

研究成果報告書（研究要旨）

研究課題名	ビスフェノール A による神経発達毒性の新たな評価手法の開発 (課題番号：0902) (研究期間：平成 21 年度～平成 23 年度)
主任研究者名	所属：東京大学大学院医学系研究科 氏名：遠山 千春 (研究課題番号：0902)

妊娠期への微量の化学物質曝露による中枢神経系への影響を見逃さず検出し、その質と程度を明らかにするためには、個体レベルの現象を発達期の一点だけを見るのではなく、発達時系列的变化を捉えることができる評価手法を開発することが必要である。

本研究では、低用量曝露によつての発達障害を引き起こすことが報告されているビスフェノール A (BPA) をモデル化学物質とし、脳の微細形態の発達形成とこれに及ぼす影響を捉える現象把握型のアプローチによる影響評価手法の構築を目的とした。神経細胞の微細形態を観察するため、神経細胞がまばらに光る Thy-1XFP マウスの毒性実験への適用可能性を検討し、これを用いることで BPA 曝露が発達期の大脑海馬における微細形態を変化させることを見出した。また子宮内電気穿孔法により新生ニューロン特異的に蛍光遺伝子を導入して可視化することで、大脳形成過程を評価する技術を毒性実験に適用し、BPA 曝露により大脳皮質の神経細胞移動に異常が生じていることを見出した。

さらに、微細形態解析で影響が検出された海馬各領域の遺伝子発現解析を行い、BPA 毒性メカニズムに関わる候補遺伝子を絞り込むことができた。

以上の結果から発達期の BPA 低用量曝露は大脳の形成に異常をもたらす可能性があることが示された。個体レベルでの行動試験により得られた異常現象を微細形態レベルで理解するうえで基盤となる知見をうることができた。

研究成果報告書（本体）

研究課題名	ビスフェノールAによる神経発達毒性の新たな評価手法の開発 (研究期間：平成21年度～平成23年度)
主任研究者名	所属：東京大学大学院医学系研究科 氏名：遠山 千春（研究課題番号：0902）

I 研究の全体計画

1 研究期間

平成21年～23年（3年間）

2 研究目的

化学物質のリスク評価のための毒性のエンドポイントとして、OECDガイドラインに基づく一般毒性、発がん性、変異原性、生殖・繁殖毒性などが用いられてきた。しかし近年、妊娠中の曝露により母体に影響が出ない用量で、仔の生殖・脳機能・免疫機能に影響が顕れることが報告された。これらの化学物質は、ダイオキシン、メチル水銀、BPA、フタル酸エステルなど様々である。しかしこのような低用量影響に関する報告の多くは、逆U字型の量・反応曲線に従うために特定の用量に特異的であったり、あるいは設定した用量数が少なく用量依存性の検証が行われていないために影響の程度を評価することが難しい場合がほとんどである。

また、特に神経発達に関する研究には、ごく限られたエンドポイントに着目したメカニズム解明タイプの実験が多い。エンドポイントとして用いられた例として、神経細胞の移動促進、性腺摘出条件下での性ホルモンにより誘導されるシナプス形成の抑制、グリア細胞数の増加などである。このような研究は、個々の化学物質の作用メカニズムの解明のためには重要なアプローチだが、これらエンドポイントが毒性学的に意味があるかどうか、あるいは、リスク評価に用いることができるかどうかを判断するためには、別途検討が必要である。影響を見逃さず検出し、その質と程度を明らかにするためには、個体レベルの現象を包括的・網羅的に捉える評価手法を開発することが必要である。

一方、脳科学の基礎研究分野では、これまで脳の形態学的変化はないとみなされてきた統合失調症やうつ病などの精神疾患において、大腦形成時の細胞形態異常や微細形態の変化が有ることがイメージング解析技術の進歩により相次いで発見されている。微細形態の変化は記憶形成に重要なことも明らかとなり、このような脳の形態形成を組織学レベル、微細形態学レベルで解析することは、ヒトの脳機能異常に直接結びつくものと期待できる。その際、数百～千億個の脳細胞に対する影響を見逃さずに評価するためには、効率的かつ

精密に解析するための工夫が必要である。

そこで本研究では、第一に、現象として的大脑形成過程に着目し、神経系細胞の分化・移動、脳領域の構築、シナプス形成などの微細形態の形成といった指標を網羅的・包括的に解析した。これにより、リスク評価のために「脳形成にどの程度の影響が顕れるか」を科学的に示す評価手法の確立を目指した。第二に、学習機能や精神機能と密接な関わりをもつグルタミン酸情報伝達系に弱目した対象細胞の可視化を行った。グルタミン酸情報伝達系は記憶・学習に重要であることは以前より知られており、さらにごく最近になってヒトの統合失調症、双極性障害や重度のうつ病の患者脳で発現が低下していること、自閉症患者での発現異常が相次いで報告されており、ヒトの脳機能異常に直結した分子マーカーとしても期待できるためである。第三に、低用量曝露によつての脳の発達障害を引き起こすことが報告されているビスフェノール A (BPA) をモデル化学物質とし、脳とその微細構造の形成という「現象」を捉える現象把握型のアプローチを採った。影響を見逃さず検出し、その質と程度を明らかにすることを目指した影響評価手法の構築を目的とした。

3 研究内容及び方法等

(1) 研究内容及び方法

1) 曝露シナリオに基づいた曝露動物の作成

BPA を対象化学物質として、C57BL/6 系統ならびに ICR 系統のマウス、thy1-GFP マウス(後述)を用い、妊娠期・授乳期の混餌曝露を行い(妊娠 8 日目から 18 日目まで、0, 40, 400 $\mu\text{g/kg/day}$ 相当量の BPA を飼料に混ぜて曝露)、仔動物の脳を、胎仔期、授乳期、成熟期において解析した。影響が出ることが確認されている用量のダイオキシンを胎仔期・授乳期に曝露した動物を用いることにより、試験系が正しく作動していることを確認するためのコントロールとした。なお、本研究は評価手法の構築が主目的であるため、手法の大部分を結果欄に記載している。同じく、曝露実験の詳細な条件も「方法欄」にはなじまないため、結果欄に都度、記載している点に留意されたい(BPA 曝露条件はすべて上記のとおりである)。

2) 分子マーカーによる可視化と形態解析

対象細胞を分類して解析するため、文献調査ならびに我々が独自に得た研究成果に基づき分子マーカーを用いて細胞を可視化し、形態変化の解析を行った。顕微鏡的解析はすべて Stereo Investigator ステレオロジー解析システム(設置済み)を用いた。ステレオロジー理論は解剖組織学の構造情報を正確かつ効率的に定量化するための理論であり、Nature 誌・Science 誌など主要雑誌では既に推奨法となっている。効率的かつ精密な定量分析によ

り、発達時の経時的变化を網羅的に捉えることができる。

実験動物として、遺伝子改変動物 thy1-GFP マウス (G. Feng 博士、Duke 大学から供与) を用いた。

また、胎児の発生期の神経細胞に対し、時期・領域特異的に遺伝子導入を行う「子宮内電気穿孔法(IUE)」を用いて、大脳発生期において神経細胞を蛍光標識し、細胞動態を検証した。

3) レーザーマイクロダイセクション (LMD) 解析と毒性メカニズムの検討

申請者はこれまでに、LMD により生体組織の蛍光免疫染色切片から回収した組織中 RNA 回収率を劇的に向上させることに成功した(Immuno-LMD 法)。本研究ではこの Immuno-LMD 法を用い、神経組織学的・微細形態学的な影響が生じた細胞(集団)のみを回収し、その特異的な遺伝子発現変動を解析した。必要に応じて in vitro 系の実験(神経系細胞の分化とシナプス形成)を行った。その際は個体レベルでの大脳形成や微細形態解析と in vitro 系の結果を対応させることを最重要課題として、動物実験代替法のための基礎的知見を提供することを目指した。

4) まとめ

脳の形態形成を組織細胞レベル・微細形態レベルで包括的に解析するリスク評価のための影響評価手法を確立して提示することを目指した。ビスフェノール A の胎仔期・授乳期の低用量曝露が脳の発達に及ぼす影響についての科学的知見を提供することを目指した。

(2) 研究体制

本研究ではすべての研究項目を、主任研究者と研究室のスタッフが行った。研究項目 1「曝露シナリオに基づいた曝露動物の作成」では、曝露シナリオに基づき、妊娠・授乳期の実験動物に BPA を曝露し、曝露動物の作製を行う。併行して研究項目 2「分子マーカーによる可視化と形態解析」ならびに研究項目 3「レーザーマイクロダイセクション (LMD) 解析と毒性メカニズムの検討」において評価手法の開発を進めた。研究項目 1 で作成した BPA 曝露動物を用いた解析により、評価手法の開発ならびに検証を行った。

4 倫理面への配慮について

動物実験は、東京大学の規則に則り、医学系研究科動物実験委員会の承認のもとに行った。遺伝子組み換え実験は、認定宿主-ベクター系を用いた同定済み DNA 組み換え実験を行った。本研究に携わる者は、あらかじめ東京大学が定める動物実験従事者および組換

え DNA 実験従事者の講習を受けた。

5 当初計画からの変更点

(1) 初年度の間評価結果を踏まえた変更点

LMD 法についての検証実験、BPA ならびに TCDD の毒性影響に関するメカニズム検討に重点配分した。

(2) 2年目の中間評価結果を踏まえた変更点

我々は BPA 曝露によりマウス海馬のスパイン密度低下が生じていることを見出した。これまでに、Yale 大学 C. Lenanh 教授らが、サルにおいて BPA がスパイン密度を低下させることを報告している (PNAS, 105:14187-14191, 2008)。しかし、この結果は、女性ホルモンを枯渇させた状態で観察された表現型であり毒性影響なのか、それとも特殊な条件下での生体反応なのか、リスク評価の際に疑問が残っていた。我々のマウスにおける結果は、通常の生育条件の中での BPA 曝露が脳発達に影響を及ぼすことを示す新たな知見である。同時に、前頭葉や扁桃体など他の脳領域よりも海馬において影響が顕著であることを確認した。加えて LMD 法の進展により、DG や CA 領域をそれぞれ別に回収して遺伝子発現の解析ができることになったことから、海馬に絞り込んだ微細形態・LMD の発達時系列解析を進め、個々の実験項目の現象を結びつけることに重点をおいた。

II 研究成果報告

1 主な研究成果

(1) 研究項目ごとの研究成果

1) 曝露シナリオに基づいた曝露動物の作成

文献調査とこれまでの我々の行動試験の結果にもとづき、曝露シナリオに基づいた曝露条件を検討した。その結果、本研究で用いる主な曝露条件として、妊娠 8 日目から妊娠 18 日目までの 11 日間、母マウスに対して 0 または 40, 400 $\mu\text{g/kg/day}$ の BPA を毎日投与することに決定した。この条件に基づいて曝露動物の作製を行い、以下の成果を得た。

2) 分子マーカーによる可視化と形態解析

グルタミン酸系を中心に興奮性神経シナプスが終止するスパインに着目して thy-1 XFP マウスの検討を行ったところ、微細形態解析に有望なラインを見出し毒性実験に適用した。BPA 曝露影響として、発達期の大脳海馬における微細形態変化を見出した。また in utero electroporation (IUE)法により新生ニューロン特異的に蛍光遺伝子を導入して可視化することで、大脳形成過程を評価する技術を毒性実験に適用した。BPA 曝露影響として、大脳皮質の神経細胞移動に異常があることを見出した。以上の結果から、発達期の BPA 低用量曝露は大脳の形成に異常をもたらす可能性があることが示された。

3) LMD 解析と毒性メカニズムの検討

LMD 法をさらに発展させ、領域をそれぞれ別に回収して遺伝子発現の解析ができるようになったことから、毒性実験への適用を行った。BPA 曝露影響の毒性メカニズムの検討としては、発達期の大脳におけるグルタミン酸受容体関連遺伝子等の変動を見出した。これをもとに網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行い、複数の候補遺伝子を得た。微細形態解析で影響を見出した海馬における LMD 解析により、BPA 毒性メカニズムに関わる候補遺伝子を絞り込むことに成功した。

4) まとめ

影響評価手法の構築としては、毒性実験としては初めてとなる、Thy-1 GFP マウスを用いた微細形態解析、IUE 脳形成過程解析、LMD 解析を適用することに成功した。BPA 胎仔期・授乳期の低用量曝露が脳の発達に及ぼす影響についての科学的知見として、BPA は特に大脳の形成に異常をもたらす可能性があることを微細形態レベル、分子レベルで示す新たな知見を得ることができた。

