

- H., Matsushima, A., Shimohigashi, Y., 2006. Endocrine disruptor bisphenol A strongly binds to human estrogen-related receptor gamma (ERRgamma) with high constitutive activity. *Toxicol Lett* 167, 95-105.
- Wang, L., Andersson, S., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2003. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 703-708.
- Xu, L.C., Sun, H., Chen, J.F., Bian, Q., Qian, J., Song, L., Wang, X.R., 2005. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216, 197-203.
- Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M., 2005. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 383, 638-644.
- Yoshida, M., Shimomoto, T., Katashima, S., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A., 2004. Maternal exposure to low doses of bisphenol a has no effects on development of female reproductive tract and uterine carcinogenesis in Donryu rats. *J Reprod Dev* 50, 349-360.
- Zsarnovszky, A., Belcher, S.M., 2001. Identification of a developmental gradient of estrogen receptor expression and cellular localization in the developing and adult female rat primary somatosensory cortex. *Brain Res Dev Brain Res* 129, 39-46.

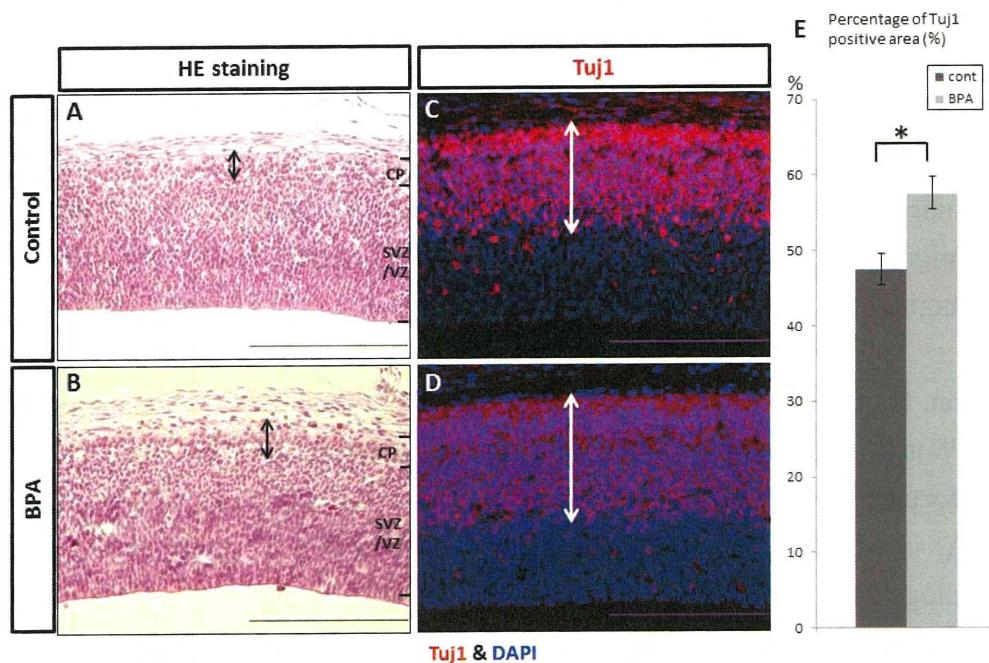


Figure 1

BPAの胎児期曝露は皮質板の過形成と神経新生の促進を誘導する  
 胎生14.5日の対照群(A)とBPA曝露群(B)胎児の終脳矢状断切片に対してHE染色を  
 行った。BPA曝露群で皮質板の過形成が認められた(黒矢印)。同じ切片を用いてanti-  
 neuron specific class III beta tubulin (Tuj1)の免疫組織染色を行った(C, D)ところ、  
 BPA曝露群で陽性領域が拡張していた(E, BPA: 57.6 ± 2.11% 対照: 47.5 ± 2.09%  
 P<0.05)。Scale bar=200 μm

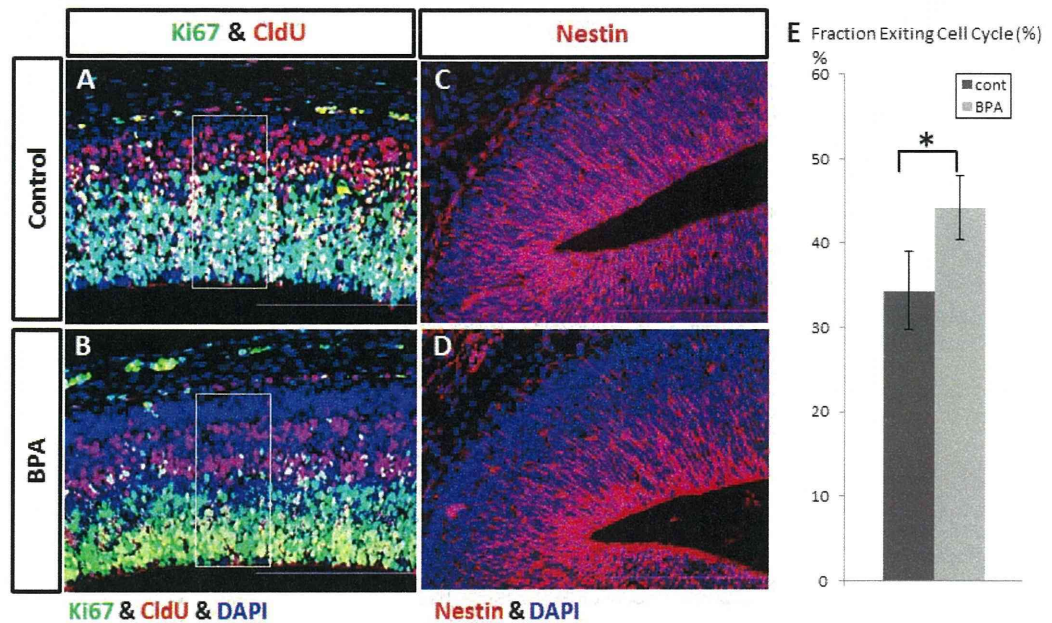


Figure 2

### BPAの胎児期曝露はCell cycle exitを促進し、神経幹・前駆細胞の数を減少させる

神経幹・前駆細胞のCell cycle exitを解析するために、胎生14.5日の胎児にCldUを投与し、24時間後にサンプリングした個体に対して、anti-Ki67とanti-CldUの免疫組織染色を行った(対照:A, BPA:B)。Cell cycle exitの割合を比較するために、すべてのCldU陽性細胞(赤+黄)における細胞周期を出た細胞(赤, CldU+/Ki67-)の割合を算出した。細胞は、100  $\mu$ mの幅の領域(白枠)で行い、BPA曝露群で増加していた(対照:34.3 $\pm$ 4.7% BPA:44.1 $\pm$ 3.8% P<0.01)。胎生14.5日の胎児終脳の矢状断に対して、anti-Nestinを用いた免疫組織染色を行った。Nestin陽性の放射状突起はBPA曝露群で対照群と比べ、縮小していた。Scale bar=200  $\mu$ m

