

論文の内容の要旨

論文題目 環境化学物質の周産期曝露によるニューロン形態変化の解析

氏 名 木村栄輝

序論

現代社会において、ヒトや野生動物は環境中に放出された様々な化学物質にさらされている。環境化学物質の健康リスク評価を行う際には、ヒトにおける臨床・疫学的知見に加え、実験動物を用いた繁殖毒性、発がん性、発達神経毒性などの毒性試験結果が用いられる。発達神経毒性は化学物質曝露が胎児期・発達期における神経系の構造や機能におよぼす毒性影響であり、いわゆる内分泌かく乱化学物質への曝露により、高次脳機能への作用が引き起こされる可能性が疫学研究および動物実験の結果から示唆されている。このような影響が報告されている化学物質にはビスフェノール A (BPA) やダイオキシン類などがある。

BPA はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であり、これらを材料とする製品から BPA が溶出することで、ヒトは日常生活で曝露をうけている。そのレベルは低いもののヒトの羊水からも検出されており、胎児も曝露をうけていると考えられる。ダイオキシン類は廃棄物処理の焼却過程で非意図的に生じたり、難燃剤や誘電性流体として工業的に製造・使用されたりしていた。ダイオキシン類は環境残留性が高いため微量ながらも環境中に存在し、脂溶性であり高い生物蓄積性を示すために胎盤や母乳を介して胎児・乳児へ移行する。なお、ダイオキシン類の中で最も高い毒性を有する同族体は 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (TCDD) である。TCDD は芳香族炭化水素受容体 (AhR) に結合し、活性化した AhR は細胞質から核へ移行後、転写調節因子として機能することで標的遺伝子の発現を誘導する。TCDD 毒性には AhR が必須であることが AhR 欠損マウスを用いた実験により実証されており、AhR により誘導されるシグナルカスケードが毒性影響に重要であることが強く示唆される。

低用量の BPA および TCDD の周産期曝露により引き起こされる発達神経毒性については、げっ歯類を用いた実験から青班核、分界条床核、前腹側脳室周囲核、視索前野性的二型核

などの神経核における体積や構成細胞数の変化が報告されている。高次脳機能への曝露影響については、空間記憶や恐怖条件付け学習の成績低下や社会性行動の変化が報告されている。曝露による高次脳機能の変化から、記憶・学習機能および恐怖情動に重要な役割を担う海馬や扁桃体での器質的変化が生じている可能性が考えられる。しかしながら、器質的変化が報告されている青班核や視索前野性的二型核への曝露影響は、記憶・学習や情動といった高次脳機能への変化を説明するには不十分である。そこで本研究では、高次脳機能と密接な関連をもつ器質的変化を捉えるため、単一ニューロン形態に焦点を当てて、BPAあるいはTCDDの周産期曝露をうけたマウスにおけるニューロン形態の変化を調べた。

方法

本研究では単一ニューロンの複雑な形態を解析するため、脳組織中の限られたニューロンのみを可視化するため、脳の一部のニューロンのみ GFP を発現する Thy1-GFP-M マウスを用いた。また、脳の少数のニューロンのみ染色するゴルジ染色も用いた。

BPA を 40 あるいは 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w/day の用量で妊娠 8.5 から 17.5 日目まで毎日経口投与した母マウスから生まれた雄の Thy1-GFP-M マウスの脳を、生後 21 日目に採取して組織切片を作成した。C57BL/6J 系統の妊娠マウスに対し BPA を 40 あるいは 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w/day の用量で妊娠 8.5 から 18.5 日目まで毎日経口投与し、雄の仔マウスが生後 14 ヶ月齢になってから脳を採取し、組織切片を作成してゴルジ染色した。

TCDD を 0.6 あるいは 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ b.w の用量で妊娠 12.5 日目に単回経口投与した母マウスから生まれた雄の Thy1-GFP-M マウスの脳を、生後 14 日目に採取して組織切片を作成した。C57BL/6J 系統の妊娠マウスに対して TCDD を同様の条件で投与し、雄の仔マウスが生後 16 ヶ月齢になってから脳を採取し、組織切片を作成してゴルジ染色した。

子宮内胎仔電気穿孔法により、野生型 AhR あるいはリガンド非依存的に遺伝子発現を誘導する構造活性型 AhR (CA-AhR) の発現ベクターを胎生 15 日目の脳に導入した。ニューロン形態を可視化するために蛍光タンパク質 tdTomato 発現ベクターも同時に導入した。遺伝子導入したマウスが生後 14 日目の時点で脳を採取して組織切片を作成した。

作成した脳組織切片よりニューロンの形態解析を行った。NeuroLucida および NeuroExplorer ソフトウェアを用いて樹状突起の長さ、分岐数、伸長パターン of the 複雑度を解析した。スパイン密度は組織切片の標的脳領域の顕微鏡画像を取得して解析した。

