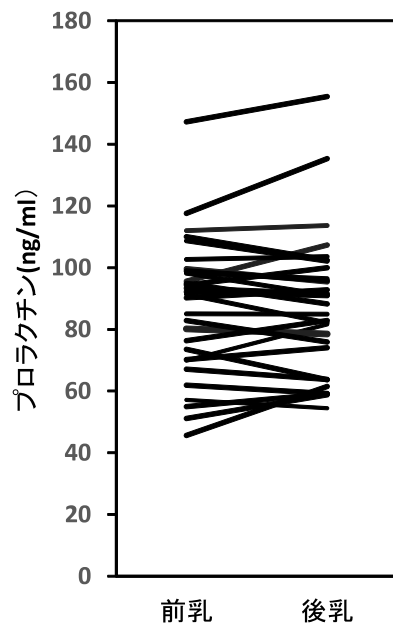
#### 4-3-1 前乳と後乳のプロラクチン濃度の比較

まず、30名の母親の前乳と後乳におけるプロラクチン濃度を測定し比較した。前乳のプロラクチン濃度は最小値が45.6 ng/mlで最大値が147.3 ng/ml、平均値は87.3 ± 22.0 ng/mlであった。後乳のプロラクチン濃度は最

小値が 54.4 ng/ml で最大値が 155.5 ng/ml、平均値は 88.1 ± 22.6 ng/ml であった。前乳、後乳ともに個体間のプロラクチン濃度にはばらつきがみられたが(図 6-A)、同一個人における前乳と後乳のプロラクチン濃度の違いは 17.7 ng/ml 以下と小さく、前乳と後乳のプロラクチン濃度は強く相関していた (R = 0.9467) (図 6-B)。そこで以後の分析には後乳を用いた。



A



B

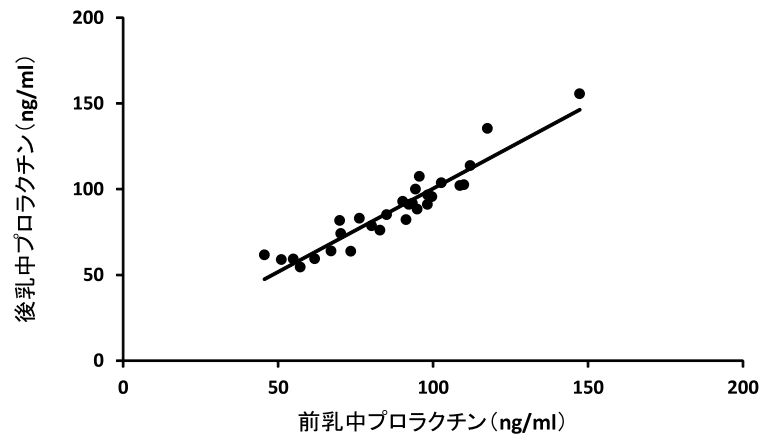


図 6. 前乳と後乳のプロラクチン濃度の比較

A: 分娩後 4 日目の 30 名の同一人の前乳と後乳のプロラクチン濃度の比較

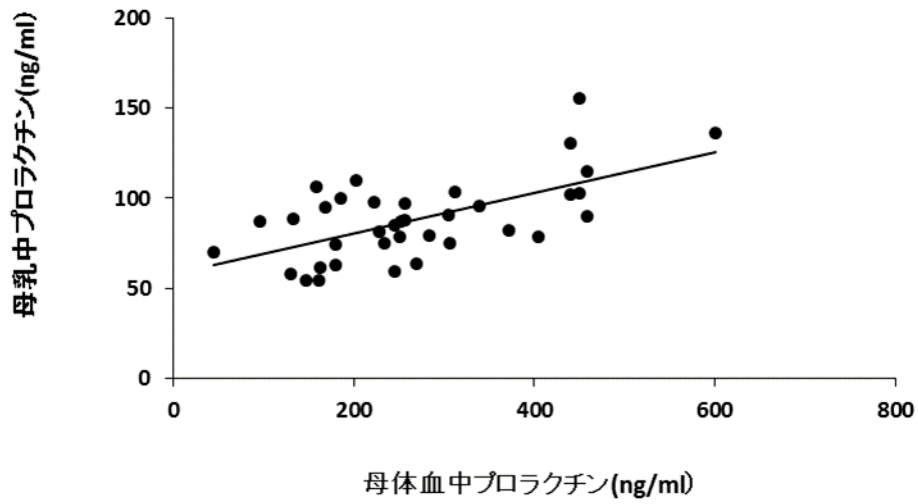
B: 前乳と後乳間のプロラクチン濃度の相関 (N=30

R=0.9467, P<0.01)

