

# 博士論文

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

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

社会医学専攻 健康環境医工学部門

指導教員 遠山 千春 教授

木村 栄輝

## 要旨

環境化学物質の周産期曝露による単一細胞レベルでのニューロン形態変化はほとんど調べられていない。本研究では、ビスフェノール A あるいはダイオキシンを曝露したマウスを用いて、蛍光タンパク質とゴルジ染色により可視化したニューロンの形態解析を行った。その結果、発達期にて樹状突起の長さや分岐数の変化を、老齢期ではスパイン密度の低下を捉えることができた。さらに、ダイオキシン受容体である AhR により誘導される下流のシグナルと樹状突起伸長との関連も明らかとなった。本研究成果より、化学物質の曝露による単一細胞レベルでの器質的变化を捉え、発達神経毒性のメカニズム解明の手がかりとなる知見を得ることができた。

## 目次

略語一覧.....	5
<b>第1章 序論</b> .....	<b>7</b>
1-1. 環境化学物質曝露による毒性影響.....	7
1-2. BPA 曝露による生殖・発生毒性と繁殖毒性.....	8
1-3. ダイオキシン類の曝露事例と毒性影響.....	10
1-4. BPA および TCDD の発達神経毒性.....	13
1-4-1. 性的二型核を示す脳領域における器質的変化.....	13
1-4-2. BPA および TCDD の記憶・学習や情動などの高次脳機能への影響....	15
1-5. 単一細胞レベルでのニューロン形態の観察方法.....	16
1-6. ニューロン形態と高次脳機能との関連.....	18
1-7. 本研究の目的.....	20
<b>第2章 方法</b> .....	<b>22</b>
2-1. 試薬.....	22
2-2. 環境化学物質の曝露量および曝露期間の選定理由.....	23
2-3. Thy1-GFP-M マウスの脳組織切片作成.....	25
2-3-1. BPA 曝露マウスの脳組織切片作成.....	25
2-3-2. TCDD 曝露マウスの脳組織切片作成.....	26

2-4. 脳の組織学的解析 .....	27
2-4-1. BPA 曝露マウスの脳組織切片作成.....	27
2-4-2. TCDD 曝露マウスの脳組織切片作成.....	28
2-4-3. 脳のゴルジ染色と切片作成.....	28
2-5. AhR あるいは CA-AhR 発現細胞の解析 .....	29
2-5-1. プラスミドベクター作成 .....	30
2-5-2. 子宮内胎仔脳電気穿孔法と脳組織切片の作成 .....	31
2-6. ニューロン形態の解析方法 .....	32
2-6-1. 樹状突起の長さ、伸長パターンの複雑度および分岐数の解析 .....	32
2-6-2. スパイン密度の解析.....	33
2-7. 定量 RT-PCR.....	34
2-8. ウェスタンブロット.....	35
2-9. 統計学的解析 .....	36
<b>第 3 章 結果</b> .....	<b>38</b>
3-1. 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔の解析 .....	38
3-1-1. 生後 21 日齢における樹状突起の形態解析.....	38
3-1-2. 生後 21 日齢における遺伝子の発現解析 .....	39
3-1-3. 生後 14 ヶ月齢における樹状突起形態とスパイン密度の解析 .....	40

3-2. 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスの解析.....	41
3-2-1. 生後 14 日齢における樹状突起の形態解析.....	41
3-2-2. 生後 14 日齢における遺伝子の発現解析 .....	42
3-2-3. 生後 21 日齢におけるタンパク質の発現解析 .....	42
3-2-4. 生後 16 ヶ月齢における樹状突起形態とスパイン密度の解析 .....	43
3-3. AhR あるいは CA-AhR 発現をさせた海馬 CA1 錐体細胞における樹状突起の 形態解析.....	44
<b>第 4 章 考察</b> .....	<b>46</b>
4-1. 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔におけるニューロン形態への影響 .....	47
4-2. TCDD 周産期曝露によるニューロン形態への影響 .....	51
4-3. 毒性影響の分子メカニズム解明に向けた子宮内胎仔脳電気穿孔法の利用 .....	54
4-4. ニューロン形態の発達神経毒性における評価指標としての展望.....	57
引用文献.....	61

## 略語一覽

AhR ; aryl hydrocarbon receptor

AMPA ;  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid

Arc ; activity regulated cytoskeletal-associated protein

AVPV; anteroventral periventricular nucleus

BDNF ; brain derived neurotrophic factor

bHLH ; basic helix-loop-helix

BPA ; bisphenol A

BST; bed nucleus of stria terminalis

CA1 ; cornu amonis 1

CA3 ; cornu amonis 3

CA-AhR ; constitutively active aryl hydrocarbon receptor

cDNA ; complementary DNA

CRH; corticotropin releasing hormone

Cyp ; cytochrome P450

DG; dentate gyrus

GFP ; green fluorescent protein

Fos ; FBJ osteosarcoma oncogene

LC; locus coeruleus

NGF ; nerve growth factor

NMDA ; N-methyl-D-aspartate

NOAEL ; no observed adverse effect level

NTP; National Toxicology Program

OECD ; organization for economic co-operation and development

PAS; Per-Arnt-Sim

PCBs ; polychlorinated biphenyls

PCDDs ; polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins

PCDFs ; polychlorinated dibenzo-*p*-furans

SDN-POA; sexually dimorphic nucleus of the preoptic area

TCDD ; 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin

TDI ; tolerable daily intake

TH; tyrosine hydroxylase

YFP ; yellow fluorescence protein



## 第1章 序論

### 1-1. 環境化学物質曝露による毒性影響

現代社会においては工業製品の製造や利用に伴い様々な化学物質が大気や水域などの環境中に放出されており、ヒトや野生動物が環境中に存在する化学物質にさらされる機会は増え続けている。環境化学物質の潜在的な影響から健康を守るためには、個々の化学物質について環境への排出を規制するとともに、健康リスク評価や有害性の特定などを実施する必要がある。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、動物実験における一般毒性、生殖・発生毒性、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仔期・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、その影響は成熟期や老齢期にまでおよぶ可能性がある。過去に母体や胎仔の全身症状を引き起こす過剰曝露があり、胎仔・小児に顕著な発達神経毒性が観察された事例として環境汚染による公害（水俣病）、カネミ油症や台湾油症などの報告がある(Kuratsune *et al.*, 1972; Harada, 1978; Hsu *et al.*, 1985)。他方、いわゆる内分泌かく乱化学物質への曝露により、全身性の顕著な症状がなくても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により示唆されている(Jacobson *et al.*, 1990; Patandin *et al.*, 1999)。実験的には一般毒

性、生殖・発生毒性、繁殖毒性が検出されない低用量の曝露であっても発達神経毒性が顕れる研究結果も報告されている(Faith and Moore, 1977; Gray and Ostby, 1995; vom Saal *et al.*, 1998; Gray *et al.*, 2000; Kakeyama and Tohyama, 2003; Yoshino *et al.*, 2004)。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 (bisphenol A; BPA)、ダイオキシン類、ジエチルスチルベストロール、フタル酸エステルなどが含まれる。本研究では下記に詳述するように、高次脳機能への発達神経毒性を示す BPA あるいはダイオキシンの周産期曝露が、単一細胞レベルでのニューロン形態におよぼす影響を調べた。

## 1-2. BPA 曝露による生殖・発生毒性と繁殖毒性

BPA はポリカーボネートやエポキシ樹脂の原料であり、これらを使用した歯科充填剤(Suzuki *et al.*, 2000)、缶詰のコーティング剤(Kang *et al.*, 2003)、哺乳瓶(Brede *et al.*, 2003)などに含まれている。製造工程や最終製品からの溶出により、ヒトの場合は日常的に曝露をうけている。レベルは低いものの出産後の羊水からも検出されていることから(Ikezuki *et al.*, 2002)、胎仔期でも曝露をうけていると考えられる。げっ歯類を用いた研究から、妊娠個体に曝露した BPA は母体内でグルクロン酸抱合され、胎盤通過後に胎仔体内でグルクロン酸が脱グルクロンサン化されて胎仔が BPA に曝露されることが分かっている(Nishikawa *et al.*,

2010)。

BPA はエストロゲン受容体と結合することから(Blair *et al.*, 2000)、これまでに実験動物を用いて生殖・発生毒性や繁殖毒性について研究されてきた。妊娠 6-15 日目の母マウスに 500、750、1000 あるいは 1250 mg/kg b.w./day の用量で BPA を経口投与すると、母マウスでは全ての BPA 曝露群にて肝臓相対重量の増加、1250 mg/kg b.w./day 曝露で体重増加の抑制および妊娠子宮重量の減少がみられる。胎仔マウスでは 1250 mg/kg b.w./day 曝露で吸収胚の増加および体重減少が起こる(Morrissey *et al.*, 1987)。BPA 混餌投与によるラット 3 世代繁殖毒性試験において、7500 ppm (500 mg/kg b.w./day 相当) の曝露量では全出生仔数および生存出生仔数の減少、卵巣重量の減少が認められている(Tyl *et al.*, 2002)。これらの曝露影響は 750 ppm (50 mg/kg b.w./day 相当) では観察されないことから、この繁殖毒性の試験結果より BPA の無毒性量 (No Observed Adverse Effect Level; NOAEL) は 50 mg/kg b.w./day とみなされ、この数値を出発点として不確実係数で除して TDI は 50 µg/kg b.w./day と設定されている。米国・国家毒性プログラム (National Toxicology Program; NTP) が 2000 年に組織した公開ピアレビューでは、NOEL と同等かこれ以下の用量を「低用量」と見なすことが妥当とし、曝露の経路や期間、曝露をうけた時期に関わりなく BPA における低用量の上限値を 5 mg/kg b.w./day としている(Melnick *et al.*, 2002)。

### 1-3. ダイオキシン類の曝露事例と毒性影響

ダイオキシン類に分類される化合物はポリ塩素化ジベンゾパラダイオキシン (polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins; PCDDs)、ポリ塩素化ジベンゾフラン (polychlorinated dibenzo-*p*-furans; PCDFs)、平面構造をもつコプラナーポリ塩素化ビフェニル (polychlorinated biphenyls; PCBs) が含まれ、最も高い毒性を有する同族体が 2,3,7,8-四塩素化ジベンゾ-*p*-ジオキシン (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; TCDD) である (Van den Berg *et al.*, 1998)。

PCDDs と PCDFs は廃棄物処理場の焼却過程にて非意図的産物として生じる化学物質であり、PCBs は難燃剤や誘電性流体として工業的に製造・使用されていた。

いずれも環境残留性が高いため微量ながらも常に環境中に存在し、脂溶性であるため高い生物蓄積性を示す (Van den Berg *et al.*, 1994)。ダイオキシン類は胎盤や母乳を介して母体から胎仔・乳児へ移行し (Masuda *et al.*, 1978; Hurst *et al.*, 1998; Hurst *et al.*, 2000)、血液脳関門を通過して脳へ到達するため (Kakeyama *et al.*, 2003)、周産期曝露による子 (仔) の脳への影響が懸念されている。日本におけるヒトのダイオキシン類の TDI は 4 pg/kg b.w./day だが、げっ歯類と比べてヒトでは体内における半減期が長いいため動物実験の投与量を直接当てはめることはできず、体内に存在する量 (体内負荷量) により毒性影響評価が行われる。な

おヒトにおける消失半減期は 7-10 年、マウス、ラット、ハムスターでは 12-24 日だと考えられている(Van den Berg *et al.*, 1994)。

ダイオキシン類のヒトへの曝露事例として、1968 年の日本および 1979 年の台湾で起きた油症事件(Kuratsune *et al.*, 1972; Hsu *et al.*, 1985)、1976 年のイタリアのセベソにおける農薬工場の爆発事故(Homberger *et al.*, 1979)などがあり、経胎盤・経母乳曝露をうけた子どもにおいて神経系、免疫系、生殖系への影響が報告されている(Weisglas-Kuperus, 1998)。日本と台湾の油症事件はある種のダイオキシン類が混入した食用油を摂取した人々に生じた食中毒であり、曝露をうけた妊婦から産まれた出産児では体重減少や色素沈着がみられ、子どもの認知機能の低下も報告されている(Yamashita and Hayashi, 1985; Rogan *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1992)。げっ歯類を用いた実験から、TCDD を曝露した母動物の胎盤・母乳を介して周産期曝露をうけた仔動物では、奇形や生殖器系への影響が報告されている。曝露により認められる奇形は口蓋裂および水腎症が顕著であり(Courtney and Moore, 1971; Couture-Haws *et al.*, 1991)、生殖器系への影響は精巣中の精子細胞の減少、精巣上体尾部精子数減少、肛門生殖突起間距離の短縮などが認められている(Gray *et al.*, 1997)。

TCDD は芳香族炭化水素受容体 (aryl hydrocarbon receptor; AhR) のリガンドとして知られている。AhR は分子量が約 100 kDa のタンパク質であり、N 末端側

に bHLH (basic helix-loop-helix) および PAS (Per-Arnt-Sim) ドメインをもち、受容体型転写調節因子としての構造をもつ。PAS ドメインは約 50 アミノ酸からなる PAS A、PAS B と名付けられている繰り返し配列をもち、TCDD などのリガンドは PAS B ドメインを含む領域と結合する。TCDD と結合して活性化した AhR は細胞質から核へ移行し、別の転写調節因子とヘテロダイマーを形成してダイオキシン応答配列と名付けられている転写調節配列に結合する。この結合により *Cyp1a1*、*Cyp1b1*、*AhR repressor* などの標的遺伝子の発現が誘導される (Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003)。なお、AhR は 277-418 番目のアミノ酸を削ることでリガンド非依存的に転写調節因子として機能できる構造活性型 AhR (constitutively active-AhR; CA-AhR) となり、TCDD 非依存的に核へ移行して標的遺伝子の発現を誘導することが実験的に確かめられている (McGuire *et al.*, 2001)。また、AhR ノックアウトマウスを用いた実験により、TCDD 曝露による毒性影響には AhR を介したメカニズムが必須であることが明らかにされている。すなわち、妊娠 12.5 日目の C57BL/6 系統マウスに TCDD 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w. を経口投与すると、ほぼ 100% の胎仔に口蓋裂と水腎症が生じるが、AhR ノックアウトの胎仔ではこれらの変化がみられなくなる (Mimura *et al.*, 1997)。この結果は TCDD と結合して活性化した AhR により誘導される下流のシグナルカスケードが、TCDD の毒性影響に極めて重要であることを強く示唆している。

#### 1-4. BPA および TCDD の発達神経毒性

##### 1-4-1. 性的二型核を示す脳領域における器質的変化

BPA あるいは TCDD の周産期曝露による器質的変化として、雌雄差が存在する神経核、すなわち青斑核 (locus coeruleus; LC)、分界条床核 (bed nucleus of stria terminalis; BST)、前腹側脳室周囲核 (anteroventral periventricular nucleus; AVPV)、視索前野性的二型核 (sexually dimorphic nucleus of the preoptic area; SDN-POA) における体積や構成細胞数の変化が報告されている (Kubo *et al.*, 2003; Funabashi *et al.*, 2004; Ikeda *et al.*, 2005; Rubin *et al.*, 2006)。

Kubo らの実験 (Kubo *et al.*, 2003) では、妊娠期・授乳期の母ラットに対して BPA を 0.1 あるいは 1 mg/L の濃度で含む水を飲ませて飼育した結果、産仔ラットが 14 週齢の時点の脳では LC の体積と細胞数に変化が認められた。他方、対照群の仔ラットでは雌の LC のほうが雄の LC と比べて体積が大きく、構成細胞の数も多かった。BPA 曝露をうけた仔ラットでは雄の LC のほうが雌の LC と比べて体積が大きくなり、構成細胞の数も多くなる雌雄差の逆転が起こることが見出された。また、Funabashi ら (Funabashi *et al.*, 2004) によると、妊娠期・授乳期の母ラットに対する BPA 2.5 mg/kg b.w./day 相当の飲水投与により、4-7 ヶ月齢の産仔ラットにおいて BST の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin

releasing hormone; CRH) 陽性細胞の数への影響が見出されている。すなわち、対照群では雌の CRH 陽性細胞数のほうが雄と比べて多いが、BPA 曝露を受けた仔ラットでは雌雄による細胞数の差が認められない。さらに、Rubin ら(Rubin *et al.*, 2006)は、妊娠期・授乳期の母マウスに対する BPA 25 あるいは 250 ng/kg b.w./day 相当の投与により、生後 22-24 日目の産仔マウスでは AVPV の体積およびチロシンヒドロキシラーゼ (tyrosine hydroxylase; TH) 陽性細胞数の変化が起こることを見出した。すなわち、対照群の仔マウスでは雌の AVPV のほうが雄と比べて体積が大きく、TH 陽性細胞の数も多い。しかし BPA 25 および 250 ng/kg b.w./day 相当曝露を受けた仔マウスでは体積の性差が無くなり、BPA 250 ng/kg b.w./day 相当の曝露では TH 陽性細胞数の性差も観察されなくなった。

TCDD においても、妊娠 15 日目の母ラットに対して TCDD 200 ng/kg を曝露することで、生後 98 日目の産仔ラットで SDN-POA における体積が変化することが報告されている(Ikeda *et al.*, 2005)。すなわち、対照群の仔ラットでは雄の SDN-POA の体積は雌と比べて大きいですが、TCDD を曝露した仔ラットでは SDN-POA における体積の雌雄差が無くなる。

以上のように、BPA あるいは TCDD の周産期曝露による器質的変化が性的二型核において観察されている。



#### 1-4-2. BPA および TCDD の記憶・学習や情動などの高次脳機能への影響

記憶・学習は海馬が基本的な役割を担っている(Morris *et al.*, 1982)。海馬は解剖学的に明瞭な構造をもつために組織学的に詳細に調べられている脳領域であり、記憶・学習に関わるニューロンが同定され(Tsien *et al.*, 1996; Chen and Tonegawa, 1997)、これらのニューロンを対象に神経突起の長さや分岐数を計測指標とした単一細胞レベルでの形態解析が行われている(Bannister and Larkman, 1995; Pyapali *et al.*, 1998)。情動には扁桃体が重要な役割を担うことが知られている(Phillips and LeDoux, 1992)。扁桃体は基底外側核、内側核、中心核などの複数の神経核から構成されており、それぞれ機能および構造的に特徴をもつニューロンから構成されている(McDonald, 1982; Sah *et al.*, 2003)。

BPA を曝露したげっ歯類の実験から、BPA 5 mg/kg b.w./day より低い用量でも母動物への曝露が仔動物の記憶・学習機能に影響することが報告されている。妊娠期・授乳期の母ラットに対して BPA 40 µg/kg b.w./day を投与すると、生後 46 日目の産仔ラットにて空間記憶を調べる Y 迷路の成績低下が認められ、BPA 曝露による記憶・学習機能への影響を示唆する報告がある(Poimenova *et al.*, 2010)。マウスを用いた Y 迷路試験においても、仔マウスが胎生 7-21 日目および生後 22-36 日目の時期に母マウスに対して BPA 100 あるいは 500 µg/kg b.w./day を投与したところ、生後 5 週目の産仔マウスで Y 迷路の成績低下が観

察されている(Tian *et al.*, 2010)。妊娠 7–20 日目の母マウスに BPA 0.4 あるいは 4 mg/kg b.w./day を投与したところ、生後 56 日目の産仔マウスでは空間記憶を調べるモリス水迷路の成績低下が認められる(Xu *et al.*, 2012)。

TCDD の経胎盤・経母乳曝露モデルとして、妊娠 10–16 日目の母ラットに TCDD 0.1 µg/kg b.w./day を投与すると、生後 100 日目の産仔ラットでは空間記憶を調べる放射状迷路の成績が低下することが報告されている(Widholm *et al.*, 2003)。妊娠 12.5 日目の母マウスに TCDD 0.6 µg/kg b.w.を単回経口投与した場合、生後 180 日目の産仔マウスでは社会性行動の活動レベルが低下すること(Endo *et al.*, 2012)、また、妊娠 12.5 日目の母マウスに TCDD 3.0 µg/kg b.w.を単回経口投与した場合には、生後 25–28 週目の産仔マウスでは恐怖条件付け学習の成績が低下すること(Haijima *et al.*, 2010)が報告されている。

BPA あるいは TCDD の周産期曝露条件における上述の行動試験の結果は、母体を介した BPA あるいは TCDD が産仔の記憶・学習や情動などの高次脳機能に影響することを示唆している。