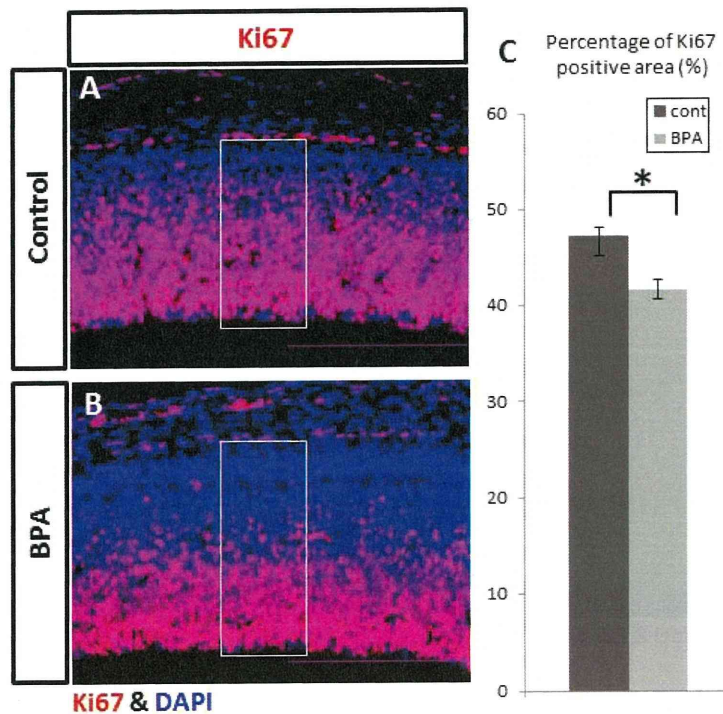


Figure 3

### BPA曝露によって終脳背側における神経幹・前駆細胞の細胞増殖は抑制される

胎生14.5日の胎児終脳に対してanti-Ki67の免疫組織染色を行った(対照:A BPA:B)。Ki67は終脳背側のSVZ/VZの増殖中の細胞に発現しており、100 μm幅の領域(白枠)で陽性細胞の割合を比較した。BPA曝露群で陽性細胞の割合が減少していた(対照:47.2±1.0% BPA:41.6±1.0% P<0.01)。Scale bar=200 μm

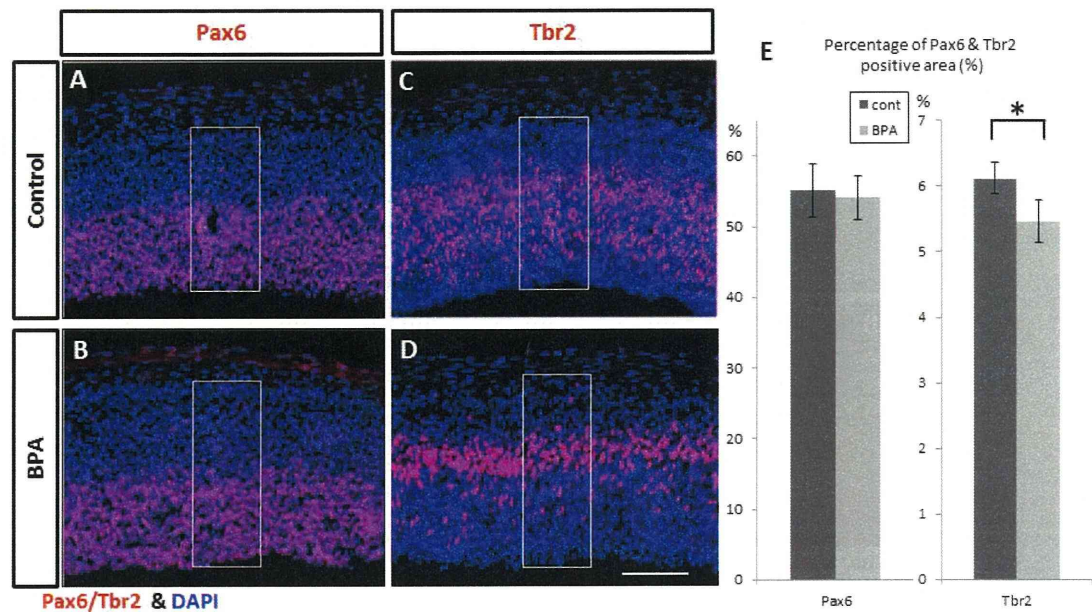


Figure 4

### BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞を減少させるが、放射状グリアには影響しない

胎生14.5日の胎児終脳の冠状断切片に対してanti-Pax6(A, B)とanti-Tbr2(C, D)を用いた免疫組織染色を行った。VZに局在する放射状グリアはPax6陽性であり、SVZにおけるTbr2陽性細胞は中間前駆細胞である。陽性細胞の数を100 μmの幅(白枠)で定量したところ、Pax6陽性の放射状グリアの数には影響はみられなかったが(E, 対照: 55.1 ± 3.8% BPA: 54.1 ± 3.1%)、Tbr2陽性の中間前駆細胞の数が明らかに減少していた(E, 対照: 6.12 ± 0.24% BPA: 5.46 ± 0.32% P < 0.05)。Scale bar = 200 μm

