

図3. 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 (Cux1, Tle4)

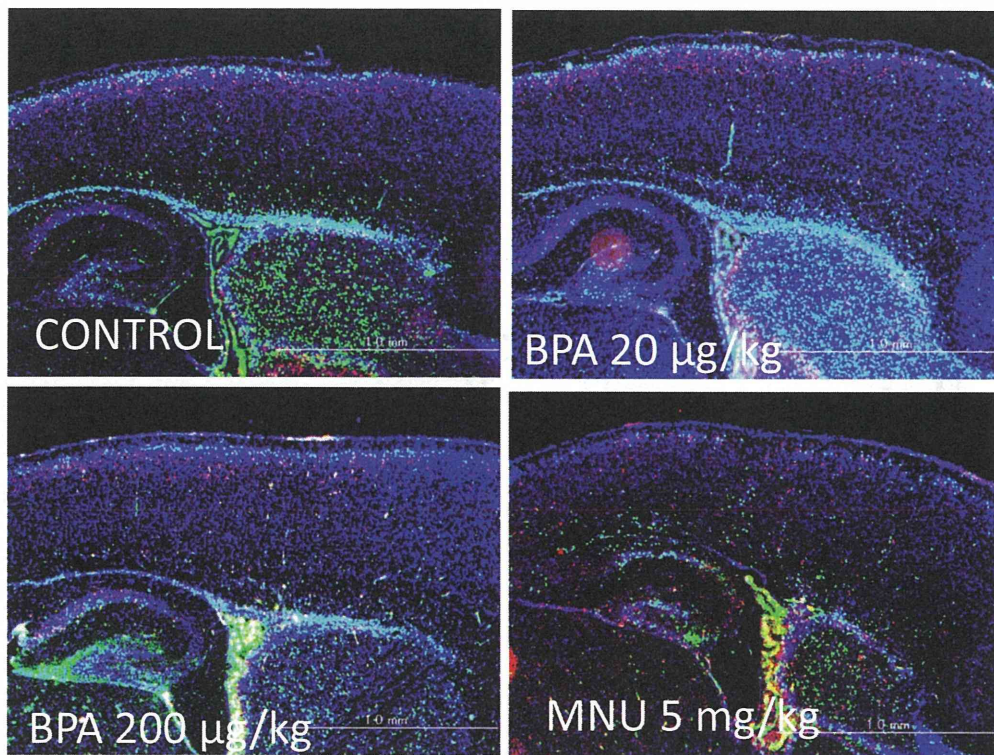


図4. E14及びE16生まれの神経細胞の生後3日新生児の脳皮質における分布

Birth-date analysisにより胎児期生まれの神経細胞を追跡し、対照群及びBPA投与群では神経細胞の分布にinside-out patternを確認した。MNU投与群では著しい脳皮質形成の異常による層構造の乱れが観察された。

