

201236010A

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)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二

平成 25 (2013) 年 3 月

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)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二  
平成 25 (2013) 年 3 月

別添 1

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)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二  
平成 25 (2013) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告

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 -

----- 1

長尾 哲二

II. 分担研究報告

1. 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 4-ヒドロキシタモキシフェンの胎児期曝露が誘発する大脳皮質形成異常の解析  
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

----- 9

長尾 哲二

2. Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析

----- 67

渡邊 肇

3. 周産期低用量曝露による免疫影響評価

----- 87

林 良夫

4. マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構

----- 115

井口 泰泉

5. 化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応

----- 145

菅野 純

6. 化学物質の子どもへの影響評価に関する研究 - げっ歯類一生涯試験の検証 -

----- 181

太田 亮

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 195

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 197

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
総括研究報告書

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)

研究代表者 長尾 哲二 近畿大学工学部生命科学科 教授

## 研究要旨

近年の「低用量曝露による遅発影響」研究の進展により、bisphenol A(BPA)に代表される化学物質がエストロゲン受容体(ER)を介して作用しているか否かが問題となっている。即ち、確定試験としての齧歯類一生涯試験法の確立と併せて、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」(試験スキーム)の拡充の必要性が問題となっている。

そこで本研究では、先行研究の成果を最大限に取り入れ、「試験スキーム」の網羅性拡充のために必要な基盤研究を進める。国内外で生体影響の分子メカニズム解明が急がれているBPA及びdiethylstilbestrol(DES)を掲げ、①発生・発達期の脳及び免疫系に対する低用量曝露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発影響」、及び、②その分子標的としてのDNA修飾機構及びmRNA修飾機構を検討した。さらに「齧歯類一生涯試験法」において遅発性の免疫系への影響を検証した。

その結果、①では低用量BPAの胎児期曝露による大脳皮質の神経新生促進による皮質発生の異常を明らかにし、またER遺伝子の発現部位を可視化するトランスジェニックマウスが作成できた。さらに妊娠期の胸腺細胞でのダイオキシン受容体(AhR)の発現亢進がみられ、AhRを介したT細胞分化にエピジェネティックな影響の関与も認めた。②からは臍組織の未成熟な時期のDES曝露によるそのホルモン応答システム破綻にWnt/ $\beta$ -カテニンシグナルの関与を認めた。また、低濃度BPAにより発現亢進するnon-coding RNAの機能解析のためのノックアウトマウス作成を試みた。一生涯試験法の検証では低用量BPA投与による遅発効果としてT細胞分化への影響を確認した。

これらの成果と遅発影響の有無の検討を中心とした最終年度の成果から、現在の「試験スキーム」に緊急性をもって追加する必要がある試験項目や効率的な代替法への切り替えの提示の有無を結論し、また一生涯試験法の検証を継続して、OECDの「延長一世代試験」の完成を促す。

## 研究分担者

渡邊 肇 大阪大学大学院  
工学研究科 教授  
林 良夫 徳島大学 名誉教授  
井口泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授  
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 部長  
太田 亮 財団法人食品薬品安全センター  
秦野研究所 毒性部 部長

## A. 研究目的

本研究は、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」(試験スキーム)の網羅性の拡充と確定試験法の確立を目的とする。このために、①発生・発達期の脳及び免疫系に対する低用量曝露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発影響」、及び、②その分子標的としてのDNA修飾機構及びmRNA修飾機構を検討する。①からは臓器～細胞レベルの遅発影響の同定とその影響発現メカニズムを明らか

にして評価系を確立し、②からは発現メカニズムに共通する分子基盤を明らかにする。また、先行研究で培った③「齧歯類一生涯試験法」の検証を並行し、OECDの「延長一世代試験」の完成を促すとともに、厚生労働省「試験スキーム」の拡充を提案する。

## B. 研究方法

### B-① 低用量曝露の標的臓器(脳、免疫系)への影響、とくに遅発影響の同定とその発現メカニズムの解明

#### B-①-1 周産期の低用量化学物質曝露による大脳皮質形成への影響(長尾)

*In vivo*実験にチミジン類似物質ラベル法を適用して、ラベルされたS期の細胞数を比較して神経細胞の細胞周期異常を検出する。またラベルされたニューロンの大脳皮質成熟後の数や位置を解析して、低用量化学物質の胎児期曝露によるニューロン新生及び神経細胞移動の障害による大脳皮質の層構造における微小異常などを胎児期あるいは新生児期での検出のみならず成熟後の遅発影響を検出する系の確立を目指す。さらに「代替法」として中枢神経系細胞の分化モデルを用いた *in vitro* 評価法の確立を試みる。

#### B-①-2 Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスを用いた化学物質の神経標的解析(渡邊)

神経軸索内微小管結合蛋白 tau と  $\beta$ -ガラクトシダーゼを融合させて、ER $\alpha$ 発現神経細胞の樹状突起までを可視化した tau 融合エストロゲン受容体レポーター(Tau-ER)マウスを作成することを目指す。このマウスによりERの発現部位を細胞レベルで明らかにすることが可能になる。すなわち、ホルモン様作用を有する化学物質を新生児期マウスに曝露し、ERの量的、機能的変化を観察して、新生児～幼若期特有の変化のメカニズム、とくに発生・発達期の脳神経系が示す高感受性の作用メカニズムを明らかにすることができる。