(2) 全体の研究成果

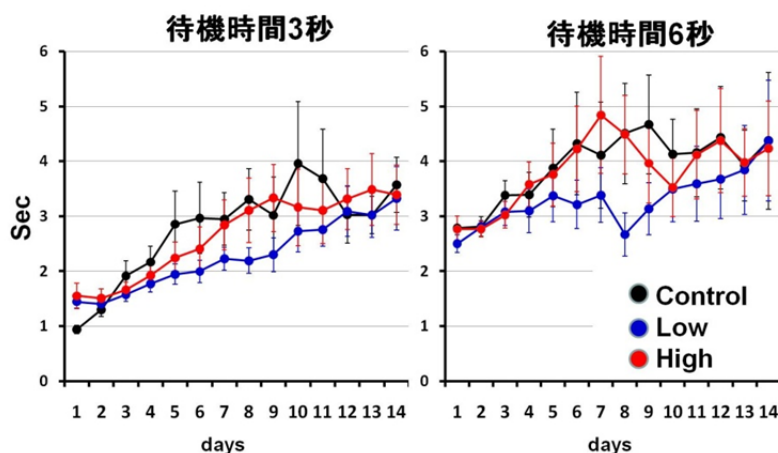
1) 全体の研究成果の要旨

本研究では、低用量曝露によつての発達障害を引き起こすことが報告されているビスフェノール A (BPA) をモデル化学物質とし、脳の微細構造の形成とこれに及ぼす影響という現象を捉える現象把握型のアプローチによる影響評価手法の構築を目的とした。毒性実験としては初めてとなる、Thy-1 GFP マウスを用いた微細形態解析、IUE 脳形成過程解析、LMD 解析を適用することに成功した。そして手法の検証ならびに、BPA 胎仔期・授乳期の低用量曝露が脳の発達に及ぼす影響についての科学的知見の提供をめざし、BPA 発達神経毒性を調べた。その結果、BPA の発達期低用量曝露は、脳の形成に異常をもたらす可能性があるという新たな知見を得ることができた。

2) 研究成果の詳細

1. 曝露シナリオに基づいた曝露動物の作成

文献調査ならびにこれまでの我々の研究報告や行動試験等の成果をもとに、曝露シナリオに基づいた BPA 曝露条件を検討した。総合的に判断し、本研究で用いる主な曝露条件として、妊娠 8 日目から妊娠 18 日目までの 11 日間、母動物に対して 0 または 40, 400 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の BPA を毎日投与することに決定した。これをもとにした曝露条件で我々は行動レベルでの異常も見出しており (参考図)、また本報告で示すような毒性表現型を複数見出しているため、この条件設定は正しかったといえよう。



参考図 1.マウスは、指定された場所 (窪み) に鼻を入れる (ノーズポーク反応) ことで報酬 (飲み水) を得ることができる。この試験では、最初のノーズポーク反応から 3 または 6 秒以上待機してから次のノーズポーク反応をしないと報酬が得られない。すべての実験群で反応間の間隔 (Y 軸) は日を追うごとに長くなった。しかし BPA 低用量曝露群 (40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$; Low) は、待機時間 3 秒の場合でも 6 秒の場合でも、反応間の間隔が長くなるのが対照群よりも遅かった。衝動性が亢進し、待つことが苦手になっていることが示唆された。

2 分子マーカーによる可視化と形態解析

マウスの脳には数百～千億個の神経細胞があると推定され、これら全てを解析するのが

不可能なことは、細胞数自体が推計でしか示されていないことから明らかである。さらに神経細胞 1 個当たり約 10,000 個のシナプスを持つので、微細形態の解析ではさらに計測対象を絞り込み、精緻な解析を行っていく必要がある。そこで本研究では、分子マーカーを標識として解析の対象を絞り込み、効率的かつ精緻な形態解析を行う技術の検討を行い、結果として二つの有望なアプローチを見出した。

Thy1-GFP マウスを用いた微細形態解析手法の整備： 第一のアプローチは、遺伝子改変動物 thy1-GFP マウスの使用である。このマウスは、神経細胞特異的に蛍光色素を発現する遺伝子改変動物である (Feng et al. Neuron 28:41-51, 2000)。Thy1 GFP マウスでは、細胞体だけでなく神経線維やスパイン (神経線維にある微小な棘状の部分。ほとんどすべての興奮性シナプスはこのスパインに連絡している) にも蛍光発現があるため、ゴルジ染色をせずとも微細形態解析が可能である。Thy1-GFP マウスは複数のラインが作成されており、ラインごとに蛍光発現する神経細胞群が異なる。Stereo Investigator ステレオロジー解析システムにより検討を行ったところ、解析に有効なラインを選定することができた (図 1)。

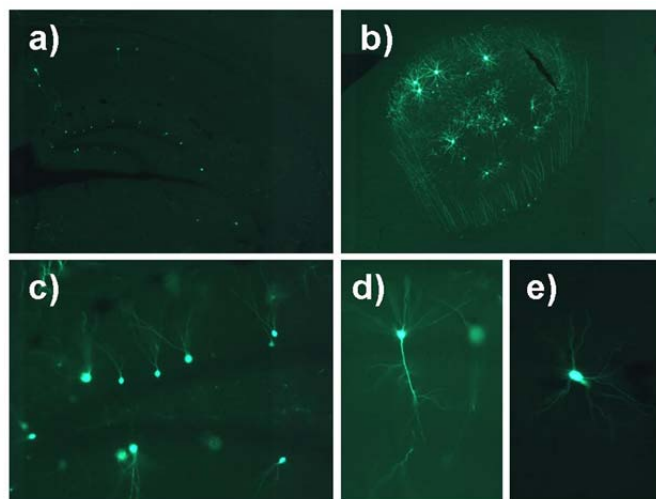


図 1. Thy1-GFP マウスの脳切片標本例。Thy-1 プロモーターは神経細胞で強く活性化されるので、このマウスでは、神経細胞特異的に蛍光色素 XFP を発現する。さらに thy1 は、染色体に組み込まれる部位に依存して活性化が異なる性質を持つ。その部位は不規則なので、トランスジェニックマウスの line ごとに表現型が異なる。(a) M-line は低発現 line であるが (写真は 5×対物レンズ相当)、(b) 神経細胞間の走行を捉えやすい (写真は 5×対物レンズ相当)。(c) どの神経線維がどの細胞体から伸び出しているかを検討するのに適している (写真は 20×対物レンズ相当)。(d) 錐体細胞と (e) 介在細胞の分類も容易に行うことができる。

IUE 法による大脳形成過程解析手法の整備： 第二のアプローチは、in utero electroporation(IUE)法を用いた大脳発生期における神経細胞の蛍光標識による可視化である。特定の胎生期に神経前駆細胞に蛍光タンパク (GFP) の遺伝子導入を行い、新生ニューロンの位置・形態の定量的解析を行うことができる。IUE 法を用いて個体間 (実験群間) の差を定量的に求めるためには、組織切片の分析エリアをシステムチックに決定する必要がある。そこで本研究では、DAPI 細胞核染色と神経細胞マーカー MAP2 の二重染色により、大脳皮質板内を 10 区画(bin)に分けるプロトコルを確立した (図 3)。神経細胞は皮質深層において新生し発達にそって表層に移動してゆく。これまで研究者

の目視判断に頼っていた区画分けを再現性高く行うことで、神経細胞の移動の様子の定量評価の信頼性を向上させることができた（図 3, 4）。

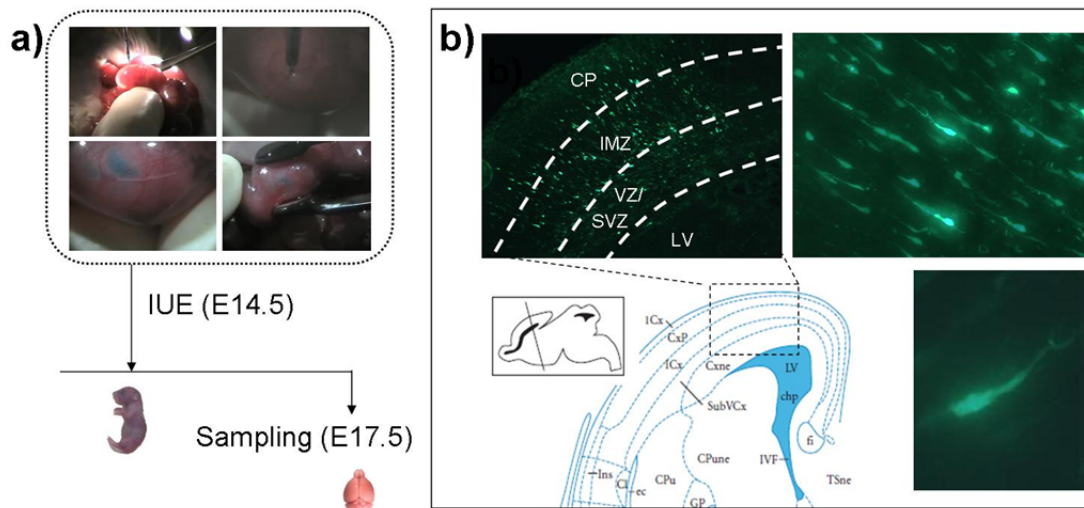


図 2. IUE 法によるマウス胎仔脳室帯（VZ）神経前駆細胞群への遺伝子導入。(a) 胎生 14.5 日目（E14.5）に妊娠マウスを開腹し、子宮の外側より胎仔の側脳室（LV）に任意のプロモーター、遺伝子配列を持つプラスミド（溶液）を注入する。その後子宮外から電気パルスを加えることで脳室帯（VZ）に局在している神経前駆細胞（NPC）特異的に遺伝子導入を行う。その後子宮を体内に戻し閉腹する。(b)発現効率の確認の為、手術の 72 時間後（E17.5）に子宮内より取り出した胎仔の脳をサンプリングし、脳を固定・薄切（冠状断）した。E14.5 に遺伝子導入された NPC より発生したニューロンの位置・形態が蛍光タンパク（GFP）により同定出来ることがわかる。VZ/SVZ の NPC より発生したニューロンは、72 時間のうちに中間帯（IMZ）→皮質板（CP）と移動していく。移動中のニューロンが進行方向に突起を伸ばしているのが確認できる。

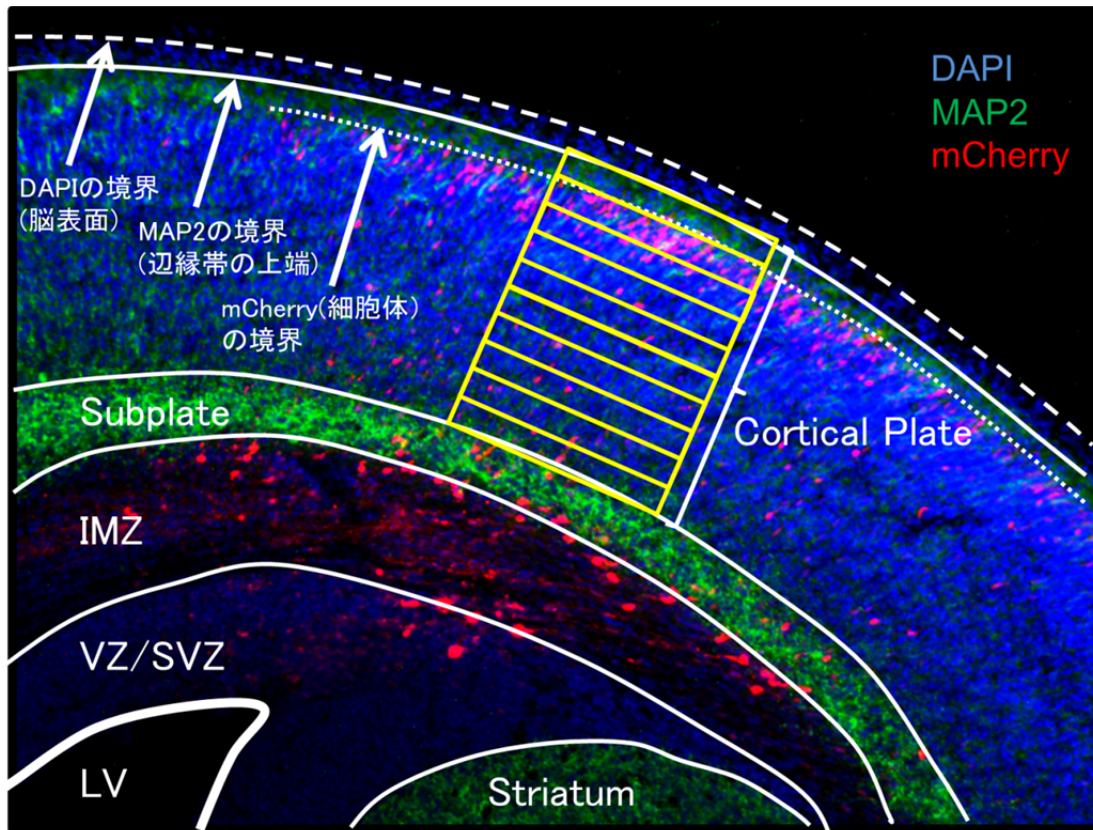


図 3. 胎仔大脳皮質板(cortical plate)の区画分け(胎生 19 日の例)。IUE 法により赤色蛍光遺伝子 mCherry を胎生 15 日齢に導入された脳サンプル)。DAPI による細胞核染色(青)と MAP2 抗体による神経細胞免疫組織染色(緑)を組み合わせた。二種の蛍光標識を客観的指標として、脳表層(図の上部)から順に、脳表面の境界、辺縁帯の上端、皮質板の下端を定義できる。これにより皮質板を 10 区画(bin)に分け、細胞移動の様子を定量評価できる(図 4 参照)。脚注: cortical plate; 皮質板, subplate; サブプレート(皮質板の下部構造), IMZ; 中間帯, VZ/SVZ; 脳室帯・脳室下帯, LV; 側脳室, Striatum; 線条体。

