

201329002A

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二  
平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二  
平成 26 (2014) 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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二  
平成 26 (2014) 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. 低用量暴露の標的臓器としての脳・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 の胎児期暴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

----- 61

渡邊 肇

3. 周産期低用量暴露による免疫影響評価

----- 83

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

----- 121

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

----- 147

菅野 純

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

----- 185

太田 亮

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 201

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 203

# 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)

(平成 25 年度)

研究代表者 長尾 哲二 近畿大学理工学部生命科学科 教授

## 研究要旨

本研究では、「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た。①発生・発達期の脳神経系及び免疫系に対する低用量暴露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発性影響」、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。さらに厚生労働省の「齧歯類一生涯試験法」を検証した。

その結果、①では低用量BPAの胎児期暴露による出生児の大脳皮質における層構造の異常を明らかにし、またER遺伝子の発現部位を可視化したマウスを作製し、脳内ER遺伝子発現の雌雄差を確認した。さらに妊娠期の胸腺細胞ではダイオキシン受容体を介したT細胞分化や機能に関与する遺伝子のエピジェネティックな影響が大きく関与し、ダイオキシン暴露によりその変動が大きくなることが判明した。②からは臍組織の未成熟な時期のDES暴露による長期的かつ不可逆的な応答にPten/PI3K/Aktシグナルが重要であることを明らかにした。また低用量BPA暴露によりnon-coding RNA Malat-1遺伝子ホモ欠失ES細胞を用いた発現増加解析からMalat-1は生体外物質から生体を防御していることが示唆された。一生涯試験法の検証では新生児DES暴露の影響は性成熟、体重推移、性周期及び内分泌系の器官重量にみられ、性成熟及び体重への影響は視床下部 - 下垂体 - 性腺軸の反応性に依存することが示唆された。

これらの成果と平成23及び24年度の成果から、周産期低用量暴露が引き起こす高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的な遅発性影響について、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず体系的かつ総合的な評価系を構築することができると考える。

## 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した。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暴露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発性影響」、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。①からは臓器～細胞レベルの遅発性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の確立を目指し、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した。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、厚生労働省「試験スキーム」の拡充を提案することとした。

## B. 研究方法

### B-① 低用量暴露の標的臓器（脳、免疫系）への影響、とくに遅発性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暴露による大脳皮質形成への影響（長尾）

*In vivo* 実験に layer marker を用いた免疫組織染色法及びチミジン類似物質ラベル法を適用して、低用量化学物質の胎児期暴露による神経細胞移動の障害による大脳皮質層構造の微小異常などを新生児期での検出のみならず成熟後の遅発性影響を検出する系の確立を目指した。さらに神経細胞分化への影響評価の「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た。

#### 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 ER レポーター (Tau-ER) マウスを作製することを目指した。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暴露し、ER の量的、機能的变化を観察して、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と同時に、B-①-1 と組み合わせることにより標的臓器への遅発性影響の同定においても解析確度の向上が期待できる。

#### B-①-3 周産期の低用量化学物質暴露による免疫影響評価（林）

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性影響の評価系完成を目指した。そこで妊娠期におけるダイオキシンの暴露が母体側の免疫システムにどのような影響を及ぼすかを検討するために、妊娠期における胸腺組織における遺伝子発現について解析した。

### B-② 「遅発性影響」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性影響標的分子としての DNA 修飾機構の解析（井口）

膈、子宮などの女性生殖管はその発生期にホルモン様化学物質に暴露されると遅発性影響が観察されることから、雌性生殖管（膈上皮）をモデルとした。雌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した。すなわち、周産期の化学物質暴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暴露によって誘導される組織異常の原因遺伝子の同定及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した。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 暴露マウスを用いて解析した。

#### 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。そこで Malat-1 ノックアウトマウスの作製を試みた。また、Malat-1 欠失 ES 細胞を用いた BPA の影響解析と Malat-1 遺伝子のプロモーター解析を行った。

次いで *in situ* hybridization 法により BPA 暴露したマウス胎児脳における Malat-1 遺伝子の発現を検索した。

また、OECD/WHO 対応として OECD 関連会合などに出席し、低用量効果、遅発性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った。

### B-③ 齧歯類一生涯試験法の改良、及び OECD 対応 (太田)

脳神経 - 内分泌 - 免疫系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」を検証するため、低用量の性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た。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性影響の再現性を確認する実験をさらに低用量域で試みた。

(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した。マウス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た。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した。

