

研究ノート

胎生期・授乳期 3-メチルコランスレン暴露による
新生マウスの記憶・学習機能に関する研究

木 津 良 一

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
教授

後 藤 由 佳

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
特別任用助手

中 野 博 子

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
6年次生

眞 田 法 子

同志社女子大学
薬学部・医療薬学科
特別任用助教

1. 序文

ダイオキシンとは200種類以上の構造の異なる一群の化学物質の総称である。ダイオキシンは、800°C以下の温度でゴミを燃やすと不完全燃焼により発生し、またタバコ煙や自動車の排ガスに含まれている。このダイオキシンなどの環境物質による健康被害が明らかとなり、社会的な問題となり注目を浴びた。ダイオキシンは無色無臭の化合物で、非水溶性である一方、極性を持つ有機溶媒に溶け、人体に吸収されると、代謝を受けず脂肪組織に蓄積する。ダイオキシンの中でも特に毒性の強い、2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) はアрил炭化水素受容体 (AhR) を介して、脂肪組織重量の減少に伴う体重減少を特徴とする消耗性症候群 [Seefeld et al., 1984]、口蓋裂 [Birbaum et al., 1985] や水腎症 [Couture-Hawas et al., 1991] などの奇形を誘発するほか、内分泌攪乱作用 [Roman et al., 1995] を有する。これまでこれらに関する多くの研究が盛んに行

Learning and Memory in Mice Gestationally and Lactationally Exposed to 3-methylcholanthrene

われてきたが近年、胎生期・授乳期に TCDD 暴露を受けたラットにおいて記憶・学習機能の低下を引き起こす [Powers et al., 2005] ことが報告された。この原因の一つに、胎生期あるいは授乳期中に TCDD 暴露を受けたラットやマウスの脳内の大脳皮質 [Mitsuhashi et al., 2010] や小脳 [Collins et al., 2008] 領域の発達遅延が考えられている。一方、記憶・学習機能を支配する脳海馬は重要な領域であるが、海馬についての知見は未だ報告されていない。

記憶・学習機能に関与する受容体に N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が存在する。胎生期・授乳期中枢神経系においては、神経幹細胞が豊富に存在し、活発な増殖を繰り返し、その後神経細胞、アストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化する。脳の正常な発達には、胎生期・授乳期に神経幹細胞の活発な増殖・分化が維持される必要がある。しかしながら、TCDD がこれら細胞の増殖・分化に対する影響については未だ全く研究されていない。そこで本研究では、胎生期・授乳期における 3-methylcholanthrene (3MC) 暴露が新生マウスの記憶・学習機能、海馬の大きさ、海馬内の神経幹細胞の増殖能、神経細

胞および NMDA 受容体 (NR1) の発現量に及ぼす効果について検討した。なお、化学物質の安全管理に対する本学の施設上の問題から TCDD を用いることが不可能なため、代替化合物として、強力な AhR アゴニストである 3-methylcholanthrene (3MC) を用いた。

2. 方法

2-1. 動物飼育

実験動物の取り扱い、全て同志社女子大学動物実験指針に則り、同志社女子大学薬学部動物委員会規約に基づいて行った。C57BL/6J 妊娠マウスを自由摂食および摂食下、気温 $25 \pm 2\%$ および湿度 55% で、8時から20時までの明期および20時から翌朝8時までの暗期を持つ明暗サイクル下で飼育した。

2-2. 使用試薬・化合物

3MC は和光純薬 (大阪) から購入した。Protease cocktail および phosphatase inhibitor cocktail はナカライテスク (京都) から購入した。5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) およびウサギ抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体は SIGMA (St. Louis, Mo, SA) から購入した。ヘマトキシリンは MERCK (KGaA, Darmstadt, Germany) から購入した。ラット抗 BrdU 抗体は abcam (Cambridge, UK) から購入した。抗マウス nestin 抗体、抗 Microtubule-associated protein 2 (MAP2) 抗体およびビオチン化抗ラット抗体は Millipore (Billerica, MA, USA) から購入した。マウス抗 Alexa 488 抗体およびウサギ抗 Texas red 抗体は Invitrogen (Carlsbad, CA) から購入した。