#### B-①-3 周産期の低用量化学物質曝露に

### よる免疫影響評価(林)

新生児期に低用量のダイオキシン曝露により遅発影響として自己免疫性病変が誘導されることから、周産期におけるダイオキシン受容体(AhR)を介した免疫反応を中心に検討し、標的臓器における組織異常の同定とそれに至る分子機構の解明により免疫系への低用量遅発影響の評価系完成を目指す。妊娠期における胸腺組織及びリンパ節でのT細胞分画の解析、AhR発現およびAhRノックアウトマウスの胸腺組織における免疫関連遺伝子のメチル化を検討する。さらに妊娠期における胸腺組織のダイオキシン曝露による影響を網羅的遺伝子発現解析により検討する。

### B-② 「遅発影響」の標的分子とその分子基盤の解明

#### B-②-1 化学物質による遅発影響標的分子としてのDNA修飾機構の解析(井口)

膣、子宮などの女性生殖管はその発生前にホルモン様化学物質に曝露されると遅発影響が観察されることから、雌性生殖管(膣上皮)をモデルとする。女性生殖管に対する女性ホルモンの不可逆的かつ長期的影響など組織・個体レベルでのホルモン応答システムの破綻のメカニズムを明らかにすることを目指す。すなわち周産期の化学物質曝露が誘導する組織不可逆化の発症メカニズムについて、ホルモン様作用を有する化学物質曝露によって誘導される組織異常の原因遺伝子の同定およびその遺伝子の発現制御メカニズムの解析により明らかにする。特に多くの組織の発生・分化・細胞増殖などに関係するWnt/ $\beta$ -カテニン経路及びPI3K/Akt経路に注目し、遺伝子改変マウスあるいは周産期DES曝露マウスを用いて解析する。

#### B-②-2 化学物質による遅発影響標的分子としてのmRNA修飾機構の解析、及びOECD/WHO対応(菅野)

ES細胞分化系において低濃度BPAがMalat-1(RNAスプライシングに関与)の発現を増加させ、胎児でStat1、Egfr、ER $\alpha$ 等がこれと同期発現したことから、向神

経因子としての解析意義が大きいと判断した。*In vitro* 系においてホルモン様作用を有する化学物質による Malat-1 と細胞分化の関係を、また *in vivo* 系においてその発現局在 (*in situ* hybridization 法) を解析し、ホルモン様物質による遅発影響の分子標的としての mRNA 修飾機構を検討する。さらに Malat-1 遺伝子の機能解析のためのノックアウトマウスを作成する。

また、OECD/WHO 対応として OECD 関連会合に出席し、低用量作用、遅発影響あるいは評価試験法を含む内分泌かく乱問題の情報交換ならびにコメント対応を行う。

### B-③ 齧歯類一生涯試験法の改良、及び OECD 対応 (太田)

神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した厚生労働省の「齧歯類一生涯試験法」において低用量のホルモン様作用を有する化学物質 (BPA、DES) を適用し、改良の必要な問題点を明らかにし、OECD の延長一世代試験に反映させる。すなわち、これまで本試験法により見出された性周期、免疫機能及び体重における遅発影響の再現性を確認する実験をさらに低用量域で試みる。

(倫理面への配慮)

各研究施設の倫理規定に従い、倫理委員会の承認を得た上で適切に動物実験を実施する。マウス、ラットを用いた動物実験は各研究施設の動物実験規程に準拠し、かつ動物実験委員会の承認を受ける。実験は必要欠くべからざる場合にのみ行い、動物数を最小限にとどめ、サンプリングの際にはすべて麻酔下に行い動物に苦痛を与えないように配慮する。

## C. 研究結果

### C-①-1 低用量曝露の標的臓器としての脳神経系への影響評価系の確立

胎児期の低用量 BPA 曝露による大脳皮質形成への影響を明らかにするために、C57BL 妊娠マウスの胎児脳神経系発生期 (neurogenesis) に BPA を経口投与し、神経幹/前駆細胞の数や分布、増殖能や細胞

周期の異常に着目して、免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法を用いて解析した。その結果、皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞の減少が観察され、低用量 BPA は神経幹/前駆細胞の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することを明らかにした。また、低用量 BPA の遅発影響の有無を検討するために新生児大脳皮質の層構造を、胎児期に生まれたニューロンを標識して観察し、低用量 BPA はニューロンの移動に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、大脳皮質形成への影響は、胎児脳及び胎盤に多く存在する ERR $\gamma$  に BPA と同様、強く結合する化学物質 4-ヒドロキシタモキシフェンの低用量胎児期曝露においても確認し、メカニズムの解明を進めている。

### C-①-2 Tau 融合エストロゲン受容体レポーターマウスの作成と化学物質の神経標的解析

ER 発現細胞を可視化したマウスを作成するために、BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組込むために、Red/ET 相同組換え法を用いた。BAC 側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZ レポーター遺伝子の両末端に PCR 法によって融合させたのちに、この DNA 断片をリコンビナーゼと共に RP23-7 D5BAC クローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、RP23-7 D5BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。得られたクローンを大量精製し、塩基配列を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、ER $\alpha$  遺伝子の翻訳開始 ATG 以下が tau-lacZ に置換されていることを確認した。構築したプラスミドをマウス受精卵にインジェクションし仔を得た。トランスジーンを確認した結果、構築した遺伝子が導入されていることが確認できたため交配したところ、トランスジーンについては問題なく生殖系列に導入され、ER 発現部位において可視化用マーカー遺伝子の共発現を確認した。