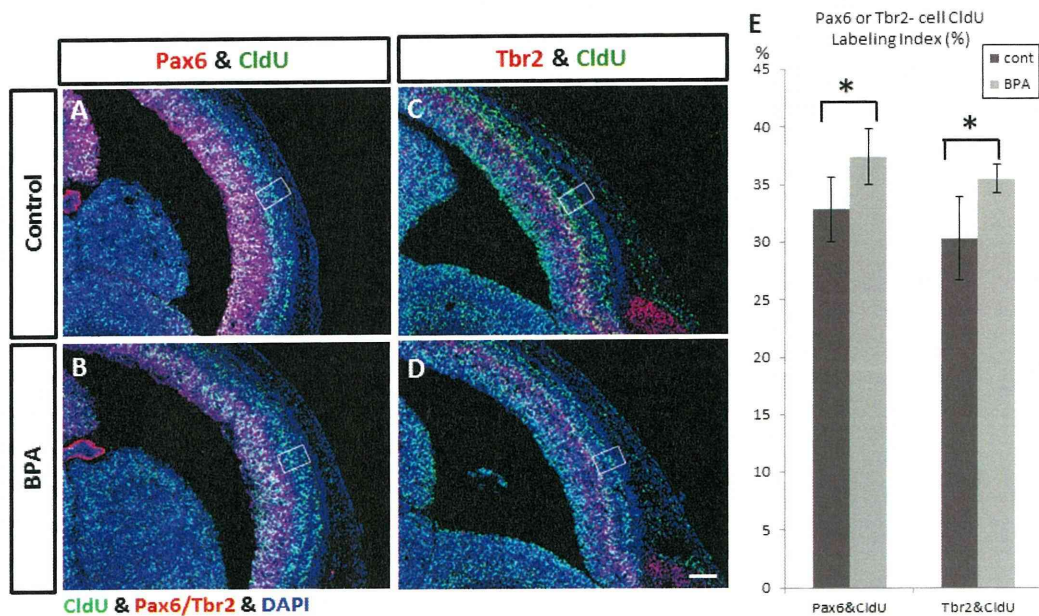


Figure 5

BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞と放射状グリアの分化を促進するRGCとIPCの分化について解析するために、サンプリングの24時間前にCldUを投与し、胎生14.5日の胎児終脳の矢状断切片に対してanti-Pax6とanti-CldU (A, B)、anti-Tbr2とanti-CldU (C, D)の二重染色を行った。RGCから分化した細胞はCldU陽性かつPax6陰性で緑色に染色された細胞、IPCから分化した細胞はCldU陽性かつTbr2陰性で緑色に染色された細胞として区別することができる。陽性細胞の数を100  $\mu$ mの幅(白枠)でSVZ (RGCの場合)とSVZの上層で定量したところ、RGCにおいても(E 対照: 32.8 $\pm$ 2.89% BPA: 37.4 $\pm$ 2.4% P<0.01)、IPCにおいても(E 対照: 30.3 $\pm$ 3.7% BPA: 35.7 $\pm$ 1.2% P<0.01)増加した。Scale bar=200  $\mu$ m

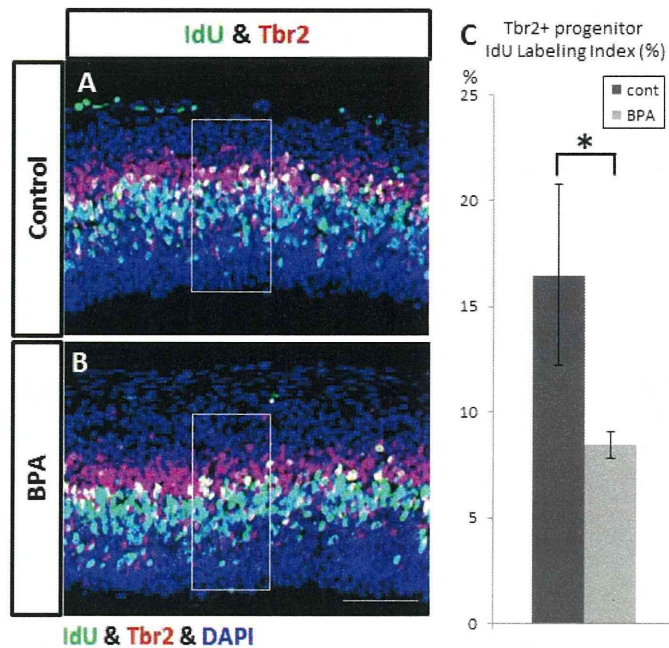


Figure 6

### BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞の細胞周期を延長する

IPCの細胞周期の長さについて解析するために、サンプリングの1時間前にIdUを投与し、胎生14.5日の胎児終脳の矢状断切片に対して、anti-Tbr2とanti-IdU (A, B)の二重染色を行った。IPCの細胞周期の長さはTbr2陽性細胞におけるIdUとTbr2の共発現している細胞の割合で比較することができる。この割合が小さくなるほど細胞周期は長くなっていることを示す。陽性細胞の数を100  $\mu$ mの幅(白枠)で定量したところ、BPA曝露群において細胞周期が長くなっていることが明らかになった(C 対照: 16.5 $\pm$ 4.3% BPA: 8.4 $\pm$ 0.6% P<0.01)。Scale bar=200  $\mu$ m

平成23年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究  
-発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と  
それに基づく試験スキームの最適化- (H23-化学-一般-002)

-低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立-  
**1.低用量ビスフェノールAの胎児期曝露が  
誘発する大脳皮質形成異常の解析**

長尾 哲二 近畿大学理工学部 生命科学科  
駒田 致和 福井大学医学部 医学科

## 大脳皮質形成・脳機能異常の組織学的検出法の確立

低用量化学物質の胎児期/新生児期曝露が誘発する大脳皮質形成における異常

➡ ニューロン新生の異常と脳・神経機能の異常に着目した組織学的検出法

ニューロン新生の異常

- ① 細胞の増殖や生存
- ② 細胞周期
- ③ 神経分化・層構造の形成

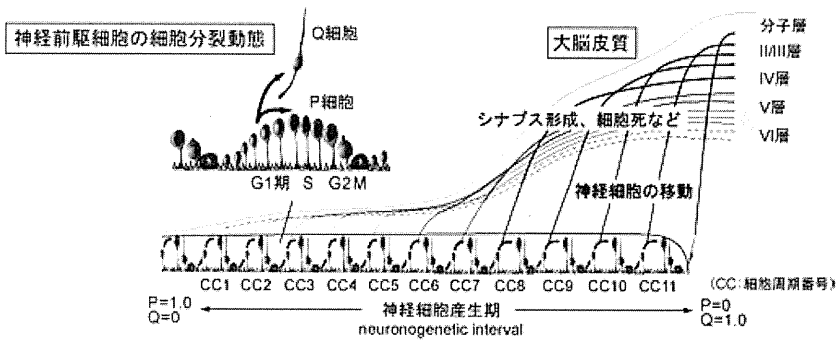
脳・神経機能の異常

- ① 神経線維の投射異常
- ② 中間前駆細胞の異常
- ③ 神経活動の異常

- 低用量化学物質の胎児期/新生児期曝露による影響を検出する組織学的評価法の確立
- 化学物質曝露モデル動物の確立  
→異常が検出された動物の表現型を解析し、ヒトへの影響の予測モデルとする



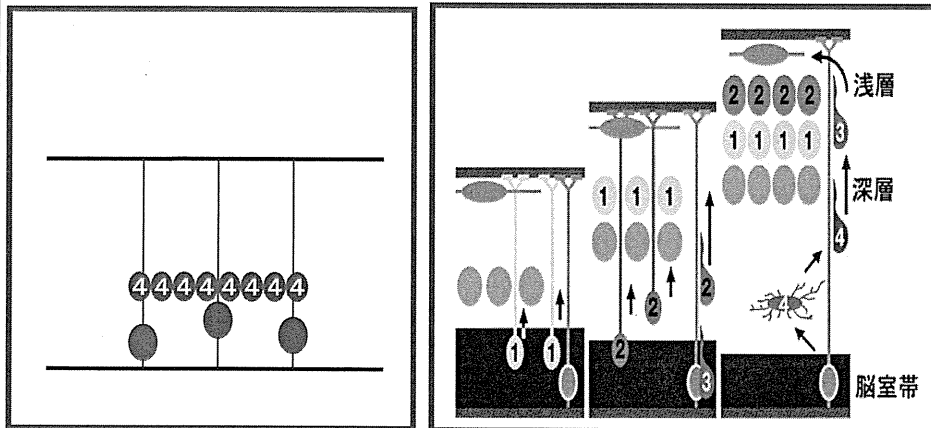
## 大脳皮質を形成するニューロンの 産生メカニズム



脳室面に局在する神経幹細胞はエレベーター運動(細胞体の上下運動)を繰り返し、適切な時期に神経細胞に分化し、脳表面に向かって移動を始める。細胞によって分裂する回数、分化するタイミングは決まっていると考えられる。