2-3. 薬物投与

C57BL/6J 妊娠 11 日目、出産後 2、7、14 日目のマウス母体 (清水実験材料、静岡) に計 4 回、3MC (10、30、60 mg/kg) を corn oil で懸濁した後、体重 10 g あたり 0.1 mL の割合で腹腔内に投与した。また、記憶・学習試験 12 時間および 24 時間後に BrdU (50 mg/kg) を、

計 2 回腹腔内投与を行った。

2-4. 体重測定

仔マウスの体重を生後 2、5、8、11、14、17、20 日目に測定し、21 日目にオス、メスを区別し、違うケージに移し離乳させた。

2-5. 記憶・学習試験

生後 4 週目に新奇物質認知試験を行った。オブジェクトを設置していないゲージ (30 x 30 x 35 cm) に 3 日間 (10 分間/日) マウスを慣れさせ、翌日ゲージ内に同形の三角フラスコ (A、B) を 1 つずつ置き、それぞれの三角フラスコ A、B に対する接触時間を 10 分間測定した (training test)。Training test 終了後の 1 時間目に、三角フラスコ (B) を木のおもちゃ (C) に置換し、5 分間自由に探索させた (retention test, 1 h)。また、training test 終了後 24 時間目に三角フラスコ (B) をプラスチック製のおもちゃ (D) に置換し、5 分間自由に探索させた (retention test, 24 h)。マウスが B あるいは C、B あるいは D に対して接触した時間の割合を以下に示す数式により、視覚的認知記憶指数として数値化した。

視覚的認知記憶指数 (Ep) (%)

Training test; $Ep (\%) = tB / (tA + tB) \times 100$

Retention test (1 h); $Ep (\%)$

$= tC / (tA + tC) \times 100$

Retention test (24 h); $Ep (\%)$

$= tD / (tA + tD) \times 100$

2-6. 組織の固定と包埋

記憶・学習試験後 BrdU (50 mg/kg) を 12 時間毎に計 2 回腹腔内投与し、最終投与から 12 時間後にマウスを頸椎脱臼した。開腹開胸し、右心耳切開後に左心室に注射針を挿入した。マウス 1 匹あたり 100 mL の生理食塩水を灌流し脱血した後、4% paraformaldehyde (PFA) を灌流した。摘出した脳については、PFA で 4°C、一晩の後固定を行った。後固定後の標本を細切し、流水洗浄を 1 時間行った。脱脂処

理のためアセトンに室温で一晩浸した。60%、70%、80%、100% エタノールに順次浸し、キシレン液で透徹後にパラフィンを浸透させた。パラフィン包埋組織から海馬冠状切片を 3 μ m の厚さで薄切した。切片は、進展後に親水性シランコーティングスライドガラスに貼り付け 40°C で一晩乾燥させた。

2-7. ヘマトキシリン染色

標本切片をキシレンにより脱パラフィン処理したのち、キシレン、100%、90%、80%、70%、50% エタノールに順次浸して親水化させた。蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリン液に浸け、その後流水洗浄した。染色切片を 100% エタノールおよびキシレンでそれぞれ脱水および透徹したのち、ENTELLN new で封入した。

2-8. BrdU 染色

標本切片を PFA で固定した後、塩酸処理した。続いて、ホウ酸バッファー (pH 8.5) で中和後、過酸化水素水を含むメタノールで内在性ペルオキシダーゼに対する不活性化を行った。ヤギ正常血清でブロッキングを行い、一次抗体は抗 BrdU 抗体、二次抗体は抗ラット IgG 抗体を用い、avidin-biotinylated peroxidase complex kit を用いた。次に simple stain DAB solution を用いて発色させた。染色切片を蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。最後にエタノールで脱水およびキシレンによる透徹を行った後、ENTELLAN new を用いて封入した。

2-9. 海馬溶解液の調製

記憶・学習試験後のマウスの脳から海馬を摘出し、homogenizing buffer {10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM EDTA、1 mM EGTA、0.32 M sucrose、protease cocktail および phosphatase inhibitor cocktail} を加え、超音波破碎装置を用いてホモジナイズした。これを海馬溶解液とした。