#### 4-3-2 母体血と母乳のプロラクチン濃度の相関

母体血（血漿）と母乳（後乳）のプロラクチン濃度を初産婦と経産婦に分けて測定したところ、初産婦の母体血の平均濃度は  $271.1 \pm 124.2$  ng/ml (n=37)、経産婦の平均濃度は  $296.6 \pm 161.6$  ng/ml (n=34) で、初産婦と経産婦間で有意差はなかった。また、初産婦の母乳の平均濃度は  $88.4 \pm 22.5$  ng/ml (n=37)、経産婦の平均濃度は  $86.0 \pm 26.1$  ng/ml (n=34) で、初産婦と経産婦間で有意差はなかった。母体血と母乳のプロラクチン濃度の相関を調べたところ、初産婦においては強い正の相関 ( $R=0.6229$ ) がみられ（図 7-A）、また、経産婦でも中程度の正の相関 ( $R=0.4422$ ) がみられた（図 7-B）。

A



B

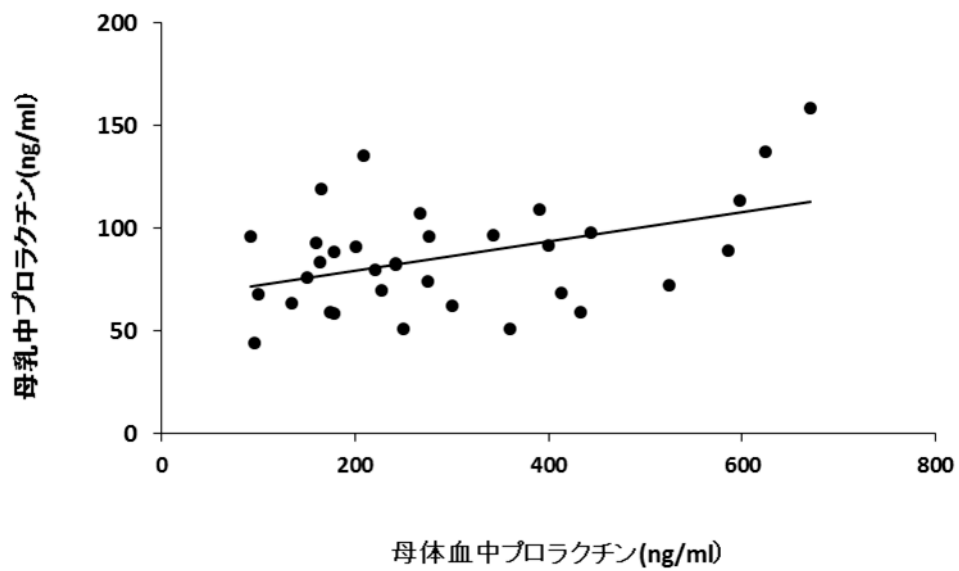


図 7. 母体血と母乳のプロラクチン濃度の相関

A: 初産婦 (N=37, R=0.6229, P<0.05)

B: 経産婦 (N=34, R=0.4422, P<0.05)

#### 4 - 4 考 察

母乳に含まれるグレリンとレプチンの濃度は同じ母親でも授乳前の前乳と授乳後の後乳で異なることが知られている(59)。しかし、プロラクチンの濃度は授乳の影響を受けず、前乳と後乳の濃度に有意な差はみられなかった。そこで以後の母乳検体には採取の容易な後乳のみを用いた。初産婦と経産婦それぞれの母体血中と後乳のプロラクチン濃度の相関を調べたところ、いずれも正の相関がみられたが、初産婦のほうが経産婦よりも相関が強かった。初産婦と経産婦で相関の強さが異なる理由は不明であるが、いずれも母体血中と後乳のプロラクチン濃度に正の相関が認められたことは、母乳中へのプロラクチンの分泌量は母体血のプロラクチン濃度が大きく影響することを意味している。

母乳哺育には乳児における感染やアトピー性疾患の予防の利点があり、また、母親においても乳がん、卵巣がんのリスクの軽減等の効果が知られている(60)。また、近年、母乳中のプロラクチンの摂取が乳児の成長後の栄養状態あるいは母性行動やストレス耐性等の脳機能に対してエピジェネティックな効果を有することが示唆されている(13,55)。本研究において母乳中のプロラクチン濃度と母体血の濃度に正の相関が認められたことより、母乳中へのプロラクチン分泌が充分でない場合の対処法として授乳期の母体におけるプロラクチン分泌を高める