### C-①-3 周産期の低用量化学物質曝露による免疫影響評価

妊娠期のリンパ節あるいは脾臓の T 細胞分画を解析したところ、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞がリンパ節及び脾臓において非妊娠期に比較し増加した。妊娠マウスの胸腺細胞におけるダイオキシン受容体 AhR の mRNA 発現は非妊娠マウスの胸腺組織における発現に比べ増加した。AhR ノックアウトマウスの胸腺細胞では、Th1 及び Th2 関連遺伝子の DNA メチル化に変動がみられた。さらに妊娠マウス胸腺組織では autoimmune regulator mRNA も上昇した。アロマターゼノックアウトマウスの胸腺組織でも AhR mRNA 発現が亢進した。次いでケモカイン、サイトカイン、それらの受容体、各種転写因子、Th1/Th2/Th17 関連遺伝子に加え、エピジェネティックな変化が想定される遺伝子について、妊娠マウス胸腺組織の *in vitro* での TCDD 曝露の結果、C57BL マウス及び AhR ノックアウトマウスでの遺伝子発現に差はみられず、妊娠により亢進した多くの遺伝子発現が TCDD 曝露により低下した。

### C-②-1 マウス雌性生殖管の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構

未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答について、女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としての Wnt シグナルとのクロストークの解析を行った。β-カテニンを構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膈上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導された。さらに周産期に DES を投与したマウスの膈上皮の基底細胞の一部や腺様疾患部でも β-カテニンは高発現し、妊娠期女性ホルモン曝露によるホルモン応答システムの破綻時において、Wnt/β-カテニン経路の関与が明らかとなった。

### C-②-2 遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 会合出席 胚様体 (EB) における BPA 応答遺伝子の

用量反応解析を行い ERα 及び ERRγ の発現増加を認めた。EB 培養系において BPA 曝露により RNA スプライシングに関与する Malat-1 が BPA の低濃度で増加することをマイクロアレイ解析により確認した。そこで、Malat-1 の発現機構を調べるためにプロモーター解析ベクター及びノックアウトマウス作成のためのターゲティングベクターを構築した。さらに同遺伝子の定量的 *in situ* hybridization を行い、マウス胎児脳での高発現を確認した。

OECD 対応では、内分泌かく乱化学物質の試験及び評価に関する OECD/EDTA 第3回アドバイザーグループ会合に出席して厚生労働科学研究の進捗を報告した。また米国国立環境科学研究所に於いて開催される BPA 会合に出席を予定している。

### C-③ 齧歯類一生涯試験における遅発影響としての性周期変化及び免疫学的変化の検証

齧歯類を用いる一生涯試験の検証として、BPA あるいは DES を C57BL マウスの新生児に強制経口投与し、遅発性の低用量影響を検索中である。8 週齢までの体重推移には BPA あるいは DES 投与の影響は認められず、雌の膈開口の時期及び雄の陰茎包皮分離の時期を指標とした性成熟にも影響はみられなかった。14 週齢で各種の免疫学的検査、24 週齢から性周期を観察し、体重測定を定期的実施した。現在までのところ性周期への明らかな遅発影響は認められていないが、BPA 投与により 14 週齢雌に T 細胞分化の影響が観察され、また両物質とも雌で体重推移に遅発性の肥満を示唆する変化が観察されている。

### D. 考察

脳神経系の影響評価研究では、低用量 BPA の胎児期曝露が細胞周期の異常を引き起こすことにより、胎児大脳皮質の分化に影響を及ぼすことが示唆された。胎児期に生まれた神経細胞移動の異常の有無と併せて、大脳皮質にみられた異常が生後も維持され、成熟後に脳機能の発達などに影響を及ぼすか否かを明らかにする必要があ

る。さらに皮質板の肥厚（過形成）がヒトで報告されている自閉症児の脳肥大傾向と関連があるのか否かなど、毒性学的意義についても明らかにする必要がある。また、脳神経系の影響評価研究では、中枢神経系の培養細胞を用いた *in vitro* 研究を並行しており、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「代替評価法」の開発に結びつく重要なものと考えられる。

ER $\alpha$  は大脳皮質形成に重要な役割を果たすことから、今回作成したトランスジェニック（Tau-ER）マウスの新生児期に BPA などのホルモン様化学物質を曝露し、脳神経系を中心とした ER 発現部位の変化を解析することにより、発生・発達期の脳が示す高感受性の作用メカニズムが解明され、「試験スキーム」の最適化に資することができると考える。さらに脳神経系（あるいは女性生殖管）への影響の同定においても、このマウスを組み合わせ、複合的に解析することにより、解析精度の向上が期待できる。

免疫影響評価では AhR を介した免疫反応を中心に検討した。妊娠期には胸腺細胞の AhR を介した T 細胞分化制御機構が存在し、さらにエストロジェンの合成に重要な酵素であるアロマターゼのノックアウトマウスの胸腺細胞における AhR mRNA 発現の亢進からアロマターゼ及び性ホルモンと AhR シグナルがリンクしていることが示唆される。また妊娠期の胸腺組織での T 細胞分化に関与する遺伝子発現の変動が TCDD 曝露により著しく低下したことは、TCDD が T 細胞分化に極めて重要な遺伝子群の発現に影響を及ぼしていることを示す。

雌性生殖管におけるホルモン応答システムの破綻についての解析では、 $\beta$ -カテニン活性化マウスの膣上皮細胞に女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導され、さらに新生児期 DES 投与マウスの膣上皮基底細胞にも  $\beta$ -カテニンの蓄積を認めたことから、未成熟期のホルモン作用を有する化学物質の曝露によるホルモン応答システムの破綻に Wnt/ $\beta$ -カテニン経路が関