BPA 毒性(1)～胎仔期の形態解析： 毒性実験としての検証を、研究項目 1 で作成したマウスを用い、BPA 曝露影響解析として行った。発達時系列を追って結果を記載する。胎生期の IUE 解析では、胎生 15 日の新生ニューロンを可視化し、胎生 19 日において解析を行った。低用量曝露群(40 $\mu\text{g/kg/day}$)において、皮質板最上部(bin 10、図 3 参照)の mCherry 陽性神経細胞数 (IUE 法で可視化された胎生 15 日の新生ニューロン) が低く、逆に下部(bin 1 と 2)では高かった (図 4)。このことは、低用量曝露群の脳における神経細胞移動が遅延していることを示している。

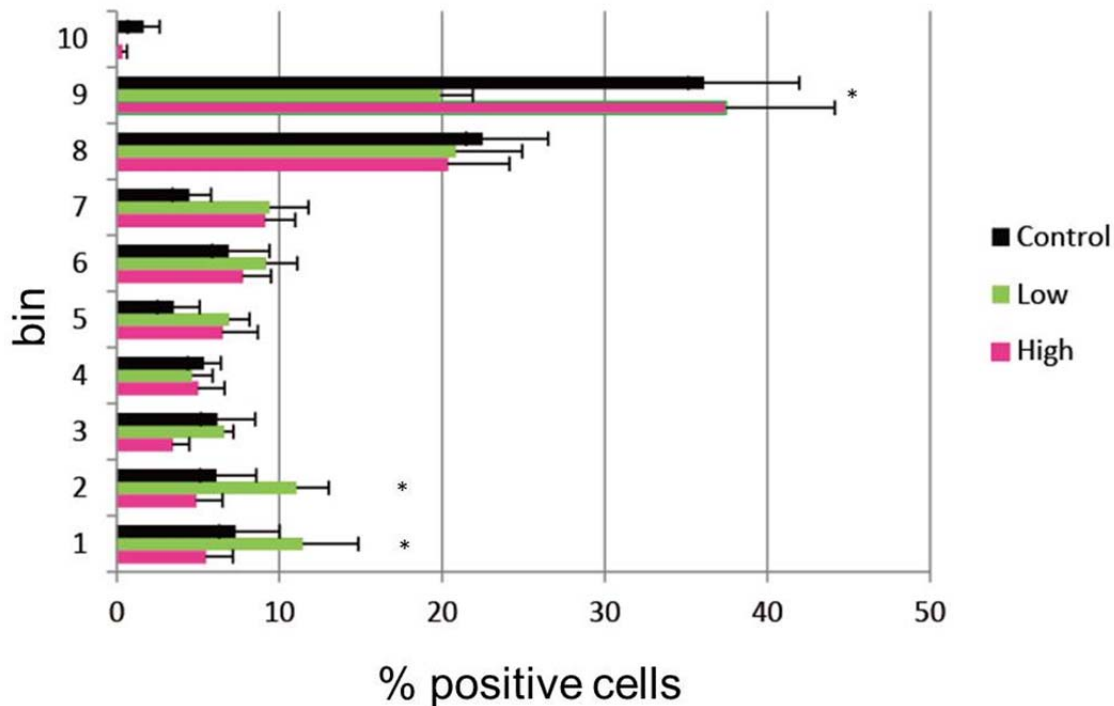


図 4. 発達期 BPA 曝露が大脑皮質板各区画における神経細胞数に及ぼす影響. 皮質板を最下層(bin 1)から表層(bin 10)までにおける分布割合(%positive cells)を示した。*, $p < 0.05$.

BPA 毒性(2)～授乳期の微細形態解析： 次に、神経ネットワーク構築中の授乳中の解析を *thy1-GFP* マウスを用いて行った。神経突起の形態を調べる *scholl* 解析において、生後 21 日目の海馬において BPA 曝露影響を確認した。すなわち、BPA 曝露マウスの海馬錐体細胞では突起の広がり低下しており、空間的広がりが対照群に比して乏しくなっていることを新たに見出した (図 5)。空間的広がりの低下を精査するため、突起長と数を分岐ごとに定量したところ、突起長には変化がなく、第 5 ならびに第 6 分岐における突起数が低下していることがわかった (図 6)。第 5・第 6 分岐は細胞体からの距離が 90~150 μ m 付近に位置するので、この結果は *scholl* 解析のデータを裏付けるものと考えられる。すなわち BPA は、海馬 CA1 領域において、細胞体から比較的離れた最終分岐付近での突起数が減少しており、結果的に突起の広がりが低下していることが明らかとなった。

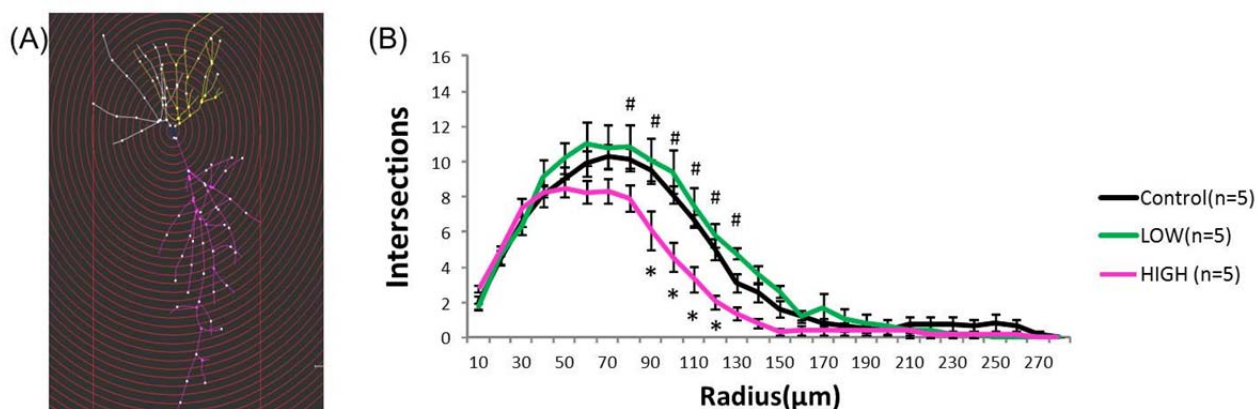


図 5. BPA 曝露 thy-1 マウスにおける生後 21 日齢の海馬 CA1 錐体細胞の神経突起広がり。 (A) Scholl 解析では、神経細胞体を中心とした同心円を描き、円との交点の数によって神経細胞突起の広がりを定量する。 (B) Control マウスの錐体細胞では、神経細胞体中心から 80 μ m の部分で突起数が最大となる。 BisA 曝露マウス (400 μ g/kg/day; High) ではピークが細胞体側にシフトし、全体的に交点が少なかった。*, $p < 0.05$. HIGH vs. Control. #, $p < 0.05$, HIGH vs. LOW

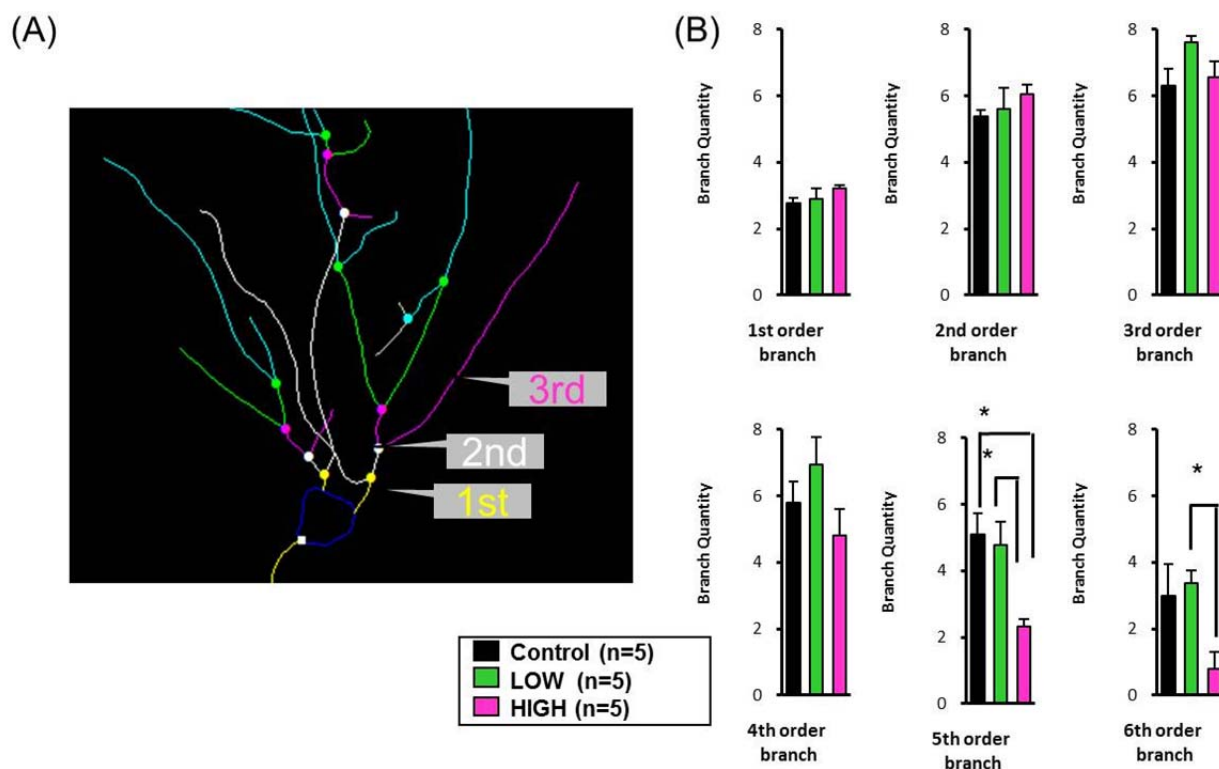


図 6. BPA 曝露 thy1 マウスにおける生後 21 日齢の海馬 CA1 錐体細胞の神経突起数。 (A) 細胞突起の分岐を、細胞体直近を第 1 分岐(1st order branch)として、第 6 分岐(6th order branch)までの各群の平均突起数と突起長を定量した。 (B) BisA 曝露群 (400 μ g/kg/day; High) では、第 5・第 6 分岐の突起数が低下していた。突起長には変化がなかった。*, $p < 0.05$.

