

東京都神経科学総合研究所  
客員研究員

黒田洋一郎

「内分泌かく乱物質の脳神経系機能発達への  
影響と毒性メカニズム」

研究期間：平成11年11月1日～平成16年10月31日

## 【全体のまとめ】

医学的には脳の微少な機能発達障害とされてきた学習障害（LD）、注意欠陥多動性障害（ADHD）、高機能自閉症児が、2003年文科省調査で全学童の6.3%にのぼるなど、ここ50—60年の間に米国や日本で、子どもたちの様々な行動の異常が増えつつあり、社会問題になっている。このような大きな人口全体に見られる数世代という短い期間での変化は、数千年以上かかる遺伝子変化とその拡がりでは説明できず、この間進んだ人工化学物質による環境・人体汚染から家庭・社会環境の変化まで、広い意味での環境が原因と考えられる。胎児性水俣病をはじめ、PCBが混入した食用油によるカネミ油症事件と同じ、台湾での事件では被害者の母親から生まれてきた子どもの知的能力（IQ）が低下したなど、周産期での母親の環境化学物質汚染により、次世代の子どもの脳・行動に異常がおこった例は多い。

内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）の基本毒性メカニズムは、いわゆる“ニセ・ホルモン”として、ホルモン受容体を介する遺伝子発現をかく乱し、発生・発達の過程に障害を与えることにある。ところが他の臓器に比し複雑な構造と機能を持つヒトの脳の発達には、数万といわれる遺伝子が、各種ホルモンを含む、数多くの生理化学物質によって精緻に調節されながら発現し、知能や行動を決定する神経回路ができていって行く。しかも、脳の機能発達のための遺伝子発現には、ホルモン受容体を介するものの他に、神経興奮に伴う（活動依存性の）遺伝子発現があり、これが外界から刺激に基づく刷り込み現象や、記憶・学習をはじめとする脳の高次機能の発達に重要である。

したがって、正常な機能を持つ脳を作り上げるための一連の遺伝子発現は、“ニセ・ホルモン”ばかりでなく、“チャンネル影響型化学物質”や“ニセ・神経伝達物質”など、より多様な化学物質によって、より微妙に攪乱されやすい。遺伝子は正常でも環境因子によって遺伝子発現がかく乱されれば、発達異常は当然起こるのである。しかも「胎児期や新生児期の脳の、どの部分の発達が、どの時期に、どのような毒性化学物質によって傷害されるか」によって、子どもや若者の知能・行動に、それぞれ異なった表現型を持つ、多様な異常を起こすことが予想された。

さらに重度の知的障害を伴うクレチン症だけでなく、母親が妊娠初期に甲状腺機能低下症だと生まれた子供にIQの低下が知られ、甲状腺ホルモンによって特定の脳機能発達関連遺伝子群の発現が調節されており、それが環境ホルモンによって攪乱されていることが考えられる。

本CREST研究で、遺伝子発現を指標にしたオリジナルDNAマイクロアレイなど、新しいトキシコジェノミック（ゲノム毒性学）の実験系が開発され、甲状腺ホルモン類似の“ニセ・ホルモン”型環境化学物質である、低濃度のPCBおよびその体内代謝物である水酸化PCBによる甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現の阻害が判明した。また神経活動依存性の遺伝子発現はDDTや殺虫剤ピレスロイド、DESなどの“チャンネル影響型化学物質”や遺伝子組み換え作物用除草剤であるグルホシネートのような“ニセ・神経伝達物質”でかく乱された。さらに3つの“チャンネル影響型化学物質”を同時にあたえると毒性は相加的で、複合汚染問題があることを実証した。

遺伝子・分子レベルばかりでなく細胞レベルでも、大脳皮質神経細胞間の機能的シナプス形成のアッセイ系、小脳プルキンエ細胞樹状突起発達系など、培養中枢神経細胞を用いた新しい実験系により、脳機能発達における甲状腺ホルモンの重要性とやはり低濃度の水酸化PCBによる抑制を証明した。PCBは30年前に使用禁止になっているのにもかかわらず、古い蛍光灯、変圧器などには未だに使われており、注意が必要である。

また環境化学物質が次世代の子どもの行動に与える影響を直接調べるため、オープン・フィールド実験で齧歯類の行動をコンピュータで画像判断させる「Kinecluster」システムや、サルを用いた各種の新しい学習・社会行動観察系の開発も行い、ダイオキシンが次世代の脳発達に影響があることを示した。また母ザル血液中の総PCB濃度に比例して生まれた

子ザルの記憶・学習行動テストの成績が悪化しているなど、環境化学物質の脳発達毒性をしめすデータが出ている。

今後、これら開発に成功した実験系などを用い、さらに詳しいリスク評価のための実験データを蓄積し、将来の人材確保のためにも重要な、さまざまな対策に役立てることが必要である。

## 1. 研究実施の概要

内分泌かく乱物質など環境由来の化学物質が次世代の子どもたちの知能や行動、すなわち脳の機能発達に異常を起し、知能低下やさまざまな行動異常をおこしている可能性が憂慮されていた。しかし先端境界領域の常として、従来この分野の研究はほとんど行われておらず、問題の重大さに比し、このような憂慮に回答を与えるリスク（危険度）評価のための科学的データ、情報は著しく不足しており、安全性は保証されていなかった。「どのような化学物質が、どのくらいの量で、どのような脳や行動の異常を起すのか」についての各論は、全くといっていいほど未知だった。

知能低下、LD、ADHD、自閉症や子育て行動の異常などにかかわる、ヒト脳の高次機能や行動の発達メカニズムとその障害は、脳神経科学としても未知のことが多いが、最近まで行動毒性学・毒性試験の対象になっておらず、基礎的な実験系、ことにA) リスク評価のため多数の化学物質を同時に検討できる簡便な実験系の開発と、B) ヒトの複雑で微妙な心理行動に対する影響を実験動物でどのように解析し、定量化するかという、2つの新しい課題に取り組む必要があった。

本研究プロジェクトでは、この最も研究が遅れていたリスク評価のための遺伝子レベル、細胞レベル、行動レベルの多くの実験系を立ち上げ、さらに、焦点を

- (1) エストロゲンなど性ホルモンの研究に比しても、著しく研究の少なかった甲状腺ホルモン系や、記憶・学習など脳高次機能の後天的獲得に必須の神経活動依存性の脳の発達への影響。
- (2) 遺伝子発現レベルでは、これまでの市販品の欠点を克服し、ゲノム・プロジェクトの成果として網羅性が保証されるようになった、オリジナルなDNAマイクロアレイの開発。
- (3) 微妙なヒトの行動異常への影響を実験的にしらべるためのサルを使った次世代行動試験系の開発

の3つに絞った。

当然のことであるが、これら脳発達障害の原因としては、内分泌かく乱物質（環境ホルモン）などの環境化学物質の可能性だけでなく、家庭・学校・社会環境の近年の著しい変化などが複雑に相互に影響し合っており、多因子性である。しかし、後でふれる本CREST研究で、子どもの脳の機能発達でことに重要な、後天的な影響の実態である、外部環境からの刺激に基づいた神経活動依存性の脳内遺伝子発現も、殺虫剤（農薬）などの化学物質によってかく乱されることがわかった。

### A. 「脳の機能発達と遺伝子発現」

『奪われし未来』でも暗示されていたが、環境ホルモンの基本毒性メカニズムは「遺伝子発現のかく乱」、すなわち“偽ホルモン”がホルモン受容体を介する正常な遺伝子の発現をかく乱し、受精卵から始まる発生・発達過程に障害を与えることにある。他の臓器に比しても非常に複雑な構造と機能を持つヒト脳の発達には、数万といわれる遺伝子が、各種ホルモンを含む、数多くの生理化学物質によって精緻に調節されながら発現し（遺伝子発現カスケード）、行動を決定する神経回路ができ上がっていく。このように脳をつくりあげるための遺伝子群の発現は、ホルモン受容体を介するものだけではない。外界からの刺激入力による神経興奮に伴う神経活動依存性の遺伝子発現があり、これが刷り込み現象や記

憶・学習をはじめとする脳の高次機能の発達に重要なことが知られている。

したがって環境化学物質が遺伝子発現をかく乱して子供の脳の発達に障害を与える分子メカニズムとして、ホルモン受容体を介する先天的な過程のかく乱とともに、神経活動依存性の後天的に獲得される過程もかく乱される可能性がある。正常な機能を持つ脳を作り上げるための遺伝子発現カスケードは、他の臓器よりはるかに多様な種類の環境由来の化学物質によってかく乱されやすいといえる。

#### B. 「PCB、水酸化 PCB による遺伝子発現の抑制」

甲状腺ホルモンは甲状腺ホルモン受容体 (TR) に結合し、TR は DNA 上の甲状腺ホルモン応答配列 (TRE と略) 部位に結合して、下流の遺伝子の転写・発現を調節している。鯉淵典之らは適当な培養細胞に TR 遺伝子、TRE 遺伝子、レポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を人為的に組み込み、甲状腺ホルモンの添加で始まる TRE を介する転写の活性化を、ルシフェラーゼ遺伝子の発現による蛍光の増大で観察できる「レポーター・アッセイ系」をつくることに成功した。この系に低濃度 (pM オーダー) の PCB、水酸化 PCB を加えると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が抑えられ、甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現が阻害された。しかも、腎臓由来の細胞に遺伝子を組み込んだ系よりも、脳由来の細胞に遺伝子を組み込んだ系で、水酸化 PCB は甲状腺ホルモンによる下流遺伝子の発現をより強く抑制した。

甲状腺ホルモン系で発現が調節されている遺伝子群には、ニューロトロフィン-3(NT-3) 遺伝子を初め神経回路形成など脳の機能発達に必須と考えられる遺伝子が多い。PCB やその脳内代謝物である低濃度の水酸化 PCB がこの甲状腺ホルモンによる遺伝子発現調節を阻害することは、カネミ油症事件と同様の PCB 混入食用油を食べた母親から生まれた子どもたちの IQ が低下したという疫学データの因果関係、すなわち「知能低下を起こした原因は PCB 類の毒性である」ことを強く示唆している。

#### C. 「神経回路形成への甲状腺ホルモンの重要性と水酸化 PCB」

さらに甲状腺ホルモンの脳の発達への重要性を示すデータが、神経回路形成に必須の過程である樹状突起の伸展を時間を追って観察できる培養神経細胞の系で得られた。樹状突起は神経細胞体から樹の枝状に長く大きく伸びた構造で、他の神経細胞からの情報を運んでくる軸索 (入力繊維) 末端とシナプスを作り、情報を受け取り処理・統合する神経細胞に特有の重要な構造である。

小脳の代表的な神経細胞であるプルキンエ細胞は特徴ある大きな樹状突起を発達させるが、どういふわけか培養すると肝心の樹状突起が伸びず、最近まで培養下ではあまり研究されてこなかった。筆者らは、培地に微量の甲状腺ホルモン (T4) を加えてやるだけで、プルキンエ細胞が脳内と同じような見事な樹状突起を伸ばすことを発見した。あらかじめホルモン類がない無血清培地で培養したマウス・プルキンエ細胞に、甲状腺ホルモン (T4) を添加し、3 週間培養しプルキンエ細胞の数と形態を観察した。ホルモン無添加の対照群に比べ、T4 添加群では樹状突起の発達がよく、突起の伸展した面積を画像解析により計測したところ、T4 5pM 以上を添加した群では対照群の 2-4 倍だった。

このとき、甲状腺ホルモンと同時に低濃度 (pM オーダー) の水酸化 PCB を与えると、樹状突起の発達はほぼ完全に阻害されてしまった。このとき有効な水酸化 PCB の最小濃度は、前に述べた遺伝子の発現を阻害する水酸化 PCB とほぼ同じ数十 pM オーダーであり、樹状突起伸展の抑制は、伸展に必須な甲状腺ホルモン依存性遺伝子群の発現を水酸化 PCB が抑制したためであることが強く示唆された。

#### D. 「神経回路 (シナプス) 形成のアッセイ系と甲状腺ホルモン」

筆者らは、これまでにラット大脳皮質初代培養神経細胞を長期培養しシナプス形成の定量的アッセイ系を確立している。ラット胎仔より得られた神経細胞は、培養後数日で樹状突起や軸索を伸展させ、神経細胞同士が多数のシナプスを形成するようになる。興味深いことに、脳内と同様、相互に十分密なシナプス群で結合された、この培養下での神経回路

網は自発的に興奮を始め、その神経活動を細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度同時多点観察システムによって観察したところ、約1週間で、回路内のほぼ全ての神経細胞で同期した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の振動を生じるようになった。この同期した自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup>振動は、シナプス活動によることがさまざまな薬理学実験から判明しており、しかも、この振動数は電子顕微鏡観察によって定量的に計測されたシナプス密度と良い相関を示すことが明らかになった。言い換えれば、細胞内Ca<sup>2+</sup>振動の振動数を測定することによって、培養神経細胞間で形成されたシナプス数を簡便に定量できることになる。

このシナプス形成のアッセイ系を用いて、甲状腺ホルモン (T3, T4) がこの大脳皮質培養神経細胞の神経回路 (シナプス) 形成を促進し、シナプス蛋白の発現も増加することを見いだした。従って、甲状腺ホルモンは大脳皮質のシナプス形成に重要であり、また、この系をつかえば、神経回路 (シナプス) 形成をかく乱する化学物質の探索が可能となる。私たちは既に除草剤 ATA などの阻害効果を見いだしている。

#### E. 「甲状腺ホルモン類似 PCB 類とダイオキシンの毒性の違い」

鯉淵典之らはさらに彼らの甲状腺ホルモン依存性転写活性測定系を用い、ダイオキシン (2, 3, 7, 8, TCDD) やダイオキシン類似の毒性を持つとされるコプラナー型 PCB は、この甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現を阻害しないことを見いだした。ダイオキシン類と甲状腺ホルモン類似型の PCB 類とは、少なくとも甲状腺ホルモンで調節される遺伝子発現に関してははっきり異なった毒性を持つことを示した。

一方食品、医薬品などの安全性の確立に絶対に必要な、実験動物をつかった毒性実験での主な問題点の1つに、サリドマイド事件などで明らかになった、種差の問題がある。一般につかわれているマウスやラットとヒトの種差が大きいと、外挿によるヒトへの毒性評価が大きく誤る可能性である。この問題は、ヒトと遺伝子配列など類似点が多い霊長類 (サル) を用いれば、より信頼性が高まる。吉川らは、ヒトのもつ社会性など複雑で微妙な心理・行動の発達に対する影響を実験動物で調べる目的もあり、サルを使った指迷路学習試験、出会わせ試験、アイ・コンタクト試験など新しい行動毒性実験の開発に成功している。最近安田らが研究中のダイオキシン (2, 3, 7, 8, TCDD) 投与した母ザルから生まれた子ザルを用い、指迷路試験で学習能力をテストしたところ、ダイオキシン曝露群では、少なくとも対照群より成績は低下しなかった (8)。鯉淵らの「甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現をダイオキシンは阻害しない」というデータや、吉川らの他の行動毒性実験の結果と合わせると、急性毒性の強さ (それもモルモットで、なぜか異常に強く出る致死毒性) から“地上最強の毒物”と恐れられたダイオキシン (2, 3, 7, 8, TCDD) の脳神経毒性は、現在のところ、こと知的発達への毒性に限り実はあまり強くないらしい。カネミ油症のような PCB 汚染で生まれてきた子供の IQ の低下は、混在したダイオキシンが原因でなく、甲状腺ホルモン類似構造を持つ PCB 類ことに、その体内代謝物である水酸化 PCB が原因である可能性が高い。

#### F. 「神経活動依存性の遺伝子発現阻害と農薬などによる複合汚染」

ヒト脳の機能は DNA 上に書かれた設計図だけで遺伝的に決まっているのではない。記憶・学習や言語の獲得をはじめヒトの高次な行動は、生後に受けた外部環境からの刺激によって後天的に決まってくる。DNA レベルでは、ほとんど同じであるヒトの行動パターンや能力が、発育するにつれて個人・個人で大きく異なるのは、「この生後の環境から受けた発達に必要な情報の違い」による部分が多い。特定の感受性期に脳に入ってきた、これらの刺激による脳の特定の部位における神経活動依存性の遺伝子発現が、このようなヒト脳の可塑的な機能発達の基盤にあると考えられている。従って社会生活に適応する能力が欠けた子供の増加や、いわゆる学力低下など、これまで育児や教育のしかたの問題と考えられがちだったものでも、ホルモン系のかく乱とともに、後天的に獲得される高次機能の神経活動を介した遺伝子発現のかく乱による発達障害が一因である可能性がある。すなわち適切な時期に適切な発達のための刺激があったとしても、その神経活動に依存した遺伝子の発

現が環境化学物質によってかく乱され、それに対応する行動の発達が障害されてしまう可能性である。

津田正明らは、このような神経活動依存性の遺伝子発現、ことに記憶などで重要な脳由来神経栄養因子 (BDNF) の遺伝子の発現が、身近な環境化学物質で抑制されることを発見した(16)。家庭でも良く使われる殺虫剤の成分・ペルメトリンなどの合成ピレスノイドや DDT などの農薬類や流産防止剤・ジエチルスチルベストロール (DES: 合成女性ホルモン) はカルシウムの流入を介して神経活動依存性の遺伝子発現を阻害し、しかもそれらを一緒に与えると効果は相加的であった。有吉佐和子が残した『複合汚染』の問題を実験的に示した点でも重要な結論である。

## 2. 研究構想

### A. 「研究の背景と社会との関わり」

出産前後 (周産期) の母親が環境化学物質に汚染されていると、生まれた子どもに脳などの発達障害を起こすことがある。日本人に最も良く知られた例は「胎児性水俣病」で、有機水銀に曝露されていた母親から生まれた子どもは著しい発達の遅れと運動・知的能力の低下をまねいた。「胎児性水俣病」より軽いが見逃せない例に、PCB 類によるカネミ油症事件があり、台湾での同様な事件では被害者の母親から生まれた子どもは、6-7才時で知能指数 (IQ) が平均約5ポイント低下し、多動性を示した。