与していることが示唆される。

遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析では、低濃度 BPA により発現増加がみられた non-coding RNA の Malat-1 を中心に解析し、マウス胎児脳において高発現を確認した。Malat-1 遺伝子の機能解析のための Malat-1 ノックアウトマウスができれば低濃度 BPA による Malat-1 発現増加の生物学的、毒性学的意義が明らかになり、この遺伝子が遅発影響の分子標的の 1 つであるか否かが結論できると思われる。

BPA あるいは DES を用いた一生涯試験では性成熟ならびに性周期に遅発影響がみられなかった。BPA 投与のみに T 細胞分化への影響が示唆された。さらに曝露マウスの成熟が進行し抗体産生能の低下などがみられれば、極めて低用量域での内分泌かく乱作用の指標として、免疫学的検査が有効な手段となり得ると期待される。また、脳神経系への遅発影響についても本試験系による検証を行い、確定試験法の確立をめざすとともに、OECD が提唱する延長一世代試験のガイドライン策定にも情報提供ができるものと期待される。

## E. 結論

本研究の成果から、周産期低用量曝露が引き起こす神経-内分泌-免疫系に代表される高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発影響を、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず受容体原性毒性あるいはシグナル毒性として、体系的、総合的、かつ GLP ガイドライン化が可能な評価系の構築が見込まれる。これは従来行なわれてきた各種の毒性試験法による検査の及んでいない影響指標を明示し、この分野の研究に新しい視点を提供するものであり、国内はもとより、OECD 等の国際的なテストガイドライン策定の際の具体的な科学的な基盤情報としての大きな意義を有する。

いずれの分担研究も当初計画した研究成果が概ね得られていることから、最終年度においては本研究事業の主目的である「試験スキームの最適化」に資する成果が期待され、また、低用量化学物質曝露の性

周期、免疫系あるいは体重推移などにおける遅発影響の再現性を確認するための齧歯類一生涯試験がすでに 50 週齢まで進んでいることから研究事業の期間内に終了することが可能であり、改良を要する点なども提案できると思われる。さらに本研究事業においては BPA、DES あるいはダイオキシンの作用が中心となっているが、一生涯試験法の確立を待って他の物質についても検討を行い、また他の化学物質の予測にも繋げたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagao T, Komada M, Kagawa N.

Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2802.

Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M.

Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2766.

Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T.

Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* (2012) **295** (1-3):31-38

Taylor JA, Richter CA, Suzuki A, Watanabe H, Iguchi T, Coser KR, Shioda T, Vom Saal FS.

Dose-related estrogen effects on gene expression in fetal mouse prostate mesenchymal cells. *PLoS One* (2012) **7**(10):e48311. doi: 10.1371/journal.pone.0048311.

Nakamura T, Miyagawa S, Katsu Y, Watanabe H, Mizutani T, Sato T, Morohashi K, Takeuchi T, Iguchi T, Ohta Y.

Wnt family genes and their modulation in the ovary-independent and persistent vaginal epithelial cell proliferation and keratinization induced by neonatal diethylstilbestrol exposure in mice. *Toxicology* (2012) **296** (1-3):13-19

Kakuta H, Tanaka M, Chambon P, Watanabe H, Iguchi T, Sato T.

Involvement of gonadotropins in the induction

of hypertrophy-hyperplasia in the interstitial tissues of ovaries in neonatally diethylstilbestrol-treated mice. *Reprod Toxicol.* (2012) **33** (1):35-44

Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N.

Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient *lpr* macrophages. *J Immunol.* (2012) in press

Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N.

Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/*lpr* mice. *PLoS One* (2012) in press

Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y.

CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol.* (2012) **180**:199-208

Oka K, Kohno S, Urushitani H, Guillettee LJ Jr, Ohta Y, Iguchi T, Katsu Y.

Molecular cloning and characterization of the corticoid receptors from the American alligator. *Mol Cell Endocrinol.* (2012) in press

Oka T, Mitsui-Watanabe N, Tatarazako N, Onishi Y, Katsu Y, Miyagawa S, Ogino Y, Yatsu R, Kohno S, Takase M, Kawashima Y, Aoki Y, Guillettee LJ Jr, Iguchi T.

Establishment of transactivation assay systems using fish, amphibian, reptilian and human thyroid hormone receptors. *J Appl Toxicol.* (2012) in press

Hirakawa I, Miyagawa S, Mitsui N, Miyahara M, Onishi Y, Kagami Y, Kusano T, Takeuchi T, Ohta Y, Iguchi T.

Developmental disorders and altered gene expression in the tropical clawed frog (*Silurana tropicalis*) exposed to 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *J Appl Toxicol.* (2012) in press

Ohta R, Ohmukai H, Marumo H, Shindo T, Nagata T, Ono H.