BPA 毒性(3)～成熟期の微細形態解析： 次に、仔動物が 1.5 歳齢になってからの微細形態変化をゴルジ解析法により検証したところ、発達期に見られた神経突起の広がりや神経突起数といった指標に変化は見られなかった (図 7A)。一方、興奮性シナプスが終止するスパインについて調べたところ、BPA 曝露群ではスパイン密度が低下していることが明らかとなった (図 7B,C)。さらにスパイン形態の解析では、低用量曝露群 (40 μ g/kg/day) において、スパインの丸みが低下し張短軸比が上昇していること、すなわちスパイン形態が縦長に変化していることを見出した (図 8)。微細形態変化の脳領域特異性を検証したところ、今回対象とした 5 つの脳領域の中では、海馬 CA1 領域においてのみ影響があることがわかった (図 9)。

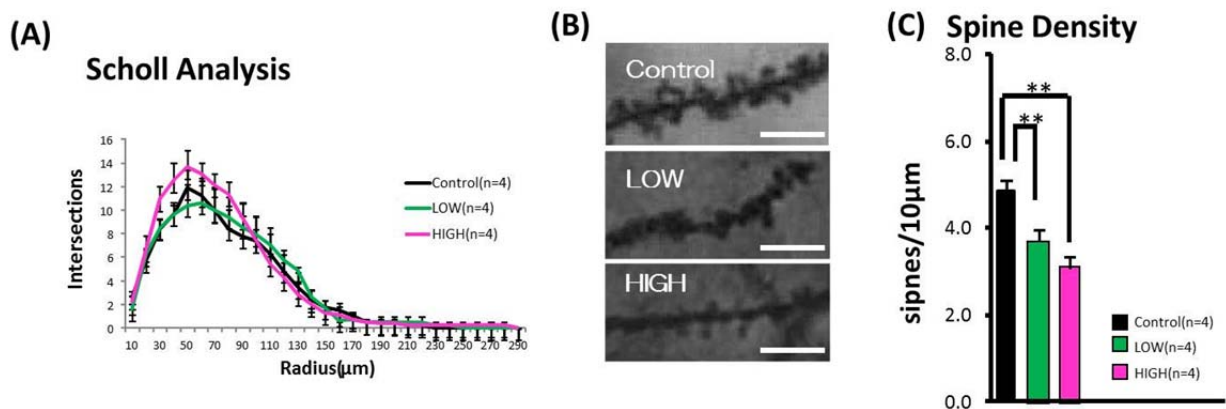


図 7. BPA 曝露マウスにおける生後 14 ヶ月齢の海馬 CA1 錐体細胞の微細形態解析。(A)神経突起の広がりでは曝露影響は見られなかった。(B)(C)BPA 曝露によりスパイン密度が低下していた。*, $p < 0.01$, vs. Control.

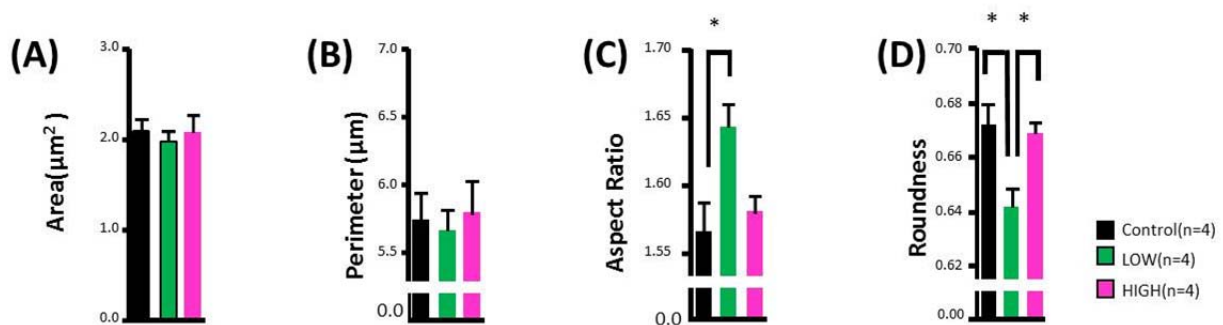
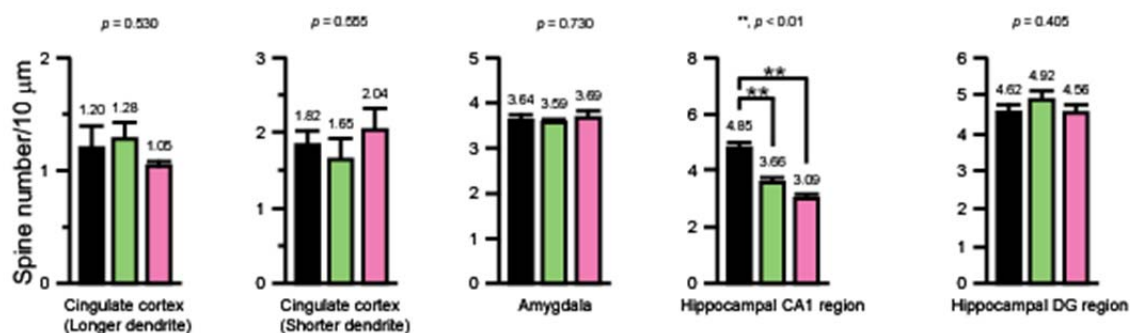
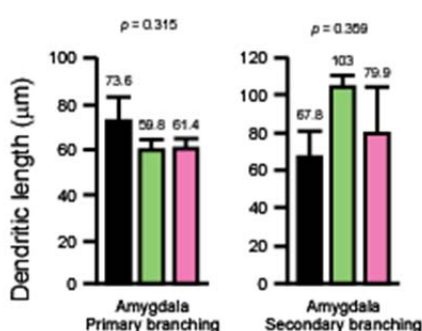


図 8. BPA 曝露マウスにおける 1.5 歳齢の海馬 CA1 錐体細胞のスパイン形態解析。(A)スパイン面積、(B)周囲長には曝露影響は認められなかったが、(C)低用量曝露群において長短軸比が上昇し、(D)真円率が低下していた。*, $p < 0.05$.

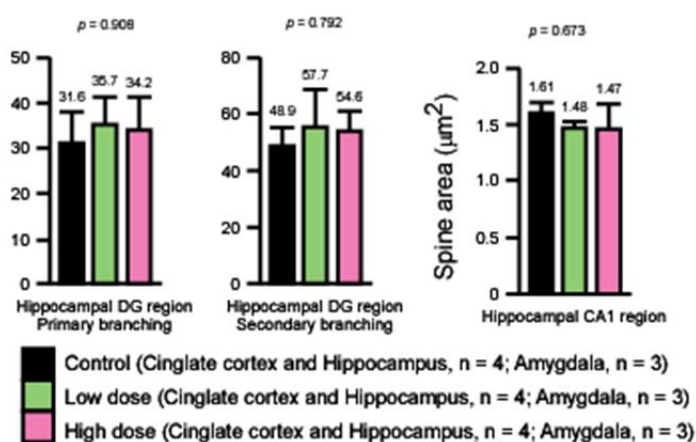
(A) Spine density



(B) Dendritic length



(C) Spine area (μm²)



■ Control (Cingulate cortex and Hippocampus, n = 4; Amygdala, n = 3)
 ■ Low dose (Cingulate cortex and Hippocampus, n = 4; Amygdala, n = 3)
 ■ High dose (Cingulate cortex and Hippocampus, n = 4; Amygdala, n = 3)

図 9. BPA 曝露マウスにおける 1.5 歳齢の大脳皮質帯状回(cingulate cortex)、扁桃体(amygdala)、海馬 CA1 領域(hippocampal CA1 region)、海馬 DG 領域(hippocampal DG region)における微細形態の比較。(A)スパイン密度解析では、海馬 CA1 領域(hippocampal CA1 region)において有意な減少があった。その他の領域のスパイン密度、(B)樹状突起の長さの解析、(C)海馬 CA 領域におけるスパインの大きさには曝露影響は認められなかった。

3. レーザーマイクロダイセクション (LMD) 解析と毒性メカニズムの検討

BPA 毒性(4)～胎仔期の生化学的解析： IUE 解析で影響が認められた胎生 19 日目における脳内の mRNA 発現量を定量的 PCR 法により解析した結果、BPA 低用量曝露群においてのみ DISC1 mRNA の発現に亢進傾向が認められた (図 10)。低用量特異的な変化 (傾向) は thy1-GFP の微細形態変化と一致していることから、DISC1 遺伝子発現変化が微細形態変化に関与する可能性が考えられた。実際に、DISC1 遺伝子の転座が認められる家系では統合失調症やうつ病を多発し、マウスでもその遺伝子発現変化が行動異常を引き起こすことが知られており、また神経細胞移動に重要な働きをもつことが報告されている(Niwa et al. Neuron 64:480-489, 2010)。よって、形態レベルの変化と分子レベルの変化が直接的に結びつく可能性があり、BPA の胎児期曝露が脳形成に影響を及ぼす可能性が示唆された。

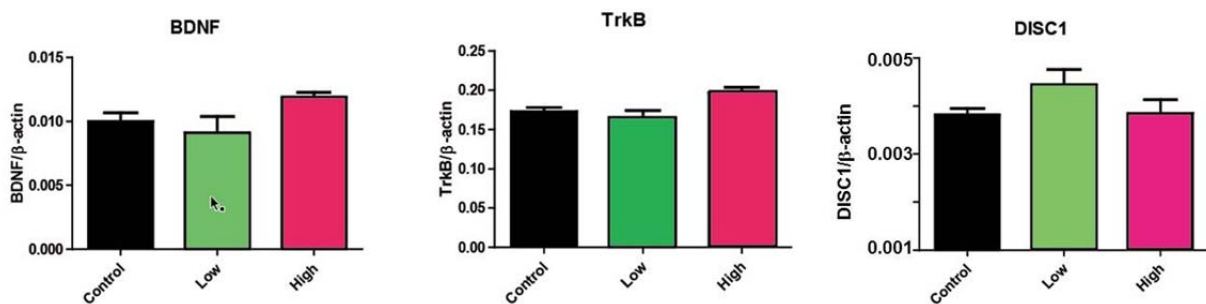


図 10. BPA 曝露 ICR マウスにおける胎生 19 日の前脳における遺伝子発現変化。*, $p < 0.05$.

BPA 毒性(5)～授乳期の生化学解析： 次に、微細形態変化の確認された生後 21 日齢においてマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現プロファイル解析を行った。海馬では、対照群よりも BPA 曝露群で 2 倍以上のアレイ・シグナル強度のあった遺伝子が 421 個、逆に低下した遺伝子（対照群において 2 倍以上の値を示した遺伝子）が 95 個、大脳皮質では BPA 曝露群で 2 倍以上の強度を示したものが 341 個、低下していたものが 106 個あった（附表 1～4 参照）。このデータをもとにパスウェイ解析を行い、発現変更候補遺伝子を絞り込んだ。パスウェイ解析は MAPPFinder (Doniger et al, Genome Biol 4: R7, 2003)を用い、統計学的に有意な変化を示す 10 のパスウェイを絞り込んだ（表 1）。

表 1. マイクロ・アレイ・データのパスウェイ解析結果

MAPP Name	Z Score	PermuteP	BPA effect
Mm_C21_Steroid_hormone_metabolism	5.443	0	↑
Mm_Glucocorticoid_Mineralcorticoid_Metabolism_WP495_33388	4.894	0.002	↑
Mm_Keratan_sulfate_biosynthesis	2.768	0.044	↑
Mm_Eicosanoid_Synthesis_WP318_35469	2.721	0.039	↑
Mm_Apoptosis_WP1254_35103	2.688	0.019	↑
Mm_Type_II_interferon_signaling_(IFNG)_WP1253_34425	2.589	0.045	↑
Mm_Prostaglandin_Synthesis_and_Regulation_WP374_33046	2.51	0.038	↑
Mm_T_Cell_Receptor_Signaling_Pathway_WP480_34406	2.332	0.023	↑
Mm_Apoptosis_Mechanisms_WP168_34410	2.082	0.046	↑
Mm_Blood_Clotting_Cascade_WP460_35089	3.669	0.02	↓

LMD 解析手法の改良： LMD 解析では、組織学的・微細形態学的な影響が顕れた領域/

細胞を LMD により切り出して採取し、遺伝子発現解析を行うことができる。従来の方法では影響の有無を区別して切り出すことができなかったため、これらの細胞をまとめて解析せざるを得なかったが、LMD 解析により影響が顕れた微細領域/細胞を採取し解析することができるため、影響の原因となる分子を同定できる可能性が飛躍的に高まる。また、この方法は微量試料を用いて解析することとなるため、極微量サンプルからの遺伝子発現解析技術を確立した。遺伝子発現解析の標的遺伝子としてハウスキーピング遺伝子の 1 つである cyclophilin B を対象として解析手法を検討した。まず通常の解析方法の検出限界を調べたところ、real-time RT-PCR 法により 100 pg まで検出可能であったが、我々の改良法により、1 pg を検出することができた。すなわち検出感度が 100 倍向上した (図 11)。

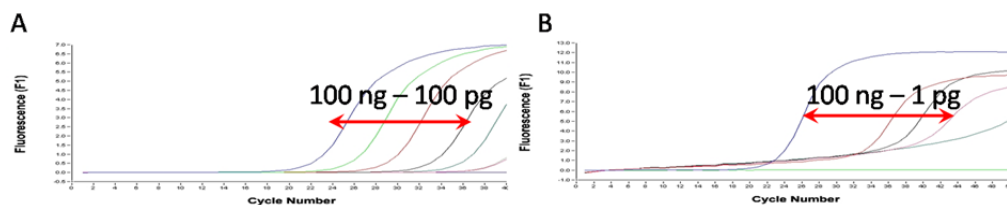


図 11. qPCR 法による微量サンプルからの遺伝子発現解析 A.従来法。B. 改良法。微量試料の容器への付着による影響低減の為に低付着性容器と carrier RNA を用いる等のプロトコールを作成することで検出感度が 100 倍向上した。carrier RNA は mfold プログラムによって特定構造を取らないことと、BLAST 検索によりマウス cDNA に相同性がないことを確認し、*in vitro* transcription 法により作成した。

