

機関番号：1260

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310034

研究課題名（和文）霊長類を用いた内分泌攪乱化学物質の神経発達への影響メカニズムの解析  
研究課題名（英文）Analysis for the mechanisms affecting neural of development by  
endocrine disrupting chemicals using non-human primates

研究代表者

吉川泰弘（YOSHIKAWA YASUHIRO）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：80109975

研究成果の概要（和文）：内分泌攪乱化学物質のヒトへのリスクの評価を行うにあたり種差を考慮し、ヒトと近縁な霊長類を用いた。これまでの研究成果からエストロゲン様作用物質であるビスフェノールA、及び甲状腺ホルモンを阻害する作用を有する PCB 等の代替としてメチマゾールを使用した。ビスフェノールA 投与群に関しては脳の性的二型核における雌雄差の有無をプロテオーム解析した。曝露群のオスの雌化、曝露群メスの中性化傾向が見られた。コントロール群で有意差の見られたペプチドスポットを対象に、曝露群の雌雄差について検討を進め、候補蛋白群を広めて免疫組織染色により有意差を検索したが、形態学的には差を見つけるのは困難であった。ホルモン受容体を含めた定量的な解析が必要と思われた。メチマゾール投与実験では、甲状腺ホルモン低下が胎児サル類の脳発達に深刻な影響を与えることが判ったので、メカニズムを解明する実験を進めた。妊娠時期の異なるステージ（妊娠前期、中期、後期、終末期）でのメチマゾール曝露個体から得られた胎児の脳を詳細に解析した。終末期（妊娠 130 日から末期 150 日までの投与）の影響が最も強かった。この結果に基づき再現性を得るためさらに 4 個体を追加し実験を進めた。またウエスタンブロットによる候補蛋白群の発現量の変化を定量的に解析した。曝露群の甲状腺肥大は明瞭な再現性が見られた、しかし、神経発達、蛋白発現には個体差が強く、曝露群での発達遅延の傾向は見られたが有意差は見られなかった。個体別の甲状腺ホルモン濃度と神経発達の相関を見たが、明確な関係は明らかにできなかった。影響の強く出る小脳プルキンエ細胞、大脳皮質椎体細胞などを標的とし、個体別の定量的な解析が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Consideration of species differences in conducting risk assessments of endocrine disrupting chemicals to humans, closely related non-human primates were used in experiments. Bisphenol A was used as an estrogenic agents from the results of previous studies, and methimazole was conducted as an alternative of the PCB or TCDD which have the effect of inhibiting thyroid hormones. Bisphenol A treated groups consisting of male and female offspring were done in proteome analysis for sexually dimorphic nucleus of the brain. Exposure group of male exhibited female patterns, and exposed females tended to show neutral patterns. Peptide spots showing significant differences from the control group were targeted, and sex differences in the exposed group were studied. Several proteins covering the targeted spots were examined by immunohistochemical methods in both exposure and control groups for sex differences, however, to find the difference between the control sex difference or exposure effects were difficult morphologically. The quantitative analysis should be carried, including hormone receptors in the future. Methimazole administration

experiments were found to affect severely both fetal thyroid hormone production and brain development in non-human primates. The experiments to elucidate the mechanisms of methimazole were proceeded. During different stages of pregnancy (early pregnancy, mid, late, and end stages) mothers were administered methimazole and the offspring fetal brain obtained from individuals were analyzed precisely. Terminal phase (doses from the 130 to 150 days in gestation) treatments influenced the strongest effect. Thus, new experiment was proceeded to add four more individuals to obtain reproducible results based on this. Quantitative analysis of changes in the expression of candidate proteins by Western blot analysis. Thyroid enlargement and dysfunction were observed in the exposed group with a clear reproducibility, however, as for neuronal development, individual differences in protein expression level were strong. A tendency of retardation in large neural cell projections in the exposed group was observed but there was no significant difference. A correlation between thyroid hormone concentrations with enlarging thyroid glands and neural developmental retardations in individuals did not reveal a clear relationship. Purkinje cells in the cerebellar and pyramidal cells in the cerebral cortex showed a strong impact by exposure compared to other neural cells. An experiment targeted to these cells was considered necessary by quantitative analysis of individual in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

|      | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|------|------------|-----------|------------|
| 20年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 21年度 | 5,600,000  | 1,680,000 | 7,280,000  |
| 22年度 | 3,500,000  | 1,050,000 | 4,550,000  |
| 年度   |            |           |            |
| 年度   |            |           |            |
| 総計   | 14,100,000 | 4,230,000 | 18,330,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：霊長類、カニクイザル、胎児脳、ビスフェノール、免疫染色、プロテオーム、メチマゾール、甲状腺