子供の脳の発達障害では周産期での甲状腺ホルモンの欠乏による精神遅滞を伴うクレチン症が古くから知られているが、米国では 1950 年代までに化学物質汚染が進み、PCB などで汚染された五大湖の魚を食べた母親から生まれた子どもに IQ の低下などの知的障害や神経症状が目立ち始めた。脳神経系の疾患や障害は 20 世紀の後半から増加し、今や米国の 18才以下の子どもの 17%が、行動障害、精神症状など何らかの問題をもっているという統計がある。ことに学習障害 (LD)、注意欠陥多動性障害 (ADHD)、自閉症などが増え、ADHD 児だけでも全学童の 3-6%に達している。さらにここ 10年間で、ADHD 対症治療薬とされるリタリンの使用量は約4倍、カリフォルニア州での自閉症児の登録数は約2倍になった。

日本でも50年以上前から、PCB、農薬など化学物質による環境汚染は全国的に進行しており、近年、LD、ADHD、アスペルガー症候群を含む高機能自閉症児が増加し、2003年の文科省調査で LD、ADHD、高機能自閉症と考えられる児童は学童全体の 6.3% (約17人に1人) に達している。もちろん、診断基準の変化や専門医に行き診断される率の上昇など見かけの部分はあるが、このような様々な増加データの全体は説明できず、経験豊富な現場の専門家たちも実数の増加を証言している。また、クレチン症予防のための新生児スクリーニングでの甲状腺ホルモン・レベル検査では再検査を要する“灰色”レベルの子供の割合がここ10年以上に渡って毎年増加している。一方、遺伝子変異が原因とすれば、このような人口全体での増加には数千年以上かかるはずで、ここ数十年での増加は何らかの環境要因によることは確実である。

より一般に「学力低下」が叫ばれ、さらに酒鬼薔薇事件から最近の佐世保の女子小学生による殺人事件に至る、頻りに報道される子どもや青年の異常な犯罪を氷山の一角とすれば、その蔭には“ハインリッヒの法則”的に、より軽い多数の「切れやすい」「引きこもり」の子どもたちが連続している可能性が高い。いずれにしろ現代日本では、子どもの知的発達、対人・社会的行動発達に対する漠然とした不安は、はっきりと社会問題化している。

従って、環境由来の化学物質が次世代の子どもたちの知能や行動、すなわち脳の機能発達に異常を起こし、知能低下やさまざまな行動異常をおこしている可能性は、記憶・学習などヒトの脳高次機能の分子生物学や神経毒性学を専門としている一脳研究者としても無視できなくなった。

## B. 「研究目標と計画」

しかし先端境界領域の常として、従来この分野の研究はほとんど行われておらず、問題の重大さに比し、このような憂慮に回答を与えるリスク評価のための科学的データ、情報は著しく不足しており、安全性は保証されていなかった。「どのような化学物質が、どのくらいの量で、どのような脳や行動の異常を起こすのか」については、全くといっていいほど未知だった一方、杞憂でなかったときの社会への影響は、将来とりかえしのつかないほど大きいと考えられた。

知能低下、LD、ADHD、自閉症や行動の異常などにかかわる、ヒト脳の高次機能や行動の発達メカニズムとその障害は、脳神経科学としても未知のことが多いが、最近まで行動毒性学・毒性試験の対象になっておらず、基礎的な実験系、ことに多数の化学物質をスクリーニングするための簡便な実験系の開発と、ヒトの複雑で微妙な心理行動に対する影響を実験動物でどのように解析し、定量化するかという、新しい課題に取り組む必要があった。

幸い本 CREST の研究プロジェクトに選ばれ、この最も研究が遅れていたリスク評価のための遺伝子レベル、細胞レベル、行動レベルの実験系（図1）を立ち上げることができた。

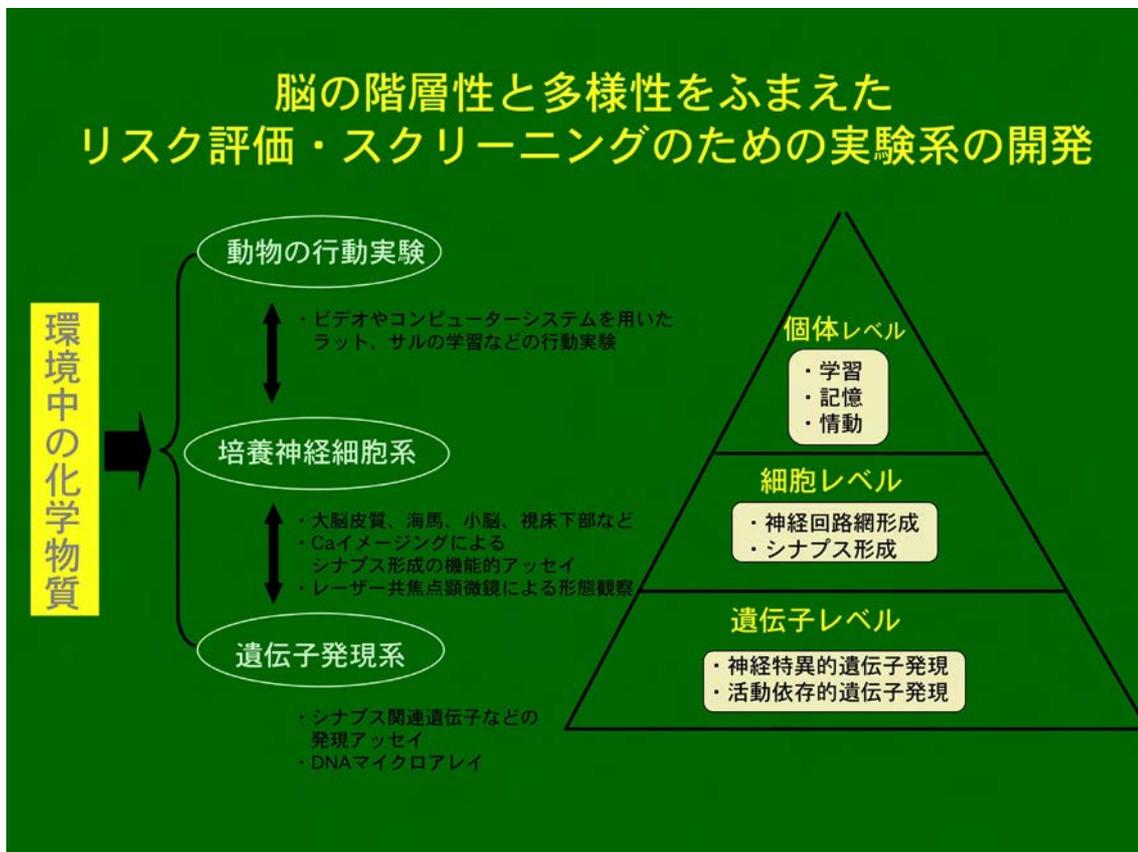


図1 脳の階層性にもとづいた新しい実験系の開発とシステム化

さらに、エストロゲンなど性ホルモン系の研究に比しても、著しく研究の少なかった甲状腺ホルモン系の脳の発達への影響を中心に研究を進め、多くの成果を得ることができた。

当然のことであるが、これらの問題の原因としては、内分泌かく乱物質（環境ホルモン）などの化学物質による脳の発達障害の可能性だけでなく、家庭・学校・社会環境の近年の著しい変化などが複雑に相互に影響し合っており、多因子性である。しかし、本 CREST 研究で、子どもの脳の機能発達でことに重要な、後天的な影響の実態である、外部

環境からの刺激に基づいた神経活動依存性の脳内遺伝子発現も、殺虫剤・農薬などの化学物質によってかく乱されることがわかった。すなわち、親の適切な対応・しつけ、先生の適正な教育が十分に行われた場合すら、子どもの脳がその種の毒性化学物質で汚染・障害されていれば、脳がそれを受けつけられず、無効になる可能性が高いのである。逆に、これら発達障害の子どもも、適切なケア・支援教育を続ければ、年齢が進むにつれて正常に戻っていく場合があることも知られている。

### C. 「成果の概略と研究グループの寄与」

#### 1. 「脳の機能発達とホルモン依存性、神経活動依存性の遺伝子発現」

環境ホルモンの基本毒性メカニズムは「遺伝子発現のかく乱」、すなわち“偽ホルモン”がホルモン受容体を介する正常な遺伝子の発現をかく乱し、受精卵から始まる発生・発達過程に障害を与えることにある。他の臓器に比しても非常に複雑な構造と機能を持つヒト脳の発達には、数万といわれる遺伝子が、各種ホルモンを含む、数多くの生理化学物質によって精緻に調節されながら発現し、行動を決定する神経回路ができ上がっていく。脳機能発達での遺伝子群の発現は、ホルモン受容体を介するものだけではない。外界からの刺激入力による神経興奮に伴う神経活動依存性の遺伝子発現があり、これが刷り込み現象や記憶・学習をはじめとする脳の高次機能の発達に重要なことが知られている。

したがって環境化学物質が遺伝子発現をかく乱して子供の脳の発達に障害を与える機構として、ホルモン受容体を介する先天的な過程のかく乱とともに、神経活動依存性の後天的に獲得される過程もかく乱される（図2）。正常な機能を持つ脳を作り上げるための遺伝子発現カスケードは、他の臓器よりはるかに多様な種類の環境由来の化学物質によってかく乱されやすいといえる。

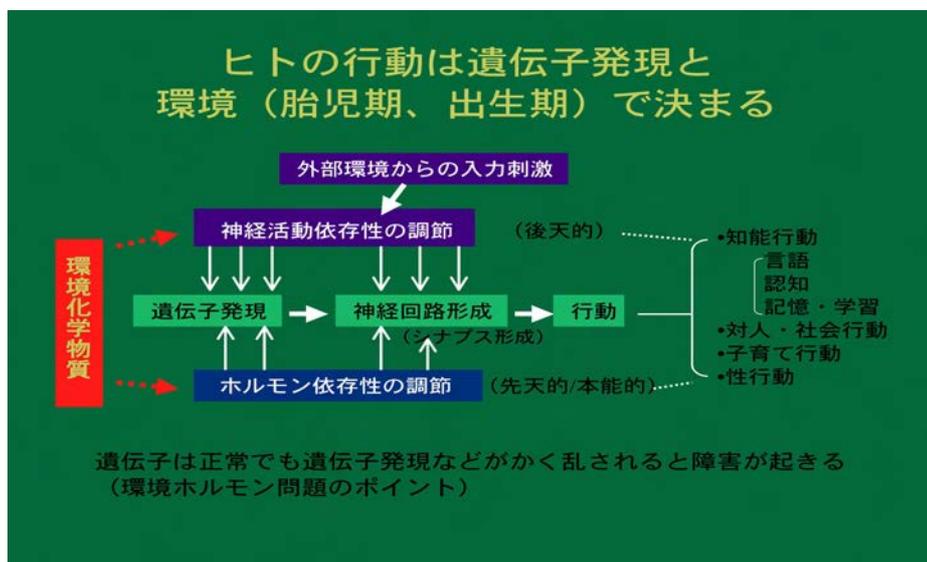
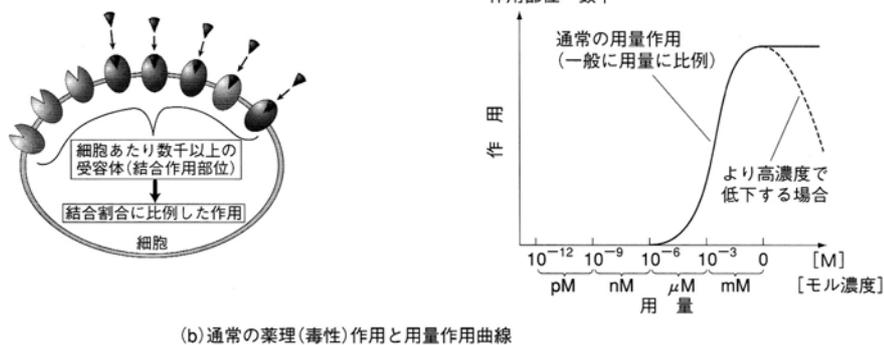
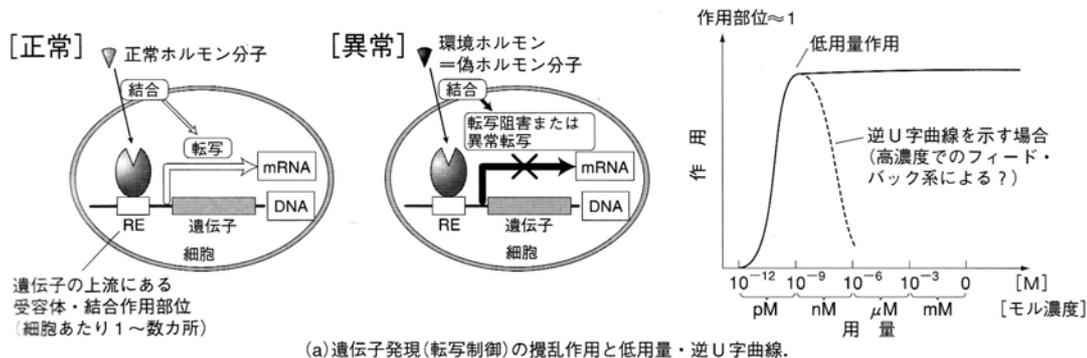


図2 ヒトのさまざまな行動の発達にはホルモン依存性、神経活動依性の2種類の遺伝子発現が必要で環境化学物質によってかく乱されやすい



一環境ホルモン(内分泌攪乱物質)による遺伝子発現の攪乱と低用量作用のメカニズム(DNA single target 説)模式図。

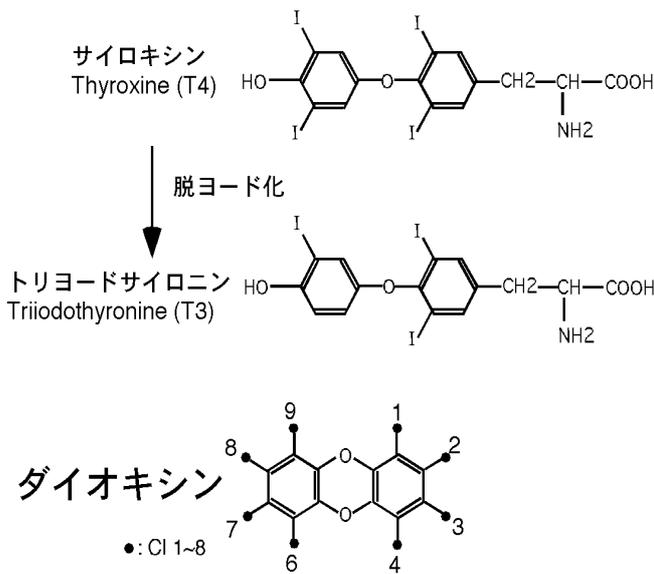
図3 環境ホルモンの低用量作用の分子メカニズム:「DNA single target」説

さらに従来の薬理学・毒性学の教科書的知識をくつがえした環境ホルモンの「低用量作用」は、毒性作用部位が DNA 上の mRNA への転写調節部位とすれば容易に理解できるといふ「DNA single target」説を Kuroda は提唱している。すなわちこれまでの「用量依存性」は 1 細胞あたり数千分子以上発現している受容体の系を前提にしているのに対し、環境ホルモンが作用する転写調節部位は、1 細胞に 1 つしかない核の中の特定の遺伝子 DNA 上に通常 1 カ所(数カ所)しかなく、たった 1 分子(数分子)の毒性化学物質がたどりつき、結合すれば毒性が発揮されてしまう(図 3)。用量作用曲線が逆 U 字形になることがあるのは、一般に高濃度になると、体内のホメオスタシスを保つために備わっている各種のフィードバック系が働き出すためであろう

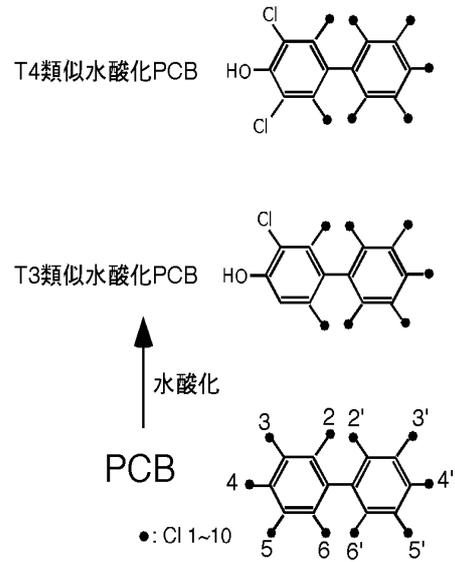
## 2. 「脳機能発達に重要な甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現の PCB、水酸化 PCB による抑制」

脳の機能発達にもさまざまなホルモンが関与しているが、脳でことに重要なホルモンは甲状腺ホルモンである。前に述べたように、周産期での甲状腺ホルモンの絶対的不足が重度の知的障害を伴うクレチン症を起こすことは、古くから分かっていた。母親が妊娠初期に甲状腺機能低下症だと生まれた子供の IQ が低下することも知られている。脳機能関連遺伝子群で甲状腺ホルモンによって発現が調節されているものがあることは本 CREST 研究でも実験的に明らかにしている。甲状腺ホルモンと化学構造の似た PCB、ことに水酸化 PCB 類(図 4)の曝露による IQ の低下は、甲状腺ホルモン系のかく乱が疑われる。

## 甲状腺ホルモン



## 水酸化PCB



## 甲状腺ホルモンとPCB、水酸化PCBの化学構造の類似

PCB、ダイオキシンでは、●に塩素(Cl)が様々な結合し、多くの異性体をつくる。  
PCB、ダイオキシンの数字は塩素のつく位置

図4 甲状腺ホルモンとPCB、水酸化PCBなどの化学構造の類似

ADHD児は鉛中毒児と症状が似ているが、PCBを投与したサルから生まれた仔もまわりの環境に合わせた適当な行動をとれなくなる、などのデータはPCB類が甲状腺ホルモン系を介し、その量に応じて、さまざまな程度で多様な脳の発達障害を起こしている可能性を示唆している。

