

「内分泌かく乱物質」
平成11年度採択研究代表者

黒田 洋一郎

(東京都神経科学総合研究所 参事研究員)

「内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への影響と毒性メカニズム」

1. 研究実施の概要

内分泌攪乱物質が遺伝子発現などの攪乱などを介して脳神経系の機能発達に影響を与えることが憂慮される。ADHD（注意欠陥多動性障害）など最近の日本における青少年の異常な行動を考慮しつつ、神経科学の最先端の知識・研究方法を駆使して、分子・細胞・個体レベルで実験的研究を行い、リスク評価のため機能スクリーニング系の開発、それを支える分子メカニズムや毒性メカニズムの解明のための基礎データの積み上げを行う狙いを持つ。

本年度は個体行動への影響を見るグループも立ち上がり、研究が進んだ。

- (1) 培養系神経細胞の機能発達や分化を指標とした系の開発と基礎データの積み上げなど細胞レベルの研究では、知能低下などの発達障害との関係が示唆されている甲状腺ホルモンが、大脳皮質や小脳の神経細胞の機能発達や分化に大きな影響を与えていることが明らかになった。さらに1次スクリーニング系として使えるかを明らかにするために、条件検討など詳しい実験を行った。
- (2) 遺伝子発現への影響を指標とした機能スクリーニング系の開発など遺伝子レベルの研究では、遺伝子発現への影響をさらに詳しく検討した。たとえばピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンとDDTは共に神経活動(Ca^{2+})依存性のc-fos, BDNF遺伝子の発現誘導を抑制する。そこで、ペルメトリンとDDTを同時に加えて、発現誘導、 Ca^{2+} 流入に及ぼす影響を調べた。その結果、10mMペルメトリン、10mMDDT以下の濃度での同時投与で、相加的な抑制が認められた。また、 Ca^{2+} 流入に対しても、同様な相加的效果が認められた。今後、このような複合汚染による影響の検討も重要なことが示唆された。
- (3) ラットの胎生期・新生期暴露による環境化学物質の行動発達への影響など、個体レベルの研究では、胎生期および新生仔期におけるBPA暴露がF344系ラットにあたえる影響を検索した。発生期における内分泌系の作用機序の複雑さを反映し、結果は複雑であった。しかしながら発生期におけるBPA暴露は中枢神経系に対し微細であったが影響を与えたと考えられる。今後さらに成熟した個体についても同様な検索を行い、その影響を詳細に検討する必要があることが判明した。

それぞれの階層別の3グループが、それぞれの結果を相関できるようになってきたので、今後各研究グループの協力体制を強め統合された知見を目指す。

2. 研究実施内容

・培養脳細胞を用いた機能スクリーニング系開発

(1) 大脳皮質神経細胞機能発達に対する甲状腺ホルモンの影響

甲状腺ホルモンが脳の発達に重要なこと、PCBなどの胎児被曝により結果的にIQの低下など知的発達の遅れが起こることはよく知られているが、細胞・分子レベルの研究はほとんどない現状である。甲状腺ホルモンが神経細胞機能発達を促進するという前年度の結果を踏まえ、甲状腺ホルモンの添加法など詳しい実験条件を検討した。妊娠ラットより取り出した18日齢の胎児(E18)ラット大脳皮質神経細胞の初代培養を行った。大脳皮質を切り出し、酵素処理により細胞をバラバラにし、5% Horse serum、5% Calf serumを含むDMEM培地に細胞を懸濁した。ポリエチレンイミンでコーティングしたカバーグラスに8wellのフレキシバームを貼付けた培養ディッシュに細胞懸濁液を分注した。37℃、7% CO₂に保ったインキュベーターで3日間培養後、血清を取り除くため、血清を含まないDMEM培地で1回ウオッシュし、血清を含まないDMEM培地に交換して30分間インキュベートした。cultureから培養上清を取り除き、甲状腺ホルモン(T₃、T₄)又はcontrolとして同濃度のDMSOを含むDMEM培地を加える。以後培地交換を2日に1回行った。培養8-10日でfura-2を用いた蛍光同時多点計測を行い、シナプスで結合された神経細胞の自発発火を細胞内カルシウム濃度の同期変化として観察した。