2-10. ウェスタンブロット解析

全細胞溶解液に 6% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、0.18% 2-mercaptoethanol、0.3% glycerol および 0.02% bromophenol blue を含む 0.15 M Tris-HCl buffer (pH6.8) を加え、98°C で 5 分間加熱処理を行い、これをウェスタンブロット用サンプルとした。次いで、サンプルを 7.5% ポリアクリルアミドゲルで分離した後、PVDF 膜 (Millipore, Billerica, MA, USA) にブロットした。一抗体は抗 MAP2 抗体および抗 NR1 抗体、二次抗体は peroxidase で標識された抗マウス IgG 抗体あるいは抗ウサギ IgG 抗体を使用した。発光試薬は Chemi-Lumi One (ナカライテスク、京都) を用いて、Lumi Vision PRO 400EX により抗体陽性バンドを検出した。

2-11. データ解析

得られた結果は平均値 \pm 標準偏差で表示し、統計学的有意差は Student's-t-test で判定した。

3. 結果

3-1. 3MC 暴露後の新生マウスの体重への影響

TCDD 暴露により低体重が引き起こされることが報告されている [Seefeld et al., 1984]。本研究で用いた TCDD の代替化合物である 3MC も低体重を引き起こすか否かを調べた。胎生期および授乳期 3MC 投与により、生後 2 日目から 3 日おきに体重を測定した結果、いずれの日数においても 3MC 投与群は対照群と比較して体重増加率が有意に低下した (Figure 1)。したがって、胎生期および授乳期 3MC 暴露は、新生マウスの成長に影響を及ぼすことが明らかとなった。

3-2. 3MC 暴露後の新生マウスの記憶学習機能への影響

胎生期・授乳期 TCDD 暴露は出生後のラットの記憶・学習能を低下させることが既に報告されている [Powers et al., 2005]。本実験では、胎生期・授乳期に 3MC を暴露して、新生

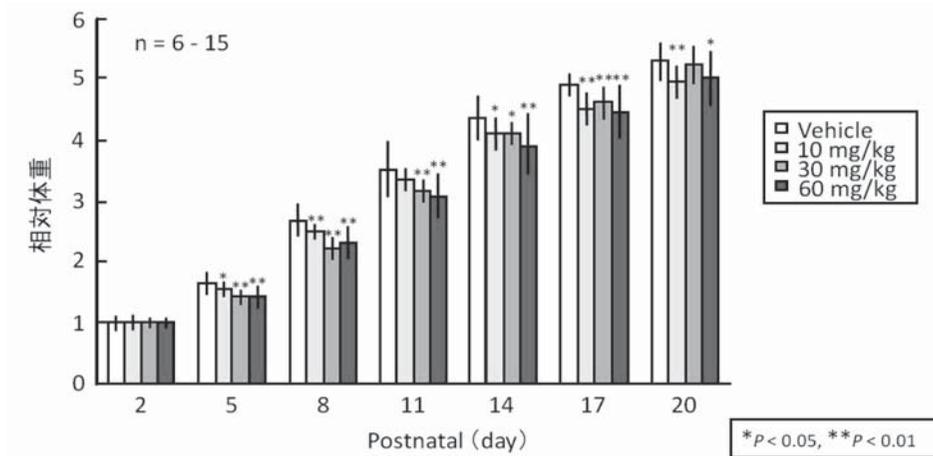


Figure 1. 胎生期・授乳期 3MC 暴露後の新生マウスの体重変化
Values are expressed mean \pm S.D.

マウスの記憶・学習機能について新奇物質認知試験を行った。その結果、いずれの 3MC 濃度においても記憶・学習能に影響はみられなかった。(Figure 2)。

3-3. 3MC 暴露後の新生マウスの海馬の大きさについて

胎生期 TCDD 暴露により、出生後のマウスの大脳皮質の発達遅延が観察され [Mitsuhashi et al., 2010]、また授乳期 TCDD 暴露により出生後のラット小脳の前発達遅延が報告された [Collins et al., 2008]。しかしながら、記憶・学習機能を司る海馬については未だ報告されていない。そこで、胎生期・授乳期 3MC 暴露後、