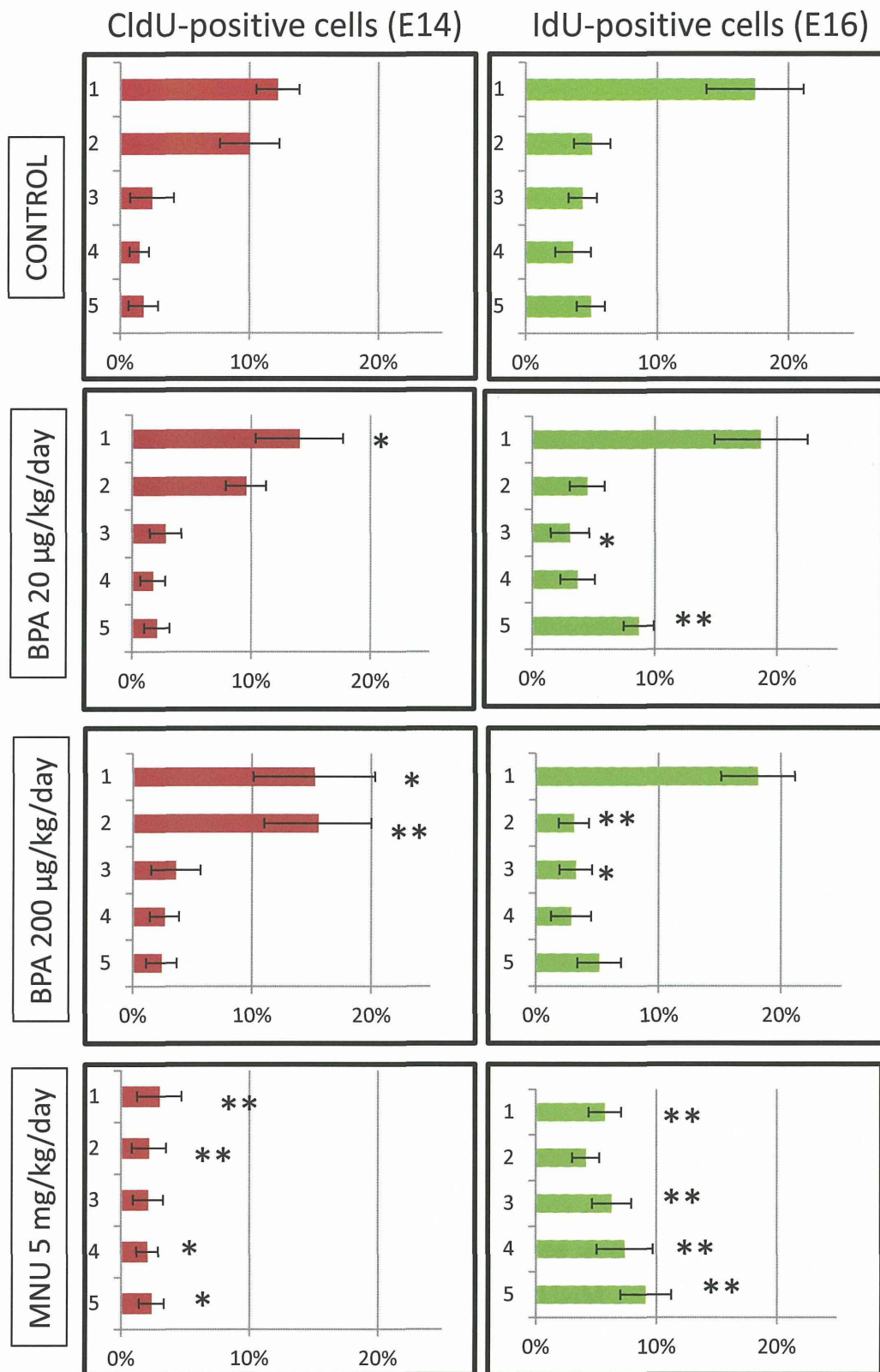


図5. Birth-date analysisによる神経細胞の分布
 区画ごとにE14生まれとE16生まれの神経細胞の割合を
 求めた。BPA投与群では対照群との間に有意差が散見
 され、MNU投与群では著しい影響がみられた。