甲状腺ホルモンの添加はpMオーダーから、細胞内カルシウム濃度の同期変化の頻度を上昇させた。細胞内カルシウム濃度の同期変化の頻度は、形成されたシナプス密度に比例することが分かっているので、甲状腺ホルモンによるシナプス形成の促進が示唆された。さらに甲状腺ホルモンにアンタゴニスト作用のあるアミグダロンは用量依存的に甲状腺ホルモンの作用を抑制した。

大脳皮質神経細胞機能発達、ことに知能発達にかかわるシナプス形成に対する甲状腺ホルモンの影響がin vitroで簡便にアッセイ出来ることになった。本実験系は内分泌かく乱物質の脳機能発達への影響をみるための一次スクリーニング系となるばかりでなく、甲状腺ホルモン系を介する分子毒性メカニズムを解析するのに好適な系であることが示唆された。

(2) 大脳皮質でのシナプス形成にかかわる機能分子とその遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響

ヒト脳の発達過程で甲状腺ホルモンの不足が、重篤な知的発達障害(精神遅滞)を伴うクレチン症を引き起こすことは良く知られている。一方内分泌かく

乱物質のエンド・ポイントの1つとして考えられる、知的発達の要であるシナプス形成にかかわる分子群については、ほとんどわかっていない。しかしさまざまな知的機能にかかわる脳内の神経回路を精緻に作り上げている100兆のシナプスを正しく結合させるには、きちんとコントロールされた秩序立った遺伝子発現が必須である。シナプス形成に直接かかわっていると考えられる分子に microtubule-associated protein 1b (MAP1b) がある。まずこのMAP1b遺伝子の発現に対する甲状腺ホルモンの影響をノーザンブロットで調べた。

胎生18日齢のラットより大脳皮質を切り出し、初代培養細胞を調製し、血清入りDMEMで培養した。培養7日目、培養細胞を血清を含まないDMEMで2回洗った後、培地を血清を除いたDMEMで置換した。培養8日目、終濃度100nM、10 μ MのT3およびT4を含む血清(-)のDMEM培地をそれぞれ、培地を全置換する形で大脳皮質培養細胞に加え、overnight処理した。薬物添加12時間後、培地を除き、冷却したリン酸バッファーで細胞を洗浄した後、RNAzol液を加え、大脳皮質培養細胞より、全RNAを抽出した。1 μ gずつの各全RNAをアガロースゲルにのせ、電気泳動により分離した後、Northern blot法によりブロット膜へRNAを移した。MAP1B cDNA部分塩基配列をプローブとし、DIG標識して用いた。RNAをブロットした膜を、このプローブと24時間ハイブリダイズさせ、アルカリフォスファターゼ標識の抗DIG抗体をさらに反応させた後、MAP1b mRNAを化学発光法によりX線フィルムに感光させて検出した。MAP1b mRNAの発現量は、28s rRNAの量で標準化を行い、densitometerにより定量した。

RNA抽出前に位相差顕微鏡観察のレベルでは、どの処理条件においても培養細胞の様子に顕著な差はなく、またRNA収量もほぼ同程度であった。遺伝子の転写活性への影響では、甲状腺ホルモン無添加コントロールに比べ、甲状腺ホルモンで処理した群では、明らかにMAP1b mRNA量が増加していた。この発現量の増加は、T3、T4両処理群で共に認められ、T3、T4間では顕著な差は認められなかった。またそれぞれで濃度を2点(100nMと10 μ M)取ったが、いずれもmRNA発現量の増加は同程度で、無添加コントロールに比べて、約6倍程度であった。