Delayed reproductive dysfunction in female rats induced by early life exposure to low-dose diethylstilbestrol. *Reprod Toxicol.* (2012) **34** (3):323-330

Ohta R, Takagi A, Ohmukai H, Marumo H, Ono A, Matsushima Y, Inoue T, Ono H, Kanno J. Ovariectomized mouse uterotrophic assay of 36 chemicals. *J Toxicol Sci.* (2012) **37** (5):879-889

## 2. 学会発表

長尾哲二、井藤早紀、正見寛子、駒田致和  
低用量ビスフェノール A のマウス子宮内  
曝露は新生児の出生直後の活動量に影響  
を及ぼす 環境ホルモン学会第 15 回研究  
発表会 東京、12 月 18～19 日、2012 年

溝端彩、森佳奈美、駒田致和、長尾哲二  
胎児期 4-ヒドロキシタモキシフェン曝露  
はマウス大脳皮質形成を障害する 環境  
ホルモン学会第 15 回研究発表会  
東京、12 月 18～19 日、2012 年

新垣理恵子、山田安希子、江口洋、林良夫、  
石丸直澄  
シェーグレン症候群モデルマウスを利用  
したレバミピド点眼投与による病態抑制  
機序の解明、第 101 回日本病理学会総会  
東京、4 月、2012 年

石丸直澄、山田安希子、新垣理恵子、林良夫  
自己免疫疾患における CCR7 を介した制御  
性 T 細胞のパトローリング機能 第 101 回  
日本病理学会総会 東京、4 月、2012 年

中島忠章、井口泰泉、佐藤友美  
胎仔期から成熟期にかけての子宮と膣の  
分化におけるレチノイン酸シグナルの役  
割 第 83 回日本動物学会 大阪、9 月 13  
～15 日、2012 年

中村武志、宮川信一、平川育美、井口泰泉、  
太田康彦  
新生時期に DES 曝露をうけた成熟マウス  
の膣における p21、p53 及び Notch 関連遺  
伝子の発現 日本獣医学会 岩手、9 月 14  
～16 日、2012 年

## G. 知的財産権の取得状況

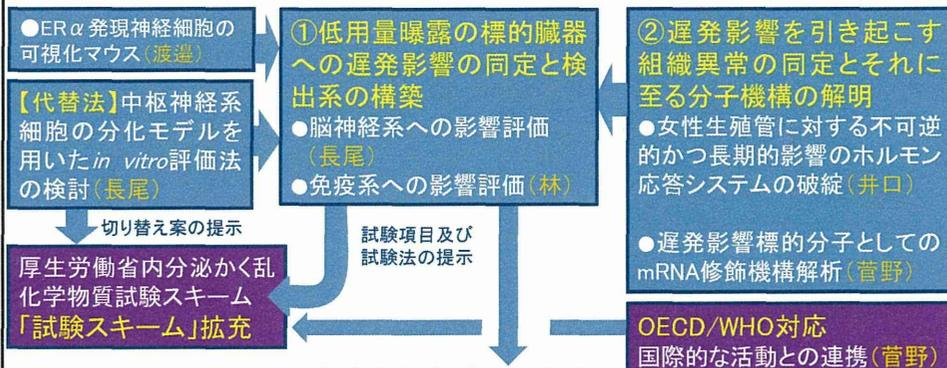
1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## 化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

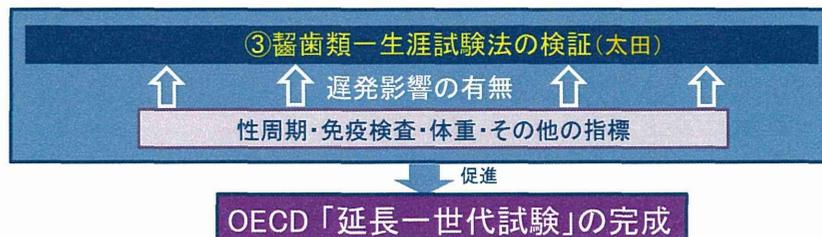
-発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、  
それに基づく試験スキームの最適化-

|       |                            |
|-------|----------------------------|
| 長尾 哲二 | 近畿大学理工学部 教授                |
| 渡邊 肇  | 大阪大学大学院工学研究科 教授            |
| 林 良夫  | 徳島大学 名誉教授                  |
| 井口 泰泉 | 自然科学研究機構・岡崎統合倍サイエンスセンター 教授 |
| 菅野 純  | 国立医薬品食品衛生研究所毒性部 部長         |
| 太田 亮  | 財団法人食品薬品安全センター・秦野研究所 部長    |

### 1. 「試験スキーム」の網羅性の拡充



### 2. 確定試験法の確立



## Ⅱ. 分担研究報告書

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)

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

### 1. 低用量 4-ヒドロキシタモキシフェンの胎児期曝露が誘発する大脳皮質形成異常の解析

研究分担者 長尾 哲二 近畿大学理工学部教授

研究協力者 駒田 致和 徳島大学薬学部助教

**研究要旨：**本研究課題では、低用量化学物質の胎児期曝露により誘発される大脳皮質形成異常の、特にニューロン新生の異常に着目した組織学的検出法の確立を目指す。昨年度の研究から、胎児期の低用量ビスフェノール A (BPA) 曝露が神経分化の促進や神経細胞移動の異常を引き起こし、大脳皮質の発生に重篤な異常を引き起こすことを報告した。さらに、神経幹/前駆細胞の増殖や分化に関する詳細な解析を実施して表現型や発症メカニズムの解明を試みた。その結果、低用量 BPA は、神経幹/前駆細胞の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することが明らかになった。今年度は低用量 BPA で得られた実験的証拠を他の化学物質においても確認するために 4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)を用いて低用量影響について検討し、BPA と同様に 4-OHT は、皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞を減少させることを確認した。これらのことから、免疫組織化学的手法やチミジン類似物質のラベリング法を用いた評価法により、大脳皮質の発生における神経分化や細胞増殖に対する低用量化学物質の曝露の毒性影響を検出することが可能であることが明らかになった。