ことが推奨される。脳下垂体からのプロラクチンの分泌はドーパミンにより抑制されている(5)。一方、プロラクチン分泌の促進に働く因子としては、甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン、血管作動性腸管ペプチド、オキシトシン等が知られているがいずれもその作用はそれほど強いものではない。主たるプロラクチン促進因子は未だ不明であり今後の説明が待たれる。

## 第 5 章

### 総括

動物の生殖過程を次世代を残すという意味でとらえると、哺乳動物の生殖過程は卵子の受精に始まり、胎児の母胎での発育を経て、出産後の母乳による哺育までということになる。こうした生殖過程において、出産すなわち分娩は「産みの痛み」といわれるように母親にとって陣痛という大きな痛みのストレスを被る過程である。ヒトにおける分娩時間は他の哺乳類に比べて長いため、母親のみならず胎児も子宮の収縮による圧迫ストレスを受けていると考えられるがこれまで科学的検証はなされていなかった。そこで本研究においてはストレス応答ホルモンのコルチゾールとプロラクチンに着目し、分娩所用時間と胎児のストレス度の検証をおこなうことにした。ラットやマウス等の実験動物とは異なり、ヒトにおける生体内現象の研究には必要な検体の入手に大きな制約があるが、幸い静岡県富士宮市立病院において倫理委員会の承認のもと、研究への賛同を得られた妊産婦さんから臍帯血、母体血、羊水および母乳検体の提供を受け、研究を遂行することが可能となった。

まず、第 2 章において臍帯血のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関について論じた。臍帯血は胎盤から胎児側に流れる 1 本

の静脈血と胎児側から胎盤に流れる2本の動脈血として循環している。したがって胎児（新生児）の血中濃度の分析には動脈血が適していると考えられるが、同一個体の動脈血と静脈血間においてコルチゾールとプロラクチンの濃度には大きな差は認められなかった。従っていずれの臍帯血中濃度も母体側の影響を受けず、胎児側の状況を反映していると考えられる。ついで分娩直後の臍帯血におけるコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関を調べたところ、コルチゾール濃度は自然分娩よりも吸引分娩のほうが有意に高く、また、分娩総所要時間と正の相関が認められた。中でも胎児が子宮内での圧迫を強く受ける分娩第Ⅱ期の所要時間と強い相関があった。この結果より分娩時は母体のみならず胎児もストレスを受けていると考えられる。一方、プロラクチン濃度は分娩様式による差はなかったが分娩時間と弱いながら正の相関が認められた。プロラクチンはストレスに応答して分泌の増加することが知られているが(4)、その応答が一過性であり個体ごとの測定値がばらつく可能性が大きく相関が弱いと考えられる。以上の知見により、臍帯血中のコルチゾール濃度は分娩時の胎児のストレス度の指標として有用であると考えられる。経膣分娩においては、分娩の状況によって自然分娩か補助分娩かが選択されるが、いずれの方法においても、産婦だけでなく胎児もストレスの負荷を受けている

ことが明らかになり、今後の適切な分娩方法の選択にあたり考慮されるべき知見であろう。

ついで、第3章において羊水中のコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関について論じた。胎児は羊膜腔を満たしている羊水中で発育する。妊娠中期以降の羊水の主な供給源は胎児の尿であり、羊水中に含まれるタンパク質等の成分の濃度は羊水独自の調節を受けている(31, 34)。羊水にはコルチゾールとプロラクチンも含まれ、羊水中のコルチゾール濃度は母体血の濃度と相関し、出産前の母体へのストレスにより羊水のコルチゾール濃度も増加する。羊水中のプロラクチンは子宮の脱落膜由来であり、妊娠末期の羊水中のプロラクチン濃度は母体血の濃度より10倍以上高いにもかかわらずその生理作用はよくわかっていない(40, 41)。そこで分娩直後の羊水におけるコルチゾールおよびプロラクチン濃度と分娩様式および分娩所要時間との相関を調べた。その結果、羊水中のコルチゾール濃度は臍帯血と同様吸引分娩のほうが有意に高く、分娩所要時間と正の相関が見られた。したがって、羊水のコルチゾール濃度も胎児へのストレスの強さを反映している可能性がある。近年、実験動物のラットにおいて、幼若期のストレスにより増加したコルチゾールによる脳へのエピジェネティックな作用により、成体期の行動異常の生じることが報告されている(61)。ヒトにおいても、分娩前の母親へのストレスによる羊水中のコルチゾールの増