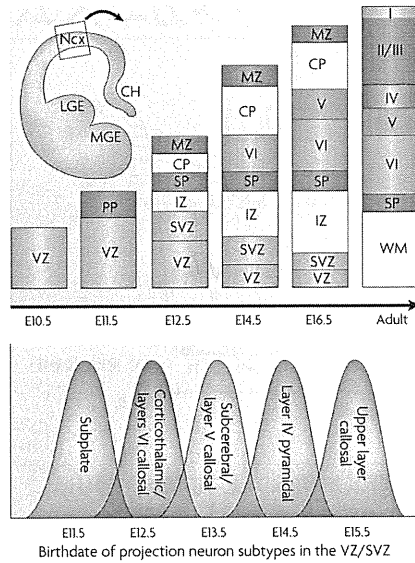
## 大脳皮質の層構造の形成メカニズム

細胞の移動様式



Inside-out: 遅く生まれた神経細胞が早く生まれた神経細胞を追い越して上層に局在する  
→大脳皮質の6層構造が形成される

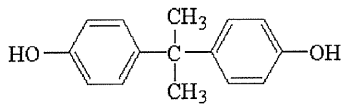
## 神経新生の時期と層構造の形成



大脳皮質を構成する神経細胞は、産まれる時期によってどの層に分布するか決定される。

Nature Reviews | Neuroscience

## 【ビスフェノール A (Bisphenol A : BPA)】



2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane  
分子式: C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>O<sub>2</sub>  
分子量: 228.29

### 【用途】

ポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂、フェノール樹脂、酸化防止剤の原料  
→ 強力洗剤での洗浄や高温の液体に接触した場合に溶出し、経口暴露の可能性がある。

カナダ、EUでは、ポリカーボネートが含まれる哺乳瓶の使用を制限

### 【体内動態】

経口で摂取するとBPAはグルクロニド抱合体となって速やかに吸収され、胎盤を介して、胎児にも移行

#### 低用量BPA胎児期暴露による影響

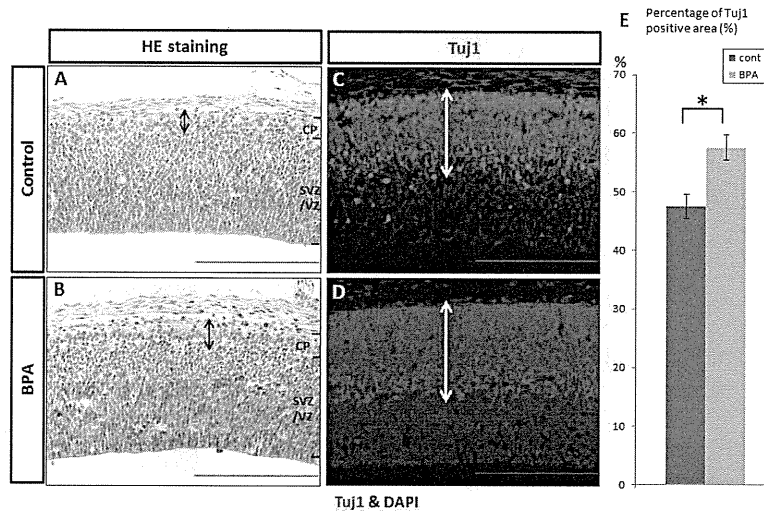
- ・雄性生殖器への影響 (前立腺、精巣上体の重量増加)
- ・行動異常(哺育行動、多動、排泄回数の増加)
- ・中枢神経系の組織構造の異常
- ・終脳における神経新生の促進
- ・大脳皮質の層構造の乱れ

#### 生殖系への影響

- ・子宮重量の減少
- ・子宮の組織構造の変化
- ・胎児体重の減少

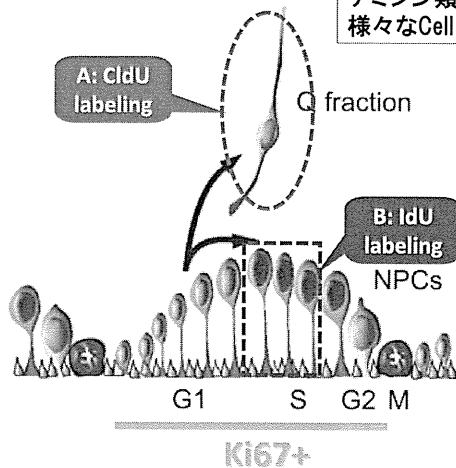
低用量BPA胎児期暴露により誘発される大脳皮質形成における神経分化制御異常について解析

## 低用量BPAの胎児期曝露は、皮質板の過形成と神経新生の促進を誘導する



## チミジン類似物質によるCell Cycle Kineticsの解析

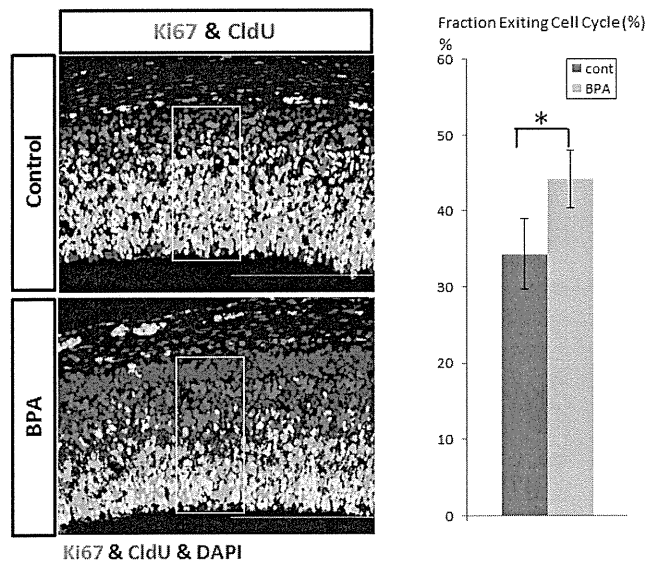
チミジン類似物質とKi67の二重染色を行うことによって様々なCell cycle kineticsを解析することが可能である。