#### A. 研究目的

ヒトは生活環境下において様々な化学物質に晒される機会があり、特に胎児期、発達期などの高感受期における化学物質の曝露が中枢神経系の形態異常、さらには成熟後の脳機能障害を引き起こすことが報告されている。さらに近年、これまでは毒性影響がないとされていた低用量の化学物質の母体曝露が出生児の脳機能発達に影響を及ぼすことが注目されている。環境中の化学物質の低用量曝露により誘発される可能性のある脳の形態学的変化は微細であると

考えられるため、その毒性影響を評価することは難しい。そのため、実験動物を用いた中枢神経系の発生における化学物質のリスク評価には、わずかな毒性学的変化を検出することが可能な形態学的指標により明確に定量する試験系や器質的变化を評価する手法の構築が必要である。そこで本研究では、中枢神経系の発生において重要な細胞増殖と神経新生を高感度に定量できる免疫組織学的評価手法の構築を目的とした。正常な中枢神経系の発生には、適切な時期に適切な数の細胞が増殖し、神経細胞に分化す

ることが必須である。特に脳の器官形成期には膨大な数の細胞が増殖・分化・移動するため、わずかな発生学的歪みが形態学的あるいは脳機能学的な異常に繋がる。そこで本研究では、免疫組織化学的に細胞の増殖と神経新生の変化を、細胞数の増減により評価するという新たな手法の確立を試みた。

昨年度の研究から、BPAの胎児期曝露は細胞周期の異常を引き起こすことにより、大脳皮質の分化に影響していることが明らかになった。そこで今年度は、内分泌攪乱化学物質であるBPAと同様に、エストロゲン受容体関連受容体 $\gamma$  (ERR $\gamma$ )に強く結合することが報告されている4-ヒドロキシタモキシフェン (4-hydroxytamoxifen: 4-OHT)の大脳皮質の分化に及ぼす影響について検討した。

本研究課題では、低用量化学物質の胎児期曝露マウスをモデルとし、細胞数という明確な数値で器官形成期における変化を評価できるこの評価手法が、リスク評価手法としては極めて有用であることを明らかにすることを旨とする。さらにBPAの子宮内曝露により胎児にみられた大脳皮質への影響が成熟後にも維持されるのか、あるいは遅発影響として別の脳神経系への影響が現れるか否かについても検討した。

## B. 研究方法

### 1. 動物と飼育条件

8週齢のICRマウス(日本SLC、吹田市)を、SPF環境下(明暗周期:12時間(午前7時-午後7時)、温度:24±1℃、湿度:55±5%)にて飼育した(近畿大学の実験動物飼育規定に準拠)。給水瓶はテフロン被膜を施したものを使用した。2週間の馴化の後、雌雄1:1で交配を行い、12時間後に膣栓が確認できたものを実験に供した。膣栓が確認できた日を胎齢0.5日(ED0.5)とした。

### 2. 投与液と投与計画

4-OHT(Sigma)を0.5%CMC-Na溶液で懸濁し、ED8.5~13.5に連続して背部皮下投与した(投与液は、濃度を±10%で調整し、調整後5日以内に使用した)。

また毎日ほぼ一定の時間のPM12:00に投与した)。投与量は0.5~50 $\mu$ g/kg/dayとして、胎児期曝露による大脳皮質形成への影響の有無と異常の発症メカニズムの解明を目指した。

### 3. 組織サンプルの作製

妊娠マウスのED14.5に帝王切開により胎児を摘出した。組織学的解析には子宮口から近いものを優先して使用したが、その根拠は、生殖器系、内分泌系、生殖機能の成熟、性周期や行動学的解析により子宮内位置の違いによるこれら指標における変化が検出されないため、胎児の子宮内位置は胎児発生および生後の発達に影響を及ぼさないことが報告されているからである(Nagao et al. 2004)。ED14.5に胎児重量と頭部の大きさを測定した後、胎児はPLP固定液を用いて4℃で固定してPBSで洗浄した。パラフィン切片は5 $\mu$ mの厚さで作成し、免疫組織化学染色に用いた。

### 4. 免疫組織化学染色

1次抗体は以下のものを用いた。Mouse monoclonal anti-neural class III  $\beta$ -tubulin (TuJ1: Covance): 神経細胞のマーカー、rabbit monoclonal anti-Ki67 (Lab vision): 増殖中の細胞のマーカー、rat monoclonal anti-BrdU (CldU) (Oxford Biotechnology)、mouse monoclonal anti-BrdU (IdU) (Becton Dickinson)、mouse monoclonal anti-Nestin (BD pharmingen): RGCの放射状突起のマーカー、2次抗体にはAlexa 568、488を共役させた抗体を用いて、蛍光免疫組織染色を行った。対比染色として、DAPIによる核染色を行った。

### 5. IdUとCldUの取り込み実験

胎児生体内でS期の細胞をラベリングするために、IdU(Sigma)とCldU(MP biomedical Inc.)を腹腔内投与し、CldUの場合は投与後24時間、IdUは投与後1時間がED14.5になるように胎児を摘出した。CldUとIdU陽性細胞を免疫組織化学染色により検出

し、大脳皮質原基における陽性細胞の数や分布を定量した。

## 6. 細胞周期解析 (Cell cycle exit)

Cell cycle exit を定量するために、IdU を投与し 24 時間後に摘出した胎児を用いて、増殖中の細胞のマーカである Ki67 との二重染色を行った。すべての CldU 陽性細胞のうち、Ki67 との二重染色により終脳背側全体の割合を比較した。なお、Ki67 陽性細胞は細胞周期を出て分化した細胞を示している。