甲状腺ホルモンは甲状腺ホルモン受容体(TR)に結合し、TRはDNA上の甲状腺ホルモン応答配列(TRE)部位に結合して、下流の遺伝子の転写・発現を調節している。

# 低濃度 (100 pM)の水酸化PCBは甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現を抑制する

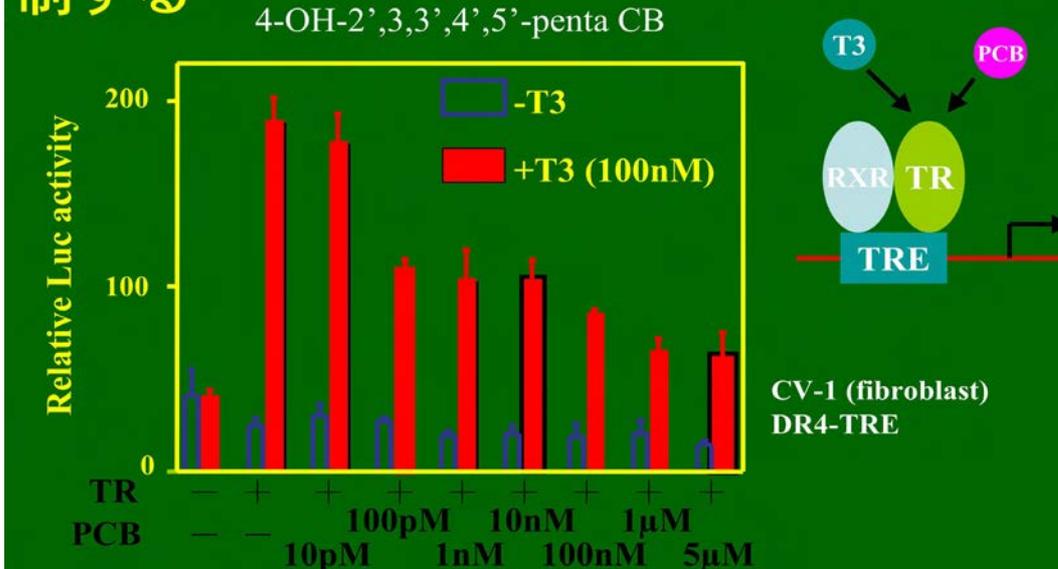


図5 PCB、水酸化 PCB による甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現の抑制

鯉淵典之（群馬大学医学部）の研究グループは、適当な培養細胞に TR 遺伝子、TRE 遺伝子、レポーターとしてのルシフェラーゼ遺伝子を人為的に組み込み、甲状腺ホルモンの添加で始まる TRE を介する転写の活性化を、ルシフェラーゼ遺伝子の発現による蛍光の増大で観察できる「レポーター・アッセイ系」をつくることに成功した。この系に低濃度 (pM オーダー) の PCB、水酸化 PCB を加えると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が抑えられ、甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現が阻害された (図 5)。しかも、腎臓由来の細胞に遺伝子を組み込んだ系よりも、脳由来の細胞に遺伝子を組み込んだ系で、水酸化 PCB は甲状腺ホルモンによる下流遺伝子の発現をより強く抑制した。さらにダイオキシンや他の PCB 異性体について調べたダイオキシンやダイベンゾフラン、コプラナー PCB は阻害しないこと、その毒性メカニズムの解析から、甲状腺ホルモンによる遺伝子発現調節の分子機構が、エストロゲン系と大きく異なっていることが分かった。

甲状腺ホルモン系で発現が調節されている遺伝子群には、ニューロトロフィン-3(NT-3) 遺伝子を初め神経回路形成など脳の機能発達に必須と考えられる遺伝子が多い。PCB やその脳内代謝物である低濃度の水酸化 PCB がこの甲状腺ホルモンによる遺伝子発現調節を阻害し、ダイオキシンやダイベンゾフランがしなかったことは、カネミ油症事件と同様の PCB 混入食用油を食べた母親から生まれた子どもたちの IQ が低下したという疫学データの因果関係、すなわち「知能低下を起こした原因は PCB 類の毒性である」ことを強く示唆している。

### 3. 「神経回路形成 (樹状突起伸展、シナプス形成) での甲状腺ホルモンの重要性と水酸化 PCB による阻害」

遺伝子レベルだけでなく、細胞レベルでも甲状腺ホルモンの脳の発達への重要性を示すデータが、神経回路形成に必須の過程である樹状突起の伸展を時間を追って観察できる培養神経細胞の系で得られた。樹状突起は神経細胞体から樹の枝状に長く大きく伸びた構造で、他の神経細胞からの情報を運んでくる数百以上の軸索 (入力繊維) 末端とシナプスを

作り、情報を受け取り処理・統合する神経細胞に特有の重要な構造である。

小脳の代表的な神経細胞であるプルキンエ細胞は特徴ある大きな樹状突起を発達させるが、培養すると肝心の樹状突起が伸びず、最近まで培養下ではあまり研究されてこなかった。黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）らの研究グループは、培地に微量の甲状腺ホルモン（T4）を加えてやるだけで、プルキンエ細胞が脳内と同じような見事な樹状突起を伸ばすことを発見した。あらかじめ無血清培地で培養したマウス・プルキンエ細胞に、甲状腺ホルモン（T4）を添加し、3週間培養しプルキンエ細胞の数と形態を観察した。ホルモン無添加の対照群に比べ、T4添加群では樹状突起の発達がよく（図6、A,B）、突起の伸展した面積を画像解析により計測したところ、T4 5pM以上を添加した群では対照群の2-4倍だった。

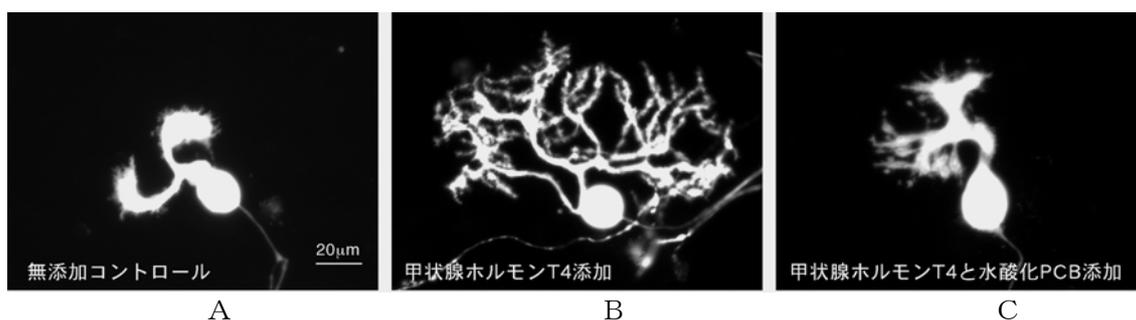


図6 樹状突起の伸展には甲状腺ホルモンが必須で水酸化PCBで阻害される

このとき、甲状腺ホルモンと同時に低濃度（pMオーダー）の水酸化PCBを与えると、樹状突起の発達はほぼ完全に阻害されてしまった（図6,C）。このとき有効な水酸化PCBの最小濃度は、前に述べた遺伝子の発現を阻害する水酸化PCBとほぼ同じ数十pMオーダーであり、樹状突起伸展の抑制は、伸展に必須な甲状腺ホルモン依存性遺伝子群の発現を水酸化PCBが抑制したためであることが強く示唆された。

黒田らは、これまでにラット大脳皮質初代培養神経細胞を長期培養し、神経回路形成の要であるシナプス形成の定量的アッセイ系を確立している。ラット胎仔より得られた神経細胞は、培養後数日で樹状突起や軸索を伸展させ、神経細胞同士が多数のシナプスを形成するようになる。興味深いことに、脳内と同様、相互に十分密なシナプス群で結合された、この培養下での神経回路網は自発的に興奮を始め、その神経活動を細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度同時多点観察システムによって観察したところ、約1週間で、回路内のほぼ全ての神経細胞で同期した細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の振動を生じるようになった。この同期した自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup>振動がシナプス活動によることは薬理的に証明され、しかも、この振動数は電子顕微鏡観察によって定量的に計測されたシナプス密度と良い相関を示すことが明らかになった。細胞内Ca<sup>2+</sup>振動の振動数の測定によって、培養神経細胞間で形成されたシナプス数を簡便に定量できることになる。

この系を用いて、甲状腺ホルモンが大脳皮質神経細胞の神経回路（シナプス）形成を促進し、シナプス蛋白の発現も増加することを見いだした。従って、甲状腺ホルモンは大脳皮質などでのシナプス形成に重要であり、また、この系をつかえば、神経回路（シナプス）形成をかく乱する化学物質の探索が可能となる。私たちは既に除草剤ATAなどの阻害効果を見いだしている。

#### 4. 「神経活動依存性の遺伝子発現の殺虫剤・農薬などによる阻害と複合汚染」

ヒト脳の機能は DNA 上に書かれた設計図だけで遺伝的に決まっているのではない。言語の獲得をはじめヒトの高次な行動は、生後に受けた外部環境からの刺激によって後天的に決まってくる。DNA レベルでは、ほとんど同じであるヒトの行動パターンや能力が、発育するにつれて個人・個人で大きく異なるのは、「この生後の環境から受けた発達に必要な情報の違い」による部分が多い。特定の感受性期に脳に入ってきた刺激による脳の特定の部位における神経活動依存性の遺伝子発現が、ヒト脳のこの可塑的な機能発達の基盤にある。

津田正明（富山医科薬科大学・薬学部）の研究グループは、このような神経活動依存性の遺伝子発現、ことに記憶などで重要な脳由来神経栄養因子（BDNF）の遺伝子の発現が、環境化学物質で抑制されることを発見した。家庭でも良く使われる殺虫剤の成分・ペルメトリンなどの合成ピレスノイドや DDT などの農薬類や流産防止剤・ジエチルスチルベストロール（DES：合成女性ホルモン）はカルシウムの流入を介して神経活動依存性の遺伝子発現を阻害し、しかもそれらを一緒に与えると効果は相加的であった（図7）「複合汚染」の問題、すなわち1つ1つの化学物質の個別の毒性だけでは、複数の化学物質汚染が起こっている人体への影響のリスク評価ができない例を実験的にした点でも重要な結論である。

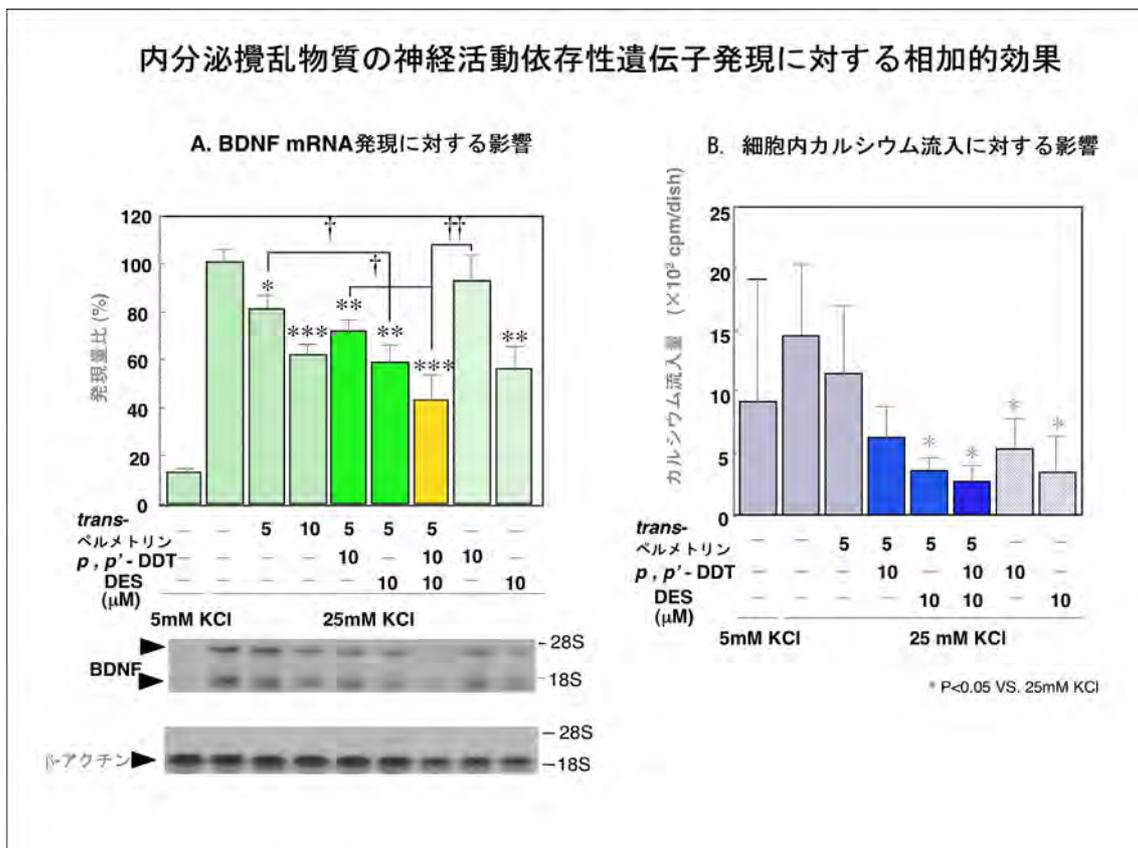


図7 神経活動依存性の遺伝子発現に対する環境化学物質の相加効果

## 5. 「トキシコジェノミックスーオリジナル DNA マイクロアレイの開発」

遺伝学・分子生物学と環境科学の接点に生まれたのが、最新の遺伝子技術を応用した毒性学「トキシコジェノミックス」である。中でも、多くの遺伝子の発現を同時に簡便に網羅的に調べることができる DNA マイクロアレイが重要な手法として注目されている。DNA マイクロアレイで最も期待されているのは、病気の原因や発症メカニズムの解明と、それに基づく新しい予防法や治療法の開発であるが、生体内のあらゆる構造・機能の時間的、空間的变化は遺伝子発現パターンの変化を必ず伴っているため、生命科学一般の基礎研究にも膨大な用途が開けている。しかし DNA マイクロアレイのこの広範な有用性にもかかわらず、現在、環境ホルモンの毒性評価のトキシコジェノミックスはもとより、一般にもあまり成果が上がらず、論文もそれほど多くないのは、これまでのアレイ技術に定量性、再現性、コスト、感度などの問題点があるためである。

田代朋子（青山学院大学・理工学部）らの研究グループは理化学研究所・工学基盤研究部と共同で、これまでのアレイの問題点を改良しオリジナルな DNA マイクロアレイ：実際には本 CREST 研究の目的である脳機能発達に最適化した「シナプトアレイ」の開発に成功した。この新しいオリゴ・アレイ技術では、基本的な欠点だった定量性と再現性を向上させるためアレイ基板の表面処理技術やプローブ選定などの改良を行い、蛍光強度比は±20%の範囲内に収まり定量性が大きく向上し、これまでの±200%以上から、±20%以上の発現比の変動は有意な変化として検出できるようになった（図8）。

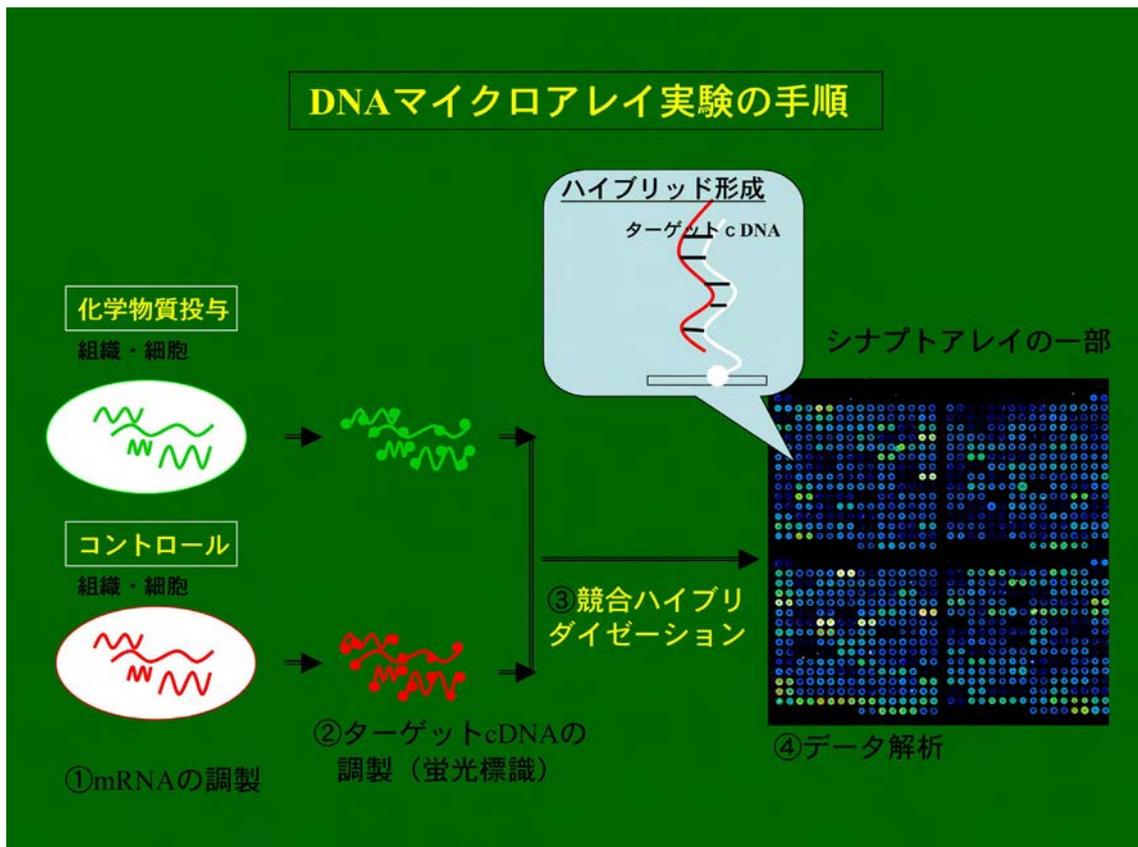


図8 オリジナル DNA マイクロアレイの実験法

神経回路形成や機能変化は、シナプスの形成、再編成、変性、再生などが構造的基盤であり、遺伝子発現パターンの変化でモニターできる。これらの各ステップで機能する遺伝子群や特定の傷害を加えた場合に变化する遺伝子群などを培養神経細胞系などで実験的に特