## 1. 研究開始当初の背景

内分泌攪乱化学物質 (EDCs) のリスクに関しては、現在も科学的に意見が分かれている。下等動物の生殖系への影響に関しては一定の評価がなされているが、高等動物の神経系に対する影響評価に関する研究は極めて限られている。我々はこれまで基盤研究 (S) 等の研究費により、EDCs の高等動物における神経発達に対する影響の評価を行ってきた。主にラットを用いたビスフェノール A (BPA)、ノニルフェノールなどのエストロゲン様作用物質、及び神経発達に必須の甲状腺ホルモンを阻害するポリ塩化ビフェニール (PCB)、メチマゾール、アミオダロンなどである。主として神経行動学的評価を中心にリスク評価を行い、その結果を公表してきた (Negishi, T. et al., Behav Brain Res. 159: 323-31. 2005, Negishi T. et al., Environ Health Perspect. 112:1159-64 2004、Negishi T, et al., Neurosci Lett, 353:99-102, 2003)。齧歯類を用いた評価を行うとともにヒトに近縁なサル類も対象に研究を進めた。その結果、①齧歯類は神経回路が極めて未熟な状態で生まれるのに対し、霊長類の神経系は胎仔期に十分に発達すること、②BPA や甲状腺ホルモンの代謝が齧歯類とサル類では著しく異なること、③妊娠のステージにより、BPA の胎仔移行・中枢神経への暴露量が異なることが明らかになり、齧歯類のデータを単純に、ヒトを含む霊長類に外挿することは危険であることが示唆された (Tominaga T, et al., Toxicology. 22:208-17, 2006, Yoshikawa Y. Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi. 25:115-24. 2005, Negishi T, et al., Exp Anim. 53:391-394, 2004)。サル類を用いたリスク評価ではアカゲザルでダイオキシン投与により、新生児の社会行動に異常が見られること

(Negishi et al., Toxicol Lett. 160; 233-44, 2005、根岸隆之、川崎勝義、小山高正、黒田洋一郎、吉川泰弘: Brain Medical: 16, : 75-80, 2004)、BPA 投与では暴露された次世代オスのみがメスの行動を示す、いわゆる性同一性障害のような行動を示すこと (吉川泰弘: 分子精神医学 6, 370-376, 2006)、甲状腺ホルモンの阻害作用を示すメチマゾールでは著しい神経細胞の減少と分化の遅延が起こること、PCB の高濃度暴露個体から生まれた次世代では高次認知機能に低下傾向が見られること (吉川泰弘: 日本疾患モデル学会誌: 22, 54-63, 2006) などの結果を得た。

## 2. 研究の目的

本研究ではBPA暴露による次世代オスの性同一性障害に類似した行動異常の発生メカニズムを明らかにするのが第一の課題である。妊娠末期のオスの精巣は一過性に急速な発達を遂げ、テストステロンの分泌を行い発達するが、生後は性成熟に至るまで休止期に入ることとすでに明らかにしている (Liang et al., J. Med. Primatol. 30, 107-11, 2001)。母体のBPA暴露の影響がこの臨界期に特異的に起こるのか否か、直接、脳発達に影響するのか、受けた影響はどのような形で性的二型核にバイアスを与えるかを、免疫組織化学、プロテオーム解析などにより明らかにする。

第二の課題は、メチマゾール処理による脳発達障害の機序とその影響評価である。これまでの研究では霊長類は齧歯類と異なり、甲状腺ホルモンの半減期が長く、産生・分解速度も非常に遅いこと、脳発達が齧歯類と異なり胎仔期に充分進むことが明らかになった。そのため胎仔期の長期暴露はしばしば、異常な甲状腺肥大を起こし新生児に致命的な障害を

与える。本研究では、妊娠ステージを区切って（脳の臓器形成期：50日齢、組織発達期：80日齢、機能発達期120日齢：GD）、各ステージで暴露した場合の影響を形態学的に検索し、プロテオーム解析により、蛋白発現の特性を明らかにする。免疫組織化学やウェスタンブロット法も利用する。