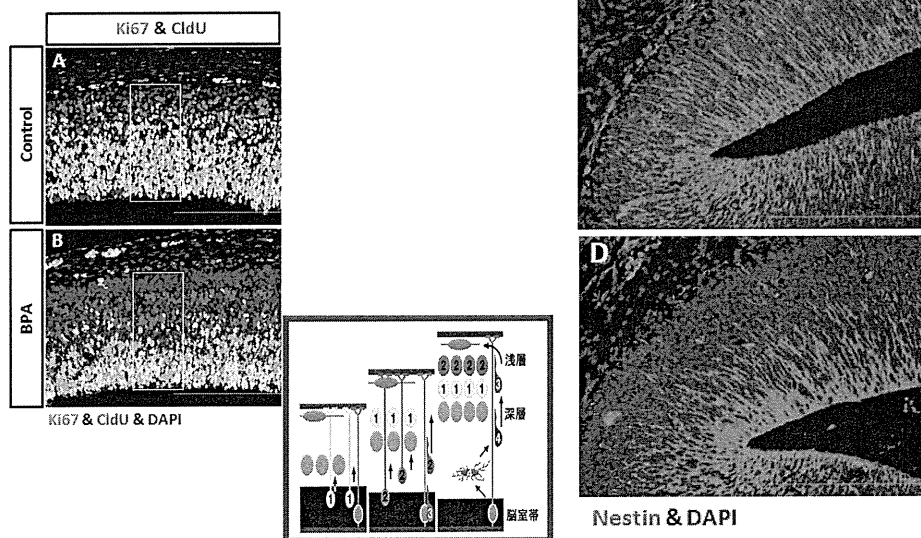
A: CldU labeling = Cell cycle exit  
細胞周期を出た(分化したニューロン)をラベルし、その割合を評価する

B: IdU labeling = Cell cycle length  
S期の細胞を特異的に検出し、細胞周期全体の細胞数と比較することで、細胞周期全体の長さを評価する

## 低用量BPAの胎児期曝露は、Cell Cycle Exitを促進する



## 低用量BPAの胎児期曝露は、放射状グリアの突起を短縮する



## 細胞の増殖・生存の評価

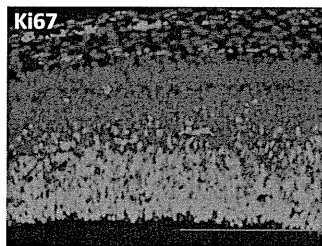
### 発生期の細胞増殖やニューロン新生

→適切な時期に適切な量の細胞が産生されることが重要

DOHaD: Developmental Origins of Health and Disease

- ・ニューロンや神経幹細胞の異常 = 精神疾患、高次脳機能障害、発達障害
- ・その他の器官の細胞の異常 = 生活習慣病

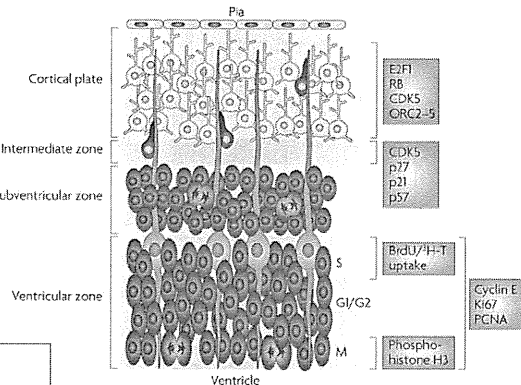
### 細胞増殖のマーカー



発生期の大腦皮質における増殖中の神経幹細胞

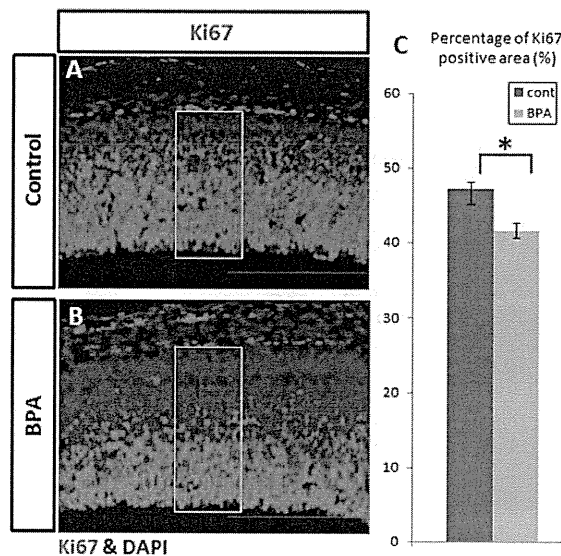
### 増殖中の細胞の検出

Ki67, Phospho histone H3、  
チミジン類似物質(BrdU、CldU、IdU)