定し、プローブの内容を拡充しバージョン・アップしている。177 遺伝子に対する 496 種類のプローブを搭載した「シナプトアレイ」(Version 4) を用いマウス小脳の生後初期発育過程を解析した。シナプスの構成蛋白、細胞骨格とその制御蛋白、細胞周期制御蛋白など、シナプス形成に重要な役割を果たすと考えられる遺伝子などと、その主要な択一的スプライシング型を区別するプローブが載せてある。シナプス形成に関わるMA P s 遺伝子のスプライシング型の変化をきちんと検出できている。

生後 4 日から 28 日にかけての 6 時点で小脳から mRNA を抽出、混合して、逆転写により二種類の蛍光色素 Cy3 および Cy5 で標識した cDNA を作成した。

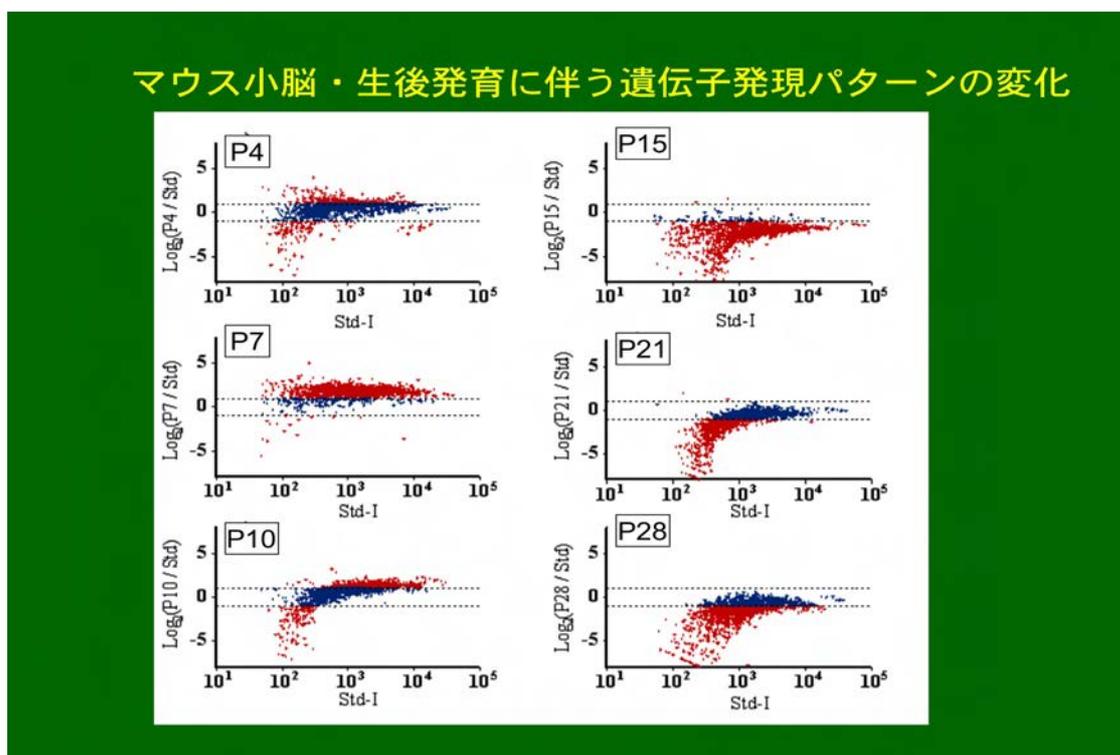


図9 小脳発達過程での遺伝子発現量の変化のシナプトアレイによる解析

図9から明らかのように、生後7日で多くの遺伝子の発現が増大した後、10日から一部が低下し始め、15日では大多数が標準試料より低い値を示した。生後7日～15日は、マウス小脳におけるシナプス形成時期に相当する。シナプトアレイはこれを遺伝子発現変化の「波」として捉えることができたわけである。

これによりシナプス形成に伴う特徴的な遺伝子発現の「波」に、どのような変化を与えるかという視点から、いろいろな毒物の投与や環境変化の脳神経系に対する影響を評価することができる。例えば実験的に起こした甲状腺機能低下マウスの小脳では、正常発達過程における遺伝子発現の時間変化と比較し、一群のシナプス蛋白遺伝子の発現が抑えられており、脳機能低下と相関していることが示された。

## 6. 「サルなどを用いた新しい学習・社会行動実験系の開発と化学物質の毒性検出」

一方食品、医薬品などの安全性の確立に絶対に必要な、実験動物をつかった毒性実験での主な問題点の1つに、サリドマイド事件などで明らかになった、種差の問題がある。一般につかわれているマウスやラットとヒトの種差が大きいため、外挿によるヒトへの毒性評価が大きく誤る可能性である。この問題は、ヒトと遺伝子配列など類似点が多い霊長類(サル)を用いれば、より信頼性が高まる。吉川泰弘(東京大学大学院・実験動物)らの

研究グループは、ヒトのもつ社会性など複雑で微妙な心理・行動の発達に対する影響を実験動物で調べる目的もあり、コンピュータでオープンフィールドでの行動を解析させるキネクラスター・システム、新しい注意行動解析装置やサルを使った指迷路学習試験、出合わせ試験、アイ・コンタクト試験など新しい行動毒性実験の開発（図10）に成功している。

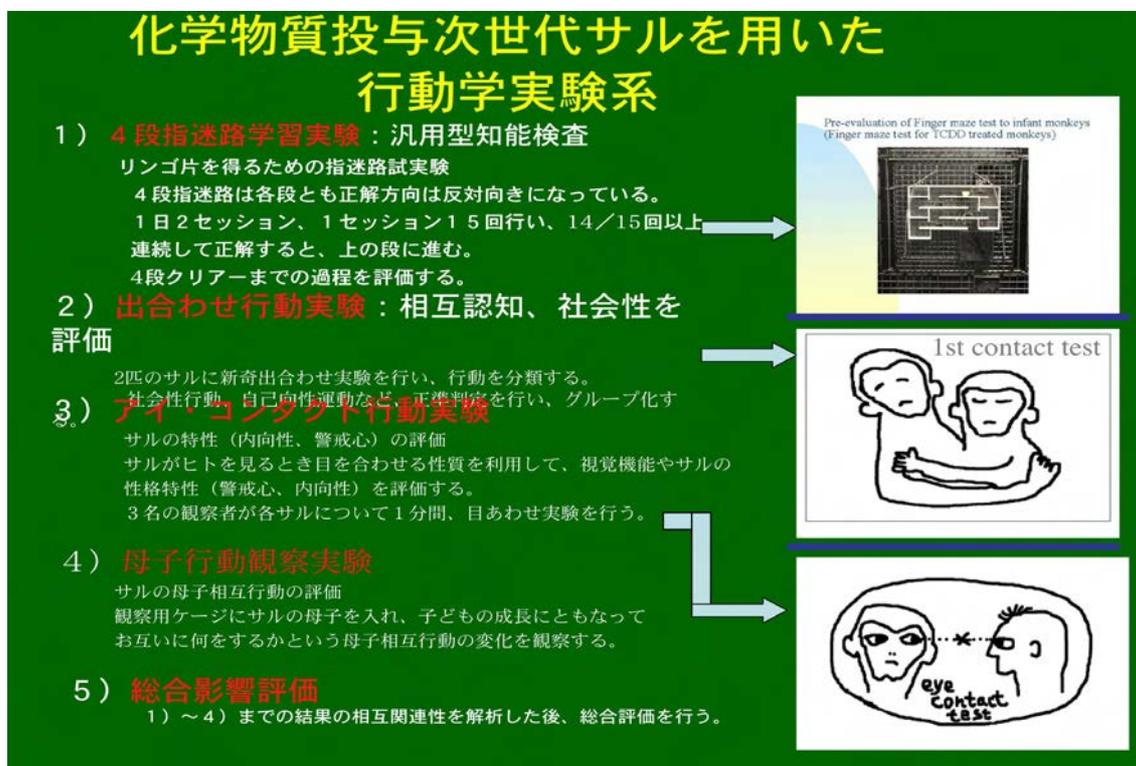


図10 サルを用いた次世代行動実験システムの開発

また安田峯生（元広島大学・医学部）らが研究中のダイオキシン（2、3、7、8、TCDD）投与した母ザルから生まれた子ザルを用い、指迷路試験で学習能力をテストしたところ、ダイオキシン曝露群では、少なくとも対照群より成績は低下しなかった。しかし出合わせ試験ではダイオキシン曝露群の社会性に微妙な影響があることも分かった（図11）。

## 次世代ザルの指迷路学習行動実験で ダイオキシンは有意な影響はなかった

アカゲザルにおける胎生期・授乳期TCDD暴露  
4段指迷路試験の結果

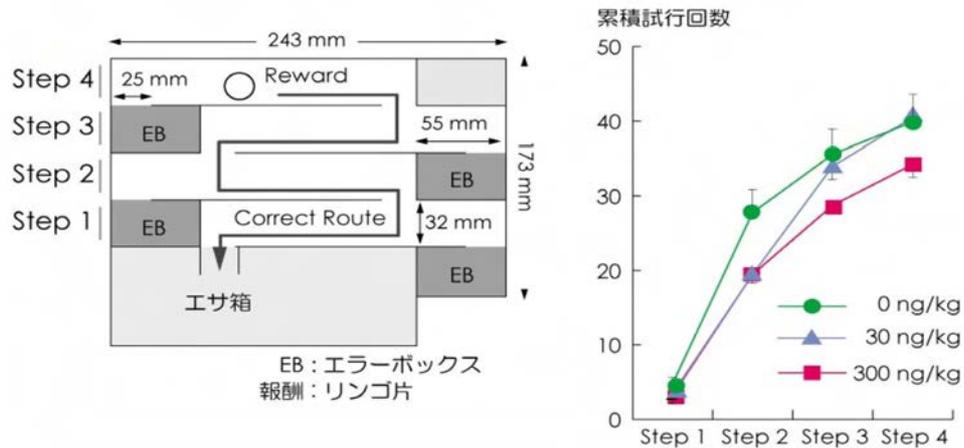


図 1 1 ダイオキシン投与次世代の指迷路学習試験成績

さらに対人行動を測ることができると考えられる一定時間内のアイコンタクトの回数と総PCB濃度には相関が見られなかったが、記憶・学習行動への影響を調べる4段指迷路の成績では母親の血中総PCB濃度が高いと子どもの学習成績が下がる傾向がみられた(図1-2)。また同時に測定した各異性体濃度と行動学的指標との相関を見た結果、異性体によって相関の度合いは異なり、異性体間で神経系への影響の強さに差があることが予測された。この実験のようにサルにおいて疫学的な関係を調べることは、ヒトでのリスクを評価するために非常に有益である。しかしながらこの調査は例数が6と少ないため、現在、さらに例数を増やし検討している。

# 母ザルの血中PCB濃度が高いと 子ザルの学習試験成績は落ちる

4段指迷路試験成績（累積試行回数）

VS

母体血漿中 Total PCB濃度

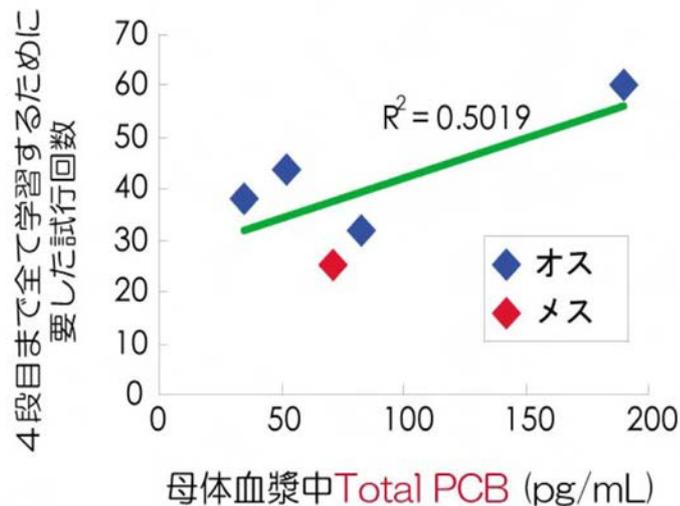


図 1 2 母親の血中総 PCB 濃度が高いと子どもの学習成績が下がる

本 CREST 研究での鯉淵らの「甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現をダイオキシンは阻害しない」というデータや、吉川らのこの行動毒性実験の結果から総合的に考えると、ダイオキシン（2、3、7、8、TCDD）の脳神経毒性は、現在のところ、こと知的発達への毒性に限り実はあまり強くないらしい。カネミ油症のような PCB 汚染で生まれてきた子供の IQ の低下は、ダイオキシンなどの混在した化学物質が原因でなく、甲状腺ホルモン類似構造を持つ PCB 類ことに、その体内代謝物である水酸化 PCB が原因である可能性が高い

## 7. 「LD, ADHD, 高機能自閉症の新しい原因仮説」

LD, ADHD, 高機能自閉症などの診断は一般に難しいといわれる。子ども毎の症状が多様で、しかも子どもによって数の異なる複数の障害の症状を、さまざまな組み合わせで合併しているからである。LD と ADHD、ADHD とアスペルガー症候群（高機能自閉症）の症状を両方もっている子どもも少なくない。「多様な症状が、なぜ子ども毎にばらつくのか」、「原因はそれだけ多様なのか」、家庭・社会環境の影響の複合も考えられるが、研究者の謎であった。

これまで述べた本 CREST 研究の結果を総合し、神経科学でよく知られている脳の部分ごとの機能分担（機能ごとの神経回路の局在）と、その回路発達の感受性期（主にシナプス形成期）の違い（図 1 3）を考えあわせると、この謎とされてきた多様な症状のばらつき（heterogeneity）と、合併(co-morbidity)を一つの原因で説明できる。

## 胎児・乳幼児期の脳の発達と化学毒性物質の侵入のしやすさ

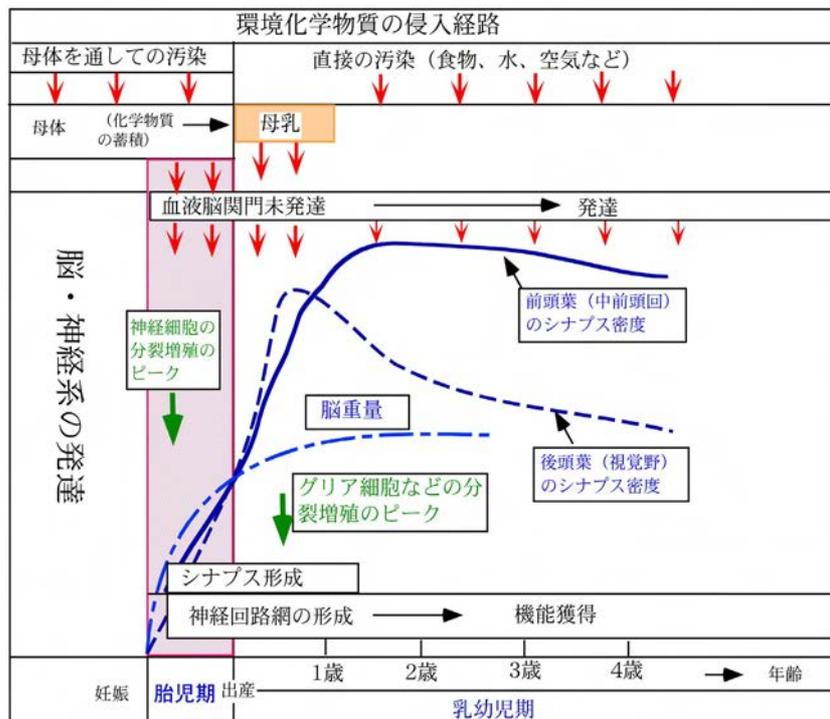


図 1 3 胎児・新生児脳でのシナプス形成期など感受性期の部位別のずれと血液脳関門の未発達による化学物質の脳への侵入しやすさ

PCBなどの多様な毒性化学物質により胎児・乳児脳の「どの部分が、どの期間（どれだけ長く）曝露されたか」によって、「曝露と感受性期が一致した部分のみ神経回路（シナプス）形成などが傷害され、その部分が担っていた脳機能＝行動の発達が障害され、LD, ADHD、高機能自閉症など、それぞれ異なった多様な症状や行動異常が併発する」という「毒性化学物質の時空間的複合汚染」仮説（図 1 4）である。