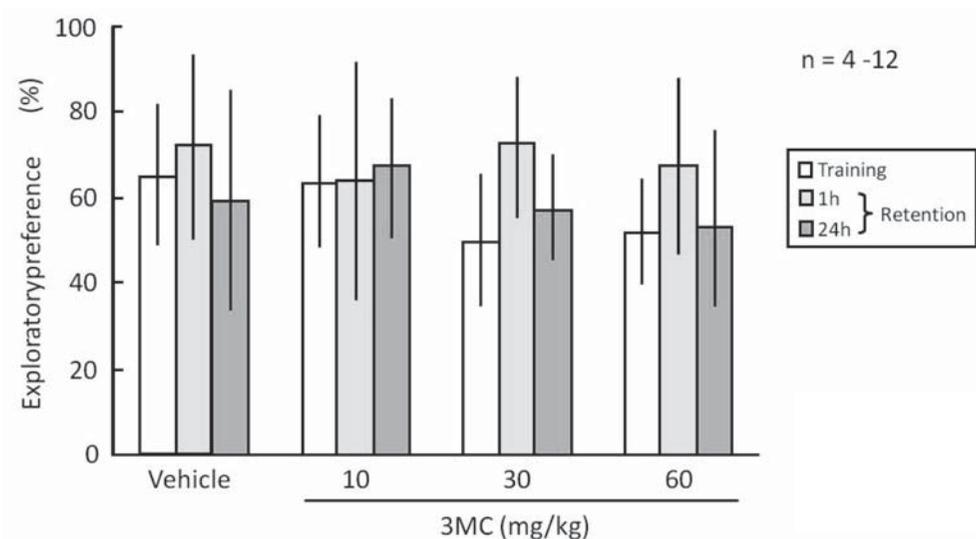


Figure 2. 胎生期・授乳期 3MC 暴露後の新生マウスの記憶・学習試験の影響
Values are expressed mean \pm S.D.

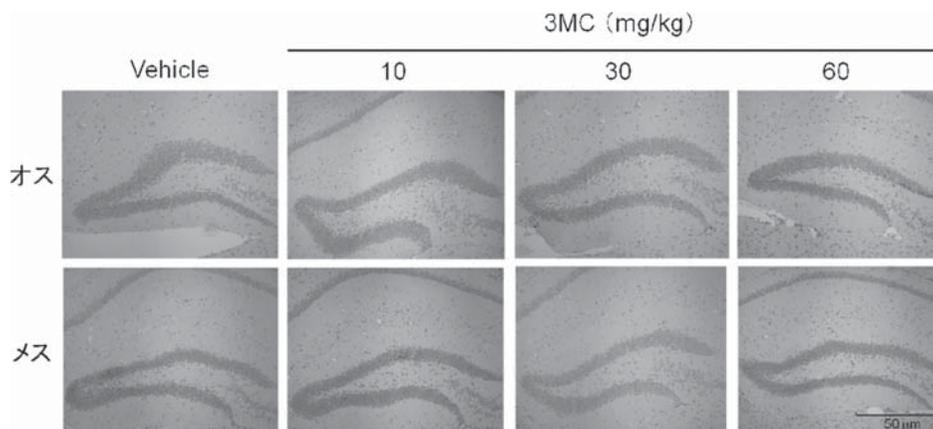


Figure 3. ヘマトキシリン染色
Scale bar = 50 μ m

生後4週目のマウス海馬の発達についてヘマトキシリン染色により海馬を顕微鏡下で観察を行った。その結果、いずれの3MC濃度においても海馬の大きさに変化はみられなかった。したがって、胎生期・授乳期3MC暴露は海馬の発達に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

3-4. 3MC 暴露後の新生マウスの海馬歯状回における BrdU 取り込みについて

海馬歯状回は神経幹細胞が活発に新生されている領域である。3MC 暴露により、海馬歯状回内の神経幹細胞の増殖能に影響を受けるか否かについて、BrdU 取り込みにより検討を行った。その結果、いずれの3MC濃度においても、BrdU の取り込みに変化はみられなかった。したがって、胎生期・授乳期3MC暴露による神経幹細胞の増殖能に影響はないと考えられた。

3-5. 3MC 暴露後の新生マウス海馬神経細胞および NR1 の発現量

神経幹細胞から分化した神経細胞は、MAP2 を高発現している。また記憶・学習機能に関与する NMDA 受容体の基本骨格である NR1 を発現している。したがって、3MC 暴露が新生マウスの神経細胞および NR1 の発現量に影響を及ぼすか否かについてウエスタンブロット法

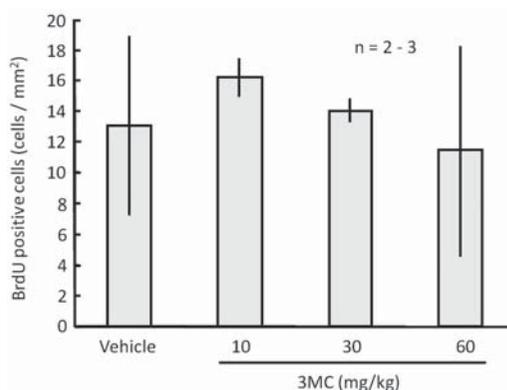


Figure 4. BrdU 取り込み

グラフは海馬歯状回 1 mm² 面積あたりの BrdU 陽性細胞数を示している。Values are expressed mean \pm S.D.