この実験結果はT3、T4によってシナプス形成がこの培養系で促進される現象と平行で、甲状腺ホルモンはMAP1bなどのシナプス形成に重要な機能遺伝子の発現量を増加させることによってシナプス形成、ひいては脳の機能発達コントロールしていることが明らかになった。甲状腺ホルモンとMAP1bなどの機能分子群のシナプス形成への関連の検討をはじめ、今後の研究の方向が示された。

(3) 小脳プルキンエ細胞発達分化における甲状腺ホルモン及びビスフェノールAの影響

内分泌かく乱物質の小脳機能発達への影響を小脳の代表的な神経細胞であるプルキンエ細胞培養系を用いて検討した。プルキンエ細胞の、正常な発達には甲状腺ホルモンやステロイドホルモンが必要であることが最近報告されており、また特有の機能や形態を示すことから、モデル系として有効と思われる。まず、甲状腺ホルモン及び、神経系への蓄積が心配されているビスフェノールAについて検討した。

生後0 - 1日のマウス小脳をパパインで消化した後、ホルモン類を除去した無血清培地で培養した。1日後、甲状腺ホルモン(T4)、BPAをおのおの0.5 pM - 500 nM添加し、3 - 4日毎に培地交換をしながら3週間培養した後固定し、特異抗体で染色してからプルキンエ細胞の数と形態を観察した。

ホルモン類無添加の対照群に比べ、T4添加群では生残プルキンエ細胞の数が多く、特に500 nMでは対照群の4 - 10倍であった。また樹状突起の発達もよく、突起の伸展した面積を計測したところ、T4 5 pM以上を添加した群では対照群の2 - 4倍で、正常マウス小脳におけるプルキンエ細胞特有の形態を示した。一方BPA添加群では、プルキンエ細胞の生残数は、T4添加群同様高くなったが、樹状突起の伸展は悪く、対照群と同様プルキンエ細胞の発達分化に異常がみられた。以上の結果から、プルキンエ細胞の発達分化には、甲状腺ホルモンが必須であること、またBPAが影響を及ぼす可能性が示唆され、プルキンエ細胞培養系は、一次スクリーニング系としても有効であると考えられる。

・遺伝子発現への影響を指標にした機能スクリーニング系の開発

哺乳動物の脳・神経系における生後の発達には、シナプス伝達によって引き起こされる、謂る神経活動に大きく依存した過程が存在する。一方、DDTやが、Na⁺チャンネルに作用してNa⁺透過性に影響を与えるという報告がなされている。この事実、これら殺虫剤が神経活動に影響を与える可能性のあることを示している。したがって、脳・血液関門が出来上がっていないヒト乳児脳に、母乳から摂取された種々の環境化学物質が到達し、神経活動に影響を与え乳児脳発達に悪影響を及ぼすことが懸念された。

脳由来神経栄養因子(BDNF)とc-fos遺伝子に注目して神経活動依存的な遺伝子発現制御系の解析をマウス小脳顆粒細胞初代培養系において行い、これら遺伝子発現に及ぼす環境化学物質の影響を検討した。また、母乳には複数種の環境化学物質が含まれており、その複合的な影響も懸念される。そこで、これら物質の複合的効果についても検討を加えた。

さらに個体レベル、すなわち母乳から殺虫剤を摂取した仔マウス脳における、

BDNF, c-fos遺伝子の発現変化も調べた。

生後一週目のICRマウスから、小脳顆粒細胞の初代培養系を調製した。25mM KCl存在下で4日間培養した後、5mM KClを含む培地(含FCS)に交換し、さらに培養を続けた。24時間後、Na⁺チャネルアゴニストであるベラトリジン、あるいは、25mMになるようにKClを加え、脱分極刺激を加えた。この刺激投与10分前に、ペルメトリン、DDT、DES、ビスフェノールA(BPA)などを加えた。刺激後6時間目に細胞を集め、全細胞RNAを調製した。BDNF, c-fos mRNAの発現量の変化はノザンプロット法で調べた。細胞内へのCa²⁺流入は、⁴⁵Ca²⁺の細胞内取り込みを測定した。