## C. 研究結果

### C-①-1 低用量暴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 暴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に BPA を経口投与し、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、出生児大脳皮質の第 6b 層の減少を明らかにしたとともに、低用量 BPA はニューロンの移動・分布に影響を及ぼすことも明らかにした。

また、*in vitro* 評価法の検討では、神経系細胞 (神経上皮細胞) への低濃度 BPA の長期暴露が神経分化に影響を及ぼすことを明らかにした。

### 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

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児を得た。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ので交配したところ、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。次いで、ER 発現細胞を可視化したマウスを解析して、大脳における雌雄差を確認し、また新生児期 DES 暴露によりその発現細胞数が変化することを明らかにした。

### 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

妊娠期の胸腺組織での T 細胞分化、増殖あるいはアポトーシスに関与する遺伝子群が大きく変動し、*in vivo* でのダイオキシン投与により、特定の遺伝子群の変化が観察された。

### 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

Pten CKO マウスの新生児期に DES を投与し、その遅発性影響を観察したところ、基底細胞あるいは重層扁平上皮細胞において Pten が過剰な PI3K/Akt シグナルを抑え、過形成 (腫瘍化) も抑えていることが分った。また、膈上皮細胞の ER は、その細胞増殖には影響はないが、角質化への分化に必須であることを明らかにした。

### 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

Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた解析から



Malat-1 は BPA に対して防御的に働いていることが示唆された。Malat-1 遺伝子のプロモーター解析から BPA により活性低下がみられた。また *in situ* hybridization 法では、マウス胎児脳における Malat-1 発現に BPA 投与の影響は認められなかった。

OECD 対応では、米国国立環境科学研究所に於いて開催された BPA 会合に出席し厚労科研の進捗状況の報告とともに、BPA 影響などについて情報交換を行った。

### 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

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、体重測定を実施した。性周期への明らかな遅発性影響は認められなかったが、BPA 投与により 14 週齢以降の雌に T 細胞分化の影響が観察され、また BPA、DES の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た。次いで DES を新生児に投与してみられた遅発性の性周期異常の誘発要因を明らかにするため、視床下部-下垂体-性腺軸の反応性が異なる系統を使用して検討した結果、遺伝的要因の関与が示唆された。

## D. 考察

脳・神経系の影響評価研究では、低用量 BPA の胎児期暴露により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ることも明らかにしたが、成熟後に行動などの高次脳機能に影響を及ぼすか否かを今後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、化学物質の毒性発現メカニズム解明のみならず、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」の開発に結びつく成果も得た。以上から、今回毒性学の分野に応用した高感度免疫組織化学的手法と細胞ラベリング法は胎児、新生児あるいは成熟期の脳神経系への低用量影響評価系として有用であると結

論される。

ER は大脳皮質形成に重要な役割を果たすため、本研究において ER 発現神経細胞を可視化したマウスの作製に成功したことは意義が大きい。このトランスジェニックマウスの新生児期に BPA などのホルモン様化学物質を暴露し、脳・神経系を中心とした ER 発現部位の変化を詳細に解析することが可能になったことから、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、さらに脳・神経系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 暴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。すなわち、本研究から妊娠期における胸腺組織での AhR を介した T 細胞分化や機能に関与する遺伝子のエピジェネティックな影響が大きく関与し、TCDD の暴露によりさらにその変動は大きくなることが判明した。

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、未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的応答（すなわち遅発性影響）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として Pten/PI3K/Akt シグナルの重要性を明らかにした。これらは今後、遅発性影響における、組織レベルでの女性ホルモン受容体の寄与を解析する上で重要な知見である。

遅発性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することを確認した。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作製を行い、キメラマウスを得た。さらに Malat-1 ホモ欠失 ES 細胞を用いた解析により、Malat-1 は生体外物

質から生体を防御していることが示唆されたことから、今後、低用量 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、この遺伝子が遅発性影響の分子標的の 1 つであるか否かが結論できると思われる。

さらに低用量域の BPA あるいは DES を用いた厚生労働省「齧歯類一生涯試験」の検証では性成熟ならびに性周期に遅発性影響がみられず、BPA 投与のみに T 細胞分化への影響が確認された。暴露マウスに抗体産生能の低下はこれまでのところみられていないが、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、大脳皮質の層構造異常など脳・神経系への遅発性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 (TG415) 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、周産期低用量暴露が引き起こす脳・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性影響を、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かつ科学的な基盤情報としての大きな意義を有する。

## F. 研究発表 (平成 25 年度)

Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, Komada M. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. *J Toxicol Sci.* (2014) *in press*

Nishimura Y, Nakai Y, Tanaka A, Nagao T, Fukushima N.