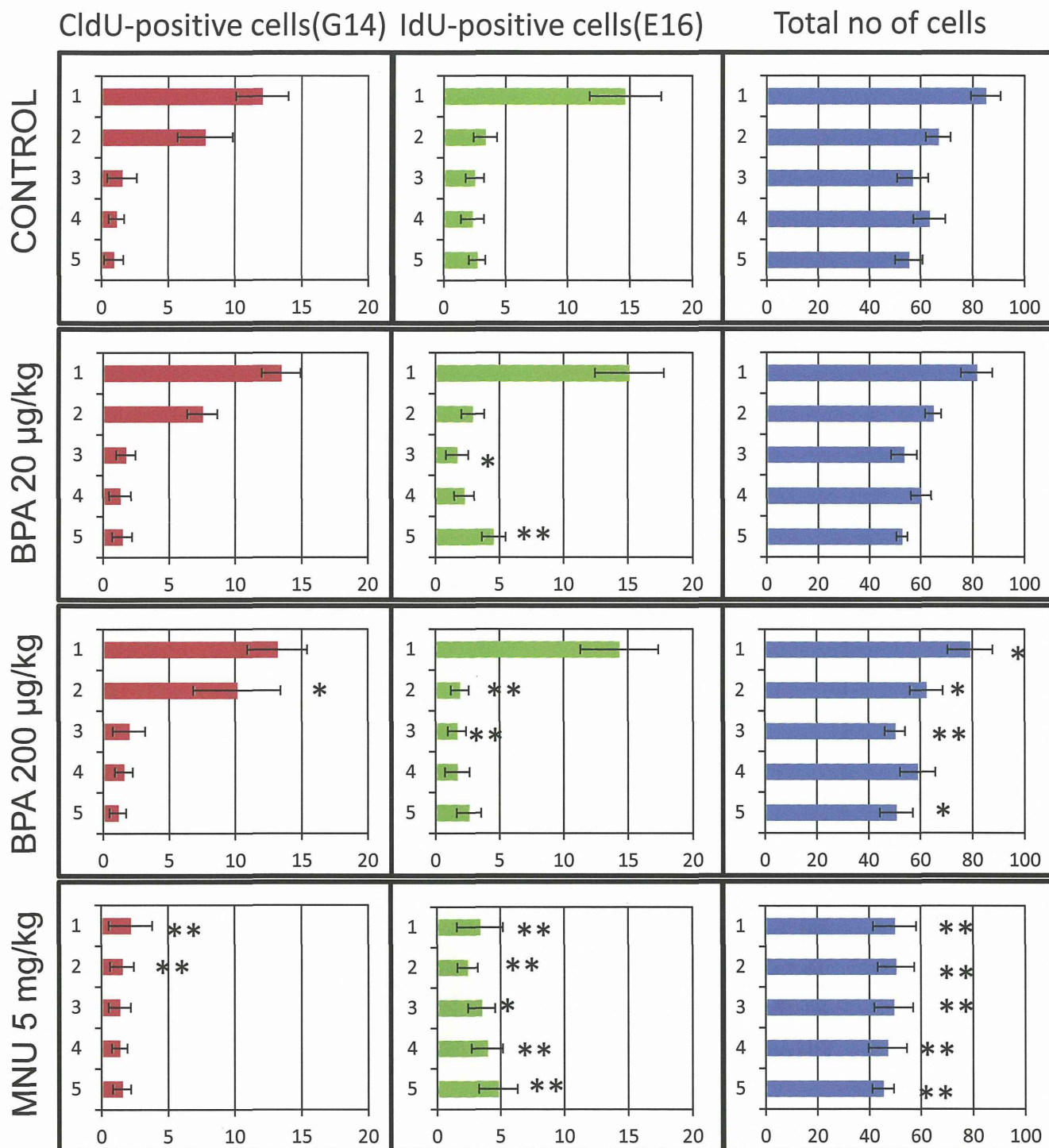


図6. Birth-date analysisを用いたE14あるいはE16生まれの各区画の神経細胞数
 区画ごとの全細胞数についてはBPA 200 µg/kg投与群及びMNU投与群の全ての区画において減少した(右列)。

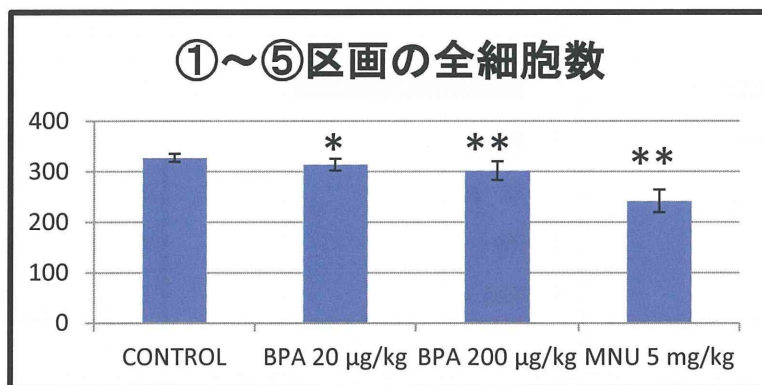


図7. 全ての区画の細胞を合計したE14及びE16生まれの全神経細胞及びDAPI染色細胞を合わせた総細胞数
BPA及びMNU投与群の全細胞数が減少した。

平成25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. 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