個体レベルの実験では仔マウスへの殺虫剤投与は、母親マウスへの飲水投与によって間接的に行った。0.33 ~ 33mg/mlのペルメトリンを含む水を、母親マウスに出産直後から与え、母乳による仔マウスの飼育を行った。経時的に仔マウス脳から、小脳、大脳皮質を調製し、RNAを抽出した。

培養細胞では10mMベラトリジンを加えた所、顕著なc-fos, BDNF遺伝子の発現誘導が認められた。ペルメトリンを加えると、ベラトリジン、あるいは25mM KCl刺激によるc-fos誘導とともに、10⁻⁶ ~ 10⁻⁵Mレベルから有意に抑制が認められた。DDTによっても、同じ濃度レベルで抑制が認められた。1 x 10⁻⁴Mまでの濃度範囲では、細胞毒性は認められなかった。また、c-Fos蛋白質の合成も低下していた。DDTでも同様の抑制効果が認められた。c-fos, BDNF遺伝子発現誘導は細胞内へのCa²⁺流入に依存しているので、ペルメトリンの細胞内Ca²⁺流入に与える影響を検討し、遺伝子発現に与える影響と同様に、カルシウム流入にも、10⁻⁶ ~ 10⁻⁵Mレベルから抑制が認められた。DDTでも抑制効果が認められた。

そこでペルメトリンとDDTの相加的効果を検討した。ペルメトリンとDDTが神経細胞に対して同じ作用点を有するならば、両殺虫剤にはそれぞれ飽和量に達しない範囲で相加的効果の及ぶことが予想された。そこで、ペルメトリンとDDTを同時に加えて、発現誘導、Ca²⁺流入に及ぼす影響を調べた。その結果、10mMペルメトリン、10mMDDT以下の濃度での同時投与で、相加的な抑制が認められた。また、Ca²⁺流入に対しても、同様な相加的効果が認められた。ペルメトリンとDDTの影響は、Na⁺チャネルへの直接的な特異作用の結果というよりも、脂溶性であるため膜の脂質二重層に影響を与え、その結果、Ca²⁺チャネルなどのイオンチャネルの透過性に影響を及ぼしているという非特異的な作用によることが考えられた。そこで、脂溶性の環境ホルモンDESとBPAについて、同様の検討を行った。その結果、DES, BPAともに、10⁻⁶ ~ 10⁻⁵Mレベルから発現誘導ばかりでなくCa²⁺流入に対しても抑制が認められた。これは、ペルメトリン、DDTによる効果と同様であった。しかし、DESとBPAの間には、明確な相加的な抑制効果は

認められなかった。

また、DESおよびBPAともに、低濃度（ $10^{-12} \sim 10^{-9} \text{M}$ ）において、遺伝子発現に与える影響は認められなかった。

さらに個体レベルの実験ではペルメトリンを飲水投与した母親マウスから、授乳を介して仔マウスにペルメトリンを摂取させて、小脳、大脳皮質RNAを調製してc-fos, BDNF mRNA発現レベルの変化を調べた。その結果、生後3週目の小脳において、c-fos mRNAの発現レベルが有意に減少した。大脳皮質におけるc-fos発現にも減少が認められた。BDNF mRNA発現にも減少の傾向が認められたが、有意差はとれなかった。授乳を止めた5週目仔マウス小脳では、非投与仔マウス小脳におけるc-fos発現レベルと同程度に認められた。