Cell cycle exit の解析における細胞数の定量では、免疫組織化学染色による陽性細胞を定量するために、2 枚の組織学的に一致する切片に対して 2 か所の測定部位 (100  $\mu\text{m}$  の幅) を決定し、すべての細胞数 (DAPI 陽性細胞) と、Ki67 陽性細胞を数えた。

## 7. Birth-date analysis によるニューロンの追跡

ED13.5 あるいは ED15.5 に CldU あるいは IdU をそれぞれ 50 mg/kg 腹腔内投与した。自然分娩にて得られた出生児の生後 14 日の脳を灌流固定後に摘出した。常法によりパラフィン切片を作成しニューロンを追跡した。

## C. 研究結果

### 1. 低用量 4-OHT の胎児期曝露は皮質板の過形成を誘導する

低用量 4-OHT の胎児期曝露による大脳皮質発生への影響を解析するために、妊娠マウスの ED8.5~13.5 に 0.5~50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  の用量で連続して背部皮下投与した。

胎児脳のパラフィン切片を用いて HE 染色を行い病理組織学的に大脳皮質を観察したところ、4-OHT 曝露群において皮質板の過形成が観察された (Fig. 1)。4-OHT 曝露による神経新生への影響を解析するために、Tuj1 の発現領域を調べたところ、Tuj1 を発現している皮質板の厚さが増していることが示された ( $P < 0.01$ , Fig. 2)。

### 2. 4-OHT の胎児期曝露は神経幹/前駆細胞の cell cycle exit を促進する

大脳皮質の発生において適切に制御された細胞周期は重要である。そこで、4-OHT 曝露による神経新生促進の原因を明らかにするために、神経幹/前駆細胞の cell cycle exit について増殖中の細胞に発現する核タンパクである Ki67 と IdU を 24 時間前に投与することで増殖中の細胞をラベリングし、蛍光免疫二重染色による解析を行った。Ki67 と IdU が共発現している細胞は 24 時間前 (ED13.5) も胎児摘出時 (ED14.5) も増殖中の細胞であることを示しており、Ki67 陰性かつ IdU 陽性の細胞はラベリングした 24 時間前は増殖中であるが、胎児摘出時は細胞周期を出ている (cell cycle exit) ことを示す。Cell cycle exit はこの細胞の割合を比較することにより解析を行う。その結果、4-OHT 曝露群で cell cycle exit の割合が対照群と比較して増加していることが明らかになった ( $P < 0.05$ , 0.01 Fig. 3)。すなわち、皮質板の過形成は神経幹・前駆細胞の分化が促進されて誘導されたことを示す。また、Ki67 と IdU が共発現している細胞は SVZ/VZ の深層に留まっており、分布に異常がみられた。これは、細胞周期に関連して細胞の核が脳室面から脳表面に向かって上下運動をする radial glial cells (RGC) のエレベーター運動に影響しているためではないかと考え、放射状突起の状態について Nestin 抗体を用いた免疫染色により解析した。その結果、BPA 曝露群と対照群との間に差はみられなかった (Fig. 3)。

### 3. 4-OHT の胎児期曝露は神経幹細胞増殖能を低下させる

ニューロン新生の促進がみられたことから、神経幹細胞増殖能への影響の有無を確認するため、CldU 取り込み実験を行った。脳室帯、脳室下帯において発現がみられ、CldU 陽性細胞の割合はいずれの 4-OHT 曝露群においても有意 ( $p < 0.05$ , 0.01) に低下した (Fig. 4)。

#### 4. BPA の胎児期曝露は増殖中の神経幹/前駆細胞の減少を誘導する

神経新生の促進は、神経幹/前駆細胞の増殖に影響を及ぼしている可能性があるため、増殖中の細胞のマーカーであるKi67の抗体を用いて免疫組織染色を行った (Fig. 5)。ED14.5においてKi67陽性細胞の割合が有意に4-OHT曝露群の高用量において減少し ( $p < 0.01$ )、神経新生のタイミングが早くなることによって神経新生が促進されており、結果として増殖中の神経幹/前駆細胞が減少している (発現領域が減少) ことが示唆された。

#### 5. BPA の胎児期曝露はニューロンの移動に影響を及ぼさない

ED13.5生まれのニューロンの割合及びED15.5生まれのニューロンの割合について解析した結果、対照群との間に有意差が散見されたが、一定の傾向は認められないことから4-OHT曝露の影響とは判断しなかった (Fig. 7, 8)。さらにニューロンの絶対数を比較したが、対照群との間に差はみられなかった (Fig. 9)。

### D. 考察

昨年度の研究では、C57BL妊娠マウスにBPA (200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) を強制的に経口投与すると、胎児において神経新生を誘導することを報告した (Komada et al. 2012)、今回の報告では、ICRマウスを用いた4-OHT (0.5~50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ ) の皮下投与によりED14.5において、神経幹細胞の神経新生や増殖に影響がみられた。

4-OHTはBPAと同様にヒトのエストロゲン関連受容体 $\gamma$  (ERR $\gamma$ ) に非常に強く結合することが報告されている。ERR $\gamma$ は脳、心臓、肝臓など多くの臓器で発現しているが、胎盤、胎児脳でも発現し、特に胎児脳では多く、その生理作用および特性を明らかにすることはきわめて重要である。

我々のBPAの研究では、BPAはRGCとintermediate progenitor cells (IPC)の増殖を抑制し、分化を促

進しているが、ER $\beta$ はE16.5においては終脳背側の深層に発現している (Fan et al. 2006) ことから、RGCやIPCにおいて発現している可能性が考えられる。さらに、エストロゲンシグナルはRGCやIPCのstem cell nicheの維持に重要であることが報告されており (Wang et al. 2003)、4-OHTはBPAと同様にERのアゴニストとして働き、エストロゲンシグナルを異常に促進することによって神経新生を促進している可能性がある。