Long-term exposure of 3T3 fibroblast cells to endocrine disruptors alters sensitivity to oxidative injury. *Cell Biol Intl* (2014) *in press*

Kagawa N, Saito Y, Nagao T.

Early to middle gestational exposure to diethylstilbestrol impairs the development of labyrinth zone in mouse placenta. *Cong Anom* (2014) doi: 10.1111/cga.12031.

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.* (2013) 33:1514-1519

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

Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol* (2013) 33:1213-1221

Hotta K, Nashimoto K, Yasumura E, Suzuki M, Azuma M, Izumi Y, Shima D, Nabeshima R, Hiramoto M, Okada A, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Ito T, Ando H, Sakamoto S, Kabe Y, Aizawa S, Imai T, Yamaguchi Y, Watanabe H and Handa H.

Vesnarinone Suppresses TNF $\alpha$  mRNA Expression by Inhibiting Valosine-Containing Protein. *Mol Pharmacol.* (2013) 83: 930-938

Bergman Å, Heindel JJ, Kidd KA, Jobling S, Zoeller RT, Becher G, Bjerregaard P, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Kortenkamp A, Muir D, Ochieng R, Skakkebaek NE, Iguchi T, Toppari J and Woodruff TJ.

The impact of endocrine disruption: A consensus statement on the state of the science. *Environ. Health Perspect.* (2013) 121: A104-106

Bergman Å, Andersson AM, Becher G, van den Berg M, Blumberg B, Bjerregaard P, Bornehag C-G, Bornman R, Brandt I, Brian JV, Casey SC, Fowler PA, Frouin H, Giudice LC, Iguchi T, Hass U, Jobling S, Juu A, Kidd KA, Kortenkamp A, Lind M, Martin OV, Muir D, Ochieng R, Olea N, Norrgren L, Ropstad E, Ross PS, Rudén C, Scheringer M, Skakkebaek NE, Söder O, Sonnenschein C, Soto A, Swan S, Toppari J, Tyler CR, Vandenberg LN, Vinggaard AM, Wiberg K, Zoeller RT.

Science and policy on endocrine disruptors must

not be mixed: a reply to a “common sense” intervention by toxicology journal editors. *Environ. Health* (2013) 12, 69

Katoh T, Hayashi S, Iguchi T and Sato T.  
Epithelial-stromal interactions in the mouse vagina exposed neonatally to diethylstilbestrol. *In Vivo* (2013) 27:333-337

Miyagawa S, Sato M, Sudo T, Yamada G and Iguchi T.  
Unique roles of estrogen-dependent Pten control in epithelial cell homeostasis of mouse vagina. *Oncogene* (2014) *in press*

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* (2013) 190:578-585

Kondoh S, Inoue K, Igarashi K, Sugizaki H, Shirode-Fukuda Y, Inoue E, Yu T, Takeuchi JK, Kanno J, Bonewald LF, Imai Y.  
Estrogen receptor  $\alpha$  in osteocytes regulates trabecular bone formation in female mice. *Bone*. (2013) 60C:68-77

Kanno J, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Matsuda N, Morita K, Tsuji M, Moriyama N, Furukawa Y, Otsuka M, Tachihara E, Nakatsu N, Kodama Y.  
Oral administration of pentachlorophenol induces interferon signaling mRNAs in C57BL/6 male mouse liver. *J Toxicol Sci.* (2013) 38:643-654

Si Y, Inoue K, Igarashi K, Kanno J, Imai Y.  
Autoimmune regulator, Aire, is a novel regulator of chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.*(2013) 437(4):579-584

Fujimoto, N, Takagi, A, Kanno, J.  
Neonatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases the mRNA expression of prostatic proteins in C57BL mice. *J Toxicol Sci.* (2013) 38(2):279-283

## 2. 学会発表 (2011~2013)

河内宏太、長尾哲二

低用量ビスフェノール A はマウス大脳皮質異常と新生児行動異常を誘発する 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 東京、12 月、2013

年

Komada M, Nagao T.  
Behavioral abnormalities and neocortical structure anomalies in newborn mice induced by chemical exposure during the embryonic period.  
日本先天異常学会 第 53 回学術集会 東京、7 月、2013 年

福嶋伸之、西村侑華、長尾哲二  
神経系細胞への低濃度ビスフェノール A の長期曝露は神経分化に影響を及ぼす Neuro2013 京都、6 月、2013 年

Ohta Y, Miyagawa S and Iguchi T.  
External genitalia development in male and female rats given flutamide in utero. SETAC Europe 23rd Ann. Meet. Glasgow, UK, May 12-16, 2013.