#### 1-5. 単一細胞レベルでのニューロン形態の観察方法

BPA あるいは TCDD の周産期曝露による単一細胞レベルでのニューロン形態の変化を検討するためには、脳組織に密集する全ニューロンのうち、個々の樹

状突起を見分けることができる数のニューロンのみを可視化する必要がある。

ゴルジ染色は脳組織中の少数のニューロンを染める古典的な手法であり、19世紀末に **Camillo Golgi** により開発された。ニューロンの隅々まで染色されるためスパインを含めた樹状突起の末端構造まで観察できる。ゴルジ染色は実験動物のマウスやラットに加え、ヒトやサルにも適用可能であり、幅広い動物種のニューロンの形態解析に用いられてきた。樹状突起の形状に基づいたニューロンの分類(Chen *et al.*, 2009)、飼育環境が樹状突起の伸長やスパイン密度に与える影響(Volkmar and Greenough, 1972; Turner and Greenough, 1985)、遺伝子改変動物における樹状突起の長さや分岐の解析(Aizawa *et al.*, 2004)などが行われており、現在でもゴルジ染色はニューロンの形態解析に有用な手法である。

近年では **GFP** や **YFP** などの蛍光タンパク質をニューロンに発現させて可視化・解析する手法も用いられている。トランスジェニックマウスや遺伝子の導入手法の開発により、蛍光タンパク質を発現したニューロンの形態を *in vivo* にて解析できるようになった。G. Feng 博士ら(Feng *et al.*, 2000)により、Thy1 遺伝子プロモーターの制御下に蛍光タンパク質の遺伝子をつないだ配列をもつトランスジェニックマウス（以下、Thy1 マウス）が開発された。Thy1 マウスの脳では一部のニューロンのみ蛍光タンパク質を発現するため、樹状突起やスパインなどの形態解析が可能となる。蛍光タンパク質を発現するニューロン種や数が

異なる複数の系統が作成されており、本研究では M 系統と名付けられた Thy1 マウス（以下、Thy1-GFP-M マウス）を選択して曝露実験に用いた。子宮内胎仔脳電気穿孔法は胎仔マウスの脳に遺伝子発現ベクターを導入する手法で、蛍光タンパク質発現ベクターを導入することでニューロン形態が観察できる(Tabata and Nakajima, 2001)。蛍光タンパク質の遺伝子と同時に機能を調べたい遺伝子の発現ベクターを導入することで、その遺伝子がニューロン形態におよぼす影響を調べることができ、神経突起の伸長を制御するシグナルカスケードの検討に有用な手法である。

#### 1-6. ニューロン形態と高次脳機能との関連

高次脳機能にニューロン形態が密接に関連することが、ヒト死後脳および実験動物の解析から示唆されている。

ゴルジ染色した精神疾患患者の死後脳でニューロンの形態解析を行った結果、自閉症スペクトラム、統合失調症やレット症候群の患者では、海馬や大脳新皮質のニューロンにおいて樹状突起の長さが短くなり、伸長パターンの複雑度が低下するなどの変化が認められている(Armstrong *et al.*, 1995; Raymond *et al.*, 1996; Broadbelt *et al.*, 2002)。加齢に伴う樹状突起の伸長パターンの複雑度の低下も報告されている(Nakamura *et al.*, 1985)。加えて、樹状突起から突き出たスパイ

ンについても高次脳機能との関連が示唆されている。電子顕微鏡の観察から、スパインでは興奮性シナプスにおけるシナプス後部に特徴的な構造が認められ、免疫電子顕微鏡解析よりスパインではNMDA受容体やAMPA受容体の局在が確認されている(Kharazia and Weinberg, 1997)。すなわち、スパイン数の変化はシナプス数の変化を概ね反映していると考えられている。自閉症スペクトラムや統合失調症の患者の脳ではスパイン密度の変化が観察されており(Garey *et al.*, 1998; Hutsler and Zhang, 2010)、正常なシナプスの形成の障害が、精神疾患の原因となっている可能性がある。

実験動物を用いた研究より、発達障害である脆弱性 X 症候群の原因遺伝子 *Fmr1* を欠損したマウスでは、樹状突起やスパインの形態変化が認められる(Nimchinsky *et al.*, 2001; Qin *et al.*, 2011)。ラット海馬では加齢により樹状突起の伸長パターンの複雑度が低下する(Nakamura *et al.*, 1985; Markham *et al.*, 2005)。ストレス負荷を加えたげっ歯類では記憶・学習機能の低下が起こり、さらにストレス負荷が海馬のニューロンにおいて樹状突起の長さや分岐数を減少させて細胞の退縮を引き起こすことも知られている(Radley *et al.*, 2006; Bloss *et al.*, 2010; Conrad, 2010)。

以上のように、樹状突起やスパインを指標とした解析はヒトにおいて精神疾患の病態理解や加齢に伴う脳組織の変化に関する重要な知見をもたらし、単一

細胞レベルでのニューロン形態と高次脳機能との密接な関連を強く示唆している。さらに実験動物の研究からも、このことを支持する結果が得られている。

#### 1-7. 本研究の目的

BPA あるいは TCDD の曝露による高次脳機能への影響から、海馬や扁桃体における器質的変化が強く示唆される。しかしながら、器質的変化が報告されている LC や SDN-POA などの性的二型核への化学物質の曝露影響は、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、BPA あるいは TCDD を周産期曝露したマウスの脳を用いて、単一ニューロンに焦点を当ててその形態変化を検討した。曝露時期と行動変化が観察される時期との間に時間的隔たりを埋めるため、Thy1-GFP-M マウスを用いて発達期の脳における海馬や扁桃体のニューロン形態を解析した。加えて、樹状突起の形態への曝露影響を反映した遺伝子やタンパク質の発現変化を検討した。発達神経毒性の影響は、周産期に曝露した化学物質が体内に残留していないとみなせる老齢期においても生じている可能性がある。しかし老齢期での曝露影響に関する知見は極めて少ないため、本研究ではゴルジ染色した野生型マウスの脳を用いて老齢期における樹状突起解析とスパイン密度を解析した。ニューロンの形態解析は成

長段階を問わず適用できるため、発達期と老齢期は本アプローチの利点を活かした時期を選んだといえる。最後に毒性影響の分子メカニズム解明の端緒を把握する目的で、TCDD 毒性に不可欠である AhR が制御しているシグナルカスケードと樹状突起の伸長との関連について検討を行った。

## 第2章 方法

### 2-1. 試薬

今回の研究において用いた試薬及び購入先を以下に記す。

Bisphenol A (Sigma Aldrich)

Blocking One (ナカライテスク)

Chemi-Lumi One (ナカライテスク)

Corn Oil (和光)

FD Rapid GolgiStain Kit (FD NeuroTechnologies)

Hemo-De (ファルマ)

2-mercaptethanol (2ME) (ナカライテスク)

n-Nonane (ナカライテスク)

Paraformaldehyde, powder (ナカライテスク)

Permout (Fisher Scientific)

RNeasy Mini Kit(QIAGEN)

PrimeScript RT reagent Kit (TaKaRa)

Sucrose (和光)

2,3,7,8-TCDD (Cambridge Isotope Laboratory)

Tissue-Tek OCT compound (サクラファインテックジャパン)



THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)

VECTASHIELD Mounting Medium (Vecter Laboratories)

一次抗体

PSD-95 (Thermo Scientific)

Synaptophysin (Abcam)

GAPDH (Millipore)

二次抗体

ImmunoPure Goat Anti-Rabbit IgG, F(ab')<sub>2</sub>, Peroxidase Conjugated

(PIERCE Biotechnology, Inc.)

ImmunoPure Goat Anti-Mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub>, Peroxidase Conjugated

(PIERCE Biotechnology, Inc.)

## 2-2. 環境化学物質の曝露量および曝露期間の選定理由

本研究では単一細胞レベルでのニューロン形態への曝露影響を検討するため、母マウスや仔マウスに対して一般毒性、生殖・発生毒性、繁殖毒性など顕著な曝露影響をもたらさず、毒性学的に低用量と見なされている用量を選択した。すなわち、BPAの曝露量については低用量の上限である5 mg/kg b.w./day以下である40および400 µg/kg b.w./dayを、TCDDについては周産期曝露した際に高次

脳機能への影響を報告されている 0.6 および 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg b.w.}$  を選定した。

曝露期間は、母体内での胚から脳が発生する過程を考慮して選択した。胎生 8.5 日目のマウスでは神経管が閉塞し、神経管の吻側では脳胞が生じる(Paudyal *et al.*, 2010)。以後、発生が進むにつれて脳胞は前脳胞、中脳胞、菱脳胞の 3 脳胞を形成し、二次脳胞形成期では前脳胞から終脳胞と間脳胞が生じる。胎生 12.5 日目以降のマウスでは終脳の発生が進み、終脳からは大脳皮質や海馬などが生じる。マウス胎仔では胎生 13.5 日目頃から層構造の深層部を構成する細胞が産生されて移動を開始し、順次上層部を構成する細胞が産生され移動し、最終的に 6 層からなる大脳皮質が形成される(Nadarajah *et al.*, 2001)。マウスの脳の発生段階とヒトの脳の発生段階との対応関係は、3 脳胞の形成や神経管の閉塞に着目すれば、マウスの胎生 8.5 日目はヒトでは受精 4 週目に相当する(Muller and O'Rahilly, 1989)。また終脳領域の明瞭化および大脳皮質の層構造の形成時期などに着目すれば、マウスの胎生 12.5 日目はヒトでは受精 6 週目に相当すると考えられる(O'Rahilly, 1979)。

マウスとヒトの脳の発生・発達の時期を考慮し、BPA 曝露については、妊娠 8.5 から 17.5 あるいは 18.5 日目の母体に BPA を投与することで仔への曝露を行った。TCDD 曝露については、特に終脳の発生への曝露影響に着目するため妊娠 12.5 日目の母マウスに TCDD を投与することで仔への曝露を行った。なお、

詳細は後述するが、TCDD は体内で高い残留性をもつため、単回投与であっても経胎盤・経母乳曝露となる。

### 2-3. Thy1-GFP-M マウスの脳組織切片作成

BPA あるいは TCDD の曝露を受けたマウスの発達期の時点におけるニューロンの形態解析を行うため、Thy1 トランスジェニックマウスの M 系統（以下、Thy1-GFP-M マウス）の脳組織切片を作成した。

#### 2-3-1. BPA 曝露マウスの脳組織切片作成

C57BL/6 系統である Thy1-GFP-M マウスを、作成者である G. Feng 博士（マサチューセッツ工科大学）より譲渡して頂いた。Thy1-GFP 遺伝子をホモとして持つ雄の Thy1-GFP-M マウス (Tg/Tg) と日本クレアから購入した野生型の雌の C57BL/6J 系統マウス (-/-) を交配し、仔マウス (Tg/-) がすべて Thy1-GFP-M マウスとなるようにした。なお、マウスは自由飲水・飲食、明暗周期 12 時間、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  の環境下で飼育した。BPA をコーン油に溶かして作成した BPA 溶液を、妊娠 8.5–17.5 日目のマウスに毎日単回経口投与した。経口投与の直前に妊娠マウスの体重を測定し、BPA が 40 もしくは  $400 \mu\text{g/kg b.w./day}$  の用量となるように曝露した。なお陰性対照群にはコーン油を同様に投与した。出生後の Thy1-GFP-M 仔マウス (Tg/-) は生後 1 日目に母マウス 1 腹あ

たり 8 匹以下になるように間引きした。生後 21 日目に各曝露群の母マウス 5 匹から腹ごとに雄の仔マウスを無作為に 1 匹ずつ選び、各曝露群 5 匹ずつ脳を採取した。ペントバルビタールナトリウム (64.8 mg/kg b.w.) の腹腔内注射により仔マウスを麻酔させ、4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定後に速やかに脳を摘出した。摘出した脳は 4%パラホルムアルデヒド溶液に浸して遮光・4℃条件下で一晩浸漬固定し、その後 5%, 15%, 30% スクロース溶液に順次置換した。スクロース置換を終えた脳は Tissue-Tek OCT Compound に浸して液体窒素により瞬間凍結して包埋し、-80℃で凍結保存した。Thy1-GFP-M マウスの凍結した脳組織はリトラトーム (REM-710) とエレクトロフリーズ (MC-802A) (共に大和光機工業) を用いて厚さ 300 μm の組織切片を作成し、スライドグラスにのせて VECTASHIELD 封入剤を用いて封入した。

#### 2-3-2. TCDD 曝露マウスの脳組織切片作成

2-3-1.と同様に雄の Thy1-GFP-M マウス (Tg/Tg) と野生型の雌マウス (-/-) を交配した。TCDD を 0.6 % n-ノナンを含むコーン油に溶かして作成した TCDD 溶液を、妊娠 12.5 日目のマウスに単回経口投与した。経口投与の直前に妊娠マウスの体重を測定し、TCDD が 0.6 もしくは 3.0 μg/kg b.w.の用量となるように曝露した。なお陰性対照群には 0.6 % n-ノナンを含むコーン油を同様に投与した。出

生後の仔マウスは生後 1 日目に母マウス 1 腹あたり 8 匹以下になるように間引きした。生後 14 日目に各曝露群の母マウス 5 匹から腹ごとに雄の仔マウスを無作為に 1 匹ずつ選び、各曝露群 5 匹から脳を採取した。脳の採取は 2-3-1.と同様に行い、包埋後の脳組織は-80℃で凍結保存した。Thy1-GFP-M マウスの凍結した脳組織はクリオスタット (Leica CM3050 S, Leica Microsystems) を用いて厚さ 150  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、スライドグラスにのせて VECHTASHIELD 封入剤を用いて封入した。

## 2-4. 脳の組織学的解析

### 2-4-1. BPA 曝露マウスの脳組織切片作成

日本クレアより妊娠 7.5 日目の C57BL/6J 系統マウスを購入し、自由飲水・飲食、明暗周期 12 時間、室温  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  の環境下で飼育した。BPA をコーン油に溶かして作成した BPA 溶液を、妊娠 8.5-18.5 日目のマウスに毎日単回経口投与した。経口投与の直前に妊娠マウスの体重を測定し、BPA が 40 もしくは  $400 \mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$  の用量となるように曝露した。なお陰性対照群にはコーン油を同様に投与した。出生後の仔マウスは生後 1 日目に母マウス 1 腹あたり 8 匹以下になるように間引きし、仔マウスを生後 21 日目に離乳した。個々の母親による影響を最小限にするため、腹単位で検討した。すなわち、BPA  $40 \mu\text{g}/\text{kg}$

b.w./day 曝露群、BPA 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w./day 曝露群、対照群ごとに各腹から雄仔マウスを 1 匹ずつ無作為に選び 4–5 匹で集団飼育した。

#### 2-4-2. TCDD 曝露マウスの脳組織切片作成

日本クレアより妊娠 11.5 日目の雌の C57BL/6J 系統マウスを購入し、2-2-1.と同環境下で飼育した。TCDD を 0.6 % n-ノナンを含むコーン油に溶かして作成した TCDD 溶液を、妊娠 12.5 日目のマウスに単回経口投与した。経口投与の直前に妊娠マウスの体重を測定し、TCDD が 0.6 もしくは 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.の用量となるように曝露した。なお陰性対照群には 0.6 % n-ノナンを含むコーン油を同様に投与した。出生後の仔マウスは生後 1 日目に母マウス 1 腹あたり 8 匹以下になるように間引きし、仔マウスを生後 21 日目に離乳した。TCDD 0.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.曝露群、TCDD 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.曝露群、対照群ごとに各腹から雄仔マウスを 1 匹ずつ無作為に選び 4–5 匹で集団飼育した。

#### 2-4-3. 脳のゴルジ染色と切片作成

生後 14 ヶ月齢の BPA 曝露マウスおよび生後 16 ヶ月齢の TCDD 曝露マウスから脳を採取してゴルジ染色を行った。ゴルジ染色は FD Rapid Golgi Stain Kit を用い、添付のプロトコールに従い以下の手順で実施した。マウスを頸椎脱臼して

速やかに脳を摘出し、FD Rapid Golgi Stain Kit の Solution A と Solution B の等量混合溶液に脳を浸して遮光・室温条件下で3日間静置した。次に Solution C 溶液に脳を移し、遮光・4℃条件下で2日間静置した。その後、粉末ドライアイスを用いて脳を凍結し、-80℃で保存した。クリオスタット (Leica CM3050 S, Leica Microsystems) を用いて厚さ 150 μm の脳切片を作成し、スライドガラス上に並べた切片は遮光・室温条件下で一晩静置して乾燥させた。乾燥した切片を超純水で洗浄 (2分×2回) して、Solution D, Solution E および超純水を 1:1:2 の体積比で混合した溶液に10分間浸して発色を行った。超純水で洗浄 (4分×2回、5分×2回) し、50, 75, 95, 100%エタノールに順次浸して脱水処理を行った (50, 75, 95%は4分×1回、100%は4分×3回)。脱水後に Hemo-De 溶液に浸し (4分×3回)、Permount 封入剤を用いて封入した。

#### 2-5. AhR あるいは CA-AhR 発現細胞の解析

TCDDにより活性化した AhR が誘導する下流のシグナルカスケードとニューロン形態との関連性を調べるため、子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて胎仔期・発達期にて AhR あるいは構造活性型 AhR (constitutively active AhR, CA-AhR) を発現させたニューロンをもつ脳の組織切片を作成した。

### 2-5-1. プラスミドベクター作成

*AhR* 遺伝子のクローニングのため、C57BL/6J 系統マウスの成熟期雄マウスの肝臓から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。PrimeScript RT reagent Kit を用いて total RNA を逆転写して cDNA ライブラリーを作成した。Nested PCR により cDNA ライブラリーから *Ahr* 遺伝子のアミノ酸コード領域の塩基配列を得た。まず、5'-cctccgggacgcaggtg-3' と 5'-agcatctcaggtacgggttt-3' をプライマーに用いて cDNA ライブラリーに対して PCR を行った。次に、この PCR 産物に対して 5'-ctcgaggcgggcaccatgagcagcggcgcca-3' と 5'-ctcgagtcaactctgcaccttgct-3' をプライマーに用いて PCR を行うことで目的の配列を得た。CA-AhR の塩基配列を得るため、pQCXIN-CA-AhR-GFP ベクターを鋳型として 5'-ctcgaggcgggcaccatgagcagcggcgcca-3' と 5'-ctcgagtcaactctgcaccttgct-3' をプライマーに用いて PCR を行って CA-AhR のアミノ酸コード領域の塩基配列を得た。AhR と CA-AhR をコードする塩基配列を pCRII-TOPO ベクターと結合させた。XhoI 制限酵素により pCRII-TOPO-AhR、pCRII-TOPO-CA-AhR から AhR、CA-AhR の断片を得た。XhoI 処理した pCAGGS1 ベクターと AhR あるいは CA-AhR 断片を結合させて pCAG-AhR および pCAG-CA-AhR ベクターを作成した。なお、プライマーDNA は北海道システム・サイエンスに合成を受託した。pQCXIN-CA-AhR-GFP は藤井義明名誉教授（東北大学）、伊藤智彦博士（独立



行政法人国立環境研究所環境健康研究領域生体影響評価研究室) に分与して頂いた。また、pCAGGS1 は仲嶋一範教授、久保健一郎博士 (慶應義塾大学医学部解剖学教室) に分与して頂いた。

## 2-5-2. 子宮内胎仔脳電気穿孔法と脳組織切片の作成

海馬 CA1 錐体細胞に AhR、CA-AhR を発現させるため、pCAG-AhR あるいは pCAG-CA-AhR と、蛍光タンパク質の tdTomato を発現する pCAG-tdTomato を含むプラスミド溶液を、胎生 15.0 日目のマウスの側脳室に注入して子宮内胎仔脳電気穿孔法を行った。対照群では pCAG-tdTomato のみ含むプラスミド溶液を用いた。プラスミド溶液は TE に溶かして 1 mg/ml の濃度に調製し、1-2  $\mu$ l の液量を脳室に注入した。pCAG-tdTomato は仲嶋一範教授、久保健一郎博士 (慶應義塾大学医学部解剖学教室) に分与して頂いた。なお、子宮内胎仔脳電気穿孔法の実験操作は久保健一郎博士 (慶應義塾大学医学部解剖学教室) に行って頂いた。

子宮内胎仔脳電気穿孔法によりベクターを導入した雄の仔マウスの脳を生後 14 日目にサンプリングした。ペントバルビタールナトリウムにより仔マウスを麻酔し、4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定した後に脳を摘出した。遮光・4°C条件下で脳組織を 4%パラホルムアルデヒド溶液に浸して固定し、5%, 15%,

30%スクロース溶液に順次置換した。その後、脳組織を Tissue-Tek OCT Compound にて包埋し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。凍結した脳組織はクリオスタットを用いて厚さ  $150\ \mu\text{m}$  の凍結切片を作成し、スライドグラスにのせて VECHTASHIELD 封入剤を用いて封入して樹状突起の形態解析を行った。

## 2-6. ニューロン形態の解析方法

2-3, 2-4, 2-5 で作成した脳の組織切片を用いてニューロンの形態解析を行った。解析指標とする形態にはニューロン同士の情報伝達に重要な樹状突起とスパインを選んだ。Neurolucida ソフトウェアを用いて樹状突起をトレースすることで長さ、伸長パターン、分岐数を計測した。また、スパイン密度を算出するため樹状突起の長さとし、スパイン数を計測した。