近年の細胞動態、形態、遺伝子の発現パターンの解析により、発生期の脳皮質においてRGC、IPCおよびouter radial glial cells (oRGC)の3種類の似た特徴を持つ神経幹/前駆細胞が同定されている。RGCは脳室面に主に分布し、対称分裂により自己複製を、非対称分裂によって神経細胞を産生している (Molnar et al. 2011)。IPCはRGCの非対称分裂によって産生され、転写因子であるTbr2を発現し、主にSVZに分布する (Noctor et al. 2004)。IPCは主に発生後期に脳皮質の2、3層の投射ニューロンを産生し、また脳皮質の進化における増大においても重要である。昨年度の実験においてBPAの曝露はIPCの神経新生に影響し、脳皮質の発生に影響を与えていることから、4-OHTについても詳細な解析が必要であり、特にヒトの脳の発生におけるリスク評価においては、IPCの異常を評価することは非常に重要であると考えられる。

先行実験のBPA曝露は神経新生に関与する遺伝子の発現に影響することが考えられる。basic helix-loop-helix (bHLH)を持つ転写因子は、活性型と抑制型の両方があり、抑制型にはHes1やHes5があり、主に神経幹細胞の維持やグリア新生に関与している。活性型はMash1、Mash2、Ngn2が存在し、神経新生の活性化に関与している。Nakamuraらによると、BPA曝露によりED14.5においてMash1とNgn2の発現が促進されており (Nakamura et al. 2006)、我々も未発表であるがMash1の発現がED14.5において増加していることを確認している。BPAはbHLHの活性型の転写因子によってMash1やNgn2の発現を活

性化し、神経新生を促進している可能性がある。  
4-OHT についても同様にこれらの遺伝子群の発現について検討を進めている。

## E. 結論

今回の研究では、4-OHT の胎児期曝露は皮質板の過形成を引き起こすことを認めた。この表現型は神経幹細胞の神経新生の促進により起こっており、それに伴う神経幹細胞の減少が観察された。これらの異常の原因は細胞周期の延長にあり、我々はこれらの異常が生後も維持され、神経機能の発達などに影響しているか否かを現在解析している。4-OHT の胎児期曝露は BPA と同様に細胞周期の異常を引き起こすことにより、大脳皮質の分化に影響していることが明らかになった。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nagao T, Komada M, Kagawa N.

Newly developed mouse newborn behavioral testing method for evaluating the risk of neurotoxicity of environmental toxicants. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2802.

Nagao T, Kagawa N, Saito Y, Komada M.

Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol.* (2012) doi:10.1002/jat.2766.

Komada M, Asai Y, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T.

Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* (2012) **295** (1-3):31-38

### 2. 学会発表

長尾哲二、井藤早紀、正見寛子、駒田致和

低用量ビスフェノール A のマウス子宮内曝露は新生児の出生直後の活動量に影響を及ぼす 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18～19 日、2012 年

溝端 彩、森佳奈美、駒田致和、長尾哲二

胎児期 4-ヒドロキシタモキシフェン曝露はマウス大脳皮質形成を障害する 環境ホルモン学会第 15 回研究発表会 東京、12 月 18～19 日、2012 年

駒田致和、浅井泰子、守井見奈、松木美知枝、佐藤真、長尾哲二

胎児期低用量ビスフェノール A 曝露は大脳皮質形成において神経新生を促進する 日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6～8 日、2012 年

長尾哲二、加川 尚、斎藤義明、駒田致和

合成エストロゲン剤のマウス胎盤傷害性と胚致死作用 日本先天異常学会第 52 回学術集会 東京、7 月 6～8 日、2012 年

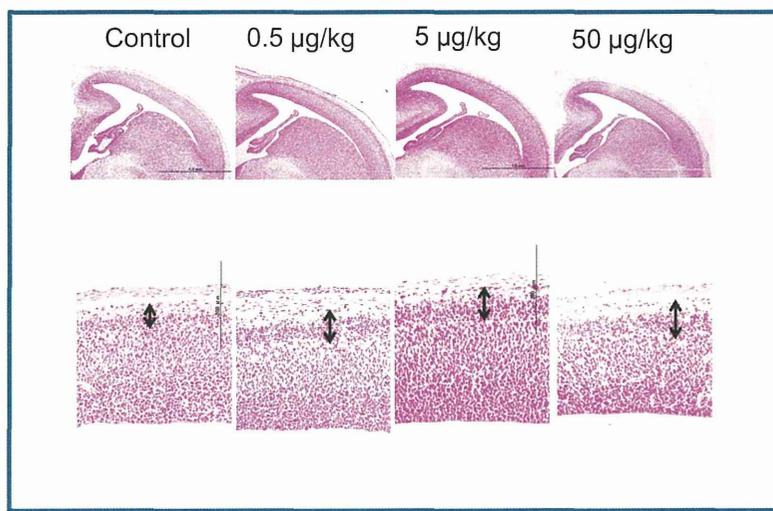


Fig.1 低用量4-OHTの胎児期曝露は皮質板の過形成を誘導する

低用量4-OHTの胎児期曝露による終脳背側の形態学的異常をED14.5マウス胎児を用いて解析した。対照群と比較して0.5 µg/kg以上の群では皮質板(矢印)の促進が進んでいる。Scale bar: 200 µm