ペルメトリン、DDT、DES、BPAは、共通に Ca^{2+} チャネルからの Ca^{2+} 流入を抑えてしまっているものと考えられる。これは、これら化学物質が脂溶性であるがため細胞質膜の脂質二重層に入り込み、脱分極レベルを下げるなどしてイオンチャネルのイオンの透過性を抑制しているためと考えられた。この効果は非特異的なものであり、これら化学物質は共通の作用効果を発揮するものと考えられた。実際、ペルメトリンとDDTには明らかな相加的效果が認められた。この事実は、母乳中に複数種の脂溶性化学物質が存在する場合、たとえそれぞれの脂溶性化学物質の濃度が低くても、その効果は総和となって発揮されることを示している。したがって、将来的に、母乳中に含まれるそれぞれの脂溶性化学物質の濃度が上昇してくるにつれ、その総和の効果で神経細胞内への Ca^{2+} 流入が抑えられる可能性がある。この Ca^{2+} 流入は、神経細胞機能の発揮には重要な役割を果たしている。例えば、前シナプス部位における神経伝達物質の放出、ミトコンドリアの活性化、遺伝子発現など多くの過程に重要である。したがって、その抑制は発達中の脳に相乗的な障害性を及し得る可能性がある。今後、このような観点からの脂溶性化学物質の影響は考慮される必要がある。

また、動物実験でペルメトリンが遺伝子発現レベルに影響を及ぼすことが明らかとなった。これが、神経機能発現にどのような影響を与えているかについては不明である。

・ラットなど実験動物を用いた行動学的観察

ビスフェノールA（BPA）の胎生期及び新生仔期暴露によるラットの中枢神経系発達への影響

F344系妊娠ラットに対し、オリーブオイルに溶かしたBPAを妊娠10日目から出産後20日目まで、毎日経口投与を行った。BPAの暴露濃度はそれぞれ、0（対照群）、4、40、400mg/kg/dayである。仔ラットは一腹あたり8匹以下に統一し、生後21日目に離乳させ、雌雄別に群飼育した。この投与により被験ラットは胎生

期に胎盤、新生仔期に乳汁を介してBPAに暴露されていると考えられる。被験ラットに対し生後1、2、3、4、および8週目に体重測定を行った。生後4、および8週目において、受動型赤外線センサーを用いた新規場面での自発運動量（30分間）および通常飼育下での自発運動量（24時間連続（暗12時間、明12時間））を測定し、それぞれ運動能力、平常時活動量の指標とした。また、シャトルアボイダンスシステムにより、能動的忌避学習能力の測定を行った。

- ・母ラットについて

投与開始後の体重増加率ではBPA暴露群の母ラットは対照群にくらべ4 mg/kg/day群で上昇し、40、400mg/kg/day群で減少した。他方、妊娠期間、産仔数、性比には各群で差はみられなかった。

- ・仔ラットについて

離乳するまでの生存率は400mg/kg/day群で55匹中1匹が死亡したことを除いて100%であった。この個体の死因は不明である。400mg/kg/day群のオス個体の体重は全ての計測時において対照群と比較し有意に低値を示した。新規場面自発運動量は4週齢、8週齢時いずれも対照群に比べ有意な変化はみられなかった。通常飼育下における自発運動量（24時間連続）については4週齢の暴露群メスの暗期自発運動量が対照群メスに比べ有意でないものの低下する傾向がみられた。そこで4週齢のメスについて赤外線センサーによるカウントが0を示した時間、つまり不動時間を合計し比較すると40、400mg/kg/day（それぞれ平均165分、145分）群は対照群（平均120分）に比べ有意に高値を示した。4週齢のオス、および8週齢のオスおよびメスではこのような影響はみられなかった。シャトルアボイダンスシステムにより測定した忌避率は、4週齢のオスでBPA暴露濃度依存的に上昇する傾向がみられた。4週齢のメスはオスと比較し高値を示したがBPA暴露の影響はみられなかった。8週齢のオスでは対照群に比較し暴露群で低下する傾向がみられた。8週齢のメスはオスと比較し低値を示したがBPA暴露の影響はみられなかった。