長尾 哲二 近畿大学理工学部・生命科学科
福嶋 伸之 近畿大学理工学部・生命科学科
駒田 致和 愛知学院大学歯学部・解剖

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/新生児期暴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・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

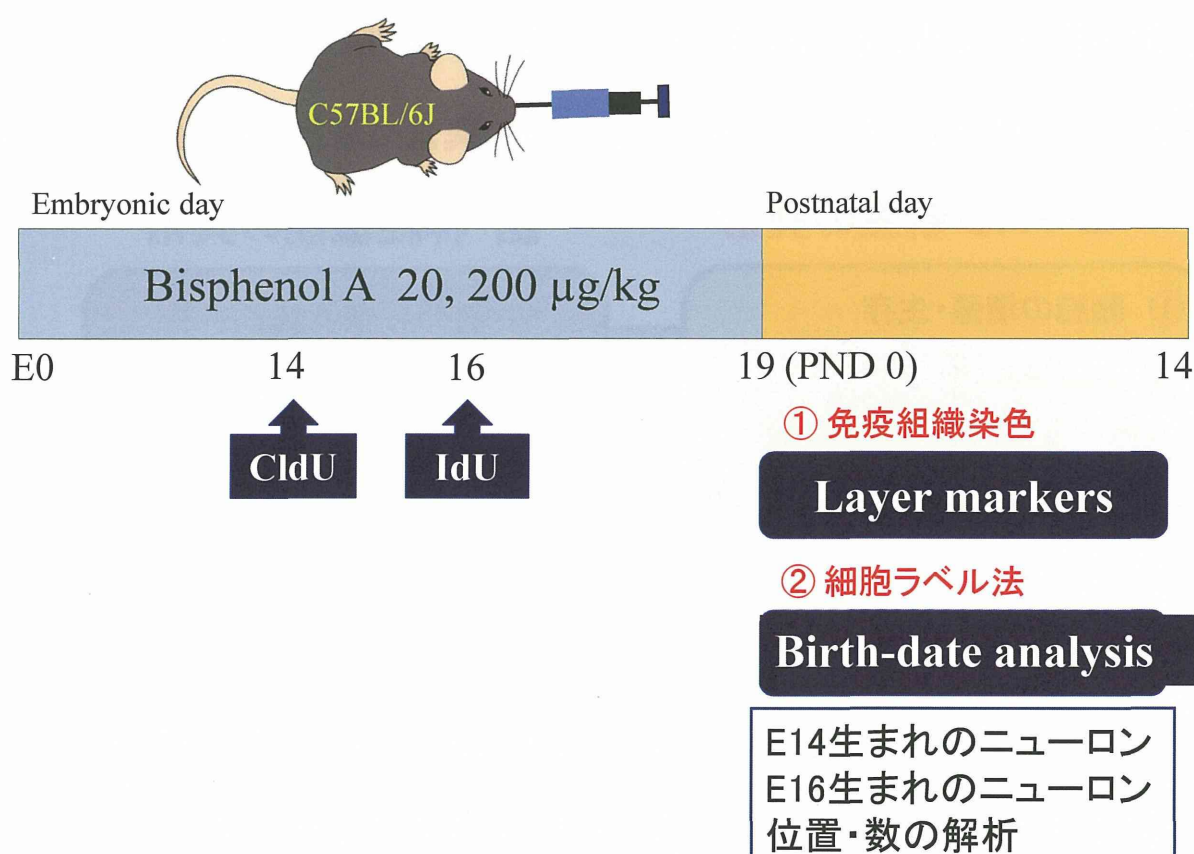
- 低用量化学物質の胎児期/新生児期暴露による影響を検出する組織学的評価法の確立
- 化学物質暴露モデル動物の確立
→異常が検出された動物の表現型を解析し、ヒトへの影響の予測モデルとする