宮川信一、佐藤優、井口泰泉  
マウス膺上皮における Pten の役割 第 84 回日本動物学会 岡山、9 月、2013 年

太田泰彦、村田清香、宮川信一、井口泰泉  
妊娠中に投与したフルタミドの雄ラット生殖輸管系への影響 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 東京、12 月、2013 年

Jun Kanno, Progress in Japanese Percellome Project and incorporation of TGP data, 11th International Conference of Environment Mutagens (11th ICEM), (2013.11.4) , Fos do Iguassu, Brazil, invited

菅野 純  
受容体シグナル毒性としての内分泌かく乱化学物質の影響について 第 86 回日本内分泌学会学術総会 仙台、教育講演 (招待)、4 月、2013 年

太田亮、根倉司、大向英夫、新藤智子  
Hatano 高および低回避雌ラットの性成熟、性周期および体重推移に及ぼす新生児期ジェチルスチルベストロール曝露の影響 環境ホル

モン学会第16回研究発表会 東京、12月、2013年

## G. 知的財産権の取得状況

### 1. 特許取得

特許第5177712号、2013年1月18日登録、特許権者：国立医薬品食品衛生研究所、NTT データ、発明者：菅野純、相崎健一ら、「競合的ハイブリダイゼーションにおける遺伝子データの補正方法及び補正装置」

柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」特願2012-148848、出願日 2012年7月2日（出願中）

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願2012-158343、出願日2012年7月17日（出願中）

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## 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)

（平成 25 年度）分担研究報告書

## 低用量暴露の標的臓器としての脳・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 の胎児期暴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 近畿大学理工学部生命科学科 教授  
研究協力者 駒田致和 愛知学院大学歯学部 助教

**研究要旨：**低用量化学物質の胎児期あるいは新生児期暴露により誘発される大脳皮質形成異常の組織学的検出法の確立を目的とした。これまでの研究から、低用量の化学物質（ビスフェノール A：BPA、4-ヒドロキシタモキシフェン）の胎生期暴露が神経分化の促進を引き起こし、大脳皮質の発生に障害を引き起こすことを報告した。そこで今年度は、神経細胞の移動障害など大脳皮質の層構造に着目した解析を出生児について行った。妊娠中に低用量 BPA を経口投与して自然分娩で得られた新生児の大脳皮質において第 6b 層の低形成を認めた。そこで layer marker を用いた免疫組織染色により BPA 投与群の第 6b 層における Nurr-1 陽性細胞の減少を確認し、チミジン類似物質を用いた birth-date analysis により胎児期に生まれたニューロンの大脳皮質における分布と数の変化を認めた。これらから、低用量 BPA の胎児期暴露により、新生児に大脳皮質の層構造異常が誘発され、layer marker による解析及び birth-date analysis は、低用量 BPA による大脳皮質形成異常の組織学的検出法として有用であることが明らかになった。

#### A. 研究目的

ヒトは通常的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暴露が中枢神経系の発生異常、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暴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暴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低用量化学

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。そこで本年度は、大脳皮質の層構造構築に及ぼす低用量ビスフェノール A の影響について、胎児期低用量暴露マウスの生後間もない時期の大脳皮質の層構造異常の有無を layer marker を用いて検討し、さらに胎児期に生まれたニューロンの生後における大脳皮質での分布を明らかにして、これら組織学的検査法が低用量化学物質暴露による大脳皮質形成異常の検出系として有用であるか否かを結論することを目的とした。

## 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、夕刻に雌雄1:1で同居させ、翌朝、膣栓が確認できたものを妊娠が成立したとして実験に供した。膣栓が確認できた日を胎齢0日(E0)とした。

### 2. 投与液と投与計画

ビスフェノールA(BPA, Sigma)を0.5% CMC-Na溶液で懸濁し、E6~18に連続して強制的に経口投与した。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(PM12:00~12:15)に投与した。投与量は2、20及び200 µg/kg 体重/dayとした。陰性対照群は無処置動物を用いた。また、陽性対照として既知の神経発生毒性物質のメチルニトロソ尿素(MNU, Sigma)をE13(マウスにおける小頭症誘発の臨界期に相当)に5 mg/kg 体重腹腔内投与した。いずれの妊娠動物も自然分娩させて出生児を得た。出生日(分娩日)を出生0日(P0)とした。