この研究では LMD 技術を大脑海馬解析に適用することとした。第一に、BPA 曝露により微細形態影響が確認されたためである。第二に、海馬は哺乳動物全般で細胞構築に共通性があり、類似の構造と機能を有していると考えられることから、実験動物の結果をヒト健康影響評価や疾患研究に外挿する意義があると考えられたからである。すなわち、海馬における解析技術を示すことは、BPA 毒性に限らず食品健康影響評価全般に適用しうる評価手法となりうる。海馬は、記憶形成など高次機能に重要な働きをもつというだけでなく、虚血に対して非常に脆弱であることや、アルツハイマー病における最初の病変部位としても知られている。心理的ストレスを長期間受け続けると海馬の神経細胞が破壊され、海馬が萎縮することや、心的外傷後ストレス障害 (PTSD)・うつ病の患者やそのモデルマウスにはその萎縮があるなど、マウスとヒトに共通して、最も研究の進んだ脳部位である。

海馬は細長い棒状の形状であり、その長軸方向に向かって特徴的な細胞層構築をもつため、どこで切断しても、神経細胞体の集まる神経細胞層が渦巻き状に現れる (図 12 参照)。神経細胞層は CA (アンモン角) と DG に大別でき、CA の細胞層には錐体細胞 (ニューロン) があり、大脳皮質をはじめとして脳の主要部位に情報を送り出す (図 12 参照)。一方歯状回(DG)は主に顆粒細胞から成り、外部からの情報を受け、それを CA 領域に送り出し

ている。DG は脳解剖学の定義としては海馬ではなく海馬体に属するほど、構造も機能も異なると考えられている。しかし神経科学全般で、図 12 に示すような組織切片を用い、DG を含めて海馬と表現している。

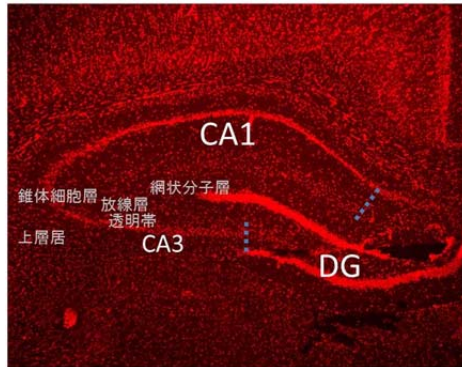
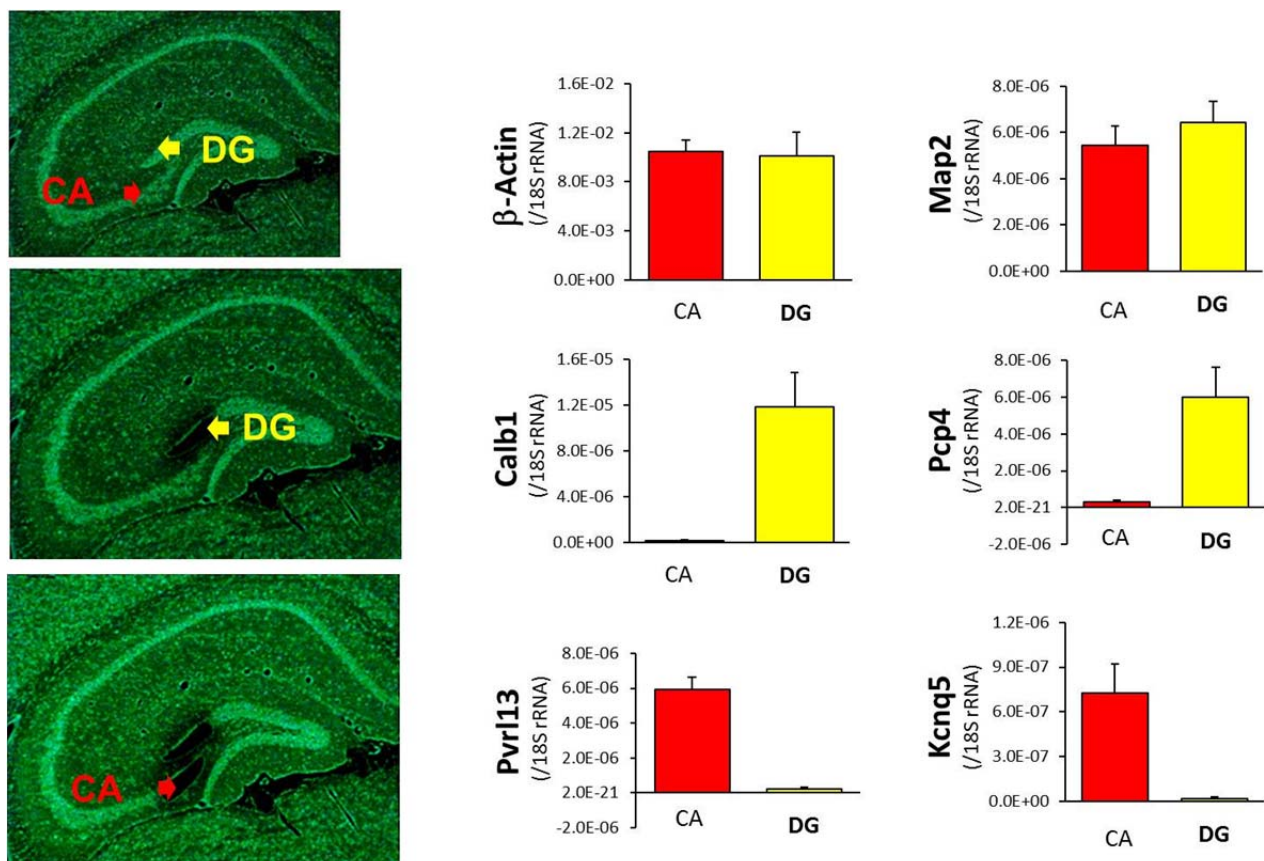


図 12. マウス海馬の組織切片顕微鏡写真. 神経細胞を NeuroTrace 抗体（赤）で染色した。

このように CA と DG は顕微鏡下でしか区別ができないので、両者には大きな違いがあるにもかかわらず、これまで両者を区別して遺伝子発現解析をすることができていなかった。顕微鏡下での遺伝子発現を調べる手法として *in situ* ハイブリダイゼーション法があるが、組織切片上では「陽性細胞数の増減」でしか示すことができなかった。CA の錐体細胞と DG の顆粒細胞では大きさも密度も異なり、両者を比較することができない。しかし LMD 技術を用いることで、このような異なる領域や細胞種であっても、ハウスキーピング遺伝子を内部標準として比較が可能な形での定量解析が実現できる。さらに神経細胞骨格遺伝子の発現量と比較することで、グリア細胞や血管細胞なども含まれる組織全体における神経細胞の割合も推計できるし、その神経細胞集団あたりの標的遺伝子量を推計することも可能となる。

我々は、過去の *in situ* ハイブリダイゼーション法のデータから、CA と DG とで発現量が異なると考えられる遺伝子を測定することで、LMD 法の検証を行った（参考図 2）。



参考図 2. 海馬 LMD 法の例。DG と CA の細胞層の一部を LMD により回収、遺伝子発現解析を行った。ハウスキーピング遺伝子 β -actin や神経細胞マーカー Map2 の mRNA 発現には CA と DG での違いはなく、均一に神経細胞を回収できたことがわかる。一方、DG において発現が高いと考えられていた Calb1 mRNA、Pc4 mRNA は、やはり DG で高い発現量を示した。定量解析の結果、それぞれ 84 倍と 19 倍、DG で発現が高いことがわかった。Pvr13 mRNA は 28 倍、Kcnq5 mRNA は 38 倍、CA のほうが発現量が高かった。

LMD 法の信頼性が確認できたので、生後 14 日目の BPA 曝露マウスの海馬において、マイクロアレイ解析から重要性が示唆される遺伝子の発現定量解析を行った。その結果、BPA 曝露により CA もしくは DG で変動する遺伝子群を、定量的に同定特定することができた (図 13)。ストレス応答に関与するグルココルチコイド受容体 (Glucocorticoid receptor) mRNA は、CA と DG とともに低下していた。同じく無機質コルチコイド受容体 (Mineralocorticoid Receptor) は、DG においてのみ低下しており、無機質コルチコイド受容体を抑制する働きのある Hsd11b2 (hydroxysteroid (11-beta) dehydrogenase 2) mRNA 発現亢進も DG においてのみ見られた。以上の遺伝子発現変動の結果は、BPA が海馬のストレス応答系を攪乱しており、その影響は特に DG に強いことを示唆するものである。また他にも、DG における Lingo 1 mRNA の上昇、CA ならびに DG における CPEB3 mRNA の低下があった。Lingo 1 はオリゴデンドロサイトにおいてミエリン化を促進するほか、神経細胞の突起伸長を阻害する分子で、近年、その多型が本態性振戦と相関があることが注目されている (Nature Genetics 41, 277–279, 2009)。本態性振戦は疾患ではないが、ふるえのみが顕れ

る症状で（日本人の 40 歳代以上での有病率は 10 万人当たり 415 人ほどであり、神経系由来の症状としてパーキンソン氏病との関連が示唆されてもいる。CPEB3 はグルタミン酸受容体の発現を調節する分子で、我々の見出した BPA による NR1, NR2A 分子の変動を支持するデータである。なお、詳述は省くが、対照群における CA と DG の発現量の違いについても、本研究の結果が、定量的データとしては世界初である。特に差が顕著なものは、過去の *in situ* ハイブリダイゼーションで示唆されるものと一致していることも確認している。