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

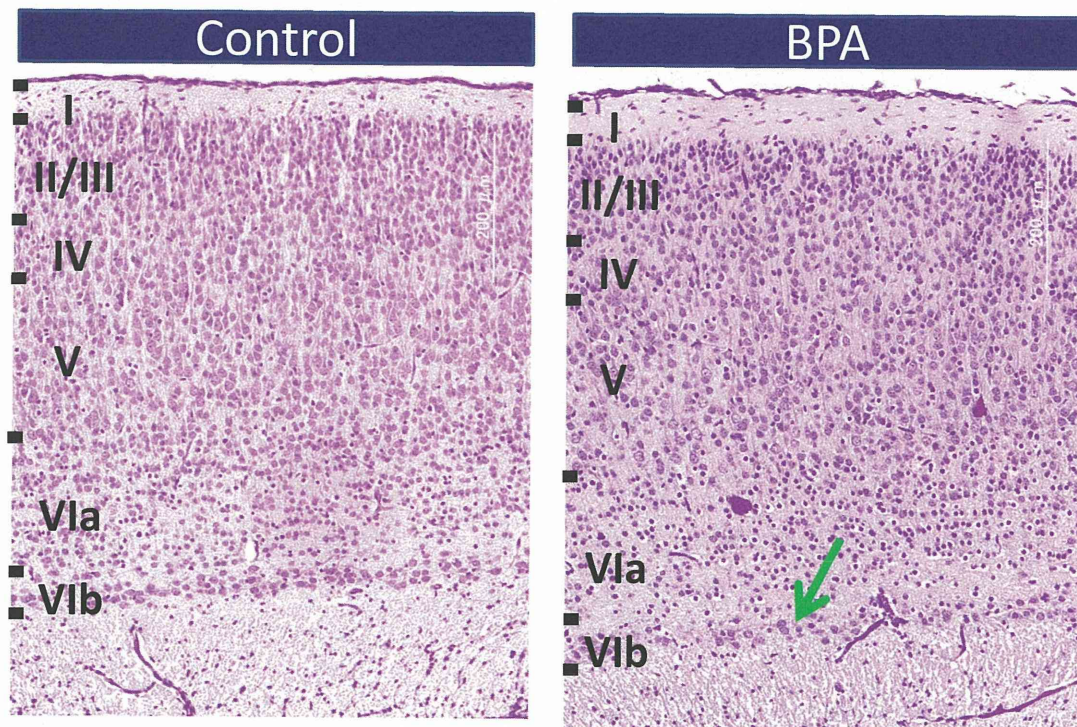
【平成25年度】

Layer markerを用いた免疫組織染色および細胞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ニューロン移動の障害による大脳皮質の層構造の微小異常を検出する系の確立を目指した。