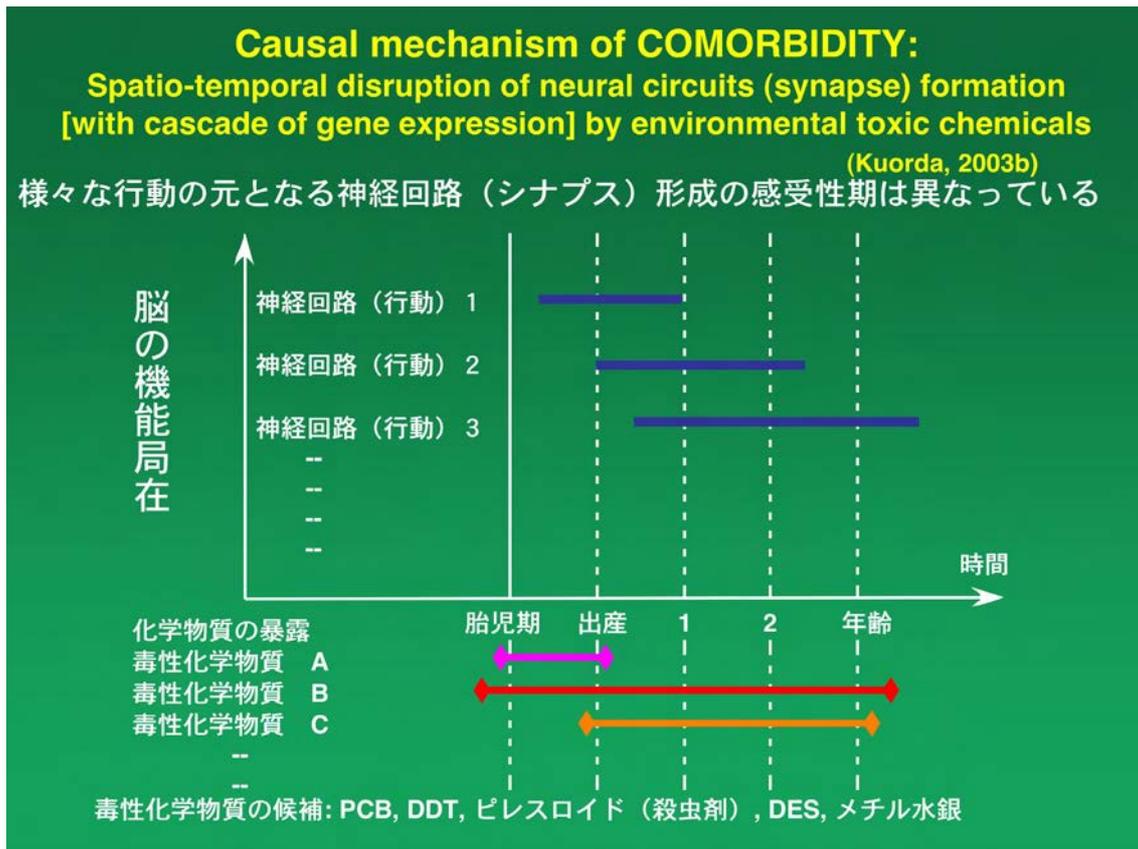


図 1 4 LD, ADHD, 高機能自閉症の症状の heterogeneity と comorbidity の原因を統一的に説明できる「毒性化学物質の時空間的複合汚染」仮説

8. 興奮性神経伝達物質グルタミン酸類似化合物・グルホシネートによる神経活動依存性遺伝子発現のかく乱

また、最近遺伝子組み換え作物とセットで売られている除草剤・グルホシネートでは、投与された母親のラットから生まれた普通はおとなしい雌の仔ラットでもかみ合いを始め、片方が死ぬまでやめなかった、という実験データが藤井寿子（前帝京大学・医学部）から報告されている。このような“にせ神経伝達物質”というべき、興奮性神経伝達物質グルタミン酸の有機リン化合物による、脳の異常な興奮し易さや、他の毒性化学物質による抑制系のシナプス形成の障害など抑制されにくさがあれば、当然抑制は利きにくくなり、一般に「切れやすく」「暴力的」になるであろう。

津田正明らのグループではグルホシネートの *c-fos* および BDNF exon III-V 遺伝子発現に対する影響を検討した。グルホシネート単独では、発現誘導が認められなかったが、グルタミン酸による *c-fos* 遺伝子発現誘導に対して、グルホシネート前処置により、さらに発現が上昇した（図 1 5）。

BDNF exon III-V 遺伝子発現に対しても同様の傾向を示している。グルホシネートの化学構造は、グルタミン酸に酷似しており、神経細胞が過剰に興奮している可能性が考えられた。グルホシネートの検討は、今まで動物実験でしか行われておらず、NMDA レセプターの関与は指摘されていたが、その機構は不明であった。今回の結果によって、グルホシネートはグルタミン酸レセプターの活性を促進し、その影響は遺伝子発現レベルにまで及ぶことが示された。

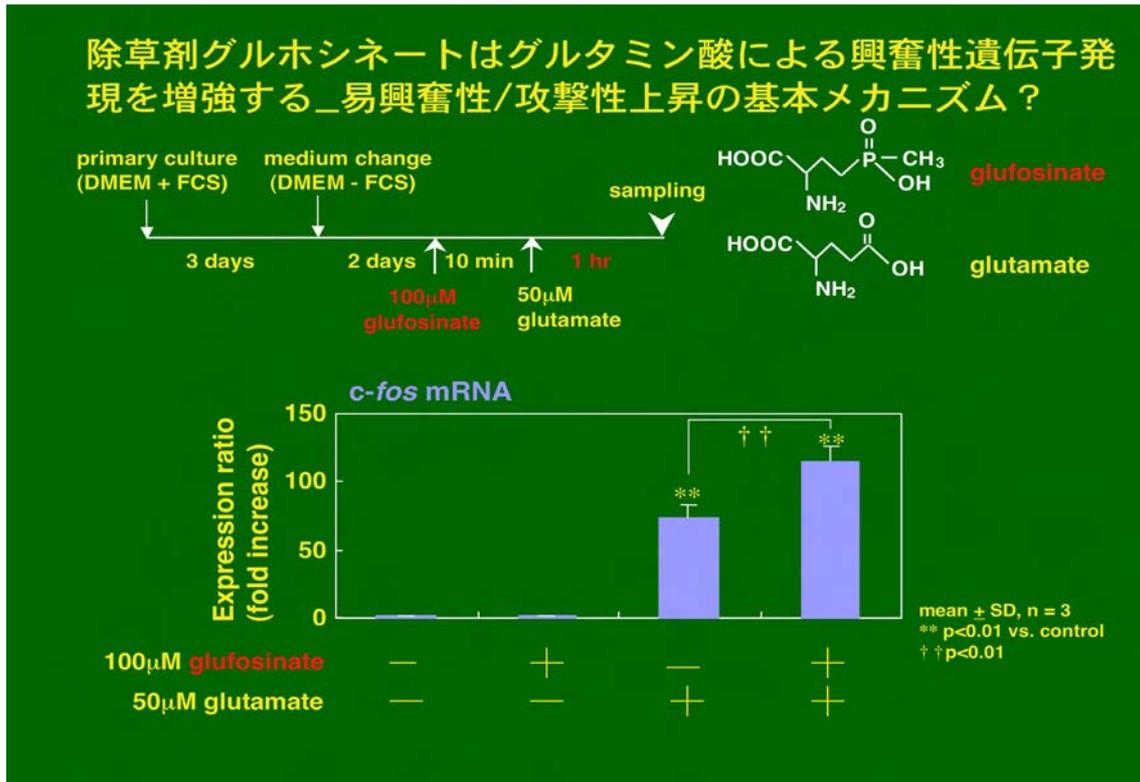


図 1 5 遺伝子組み換え作物用除草剤であるグルホシネートによる神経活動依存性遺伝子発現のかく乱

### 9. 「PCB・DDT 人体汚染の現状とリスク評価」

PCB・DDT などによる人体汚染の、次世代を含むヒトの健康へのリスク評価をするには、各種毒性試験で得られた毒性を示す最小濃度とともに、「ヒトの体内にその毒性化学物質がどれだけの濃度存在するか」のデータが重要である。

PCB は 1970 年代に米国をはじめ日本など先進国で開放系での使用が禁止されたのにも関わらず、既に莫大な量が生産、使用されてしまい、処理・管理が不十分になっている。DDT も先進国での使用は禁止されたが、生産や南アジアなどでの使用が続き、地球大気への拡散を介して中緯度地域でも汚染が継続している。PCB も DDT も環境や体内での安定性が高いため、まさにグローバルな汚染が地球全体に拡がり、野生動物や人体に蓄積している。田辺信介（愛媛大学・沿岸環境科学センター）らによれば PCB, DDT は沿岸から外洋へ海水中を拡散し、生体内濃縮と食物連鎖の結果、イルカ、クジラへ高濃度の PCB、DDT が主に脂肪層に蓄積している。PCB の汚染は既に北極圏に達し、北極グマの体内やアザラシなどを狩って食料としているイヌイットの人々の血液中でも異常に高い PCB が検出された。血液中の PCB も多く脂質に結合しているが総量は平均 1510 pg/g 血漿もの高さで、単純に均一分布するとして平均濃度は約 4 nM になる。PCB の代謝物で水溶性の高い水酸化 PCB は血液中の総量で 286 pg/g 血漿、平均濃度は約 700 pM 前後で、これでも本 CREST 研究で開発した *in vitro* 毒性実験系で得た、甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現や神経細胞の分化（樹状突起伸展）の最小阻害濃度：数 10pM よりはるかに高い。

より問題なのは、この研究のとき対照群として調べられた普通の人々（カナダ南部の都市住民）の血中濃度である。PCB 総量、843 pg/g 血漿、より問題の水酸化 PCB は総量としては 234 pg/g 血漿、平均濃度約 600 pM のレベルで、本研究で得た毒性を示す最小濃度をはるかに越えている。最も多い水酸化 PCB 異性体 4-OH-CB187 だけで 28pg/g 血漿、平均濃度約 70 pM ある。

さらに気になる日本人体内の PCB 汚染は、一時期より低下したとはいえ、カナダ都市住民とそう変わらず、高菅卓三（島津テクノリサーチ）らの最近のデータでは、血中での PCB 総量が平均 650 pg/g 全血液、単純な換算による平均濃度で約 1.6 nM 近くもある。

甲状腺ホルモン系を阻害するタイプの PCB 異性体の総量に占める割合が不明なこと、実際の毒性は、代謝されて水に溶けやすくなった水酸化 PCB の寄与が大きいであろうが代謝・排出状態が不明なこと、血液中の濃度と脳内の脳脊髄液中の濃度、母体血とさい帯血での濃度はそれぞれは異なるであろうこと、他の物質に結合して無毒化されている部分がある可能性などから、どのくらいリスクがあるかは、現時点では不明である。しかし一般に、このような測定では、人によっては平均値の 5 倍以上の値が測定される場合も多いので、日本人全体が安全とはとてもいえず、より詳しい研究とデータの蓄積を待ちたい。

### 3. 研究成果の詳細（グループ別）

#### 3. 1 内分泌かく乱物質など環境化学物質が神経活動依存性遺伝子発現のかく乱を介して脳の発達に与える影響（津田正明グループ）

##### (1) 研究内容及び成果

##### A. 神経活動依存的な遺伝子発現に与える影響

ネコの視覚神経系の眼優位性コラム形成によく知られるように、生後の脳・神経系の発達は外界刺激によって惹起される神経活動に大きく依存している。この過程は、出生前の厳密な遺伝的プログラムに則った発生過程に対して、活動依存的な脳・神経系形成過程と呼ばれるが、決して遺伝的プログラムと無関係なわけではない。むしろ、神経活動の起こることが新たな引き金となって、準備されていた活動依存的な脳・神経系発達の遺伝的プログラムが作動し始める過程と捉えることができる。したがって、脳・神経機能発達に関わる多くの遺伝子が、出生後の脳で活性化されていることが十分に予想される。一方、殺虫剤には、神経活動に関わるイオンチャネル機能を阻害することによってその殺虫効果を示すものが、数多く知られている。このことは、授乳によって乳児脳に移行した殺虫剤が神経活動を攪乱して、脳・神経機能発達に障害を与える可能性のあることを示している。そこで、本研究では、活動依存的な遺伝子発現制御系を明らかにするとともに、その発現制御系に殺虫剤や内分泌攪乱物質がどのような影響を与え得るかについて検討した。一方、ステロイド系ホルモンの脳・神経系発達における役割も重要である。ここでは、併せて甲状腺ホルモンの培養神経細胞に与える影響を検討し、活動依存性との関係を探った。

##### I) 活動依存的な遺伝子発現制御系の解析

脳由来神経栄養因子 (BDNF) 遺伝子プロモーター I 及び PACAP (Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) 遺伝子プロモーター解析を行った所、両プロモーターの  $Ca^{2+}$  シグナル応答には転写制御因子 CREB が関わっていることが明らかとなった。さらに、BDNF 遺伝子プロモーター I には、CREB 以外に USF (Upstream stimulatory factor) が結合しカルシウム応答に関わっていることが明らかになった。また、新たに VIP (vasopressin intestinal polypeptide) 遺伝子も  $Ca^{2+}$  シグナルで活性化することを明らかにした。以上の事実より、この  $Ca^{2+}$  シグナルで活性化する活動依存的な発現制御系は、外界刺激をシナプス入力として受け取り、その情報を一連のニューロペプチド合成を介して、神経内分泌系の活性化に変換する役割を担っているものと推察された。

## II) 複合的な神経活動攪乱作用について

我々は、殺虫剤および内分泌かく乱物質の神経細胞への影響を検討するために、神経活動依存的な遺伝子発現を指標に実験を進めてきた。マウス小脳顆粒細胞初代培養系では、培地のKCl濃度を上げて脱分極を起こすことにより、神経活動依存的なL-VDCCからのCa<sup>2+</sup>流入を引き起こすことができる。この培養系に、ピレスロイド系殺虫剤や内分泌攪乱物質を予め加えておき、BDNFおよび*c-fos*遺伝子発現に与える影響を検討した。Ca<sup>2+</sup>流入で誘導されたBDNFおよび*c-fos*遺伝子の発現は、ペルメトリン、シペルメトリン、DDT、ビスフェノールA、diethyletilbesterol (DES)で細胞を前処置しておくこと、濃度依存的な抑制が認められた(図1)。

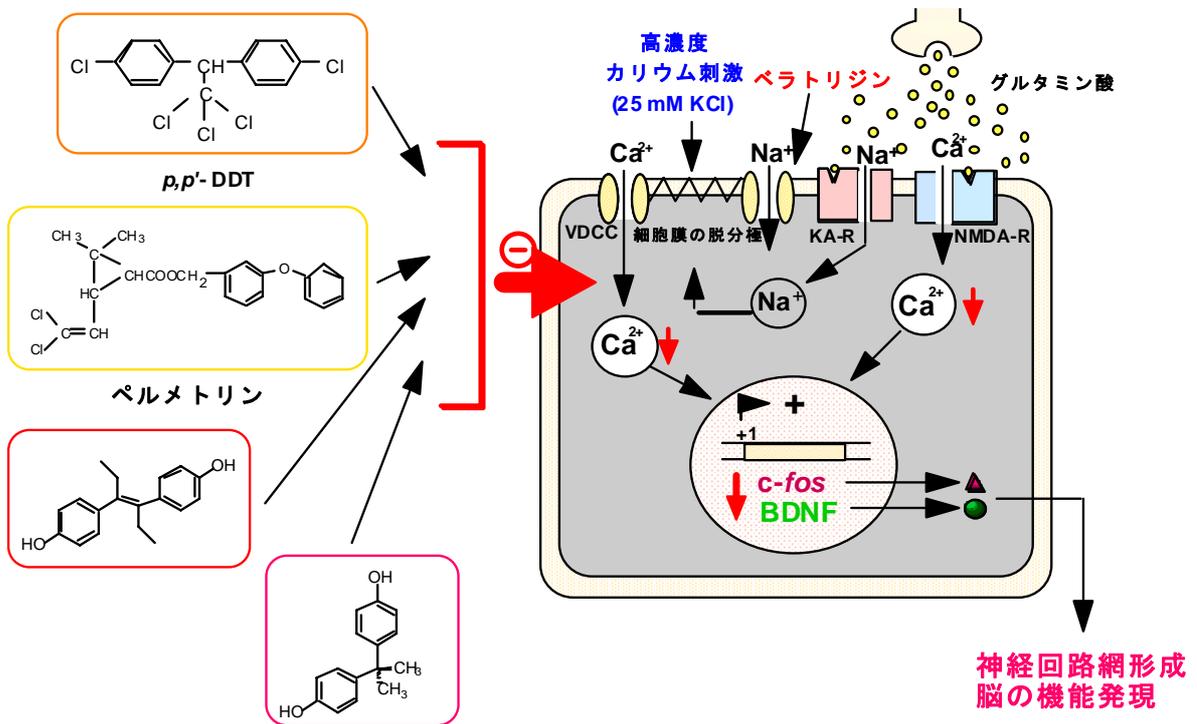


図1. 神経細胞内へカルシウムが流入することにより神経活動依存的な遺伝子発現が認められ、脳・神経機能発達に関わると考えられる。この遺伝子発現を種々の殺虫剤や内分泌攪乱物質が抑制した。

さらに、これら化合物は同様な機構で発現抑制を起こしている可能性が考えられたので、遺伝子発現に対する複合的な効果を検討した(図2)。

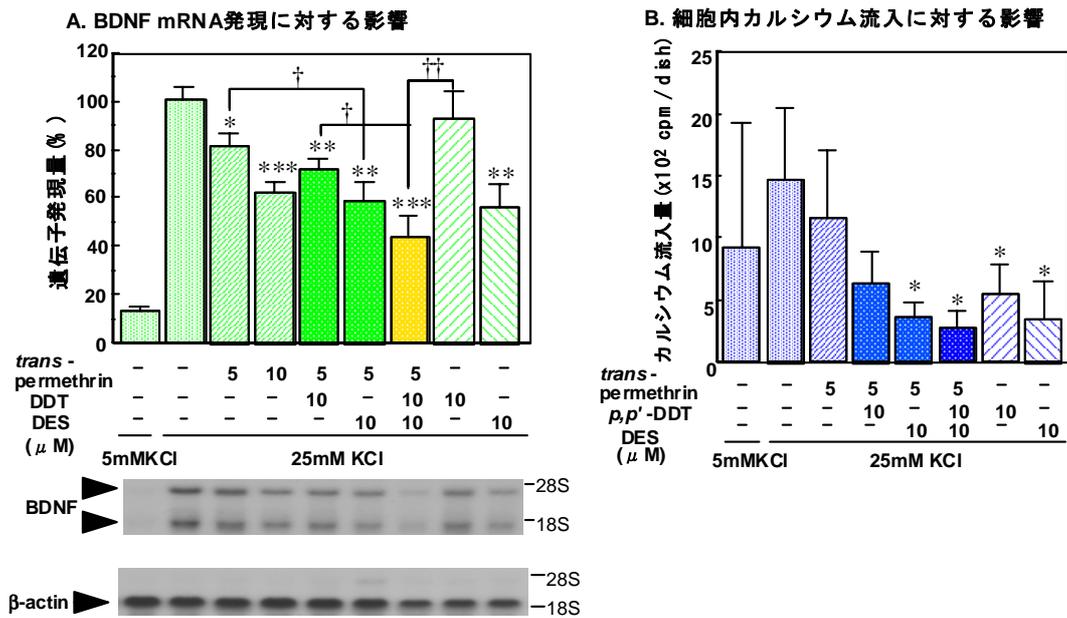


図2. 神経活動依存的な遺伝子発現(A)および細胞内カルシウム流入(B)に対して、ペルメトリン、*p,p'*-DDTおよびDESは相加的な抑制効果を示した。

その結果、ペルメトリン、DDTとDESで前処置すると、複数の化学物質処理によって、Ca<sup>2+</sup>流入および遺伝子発現誘導に対して相加的な抑制効果が認められた。これは、これら化学物質の脂溶性という共通の性質によるものと考えられた。したがって、この事実は、たとえ単独の化合物の体内濃度が毒性を示す濃度より低くても、複数の化学物質が相加的に作用することにより、毒性を発揮する有効濃度に達する可能性のあることを意味している。さらに、これら脂溶性化学物質が共通に細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入を抑制する効果を持つ場合、その毒性効果は相乗的になる可能性がある。即ち、細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入は神経伝達物質の放出、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生、遺伝子発現など様々な細胞内反応に関係しているので、僅かな抑制でもその影響はあらゆる反応系に及び、総合的に相乗的な毒性効果が現れる可能性が考えられるからである(図3)。したがって、単一化学物質の体内濃度だけで毒性評価を行うことは、脂溶性化学物質が共通の作用機構を持っている場合は不適切と言える。