また、神経細胞の分布を観察するために、E14にCldU 50 mg/kg 体重(E14生まれの神経細胞)を、E16にIdU 50 mg/kg 体重(E16生まれの神経細胞)を、それぞれ腹腔内投与し増殖中の細胞を標識した。

### 3. 組織サンプルの作製

P3に雄3匹、雌3匹の新生児を麻酔下にて断頭により放血致死させて脳を摘出し、PLP固定液を用いて4℃で終夜固定してPBSで洗浄した。常法により、海馬の形態などを基準に矢状断の同レベルのパラフィン切片(5 µmの厚さ)を作成し、以下の一般染色による組織観察及び蛍光免疫組織染色を行った。

### 4. 大脳皮質の組織観察

HE染色及びNissl染色を用いた一般染色により大脳皮質の層構造の異常の有無を観察した。

### 5. 免疫組織染色

5-1. Layer markerを用いた大脳皮質の層構造の解析

Layer markerによる免疫染色に先駆け、HE染色及びNissl染色を用いた一般染色により大脳皮質を観察した。次いで、layer markerには第6b層のマーカースとしてNurr1及びCTGF、4/5層のマーカースとしてTie4、2/3/4層のマーカースとしてCux1を用いた。以下のlayer markerを用いて大脳皮質の各層を染色して層構造の異常の有無を解析するために蛍光免疫組織染色を行った。

Anti-CTGF (Layer 6b) Santa Cruz (Sc14939)、Anti-Nurr1 (Layer 6b) R&D System (AF 2156)、Anti-Foxp2 (Layer 6) Abcam (ab 36788)、Anti-Cux1 (Layer 2, 3, 4) Santa Cruz (Sc13024)、Anti-Tie4 (Layer 4) Santa Cruz (Sc13377)

5-2. Birth-date analysisによる神経細胞分布の解析

本解析法により特定の時期(E14とE16)に生まれた神経細胞が、生後間もない(P3)新生児の大脳皮質のどの層を形成しているかを明らかにした。1次抗体には、rat monoclonal anti-BrdU (CldU) (Oxford Biotechnology)、mouse monoclonal anti-BrdU (IdU) (Becton Dickinson)を用いた。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。次いで大脳皮質を3区画(前・中・後)に分けて、それぞれの区画については100 µmの幅で脳室面から脳表面までを5等分(①~⑤)した。区画ごとにCldU及びIdU陽性細胞数、DAPI染色細胞数をカウントした。

## C. 研究結果

### 1. 大脳皮質の病理組織学的変化

HE 染色及び Nissl 染色を用いた一般染色により、BPA 200 µg/kg 投与群の P3 新生児の大脳皮質層、特に第 6b 層の低形成が観察された (図 1)。

### 2. 大脳皮質の層構造変化

Nissl 染色により、特に第 6b 層の低形成が観察されたことから、layer marker を用いた免疫組織染色を行った。その結果、BPA 200 µg/kg 投与群において Nurr1 陽性細胞が対照群と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した (図 2)。Cux1 陽性細胞及び Tle4 陽性細胞については MNU 投与群においてそれぞれ有意 (いずれも  $p < 0.01$ ) に減少あるいは増加したが、BPA 投与群と対照群との間には統計学的有意差はなかった (図 3)。

### 3. 大脳皮質における神経細胞分布

#### 3-1. Inside-out pattern の確認

Birth-date analysis により特定の時期に生まれた神経細胞が、生後間もない新生児の大脳皮質のどの層を形成しているかを明らかにした。その結果、対照群において遅生まれの細胞 (E16 生まれの神経細胞) が早生まれの細胞 (E14 生まれの神経細胞) の上層に位置する、いわゆる「inside-out」のパターンを取っていることを確認した。同様に BPA 投与群においても inside-out のパターンが確認できた。しかし、MNU 5 mg/kg 投与群では E14 及び E16 生まれの細胞が無秩序に局在して層構造の明らかな乱れが確認できた (図 4)。

#### 3-2. 大脳皮質の全細胞に対する神経細胞の割合

E14 生まれの神経細胞の割合を区画 (①~⑤) ごとに対照群と比較した結果、BPA 投与群に有意差が散見されたが、神経細胞の分布に大きな差はみられなかった。一方、MNU 5 mg/kg 投与群では対照群と比較して著しい差がみられた