結果

BPA を 40 あるいは 400 $\mu\text{g}/\text{kg b.w}/\text{day}$ の用量で妊娠期に投与したマウスから生まれた仔（以下、それぞれ BPA 40 群、BPA 400 群）が、発達期（21 日齢）の時点でのニューロン形態を解析した。海馬 CA1 錐体細胞を調べた結果、BPA 400 群では基底樹状突起の全長および伸長パターンの複雑度が対照群、BPA 40 群と比べて有意に減少していた。さらに分枝ごとの長さや数を調べたところ、BPA 400 群の第 5 分枝の数が対照群、BPA 40 群と比べて減少していた。一方、分枝ごとの長さについては曝露による変化は認められなかった。老齢期（14 ヶ月齢）では BPA 40 群、BPA 400 群ともに対照群と比べて海馬 CA1 でのスパイン密度の有意な低下が観察された。

TCDD を 0.6 あるいは 3.0 $\mu\text{g}/\text{kg b.w.}$ の用量で周産期曝露したマウス（以下、それぞれ TCDD 0.6 群、TCDD 3.0 群）が、発達期（14 日齢）の時点でのニューロン形態を解析した。海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起では、TCDD 3.0 群の第 2 分枝の長さが対照群と比べて有意に減少し、TCDD 0.6 群の第 3 分枝の長さが対照群、TCDD 3.0 群と比べて有意に増加していた。また、扁桃体ニューロンの樹状突起では、TCDD 3.0 群の第 3 分枝の長さが対照群と比べて有意に減少していた。老齢期（16 ヶ月齢）では TCDD 0.6 群、TCDD 3.0 群ともに対照群と比べて海馬 CA1 のスパイン密度の有意な低下が認められた。

TCDD と結合して活性化した AhR により誘導されるシグナルカスケードと樹状突起伸長との関連を調べるため、野生型 AhR あるいは CA-AhR を発生・発達段階の海馬 CA1 錐体細胞に発現させた。生後 14 日齢に海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起を調べたところ、CA-AhR 発現群では対照群および野生型 AhR 発現群と比べて全長と伸長パターンの複雑度が減少していた。

考察

母体や胎児に顕著な影響が生じない微量な化学物質への曝露において、生後に発達神経毒性が観察されるとの実験的証拠が蓄積している。しかし器質的変化についての研究は少なく、この私の学位論文においては単一ニューロンの形態変化の観点から曝露影響を検討した。そして本研究結果より、低用量の BPA あるいは TCDD の周産期曝露をうけたマウスにおいて発達期の時点での樹状突起の長さ、伸長パターンの複雑度、分岐数への変化を明らかにした。発達過程の脳では神経回路を正常に構築するため、樹状突起が適切なタイミングで標的部位へ到達する必要がある。曝露による樹状突起の形態への影響は神経回路の構築異常を示唆し、その後の成長に伴う神経回路の機能的成熟の障害、高次脳機能の変化

を誘発する原因となる可能性が考えられる。周産期曝露による老齢期での影響を調べたところ、海馬 CA1 領域でのスパイン密度の低下を捉えることができた。今後はスパイン密度の変化が老齢期になって顕れ始める曝露影響なのか、またはもっと早い成長段階から生じ、それが持続して老齢期に観察されたのかを確認する必要がある。発達神経毒性の研究においては、曝露をうけた個体の老齢期での変化を調べた報告は極めて少ないが、毒性影響の包括的な理解のためには老齢期の時点での影響も明らかにすることが重要である。本研究結果は、老齢期における曝露影響の端緒を把握した点で重要な成果のひとつと言える。これまでに低用量の BPA や TCDD の周産期曝露による記憶・学習機能や恐怖情動への影響が報告されている。本研究で観察された海馬や扁桃体におけるニューロン形態の変化は、高次脳機能への曝露影響と矛盾しない結果であり、高次脳機能と密接な関連をもつニューロン形態から曝露影響を検討する意義が示されたと言える。今後は行動変化と形態変化との因果関係を明らかにしていく必要があるだろう。

TCDD 毒性の発現に必須の因子である AhR により誘導されるシグナルカスケードが、ニューロン形態に及ぼす影響との関係を調べるため、CA-AhR を発現させた海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起を解析したところ、突起の長さの短縮、ならびに伸長パターンの複雑度の低下が観察された。この結果は、AhR シグナルカスケードが樹状突起伸長に影響する可能性を示唆する。CA-AhR 発現細胞で観察された変化は、TCDD 曝露で起こる毒性影響の分子メカニズムを解明する上で有用な手がかりになると考えられる。発達神経毒性を分子メカニズム解明に切り込むアプローチとして、子宮内胎仔電気穿孔法の有用性の一端を示した点も本研究の重要な成果である。

今後は BPA や TCDD に限らず、発達神経毒性が疑われる多くの化学物質についてニューロンの形態解析を行い、発達神経毒性における評価指標としての有用性を確認していくことで、将来的にはニューロン形態が高い汎用性をもつ毒性影響の評価指標となる可能性がある。