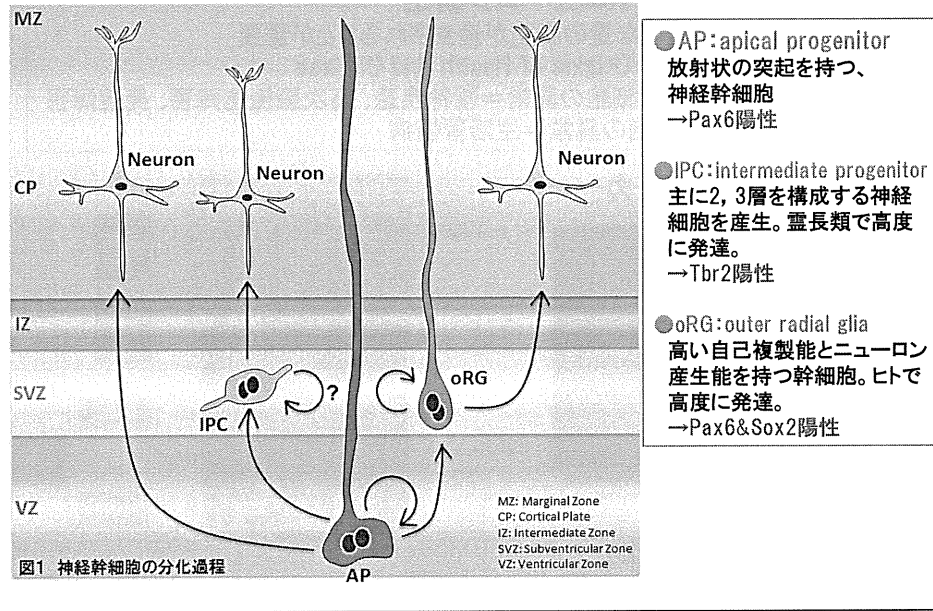


Nature Reviews | Neuroscience

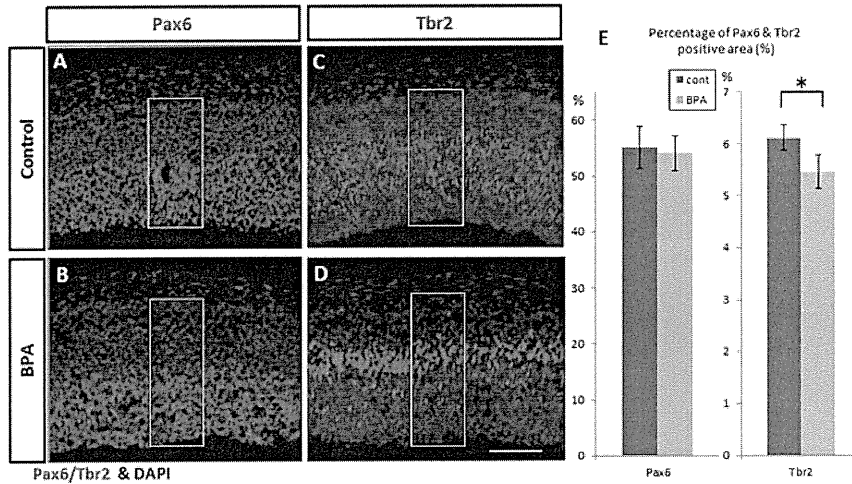
## BPA曝露によって終脳背側における神経幹・前駆細胞の細胞増殖は抑制される



# 大脳皮質を構成する神経細胞と神経幹細胞

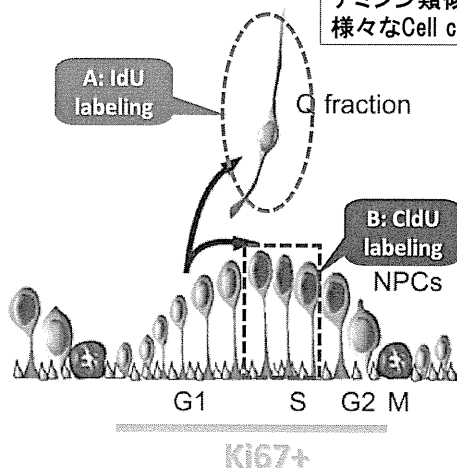


## BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞を減少させるが、放射状グリアには影響しない



## チミジン類似物質によるCell Cycle Kineticsの解析

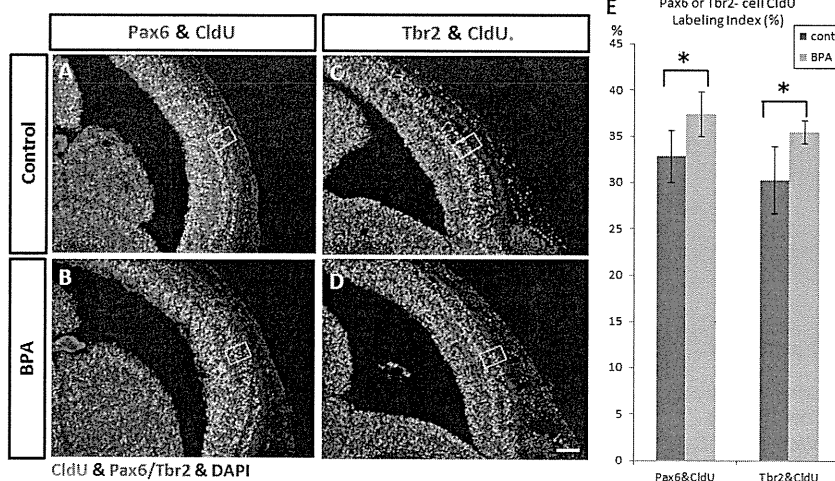
チミジン類似物質とKi67の二重染色を行うことによって様々なCell cycle kineticsを解析することが可能である。



A: IdU labeling = Cell cycle exit  
細胞周期を出た(分化したニューロン)をラベルし、その割合を評価する

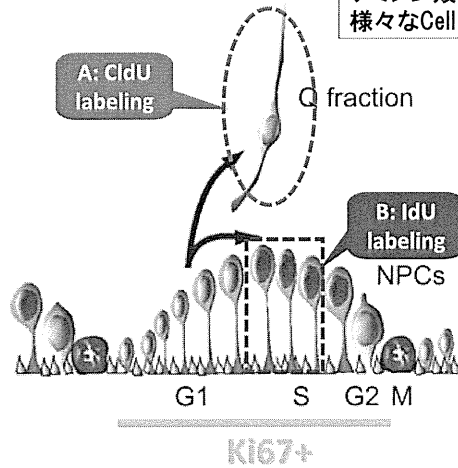
B: CldU labeling = Cell cycle length  
S期の細胞を特異的に検出し、細胞周期全体の細胞数と比較することで、細胞周期全体の長さを評価する

## BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞と放射状グリアの分化を促進する



## チミジン類似物質によるCell Cycle Kineticsの解析

チミジン類似物質とKi67の二重染色を行うことによって様々なCell cycle kineticsを解析することが可能である。



A: CldU labeling = Cell cycle exit  
細胞周期を出た(分化したニューロン)をラベルし、その割合を評価する

B: IdU labeling = Cell cycle length  
S期の細胞を特異的に検出し、細胞周期全体の細胞数と比較することで、細胞周期全体の長さを評価する

## 中間前駆細胞 intermediate progenitor cellの解析

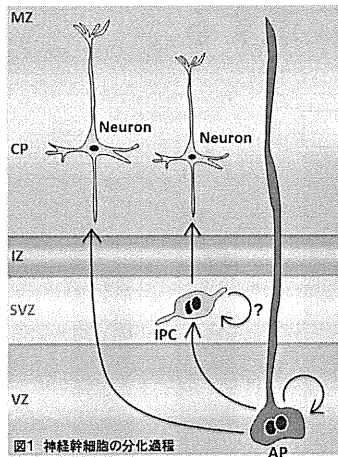


図1 神経幹細胞の分化過程

MZ: Marginal Zone  
CP: Cortical Plate  
IZ: Intermediate Zone  
SVZ: Subventricular Zone  
VZ: Ventricular Zone

大脳皮質に局在する神経前駆・幹細胞

- 放射状グリアRadial glia, Apical progenitor
- 中間前駆細胞Intermediate progenitor, Basal progenitor

→II/III層を構成するニューロンを産生

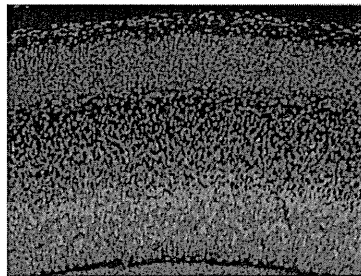
→霊長類で高度に発達=大脳皮質の進化を担う?