加が、出生後の子の低体重や不安度の増加に関連するという報告がなされている(62)。したがって、分娩中の羊水中のコルチゾール濃度の過度の増加も出生後の子の脳機能発達にエピジェネティックな影響を与える可能性が考えられる。今後、羊水中へのコルチゾールの分泌経路と脳機能へのエピジェネティックな影響についてのさらなる研究が必要である。一方、羊水のプロラクチン濃度は自然分娩よりも吸引分娩のほうが有意に高かったが、分娩所要時間との相関は認められなかった。羊水中のプロラクチンは母体における子宮の脱落膜由来であるが、脱落膜におけるプロラクチン分泌のストレス応答性については不明である。羊水における高濃度のプロラクチンの分泌調節機構および生理作用の解明のためのさらなる研究が必要である。

最後に第4章において授乳期の母体血と母乳中のプロラクチン濃度の相関について論じた。哺乳動物の母乳中には種々のホルモンが分泌されている。特にプロラクチンの分泌量は授乳期の母体血に匹敵するほど高く、その一部は乳児の体内に取り込まれ循環血中に移行していることが知られていたが母乳中のプロラクチンの生理的役割は不明であった。近年、ラットにおいて母乳中のプロラクチンが成体期の脳機能発達に影響することが報告され、その生理作用が注目されるようになった。母乳中のプロラクチンは乳腺において母体血から移行するとされているが、母体血と母乳中のプロラクチン濃度の相関は

よくわかっていなかった。そこで本研究において、その相関を解析したところ、授乳期の母体血と母乳中のプロラクチン濃度には正の相関が認められた。この知見は母体血中のプロラクチン濃度を高めれば母乳中のプロラクチン濃度も高まることを意味するものである。母乳中のプロラクチンは乳児の成長後の栄養状態や脳機能に対しエピジェネティックな作用を及ぼすことが示唆されており、母乳哺育が推奨されてきている（53-59）。しかし母親の母乳の分泌量が不足する場合もあり、粉ミルクとの混合哺育も頻繁におこなわれる。今後母乳中のプロラクチンの生理的重要性がさらに明らかになれば、母体におけるプロラクチン分泌の促進因子の解明が重要となる。ヒトにおける脳下垂体前葉からのプロラクチン分泌の促進因子としては甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンが知られるが、その作用はそれほど強いものではなく、プロラクチン分泌の促進を主とする因子は未だ発見されていない。母乳の分泌不足の改善にプロラクチンの投与が考えられるが、プロラクチンには過剰症として免疫機能の亢進作用によるアレルギー疾患の悪化やゴナドトロピン分泌不全による不妊の誘発が知られており、プロラクチンの直接投与は副作用のリスクが大きい。したがって、母乳の分泌不足を改善し、母乳哺育を推進するためには、プロラクチン分泌を促進する因子の解明がなされ、リスクの少ない改善方法の開発が待たれる。

以上のように、本研究において、ヒトの分娩時の臍帯血、羊水、母体血および母乳におけるコルチゾールとプロラクチン濃度の測定と解析を行なうことにより、分娩時間の長さや胎児へのストレスの強さとの相関ならびに母体血と母乳間のプロラクチン濃度の相関を明らかにすることができた。これらの知見は今後のヒトにおける分娩と哺乳のあり方についての有用な知見となることが期待される。

## 謝 辞

はじめに私を、社会人学生として受け入れて下さいました日本獣医生命科学大学に厚くお礼を申し上げます。

本研究は、研究の参加に同意し貴重な検体を快く提供していただきました産婦の皆さま、また検体採取にご協力していただきました病院スタッフの皆さまのご理解とご協力なくしては行うことができませんでした。

私を社会人学生として受け入れ、時間の制約のある中でもご丁寧なご指導をいただきました日本獣医生命科学大学動物生理制御学教室の田中実先生に心よりの敬意と感謝をいたします。

貴重なご意見やアドバイスをいただきました對馬宣道先生、中尾暢宏先生、実験の協力や相談にのっていただいた大学院生、学部生の皆様に深く感謝いたします。

## 参考文献

1. Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1995; 771: 1-18.
2. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 1990; 46: 1407-1420.
3. Meyerhoff JL, Oleshansky MA, Mougey EH. Psychologic stress increases plasma levels of prolactin, cortisol, and POMC-derived peptides in man. *Psychosom. Med.* 1988; 50:295-303.
4. Fujikawa T, Soya H, Yoshizato H, Sakaguchi K, Doh-Ura K, Tanaka M, Nakashima K. Restraint stress enhances the gene expression of prolactin receptor long form at the choroid plexus. *Endocrinology* 1995; 136: 5608-5613.
5. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol. Rev.* 2000; 80: 1523-1631.
6. 田中実、藤川隆彦、中島邦夫 プロラクチンによる哺育行動誘導およびストレス性胃潰瘍予防作用の分子