ことから E14 生まれの神経細胞の移動と分布に障害が生じていることが明らかとなった (図 5 左列)。

同様に E16 生まれの神経細胞の割合を区画 (①~⑤) ごとに対照群と比較した結果、BPA 投与群に有意差が散見されたが神経細胞の分布に大きな差はみられなかった。一方、MNU 5 mg/kg 投与群において対照群と比較して著しい変化がみられたことから E16 生まれの神経細胞の移動と分布に障害が生じていることが明らかとなった (図 5 右)。

以上から MNU 5 mg/kg の胎児期投与 (E13) は E14 および E16 生まれの神経細胞の分布に異常を誘発するが、200 µg/kg までの BPA の胎児期投与 (E6-18) は E14 および E16 生まれの神経細胞の分布に軽微な変化を及ぼすが、層構造の明らかな乱れなどの異常を引き起こす神経細胞分布の変化は示さないことが示唆された。

#### 3-3. 陽性細胞の数

E14 生まれの神経細胞は対照群において区画①、② (脳表面に近い部位) に多く局在していることを確認した。BPA 投与群においても同様の傾向がみられたが、大脳皮質のいずれの観察部位においても神経細胞の数は減少傾向にあった。MNU 投与群ではいずれの観察部位においても陽性細胞数は著しく減少し、区画①~⑤に均一にわずかに局在していることを確認した (図 6 左列)。また、E16 生まれの神経細胞は対照群では区画①に多く局在していることを確認した。BPA 投与群において同様の傾向がみられたが大脳皮質のいずれの観察部位においても減少傾向にあった。MNU 5 mg/kg 投与群では区画①~⑤に点在していることが確認できた (図 6 中央列)。さらに区画ごとの全細胞数 (C1dU 及び IdU 陽性細胞数 + DAPI 染色細胞数) については、BPA 200 µg/kg 投与群及び MNU 投与群ともほぼ全区画において対照群と比較して減少した (図 6 右列)。

区画①~⑤の細胞について、E14 及び E16 生まれの全神経細胞および DAPI 染色細胞を合わ



せた総細胞数を求めた (図 7)。その結果、BPA (20、200 µg/kg/day) 及び MNU 投与群の全神経細胞数に対照群と比較して有意な減少 ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ) がみられた。

#### D. 考察

低用量の BPA 胎児期投与により、自然分娩により得られた生後間もない新生児の大脳皮質の層構造に異常がみられた。birth-date analysis では顕著な影響は確認されなかったが、各層ごとの解析あるいはより細かく領域分けをした解析を行えば有意な差が得られる可能性があると考えられる。Layer marker により確認された異常は層の欠如など大きな変化ではなく、低形成あるいは減少など微細な変化であり、これらの層の器質的異常が行動など高次脳機能に影響しているか否かを判断することは本研究では難しいが、新生児期の自発行動を支配するネットワークを同定し、その自発行動の異常の原因となる脳の器質的及び機能的異常の検出を目指すことは重要である。本研究の組織学的解析により大脳皮質の第 6b 層の低形成がみられたことから、そこを足場に大脳皮質に投射する tyrosine hydroxylase 陽性のドーパミン作動性ニューロンの変化を解析し、減少している証拠を我々は得ている。さらに、新生児の生後間もない時期にみられる行動の異常について電子上皿天秤を用いた新生児行動試験法を現在開発している。これらの試みから、低用量ビスフェノール A 暴露による大脳皮質の発生・発達に及ぼす影響の神経発生毒性学的評価が可能となる。

#### E. 結論

低用量 BPA の胎児期暴露は、皮質板の肥厚を誘発し、大脳皮質の神経新生に影響を及ぼし、層構造の形成に異常を引き起こす。これらの異常は新生児期にも継続して観察されており、組織学的解析から大脳皮質の第 6b 層の低形成が確認された。以上から、layer marker による蛍光免疫組織染色及び birth-date analysis

による胎児期に生まれた神経細胞の移動による大脳皮質層構築の観察は、低用量 BPA による大脳皮質形成異常の組織学的検出法として有用であることが明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文 (平成 25 年度)

Nagao T, Kawachi K, Kagawa N, Komada M. Neurobehavioral evaluation of mouse newborns exposed prenatally to low-dose bisphenol A. *J Toxicol Sci*, (2014) *in press*

Nishimura Y, Nakai Y, Tanaka A, Nagao T, Fukushima N.

Long-term exposure of 3T3 fibroblast cells to endocrine disruptors alters sensitivity to oxidative injury. *Cell Biol Intl*, (2014) *in press*

Kagawa N, Saito Y, Nagao T.