### 2-6-1. 樹状突起の長さ、伸長パターンの複雑度および分岐数の解析

Thy1-GFP-M マウスの脳、ゴルジ染色処理した脳、子宮内胎仔脳電気穿孔法処理マウスの脳から作成した組織切片をデジタルカメラ付きの顕微鏡 (Leica DM6000 B, Leica Microsystems) を用いて鏡検した。脳組織切片の画像から、海馬 CA1 錐体細胞 (Figure 1C, F)、歯状回顆粒細胞 (Figure 1G) あるいは扁桃体基底外側核ニューロン (以下、扁桃体ニューロン) (Figure 1D, H) の樹状突起を Neurolucida ソフトウェア (MBF Bioscience Japan) を用いて手動でトレースし 3

次元構造を再構築した。NeuroLucida NeuroExplorer ソフトウェア (MBF Bioscience Japan) を用いてトレースしたデータから樹状突起の全長、伸長パターンの複雑度、分枝の数を算出した。なお伸長パターンの複雑度は Sholl 解析により算出した。この解析は細胞体の中心から Sholl 円とよばれる半径が 10  $\mu\text{m}$  間隔で大きくなる同心円を描き、各 Sholl 円と樹状突起との交点数を計測することで樹状突起の伸長パターンの複雑度を定量化する手法である。本研究では細胞体の中心からの半径 200  $\mu\text{m}$  を解析の範囲とした。ゴルジ染色脳では 1 個体あたり 3-5 個のニューロン、Thy1-GFP-M マウス脳では 1 個体あたり 3-10 個のニューロン、子宮内胎仔脳電気穿孔法処理マウス脳では 1 個体あたり 8-15 個のニューロンを解析した。各個体の複数のニューロンを対象に、その樹状突起の長さ・分岐数、および伸長パターンの複雑度を解析し、それぞれの平均値を算出してマウス 1 個体分の値とし、マウスごとの値を用いて統計学的な群間比較を行った。トレースの際には恣意的な判断がはまらないようブラインド条件下で行った。

#### 2-6-2. スパイン密度の解析

ゴルジ染色処理した脳切片をデジタルカメラ付き顕微鏡で鏡検し、海馬 CA1、歯状回、扁桃体基底外側核の 3 領域の 2 次元の組織画像をパソコン上で取得した。Image J ソフトウェア (NIH) を用いて樹状突起の長さとし、スパイン数を計測

することでスパイン密度を算出した。個体ごとにスパイン密度の平均値を算出してマウス 1 個体分の値とし、マウスごとの値を用いて統計学的な曝露群と対照群との比較を行った。解析の際には、恣意的な判断がはまらないようブラインド条件下で行った。

## 2-7. 定量 RT-PCR

BPA あるいは TCDD 曝露マウスの海馬のニューロン形態の変化を遺伝子発現レベルで検討するため、樹状突起やスパインの機能に関わる遺伝子発現レベルを定量 RT-PCR により測定した。

BPA 曝露した生後 21 日目の仔マウス、あるいは TCDD 曝露した生後 14 日目の仔マウスから脳を速やかに摘出して海馬を採集し、液体窒素により瞬間凍結して -80°C で保存した。この海馬を RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 300 ng に対して PrimeScript RT reagent Kit を用いて 20  $\mu$ l の反応系で逆転写を行った。定量 RT-PCR 解析は上記逆転写溶液 2  $\mu$ l に対し 10  $\mu$ l の THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix 及びプライマーを 0.2 M となるように加え、20  $\mu$ l の反応系において LightCycler rapid thermal cycler system (Roche Molecular Systems)により以下の条件にて PCR 反応を行った。

熱変性 : 95°C 30 秒

↓

熱変性 : 95°C 20 秒  
アニーリング : 60°C 5 秒

} ×45 サイクル

蛍光の検出は 60°C の伸長反応の各サイクルの最終段階で行った。解析対象の遺伝子には樹状突起に局在する *Map2*、興奮性シナプスの足場タンパク質 *PSD-95* をコードする *Dlg4*、NMDA 受容体サブユニットの *Grin1*、*Grin2a*、*Grin2b*、シナプス小胞構成タンパク質 *Synaptophysin* をコードする遺伝子を選んだ。定量は  $\Delta$ Ct 法で行い、補正にはハウスキーピング遺伝子である *Cyclophilin A* を用いた。

定量 RT-PCR に使用したプライマーセットは Table 1 に示した。

## 2-8. ウェスタンブロット

ニューロン形態の変化をタンパク質の発現レベルで検証するため、シナプスの機能に関わるタンパク質発現レベルをウェスタンブロットにより測定した。

TCDD 曝露した生後 21 日目の仔マウスから脳を速やかに摘出して海馬を採集し、液体窒素により瞬間凍結して -80°C で保存した。この海馬を 0.32 M Sucrose/1

mM HEPES pH 7.4 溶液中でホモジナイズした。このホモジナイズ溶液を 1,000 g で 10 分間遠心して上清を得て、さらにこの上清を 17,000 g で 50 分間遠心して沈殿を得た。この沈殿を 0.32 M Sucrose/1mM HEPES pH 7.4 溶液で再懸濁して粗シナプトソーム分画とした(Gray and Whittaker, 1962)。この分画溶液から 10  $\mu$ g のタンパク質をウエスタンブロットに用いた。タンパク質に SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 10% Glycerol, 2% SDS, 0.5% 2ME, pH6.8) を加え、96°Cにて 5 分間加熱処理し変性させた。タンパク質は 10% SDS-polyacrylamide ゲルにて定電流 (40 mA) のもと 50 分電気泳動し、タンパク質を分離させた。電気泳動後の SDS-polyacrylamide ゲルは 25 mM Tris、192 mM Glycine、20% Methanol 溶液を含む転写液の中で Immobilon-P Transfer membrane に対し定電圧 (100 V) で 1 時間転写した。転写後、メンブレンは Blocking One により室温で 1 時間処理しブロッキングを行った。一次抗体は 0.1% (v/v) BSA を含む PBST 溶液で 1,000 倍に希釈し、上記メンブレンと 4°Cで一晩抗体反応を行った。標的タンパク質の検出には、0.1% (v/v) BSA を含む PBST 溶液で 5,000 倍に希釈した二次抗体と室温で 1 時間抗体反応させ、Chemi-Lumi One により化学発光させることで行った。

## 2-9. 統計学的解析

樹状突起の長さ、分枝数、スパイン密度、定量 RT-PCR、ウエスタンブロット

比較では一元配置分散分析 (one-way ANOVA) を行った。Sholl 解析では繰り返しのある二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った。主効果が有意であった場合、ANOVA の数値を  $p < 0.05$ 、0.01、0.001、0.0001 のいずれかで本文中に記載した。また主効果が有意であった場合のみ、Tukey-Kramer test により多重検定を行った。なお、有意水準は 5%以下とした。

## 第3章 結果

### 3-1. 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔の解析

#### 3-1-1. 生後 21 日齢における樹状突起の形態解析

BPA を 40 ないし 400  $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$  の用量を妊娠マウスに経口投与し、曝露条件ごとに Thy1-GFP-M マウスの産仔を生後 21 日齢の時点で 5 匹ずつ得た(以下、各 BPA 40 群、BPA 400 群と表記)。NeuroLucida ソフトウェアを用いて脳組織切片から海馬 CA1 の錐体細胞がもつ樹状突起をトレースし、基底樹状突起と尖端樹状突起に分けて全長と伸長パターンの複雑度を計測した (Figure 2A)。基底樹状突起では BPA 400 群の突起全長が対照群、BPA 40 群と比べて短くなっていた (one-way ANOVA:  $p < 0.01$ ) (Figure 2B)。次に Sholl 解析により樹状突起の伸長パターンの複雑度を調べた。複雑度は半径 200  $\mu\text{m}$  の範囲内を 10  $\mu\text{m}$  間隔で Sholl 円とよばれる同心円を描き、この Sholl 円と樹状突起との交点数を指標とした。基底樹状突起の複雑度では BPA 曝露影響を認めることができた (two-way ANOVA: BPA 曝露効果,  $p < 0.001$ ; 距離効果,  $p < 0.001$ ; 交互作用,  $p < 0.0001$ ) (Figure 2C)。Sholl 円の半径ごとに交点数を群間比較したところ、半径 100-140  $\mu\text{m}$  の範囲では BPA 400 群の交点数が対照群と比べて有意に減少し、半径 90-150  $\mu\text{m}$  の範囲では BPA 400 群の交点数が BPA 40 群と比べて有意に減少していた。対照群と BPA 40 群との間では交点数の変化は認められなかった。一方、尖端樹



状突起では全長、複雑度ともに BPA 曝露に伴う変化は認められなかった (Figure 2D, E)。樹状突起形態への曝露影響をより詳しく捉えるため、樹状突起を第 2-5 分枝ごとに分けて突起の長さ、数を群間比較した。基底樹状突起の分枝の長さは第 2-5 分枝のいずれも曝露影響は認められなかった (Figure 3A-D)。基底樹状突起の分枝の数は BPA 400 群の第 5 分枝の数が対照群、BPA 40 群と比べて有意に減少していた (one-way ANOVA:  $p < 0.01$ ) (Figure 3H)。第 2-4 分枝の数は変化は無かった (Figure 3E-G)。先端樹状突起の分枝の長さは第 2-5 分枝のいずれも曝露影響は観察されなかった (Figure 4A-D)。先端樹状突起の分枝の数は BPA 400 群の第 4 分枝の数が BPA 40 群と比べて有意に減少していたが、対照群との間では変化が無かった (one-way ANOVA:  $p < 0.05$ ) (Figure 4G)。第 2, 3, 5 分枝の数は変化が認められなかった (Figure 4E, F, H)。以上の結果より、発達期の時点で海馬 CA1 錐体細胞の基底樹状突起の長さ、伸長パターンの複雑度、分枝の数が低用量 BPA 曝露により変化することが明らかとなった。

### 3-1-2. 生後 21 日齢における遺伝子の発現解析

樹状突起の形態解析を行った産仔と同腹の仔を対象に、生後 21 日齢の海馬における遺伝子の発現解析を行った。*Map2*、*Dlg4*、*Grin1*、*Grin2a*、*Grin2b*、*Synaptophysin* のいずれの遺伝子についても、BPA 曝露による発現量の変化は

観察されなかった (Figure 5A-F)。

### 3-1-3. 生後 14 ヶ月齢における樹状突起形態とスパイン密度の解析

BPA を 40 ないし 400  $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$  の用量を妊娠マウスに経口投与し、曝露条件ごとにマウスの産仔を生後 14 ヶ月齢の時点で 4 匹ずつ得た。ゴルジ染色処理した脳組織切片から Neurolucida ソフトウェアを用いて海馬 CA1 の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞、扁桃体ニューロンの樹状突起をトレースし、全長と伸長パターンの複雑度を計測した (Figure 6A, 7A, 8A)。海馬 CA1 錐体細胞については基底樹状突起と先端樹状突起に分けて計測した。海馬 CA1 錐体細胞、歯状回顆粒細胞、扁桃体ニューロンのいずれにおいても、樹状突起の全長は BPA 曝露の影響は認められなかった (Figure 6B, 6D, 7B, 8B)。複雑度についても、いずれのニューロンにおいて曝露影響は無かった (Figure 6C, 6E, 7C, 8C)。

樹状突起上のスパインに着目して解析を行った。樹状突起の形態解析を行ったゴルジ染色の脳組織切片を用いて、海馬 CA1、歯状回、扁桃体基底外側核の 3 領域におけるスパイン密度を計測した。海馬 CA1 では BPA 40 群、BPA 400 群ともに対照群と比べてスパイン密度の有意な低下が認められた (one-way ANOVA:  $p < 0.0001$ ) (Figure 9A, B)。一方、歯状回と扁桃体基底外側核ではスパイン密度の曝露影響は観察されなかった (Figure 9C-F)。

### 3-2. 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスの解析

#### 3-2-1. 生後 14 日齢における樹状突起の形態解析

TCDD を 0.6 ないし 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.の用量を妊娠マウスに経口投与し、曝露条件ごとに Thy1-GFP-M マウスの産仔を生後 14 日齢の時点で 5 匹ずつ得た（以下、各 TCDD 0.6 群、TCDD 3.0 群と表記）。NeuroLucida ソフトウェアを用いて脳組織切片から海馬 CA1 の錐体細胞と扁桃体ニューロンがもつ樹状突起をトレースした（Figure 10A, 13A）。海馬 CA1 錐体細胞については基底樹状突起と先端樹状突起に分けて計測した。海馬 CA1 錐体細胞の基底樹状突起の全長と複雑度は TCDD 曝露の影響は認められなかった（Figure 10B, C）。先端樹状突起でも全長と複雑度の変化は認められなかった（Figure 10D, E）。基底樹状突起の第 2-5 分枝の長さや数を比較したが、分枝の長さ（Figure 11A-D）、分枝の数（Figure 11E-H）ともに変化は無かった。先端樹状突起の第 2-5 分枝の長さや数については曝露影響が観察された。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（one-way ANOVA:  $p < 0.01$ ）（Figure 12A）、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（one-way ANOVA:  $p < 0.05$ ）（Figure 12B）。第 3, 4 分枝の長さに変化は認められなかった（Figure 12C, D）。なお分枝の数は第 2-5 分枝のいずれも変化は

無かった (Figure 12E-H)。次に扁桃体ニューロンの樹状突起の形態を解析した。突起の全長、複雑度ともに TCDD 曝露による影響は認められなかった (Figure 13B, C)。樹状突起の第 2-5 分枝の長さとな数を群間比較したところ、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 (one-way ANOVA:  $p < 0.05$ ) (Figure 14B)。一方、第 2, 4, 5 分枝では長さの変化は観察されなかった (Figure 14A, C, D)。また分枝の数については第 2-5 分枝のいずれも変化は無かった (Figure 14E-H)。以上の結果より、発達期の時点で海馬 CA1 錐体細胞と扁桃体ニューロンにおいて、低用量 TCDD 曝露により樹状突起の分枝の長さが変化することが明らかとなった。

### 3-2-2. 生後 14 日齢における遺伝子の発現解析

TCDD を 0.6 ないし 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.の用量を投与した妊娠マウスから生まれた仔が生後 14 日齢の時点で、海馬を採取し遺伝子の発現解析を行った。*Map2*、*Dlg4*、*Grin1*、*Grin2a*、*Grin2b*、*Synaptophysin* のいずれの遺伝子についても、BPA 曝露による発現量の変化は観察されなかった (Figure 15A-F)。

### 3-2-3. 生後 21 日齢におけるタンパク質の発現解析

TCDD を 0.6 ないし 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.の用量を投与した妊娠マウスの産仔が生

後 21 日齢の海馬を採取してウェスタンブロットによるタンパク質の発現解析を行った。TCDD 曝露による PSD-95 および Synaptophysin の発現量の変化は観察されなかった (Figure 16A-C)。

#### 3-2-4. 生後 16 ヶ月齢における樹状突起形態とスパイン密度の解析

TCDD を 0.6 ないし 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg b.w.}$  の用量を妊娠マウスに経口投与し、生後 16 ヶ月齢の時点でマウスの産仔を曝露条件ごとに 4 匹ずつサンプリングした。ゴルジ染色処理した脳組織切片から Neurolucida ソフトウェアを用いて海馬 CA1 の錐体細胞、歯状回の顆粒細胞、扁桃体ニューロンがもつ樹状突起をトレースし、全長と伸長パターンの複雑度を計測した (Figure 17A, 18A, 19A)。海馬 CA1 錐体細胞については基底樹状突起と先端樹状突起に分けて計測した。海馬 CA1 錐体細胞、歯状回顆粒細胞、扁桃体ニューロンのいずれにおいても、樹状突起の全長は BPA 曝露の影響は認められなかった (Figure 17B, 17D, 18B, 19B)。複雑度についても、いずれのニューロンで曝露影響は観察されなかった (Figure 17C, 17E, 18C, 19C)。

次に、樹状突起上のスパインに着目して解析を行った。樹状突起の形態解析を行ったゴルジ染色の脳組織切片を用いて、海馬 CA1、歯状回、扁桃体基底外側核の 3 領域におけるスパイン密度を計測した。海馬 CA1 では TCDD 0.6 群、

TCDD 3.0 群ともに対照群と比べてスパイン密度の有意な低下が認められた (one-way ANOVA:  $p < 0.0001$ ) (Figure 20A, B)。一方、歯状回と扁桃体基底外側核ではスパイン密度の曝露影響は観察されなかった (Figure 20C-F)。

### 3-3. AhR あるいは CA-AhR 発現をさせた海馬 CA1 錐体細胞における樹状突起の形態解析

TCDD 毒性に AhR が不可欠である点に着目し、リガンドと結合した AhR に誘導される下流のシグナルと樹状突起の長さや伸長パターンの複雑度との関連を検討した。リガンド非依存的に核へ移行して転写調節因子として機能する構造活性型 AhR (constitutively active AhR; CA-AhR) (Figure 21A) の遺伝子を CAG プロモーターの下流につないだ pCAG-CA-AhR ベクターを作成した。AhR に誘導されるシグナルの重要性を確認するため、CAG プロモーターの下流に野生型 AhR をつないだ pCAG-AhR ベクターも作成し、AhR の過剰発現が樹状突起の構造におよぼす影響についても調べた。子宮内胎仔脳電気穿孔法により、胎生 15 日目のマウスの側脳室に pCAG-AhR ベクターあるいは pCAG-CA-AhR ベクターを注入し、脳室帯の細胞にベクターを導入した (以下、AhR 群、CA-AhR 群と表記)。形態を可視化するために蛍光タンパク質の tdTomato を発現する pCAG-tdTomato ベクターも同時に導入した。子宮内胎仔

脳電気穿孔法の処置を行ったマウスを、生後 14 日目の時点で各群 3–4 匹ずつサンプリングした。脳組織切片した後に NeuroLucida ソフトウェアを用いて、tdTomato を発現する海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起をトレースした (Figure 21C)。全長と伸長パターンの複雑度を計測したところ、CA-AhR 群では対照群および AhR 群と比べて全長が短くなっていた (one-way ANOVA:  $p < 0.0001$ ) (Figure 21D)。さらに複雑度についてもベクター導入の影響が認められた (two-way ANOVA: ベクター効果,  $p < 0.0001$ ; 距離効果,  $p < 0.0001$ ; 交互作用,  $p < 0.0001$ )。詳しく解析すると、Sholl 円の半径 50 – 200  $\mu\text{m}$  の範囲における CA-AhR 群の樹状突起と Sholl 円との交点数が対照群と比べて減少していた。また、Sholl 円の半径 60 – 200  $\mu\text{m}$  の範囲における CA-AhR 群の樹状突起と Sholl 円との交点数が AhR 群と比べて減少していた (Figure 21E)。一方、対照群と AhR 群との間では突起の全長、複雑度ともに変化は認められなかった。なお基底樹状突起については本実験条件では tdTomato を発現する細胞の数が極めて多く、個々の突起の正確な識別が困難なため計測を断念した。以上の結果から、胎仔期から発達期にかけて CA-AhR を発現させた海馬 CA1 錐体細胞では、先端樹状突起の長さの減少と複雑度の低下が認められ、この変化は野生型 AhR の過剰発現では認められなかったことから、AhR に誘導される下流のシグナルカスケードが樹状突起の伸長に関与している可能性が示された。

## 第4章 考察

単一細胞レベルでのニューロン形態への影響の観点から、化学物質曝露による発達神経毒性を検討することは、これまでに十分な検討はなされていない。神経回路の構築に直結し、高次脳機能との密接な関連が示唆されるニューロン形態の解析は発達神経毒性の理解を深めるための重要な知見となるだろう。本研究では低用量の BPA あるいは TCDD 曝露によるニューロン形態の変化を捉えることを目的に実験を行い、妊娠期に BPA 投与したマウスの産仔あるいは TCDD を周産期曝露した仔マウスの脳を用いて解析した結果、発達期マウスでは樹状突起の長さ、伸長パターンの複雑度、分岐数などの変化が認められた。また、老齢期マウスの脳では海馬 CA1 領域におけるスパイン密度の低下が観察された。さらに CA-AhR を発現させたニューロンの形態解析から、活性化した AhR により誘導されるシグナルカスケードが樹状突起伸長を抑制することを示唆する結果が得られた。本研究結果より、ニューロンの形態解析から曝露影響を捉えることが可能であり、行動試験や遺伝子・タンパク質の発現解析とは異なる観点から発達神経毒性の理解に迫ることができた。将来的には、ニューロン形態が毒性影響の有用な評価指標となる可能性も考えられるだろう。