基盤. 蛋白質・核酸・酵素 2000; 45: 346-354

7. Mukherjee TK, Roth M, Recht L, Sirmans MF, Batts JA Jr. Significance of amniotic fluid corticosteroid levels in human pregnancies. *Obstet. Gynecol.* 1977;49:144-147.
8. Riddick DH, Kusmik WF. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1977; 127: 187-190.
9. Riddick DH, Luciano AA, Kusmik WF, Maslar IA. De novo synthesis of prolactin by human decidua. *Life Sci.* 1978; 23: 1913-1921.
10. Forsyth IA, Taylor JA, Gabai G, Fleet IR. Blood prolactin concentrations affect prolactin transfer into goat milk: implications for maintenance of lactation. *J. Endocrinol.* 1995; 146: 411-420.
11. Ollivier-Bousquet M: Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 1998; 3: 303-313.
12. Melo AI, Pérez-Ledezma M, Clapp C Arnold E, Rivera JC, Fleming AS. Effects of prolactin deficiency during the early postnatal period on the

- development of maternal behavior in female rats: mother's milk makes the difference. *Horm. Behav.* 2009; 56: 281-291.
13. de Moura EG, Bonomo IT, Nogueira-Neto JF de Oliveira E, Trevenzoli IH, Reis AM, Passos MC, Lisboa PC. Maternal prolactin inhibition during lactation programs for metabolic syndrome in adult progeny. *J. Physiol.* 2009; 587: 4919-4929.
14. Niven C, Murphy-Black T. Memory for labor pain: A review of the literature. *Birth* 2000; 27: 244-53.
15. Benfield RD1, Newton ER, Tanner CJ, Heitkemper MM. Cortisol as a biomarker of stress in term human labor: physiological and methodological issues. *Biol. Res. Nurs.* 2014 16: 64-71.
16. Gala RR. The physiology and mechanisms of the stress-induced changes in prolactin secretion in the rat. *Life Sci.* 1990; 46: 1407-20.
17. Gitau R1, Menson E, Pickles V, Fisk NM, Glover V, MacLachlan N. Umbilical cortisol levels as an indicator of the fetal stress response to assisted

- vaginal delivery. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2001; 98: 14-7.
18. Goldkrand JW, Schulte RL, Messer RH. Maternal and fetal plasma cortisol levels at parturition. Obstet. Gynecol. 1976; 47:41-5.
19. Leong MK, Murphy BE. Cortisol levels in maternal venous and umbilical cord arterial and venous serum at vaginal delivery. Am. J. Obstet. Gynecol. 1976; 124: 471-3.
20. Sybulski S, Maughan GB. Cortisol levels in umbilical cord plasma in relation to labor and delivery. Am. J. Obstet. Gynecol. 1976; 125: 236-8.
21. Kauppila A, Koivisto M, Pukka M, Tuimala R. Umbilical cord and neonatal cortisol levels. Effect of gestational and neonatal factors. Obstet. Gynecol. 1978; 52: 666-72.
22. Taylor A, Fisk N.M, Glover V. Mode of delivery and subsequent stress response. Lancet. 2000; 355: 120.
23. R. Gitau, E. Menson, V. Pickles, N.M. Fisk, V. Glover, N. MacLachlan. Umbilical cortisol levels as an indicator of the fetal stress response to



- assisted vaginal delivery. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2001; 98: 14-7
24. Mears K, McAuliffe F, Grimes H, Morrison JJ. Fetal cortisol in relation to labour, intrapartum events and mode of delivery. J. Obstet. Gynaecol. 2004; 24: 129-132
25. Vogl S.E, Worda C, Egarter C, Bieglmayer C, Szekeres T, Huber J, Husslein P. Mode of delivery is associated with maternal and fetal endocrine stress response. BJOG: Int. J. Obstet. Gynaecol. 2006; 113: 441-445.
26. Procianoy RS, Cecin SK, Pinheiro CE. Umbilical cord cortisol and prolactin levels in preterm infants. Relation to labor and delivery. Acta Paediatr. Scand. 1983; 72: 713-716.
27. Lao TT1, Panesar NS. The effect of labour on prolactin and cortisol concentrations in the mother and the fetus. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 1989; 30: 233-238.
28. Posaci C1, Guney M, Erata YE, Demir N, Onvural A. Stress hormones and acid-base status in human

- fetuses at term delivery: the effect of delivery method. J. Pak. Med. Assoc. 1996; 46:123-126.
29. Messinis IE1, Tsirkas N, Diamantis K, Vasakos S, Tsolas O, Lolis D. Effect of cimetidine on maternal and fetal prolactin secretion during labor. J. Endocrinol. Invest. 1988;11:785-788.
30. Kohno H, Furuhashi N, Fukaya T, Shinkawa O, Tachibana Y, Suzuki M. Serum cortisol levels in maternal venous, umbilical arterial and umbilical venous blood at delivery in the cases of fetal distress. Tohoku J. Exp. Med. 1984;144:299-304.
31. Tong XL1, Wang L, Gao TB, Qin YG, Qi YQ, Xu YP. Potential function of amniotic fluid in fetal development-novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestation. J. Chin. Med. Assoc. 2009; 72: 368-373.
32. Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. J. Perinatol. 2005; 25: 341-348.