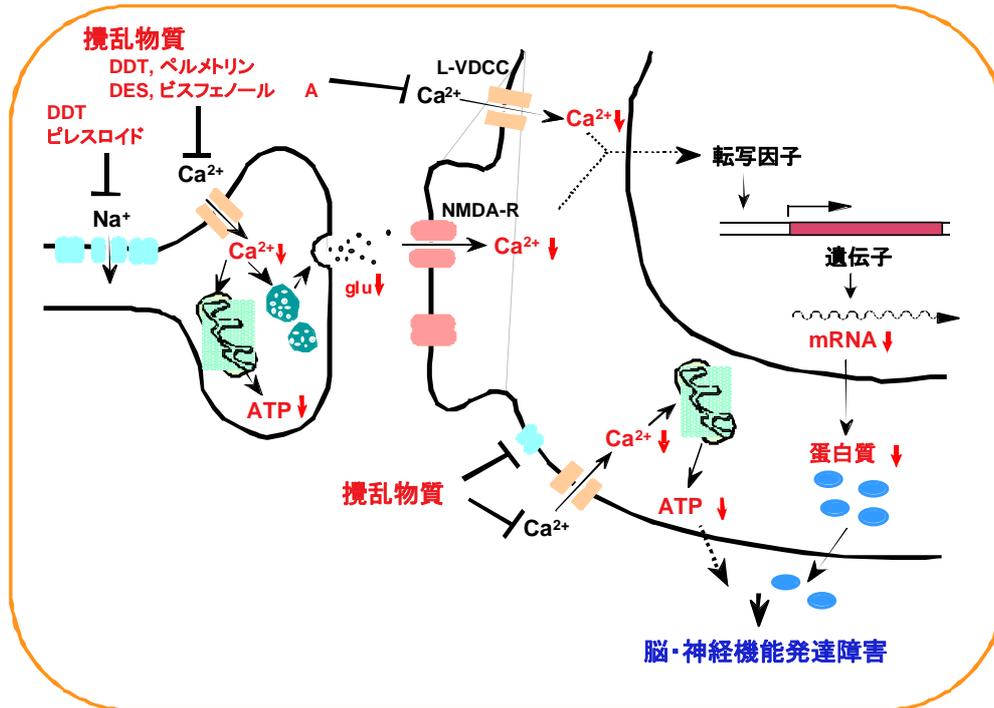


図3. 環境化学物質による  $\text{Ca}^{2+}$  の流入抑制が引き起こすと考えられる神経活動攪乱作用

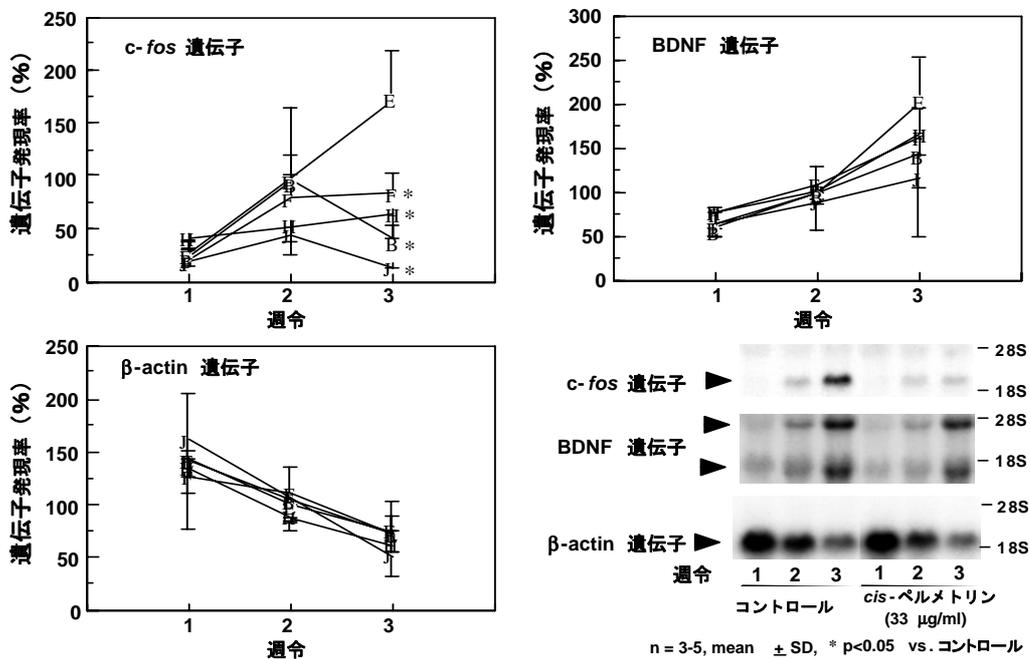


図4. 母親マウスに、出産直後から3週間、ペルメトリンを飲水投与し、1, 2, 3週目に仔マウスの小脳の *c-fos*, BDNF および  $\beta$ -actin 遺伝子発現量を定量した結果、3週目で *c-fos* 遺伝子発現量がペルメトリン摂取仔マウスで減少した。  
E : コントロール、cis-ペルメトリン (H : 0.33  $\mu\text{g/ml}$ , B : 3.3  $\mu\text{g/ml}$ , J : 33  $\mu\text{g/ml}$ ), trans-ペルメトリン (F : 33  $\mu\text{g/ml}$ )

### III) 飲水投与による仔マウス小脳発達時の発現に対する影響

また、この神経活動依存的な遺伝子発現は、げっ歯類における生後の小脳発達に重要な役割を果たすことが知られている。さらに、ペルメトリン等の脂溶性の高い化学物質は、母乳に蓄積しやすく、生まれたばかりの動物では血液脳関門が未熟なため、これらの化学物質は母乳から脳に到達しやすいばかりでなく、薬物代謝酵素の活性が低いため、代謝されにくいことが知られている。そこで私達は、ペルメトリンを親マウスに飲水投与し、哺乳マウスにおける活動依存的遺伝子の脳内発現量変化を調べた。その結果、出生3週目のマウス小脳における *c-fos* 遺伝子の発現が有意に減少した (図4)。

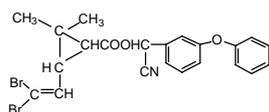
### IV) ピレスロイド系殺虫剤による BDNF mRNA 発現活性化について

本来、ピレスロイド系殺虫剤や DDT は  $\text{Na}^+$  チャンネルの開閉に影響を与え、開放を増加させ  $\text{Na}^+$  tail current を生じさせる。この興奮性の賦与が、無脊椎動物への殺虫効果として知られるものである。しかし、マウス小脳顆粒細胞においては、ピレスロイド系殺虫剤を加えることによって、約  $5 \cdot \text{M}$  以上で抑制効果だけが認められ、興奮性による効果は認められなかった。この興奮性が引き起こされていれば、*c-fos* 遺伝子などの発現は上昇してもよいはずである。この点を検討するために、初代培養系を変えて検討を試みた。

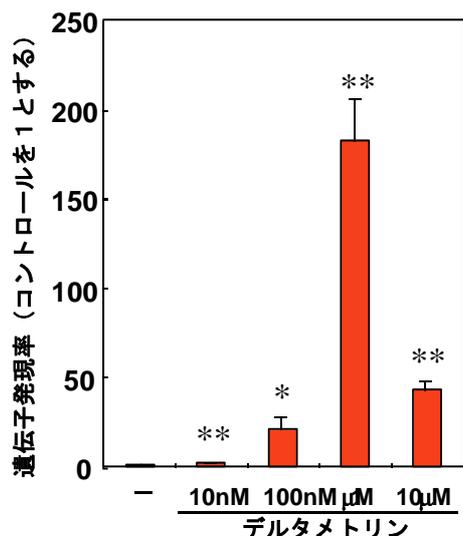
そこで、細胞間で自発的なカルシウム振動の同調が認められ、活動的なシナプスが形成されるラット大脳皮質初代神経細胞高細胞密度培養状況下 (黒田洋一郎博士、川原正博博士との共同研究) で、内分泌攪乱物質が BDNF 遺伝子発現に与える影響を検討した。この培養系では、テトロドトキシン投与で BDNF mRNA 発現が抑制されることから、活動依存的な BDNF 遺伝子発現が起こっていることを認めている。この培地中に BDNF を一過的に加えると、BDNF 遺伝子発現レベルは上昇し、その発現レベルは増加したまま維持された。さらに、この BDNF による BDNF 遺伝子発現誘導は、BDNF の特異的受容体である TrkB の阻害剤である K252a により完全に抑制されたので、TrkB 受容体を介していることが示された。これら事実より、BDNF 遺伝子発現は、自己制御的にコントロールされている可能性が示された。

一方、この培養系において BDNF は、シナプス形成を促進することから、BDNF が活動的なシナプス形成に重要な役割を果たしているものと考えられた。また、この解析系では、BDNF による一過的な刺激で BDNF 遺伝子の二次的誘導の起こることが認められた。この誘導には細胞内カルシウム濃度の周期的変動 (カルシウム振動) が関わっているらしく、この反応系は生体脳における状況を反映している可能性が高い。したがって、この二次的誘導に対する化学物質の影響を調べることは、今後、有効な解析手段を提供することになるだろう。

そこで、このような活動依存的なシナプスが形成される条件下で、環境化学物質のBDNF 遺伝子発現に対する影響を検討した。その結果、ピレスロイド系殺虫剤デルタメトリンがBDNF exon III-Vの mRNA 発現量を顕著に増加させた (図5)。



デルタメトリン

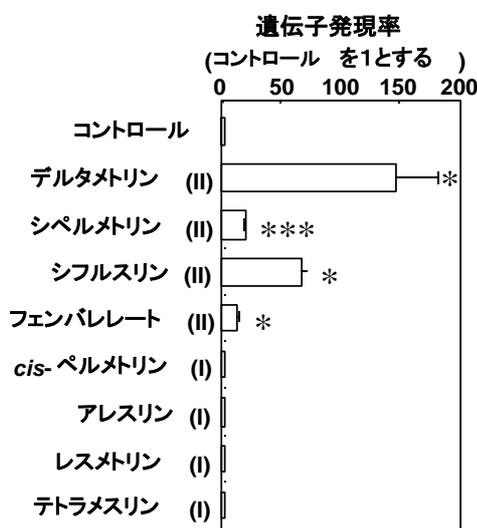


n=3, mean±SD, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001 vs. コントロール

図5. ラット大脳皮質初代培養細胞において、1µMデルタメトリン添加3時間後に、BDNF exon III-V遺伝子発現量は顕著に増加した。

さらに、BDNF プロモーターIIIも、デルタメトリンで活性化された。これは、ラットにデルタメトリンを投与し、海馬でBDNF 遺伝子および蛋白質の発現量が上昇したという報告と一致している。

また、デルタメトリンを培地中から除いてもその発現誘導が高く維持されており、阻害剤の実験から、この発現誘導は、電位依存性のカルシウムチャンネルを介した細胞内カルシウム流入によることが明らかとなった。さらに、ピレスロイド系殺虫剤のうちα-シアノ基をもつタイプ(type II)であるシペルメトリン、シフルスリン、フェンバレートでも有意な発現誘導が認められた(図6)。これら事実から、環境化学物質には神経活動依存的なBDNF 遺伝子発現を介して、シナプス可塑性に影響を及ぼす可能性のあるものが存在することが考えられた。



(I): タイプ I (シアノ基を有しない), (II): タイプ II (α-シアノ基を有する)  
mean±SE, n=3, \* p<0.05, \*\*\* p<0.001 vs. コントロール

図6. ピレスロイド系殺虫剤のうち、デルタメトリン、シペルメトリン、シフルスリン、フェンバレートにより、BDNF exon III-V 遺伝子発現量が有意に上昇した。

#### V) グルホシネートによる神経活動依存的遺伝子発現に対する影響

さらに、現在、遺伝子組み換え作物の除草剤として使用されているグルホシネートの

c-fos および BDNF exon III-V 遺伝子発現に対する影響を検討している。グルホシネート単独では、発現誘導が認められなかったが、グルタミン酸による c-fos 遺伝子発現誘導に対して、グルホシネート前処置により、さらに発現が上昇した(図7)。BDNF exon III-V 遺伝子発現に対しても

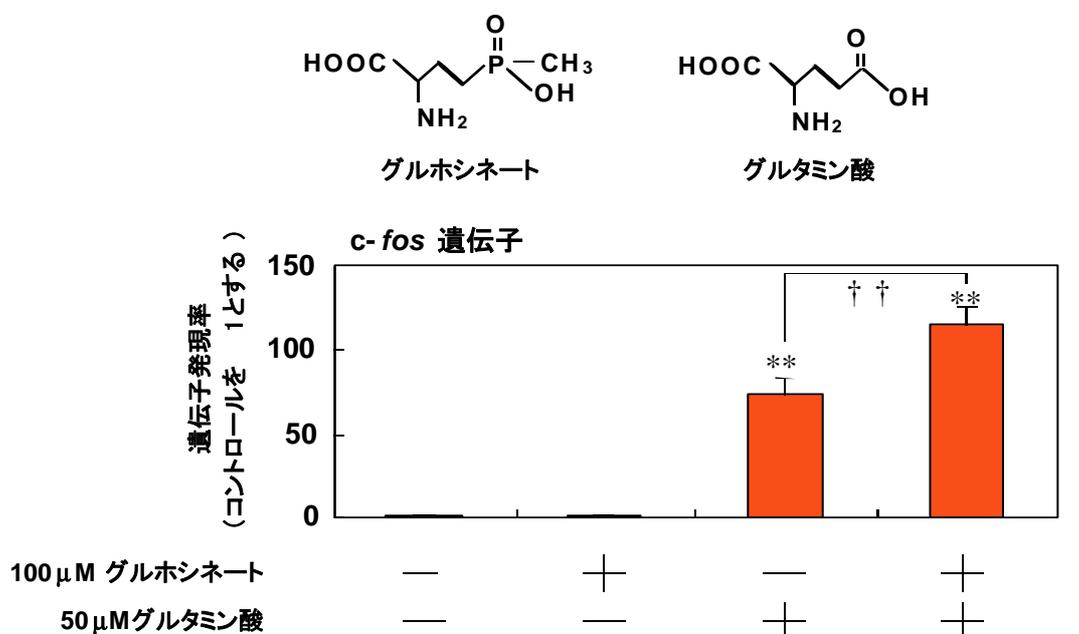


図7. グルホシネート単独では遺伝子発現を誘導しなかったが、グルタミン酸刺激による発現誘導をさらに増強した。 mean ± SD, n = 3, \*\* p<0.01 vs. コントロール, †† p<0.01

同様の傾向を示している。グルホシネートの化学構造は、グルタミン酸に酷似しており、神経細胞が過剰に興奮している可能性が考えられた。実際に、動物への投与では攻撃性が増したという報告がなされている。グルホシネートの検討は、今まで動物実験でしか行われておらず、NMDA レセプターの関与は指摘されていたが、その機構は不明であった。今回の結果によって、グルホシネートはグルタミン酸レセプターの活性を促進し、その影響は遺伝子発現レベルにまで及ぶことが示された。今後、その詳細な機構解明を行う。最近、グルホシネートは遺伝子組換え植物栽培における除草剤として使用されている。したがって、その環境汚染は今後深刻化していくものと思われ、最近問題となっている、子供たちの異常行動との関係からも、今後さらに詳しく検討していく必要がある。

## B. 甲状腺ホルモン依存的なシナプス形成に関する遺伝子発現面からの解析

すでに黒田洋一郎チームの研究成果から、ラット大脳皮質初代神経細胞培養系に甲状腺ホルモン T4 投与でシナプス形成頻度の増加の起こることが認められている。また、クレチン症でも明らかのように、生後の脳・神経系発達には甲状腺ホルモンに依存した時期があり、この過程にも多くの遺伝子の発現が関与していることが予想される。一方、ダイオキシンや polychlorinated biphenyl (PCB) は甲状腺機能低下を引き起こすことから、その影響は甲状腺ホルモン低下を通じて脳・神経機能発達に及ぶことが危惧される。そこで、甲状腺ホルモンがシナプス形成頻度を増加させたメカニズムを、特に遺伝子発現面から検