低用量化学物質の大脳皮質形成への影響を評価するために重要なポイント

マーカーによる染色: Tbr2

中間前駆細胞の増殖能・細胞周期の長さ

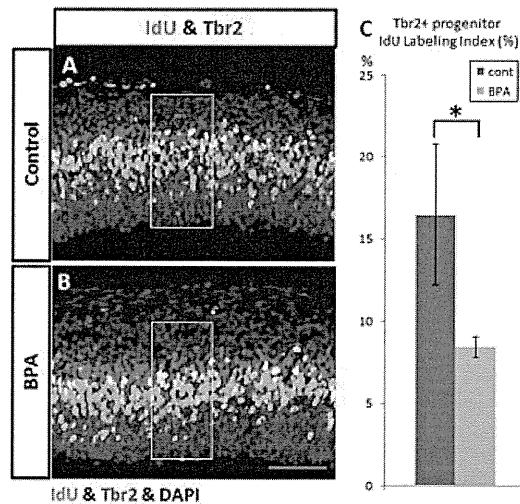
:チミジン類似物質によるlabeling



胎生16.5日のマウス胎児のTbr2抗体を用いた免疫組織染色



## BPAの胎児期曝露は中間前駆細胞の細胞周期を延長する



## Conclusion

BPAの胎児期曝露(200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ )

→20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ では異常は検出されない

●皮質板の過形成と放射状突起の縮小

→終脳背側の神経新生の促進によって誘発される

●神経前駆・幹細胞の減少

→神経新生が促進されることによる。特にIPCの維持や分化に影響する

これらのphenotypeはIPCの細胞周期の異常(細胞周期が延長されること)により誘発されている

【Next Plan】

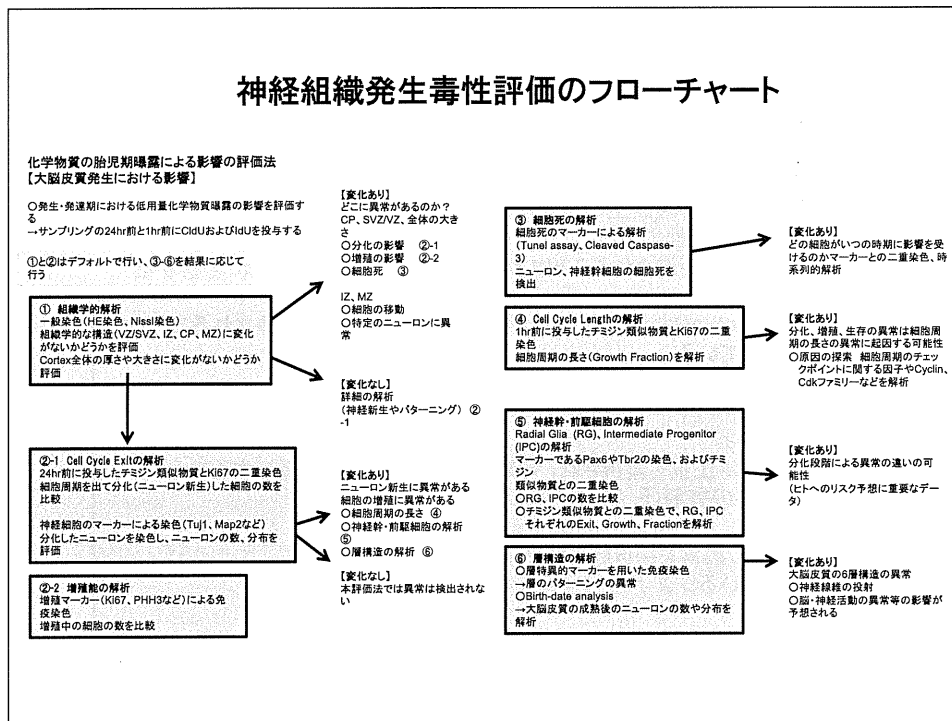
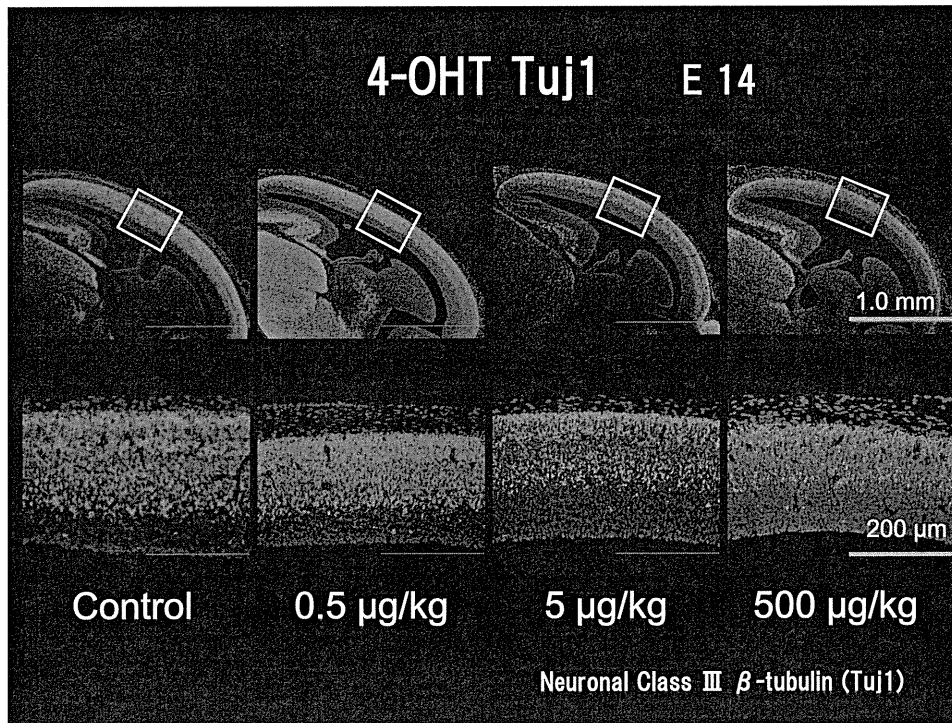
●この異常は、生後も維持され、行動異常や発達障害に関与するのか

→遅発効果の有無(5, 21, 36 weeks.....観察中)

●細胞周期の異常を引き起こす分子メカニズムの解明

→関与しているシグナル伝達系を探索

●4-Hydroxytamoxifenの低用量胎児期曝露による神経組織発生への影響



厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究  
- 発生・発達の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、  
それに基づく試験スキームの最適化 -  
(H23-化学-一般-002)  
分担研究報告書

低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立  
2. 低濃度化学物質で曝露した培養細胞の機能に関する研究