Early to middle gestational exposure to diethylstilbestrol impairs the development of labyrinth zone in mouse placenta. *Cong Anom* (2014) doi: 10.1111/cga.12031.

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* (2013) 33:1514-1519

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

Developmental effects of oral exposure to diethylstilbestrol on mouse placenta. *J Appl Toxicol* (2013) 33:1213-1221

##### 2. 学会発表 (平成 25 年度)

河内宏太、長尾哲二

低用量ビスフェノール A はマウス大脳皮質異常と新生児行動異常を誘発する。

環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 東京、12 月 12～13 日、2013 年

福嶋伸之、西村侑華、長尾哲二

神経系細胞への低濃度ビスフェノール A の長期曝露は神経分化に影響を及ぼす Neuro2013

京都、6月、2013年

Komada M, Nagao T.

Behavioral abnormalities and neocortical structure anomalies in newborn mice induced by chemical exposure during the embryonic period. The Japanese Teratology Society 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, Osaka, July 21-23, 2013

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

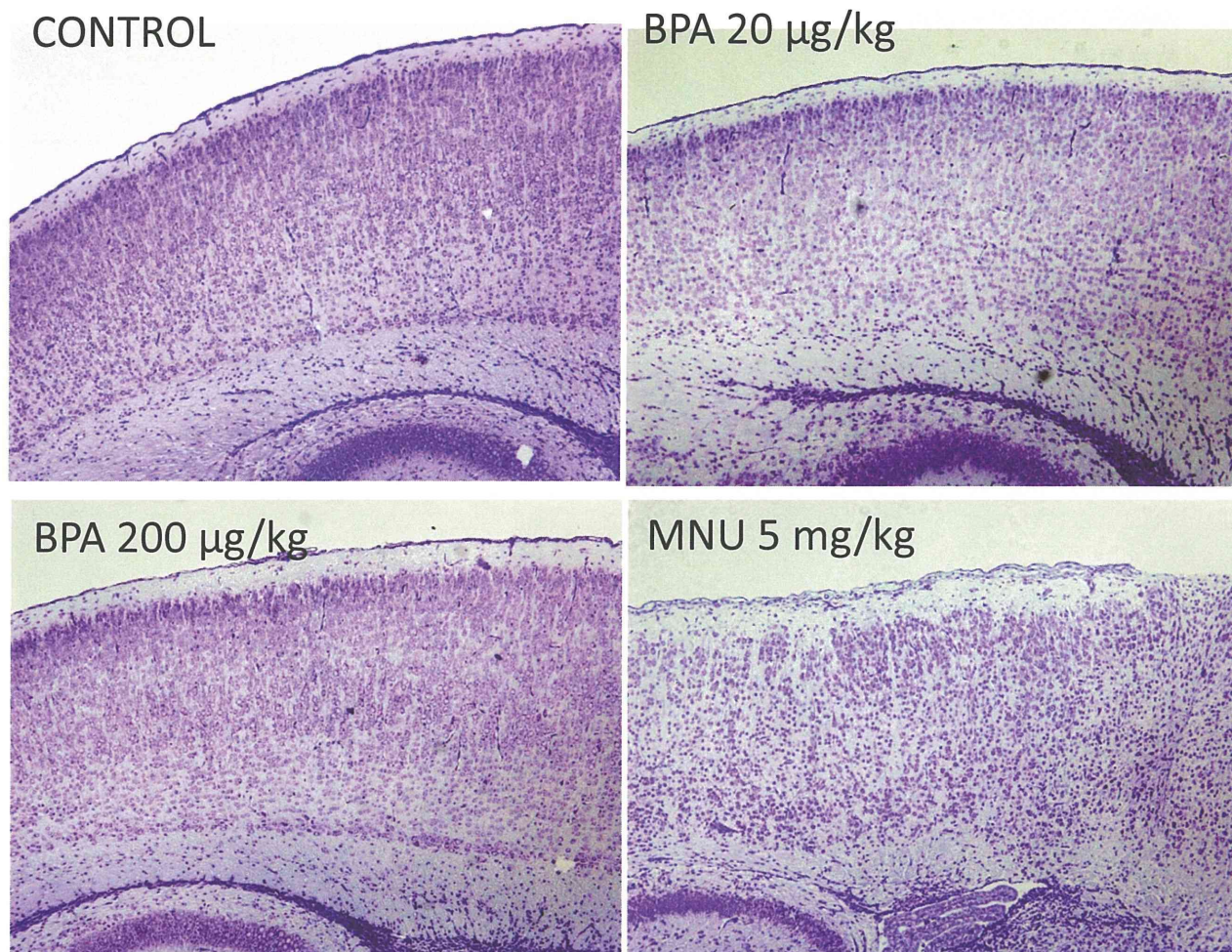


図1. 胎児期BPA投与による生後3日新生児の脳皮質(Nissl染色)  
BPA 200 μg/kg投与群において脳皮質層第6b層の低形成が観察された。

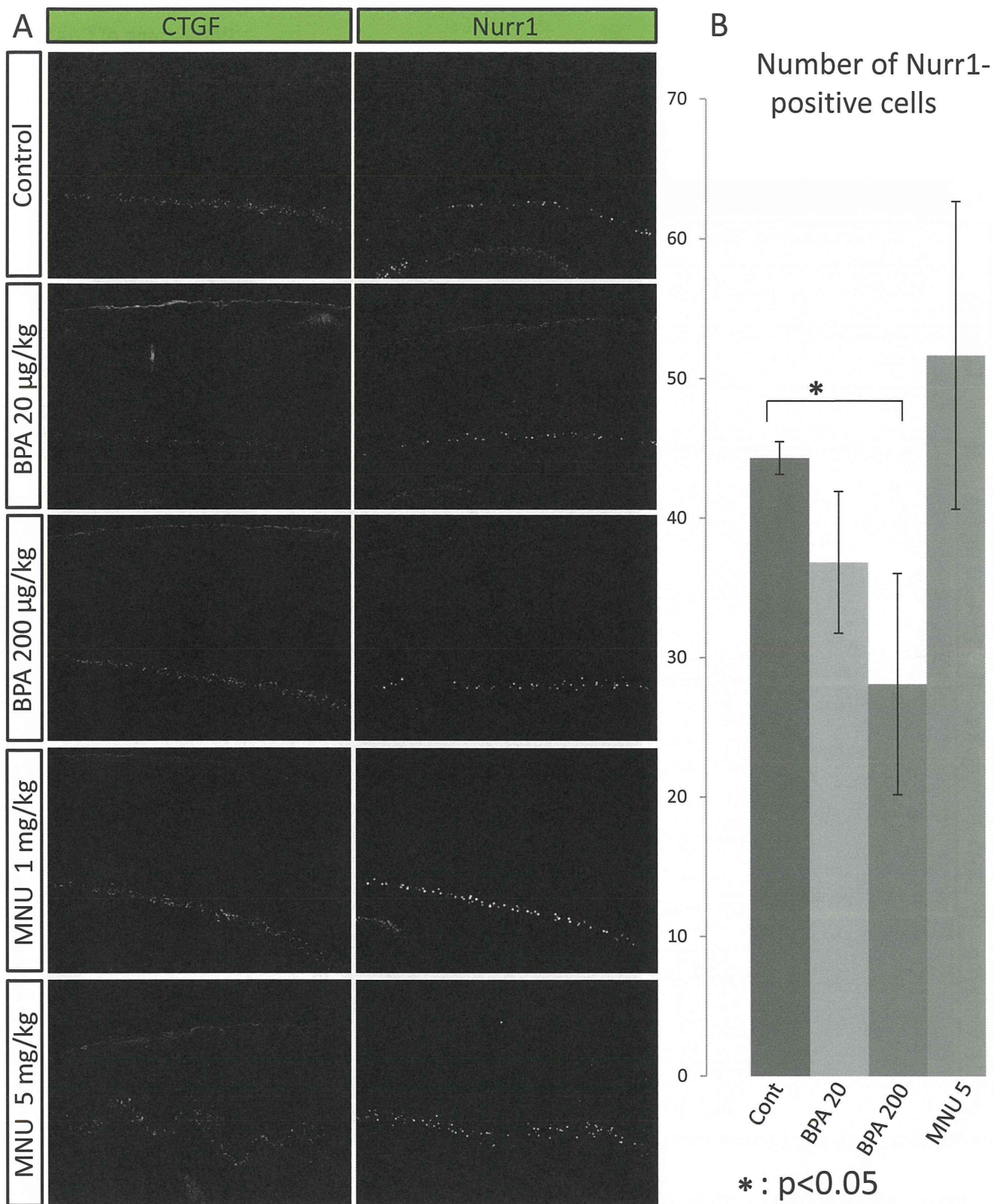


図2. 胎児期BPA投与による生後3日新生児のlayer markerによる  
 大脳皮質解析 (CTGF, Nurr1)  
 BPA 200 µg/kg投与群においてNurr1陽性細胞が有意に減少した。