Methods

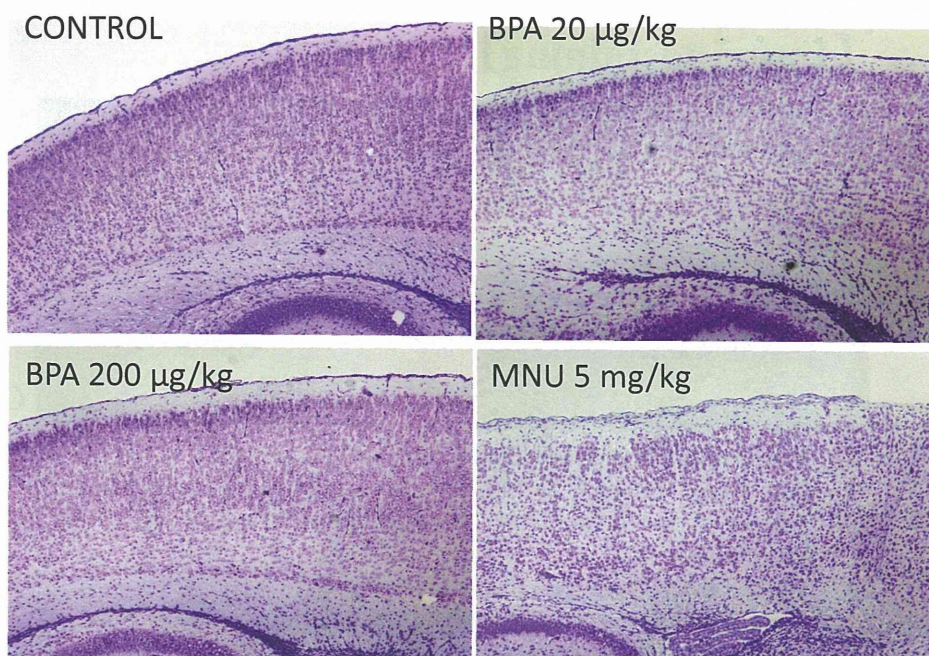


PND3マウス新生児の大腦皮質層構造【HE染色】



マウスの妊娠6～18日にBPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ を強制的に経口投与して、自然分娩により得られた新生児の生後3日の大腦皮質(矢状断) BPA投与群の第6層、特に6b層に低形成がみられた(矢印)。

PND3マウス新生児の大腦皮質層構造【Nissl染色】



BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群において大腦皮質層第6b層の低形成が観察された。

表現型の評価 【HE, Nissl染色組織像】

① 第6層(特にb)の異常について

Subplate neuronが局在する領域で、細胞数が少ない。

第6a層についても、Neuronの数が少ない。

→この領域は視床へと投射する(皮質視床路)ため、その経路の異常も予想できる(双方向に投射が起こるため、どちらも解析する価値がある):c-fosによる神経ネットワーク形成の解析

② 第5層について

錐体細胞が多数存在するため大きな核のNeuronがある
この細胞の数が減少している。

③ 全体を通して

小さな核の細胞(グリア細胞)が増加しているように見える。

特に、第6層で顕著であるがほかの細胞が減少しているため、相対的にそのように見える可能性もある。

Nurr1 induces [tyrosine hydroxylase](#) (TH) expression

Layer markersとして使用した抗体

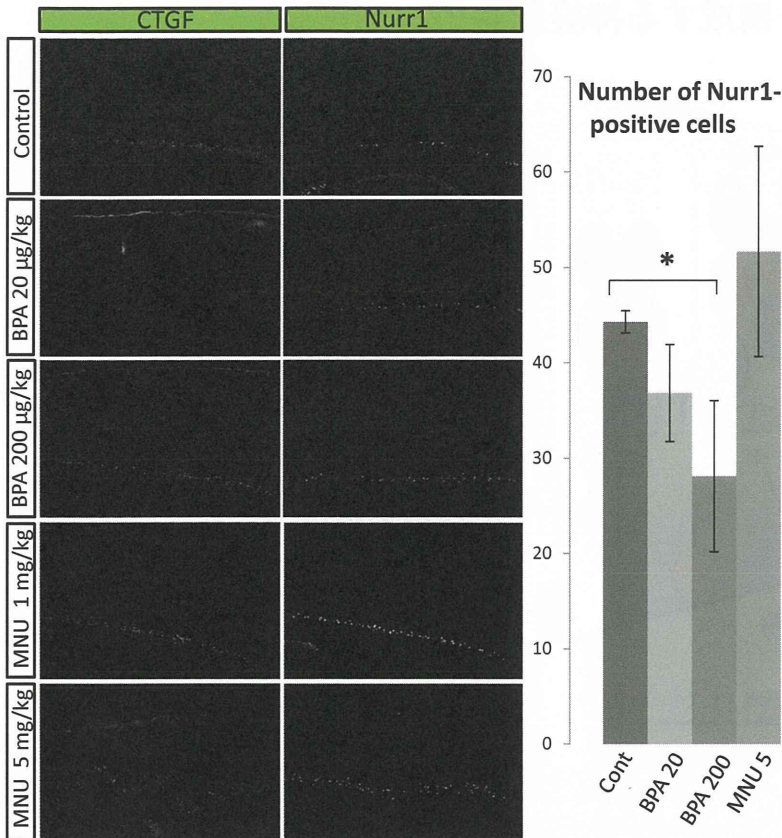
【Immunostaining】

抗体名	Expression layer	メーカー
1. Anti-CTGF	Layer 6b	Santa Cruz
2. Anti-Nurr1	Layer 6b	R&D System
3. Anti-Foxp2	Layer 6	Abcam
4. Anti-Cux1	Layer 2,3,4	Santa Cruz
5. Anti-Tle4	Layer 4,5	Santa Cruz