研究分担者 長尾 哲二 近畿大学理工学部生命科学科教授  
研究協力者 福嶋 伸之 近畿大学理工学部生命科学科講師

**研究要旨** 低濃度（100 pM~100 nM）のビスフェノール A を副腎髄質クロム親和性細胞に 1 週間または 1 ヶ月間、あらかじめ曝露しておくこと、神経成長因子による神経分化が抑制された。この作用は 1 日間の曝露では見られなかった。3T3 線維芽細胞を同様に長期間曝露したときも、酸化ストレスによる細胞死の抑制が認められたが、細胞増殖には影響しなかった。マウス大脳皮質神経上皮細胞の細胞増殖にも影響を及ぼさなかった。これらのことはビスフェノール A の長期間曝露が特定の細胞機能に変化を与えていることを示唆している。今後その詳細な分子機構を検討していく。

#### A. 研究目的

これまで、生体発達や生殖機能に影響を及ぼすとされているビスフェノール A やノニルフェノールが神経系に対して多様な作用を示すことが報告されている。これらの研究では、妊娠マウスやラットに化学物質を投与した場合、誕生した次世代マウスあるいはラットに行動異常や脳組織学的な変化が生じることが示されている[1-6]。一方、神経系の培養細胞を用いたインビトロ実験も行われており、神経細胞の生存やその機能に影響を及ぼすことが報告されている[7-17]。このようなインビトロ研究は、化学物質の作用機構を明らかにするだけでなく、化学物質の標的分子の同定とそれを活用した評価法の開発に結びつくために非常に重要なものと言える。実際に、これらの化学物質の作用は遺伝子の転写を必要とする機構だけでなく、遺伝子の関与しない機構により生じていることも示唆されているが、その詳細は不明な点が多い。

これらのインビトロ研究では、用いられている化学物質の濃度が比較的高いことが多く、また曝露期間も短い。生物個体は周辺環境から低濃度の化学物質を長期間曝露されることがあり、神経系細胞に対する長期的な影響を詳細に検討する必要がある。本研究では中枢神経系細胞の分化モデルを用いて低濃度化学物質の作用を調べるとともに、新たなインビトロ評価系の確立を最終的な目標としている。本報告では、主として先行して進めてきた神経系がん細胞の神経分化モデルを利用した化学物質の影響ならびに非神経系細胞を用いた化学物質の作用検討について記す。

#### B. 研究方法

##### 1. 使用した化学物質

ビスフェノール A、ノニルフェノールはナカライテスク、 $\beta$  エストラジオールは和光純薬、ジエチルスチルベストロールはシグマから購入して使用した。

## 2. マウス神経上皮細胞の培養

胎生 13 日令 ICR マウス（清水実験材料）の大脳皮質を摘出し、Opti-MEM 培地（インビトロジェン）中でパストールピペットを用いて機械的に単一細胞になるまで単離分散した。35mm 径のシャーレを用いて、0.5 匹分の大脳皮質由来の細胞を 20 ng/ml 塩基性繊維芽細胞成長因子（bFGF、和光純薬）、50 ng/ml 上皮細胞成長因子（EGF、和光純薬）、2%B27 サプリメント（インビトロジェン）を含む 1.5 ml の Opti-MEM（インビトロジェン）中で 7 日間培養した。化学物質の添加は培養開始時に行い、4 日後に培地 0.5 ml とともに化学物質を追加した。

## 3. 株細胞の培養

マウス線維芽細胞（Swiss/3T3）およびラット副腎髄質クロム親和性腫瘍細胞（PC12）を用いた。3T3 細胞は 10%ウシ胎仔血清（FCS）を含むダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM、和光純薬）で培養した。PC12 細胞は 10%FCS および 5%ウマ血清を含む D-MEM で培養した。化学物質の長期曝露を行う際には、細胞を 24 穴プレートに 1 穴当たり 3,000–5,000 個播種し、その 1 時間後に種々の濃度の化学物質を添加した。実験に使用するまで 3–4 日毎に継代し、化学物質の添加を継代時に行った。

## 4. マウス神経上皮細胞の細胞増殖評価実験

7 日間培養したマウス神経上皮細胞にブロモデオキシウリジン溶液（BrdU、ロッシュ）を 1/500 量添加し、さらに 4 時間培養した。神経上皮細胞を回収し 1%B27 を含む 250  $\mu$ l の Opti-MEM 中で 200  $\mu$ l ピペットチップを用いて分散した。あらかじめポリリジンコートした 96 穴プレートに 1 穴当たり 1  $\mu$ l の細胞分散液を加え、1%B27 サプリメントを含む Opti-MEM 中で 2 時間培養し細胞を接着させた。2 M 塩酸を含む 70%エタノールで細胞を固定し、抗 BrdU 抗体を用いた ELISA（ロッシュ）により DNA への BrdU 取込み量を定量した。細胞分散液 100  $\mu$ l から回収された全 DNA 量を用い

て、BrdU 取込み量を標準化した。

## 5. RT-PCR

細胞からの全 RNA の抽出には Tri Reagent（シグマ）を用いた。全 RNA（1  $\mu$ g）を DNase（インビトロジェン）で処理し、続いて oligo-d(T) プライマーおよび Reverse Transcriptase（ロッシュ）を用いて cDNA を作製した。cDNA はミリ Q 水を添加し全量 80  $\mu$ l とし、そのうち 1.25  $\mu$ l を PCR に使用した。使用したプライマーは表 1 のとおりである。遺伝子の増幅には GoTaq DNA ポリメラーゼ（プロメガ）を用いた。増幅反応は 95°C、1 分の熱変性に続いて、95°C、30 秒、56°C、30 秒、72°C、60 秒のサイクルを 35 回繰り返すことにより行った。増幅された遺伝子産物を 1.5%のアガロース電気泳動により分離し、臭化エチジウムにより可視化した。

## 6. PC12 細胞の神経分化評価実験

化学物質で曝露した PC12 細胞を、あらかじめポリリジンコートした 12 mm 径のカバーガラスに約 1,000 個/400  $\mu$ l の細胞濃度で播種した。翌日、無血清 D-MEM で 1 回洗浄し、100 ng/ml の神経成長因子（NGF、アロモネ）を含む無血清 D-MEM でさらに 3 日間培養した。細胞をフォルマリンで固定し、位相差顕微鏡下、細胞体直径よりも長い突起を持つ細胞を神経分化した PC12 細胞と見なして数えた。無作為に選んだ 5 つ以上の視野で合計 100 個以上の細胞を観察し、全細胞数に対する神経分化した細胞の割合を算出した。実験は 1 濃度につき 2 サンプルで行い、同じ実験を 3 回以上実施した。

## 7. 細胞増殖評価実験

化学物質を曝露した 3T3 線維芽細胞を 96 穴プレートに 1 穴当たり約 1,000 個/100  $\mu$ l の細胞濃度で播種し、3 日間培養した。細胞数は Cell counting kit-8（CCK-8、同人化学）を用いて測定した。培養翌日の細胞数を 100%としてその後の細胞数を相対的に表した。実験は 1 濃度につき 3 サンプル以上で行い、同じ実験を 3