33. Ackerman WET, Rovin BH, Kniss DA. Epidermal growth factor and interleukin-1beta utilize divergent signaling pathways to synergistically upregulate cyclooxygenase-2 gene expression in human amnion-derived WISH cells. *Biol. Reprod.* 2004;71: 2079-2086.
34. Tisi DK, Liu XJ, Wykes LJ, Skinner CD, Koski KG. Insulin-like growth factor II and binding proteins 1 and 3 from second trimester human amniotic fluid are associated with infant birthweight. *J. Nutr.* 2005; 135: 1667-1672.
35. Chow SS, Craig ME, Jones CA, Hall B, Catteau J, Lloyd AR, Rawlinson WD. Differences in amniotic fluid and maternal serum cytokine levels in early midtrimester women without evidence of infection. *Cytokine* 2008; 44: 78-84.
36. Glover, V., Bergman, K., Sarkar, P., O' Connor, T.G., Association between maternal and amniotic fluid cortisol is moderated by maternal anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 2009; 34: 430-435.

37. Baibazarova E, van de Beek C, Cohen-Kettenis PT, Buitelaar J, Shelton KH, van Goozen SH. Influence of prenatal maternal stress, maternal plasma cortisol and cortisol in the amniotic fluid on birth outcomes and child temperament at 3 months. *Psychoneuroendocrinology*. 2013; 38: 907-915.
38. Riddick DH, Kusmik WF. Decidua: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1977; 127: 187-190.
39. Riddick DH, Luciano AA, Kusmik WF, Maslar IA. De novo synthesis of prolactin by human decidua. *Life Sci*. 1978; 23: 1913-1921.
40. Schenker JG, Ben-David M, Polishuk WZ. Prolactin in normal pregnancy: relationship of maternal, fetal, and amniotic fluid levels. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975; 123: 834-838.
41. Taga M., Studies on the intercompartmental relationship of PRL secretion during human pregnancy. 1982; 34: 709-718.
42. Ohana E, Mazor M, Chaim W, Levy J, Sharoni Y, Leiberman JR, Glezerman M. Maternal plasma and amniotic fluid cortisol and progesterone

- concentrations between women with and without term labor. A comparison. *J. Reprod. Med.* 1996;41:80-86.
43. Nagasawa H. Physiological significance of hormones and related substances in milk with special reference to prolactin: An Overview. *Endoc. Regul.* 1991; 25: 90-97.
44. Hamosh M. Bioactive factors in human milk. *Clin. North Am.* 2001; 48: 69-86.
45. Savino F, Liguori SA. Update on breast milk hormones: leptin, ghrelin and adiponectin. *Clin. Nutr.* 2008; 27: 42-47.
46. Savino F, Fissore MF, Liguori SA, Oggero R. Can hormones contained in mothers' milk account for the beneficial effect of breast-feeding on obesity in children? *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. 2009; 71: 757-765.
47. Grosvenor CE, Whitworth NS. Incorporation of rat prolactin into rat milk in vivo and in vitro. *J. Endocrinol.* 1976; 70: 1-9.
48. Whitworth NS, Grosvenor CE. Transfer of milk prolactin to the plasma of neonatal rats by

- intestinal absorption. J. Endocrinol. 1978; 79: 191-199.
49. Forsyth IA, Taylor JA, Gabai G, Fleet IR. Blood prolactin concentrations affect prolactin transfer into goat milk: implications for maintenance of lactation. J. Endocrinol. 1995; 146: 411-420.
50. Ollivier-Bousquet M: Transferrin and prolactin transcytosis in the lactating mammary epithelial cell. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia. 1998; 3: 303-313.
51. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR. Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. J. Endocrinol. 2007; 192: 339-344.
52. Bonomo IT, Lisboa PC, Passos MC. Alves SB, Reis AM, de Moura EG. Prolactin inhibition at the end of lactation programs for a central hypothyroidism in adult rat. J. Endocrinol. 2008; 198: 331-337.
53. Lisboa PC, Pires L, de Oliveira E, Lima NS, Bonomo IT, Reis AM, Passos MC, Moura EG. Prolactin

inhibition at mid-lactation influences adiposity and thyroid function in adult rats. *Horm. Metab. Res.* 2010; 42: 562-569

54. Fraga MC, Moura EG, Silva JO, Bonomo IT, Filgueiras CC, Abreu-Villaça Y, Passos MC, Lisboa PC, Manhães AC. Maternal prolactin inhibition at the end of lactation affects learning/memory and anxiety-like behaviors but not novelty-seeking in adult rat progeny. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2011; 100: 165-173.