#### 4-1. 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔におけるニューロン形態への影響

本研究では、BPA 40 あるいは 400  $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$  の用量を妊娠マウスに投与し、生後 21 日目の産仔マウスを用いて発達期におけるニューロン形態への曝露影響を調べた。その結果、BPA 400 群での海馬 CA1 錐体細胞の基底樹状突起では全長、分枝数、伸長パターンの複雑度が対照群および BPA 40 群と比べて有意に減少していた (Figure 2A, B, C; Figure 3H)。発達過程の脳では神経回路を正常に構築するために、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。樹状突起の長さ、分岐数、伸長パターンへの曝露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。また、海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起には変化がみられなかった。基底樹状突起と先端樹状突起はそれぞれ入力を受けるニューロン種が異なることが知られており、基底樹状突起は海馬 CA3a 錐体細胞から、先端樹状突起は海馬 CA3c 錐体細胞から主に入力を受けているため (Li *et al.*, 1994)、BPA 曝露により CA3a–CA1 間の神経回路が影響を受けている可能性がある。今後は CA3a 錐体細胞の形態を調べていくことで、海馬の神経回路への曝露影響をより包括的に捉えることができるだろう。

さらに本研究では、脳の組織解析で得ることができた樹状突起の形態変化を遺伝子の発現解析から検討した (Figure 5A-F)。樹状突起に局在がみられる Map2

タンパク質、シナプス後部に局在する足場タンパク質 PSD-95、シナプス小胞構成タンパク質 Synpatophysin、NMDA 受容体のサブユニットである *Grin1*, *Grin2a*, *Grin2b*、いずれの遺伝子も発現量の変化は認められなかった。ニューロン形態は特定の細胞種のみを選択的に解析できるため、遺伝子の発現解析では捉えることが難しい局所的な変化を捉えることが可能なのかもしれない。

発達期の脳では、神経伝達物質や成長因子などの制御をうけて樹状突起が伸長し、複雑な神経回路を構築していく。ラットを用いた実験から、青班核のニューロンが産生するノルアドレナリンが大脳新皮質ニューロンの樹状突起伸長を制御していることが分かっている (Maeda *et al.*, 1974)。周産期 BPA 曝露をうけたラットでは青班核の体積および構成細胞数への影響が認められている (Kubo *et al.*, 2003)。青班核のノルアドレナリン産生ニューロンは大脳新皮質に加えて海馬へも投射しているため、本研究で示された CA1 錐体細胞における樹状突起の形態変化に、青班核への曝露影響が関連している可能性がある。また青班核の体積および細胞数の変化は BPA に限らず、合成エストロゲンであるジェチスチルベストロールでも認められており (Kubo *et al.*, 2003)、BPA と TCDD 以外の化学物質の曝露によるニューロン形態への影響を調べていくことが今後の重要な検討課題のひとつだろう。

妊娠期 BPA 投与マウスの産仔マウスが生後 14 ヶ月齢での脳をゴルジ染色し、

老齢期における海馬 CA1 錐体細胞、歯状回顆粒細胞、扁桃体ニューロンの形態を解析した。その結果、いずれのニューロンでも樹状突起の形態変化は認められなかった。海馬 CA1、歯状回、扁桃体基底外側核の 3 領域でのスパイン密度を調べたところ、BPA 40 および 400  $\mu\text{g}/\text{kg b.w./day}$  の両曝露群において海馬 CA1 領域のスパイン密度が対照群と比べて低下していた (Figure 9B)。海馬や大脳皮質などの多くの興奮性シナプスでは、スパインの上部に神経伝達物質であるグルタミン酸と結合する NMDA や AMPA 受容体が局在し、シナプス後部として機能している (Petralia and Wenthold, 1992; Petralia *et al.*, 1994; Kharazia and Weinberg, 1997)。すなわち、スパイン数の変化は興奮性シナプス数の変化を反映していると考えられる (Megias *et al.*, 2001)。周産期 BPA 曝露を受けた仔マウスの海馬において、NMDA 受容体数の減少 (Tian *et al.*, 2010)、ならびに AMPA 受容体サブユニットである GluR1 タンパク質の減少 (Xu *et al.*, 2012) が報告されている。これらのグルタミン酸受容体の減少は興奮性シナプス数の減少を強く示唆するが、これまで組織学的解析からシナプス数の減少を支持する研究報告はなかった。本研究ではゴルジ染色による組織解析からスパイン密度の低下を明らかにし、シナプス数の減少をより強く示唆する影響を捉えることができた。

発達神経毒性の研究では、老齢期に生じる曝露影響の知見は極めて少ない。

ところが、周産期 BPA 曝露をうけた雌マウスにて、18 ヶ月齢で卵巣および生殖

管の組織構造の変化が報告されており (Newbold *et al.*, 2007)、発達神経毒性を包括的に理解するためには老齢期における曝露影響を調べる必要がある。生後 14 ヶ月齢の曝露マウスにおける海馬 CA1 スパイン密度の低下は、老齢期における曝露影響の端緒を把握した点で本研究の成果のひとつと言える。ただし、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。

げっ歯類の空間記憶を調べるための Y 迷路やモリス水迷路を用いた行動試験により、曝露個体での成績低下が報告されている (Poimenova *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012)。BPA 用量、曝露期間、行動試験の時期など実験条件に違いがあるものの、40  $\mu\text{g}$ -4 mg/kg b.w./day という「低用量」5 mg/kg b.w./day (Melnick *et al.*, 2002) 以下の用量でも影響が観察されている。これらの結果は、周産期 BPA 曝露が記憶・学習機能に関わる脳領域に器質的变化をおよぼす可能性を示唆する。本研究では記憶・学習機能の責任脳領域である海馬に着目し、CA1 錐体細胞の樹状突起の形態変化および CA1 領域のスパイン密度の低下を明らかにした。行動変化が観察される以前の発達期、ならびに曝露した化学物質が体内に残留していないとみなせる老齢期でもニューロンの形態変化が観察されたことは、周産期 BPA 曝露による発達神経毒性が持続して老齢期まで影響を

およぼすことを意味している。本研究では既報の記憶・学習機能への曝露影響と矛盾しない結果を得ることができ、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。

#### 4-2. TCDD 周産期曝露によるニューロン形態への影響

本研究では妊娠 12.5 日目の母マウスに TCDD を投与して仔マウスへの曝露を行った。TCDD は体内で高い残留性をもつため、単回投与であっても胎盤を通して胎仔は曝露され続ける。また TCDD は脂溶性なので母乳にも含まれるため、生後の授乳期でも仔マウスは曝露をうける。

TCDD の周産期曝露をうけた生後 14 日目の発達期マウスを用いてニューロンの形態解析を行ったところ、海馬 CA1 錐体細胞および扁桃体ニューロンにおいて樹状突起の長さに変化が認められた (Figure 12A, B; Figure 14B)。CA1 錐体細胞では先端樹状突起の TCDD 0.6 群における第 3 分枝の長さが対照群と比べて長く、TCDD 3.0 群における第 2 分枝の長さが対照群と比べて短かった。一方、分枝の数には変化がみられなかった。扁桃体ニューロンでは TCDD 3.0 群の第 3 分枝の長さが対照群と比べて短かった。いずれのニューロンもわずかな長さの変化ではあったが、低用量 TCDD の周産期曝露によりニューロンの形態変化を捉えることができた。曝露量ごとに形態変化が顕れる脳領域が異なっており、こ

のことが用量特異的に観察される高次脳機能への曝露影響の理由を説明するきっかけとなるかもしれない。本研究と全く同じ曝露条件で TCDD を曝露したマウスでは、恐怖条件付け記憶あるいは社会性行動の活動レベルの低下が認められている(Haijima *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2012)。恐怖条件付け記憶の形成には記憶・学習機能の責任領域である海馬に加え、恐怖情動の責任領域である扁桃体が重要な役割を担う。本研究によって、発達期の時点で海馬と扁桃体においてニューロン形態の変化を捉えたことは、微細な器質的变化が行動変化をもたらす可能性を示唆しているという点で重要な知見と考える。今後は行動変化と発達期の時点で生じている器質的变化との因果関係を明らかにしていく必要がある。また、行動試験を実施する月齢のマウスを用いて海馬や扁桃体のニューロンを解析することで、器質的变化と機能的変化との関連をより深く議論できるようになるだろう。

生後 14 日目の海馬について *Map2*、*Dlg4*、*Grin1*、*Grin2a*、*Grin2b* および *Synpatophysin* 遺伝子の発現解析を行ったところ、いずれの遺伝子でも曝露による発現量の変化はみられなかった (Figure 15A-F)。さらにタンパク質レベルでの検討も行い、生後 21 日目の海馬から作成した粗シナプトソーム分画における PSD-95 および *Synaptophysin* の発現量を調べたが、曝露影響はみられなかった (Figure 16A-C)。単一細胞レベルでのニューロン形態の解析は、複数の細胞種

が混入する組織から抽出した遺伝子・タンパク質の発現解析では検出が困難な曝露影響を捉えることができると考えられる。

TCDD を周産期曝露したマウスが生後 16 ヶ月齢の老齢期の時点における脳をゴルジ染色し、海馬 CA1 錐体細胞、歯状回顆粒細胞、扁桃体ニューロンの形態を解析した。その結果、いずれのニューロンでも樹状突起の形態変化は認められなかった。海馬 CA1、歯状回、扁桃体基底外側核の 3 領域でのスパイン密度を調べたところ、TCDD 0.6 および 3.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  b.w.の両曝露群において海馬 CA1 領域のスパイン密度が対照群と比べて低下しており (Figure 20B)、興奮性シナプス数の減少を示唆する結果を得ることができた。マウスにおける TCDD 消失半減期は 12-24 日とされており (Van den Berg *et al.*, 1994)、消失半減期を 24 日と考えても生後 16 ヶ月齢での残留 TCDD は授乳期直後と比べて約 50 万分の 1 となり、曝露された TCDD はほぼ全て体外に排泄されていると考えられる。よって、16 ヶ月齢に観察されるスパイン密度の低下は、周産期の時点での曝露が正常な脳の発生・発達に与える影響に起因していると考えられる。

周産期 TCDD 曝露をうけたげっ歯類を用いた行動試験から、これまでに海馬や扁桃体への影響を示唆する結果が報告されている (Widholm *et al.*, 2003; Haijima *et al.*, 2010; Endo *et al.*, 2012)。そこで本研究では海馬と扁桃体を構成するニューロンに着目し、曝露個体における CA1 錐体細胞および扁桃体ニューロン

の樹状突起やスパイン密度を調べたところ、樹状突起の長さの変化とスパイン密度の低下捉えることができた。単一ニューロンのレベルでの形態の解析は極めて局所的な変化を対象とするが、海馬や扁桃体など複数の脳領域を解析することで、脳全体のネットワークへの曝露影響の議論につながるだろう。

#### 4-3. 毒性影響の分子メカニズム解明に向けた子宮内胎仔脳電気穿孔法の利用

TCDD の毒性影響には受容体である AhR が必須であり、TCDD と結合して活性化した AhR は細胞質から核へ移行し、転写調節因子として標的遺伝子の発現を誘導する(Mimura and Fujii-Kuriyama, 2003)。TCDD 曝露をうけた個体では脳に到達した TCDD が細胞内の AhR を活性化させ、分化・成熟に関わるシグナルカスケードを乱すことで毒性影響を引き起こすと想定される。そこで本研究では、周産期 TCDD 曝露による毒性影響の分子メカニズム解明の端緒を把握するため、ニューロン形態と AhR に誘導されるシグナルカスケードとの関連を調べた。リガンド非依存的に核へ移行して標的遺伝子の発現を誘導する CA-AhR(McGuire *et al.*, 2001)を発生・発達段階の海馬 CA1 錐体細胞に発現させると、樹状突起の全長が短くなり、伸長パターンの複雑度が減少することを明らかにした (Figure 21C, D)。野生型 AhR を過剰発現させた場合ではこのような樹状突起の変化は生じなかったため、活性化された AhR に誘導される下流のシグナルカスケードが



樹状突起の伸長を制御していることが示唆される。*Drosophila* を用いた実験より、哺乳類 AhR のオーソログ遺伝子である *spineless* (*ss*) をノックアウトしたニューロンでは樹状突起の分岐に異常が生じることから(Kim *et al.*, 2006)、*ss* が分岐形成を制御している可能性が考えられ、哺乳類のニューロンでも AhR が樹状突起の伸長に関わるシグナルカスケードの一端を担っている可能性がある。また AhR ノックアウトマウスでは恐怖条件付け記憶の成績低下が報告されており(Latchney *et al.*, 2012)、脳の発達や機能における AhR の関与を示唆する知見が蓄積しつつある。CA-AhR を発現させて強制的に AhR シグナルカスケードを誘導したニューロン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。今後、CA-AhR 発現ニューロンおよび TCDD 曝露個体のニューロンに顕れる樹状突起の形態変化が、同一の分子メカニズムによって引き起こされるのかを検討することとは興味深いテーマである。CA-AhR の発現レベルと TCDD の用量と関係については、対比は必ずしも容易ではないが、AhR 標的遺伝子である *Cyp1a1* などの発現量を用いることで比較することができるかもしれない。なお BPA については、BPA との結合が認められている受容体が複数存在するため、分子メカニズムについては不確定な部分が多く、また構造活性型タンパク質が報告されていないために実施しなかった。今後、BPA の発達神経毒性に関与する受容体が同定された際

には、子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いてニューロン形態を指標とした分子メカニズムを検討する必要がある。

発達神経毒性の分子メカニズムを解明するためには複雑なシグナルカスケードの検討にも取り組む必要がある。そのためには解析対象とする細胞集団を標識するだけでなく、シグナルカスケードの関連遺伝子を操作できる実験系の確立が不可欠である。近年、胎仔マウスの脳のニューロンに遺伝子発現ベクターを導入する子宮内胎仔脳電気穿孔法が開発され(Tabata and Nakajima, 2001)、発達過程におけるニューロンの移動や形態を *in vivo* で解明する研究に用いられている(Tabata and Nakajima, 2003; Sekine *et al.*, 2012)。子宮内胎仔脳電気穿孔法は単にニューロンを可視化するだけでなく任意の遺伝子を発現させることができ、*in vivo* で細胞内シグナルカスケードを解析できる利点がある。本研究ではこの利点に着目し、ニューロン形態と AhR シグナルカスケードとの関連を調べるために子宮内胎仔脳電気穿孔法を用いて実験を行い、AhR シグナルカスケードが樹状突起伸長を制御している可能性を示すことができた。分子メカニズムの解明に切り込むアプローチとして、子宮内胎仔脳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。

#### 4-4. ニューロン形態の発達神経毒性における評価指標としての展望

本研究では脳組織に密集するニューロンのうち、ごく少数のニューロンを可視化するために、ゴルジ染色した脳を用いて形態解析を行った。ゴルジ染色は脳全体の様々な種類のニューロンを染色することができ、海馬 CA1 錐体細胞 (McMullen *et al.*, 1984)、歯状回顆粒細胞 (Green and Juraska, 1985)、扁桃体ニューロン (Herzog, 1982)、線条体中型有棘ニューロン (Robinson and Kolb, 1997)、小脳プルキンエ細胞 (Liu and Shio, 2008)、大脳皮質錐体細胞 (Chen *et al.*, 2009) などの形態解析を行った研究例がある。化学物質の曝露影響を調べる際には実験ごとに影響が顕れるニューロン種が異なると想定されるので、解析対象とするニューロン種の制約を受けにくいゴルジ染色は曝露影響を調べる上で利便性の高い手法と言える。

Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 錐体細胞や扁桃体ニューロンでは、GFP 発現により可視化されるニューロンの数がゴルジ染色よりも少なく、樹状突起が密に重なりにくいいため、より正確な形態解析が可能である。さらに Thy1-GFP-M マウスの場合、脳切片作成後に染色作業を経ず速やかに解析を実施できるため、組織サンプルの調製に費やす時間がゴルジ染色と比べて短いという利点もある。Thy1 マウスは複数の系統が作成されており、系統ごとに可視化されるニューロン種や数が異なるため (Feng *et al.*, 2000)、実験目的に応じて適切な系統が選択で

きることも、多くの化学物質の曝露影響を調べる上で利点となる。

以上のように、ニューロン形態を解析する実験系が神経科学において確立されており、解析対象のニューロン種に適した実験系を選択することで、ニューロン形態は発達神経毒性の研究において非常に有用なアプローチになると考えられる。国際的な毒性ガイドラインである経済開発協力機構（Organization for Economic Co-operation and Development; OECD）の毒性試験ガイドラインにおいて、「げっ歯類の神経毒性試験（Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents）」（OECD, 1997）および「発達神経毒性試験（Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study）」（OECD, 2007）の項目に、中枢神経系への毒性影響を調べる際の評価指標が挙げられている。組織解析については、ヘマトキシリン・エオジン染色、神経変性を検出する渡銀染色、ミエリンを染色する髄鞘染色、壊死細胞を検出する Fluoro-jade 染色などが挙げられているが、単一ニューロンレベルでの形態については言及されていない。

私の学位論文研究においては、形態解析に特化した Neurolucida ソフトウェアを用いたものの樹状突起のトレースは手動で行わねばならず解析に多くの時間を費やさねばならなかった。現段階では汎用性の高い評価指標とは言い難いかもしれない。しかし将来、脳組織におけるニューロンの複雑な樹状突起やスパインを高精度で簡便に計測できるようになれば、高次脳機能と密接な関連をも

つニューロン形態が有用な評価指標となる可能性がある。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が必要である。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なる御指導・御鞭撻を賜りました遠山千春教授（東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門）に厚く御礼申し上げます。本研究に関して貴重なアドバイスをして頂き、御指導を頂きました掛山正心博士（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻生命医科学講座 神経機能学分野）に深く御礼申し上げます。

また、子宮内胎仔脳電気穿孔法については、久保健一郎博士（慶應義塾大学医学部解剖学教室）に御協力頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

最後になりますが、本研究の遂行に際し的確な助言を下さり、研究を手伝って下さった東京大学大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 健康環境医工学部門の皆様にご心から感謝致します。

## 引用文献

Aizawa, H., Hu, S.C., Bobb, K., Balakrishnan, K., Ince, G., Gurevich, I.,

Cowan, M., Ghosh, A. (2004). Dendrite development regulated by

CREST, a calcium-regulated transcriptional activator. *Science*

**303**(5655), 197-202.

Armstrong, D., Dunn, J.K., Antalffy, B., Trivedi, R. (1995). Selective dendritic

alterations in the cortex of Rett syndrome. *J. Neuropathol. Exp.*

*Neurol.* **54**(2), 195-201.

Bannister, N.J., Larkman, A.U. (1995). Dendritic morphology of CA1

pyramidal neurones from the rat hippocampus: I. Branching patterns.

*J. Comp. Neurol.* **360**(1), 150-160.

Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L.,

Tong, W., Shi, L., Perkins, R., Sheehan, D.M. (2000). The estrogen

receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals:

structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.* **54**(1), 138-153.

Bloss, E.B., Janssen, W.G., McEwen, B.S., Morrison, J.H. (2010). Interactive effects of stress and aging on structural plasticity in the prefrontal cortex. *J. Neurosci.* **30**(19), 6726-6731.

Brede, C., Fjeldal, P., Skjevrak, I., Herikstad, H. (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Addit. Contam.* **20**(7), 684-689.

Broadbelt, K., Byne, W., Jones, L.B. (2002). Evidence for a decrease in basilar dendrites of pyramidal cells in schizophrenic medial prefrontal cortex. *Schizophr. Res.* **58**(1), 75-81.

Chen, C., Tonegawa, S. (1997). Molecular genetic analysis of synaptic plasticity, activity-dependent neural development, learning, and memory in the mammalian brain. *Annu. Rev. Neurosci.* **20**, 157-184.



Chen, C.C., Abrams, S., Pinhas, A., Brumberg, J.C. (2009). Morphological heterogeneity of layer VI neurons in mouse barrel cortex. *J. Comp. Neurol.* **512**(6), 726-746.

Chen, Y.C., Guo, Y.L., Hsu, C.C., Rogan, W.J. (1992). Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs. *JAMA* **268**(22), 3213-3218.

Conrad, C.D. (2010). A critical review of chronic stress effects on spatial learning and memory. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **34**(5), 742-755.

Courtney, K.D., Moore, J.A. (1971). Teratology studies with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **20**(3), 396-403.

Couture-Haws, L., Harris, M.W., McDonald, M.M., Lockhart, A.C., Birnbaum,

L.S. (1991). Hydronephrosis in mice exposed to TCDD-contaminated breast milk: identification of the peak period of sensitivity and assessment of potential recovery. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **107**(3), 413-428.

Endo, T., Kakeyama, M., Uemura, Y., Haijima, A., Okuno, H., Bito, H., Tohyama, C. (2012). Executive Function Deficits and Social-Behavioral Abnormality in Mice Exposed to a Low Dose of Dioxin In Utero and via Lactation. *PLoS One* **7**(12), e50741.