討することを試みた。

齧歯類の小脳発達で、生後 1~2 週目にかけてニューロトロフィン-3 (NT-3) mRNA の発現が一過的に高まる。これに代わって、2~3 週目には BDNF mRNA の発現が高まってくる。この NT-3 mRNA の発現は、甲状腺機能低下ラットにおいては認められない。したがって、NT-3 遺伝子の活性化には甲状腺ホルモンが何らかの形で関わっていることが予想されていた。この観点から、NT-3 遺伝子プロモーターの甲状腺ホルモン応答性を検討したが、明確な応答性は認められなかった。現在の所、甲状腺ホルモンレセプターによる直接的な関与の可能性は低いと言える。これとは別に、いくつかのシナプス関連遺伝子の発現を調べ、甲状腺ホルモンの細胞生存効果との関連を検討してきた。

#### I) NT-3 遺伝子プロモーターの解析

甲状腺ホルモンによる制御機構を探るために、NT-3 遺伝子プロモーター解析を行った。現在の所、上流-80 ~ -105 に存在する二つの GC-box が基本転写開始に関与していること、この GC-box には Sp-3, Sp-4 が結合することを明らかにしている。また、-130 ~ -120 に存在する GC-box は強い抑制効果を及ぼすこと、さらには、-1100 ~ -1400 に存在する活性がこの抑制効果を抑えていることも明らかにしている。

#### I I) シナプス関連遺伝子発現に対する影響

ラット大脳皮質初代神経細胞、マウス小脳顆粒細胞ともに甲状腺ホルモン T3, T4 によって強い生存効果が認められた。この条件下で、シナプトフィジン、シナプトタグミン mRNA 及び蛋白質の発現を調べた所、両者ともに増加していた (図 8)。

また、T3, T4 によって神経突起伸長が促進され、細胞どうしの接触頻度の増加がシナプス形成頻度の増加に関係していることが考えられた。そこで、細胞密度の影響を検討した所、細胞密度が高いほど発現レベルは増加した。細胞間接触の関わりが考えられたので、Notch 及び  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) 遺伝子の発現を検討した。その結果、Notch の発現は培養経過とともに減少し、APP の発現は増加した。生後の脳切片の免疫染色でも、Notch の減少、APP の増加が認められた。また、APP の発現は T3, T4 で促進される傾向にあった。

T3, T4 投与で、NMDA (N-methyl-D-aspartate) レセプターサブタイプ NR2C の発現が顕著に増加した。さらに、*in situ* ハイブリダイゼーションによって NR2C のラット大脳皮質細胞における発現を検討した結果、T3, T4 投与で発現量の増加が認められた。

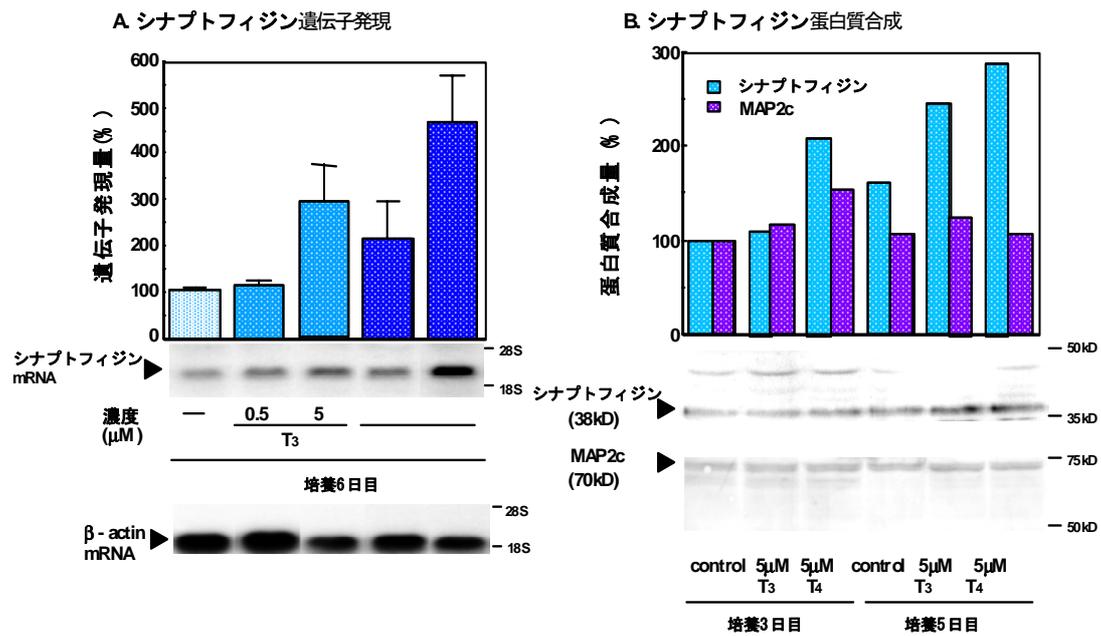


図8. ラット大脳皮質初代神経細胞において、甲状腺ホルモンによりシナプトフィジン遺伝子および蛋白質発現は増加した。

### C. BDNF 遺伝子発現に影響を与える環境化学物質の多検体スクリーニング系の開発

BDNF 蛋白質は、末梢神経に比べて中枢神経系での発現量が多いことが知られており、ラットの海馬では、NGF の 100 倍、NT-3 の 2 倍と高い発現量を示している。また、アルツハイマー病患者の脳では、BDNF 蛋白質の発現低下が確認されており、BDNF は、アルツハイマー病、パーキンソン病などの神経変性死に対して神経栄養因子作用を示すことが知られている。

そこで、環境化学物質の脳機能に対する影響を広範に検討するために、BDNF 遺伝子プロモーターⅢの活性を指標に、化学物質の多検体スクリーニング系の構築を試みた(図9)。

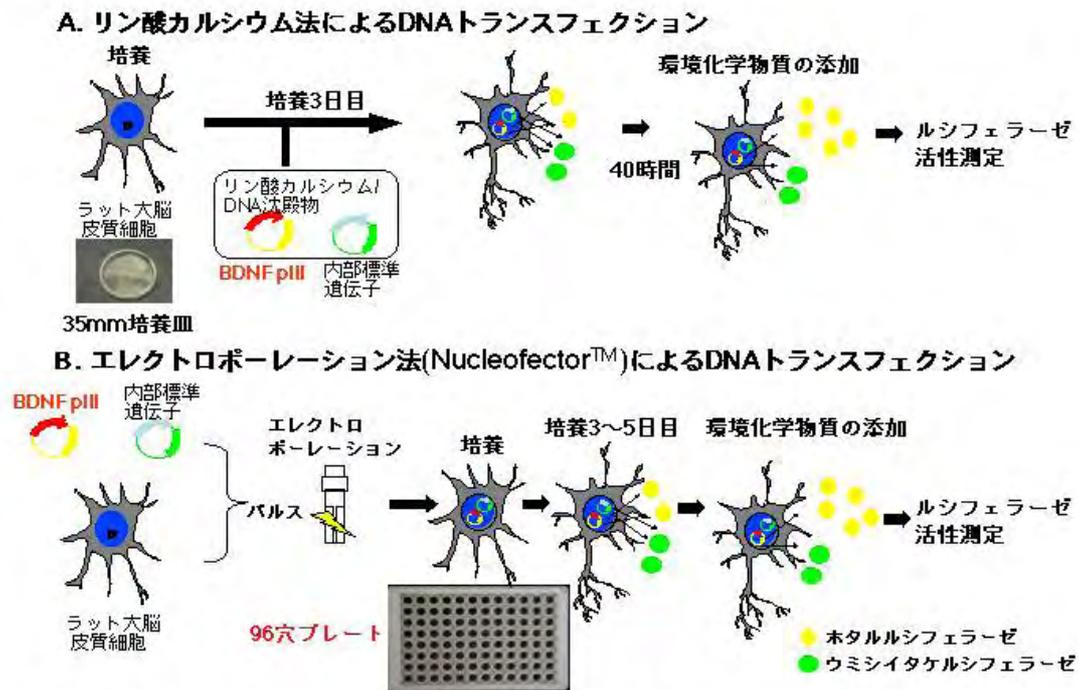


図9. プロモーター活性を指標とした多検体スクリーニングを行うため、従来のリン酸カルシウム法(A)ではなく、エレクトロポレーション法(B)を用いた。

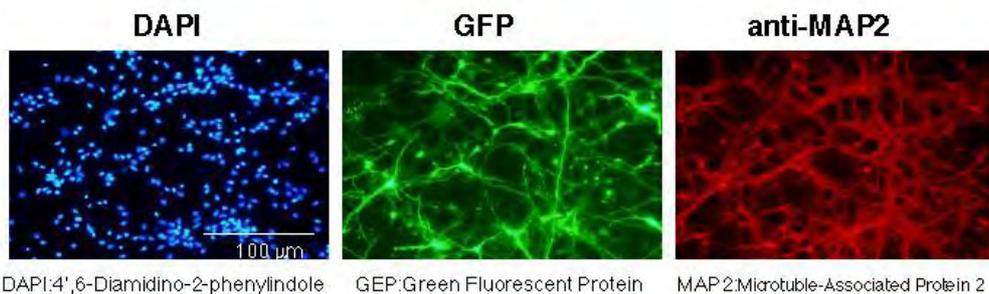


図10. エレクトロポレーション法で神経細胞にプラスミドが導入されていることを確認するため、GFP 遺伝子を導入後、DAPI染色で全細胞数を、GFP発現細胞で遺伝子導入細胞数を、抗MAP2抗体染色で神経細胞数を求めた。

その結果、このエレクトロポレーション法による遺伝子導入効率は、約18%であり、導入された細胞のうち、約90%が神経細胞であった(図10)。導入後、96穴培養プレートに細胞を均一に巻き、薬剤投与後に培養を行い、培地を除いてLysis Bufferを加え細胞を壊す。この96穴プレートをそのまま96穴多検体ルミノメーターに設置しルシフェラーゼ活性の測定を行った。また、単一薬剤の影響を調べる場合には、35mm培養シャーレに培養した細胞を用いた。

BDNFプロモーターIII活性に対するBDNFおよびデルタメトリンの影響を測定したところ、リン酸カルシウム法を用いた場合と同程度のプロモーターの活性化が認められた(図11)。この活性化の傾向は、図4、5に示した定量的PCRによる測定結果と一致するものであった。

したがって、この96穴多検体スクリーニング系はBDNF遺伝子発現に影響を及ぼす化学物質の検索に基本的に適用可能と思われる。しかし、現在の所、いくつかの検討すべき点も明らかになっている。一つ目は、インターナルコントロール用ベクターとして加えているウミシイタケルシフェラーゼの活性が、測定の際に増加気味になるということである。二つ目は、グリア細胞への遺伝子導入も行われていて、グリア細胞からのシグナルも同時に拾ってしまう可能性が高いということである。これら問題点に関しては、培養条件、測定時間などの検討の他に、発現ベクターの改良も必要とされる。現在、その条件検討と、神経特異的サイレンサーを導入した神経細胞特異的発現ベクターの作製中である。今後、これら培養条件やレポータープラスミドの改良を行うことにより、感度と精度の向上を図りたいと考えている。

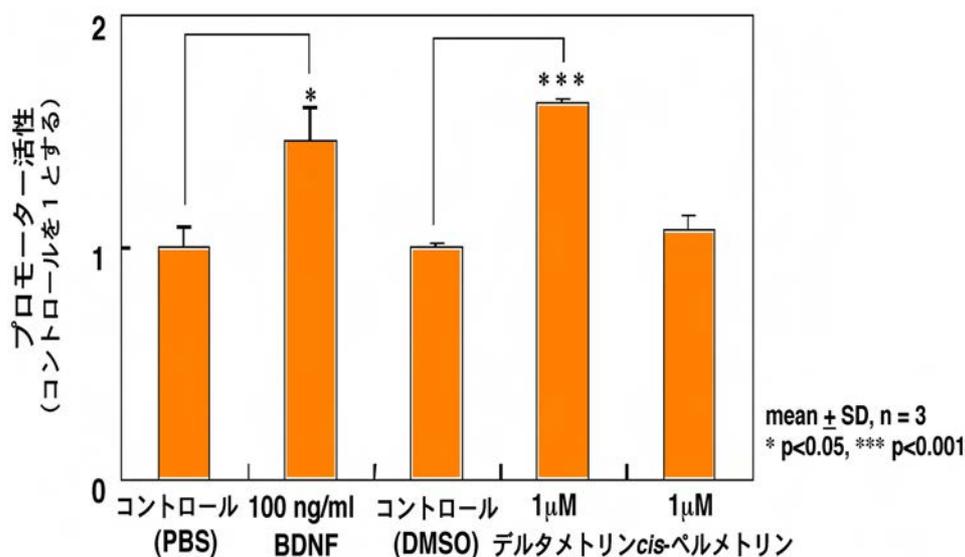


図11. エレクトロポレーション法にてDNAトランスフェクション後、96穴プレートで培養し、プロモーター活性を測定した。その結果、BDNFおよびデルタメトリンにより、プロモーターの活性化が認められた。

## (2) 研究成果の今後に期待される効果

### 今後の研究の予定

カルシウムシグナルで活性化される活動依存的な遺伝子発現制御系は、神経機能発現に中心的な役割を果たしていることが明らかになりつつある。この発現制御系の障害は、アルツハイマー病やポリグルタミン病における神経変性とも関係している可能性がある。したがって、この発現制御系の分子メカニズムの詳細な検討をさらに押し進める。同時に、内分泌攪乱物質が神経活動に与える影響を、特にイオンチャネル、活動依存的な遺伝子発現に注目して解析する (図12)。

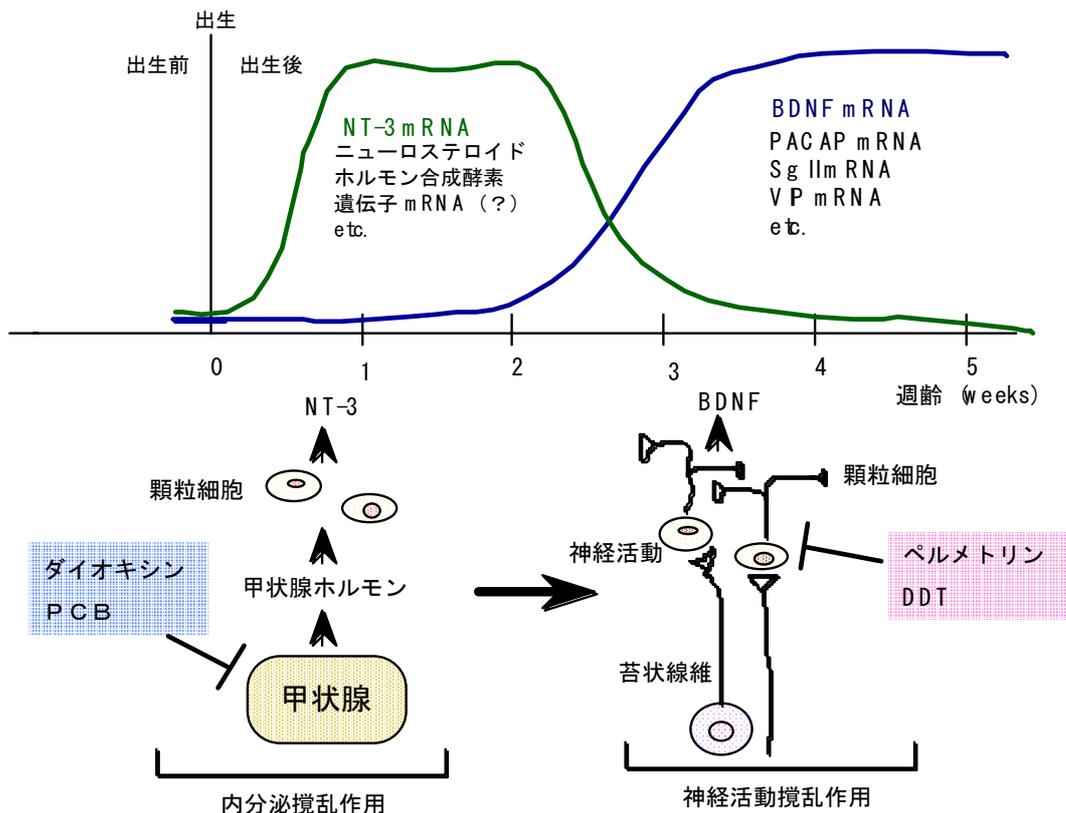


図1 2. 生後の小脳発達には甲状腺ホルモン及び神経活動依存的な側面を有し、それぞれに環境化学物質の影響を受ける可能性がある。

本研究でも明らかになったように、デルタメトリンのように BDNF 遺伝子発現を顕著に増加させる殺虫剤や、グルホシネートのようにグルタミン酸の NMDA レセプターへの働きを強めるような除草剤の存在することが明らかになった。これら化学物質の作用は、特に生後の脳・神経系発達には障害性を与える可能性がある。それは、生後の脳・神経系発達では、ある割合でニューロンのアポトーシスが起るが、これら化学物質が脳内に蓄積されると BDNF のニューロトロフィックな作用でこのアポトーシスの過程に僅かな狂いが生じる可能性が考えられるからである。また、ニューロン間のシナプス形成も過剰に行われる可能性も考えられる。このような影響は、脳機能発達に僅かな歪みを生じ、こどもたちの行動異常を招く恐れがある。この危険性は、今まで指摘されたことのない新たなものである。このような観点からの研究展開を、今後、精力的に押し進めていく必要がある。

一方、甲状腺ホルモンによるシナプス形成頻度の増加の過程には、おそらく複数制御系のカスケード的な関わりが考えられる。この中には、神経活動依存的な応答系の立ち上がりも含まれるものと考えられる。したがって、甲状腺ホルモン及び神経活動依存的な神経系発達は、一連の流れの中で捉えることが可能である。図1 2に示したように、生後の齧歯類の小脳発達では、1-2週目に甲状腺ホルモンの作用で NT-3mRNA の発現が高い時期が、2-3目以降は BDNFmRNA の発現が高く誘導される。この NT-3 と BDNF 遺伝子発現のスイッチングは、おそらく苔状線維からのグルタミン酸入力による神経活動依存的にコントロールされているものと考えられる。このように生後の小脳発達では、甲状腺ホルモンと神経活動依存的な発達は重要な関わりを持っている。現在、ラット大脳皮質初代神経細胞培養系においても、これら甲状腺ホルモンと活動依存的な応答系を一部反映できているものと考えられる。今後、以上の観点からの初代培養系を用いた、化学物質の与える影響の解析は重要と思われる。