400mg/kg/day群のオスの仔ラットで有意な体重増加率の低下がみられた。これは授乳期を含めオスのみでみられたことから、母ラットの泌乳量の低下といった母親に対する影響というよりも胎生期ないしは新生仔期におけるBPA暴露が内分泌系を攪乱した結果である可能性が高い。この効果は他の同様な実験を行っている報告では確認されていない。考えられる原因としてラットの系統差が上げられる。従来、毒性試験においてはSD系ラットが繁用されてきたが、F344系ラットはSD系ラットに比較しエストロゲン様化学物質に対する感受性が高いという報告がある。また、この効果がBPAのエストロゲン作用によるものなのか、もしくは近年報告された抗アンドロゲン作用によるもの

なのかを明らかにする事は今後の課題である。

新規場面自発運動量（30分間）は生後4週、8週齢いずれにおいてもBPA暴露の影響はみられなかった。BPA暴露は運動量に反映される行動発達には影響を与えないと考えられる。現在オープンフィールド行動を録画し、画像解析をおこなうことによりグルーミングやリアリングなどの諸行動の詳細な検索を試みている。

4週齢時のメスの暗期活動量はBPA暴露により減少する傾向がみられた。より詳細に検索を行った結果、対照群にくらべBPA暴露群では不動時間が有意に増加した。このことは、あらかじめ馴化してある飼育ケージ内で長時間連続して計測することによる平常時活動量の測定が内分泌攪乱化学物質の影響を検索するのに有用であることを示している。また4週齢オスではこのような影響が全くみられなかったことは、感受性に性差があること、すなわち性ステロイドの攪乱が原因であることを示唆する。8週齢においてはオスメスともにBPA暴露の影響はみられなかった。4週齢メスのラット体内に存在するBPAが直接このような効果をもたらしたのか、または既に中枢神経系に機能的差異が生じていたのかは興味ある課題であるが、BPA暴露は3週齢時で終了しており、BPAの長くても数時間という短い半減期を考えると、暴露により既に中枢神経系に機能的差異が存在していた可能性が高い。発達とともに影響がみられなくなった理由は不明であるが、8週齢メスでは性周期がありそれによる日間変動がBPA暴露による微細な影響をうち消してしまっている可能性がある。いずれにせよBPAなどの内分泌攪乱化学物質の影響を検索するにあたっては、正確な検索と解釈をおこなうために生体の発達を考慮した経時的検索が必要不可欠であると考えられる。

シャトルアボイダンスによる能動的忌避学習能力の測定では4週齢、8週齢ともにオスにおいてのみ、有意ではないもののBPA暴露の影響がみられた。4週齢時ではBPA暴露により忌避学習能力は上昇したが、逆に8週齢時では低下した。この結果の解釈は難しいが、4週齢、8週齢時いずれにおいても対照群に性差が存在していることからオスにおいてはBPA暴露によりメス化した結果、4週齢時では忌避率が上昇し、8週齢時では低下したと考えることもできる。中枢神経系、特に脳において性差が最も明らかなのは性的二型核であるが、今回の学習能力への影響は性的二型核というよりは海馬皮質系への影響であるのかもしれない。BPA暴露に関して組織学的検索により中枢神経系への影響を明らかにした報告はない。つまり、組織学的には明らかにできないレベルの変化でも行動学的検索では明らかにすることができるのかもしれない。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

- J. Biol. Chem. 2000 Jun 9 ; 275(23): 17269-75

Differential activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoters I and III by Ca^{2+} signals evoked via L-type voltage-dependent and N-methyl-D-aspartate receptor Ca^{2+} channels.

Tabuchi A, Nakaoka R, Amano K, Yukimine M, Andoh T, Kuraishi Y, Tsuda M.

- J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000 Dec ; 295(3): 1175-82

Repression of activity-dependent c-fos and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by pyrethroid insecticides accompanying a decrease in Ca^{2+} influx into neurons.

Imamura L, Hasegawa H, Kurashina K, Hamanishi A, Tabuchi A, Tsuda M.