Faith, R.E., Moore, J.A. (1977). Impairment of thymus-dependent immune functions by exposure of the developing immune system to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *J. Toxicol. Environ. Health* **3**(3), 451-464.

Feng, G., Mellor, R.H., Bernstein, M., Keller-Peck, C., Nguyen, Q.T., Wallace, M., Nerbonne, J.M., Lichtman, J.W., Sanes, J.R. (2000). Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral

variants of GFP. *Neuron* **28**(1), 41-51.

Funabashi, T., Kawaguchi, M., Furuta, M., Fukushima, A., Kimura, F. (2004).

Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats.

*Psychoneuroendocrinology* **29**(4), 475-485.

Garey, L.J., Ong, W.Y., Patel, T.S., Kanani, M., Davis, A., Mortimer, A.M.,

Barnes, T.R., Hirsch, S.R. (1998). Reduced dendritic spine density on cerebral cortical pyramidal neurons in schizophrenia. *J. Neurol.*

*Neurosurg. Psychiatry* **65**(4), 446-453.

Gray, E.G., Whittaker, V.P. (1962). The isolation of nerve endings from brain:

an electron-microscopic study of cell fragments derived by homogenization and centrifugation. *J. Anat.* **96**, 79-88.

Gray, L.E., Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L.

(2000). Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.* **58**(2), 350-365.

Gray, L.E., Jr., Ostby, J.S. (1995). In utero 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **133**(2), 285-294.

Gray, L.E., Ostby, J.S., Kelce, W.R. (1997). A dose-response analysis of the reproductive effects of a single gestational dose of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in male Long Evans Hooded rat offspring. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **146**(1), 11-20.

Green, E.J., Juraska, J.M. (1985). The dendritic morphology of hippocampal dentate granule cells varies with their position in the granule cell layer: a quantitative Golgi study. *Exp. Brain Res.* **59**(3), 582-586.

Haijima, A., Endo, T., Zhang, Y., Miyazaki, W., Kakeyama, M., Tohyama, C.

(2010). In utero and lactational exposure to low doses of chlorinated and brominated dioxins induces deficits in the fear memory of male mice. *Neurotoxicology* **31**(4), 385-390.

Harada, M. (1978). Congenital Minamata disease: intrauterine methylmercury poisoning. *Teratology* **18**(2), 285-288.

Herzog, A.G. (1982). The relationship of dendritic branching complexity to ontogeny and cortical connectivity in the pyramidal cells of the monkey amygdala: a Golgi study. *Brain Res.* **256**(1), 73-77.

Homberger, E., Reggiani, G., Sambeth, J., Wipf, H.K. (1979). The Seveso accident: its nature, extent and consequences. *Ann. Occup. Hyg.* **22**(4), 327-367.

Hsu, S.T., Ma, C.I., Hsu, S.K., Wu, S.S., Hsu, N.H., Yeh, C.C., Wu, S.B. (1985). Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup. *Environ. Health Perspect.* **59**, 5-10.

Hurst, C.H., Abbott, B.D., DeVito, M.J., Birnbaum, L.S. (1998).

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in pregnant Long Evans rats: disposition to maternal and embryo/fetal tissues. *Toxicol. Sci.* **45**(2), 129-136.

Hurst, C.H., DeVito, M.J., Setzer, R.W., Birnbaum, L.S. (2000). Acute

administration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats: association of measured tissue concentrations with developmental effects. *Toxicol. Sci.* **53**(2), 411-420.

Hutsler, J.J., Zhang, H. (2010). Increased dendritic spine densities on cortical

projection neurons in autism spectrum disorders. *Brain Res.* **1309**, 83-94.

Ikeda, M., Mitsui, T., Setani, K., Tamura, M., Takeyama, M., Sone, H.,

Tohyama, C., Tomita, T. (2005). In utero and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in rats disrupts brain sexual

differentiation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **205**(1), 98-105.

Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y. (2002).

Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum. Reprod.* **17**(11), 2839-2841.

Jacobson, J.L., Jacobson, S.W., Humphrey, H.E. (1990). Effects of in utero

exposure to polychlorinated biphenyls and related contaminants on cognitive functioning in young children. *J. Pediatr.* **116**(1), 38-45.

Takeyama, M., Sone, H., Miyabara, Y., Tohyama, C. (2003). Perinatal

exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters activity-dependent expression of BDNF mRNA in the neocortex and male rat sexual behavior in adulthood. *Neurotoxicology* **24**(2), 207-217.

Takeyama, M., Tohyama, C. (2003). Developmental neurotoxicity of dioxin

and its related compounds. *Ind. Health* **41**(3), 215-230.

Kang, J.H., Kito, K., Kondo, F. (2003). Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J. Food Prot.* **66**(8), 1444-1447.

Kharazia, V.N., Weinberg, R.J. (1997). Tangential synaptic distribution of NMDA and AMPA receptors in rat neocortex. *Neurosci. Lett.* **238**(1-2), 41-44.

Kim, M.D., Jan, L.Y., Jan, Y.N. (2006). The bHLH-PAS protein Spineless is necessary for the diversification of dendrite morphology of *Drosophila* dendritic arborization neurons. *Genes Dev.* **20**(20), 2806-2819.

Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., Aou, S. (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* **45**(3), 345-356.

Kuratsune, M., Yoshimura, T., Matsuzaka, J., Yamaguchi, A. (1972).



Epidemiologic study on Yusho, a Poisoning Caused by Ingestion of Rice Oil Contaminated with a Commercial Brand of Polychlorinated Biphenyls. *Environ. Health Perspect.* **1**, 119-128.

Latchney, S.E., Hein, A.M., O'Banion, M.K., Diccico-Bloom, E., Opanashuk, L.A. (2012). Deletion or activation of the aryl hydrocarbon receptor alters adult hippocampal neurogenesis and contextual fear memory. *J. Neurochem.*

Li, X.G., Somogyi, P., Ylinen, A., Buzsaki, G. (1994). The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J. Comp. Neurol.* **339**(2), 181-208.

Liu, Q.A., Shio, H. (2008). Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both Bcl-w and the glutamate receptor delta2. *PLoS Genet.* **4**(6), e1000097.

Maeda, T., Toyama, M., Shimizu, N. (1974). Modification of postnatal

development of neocortex in rat brain with experimental deprivation of locus coeruleus. *Brain Res.* **70**(3), 515-520.

Markham, J.A., McKian, K.P., Stroup, T.S., Juraska, J.M. (2005). Sexually dimorphic aging of dendritic morphology in CA1 of hippocampus. *Hippocampus* **15**(1), 97-103.

Masuda, Y., Kagawa, R., Kuroki, H., Kuratsune, M., Yoshimura, T., Taki, I., Kusuda, M., Yamashita, F., Hayashi, M. (1978). Transfer of polychlorinated biphenyls from mothers to fetuses and infants. *Food Cosmet. Toxicol.* **16**(6), 543-546.

McDonald, A.J. (1982). Neurons of the lateral and basolateral amygdaloid nuclei: a Golgi study in the rat. *J. Comp. Neurol.* **212**(3), 293-312.

McGuire, J., Okamoto, K., Whitelaw, M.L., Tanaka, H., Poellinger, L. (2001). Definition of a dioxin receptor mutant that is a constitutive activator of transcription: delineation of overlapping repression and ligand

binding functions within the PAS domain. *J. Biol. Chem.* **276**(45), 41841-41849.

McMullen, P.A., Saint-Cyr, J.A., Carlen, P.L. (1984). Morphological alterations in rat CA1 hippocampal pyramidal cell dendrites resulting from chronic ethanol consumption and withdrawal. *J. Comp. Neurol.* **225**(1), 111-118.

Megias, M., Emri, Z., Freund, T.F., Gulyas, A.I. (2001). Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience* **102**(3), 527-540.

Melnick, R., Lucier, G., Wolfe, M., Hall, R., Stancel, G., Prins, G., Gallo, M., Reuhl, K., Ho, S.M., Brown, T., Moore, J., Leakey, J., Haseman, J., Kohn, M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ. Health Perspect.* **110**(4), 427-431.

Mimura, J., Fujii-Kuriyama, Y. (2003). Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim. Biophys. Acta* **1619**(3), 263-268.

Mimura, J., Yamashita, K., Nakamura, K., Morita, M., Takagi, T.N., Nakao, K., Ema, M., Sogawa, K., Yasuda, M., Katsuki, M., Fujii-Kuriyama, Y. (1997). Loss of teratogenic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in mice lacking the Ah (dioxin) receptor. *Genes Cells* **2**(10), 645-654.

Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N., O'Keefe, J. (1982). Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* **297**(5868), 681-683.

Morrissey, R.E., George, J.D., Price, C.J., Tyl, R.W., Marr, M.C., Kimmel, C.A. (1987). The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **8**(4), 571-582.

Muller, F., O'Rahilly, R. (1989). The human brain at stage 17, including the appearance of the future olfactory bulb and the first amygdaloid nuclei. *Anat. Embryol. (Berl.)* **180**(4), 353-369.

Nadarajah, B., Brunstrom, J.E., Grutzendler, J., Wong, R.O., Pearlman, A.L. (2001). Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. *Nat. Neurosci.* **4**(2), 143-150.

Nakamura, S., Akiguchi, I., Kameyama, M., Mizuno, N. (1985). Age-related changes of pyramidal cell basal dendrites in layers III and V of human motor cortex: a quantitative Golgi study. *Acta Neuropathol.* **65**(3-4), 281-284.

Newbold, R.R., Jefferson, W.N., Padilla-Banks, E. (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod. Toxicol.* **24**(2), 253-258.

Nimchinsky, E.A., Oberlander, A.M., Svoboda, K. (2001). Abnormal

development of dendritic spines in FMR1 knock-out mice. *J. Neurosci.* **21**(14), 5139-5146.

Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H. (2010). Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ. Health Perspect.* **118**(9), 1196-1203.

O'Rahilly, R. (1979). Early human development and the chief sources of information on staged human embryos. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **9**(4), 273-280.

OECD (1997). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents*. Available at: <http://caliban.sourceoecd.org/vl=61405602/cl=13/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s25/p1>. Accessed 12 February 2013.

OECD (2007). *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 426:*

*Developmental Neurotoxicity Study*. Available at:

<http://miranda.sourceoecd.org/vl=44436495/cl=11/nw=1/rpsv/ij/oecdjournals/1607310x/v1n4/s27/p1>. Accessed 12 February 2013.

Patandin, S., Lanting, C.I., Mulder, P.G., Boersma, E.R., Sauer,

P.J., Weisglas-Kuperus, N. (1999). Effects of environmental exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins on cognitive abilities in Dutch children at 42 months of age. *J. Pediatr.* **134**(1), 33-41.

Paudyal, A., Damrau, C., Patterson, V.L., Ermakov, A., Formstone, C.,

Lalanne, Z., Wells, S., Lu, X., Norris, D.P., Dean, C.H., Henderson, D.J., Murdoch, J.N. (2010). The novel mouse mutant, chuzhoi, has disruption of Ptk7 protein and exhibits defects in neural tube, heart and lung development and abnormal planar cell polarity in the ear. *BMC Dev. Biol.* **10**, 87.

Paxinos, G., Franklin, K. (2004) *The mouse brain in stereotaxic coordinates.*,

Amsterdam; Boston: Elsevier Academic Press. 1 v.

Petralia, R.S.,Wenthold, R.J. (1992). Light and electron immunocytochemical localization of AMPA-selective glutamate receptors in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* **318**(3), 329-354.

Petralia, R.S., Yokotani, N.,Wenthold, R.J. (1994). Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J. Neurosci.* **14**(2), 667-696.

Phillips, R.G.,LeDoux, J.E. (1992). Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. *Behav. Neurosci.* **106**(2), 274-285.

Poimenova, A., Markaki, E., Rahiotis, C.,Kitraki, E. (2010). Corticosterone-regulated actions in the rat brain are affected by perinatal exposure to low dose of bisphenol A. *Neuroscience* **167**(3), 741-749.



Pyapali, G.K., Sik, A., Penttonen, M., Buzsaki, G., Turner, D.A. (1998).

Dendritic properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons in the rat: intracellular staining in vivo and in vitro. *J. Comp. Neurol.* **391**(3), 335-352.

Qin, M., Entezam, A., Usdin, K., Huang, T., Liu, Z.H., Hoffman, G.E., Smith,

C.B. (2011). A mouse model of the fragile X premutation: effects on behavior, dendrite morphology, and regional rates of cerebral protein synthesis. *Neurobiol. Dis.* **42**(1), 85-98.

Radley, J.J., Rocher, A.B., Miller, M., Janssen, W.G., Liston, C., Hof, P.R.,

McEwen, B.S., Morrison, J.H. (2006). Repeated stress induces dendritic spine loss in the rat medial prefrontal cortex. *Cereb. Cortex* **16**(3), 313-320.

Raymond, G.V., Bauman, M.L., Kemper, T.L. (1996). Hippocampus in autism:

a Golgi analysis. *Acta Neuropathol.* **91**(1), 117-119.

Robinson, T.E., Kolb, B. (1997). Persistent structural modifications in nucleus accumbens and prefrontal cortex neurons produced by previous experience with amphetamine. *J. Neurosci.* **17**(21), 8491-8497.

Rogan, W.J., Gladen, B.C., Hung, K.L., Koong, S.L., Shih, L.Y., Taylor, J.S., Wu, Y.C., Yang, D., Ragan, N.B., Hsu, C.C. (1988). Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* **241**(4863), 334-336.

Rubin, B.S., Lenkowski, J.R., Schaeberle, C.M., Vandenberg, L.N., Ronsheim, P.M., Soto, A.M. (2006). Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* **147**(8), 3681-3691.

Sah, P., Faber, E.S., Lopez De Armentia, M., Power, J. (2003). The amygdaloid complex: anatomy and physiology. *Physiol. Rev.* **83**(3), 803-834.

Sekine, K., Kawauchi, T., Kubo, K., Honda, T., Herz, J., Hattori, M., Kinashi, T., Nakajima, K. (2012). Reelin controls neuronal positioning by promoting cell-matrix adhesion via inside-out activation of integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Neuron* **76**(2), 353-369.

Suzuki, K., Ishikawa, K., Sugiyama, K., Furuta, H., Nishimura, F. (2000). Content and release of bisphenol A from polycarbonate dental products. *Dent. Mater. J.* **19**(4), 389-395.

Tabata, H., Nakajima, K. (2001). Efficient in utero gene transfer system to the developing mouse brain using electroporation: visualization of neuronal migration in the developing cortex. *Neuroscience* **103**(4), 865-872.

Tabata, H., Nakajima, K. (2003). Multipolar migration: the third mode of radial neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **23**(31), 9996-10001.

Tian, Y.H., Baek, J.H., Lee, S.Y., Jang, C.G. (2010). Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice. *Synapse* **64**(6), 432-439.

Tsien, J.Z., Huerta, P.T., Tonegawa, S. (1996). The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory. *Cell* **87**(7), 1327-1338.

Turner, A.M., Greenough, W.T. (1985). Differential rearing effects on rat visual cortex synapses. I. Synaptic and neuronal density and synapses per neuron. *Brain Res.* **329**(1-2), 195-203.

Tyl, R.W., Myers, C.B., Marr, M.C., Thomas, B.F., Keimowitz, A.R., Brine, D.R., Veselica, M.M., Fail, P.A., Chang, T.Y., Seely, J.C., Joiner, R.L., Butala, J.H., Dimond, S.S., Cagen, S.Z., Shiotsuka, R.N., Stropp, G.D., Waechter, J.M. (2002). Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.*

68(1), 121-146.

Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A.T., Brunström, B., Cook, P.,  
Feeley, M., Giesy, J., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S.W.,  
Kubiak, T., Larsen, J.C., van Leeuwen, F.X., Liem, A.K., Nolt, C.,  
Peterson, R.E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D.,  
Tysklind, M., Younes, M., Waern, F., Zacharewski, T. (1998). Toxic  
equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and  
wildlife. *Environ. Health Perspect.* **106**(12), 775-792.

Van den Berg, M., De Jongh, J., Poiger, H., Olson, J.R. (1994). The  
toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins  
(PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity.  
*Crit. Rev. Toxicol.* **24**(1), 1-74.

Volkmar, F.R., Greenough, W.T. (1972). Rearing complexity affects branching  
of dendrites in the visual cortex of the rat. *Science* **176**(4042),  
1445-1447.

vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., Palanza, P., Thayer, K.A., Nagel, S.C., Parmigiani, S., Welshons, W.V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol. Ind. Health* **14**(1-2), 239-260.

Weisglas-Kuperus, N. (1998). Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices of perinatal human exposure to PCBs and dioxins. *Chemosphere* **37**(9-12), 1845-1853.

Widholm, J.J., Seo, B.W., Strupp, B.J., Seegal, R.F., Schantz, S.L. (2003). Effects of perinatal exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on spatial and visual reversal learning in rats. *Neurotoxicol. Teratol.* **25**(4), 459-471.

Xu, X., Hong, X., Xie, L., Li, T., Yang, Y., Zhang, Q., Zhang, G., Liu, X. (2012). Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety-

and depression-like behaviors in mice. *Horm. Behav.* **62**(4), 480-490.

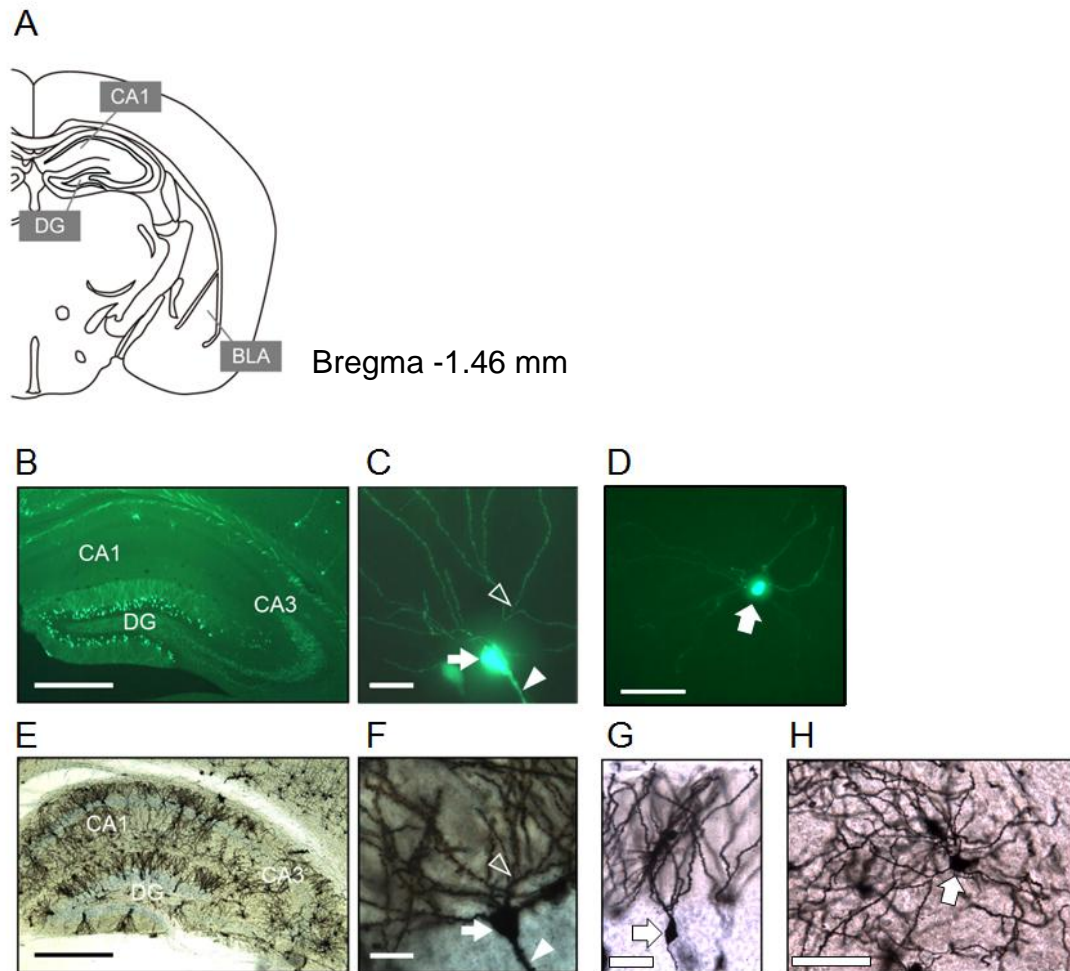
Yamashita, F., Hayashi, M. (1985). Fetal PCB syndrome: clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. *Environ. Health Perspect.* **59**, 41-45.

Yoshino, S., Yamaki, K., Li, X., Sai, T., Yanagisawa, R., Takano, H., Taneda, S., Hayashi, H., Mori, Y. (2004). Prenatal exposure to bisphenol A up-regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses, in mice. *Immunology* **112**(3), 489-495.