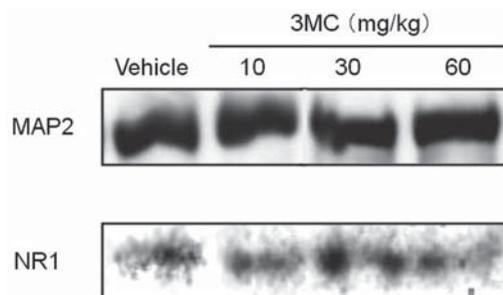


Figure 5. MAP2 および NR1 の発現量

により解析した。その結果、いずれの 3MC 濃度においても MAP2 および NR1 の発現量に影響はみられなかった。

4. 考察

ダイオキシンは環境に至るところに存在しており、我々は常に暴露されている。本研究において、胎生期・授乳期 3MC 暴露後の新生マウスの相対体重が低下していたことから、出生後のマウスの成長に影響を及ぼすことが明らかとなった。一方、今回用いた記憶・学習試験の一つである新奇物質認知試験は、動物の新奇性を好むという特性を利用した物体および位置認識の視覚的認知試験である。したがって、今回行った認知試験については影響がないということが明らかとなった。また、3MC 暴露後の海馬の発達、神経幹細胞の増殖能や神経細胞の NR1 の発現に影響はみられなかった。

今回用いた 3MC は難溶性物質であり、懸濁液の状態で腹腔内に投与した。3MC を用いた *in vivo* 実験の報告によると、胎生期および授乳期暴露後、3MC が胎盤、乳汁を通じて仔に移行することが明らかにされた [Shay H et al., 1950]。しかしながら、3MC が脳内まで到達しているかは不明である。今後は、3MC が脳内に到達しているかを解析するために、3MC 投与後の海馬内の 3MC 濃度を測定すると共に、投与経路の検討を行う予定である。

5. 謝辞

本研究の一部は、2011 年度同志社女子大学研究助成金（個人研究）により行われた。

6. 参考文献

- Birnbaum LS, Weber H, Harris MW, Lamb JC 4th and McKinney JD. (1985) *Toxicol Appl Pharmacol.* 77 (2), 292-302
- Collins LL, Williamson M.A., Thompson B D, Dever D P, Gasiewicz T.A and Opanashuk L A. (2008) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure disrupts granule neuron precursor maturation in the developin mouse cerebellum. *Toxicol. Sci.* 103 (1), 125-136.
- Couture-Hawas L, Harris MW, Lockhart AC and Birnbaum LS. (1991) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107 (3), 402-412
- Mitsuhashi T, Yonemoto J, Sone H, Kosuge Y, Kosaki K and Takahashi T. (2010) In utero exposure to dioxin causes neocortical dysgenesis through the actions of p27Kip1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (37), 16331-16335.
- Powers BE, Lin TM, Vanka A, Peterson RE, Juraska JM and Schantz SL. (2005) Tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure alters radial maze performance and hippocampal morphology in female AhR mice. *Genes Brain. Behav.* 4 (1), 51-59
- Pratt RM, Dencker L and Diewert VM, *Teratog Carcinog Mutagen.* (1984) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced cleft palate in the mouse; evidence for alterations in palatal shelf fusion. *Teratog Carcinog Mutagen.* 4 (5), 427-436
- Roman BL, Sommer RJ, Shinomiva K and Peterson RE (1995) In utero and lactational exposure of the male rat to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: impaired prostate growth and development without inhibited androgen production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 134 (2), 241-250
- Seefeld MD, Corbett SW, Keesey RE, Peterson RE. (1984) Characterization of the wasting syndrome in rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 73 (2), 311-22
- Shay H, Friedmann M, Gruestein S and Weinhouse S. (1950) Mammary excretion of 20-methylcholanthrene. *Cancer Res.* 10 (12), 797-800