55. Bonomo IT, Lisboa PC, Pereira AR, Passos MC, de Moura EG. Prolactin inhibition in dams during lactation programs for overweight and leptin resistance in adult offspring. *J. Endocrinol.* 2007; 192: 339-344.

56. Healy DL, Rattigan S, Hartmann PE, Herington AC, Burger HG. Prolactin in human milk: correlation with lactose, total protein, and alpha-lactalbumin levels. *Am. J. Physiol.* 1980; 238: E83-586.

57. Tyson JE, Hwang P, Guyda H, Friesen HG. Studies of prolactin secretion in human pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1972; 113: 14-20.
58. Turner RA, Altemus M, Yip DN, Kupferman E, Fletcher D, Bostrom A, Lyons DM, Amico JA. Effects of emotion on oxytocin, prolactin, and ACTH in women. *Stress.* 2002; 5: 269-276.
59. Karatas Z, Durmus Aydogdu S, Dinleyici EC, Colak O, Dogruel N. Breastmilk ghrelin, leptin, and fat levels changing foremilk to hindmilk: is that important for self-control of feeding? *Eur. J. Pediatr.* 2011;170:1273-1280.
60. Gartner LM, Morton J, Lawrence RA, Naylor AJ, O'Hare D, Schanler RJ, Eidelman AI. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics.* 2005; 115: 496-506.
61. Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D'Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci.* 2004;7:847-854



62. Davis EP, Glynn LM, Waffarn F, Sandman CA. Prenatal maternal stress programs infant stress regulation. *J Child Psychol Psychiatry*. 2011;52:119-129.

Studies on cortisol and prolactin concentrations in  
umbilical cord blood, amniotic fluid, maternal blood,  
and breast milk related to perinatal factors

Summary of the thesis

Doctoral Course of Applied Life Science, Graduate School  
of Veterinary Medicine and Life Science, Nippon  
Veterinary and Life Science University

Yoko Sano

(Supervisor: Minoru Tanaka)

## **Chapter 1: Introduction**

Prolactin is known as a hormone that promotes the production of breast milk in mammals. In addition, prolactin shows a variety of physiological functions such as induction of maternal behavior, enhancement of stress tolerance, osmoregulation, and immune regulation. Cortisol is an adrenocortical hormone which regulates energy metabolism. The level of cortisol increases in response to stress. During the delivery, mother undergoes labour pain stress. The fetus is also thought to be undergoing high stress by uterine contractions during the delivery. In this study, based on the stress response of prolactin and cortisol, the correlations between the concentrations of both hormones in umbilical cord blood and amniotic fluids were studied during delivery. In lactation period, prolactin is secreted with high concentration in breast milk as well as maternal blood. It has recently been reported that breast milk prolactin taken at neonatal stage affects on the maternal behavior and stress tolerance at adult stage in rats, suggesting importance of physiological role of the breast milk. In human, however, relationship of prolactin concentrations in mothers' blood and breast milk is not known. In this study, the relationships between the prolactin concentrations in mothers' blood and breast milk were also

studied.

This study was reviewed and approved by the ethics committee at Fujinomiya City General Hospital in Shizuoka prefecture. The subjects also signed a consent form after receiving an oral explanation and written documents regarding the study.

## **Chapter 2: Correlations of cortisol and prolactin levels in umbilical cord blood with the modes of delivery and delivery duration**

Umbilical cord blood was collected after vaginal delivery and plasma was separated by centrifugation. The concentration of cortisol was determined by Radioimmunoassay using Cortisol kit: FTA (TFB). The concentration of prolactin was measured by Electro Chemiluminescent Immunoassay using ECLusys Prolactin III kit (Roche-diagnostics). All statistical analyses were performed by Spearman's rank correlation coefficient test using SPSS v15 for Windows.