**Table 1. 定量 RT-PCR に使用したプライマー塩基配列**

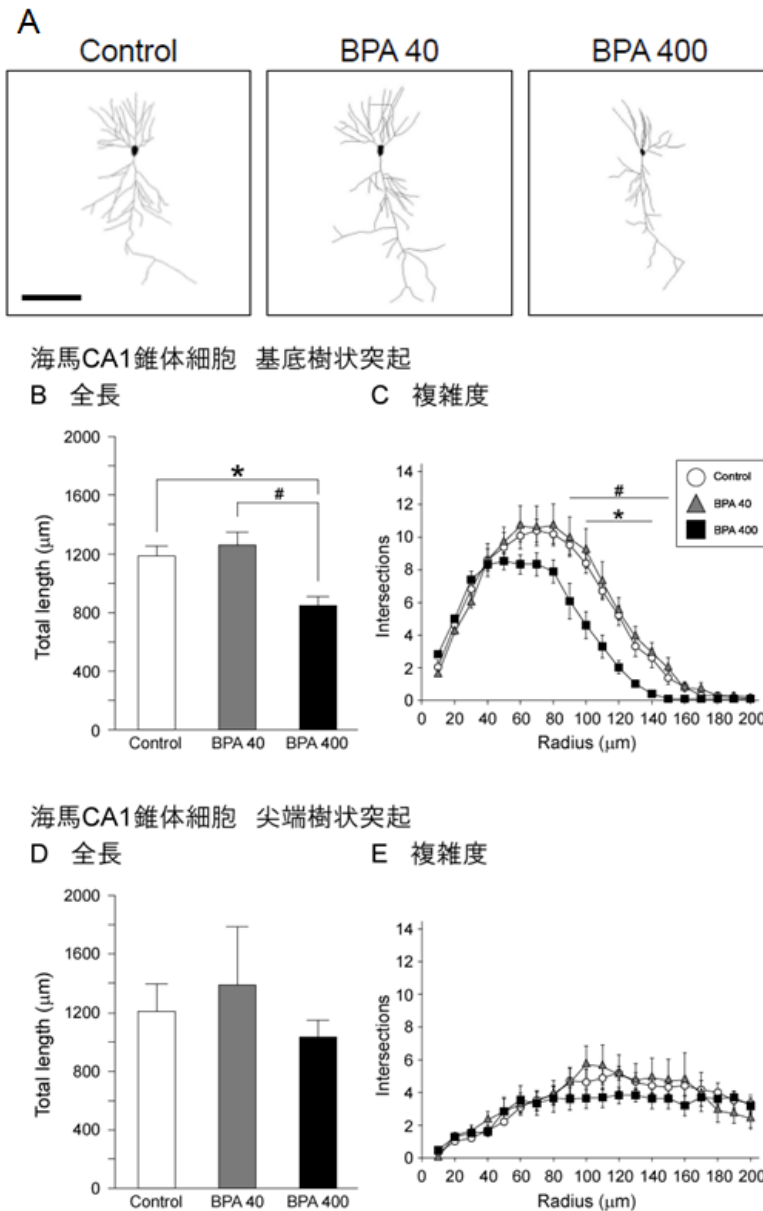
遺伝子名		配列
<i>Map2</i>	Forward	5'-AGAAACAGCTAATCTGCCACC-3'
	Reverse	5'-CGAGGCTGTAAGTAAATCTTCC-3'
<i>Dlg4</i>	Forward	5'-AACAGAGGGGGAGATGGAGT-3'
	Reverse	5'-AAAGATGGATGGGTCGTCAC-3'
<i>Synaptophysin</i>	Forward	5'-CAGTGGGTCTTTGCCATCTT-3'
	Reverse	5'-GTACACTTGGTGCAGCCTGA-3'
<i>Grin1</i>	Forward	5'-CGGCTCTTGGAAGATACAGC-3'
	Reverse	5'-GTGAAGTGGTCGTTGGGAGT-3'
<i>Grin2a</i>	Forward	5'-CAGCAGGACTGGTCACAGAA-3'
	Reverse	5'-GAGAGGGCCTGCTAAGGTCT-3'
<i>Grin2b</i>	Forward	5'-GTGAGAGCTCCTTTGCCAAC-3'
	Reverse	5'-ATGAAAGGGTTTTGCGTGAC-3'
<i>Cyclophilin A</i>	Forward	5'-TCATCCTAAAGCATACAGGTCCT-3'
	Reverse	5'-TTTCACCTTCCCAAAGACCACA-3'





**Figure 1.** Thy1-GFP-M マウスの脳組織切片における GFP 発現ニューロンと野生型マウスのゴルジ染色した脳組織切片における染色ニューロンの画像。

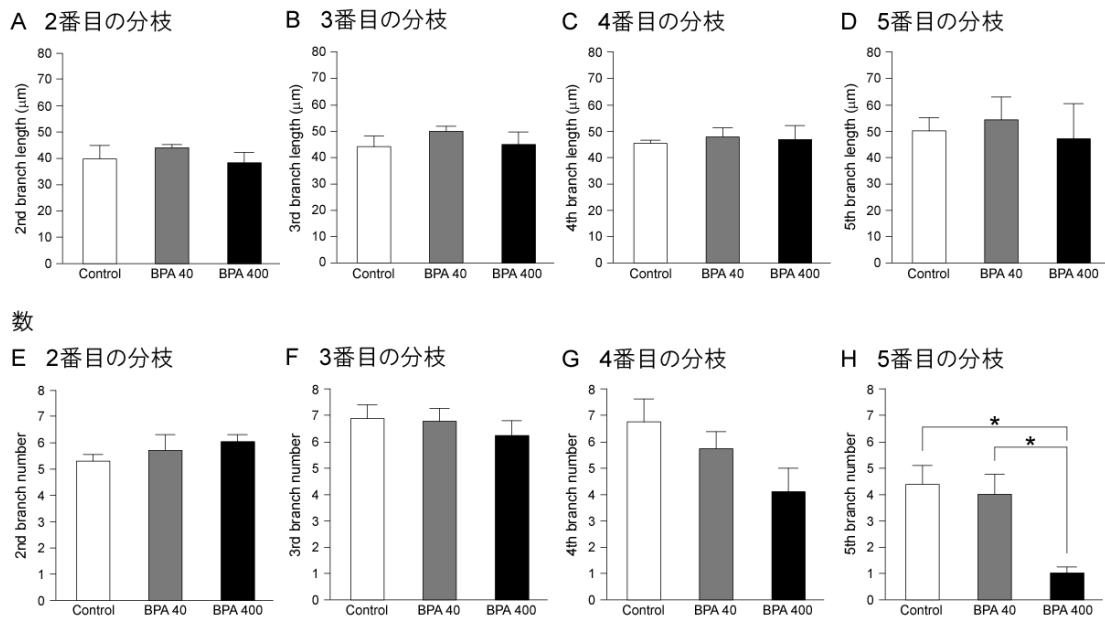
(A) マウス脳の冠状断面の模式図。本研究で解析対象の脳領域とした海馬 CA1 (CA1)、歯状回 (DG)、扁桃体外側基底核 (BLA) を示す。図は *The mouse brain in stereotaxic coordinates* を改変 (Paxinos and Franklin, 2004)。(B-D) Thy1-GFP-M マウスの脳組織切片における GFP 発現ニューロン。海馬 (B)、CA1 錐体細胞 (C)、扁桃体ニューロン (D)。(E-H) ゴルジ染色したマウス脳組織切片における染色ニューロンの画像。海馬 (E)、CA1 錐体細胞 (F)、歯状回顆粒細胞 (G)、扁桃体ニューロン (H)。矢印は細胞体 (C, D, F, G, H)、矢頭は先端樹状突起 (C, F)、白抜きの矢頭は基底樹状突起 (C, F)。スケール = 500  $\mu$ m (B, E), 20  $\mu$ m (C, F), 50  $\mu$ m (G), 100  $\mu$ m (D, H)。



**Figure 2.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 21 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起全長と伸長パターンの複雑度。

(A)Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。(B-E)基底樹状突起(B, C)と尖端樹状突起(D, E)の樹状突起における全長(B, D)と複雑度(C, E)を計測した。基底樹状突起にて BPA 400 群の全長および複雑度が対照群、BPA 40 群と比べて有意に減少していた(B, C)。一方、基底樹状突起では曝露による変化はみられなかった(D, E)。ANOVA および post hoc 試験により統計解析を行った(n = 5 mice, mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$  (Control vs BPA 400), #:  $p < 0.05$  (BPA 40 vs BPA 400) )。スケール = 100 μm (A)。

海馬CA1錐体細胞 基底樹状突起  
長さ

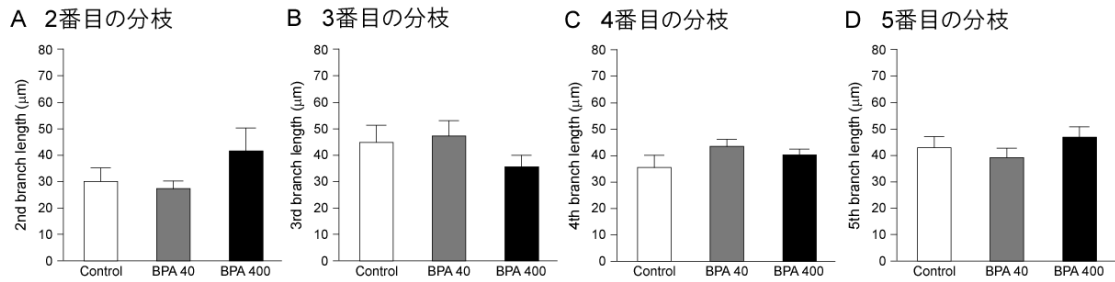


**Figure 3.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 21 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の基底樹状突起の分枝ごとの長さおよび数。

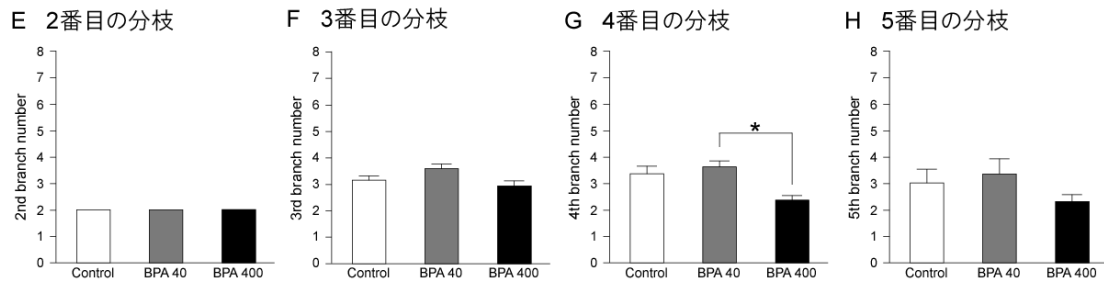
Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞がもつ基底樹状突起の解析。第 2-5 番目の分枝の長さ(A-D)と数(E-H)を計測した。BPA 400 群の第 5 分枝の数が対照群、BPA 40 群と比べて有意に減少していた(H)。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った(n = 5 mice, mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$ )。

海馬CA1錐体細胞 先端樹状突起

長さ

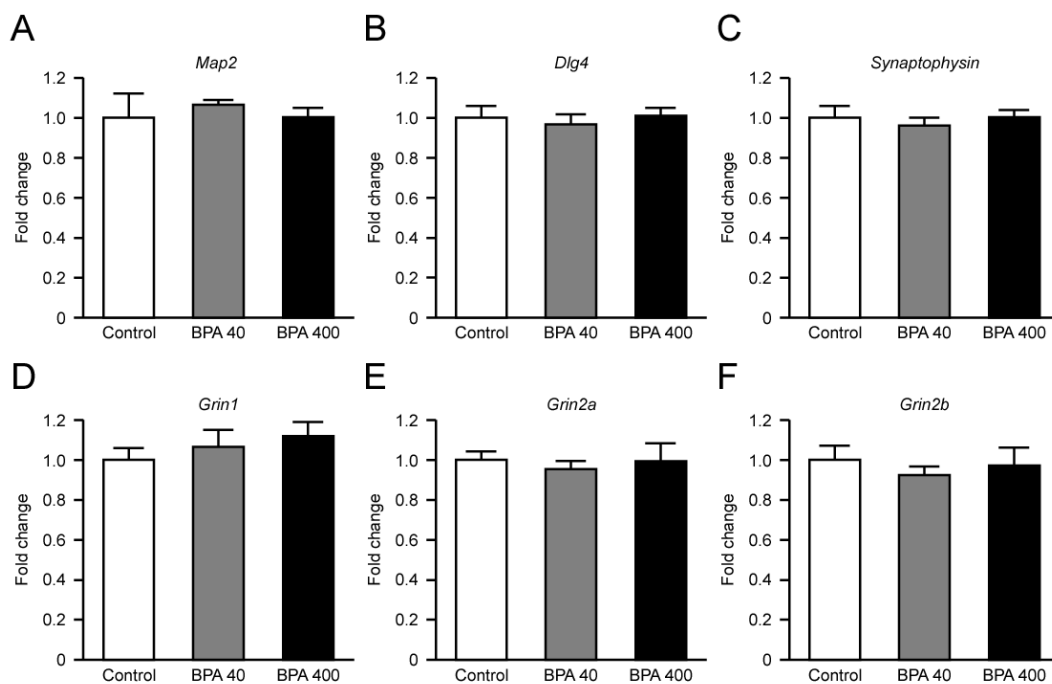


数



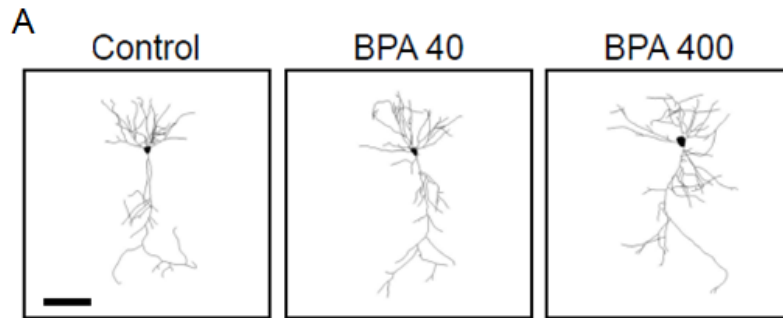
**Figure 4.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 21 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の先端樹状突起の分枝ごとの長さおよび数。

Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞がもつ先端樹状突起の解析。第 2-5 番目の分枝の長さ(A-D)と数(E-H)を計測した。BPA 400 群の第 4 分枝の数が BPA 40 群と比べて有意に減少していた。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った (n = 5 mice, mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$ )。



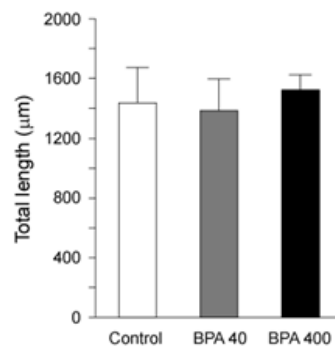
**Figure 5.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 21 日齢になった時点における海馬の遺伝子の発現解析。

Thy1-GFP-M マウスから海馬を採取して定量 RT-PCR により遺伝子の発現解析を行った。その結果、*Map2* (A), *Dlg4* (B), *Synaptophysin* (C), *Grin1* (D), *Grin2a* (E), *Grin2b* (F)のいずれの遺伝子も発現量に変化は認められなかった。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。

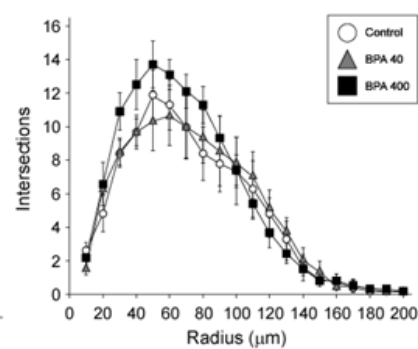


海馬CA1錐体細胞 基底樹状突起

B 全長

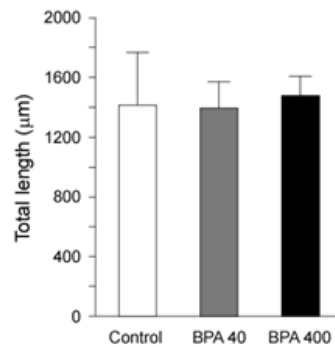


C 複雑度

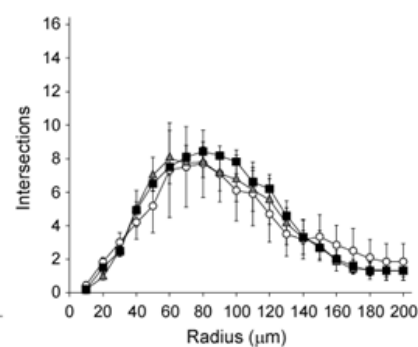


海馬CA1錐体細胞 先端樹状突起

D 全長

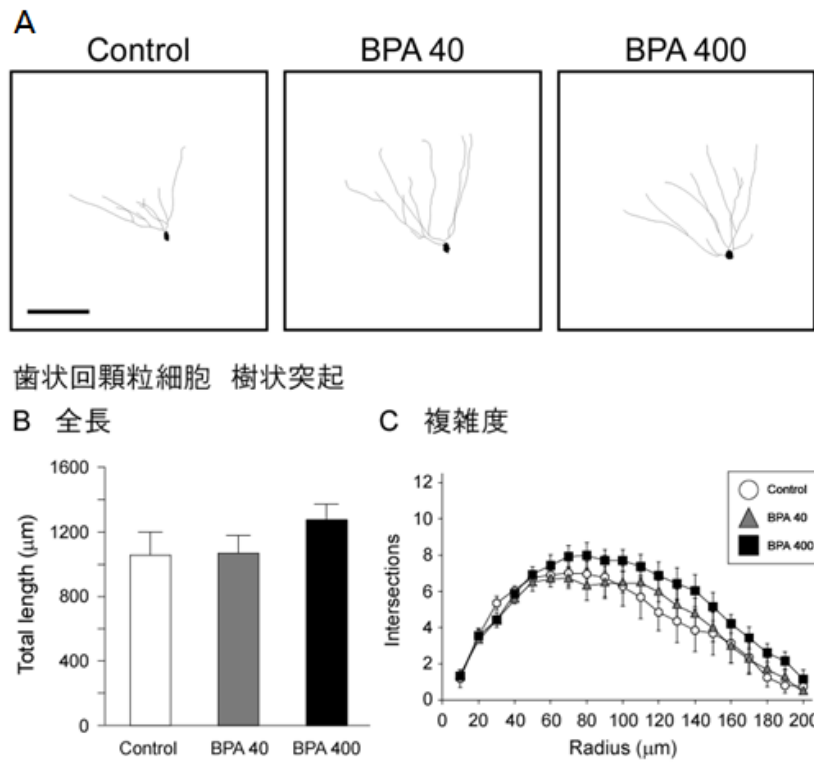


E 複雑度



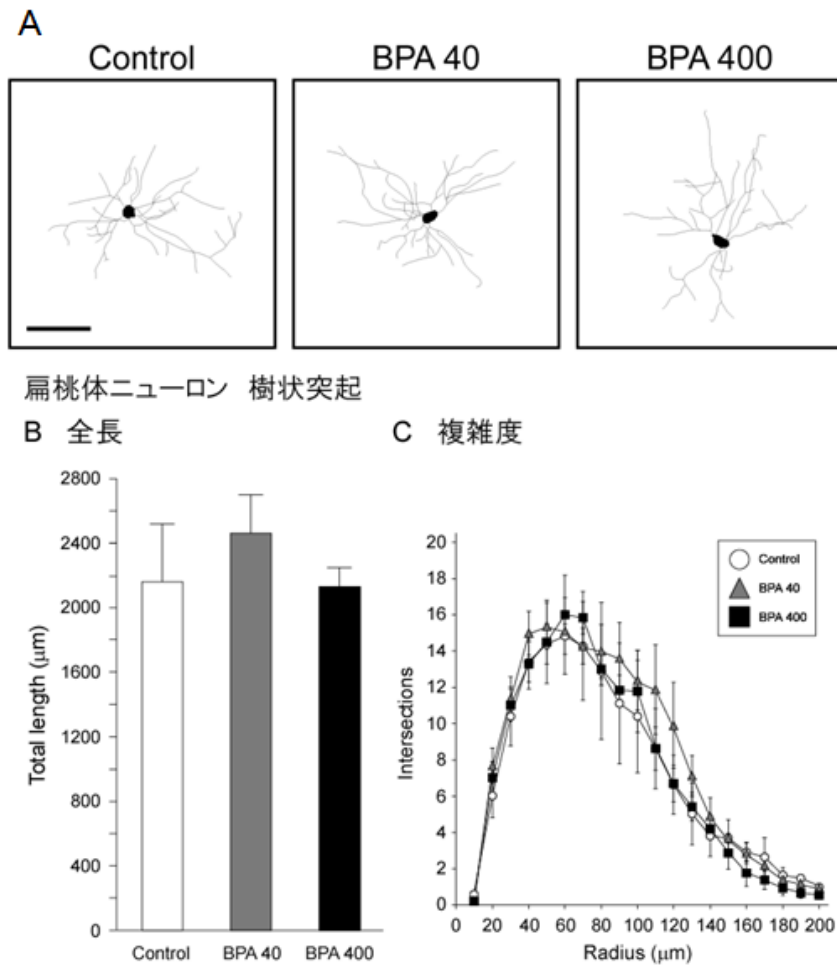
**Figure 6.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 14 ヶ月齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。