### 3. 研究の方法

妊娠カニクイザルに BPA を投与、出産後、次世代のカニクイザルを実験対象とする。認知・行動試験を遂行した後に、安楽死した個体群の脳組織をホルマリン固定したもの（既存）を本研究の試料とする。BPA 曝露群のオスの脳が、メスの脳に近い状態にあるかどうかを検討するために、健常なカニクイザル個体の脳で、性的な変化が確認できるかどうかを、プロテオーム解析により検討する。

パラフィン切片よりターゲット部位を分取後、タンパク質を抽出(LT法)、LC-MS/MS を利用したショットガン法によるプロテオーム解析を行う。定量比較をすることにより、雌雄差のあるペプチドを検索する。これまで困難であった、ホルマリン固定サンプルを用いたプロテオーム解析の系は、既に確立してあるので、健常個体のデータ取得は可能である。データを溶出時間(s)と質量 (m/z) t とで二次元展開するイメージを作成することにより、他サンプルの比較定量を可能とする系を、既に確立済みである。メチマゾールを妊娠ステージの長期にわたって投与することに起因する甲状腺ホルモン阻害が、新生仔の中枢神経の発達障害を引き起こすことを確認している。本研究では、妊娠ステージを区切ってメチマゾールを曝露することにより、各ステージにおける中枢神経系発達障害の程度を検索する。メチマゾール投与

実験群のパラフィン切片を作成し、組織形態学的解析を行う。

また、異なる妊娠ステージ（50日齢から70日齢まで、70日齢から90日齢まで、90日齢から110日齢まで、110日齢から130日齢まで、130日齢から150日齢まで：各群2頭）でメチマゾールを投与し、投与後、帝王切開し胎仔を回収する。回収された胎仔の脳をホルマリンにより固定、パラフィン切片を作成し、胎仔の中枢神経系の発達程度に関して、組織学的解析を行う。これまでに得られている、正常胎仔脳の基礎的情報を基に、各ステージにおけるメチマゾール曝露群およびその対照群に対し、一般染色および免疫染色(表1)により、比較解析を行う。また、アポトーシスの検出には、TUNEL法を用いる。

### 4. 研究成果

H20年度：プロテオーム解析を用いて、健常カニクイザル個体の脳(視床下部)で、雌雄に性的な変化が確認できるかどうかを検討したところ、雌雄で差のあるペプチドを確認することができた。雌雄の比較ができる系が確立されたので、BPA投与実験群の視床下部のプロテオーム解析を行い、健常群で得られたデータと比較することで BPA 曝露による発現タンパク質の変化の有無、特に性差に関係しているか(雄の雌化など)について検討した。その結果、脳の性分化に関わるようなターゲットタンパク質候補として、N-ethylmaleimide sensitive factor(NSF)が得られた。このタンパク質について組織切片上で検索したが、明確な差はみられなかった。

メチマゾールの系では、5つの異なる妊娠ステージで短期間投与した胎仔脳の組織学的解析を行った。その結果、神経機能成熟期である E110 以降（小脳は E130 以降）におい

て、大脳皮質の神経細胞樹状突起、および小脳プルキンエ細胞樹状突起の未発達が認められたことから、胎仔期における甲状腺ホルモンの欠乏は組織発達より機能発達に影響することが示唆された。さらに、E150 のメチマゾール投与群および対照群の前頭葉大脳皮質と小脳皮質のプロテオーム解析を行い、メチマゾール曝露の影響を受けたタンパク質発現の特性を調べたところ、14-3-3 タンパク質が、投与群での発現量が対照群に比べて半分以下であった。E150 の大脳および小脳の切片で、14-3-3 抗体を用いた免疫染色を行ったが、差はみられなかった。

H21 年度：パラフィン包埋組織切片からの RNA 抽出し、ターゲットタンパク質候補の 1 つである、N-ethylmaleimide sensitive fusion protein について、免疫組織学的染色では対照群および BPA 投与群の雌雄で差がみられなかった。組織学的解析の代わりに視床下部のパラフィン包埋切片を用いて RT-PCR による mRNA の検出を行ったが、有意な差はなかった。妊娠ステージの異なるオス胎児の精巣発達を組織学的に検索した。

メチマゾール投与実験群では、新たにメチマゾール投与実験群のサンプルを調製した。甲状腺ホルモンによる影響を形態学的にみて、最も影響を受けたステージである胎齢 130 日から 150 日まで、毎日メチマゾールを母体に投与後、帝王切開し、胎仔を摘出した。対照群として同様の期間生理食塩水を投与した母体からの胎仔を用いた。胎仔脳の半球を組織学的解析用に、もう一方の半球を分子生物学的解析に用いた。メチマゾール投与は甲状腺肥大には明瞭な影響を与えたが、神経発達には個体差が大きく、有意な差は見られなかったので、新規に胎