In human, delivery consists of three stages. The first stage is the period from the beginning of regular uterine contractions until full cervical dilation; the second stage is from full cervical dilation to the birth of a neonate, and the third stage is from the birth to completion of expulsion of the umbilical cord, placenta and foetal membrane. First,

relationship between delivery modes and cortisol and prolactin concentrations in the umbilical cord blood were examined. The cortisol concentration, but not prolactin concentration, of the vacuum-assisted delivery group was significantly higher than that of the spontaneous delivery group. Since vacuum-assisted delivery is employed in difficult delivery, neonate may suffer from stronger stress during the delivery. Then, the correlations between cortisol concentrations and delivery duration among the spontaneous delivery groups were analysed. Positive correlations were observed between cortisol concentration and duration of full delivery with stronger extent during the second phase of parturition. These findings suggest that fetuses suffer from the stress caused by uterine contraction during delivery. On the other hand, the prolactin concentration showed no significant correlation with the duration of delivery. Since stress response of prolactin is temporal, individual prolactin levels in cord blood may fluctuate during delivery.

### **Chapter 3: Correlations of cortisol and prolactin concentrations in amniotic fluid with the modes of delivery and delivery duration**

Umbilical fluid was collected at spontaneous or artificial membrane rupture during delivery.

Concentrations of cortisol and prolactin were determined by the methods described in Chapter 2. Both the cortisol and prolactin concentrations in amniotic fluid of the vacuum-assisted delivery group were significantly higher than those of the spontaneous delivery group. There was a positive correlation between the cortisol concentration in amniotic fluid and the duration of delivery as observed in the umbilical cord blood, whereas, prolactin concentration showed no correlation with the duration of delivery. The origin of cortisol in the amniotic fluid is considered to be the urine of the fetuses and therefore, the increase of cortisol concentration may reflect the stress response of fetuses during delivery. Prolactin in the amniotic fluid derived from endometrial decidua where stress response of prolactin is unclear.

#### **Chapter 4: Correlation of prolactin concentrations between maternal plasma and breast milk**

Prolactin concentrations in breast milk are markedly increased during the first few days after delivery. Although prolactin is known to be transferred from maternal blood to breast milk, the correlation between prolactin concentration in breast milk and those in maternal blood is not clear. In this study, we investigated the correlation between prolactin concentrations in maternal blood and

breast milk collected 4 days after the delivery. First, prolactin concentrations in foremilk collected before breast milk feeding were compared with those in hindmilk collected after breast milk feeding. There was no significant difference in prolactin concentrations between foremilk and hindmilk. Then, prolactin concentrations in maternal plasma were compared with those in hindmilk of primiparas and multiparas. There was a positive correlation between prolactin concentrations in plasma and hindmilk, with a stronger correlation in primiparas than in multiparas. Breastfeeding is known to have many benefits such as enhancement of immune function in neonate, decrease of the risk of atopic diseases, and mortality in infants, and decrease breast and ovarian cancer risk in mother. In addition, recent reports have demonstrated the epigenetic effects of breast milk prolactin on the nutritional status and brain function of adult offspring. Therefore, it is important to clarify the maternal factors affecting prolactin concentration in breast milk.

## **Chapter 5: Overall recapitulation**

In this study, we first examined the relationship between delivery modes and cortisol and prolactin concentrations in the umbilical cord blood. The cortisol concentration was significantly higher in the vacuum-assisted delivery than

in the spontaneous delivery and positively correlated with the duration of delivery, with higher extent during the second phase of parturition. These findings suggest that fetuses as well as mothers suffer from the stress caused by uterine contraction during delivery. On the other hand, the prolactin concentration showed neither significant correlation with the duration of full delivery nor the second stage of delivery. Since the stress response of prolactin is temporal, individual prolactin concentrations in cord blood may fluctuate.

Cortisol concentration in amniotic fluid of the vacuum-assisted delivery group was significantly higher than those of the spontaneous delivery group. There was a positive correlation between the concentration of cortisol in amniotic fluid and the duration of parturition as observed in the umbilical cord blood. The origin of cortisol in the amniotic fluid is considered to be the urine of the fetus, and therefore, the increase of cortisol concentration may reflect the stress response of fetus during delivery. Prolactin concentration in amniotic fluid of the vacuum-assisted delivery group was significantly higher than those of the spontaneous delivery group but no correlations was observed between the prolactin concentration and the duration of delivery. Prolactin in the amniotic fluid is derived from endometrial decidua where



stress response of prolactin is unclear.

There was a positive correlation between prolactin concentrations in plasma and hindmilk supporting that prolactin in breast milk is mother-blood origin. Recent reports suggest epigenetic effects of breast milk prolactin on the nutritional status and brain function of adult offspring. Therefore, it is important to clarify the maternal factors affecting on prolactin concentrations in breast milk.