1. Connective tissue growth factor: Matricellular protein
2. Nur-related factor 1 :NR4A2, maintenance of the dopaminergic system of the brain. Nurr1 induced tyrosine hydroxylase (TH) expression.
3. Forkhead box protein P2 (Nucleus, Probably)
4. Cut-like homeobox 1 protein: Golgi apparatus membrane protein
5. Transducin-like enhancer protein (Nucleus)

本研究では上記抗体を用いて、大脳皮質の各層を染色することにより層構造の異常の有無を解析した。検出はすべて蛍光免疫組織染色により行った。

Layer markerによる大脳皮質解析 【CTGF, Nurr1】



Nuclear receptor related 1 protein (Nurr1)

Nurr1 is a member of the nuclear receptor family of intracellular transcription factors.

Nurr1 plays a key role in the maintenance of the dopaminergic system of the brain.

Nurr1 induces tyrosine hydroxylase (TH) expression, which eventually leads to differentiation into dopaminergic neurons.

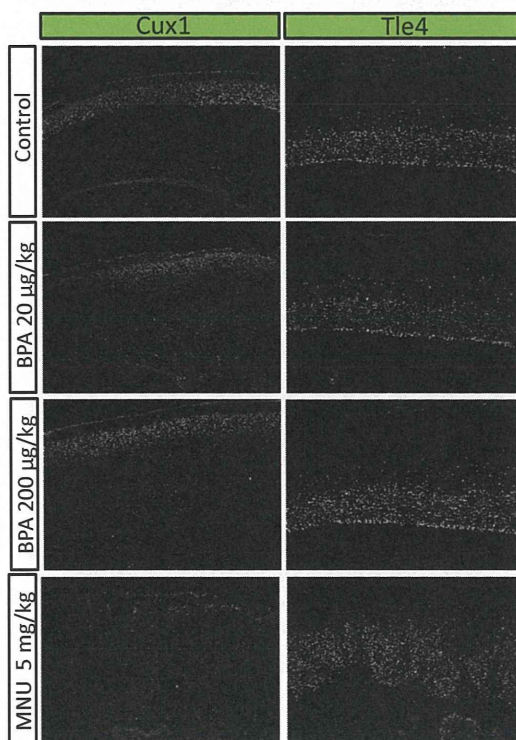


大脳皮質に投射するTH陽性のドパミン作動性ニューロンの減少を確認している。

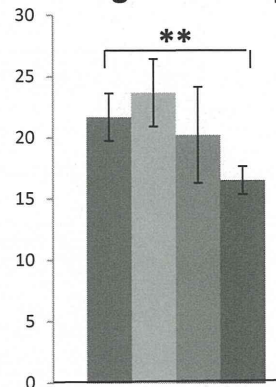
BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群においてNurr1陽性細胞が有意に減少した。E6~18にBPAを強制的に経口投与し、自然分娩にて得られた新生児の生後3日にサンプリングした。

* $P < 0.05$

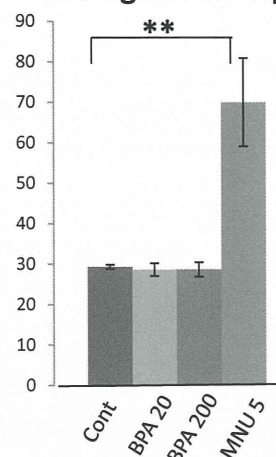
Layer markerによる大脳皮質解析 【Cux1, Tle4】



Percentage of Cux1-positive area



Percentage of Tle4-positive area



* $P < 0.01$