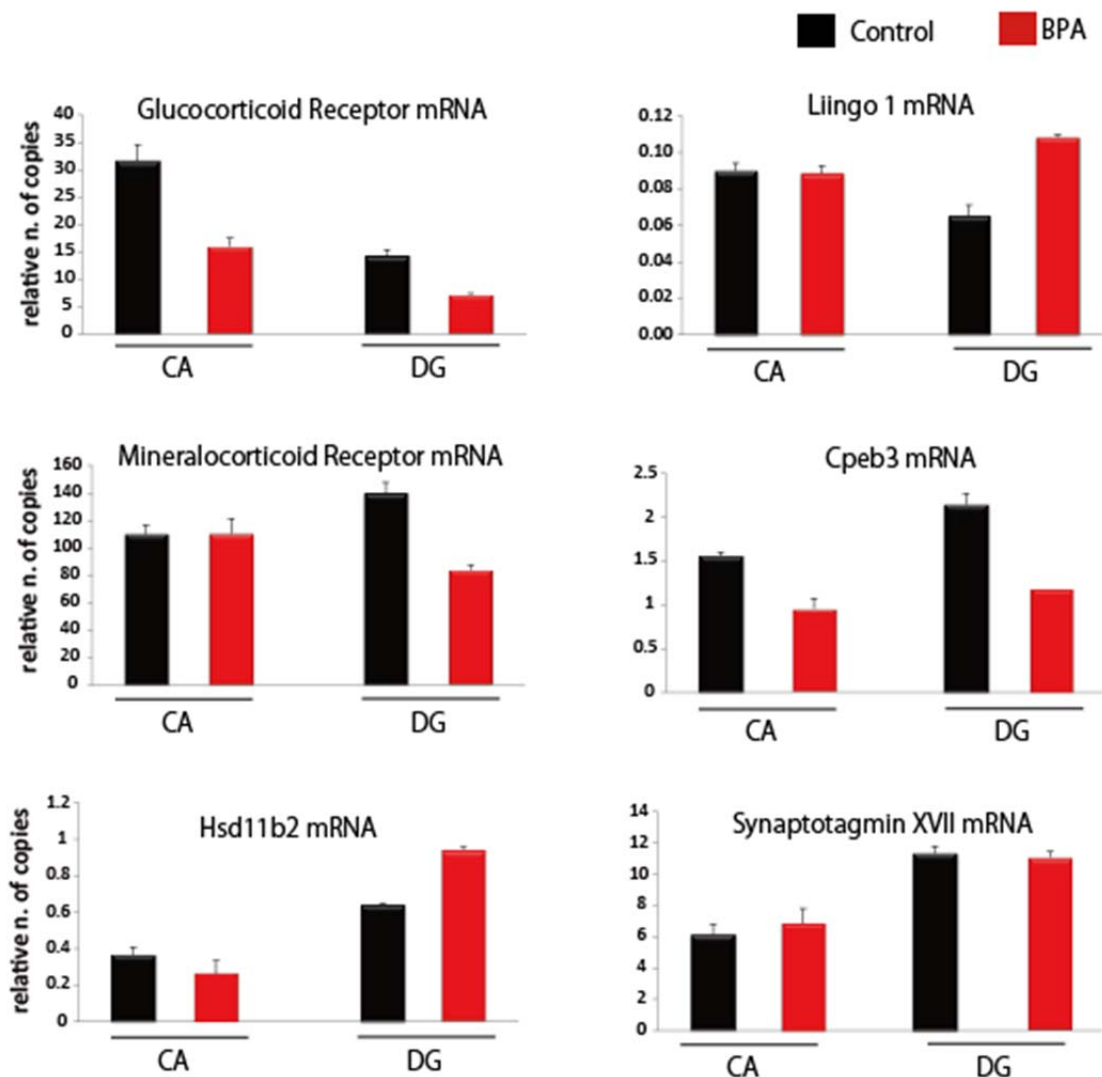


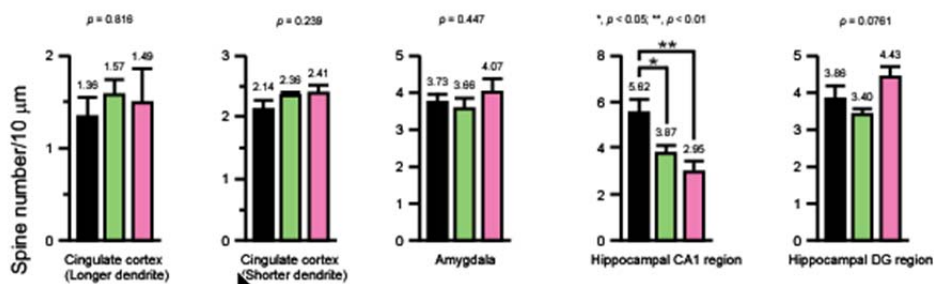
図 13. BPA 曝露マウスにおける海馬遺伝子発現変動の LMD 解析. DG と CA の細胞層の一部を LMD により回収、遺伝子発現解析を行った。各群 n=3.

4.まとめ (BPA 毒性と TCDD 毒性の比較検証)

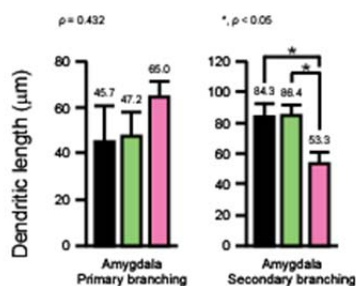
研究項目「まとめ」でおこなった本研究のとりまとめは、報告書の「考察及び結論」欄にて記載することとした。本章では、BPA 曝露影響と TCDD 曝露影響の比較の観点から行った実験結果を報告する（なお、評価手法構築・検証にあたって、部分的にはダイオキシン(TCDD)発達期曝露マウスも用いた）。

TCDD による成熟後微細形態異常： BPA 曝露マウスの解析に対応する形で、ダイオキシン曝露マウスの 1.5 歳齢時の微細形態変化をゴルジ解析法により検証した。具体的には、ダイオキシンのプロトタイプである TCDD の経胎盤・経母乳曝露を行い、BPA 曝露マウス（図 9 参照）と同様の解析を行った（曝露は、妊娠 12.5 日の母マウスに 0, 0.6, 3.0 μ g/kg の TCDD を単回経口投与。我々は同条件にて精神疾患様行動異常が顕れることを見出している）。結果、BPA 曝露マウスと同様に、海馬 CA1 領域においてのみ、スパイン密度が低下していることが明らかとなった（図 14）。ただしスパイン形態の解析では、BPA とは異なり、TCDD 曝露影響は観察されなかった。

(A) Spine density



(B) Dendritic length



(C) Spine area (μ m²)

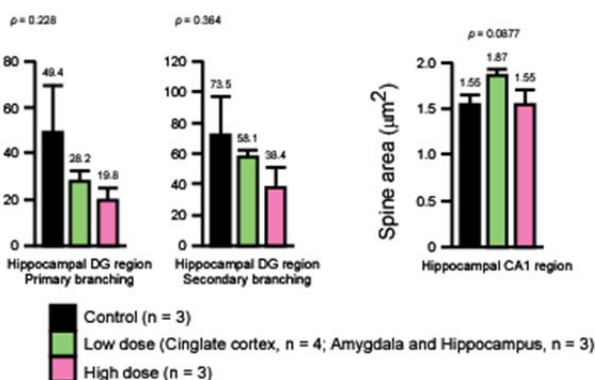


図 14. TCDD 曝露マウスにおける 1.5 歳齢の大脳皮質帯状回(cingulate cortex)、扁桃体(amygdala)、海馬 CA1 領域(hippocampal CA1 region)、海馬 DG 領域(hippocampal DG region)における微細形態の比較. (A)スパイン密度解析では、海馬 CA1 領域(hippocampal CA1 region)において有意な減少があった。その他の領域のスパイン密度、(B)樹状突起の長さの解析、(C)海馬 CA 領域におけるスパインの大きさには曝露影響は認められなかった。

次に、発達期及び成熟後の分子レベルの発現変化を比較した。我々を含めて、TCDD 曝露による分子レベルの変更は多くの先行研究があり、例えば NR1、NR2A、NR2B 等のグルタミン酸伝達系遺伝子、Tublin（神経線維微小管）、MAP2（神経線維微小管）、Tau（神経線維微小管）、NF-L、NF-M、NF-H（ニューロフィラメント）等の細胞骨格遺伝子が成熟後において発現変化することが知られている。しかし今回の曝露条件では、BPA 曝露によりこれらの遺伝子群の発現変化はまったく認められなかった。ところが、授乳期の脳では、TCDD 曝露では影響が見られなかったいくつかの発現変化を BPA 曝露マウスにおいて見出した。まず、MAP2 タンパク質の発現が増強していることを見出した（図 15）。また BPA 曝露群の脳新皮質において、グルタミン酸受容体分子 NR1、NR2A ならびに NR2B の mRNA の発現亢進を認めた（図 16）。以上の結果は、後述のように、BPA 曝露と TCDD 曝露で、海馬スパイン密度の低下という一点だけで比較すると共通するものもあるが、発達をおって変化のパターンを比較していくと、影響の質が異なることを強く示唆するものである。

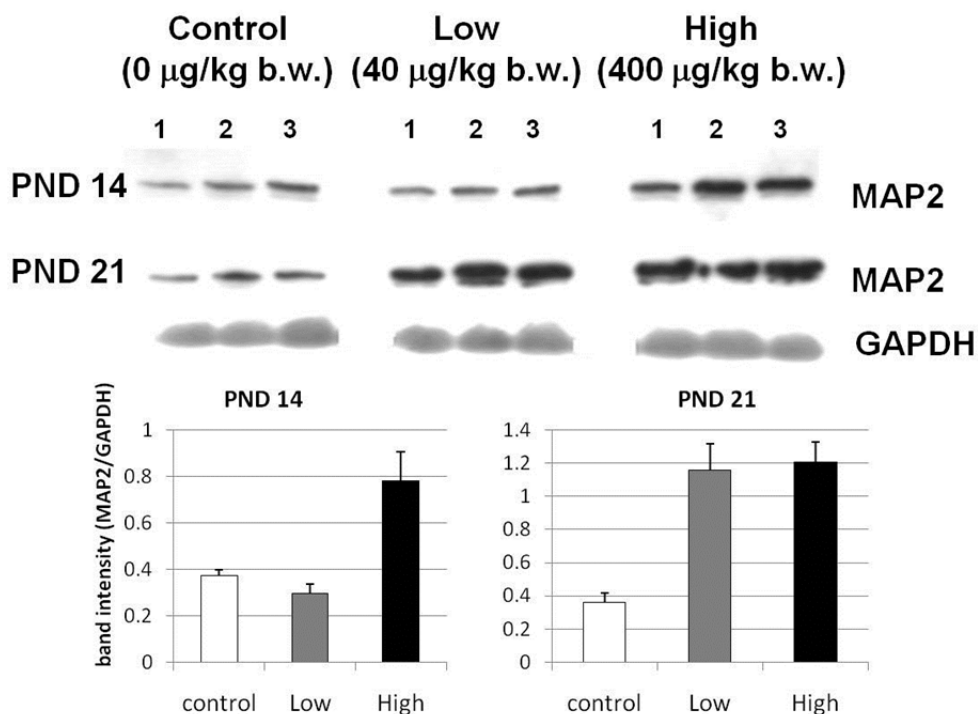


図 15. 胎仔期 BPA 曝露が発達期海馬の MAP2 タンパク質発現を増加させる。妊娠中の母動物に BPA を曝露し、雄仔動物が生後 14 日(PND 14)、21 日(PND 21)の時に脳をサンプリングした。大脳新皮質、海馬にわけて細胞骨格タンパク質をウェスタンブロッティング法により測定したところ、PND 14 では 400 µg/kg/day 曝露群にて MAP2 が上昇、PND21 では 40, 400 µg/kg/day 曝露群ともに上昇していた。なお、その他の骨格タンパク質 tau, tublin, actin 等の発現には影響がみられなかった。また、ダイオキシン曝露動物では MAP2 発現に影響はみられなかった。

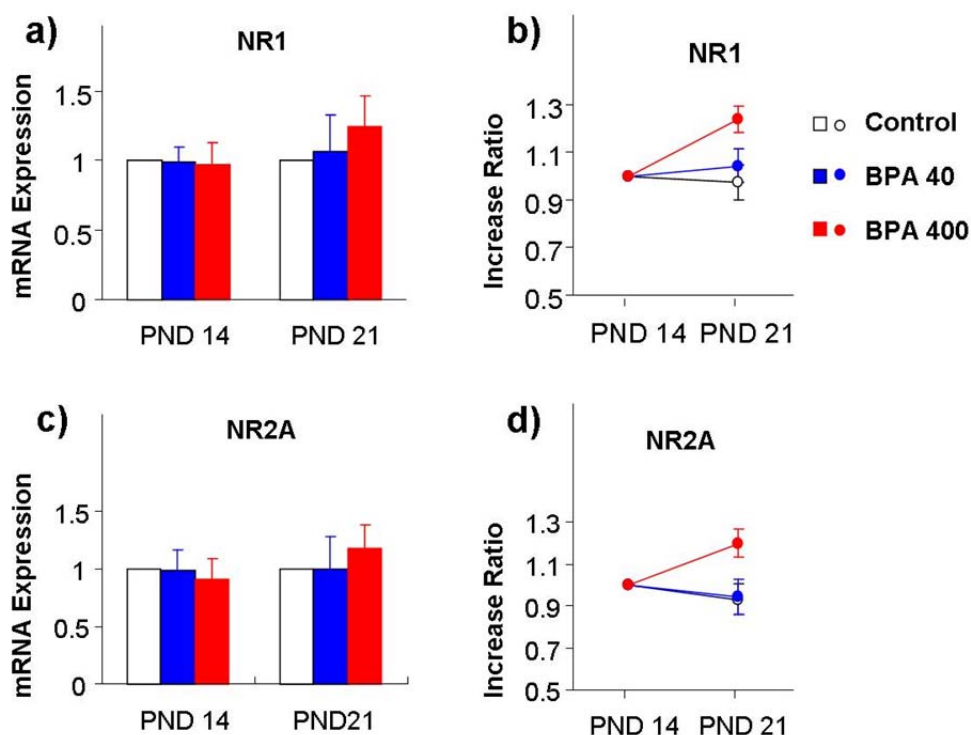


図 16. 胎仔期 BPA 曝露マウスにおける遺伝子・タンパク質発現解析. 生後 14 日(PND14) と 21 日 (PND21) に、一腹あたり一匹雄仔動物の脳サンプルを回収し、real-time RT-PCR による定量的発現解析と western blotting によるタンパク質発現解析を行った。PND21 の大脳新皮質において、BPA 曝露により、(a) NR1 mRNA の発現が高くなる傾向が見られた。そこで(b)発達にともなう増加率を調べたところ、400 $\mu\text{g/kg/day}$ 曝露群において有意な増強が認められた。(c, d) NR2A 遺伝子も同様の結果を得た。

3) 考察及び結論

現象としての大脳形成過程に着目し、神経系細胞の分化・移動、脳領域の構築、シナプス形成などの微細形態の形成といった指標を網羅的・包括的に解析し、リスク評価のために「脳形成にどの程度の影響が顕れるか」を科学的に示す評価手法の確立を行うのが本研究の目的である。その際、影響を見逃さず、その質と程度を明らかにするためには、個体レベルの現象（影響）に基づいた評価手法の高度化が必要である。