(A)海馬 CA1 におけるゴルジ染色した錐体細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。(B-E)基底樹状突起(B, C)と先端樹状突起(D, E)の樹状突起における全長(B, D)と複雑度(C, E)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。



**Figure 7.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 14 ヶ月齢になった時点における歯状回顆粒細胞の樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。

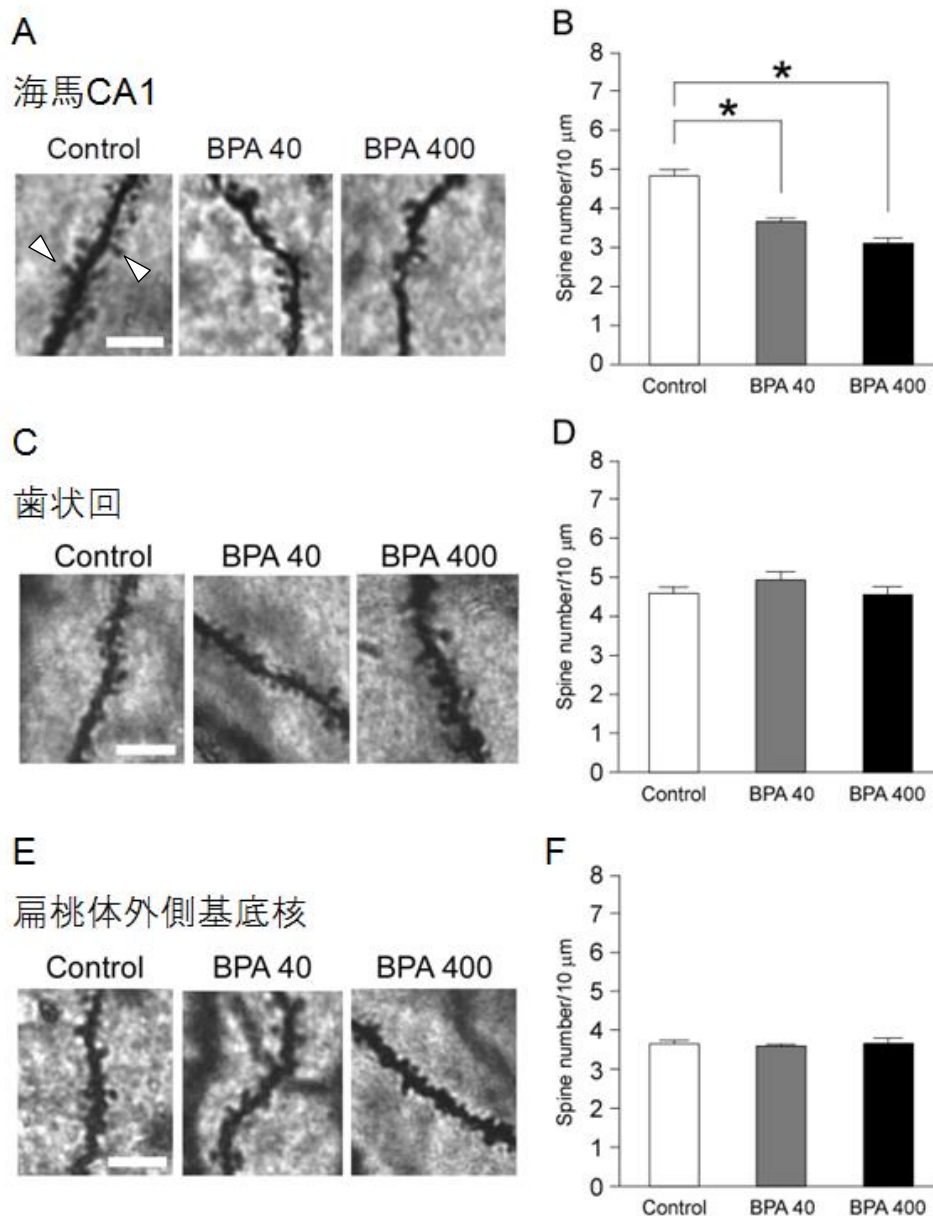
(A) 歯状回におけるゴルジ染色した顆粒細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。  
 (B, C) 樹状突起における全長(B)と複雑度(C)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。



**Figure 8.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 14 ヶ月齢になった時点における扁桃体ニューロンの樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。

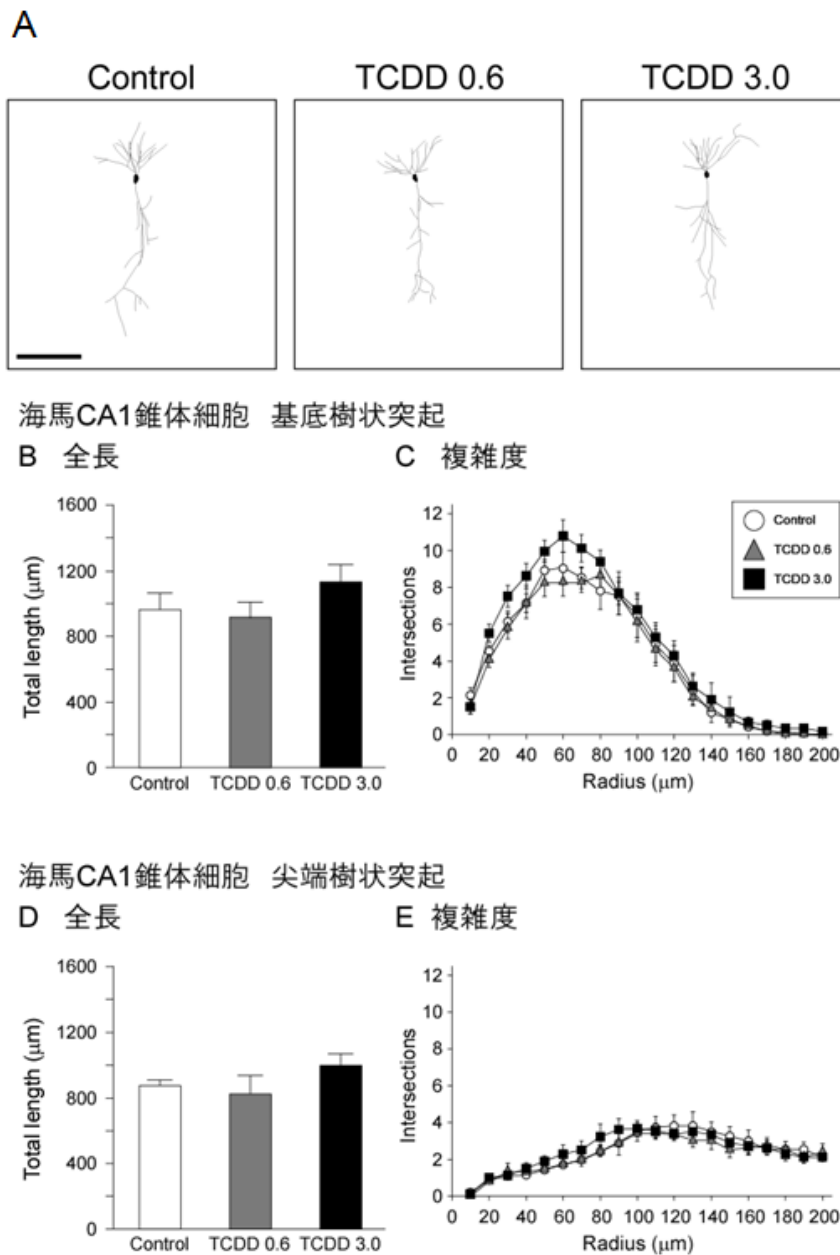
(A)扁桃体外側基底核におけるゴルジ染色したニューロンの樹状突起と細胞体のトレース例。(B, C)樹状突起における全長(B)と複雑度(C)を計測した。ANOVAにより統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。





**Figure 9.** 妊娠期 BPA 投与マウスの産仔が 14 ヶ月齢になった時点における脳の海馬 CA1 (A, B)、齒状回 (C, D)、扁桃体外側基底核 (E, F) におけるスパイン密度。

(A, C, E) ゴルジ染色した海馬 CA1(A)、齒状回(C)、扁桃体外側基底核(E)における樹状突起のスパイン画像。矢頭はスパインの例を示す。(B, D, F) CA1(B)、齒状回(D)、扁桃体外側基底核(F)におけるスパイン密度を樹状突起 10  $\mu\text{m}$  あたりのスパイン数で示した。海馬 CA1 では BPA 40 および 400 曝露群のスパイン密度が対照群と比べて有意に低下していた。一方、齒状回と扁桃体外側基底核では変化がみられなかった。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った ( $n = 4$  mice, mean  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0.05$ )。スケール = 10  $\mu\text{m}$  (A)。

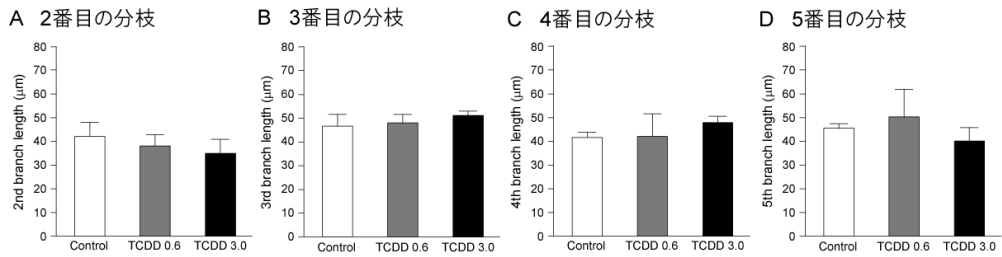


**Figure 10.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起全長と伸長パターンの複雑度。

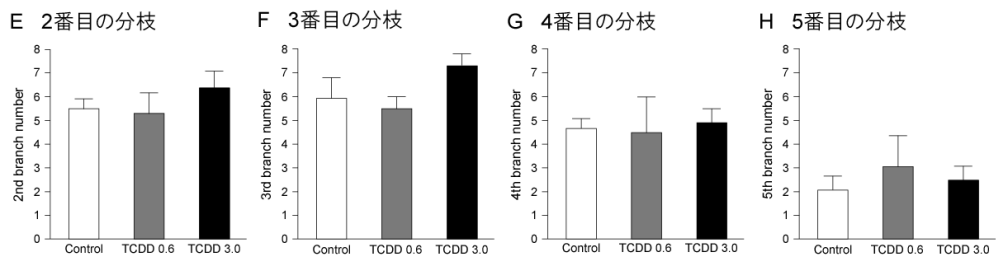
(A)Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。(B-E)基底樹状突起(B, C)と尖端樹状突起(D, E)の樹状突起における全長(B, D)と複雑度(C, E)を計測した。ANOVA により統計解析を行った(n = 5 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。

海馬CA1錐体細胞 基底樹状突起

長さ



数

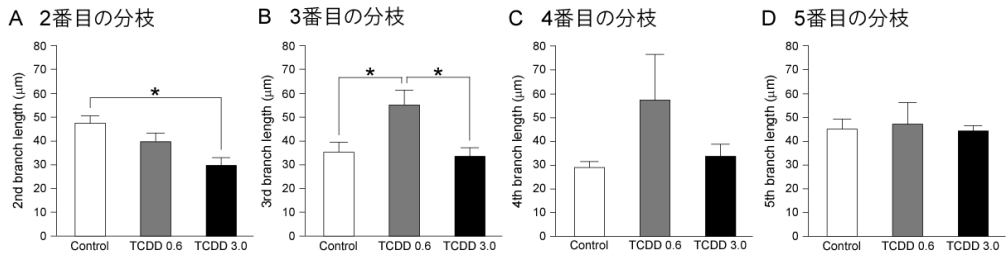


**Figure 11.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の基底樹状突起の分枝ごとの長さおよび数。

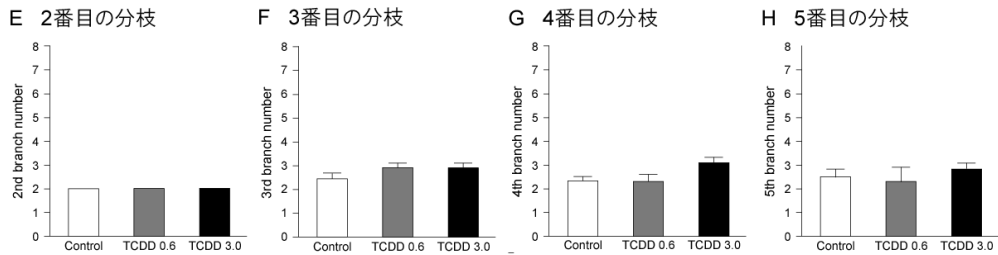
Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞がもつ基底樹状突起の解析。第 2-5 番目の分枝の長さ(A-D)と数(E-H)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 5 mice, mean ± SEM)。

海馬CA1錐体細胞 尖端樹状突起

長さ

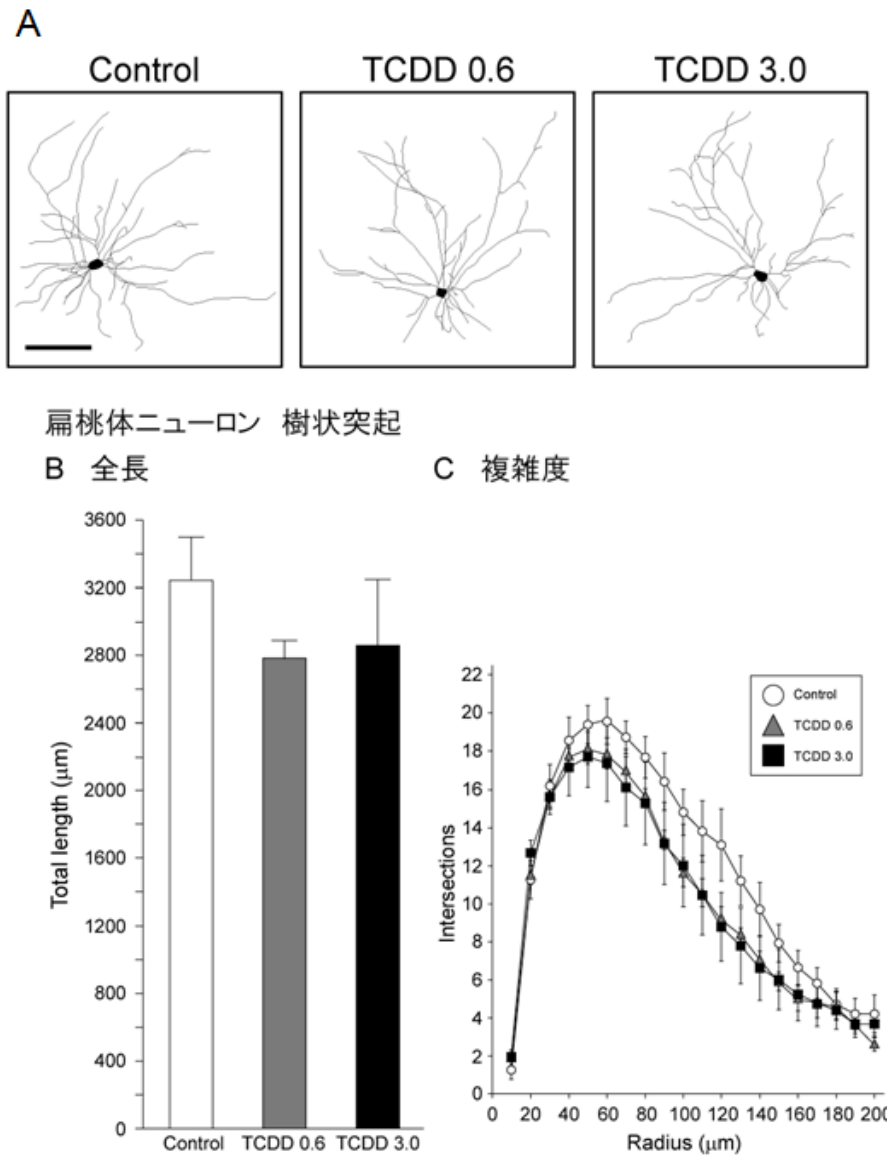


数



**Figure 12.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の尖端樹状突起の分枝ごとの長さおよび数。

Thy1-GFP-M マウスの海馬 CA1 における GFP 発現錐体細胞がもつ尖端樹状突起の解析。第 2-5 番目の分枝の長さ(A-D)と数(E-H)を計測した。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ていた(A)。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(B)。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った (n = 5 mice, mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$ )。

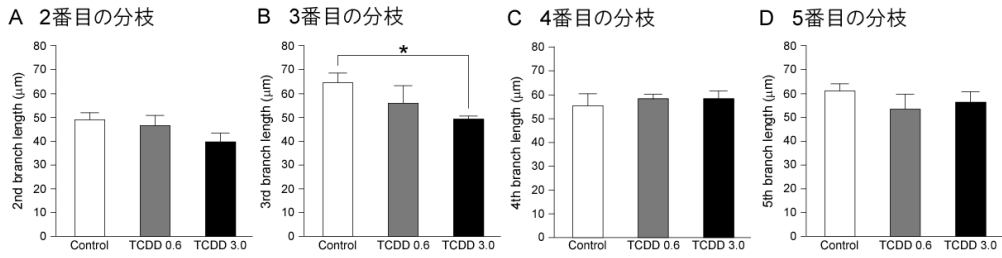


**Figure 13.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における扁桃体ニューロンの樹状突起全長と伸長パターンの複雑度。

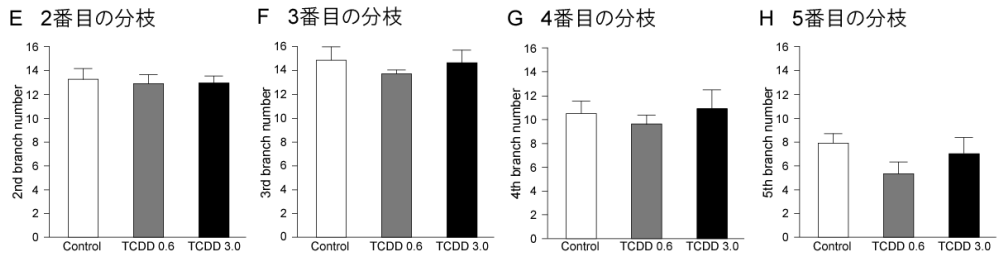
(A) Thy1-GFP-M マウスの扁桃体外側基底核における GFP 発現ニューロンの樹状突起と細胞体のトレース例。(B, C) 樹状突起における全長(B)と複雑度(C)を計測した。ANOVA により統計解析を行った(n = 5 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。