児の追加実験を行い、個体数を増やし解析した。

H22 年度：ビスフェノール投与群に関しては脳の性的二型核における解析を進めた。曝露群のオスの雌化、暴露群メスの中性化傾向が見られた。コントロール群で有意差の見られたペプチドスポットを対象に、暴露群の雌雄差について検討を進め、候補蛋白群を広めて免疫組織染色により有意差を検索したが、形態学的には差を見つけるのは困難であった。今後、ホルモン受容体を含めた定量的な解析が必要と思われた。

メチマゾール投与実験では、妊娠時期の異なるステージ（妊娠前期、中期、後期、終末期）でのメチマゾール暴露個体から得られた胎児の脳を詳細に解析した。終末期（妊娠 130 日から末期 150 日までの投与）の影響が最も強かった。この結果に基づき再現性を得るためさらに 4 個体を追加し実験を進めた。またウェスタンブロットによる候補蛋白群の発現量の変化を定量的に解析した。暴露群の甲状腺肥大には明瞭な再現性が見られた、しかし、神経発達、蛋白発現には個体数を増やしても、個体差が依然として強く、暴露群での発達遅延の傾向は見られたが、統計的な有意差は見られなかった。個体別の甲状腺ホルモン濃度と神経発達の相関を見たが、明確な関係は明らかにできなかった。今後、影響の強く出る小脳プルキンエ細胞、大脳皮質椎体細胞などを標的とし、個体別の定量的な解析が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 9 件）

Kutsukake N, Ikeda K, Honma S, Teramoto M, Mori Y, Hayasaka I, Yamamoto R, Ishida T, Yoshika

wa Y, Hasegawa T. 「Validation of salivary cortisol and testosterone assays in chimpanzees by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.」 (American Journal of Primatology) 査読有、71巻、2009年、in press

吉川泰弘 「サルとヒトの脳」 (Brain Medical) 査読無、21巻、2009年

吉川泰弘 「サルから人への進化と脳；特集脳の進化・人間の由来」 (Brain Medical) 査読無、21巻、2009年、139-147、

Yasuhiro.Y 「International wildlife-disease notification system」 (Jpn.J.zoo.Wildl.Med) 査読有、14巻、2009年、7-18、

Nakagami, A., Negishi, T., Kawasaki, K., Imai, N., Nishida, Y., Ihara, T., Kuroda, Y., Yoshikawa, Y., Koyama, T. 「Alterations in male infant behaviors towards its mother by prenatal exposure to bisphenol A in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis) during early suckling period」 (Psychoneuroendocrinology) 査読有、34巻、2009年、1189-1197

Okamoto, H., Umeda, S., Nozawa, T., Suzuki, M., Yoshikawa, Y., Matsuura, E.,

Iwata, T. 「Comparative proteomic analysis of macular and peripheral retina of

cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)」 (Exp. Anim.) 査読有、59巻、2010年、171-182

吉川泰弘、太田周司、吉崎理華、門平睦代、「ズーノーシス統御へのアプローチ」 (JVM) 査読無、

Vol.64,(No.4)、2011年、75-282

吉川泰弘、「ニホンザルの流行性血小板減少症について」(LABIO21) 査読無、No.44、2011年、11-15

[学会発表] (計2件)

Yasuhiro Yoshikawa 「Recent non-human disease model in Japan」 (Korean Association of Laboratory Animal Science) 2009年8月27日, Korea Seoul

Yasuhiro Yoshikawa Zoonosis control measure in Japan」 (Korean Association of Laboratory Animal Science) 2009年8月27日, Korea Seoul

吉川泰弘 「人獣共通感染症の研究(越智賞受賞講

演)」(日本獣医学会) 2010年3月28日 日本獣医生命科学大学

[図書] (計2件)

吉川泰弘、「東京大学出版会」(新老年学：老化モデル(サル類)) 2010年、2142

吉川泰弘、「みみずく舎」(日本における伝染病との闘いの歴史：ヒトから動物へ動物からヒトへ) 2010年、176

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等：なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉川 泰弘 (YOSHIKAWA YASUHIRO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：80109975

### (2) 研究分担者

研究者番号：

### (3) 連携研究者

濱崎 裕子 (HAMASAKI YUKO)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科  
研究者番号：10422370