特に健康影響として問題となっている胎仔期・授乳期は脳の形成が進む重要な時期であるが、研究の中心は細胞内の任意の分子カスケードに関するものが中心であり、脳が形作られる過程で曝露により何が起こるのかという研究は極めて乏しかった。神経細胞の新生は脳のごく限られた場所で行われ、その後長い距離を移動して最終的に配置すべき場所へと移動する。興奮性神経細胞の多くは脳室面で新生し、脳表面の辺縁帯直下まで放射状に移動してその移動を終える。その過程を繰り返すことにより、早生まれの神経細胞ほど最終的により深層に配置され、遅生まれの神経細胞ほどより表層に配置される “inside-out”

様式をとる。その後、神経細胞は周辺や遠くの特定部位の神経細胞と「配線」を行い、神経回路網を築いてゆくことになる。

本研究ではまず、神経細胞が新生しあるべき場所に配置されるかどうかを定量的に検証するための、*in utero electroporation*(IUE)法を毒性実験に適用した。IUE 法は電気パルスにより新生ニューロンに遺伝子を導入する手法であり、本研究の BPA 曝露実験では、大腦皮質の上層に位置する予定の胎生 15 日目の新生ニューロンを蛍光標識することで、正しい移動が行われていないことを明らかにすることができた。この結果は、大腦皮質の特定の細胞層の欠落を意味するのではなく、実際に曝露マウスの成熟後の大腦皮質は、一見しても影響が観察されない程度に回復している。とはいえ、これは現在の一般的病理組織解析では違いを見出せないだけで、何らかの影響が生じていると考えるのが自然である。統合失調症のような重度な精神疾患においても、一般病理組織解析では、なんら違いを見いだせていないからである。実際に、大腦形成異常が確認された胎仔期の脳で我々は、DISC1 をはじめとして大腦形成に関わる分子が変動していることも今回明らかにした。DISC1 は家系解析から同定された統合失調症の原因遺伝子の一つであり、最近になって大腦形成期の神経細胞移動に関わることを明らかになった分子であり (Niwa et al. *Neuron*.2010, 65:480-489)、形態レベルの現象と分子レベルの現象がともに、低用量 BPA 曝露が大腦形成異常を引き起こすことを示すものである。

次に本研究では、微細形態解析を効率的かつ高精度で行うため、*thy1-GFP* マウスとステレオロジー理論を用いた解析手法を導入した。*thy1-GFP* マウスを用いた微細形態解析は医学研究としても新しく、毒性実験への適用は今回が初めてのものである。その結果、我々の予想よりもずっと早い授乳期において、既に BPA 曝露による神経突起の広がりには異常があることを見出すことができた。成熟後には、神経突起の長さには有意差はみられなかったが、スパイン密度やスパイン形態に異常があることを見出した。本研究で当初より注目してきたグルタミン酸伝達系をはじめとして、興奮性シナプスのほとんどがスパインに終止する。スパインは形態により伝達効率が変化的であることが知られており、密度の低下をあわせて、胎仔期 BPA 曝露は成熟後の興奮性神経伝達を障害することを示す微細形態レベルでの証拠だと言える。これまでに、Yale 大学 C. Lenaneh 教授らが、サルにおいて BPA がスパイン密度を低下させることを報告している (PNAS, 105:14187-14191, 2008)。しかしこの結果は女性ホルモンを枯渇させた状態で観察された表現型であり、毒性影響なのか、それとも特殊な条件下での生体反応なのか、リスク評価の際に疑問が残っていた。我々のマウスにおける結果は、通常の生育条件の中での BPA 曝露が脳発達に影響を及ぼすことを示す新たな知見である。また、一般病理組織解析で異常が認められない統合失調症、うつ病等の精神疾患でも、このような微細形態変化があるという報告が最近相次いでおり、その意味でも我々の結果は、リスク評価にとっても重要な科学的知見を提供できたものといえよ

う。

この研究で用いた IUE 法は、海馬に適用することは技術的に難しかったため、大脳皮質で行われたが、微細形態解析は海馬を対象に行われた。よって報告書では、大脳皮質と海馬を含めた解剖学的定義として「大脳」を用い、BPA は大脳の形成に影響を及ぼすと結論づけている。現在は慶應大・仲嶋グループが海馬への IUE 法適用を実現しているので(Tomita & Kubo et al. Hum. Mol. Genet., 20:2834-2845, 2011).、大脳皮質と海馬の影響の度合いの比較など、今後に期待すべきテーマである。IUE 法では、単なる蛍光遺伝子だけでなく、siRNA 等を用いた遺伝子ノックダウンも行うことができる。本研究でも候補遺伝子について検討を行っている。本研究で対象とした遺伝子の結果はネガティブだったが、評価手法としては成立しているので、今後に期待したい。

次に LMD 法については、先述のとおり Harvard 大学研究グループに先を越されてしまったが、本年度内にさらに進展させることができ、(1)蛍光標識した組織切片から微量 RNA の回収を可能にしたこと、(2)極微量サンプルからの RNA 定量の検出感度について、Harvard 大の先行研究よりもさらに感度と信頼性を劇的に向上させたという 2 点において、生命科学全体に貢献できる先導的成果として完成させることができた。定量解析は、影響の有無だけでなくその程度までを明らかにしなければならない毒性研究における命題であり、食品健康影響評価技術にとって特に、大きな前進だといえよう。開発された RNA 定量法は吉岡亘特任助教（本研究予算にて雇用）による成果であり、精密な定量解析を実現するためには、相当な修練が必要なのは言うまでもない。しかし当研究室では、既に学生でも定量できるようになっており、専門家でなくとも、適切な指導により、この手法を習得できることを確認済みである。

BPA 曝露影響解析に関しては、本研究では次のステップとして、毒性メカニズムに基づいた科学的検証を進めた。曝露時期に最も近い時期で微細形態異常が確認された授乳期の脳サンプルを用いたマイクロアレイ解析により候補遺伝子を抽出し、さらに LMD 法を用いた脳領域特異的解析を行うことで、曝露影響メカニズムを説明しうる遺伝子群を同定することができた。すなわち、BPA は授乳期の海馬において、グルココルチコイド伝達系とグルタミン酸伝達系を攪乱している可能性が強く示唆された。神経内分泌学の大家である B. McEwen 博士は近年、環境化学物質曝露影響の解析において、ストレス応答系に着目することが重要だとするレビューを発表している (McEwen et al. Am J of Public Health 101:S1:S131-S139, 2011)。海馬の神経細胞はグルココルチコイド受容体を多く持っており、脳のストレス応答に主要な働きを持つ。我々の今回の結果とあわせると、これまで毒性影響としてあまり注目されなかった、海馬ストレス応答系こそが BPA 曝露影響のターゲットである可能性が高い。

また我々はアレイ解析とは別に、BPA による MAP2 蛋白の発現亢進も見出した。MAP2

抗体は、神経細胞のマーカーとして用いられているように、神経細胞に特異的な発現を示すことから、その発現量増加は、BPA による神経回路形成の促進と一致するもののように見受けられる(Tando et al. Brain Dev. 29:352-356)。しかし一方で、統合失調症患者の脳で MAP2 発現が高く、MAP2 は精神疾患治療薬のターゲット分子の一つという、全くことなる特徴も有する (Hirokawa et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 10:682-696, 2009 など)。まとめると、一つの測定パラメータや限定的な側面から毒性を判断するのではなく、脳発達形成過程における BPA 曝露動物の毒性の表現型を網羅的に捉え、包括的に判断を下すことが肝要であると言えよう。

結論として、BPA の低用量胎仔期曝露は、胎仔期の大脳形成を阻害し、授乳期の神経細胞微細形態の異常をもたらす。それにはグルタミン酸伝達系とストレス応答系分子が関与すると考えられ、微細形態異常は成熟後も残っており、それが結果として行動異常を引き起こす（参照 1 参照）と考えられる。また、微細形態異常は用量依存的に観察されたが、分子レベルの変化のいくつかには低用量に特異的なものもあり、そのような低用量特異的变化はダイオキシン等の曝露影響としても観察されており、健康リスク評価にとって今後の重要な課題である。

以上本研究では、胎仔期から授乳期にかけての体系的な脳発達の英表評価手法を提示することができた。今後はダイオキシン等他の化学物質にも適用を進め、個々の影響の違いと量反応関係について評価を進めていく必要があるだろう。

2 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名のリスト

該当なし

3 本研究を基にした学会発表の実績

掛山正心、柴田敏幸、西山隆太郎、山田誠子、森下達治、遠山千春 「蛍光免疫染色標本からの遺伝子発現解析」第 34 回組織細胞化学講習会、2009/07、徳島

仲井 沙織、掛山 正心、遠山 千春 「Immuno-LMD による遺伝子発現定量：胎仔期メチル水銀曝露によるラット海馬錐体細胞層におけるグルタミン酸トランスポーター遺伝子の発現低下」 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、2009/07、盛岡

遠山千春 「内分泌かく乱化学物質のリスク研究と公衆衛生」 第 68 回日本公衆衛生学会総会、2009/10/22、奈良

遠山千春『環境ホルモン』問題の現状と今後の課題」 松本大学特別講演会、2010/02/05、松本

掛山正心、遠山千春 「蛍光免疫染色標本からの遺伝子発現解析」第 35 回組織細胞化学講習会、2010/08/06、山梨

Takeyama M, Endo T, Tohyama C. Corridor shuttling spatial learning task: Chemically-induced emotional dysfunctions in group-housed mice as an animal model of perseveration and social anxiety. 40th Annual meeting of Society for Neuroscience, 2010/10/17, San Diego.

遠山千春, 「ビスフェノール A とその健康リスク」 食品安全フォーラム、日本薬学会レギュラトリーサイエンス部会主催、2010/11/22, 東京.

掛山正心, 遠山千春. 「実験動物高次脳機能評価法の今後の展開」 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会シンポジウム「環境ホルモン研究の今後の方向性」, 2010/12/16, 東京.

齋島旭, 張艶, 遠藤俊裕, 掛山正心, 遠山千春 「胎仔期・授乳期の低用量ダイオキシン曝露が情動機能に及ぼす影響：低用量特異的影響と用量依存的影響」 環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 2010/12/17, 東京.

宮崎航, 木村栄輝, 保坂亮太, 孫鮮策, 遠藤俊裕, 齋島旭, 掛山正心, 遠山千春「胎仔期ビスフェノール A 曝露によるマウスの情動行動変化：ダイオキシン曝露とは異なる毒性表現系」環境ホルモン学会第 13 回研究発表会, 2010/12/17, 東京.

Miyazaki W, Kimura E, Hosaka R, Xian S, Endo T, Haijima A, Takeyama M, Tohyama C. Abnormal emotional behavior after maternal exposure to bisphenol A in mice detected by IntelliCage. 50th Annual meeting of Society of Toxicology, 2011/03/06, Washington D.C.

Zhang Y, Haijima A, Hosaka R, Ling W, Endo T, Kimura E, Miyazaki W, Takeyama M, Tohyama C. Alterations in monoaminergic neural system in the brain of adult male mice born to dams perinatally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. 50th annual meeting of Society of Toxicology, 2011/03/06, Washington D.C.

Kimura E, Miyazaki W, Endo T, Hosaka R, Yoshioka W, Takeyama M, Tohyama C. In utero and lactational exposure to dioxin alters gene expression in the developing mouse brain. 51st Annual meeting of Society of Toxicology, 2012/03/14, San Francisco.