扁桃体ニューロン 樹状突起

長さ

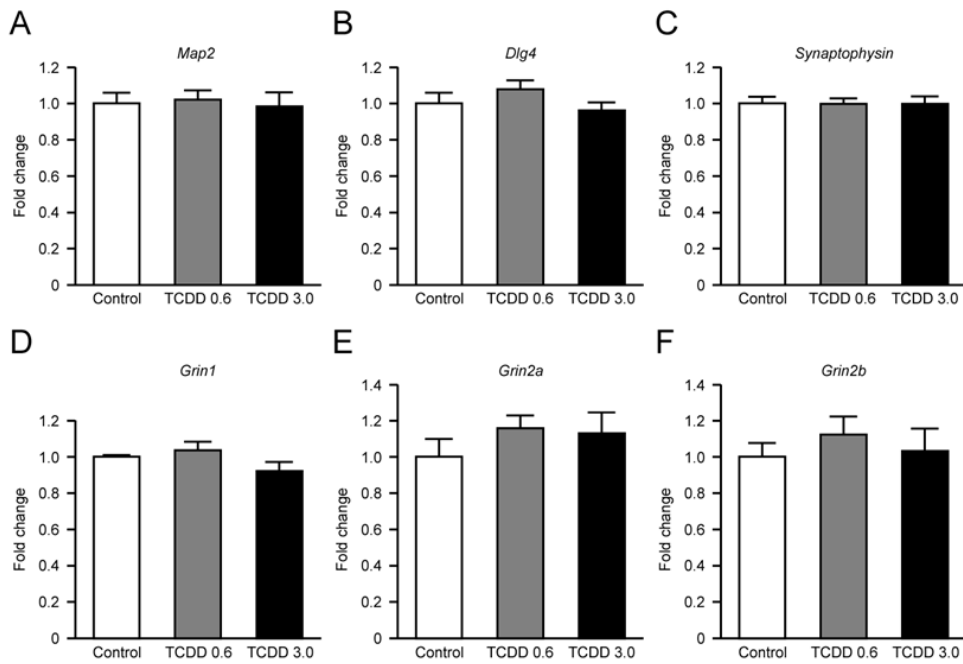


数



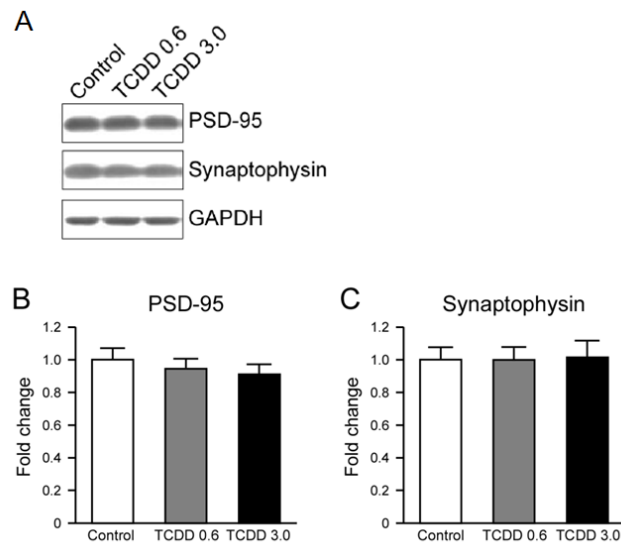
**Figure 14.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における扁桃体ニューロンの樹状突起の分枝ごとの長さおよび数。

Thy1-GFP-M マウスの扁桃体外側基底核における GFP 発現ニューロンがもつ樹状突起における 2-5 番目の分枝の長さ(A-D)と数(E-H)を計測した。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(B)。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った (n = 5 mice, mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$ )。



**Figure 15.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 14 日齢になった時点における海馬の遺伝子の発現解析。

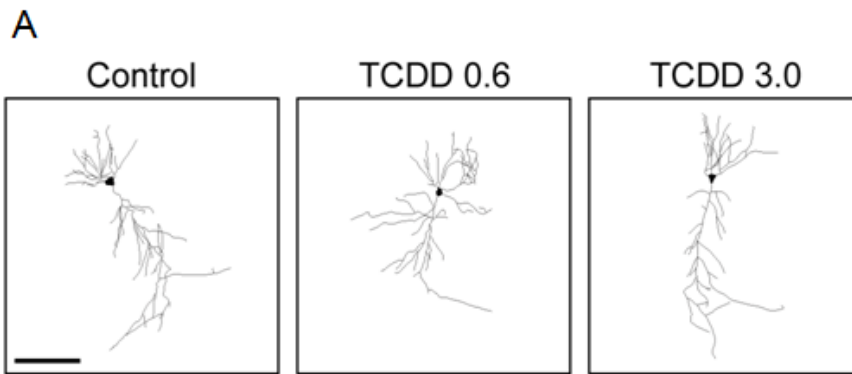
マウスから海馬を採取して定量 RT-PCR により遺伝子の発現解析を行った。その結果、*Map2* (A), *Dlg4* (B), *Synaptophysin* (C), *Grin1* (D), *Grin2a* (E), *Grin2b* (F)のいずれの遺伝子も発現量に変化は認められなかった。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。



**Figure 16.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 21 日齢になった時点における海馬のタンパク質の発現解析。

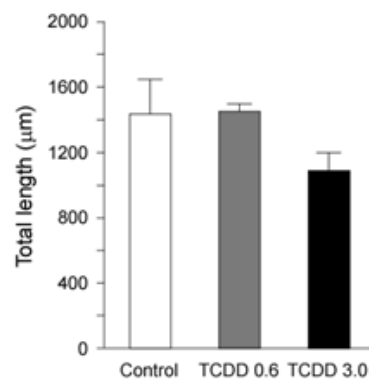
(A)ウエスタンブロットのバンド写真。マウスから海馬を採取してウエスタンブロットにより PSD-95 (C)および Synaptophysin (C)の発現解析を行った。補正は GAPDH で行った。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。



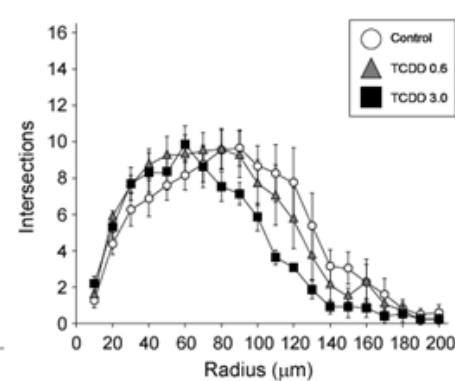


海馬CA1錐体細胞 基底樹状突起

**B** 全長

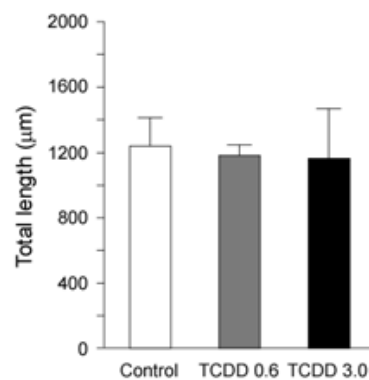


**C** 複雑度

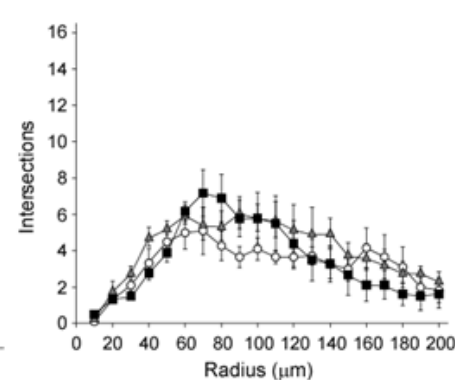


海馬CA1錐体細胞 先端樹状突起

**D** 全長

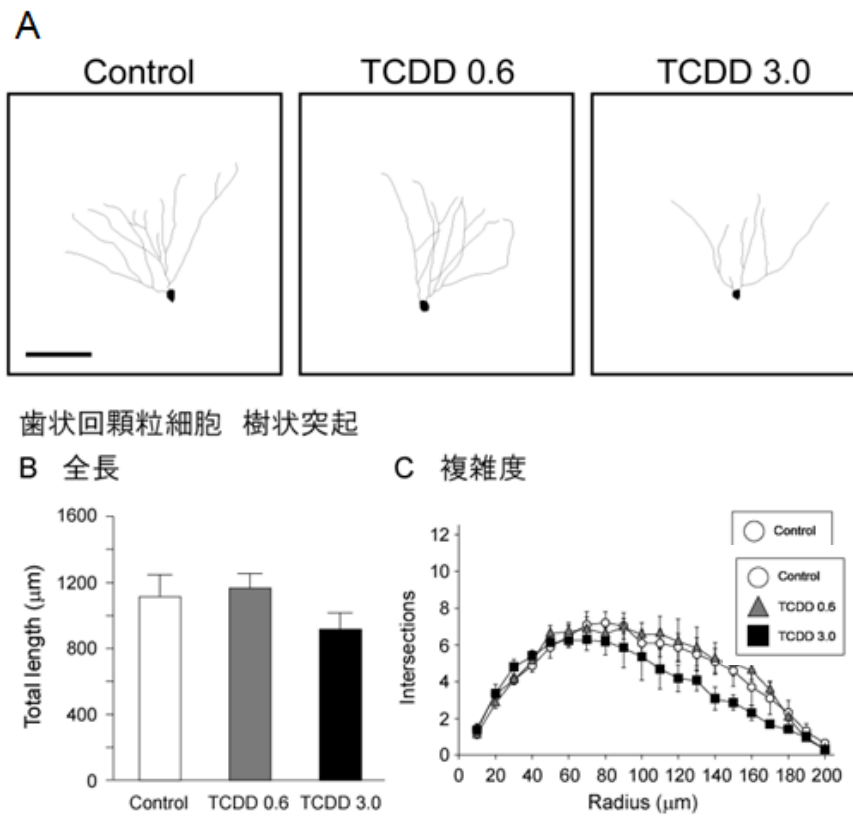


**E** 複雑度



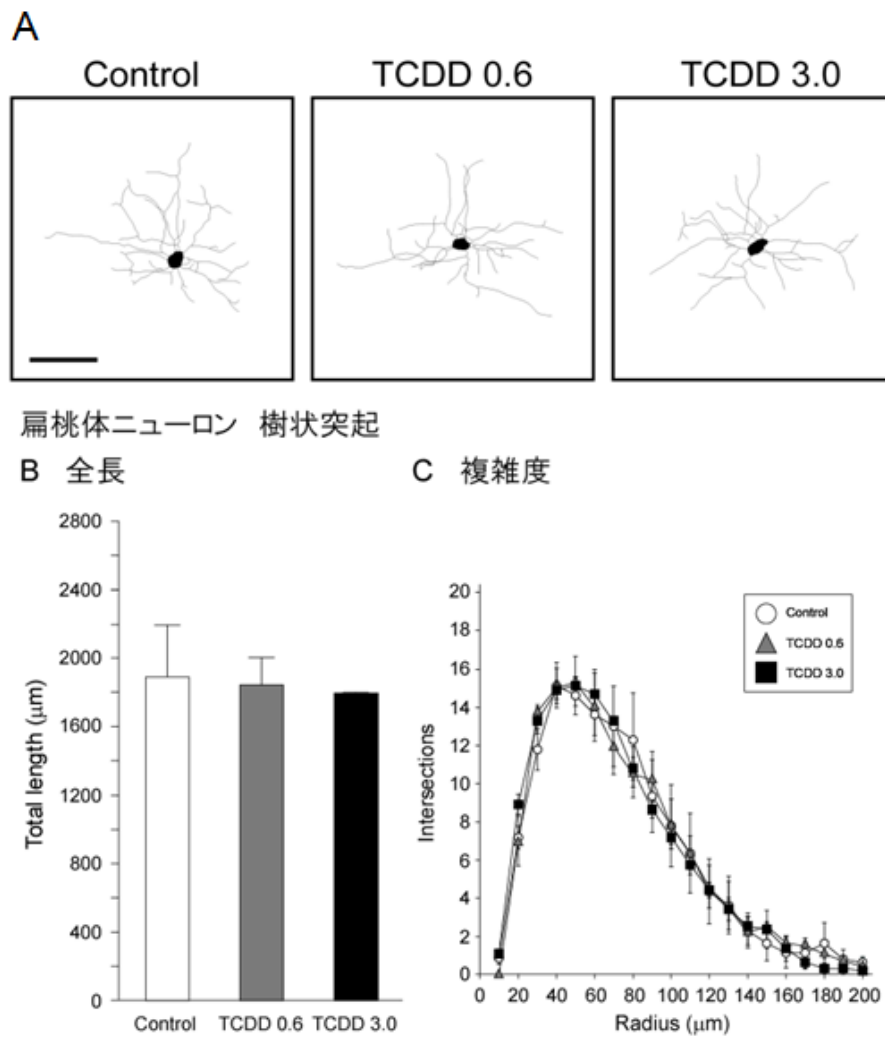
**Figure 17.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 16 ヶ月齢になった時点における海馬 CA1 錐体細胞の樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。

(A)海馬 CA1 におけるゴルジ染色した錐体細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。(B-E)基底樹状突起(B, C)と先端樹状突起(D, E)の樹状突起における全長(B, D)と複雑度(C, E)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。

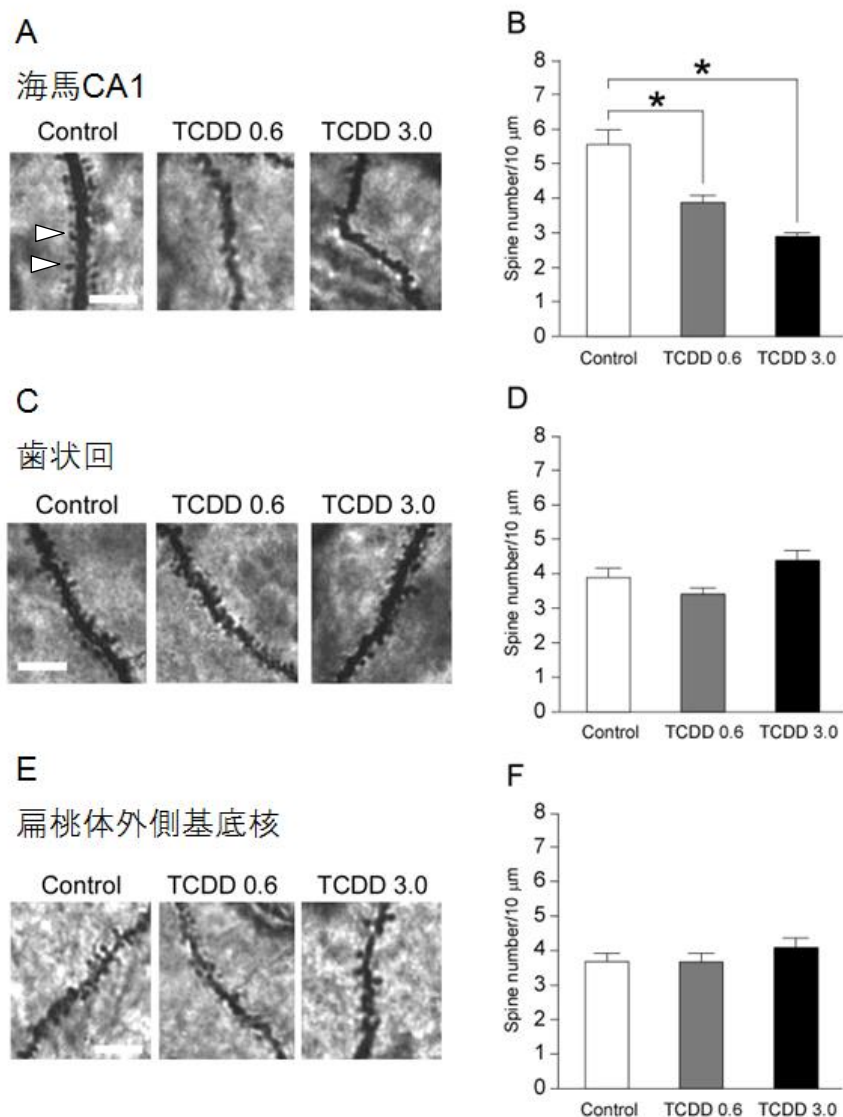


**Figure 18.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 16 ヶ月齢になった時点における歯状回顆粒細胞の樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。

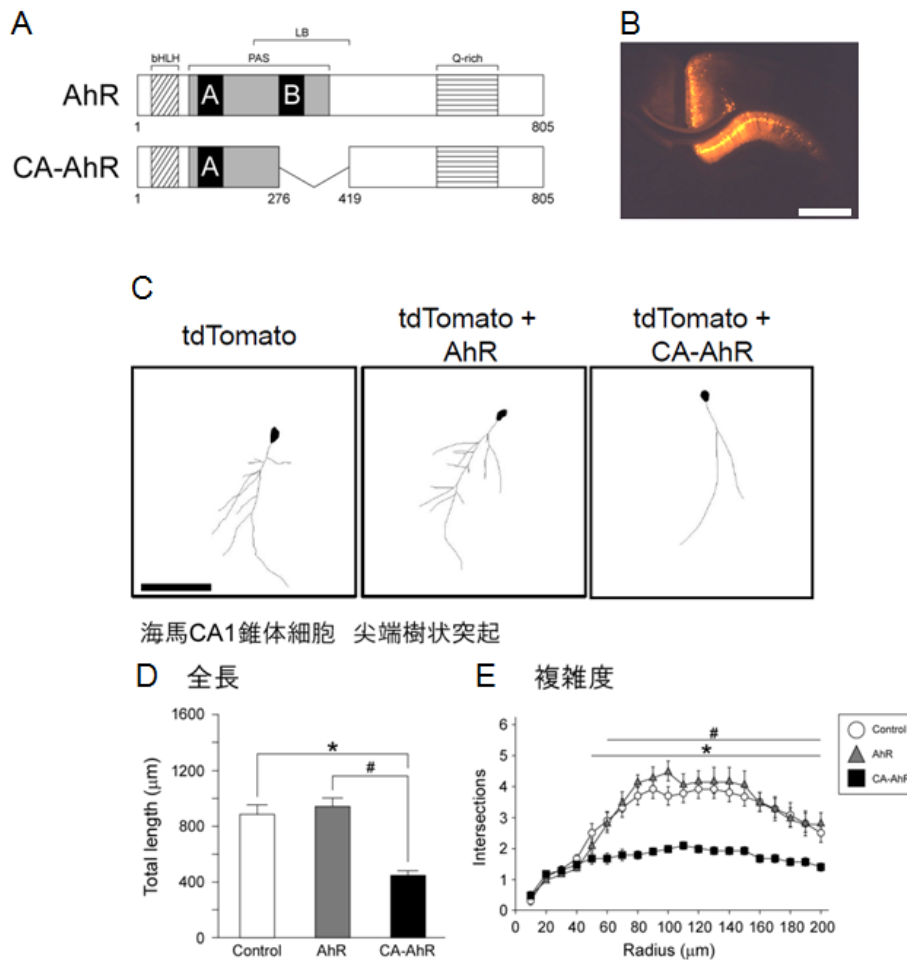
(A) 歯状回におけるゴルジ染色した顆粒細胞の樹状突起と細胞体のトレース例。  
 (B, C) 樹状突起における全長(B)と複雑度(C)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。



**Figure 19.** 周産期に TCDD 曝露を受けた仔マウスが 16 ヶ月齢になった時点における扁桃体ニューロンにおける樹状突起の全長と伸長パターンの複雑度。(A)扁桃体外側基底核におけるゴルジ染色したニューロンの樹状突起と細胞体のトレース例。(B, C)樹状突起における全長(B)と複雑度(C)を計測した。ANOVA により統計解析を行った (n = 4 mice, mean ± SEM)。スケール = 100 μm (A)。



**Figure 20.** 妊娠期 TCDD 投与マウスの産仔が 16 ヶ月齢になった時点における脳の海馬 CA1 (A, B)、齒状回 (C, D)、扁桃体 (E, F) におけるスパイン密度。(A, C, E) ゴルジ染色した海馬 CA1(A)、齒状回(C)、扁桃体外側基底核(E)における樹状突起のスパイン画像。矢頭はスパインの例を示す。(B, D, F) CA1(B)、齒状回(D)、扁桃体外側基底核(F)におけるスパイン密度を樹状突起 10  $\mu\text{m}$  あたりのスパイン数で示した。海馬 CA1 では BPA 40 および 400 曝露群のスパイン密度が対照群と比べて有意に低下していた。一方、齒状回と扁桃体外側基底核では変化がみられなかった。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った ( $n = 4$  mice, mean  $\pm$  SEM, \*:  $p < 0.05$ )。スケール = 10  $\mu\text{m}$  (A)。



**Figure 21. AhR 過剰発現または CA-AhR を発現した海馬 CA1 錐体細胞の尖端樹状突起の変化。**

(A) AhR および CA-AhR の構造と機能ドメイン。数字はアミノ酸の数を示す。PAS ドメイン内には PAS A と PAS B ドメインが存在する。AhR の 277-418 番目のアミノ酸を削ることで、リガンド非依存的に核へ移行して標的遺伝子の発現を誘導する CA-AhR となる。bHLH: 塩基性ヘリックス-ループ-ヘリクスドメイン、PAS: Per-Arnt-Sim 相同性ドメイン、LB: リガンド結合ドメイン、Q-rich: グルタミンリッチ領域。(B) 蛍光タンパク質 tdTomato を発現した CA1 錐体細胞の組織切片画像。(C) tdTomato を発現した CA1 錐体細胞の尖端樹状突起と細胞体のトレース例。(D, E) AhR の過剰発現または CA-AhR を発現した海馬 CA1 錐体細胞における尖端樹状突起の全長(D)と伸長パターンの複雑度(E)を計測した。ANOVA および *post hoc* 試験により統計解析を行った (Control, n = 36 cells from 4 mice; AhR, n = 30 cells from 3 mice; CA-AhR, n = 52 cells from 4 mice. mean ± SEM, \*:  $p < 0.05$  (Control vs CA-AhR), #:  $p < 0.05$  (AhR vs CA-AhR) )。スケール = 1 mm (B), 100 μm (C)。