4 特許及び特許出願の数と概要

該当無し

5 その他（各種受賞、プレスリリース、開発ソフト・データベースの構築等）

遠山千春 平成 21 年度日本衛生学会学会賞

6 今後の問題点等

本研究の目的は、現象として的大脑形成過程に着目し、神経系細胞の分化・移動、脳領

域の構築、そしてシナプス形成などの微細形態の形成といった指標を網羅的・包括的に解析し、リスク評価のために「脳形成にどの程度の影響が顕れるか」を科学的に示す評価手法の確立を行うことにあった。手法構築に関しての最大の成果は、Thy-1 GFP マウスとステレオロジー解析による微細形態解析の毒性実験への適用、そして LMD 法の劇的な精度向上に成功したことである。また BPA ならびにダイオキシン曝露影響についても、多くの新知見を得ることができた。体系的評価手法の構築のために、本研究で構築した手法をもとに改良を重ねてゆく必要があるだろう。

(附表 1) 生後 21 日目の海馬において BPA 曝露によりアレイ・シグナル値が 2 倍以上増加した遺伝子 (official gene symbol のみ記載)

Krt20, Ms4a1, Age1, Parp16, Clca6, 4931429P17Rik, Tcfap2e, Es31, Clec4b2, 4921511M17Rik, Olfr329, Olfr441, Ccr2, Ints6, Acsml, Fut1, Cspp1, Cdkl3, Cep290, Spert, 1700034H15Rik, 8030463A06Rik, A030004J04Rik, Gm1045, EG245376, 1700013H16Rik, Eif3s1, 1700011H14Rik, Htr3b, Gcg, Catsper4, Slc17a6, Fmo3, Prc1, Olfr1084, Crabp2, Yaf2, 4921524J06Rik, 1700003F17Rik, 2010109I03Rik, Il19, Ankrd56, Symp2, Noxa1, 4933433K01Rik, Bmp8b, Pklr, EG433180, Olfr107, Olfr410, Tktl1, Atf7ip2, LOC630212, Tctsv3, Ifna12, 2610016E04Rik, Fcna, D14Ert668e, C130060K24Rik, Hsd3b5, Tulp2, Soat2, Gm93, Lzts1, Sit1, Hscb, EG385412, 4930485B16Rik, IGKV4-54, Csrp3, Vgll1, 4732474A20Rik, Fhl3, Hsd3b6, Olfr1467, 1700014B07Rik, BC048502, Gpr173, V1rc30, 4930583C14Rik, Olfr606, Dsg1a, NP_848901.1, Olfr61, Mpa2l, Olfr943, Olfr978, Shox2, 3830403N18Rik, IGKV4-72, AI481877, Hgd, Cdr4, Bst1, Pah, Lrrn6d, Olfr432, Alpk1, 9330101J02Rik, Olfr843, 2210409E12Rik, Gm1564, LOC635992, Mdn1, Map3k2, Blk, Trpv6, Dnajc5b, Olfr131, Abra, Ppp1r12a, Cntn5, Pde5a, Ces7, Olfr205, NP_001004153.1, Olfr145, 1700029P11Rik, Wnt1, Muc10, Prg4, 1700084C06Rik, Bmf, Pla2g10, Olfr745, Igfl3, LOC633404, Cdca8, Phox2a, Cd7, Sucla2, Myot, 1700058C13Rik, Mllt3, 8030451F13Rik, Olfr922, Defb13, Zp1, Csf3, Nr4a3, Prlpc4, Eif3s6, OTTMUSG00000008540, Olfr1257, 8030423F21Rik, Tubgcp6, Olfr881, EG436523, Ccl28, 1700003E24Rik, Avpr2, Gpr35, Timp1, Ptgdr, Prg3, Aldh7a1, Usp43, Ccdc54, Kenh7, 4631426E05Rik, Olfr594, A530013C23Rik, Olfr830, Lbxcor1, Sprr2e, Defcr21, Olfr42, Gimap4, Olfr1215, Olfr740, Prlpj, Hsd17b13, Nola2, Pot1b, BC026782, 6330505N24Rik, Olfr284, 4930470H14Rik, Gm414, A130023I24Rik, Olfr1491, Dub2a, Olfr730, Olfr105, Olfr695, Olfr1265, Irg1, Omd, Cxcl13, V1rc27, Trhr2, Csn3, Ifltd1, 4930528F23Rik, 4930546C10Rik, Tmem16e, H2-M1, Olfr683, Obox4, Olfr519, Cilp2, Olfr709-ps1, NP_001033765.1, Olfr1019, Ccdc99, Olfr1018, Avil, Tmigd1, Srpax, Cryaa, Nrl, OTTMUSG00000010433, Sprr2j, Zdhhc19, Gpr55, C230029F24Rik, LOC621167, LOC546711, IGHV1-55, Gpr111, Olfr1126, Sgol1, Gpx5, Myh6, Aldh3a1, Gm885, Hpvc2, Asb4, Lrrc9, Jph2, 4930563P21Rik, Sult1d1, Cobl, Scube1, Hoxa1, Krt84, EG546672, Gm467, A130066N16Rik, 5730585A16Rik, Gpr112, Sprr2d, Tmem102, Rhox2, Fat2, Olfr1085, Enam, Utlf1, Tenr, Rhcg, Tsga13, Amdhd1, Abca13, Slc4a9, Cyp21a1, Tat, Tspan8, Dnahc17, EG333669, Prrg1, Olfr427, LOC676847, Abca17, Sumo2, A630098G03Rik, Olfr935, ENSMUSG00000053049, EG667588, Olfr1051, Arg1, Mybl2, Cyp2c29, 1810046K07Rik, Amh, Gzmk, Dysfip1, Slc5a4b, Tnfrsf26, A630055G03Rik, EG383229, Odf3l1, Gucy2g, Olfr624, Siglec1, ENSMUSG00000053891, LOC675189, ENSMUSG00000043661, Dnahc7, Olfr1458, D230014K01Rik, Hus1b, Olfr469, Pbp2, C330046G03Rik, Gp1ba, Hoxd4, Cpa1, Abcg3, Art2b, Pde6c, Slc6a5, Jmjd2d, Hfm1, Tas2r144, 9630028B13Rik, Olfr522, 1700049M11Rik, D0H6S2654E, ENSMUSG00000053531, Olfr290, Obp1b, Ccdc72, Gpr44, V1re10, Ly6k, Tktl2, Gdpd4, Krt17, Glra4, Cdkn2a, Gm379, Olfr1033, Oog1, EG238564, Hmgb1l, Spt2, Leng1, Olfr1280

（附表 2）生後 21 日目の海馬において BPA 曝露によりアレイ・シグナル値が低下した遺伝子（対照群において 2 倍以上の値を示した遺伝子）（official gene symbol のみ記載）

Efhb, Defb9, Tcl1b3, 2810046M22Rik, Reg4, Wfikkn2, Olfr1111, Tex16, Serpinb1b, Clic6, Olfr1442, Tap1, Pon1, Otof, 1700123K08Rik, Epo, H2-M10.5, Tmem162, Olfr894, ENSMUSG00000054745, Olfr591, Cypt10, Olfr9, Prdm9, Txnl6, Hist1h2aa, 4933408J17Rik, A430107D22Rik, TRAV12-2, Olfr948, Drd4, 1110059M19Rik, Folr1, Krt18, Olfr570, Hbs1l, Pcdcd11, Lycat, Nqo1, 1500015O10Rik, Wfikkn2, Plek2, Slc16a8, Dcdc2a, Olfr328, Tmprss6, 1300013D18Rik, Magea10, Hs3st6, Wfdc2, Krt8, V1ri2, Whrn, Ubb, 1700011L22Rik, Fga, Gp2, Dsc3, Smpx, Krt33b, Defb10, 2700023E23Rik, Itga5, Cldn2, Htr4, Defb11, F5, Tex14, Guca1a, Ttr, Kcne2, Steap1, Marveld3, Tlr6, Hba-a1, Aqp1, Sulf1, Tas2r143

(附表 3) 生後 21 日目の大脳皮質において BPA 曝露によりアレイ・シグナル値が 2 倍以上増加した遺伝子 (official gene symbol のみ記載)

Crybb2, Acpt, Agcl, Efhh, Cyp2a4, Gm1008, Olfr1013, 4921511M17Rik, Q8C3I5_MOUSE, Arnt, Ints6, 1700126L10Rik, Cdkl3, 2210010C17Rik, Gm382, A930013B10Rik, ENSMUSG00000060271, Olfr76, Tchp, Eif3s1, Grk1, Clic6, Clspn, Adh4, 1700003E24Rik, Olfr1014, LOC633199, Cyp2e1, Ddx55, Slc7a13, Hist4h4, Ssh2, 4933421E11Rik, A230052G05Rik, OTTMUSG00000007392, Aprin, BC013476, Tbx15, Mfsd9, LOC630212, Klklb1, Rnf17, Krtap6-3, Itih1, Tnnt3, 5830433M19Rik, OTTMUSG00000007026, Sipal12, EG623186, Ear6, Ttyh1, Fgr, Csrp3, Gc, Dyrk4, Atad2, Tpsgl, Olfr429, Ereg, Car1, LOC670644, Cpa6, Olfr1385, Mybl1, Csf2rb1, Adra2b, 2610016E04Rik, Ddc8, Gbp1, Foxp3, Rad54l2, Folr1, Cep110, 1700001C19Rik, Olfr1094, Gm1381, 9930038B18Rik, Myh13, Kl, D930016N04Rik, Kcnj15, Gm1564, Cd3e, LOC635992, Gpr110, A830080D01Rik, ENSMUSG00000053792, Olfr145, Gpr115, Cer1, LOC633404, Cenpe, Gpr97, Nmu, 2610528K11Rik, Ckap5, Mllt3, 4933440M02Rik, Upk3b, TRBV13-3, Cd200r2, Defb8, Olfr642, Ptpn7, Ptpn3, Olfr951, Dock2, EG668411, Ccl28, Csn1s2a, Gja10, BC038479, Ppp1r1c, Scml2, Defb10, 5430402E10Rik, Defcr21, Cldn23, Bves, Zp3, Pot1b, Paxip1, Nfat5, Stra8, BC026782, BC048390, 4932411E22Rik, Gm414, Wapal, Cyp4a12b, V1rf3, Padi4, 4930560E09Rik, Lcn9, Gtf2a1lf, Myo1g, Atad2b, Ppfia2, Cga, Rab5a, C130073F10Rik, Defb11, Hoxc8, Prss7, 2610528E23Rik, Ankhd1, TRBV19, Pkd1l3, 4930544M13Rik, Mrgprb8, Gpr55, C230029F24Rik, Cebpe, LOC546711, Ang4, IGHV1-55, Pfas, Col8a2, Avpr1a, Gm885, Cts8, Prlpc1, Slc7a15, 1700025O08Rik, Il1f10, D130058I21Rik, EG546672, Olfr607, Olfr299, Tmem102, Olfr531, Trim65, Olfr1232, Olfr1085, Popdc3, Tenr, Ldhc, Stk32b, Fbxw8, 1700113H08Rik, Serpina7, Trpv1, Pramel6, Dnahc8, Adamts6, Olfr926, BC002059, Olfr1274, Olfr972, Car3, Defcr26, Heg1, Rps12, Arg1, Hsd11b2, Ttr, Smtnl1, Pkp3, 2410004A20Rik, 1810046K07Rik, 4930511H11Rik, Crtam, Dysfip1, Lrriq1, Cyp2j13, 1700029J11Rik, Tnfrsf26, 1700018B24Rik, Gldn, Dnajc5g, V1rg10, 5830477G23Rik, Olfr354, Olfr137, Aoah, Gp1ba, Il2, Dtpnp, Ces5, Slc6a5, Cnksr1, Olfr558, Slc26a9, Nut, Ttc16, 9630028B13Rik, Cep170, 1700049M11Rik, LOC632254, Rnase11, Eda, Olfr373, Olfr1293, Xmr, Gprc5a, Pla2g2a, Sh2d1a, Aqp1, Tbc1d8b, Miox, Pkhd1l1, Lrrc46, Slc5a7, 2310002L13Rik, Csc5, Ros1, 1110029E03Rik, Pla2g4f, Pamci, Gm1082, 1700008G05Rik, Olfr1033, Madd, E2f8, Spt2, BC018285, Olfr994, Olfr1259

（附表 4）生後 21 日目的大脑皮質において BPA 曝露によりアレイ・シグナル値が低下した遺伝子（対照群において 2 倍以上の値を示した遺伝子）（official gene symbol のみ記載）

Cpox, Olfr1179, Chrna6, Tecta, 4921526F01Rik, Olfr265, Olfr397, Ap3s2, Nlrp1, Atp6v0b, Gli2, E330013P04Rik, Gm317, 6720460F02Rik, Brs3, Iqch, 1700094C09Rik, Grb2, Hyal3, Adam25, 4930451C15Rik, 4933434I20Rik, Olfr690, 39337, Ms4a8a, Camk2a, Aldoa, 4930522H14Rik, Phox2b, Olfr664, 4933425L03Rik, Ppia, AA792892, Tspan18, Olfr874, 4931431C16Rik, 4930553M12Rik, Thada, 4930422G04Rik, Lyzl4, Aldh18a1, Zfr, Ceacam18, St6galnac2, 2810451A06Rik, Ysk4, NP_083982.1, Olfr202, Prp2, Gpr149, Spon2, Plac8, Spata16, Slitrk5, H2-Q10, Sars, Gpr84, Psmb7, Fut2, Jarid1c, Olfr706, Q8CDJ0_MOUSE, Csh1, Adh6a, Akr1c12, Slc18a1, Olfr1164, Chd3, Edg6, Gltp, Uap111, Ifnb1, EG434228, Depdc5, Ubb, 2810408M09Rik, Q9D605_MOUSE, Treh, Dapk3, Tst, Hba-a1