## 研究成果の見通し

以上の研究成果により、今後、神経活動攪乱作用とも呼ぶべき、内分泌攪乱物質の活動依存的な脳・神経機能発達への影響が明らかになるものと思われる。これは、脳・神経系発達に対する新たな警笛である。現在、自閉症や精神遅滞、ADHD やアスペルガー症候群のような幼児脳発達における障害の増加が指摘されている。本研究でも指摘したように、殺虫剤や除草剤の幼児脳への混入によって BDNF 発現異常が起り、生後の脳・機能発達に狂いが生じる可能性が考えられる。それは私たちがまだ知らない所ですすでに進行していて、自閉症のような症状が社会的に僅かずつ増えているのかもしれない。このことは、これまで危険視されてきたダイオキシンや PCB による障害性とは異なった形で、殺虫剤や除草剤の危険性を捉える必要のあることを意味している。これは新たな神経毒性学の構築にも通じるもので、今後、本研究で得られた知見などをもとに、具体的な予防対策の検討が必要とされる時期が来るものと思われる。

### 3. 2 内分泌かく乱物質など環境化学物質が甲状腺ホルモン依存性遺伝子発現など甲状腺ホルモン系を介して脳の発達に与える影響（鯉淵典之グループ）

#### (1) 研究内容及び成果

##### A. 発達期小脳における転写共役因子 SRC-1 発現の変化

TH が転写を調節する際には SRC-1 などの転写共役因子と結合する必要がある。一方、甲状腺ホルモン (TH) の発達期中枢神経系に対する作用は臨界期にほぼ限られることが知られているが、甲状腺ホルモン受容体の発現は成熟後の方がむしろ多い。また、外顆粒層に存在する小脳顆粒細胞のように TH 受容体 (TR) の発現はあるものの、甲状腺ホルモン不応の細胞がある。これらの TH 感受性変化の原因のひとつに転写共役因子発現が変化している可能性がある。そこで免疫組織学的にラット発達期小脳における SRC-1 の局在を解析すると共に、ウエスタンブロットにより定量的な発現変化の解析を試みた。

図 1 (図は全てこの項の最後にまとめて表示) にラット小脳における SRC-1 タンパク免疫組織化学の結果の一例 (生後 15 日齢) を示す。SRC-1 はプルキンエ細胞に強い発現を示した。また、内顆粒層にも弱い発現を示した。しかし、外顆粒層は 15 日齢になるまで陽性細胞は見られなかった。15 日齢においても外顆粒層における陽性細胞は premigratory zone に限局しており、proliferative zone には陽性細胞は見られなかった。

一方、小脳発達に伴う SRC-1 タンパクの発現変化を Western blotting により解析したところ、図 2 に示すようにもっとも TH 作用の強い P15 に最大の発現となった。

以上より、ラット小脳において TR はほぼ全ての細胞に発現しているが、TH の感受性を決定しているのはむしろ SRC-1 の発現である可能性が高いと思われた。また、TH の感受性の決定にも SRC-1 の高発現が関与している可能性が高いことがわかった。

##### B. 先天性甲状腺機能低下ラットを用いた運動機能異常の解析

先天性甲状腺機能低下症や TR 変異による甲状腺ホルモン不応症では自発行動量は低下するものの、新奇性の刺激にさらされると hyperactive になることが示唆されている。しかし、母体への PTU 投与などによる薬物誘発性の先天性甲状腺機能低下では、母体も甲状腺機能低下となり、子育て行動も変化する。従って、正常な親に育てられた仔と比較すると行動異常は仔自体の甲状腺機能低下と母親より受ける子育て行動のへんかの複合的な影響を受けることになる。そこで我々は先天性甲状腺機能低下症ラット (rdw) を用いて子育て行動変化の影響を受けることなしに、純粋に仔の甲状腺機能低下による行動変化を解析する方法を開発した。

homozygote の rdw オスマットに出生直後より生理的量の甲状腺ホルモンを投与して飼育 (genotype は hypothyroidism だが, 外因性 T4 により正常に育つ) し, heterozygote (甲状腺機能正常) のメスと掛け合わせて仔を得た。仔は 1:1 の割合で homo と hetero が生まれる。これらのラットを用いて生後 60 日齢で Open field による行動量測定と Rota Rod による小脳機能測定を行った。

Open field の結果を図 3 に示す。5 分間の測定の結果, rdw ラットは対照群 (hetero) よりも行動量が多い傾向になった (A)。特に測定開始の最初の 1 分で差が顕著になった。

また, 図 4 で示したように, Rota Rod により小脳機能を測定したところ, rdw ラットでは回転棒の上に乗ることはほとんど不可能であった。本実験では同時に筋力測定も行っているが, 体重あたりの筋力には対照群と rdw ラットの間で差は無く, 回転棒から転落する原因は小脳失調のためであると思われた。

以上より, 先天性甲状腺機能低下ラットは新奇性の環境下では多動を示すことがわかった。

C. Ras-Sos Yeast Two Hybrid 法を用いた新規甲状腺ホルモン受容体結合タンパクの同定  
1 で述べたように, 発達期の脳における TH の感受性には明らかな臨界期が存在するが, TR の発現量は成熟した脳のほうが多い。また転写共役因子 SRC-1 の発現量は臨界期に一過性の上昇を示すものの, それだけで TH 感受性変化を説明することは出来ない。すなわち, 臨界期特異的に TR 作用を促進する共役因子, または臨界期の前後に TR 作用を抑制する共役因子が発現している可能性がある。我々は Ras-Sos Yeast Two Hybrid System を用いてそのような因子の同定を目指した。

受容体を介する転写調節に関与する共役因子は多くが受容体のリガンド結合領域 (ligand binding domain; LBD) に結合することが知られている。そこでベイト (結合タンパク) として甲状腺ホルモン受容体 (TR)  $\beta$ 1-及び TR と 2 量体を形成するレチノイド X 受容体 (RXR)  $\beta$  のリガンド結合領域 (LBD) を用いた。これらの cDNA をヒト Sos cDNA の C-末端に導入し, 大腸菌内で大量培養を行い, cDNA を抽出した。イーストの cDNA ライブラリーとしてはヒト胎児小脳由来 cDNA ライブラリーを用いた。リガンドとして TR  $\beta$ 1 に対しては Triac (甲状腺ホルモンアゴニスト) を, RXR  $\beta$  に対しては 9-cis retinoic acid を用いた。

ライブラリーへ上記 Sos 結合 cDNA と cDNA ライブラリーを導入後, リガンド存在下, または非存在下でイーストを培養した。イーストはベイトと及び DNA ライブラリーより発現したタンパクとの間でタンパク-タンパク結合が生じたときのみ 36°C で発育するように修飾を加えた。

培養後, 陽性コロニーを採取し, さらに数回のスクリーニングの後, 確定した陽性コロニーを大量培養した。そしてプラスミド DNA を採取し, 塩基配列の解析 (外注) を実施した。全鎖長を同定後, 機能を確定するために, 下で述べる reporter gene assay を実施した。

スクリーニングの結果, RXR と特異的に結合する cDNA がクローニングされた。この cDNA 断片の塩基配列を基にデータベース解析した結果, ovarian cancer overexpressed (OVCOV)-1 の一部と一致した。OVCOV-1 は, 全長 365 アミノ酸 (分子量推定約 40 kDa) で, 核内ホルモン受容体結合領域である LXXLL モチーフを 3 つ含む (図 5)。マウス OVCOV-1 は全身的には胎生 7.5 日に発現が強く, 以後発現がわずかになり, 時期特異的な発現様式を

示す。中枢神経系発達期における発現パターンについては報告がない。今後、発達に伴う脳における発現変化を詳細に解析する予定である。

我々は、この遺伝子の全塩基配列のクローニングを試みた。まず、ヒト小脳腫瘍由来の TE671 細胞から得られた total RNA 及び、胎盤由来の total RNA を用いて RT-PCR 法を行ったが、目的のバンドは得られなかった。このことからこれらの組織での発現量は低いことが推定された。一方、コンピューターサーチにより、Open Biosystems 社より、human OVCOV-1/pOTB7 (GenBank ID: BC025277) が購入可能であることがわかった。そこで本品を購入し、発現ベクター等の機能解析用コンストラクトを作製した。

OVCOV1 を発現ベクター pcDNA I に組み込み、transient transfection 法を用いて reporter gene assay を実施したところ、OVCOV1 は濃度依存性に TR を介する T3 による転写を抑制した (図 6)。TR ばかりではなく、GR や RXR を介する転写も抑制した (データは示していない)。このことから、OVCOV1 は核内ホルモン受容体非選択的に転写抑制因子として機能している可能性が示唆された。

#### D. PCB による甲状腺ホルモン受容体機能への修飾作用

我々は既に、水酸化 PCB により TR を介する TH による転写作用が抑制されることを報告した。作用は濃度依存性が低く 100 pM の PCB と 5  $\mu$ M の PCB の間の抑制の程度には大きな差は無かった。そこで、PCB の作用機構について検討を加えた。同時に PCB と構造が類似しているダイオキシン類により抑制が生ずるかどうかもあわせて検討した。

##### (1) レポーターアッセイ

CV-1 細胞を大量培養後、24 穴培養プレートに分注して少量培養し、底の 70%程度を細胞が占めるまで培養の後、リン酸カルシウム法を用いて TR  $\beta$  1 及び SRC-1 発現ベクターやレポータープラスミドを導入した。導入 24 時間後に培地を交換し、甲状腺ホルモン (T3) および PCB やダイオキシン類を投与し、24 時間インキュベートした。そして細胞を採取後、細胞抽出液を採取し、ホタルルシフェリンと ATP を加え、ルミノメーターにて化学発光させることによりルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は遺伝子の転写活性と相関するため、ルシフェラーゼ活性の変化をもって、転写活性の変化とした。

##### (2) プルダウンアッセイ

プルダウンアッセイのために、上記 in vitro translation kit により、<sup>35</sup>S 標識メチオニンを用いて転写共役因子の SRC-1 や NCoR 等の核内受容体結合部位のタンパクをそれぞれの cDNA から合成し、アイソトープ標識タンパクを得た。また、Glutathion-S-Transferase (GST) と TR  $\beta$  1-LBD のキメラ cDNA を作製し、大腸菌の中でタンパクを合成させた。大量培養の後、大腸菌よりタンパクを抽出し、グルタチオンビーズを用いて GST-TR キメラタンパクを精製した。そして、標識タンパクと GST-TR タンパクをビーズ存在下でチューブ内で混合し、数回の洗浄の後、熱処理をおこない、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。ゲルを乾燥の後、BAS2000 を用いてオートラジオグラフィーを行い、バンドを検出した。

##### (3) electrophoretic mobility shift assay (EMSA) : ゲルシフトアッセイ

TR は 2 本鎖 DNA 上の TRE を認識して、DNA に結合する。TRE を含む 2 本鎖オリゴヌクレオチドは、相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを 2 本まず別個に合成し (外注)、熱変性した後、室温にてハイブリダイズさせ、作成した。<sup>32</sup>P-CTP によりこの 2 本鎖オリゴヌクレオチドの 3' 末端を標識した。また、上記と同様に in vitro translation により TR  $\beta$  1 タンパク (全鎖長を含む)、SRC-1 や NCoR の核内ホルモン受容体結合領域を含むタンパク断片を合成した (放射線未標識)。標識オリゴヌクレオチドと合成タンパクをチューブ内で反応させた後、アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。そして上記と同様にゲルを乾燥後、BAS2000 を用いてオートラジオグラフィーを行い、バンドを検出した。

今回、抑制を生ずるメカニズムについて、1)PCBのT3に対する競合阻害、2)基本転写因子群に対するPCBの影響、3)PCBによる細胞死、4)促進型転写共役因子SRC-1とTRの結合へのPCBの影響、5)PCBによる抑制型転写共役因子N-CoRの結合の誘導、6)TRとDNAの結合に対するPCBの影響の6つの仮説を立てて検討した。

まず、線維芽細胞由来の細胞株CV-1細胞を用いて、TR $\beta$ 1発現ベクターとTREをプロモーター領域に含むレポーターベクターを細胞内に導入し、種々のPCB同族体を用いてReporter gene assayを実施したところ、上述の様にPCBによる転写抑制効果は濃度依存性が低く、それぞれのPCB同族体において、この傾向には変化がなかった(図7)。また、T3非存在下ではPCBは転写に影響しなかった。また、図には示さないが、ダイオキシン同族体、ジベンゾフラン同族体のいずれもTR作用へ影響を及ぼさなかった。

さらにトリパンブルー染色を用いた細胞の生死判定においてPCB添加は細胞死を誘導しなかった(図8)。従って、1)~3)の仮説は棄却された。

さらに4)~6)について検討を行った。まずTRとSRC-1の結合に及ぼすPCBの作用を解析したところ、 $10^{-7}$  MのT3存在下に誘導されるTR $\beta$ 1とSRC-1の結合を $10^{-8}$  MのPCBは阻害しなかった(図9A)。

また、N-CoRは通常はT3非存在下のみでTRと結合し転写を抑制し、T3によりTRから解離する。もしT3存在下でPCBによりN-CoRが結合すると転写は抑制される。しかし、T3存在下に、PCBはN-CoRのTRとの結合を誘導しなかった。(図9B)

さらにTRとTREの結合に対する影響をelectrophoretic mobility shift assay (EMSA)を用いて解析したところ、 $10^{-6}$  MのT3存在下で $10^{-8}$  MのPCBによりTR/RXRヘテロダイマーとTREの結合は約50%に低下した(図10)。

また、T3非存在下におけるTRホモダイマー及びTR/RXRヘテロダイマーとTREの結合も同様に低下した。レポーターアッセイではT3比存在下ではPCBは転写に影響を及ぼさないことから、ゲルシフトの結果は若干異なる。そこで、TR-共役因子複合体においても解離が生ずるかどうか検討したところ、SRC-1-TR複合体(コアクチベーター)はPCBによりTREから解離したがN-CoR-TR複合体は解離しなかった(図は省略する)。

以上から、PCBによるTR転写活性の抑制はTRと転写共役因子結合の変化によるのではなく、TRとTRE結合の部分的な阻害により起こることが示唆された。

#### E. PCBによる神経細胞膜を介した遺伝子発現促進機構

我々は、以前、PCBの急性投与により静止膜電位が上昇し、その一方で細胞外からの化学感受性(H<sup>+</sup>刺激)が低下することを確認した。今回、さらに脱分極を生ずるメカニズム、特に細胞内カルシウム濃度の変動を解析した。また、脱分極によりimmediate early geneであるc-Junの発現変化を解析した。

##### (1) 細胞内カルシウム濃度変化の測定

延髄腹側表面(VMS)には化学受容細胞が存在し、脳脊髄液pHの低下を検出して呼吸中枢の興奮・換気量の増加を引き起こすことが知られている。我々はVMSには細胞外pH低下に応じ脱分極する細胞があり、PCBがH<sup>+</sup>感受性細胞の静止電位を脱分極方向させ、H<sup>+</sup>による興奮性は減弱させることを報告した(投稿準備中)。

妊娠ラットを購入し、出産を確認した後、1~3日齢の仔ラットを断頭屠殺し、脳を摘

出した。そして延髄腹側表面 (VMS) 領域を切り出し、トリプシン処理により細胞を分離後、スライドガラスの上に3-7日間培養した。実験当日は、細胞内カルシウム測定のための蛍光プローブ (Fluo-3-AM) を培養液中に加え60分間インキュベートし、その後倒立型蛍光顕微鏡のステージ上に設置したチェンバー内に移した。そしてコントロール及び PCB 存在下の蛍光イメージ像を2分間隔で経時的に記録した。得られたイメージから解析ソフト (Mac Scope) によって蛍光強度を測定した。

PCBによる神経細胞膜への作用の解析のためには、他の文献を参考に、従来 Aroclor1254 を用いていたが、先行する転写調節の実験において、水酸化 PCB (PCB-5005) がより低濃度で TR を介する転写抑制効果があることがわかり、また、同族体の間でも作用に差があった。そこで、膜に対する作用にも同族体の間で差がある可能性を考え、転写調節系で影響の強かった PCB-5005 を用いた。また、カルシウム濃度変化がどのようなメカニズムにより生じているのかを検討するため、L型カルシウムチャンネルブロッカーであるニモジピンも用いた。これらの物質を所定の濃度で培地に添加し、蛍光強度の変化を測定した。

コントロール及び PCB 存在下の蛍光イメージ像を記録したところ、 $10^{-8}$ M 水酸化 PCB を加えると蛍光強度の上昇を示す細胞が観察された。この上昇は、約 60 分間持続した後にコントロールレベルに戻った。このことは水酸化 PCB による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇を意味する。また、培養細胞を予め L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害剤である Nimodipine ( $10^{-5}$ M) を含む溶液で灌流すると水酸化 PCB による細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇が阻害された (図 1 1)。

以上より、低濃度 ( $10^{-8}$ M) の水酸化 PCB が神経細胞の L 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの阻害剤を介するカルシウム流入に影響を与えている可能性のあることがわかった。

## (2) 細胞外刺激により発現する転写因子 c-Jun の PCB による発現誘導

PCB により細胞膜脱分極や細胞内カルシウム濃度上昇が見られた。そこで、細胞外刺激により発現し、様々な機能を調節する遺伝子の発現を解析した。特に、Activator protein-1 (AP-1) 転写因子の構成成分である c-Jun は紫外線、酸化ストレス、サイトカインなどの細胞外刺激により発現することが知られている。さらに c-Jun は発癌プロモーターを始めとして様々な細胞内の遺伝子発現を調節する。そこで我々は PCB (4-OH-2', 3, 3', 4', 5'-pentachlorobiphenyl) と c-Jun 発現の相関を検討した。

培養 PC-12 細胞 (ラット副腎髄質由来の神経株細胞) を培養し、70% 程度の細胞密度になった時点で、 $10^{-8}$ M から  $10^{-5}$ M の PCB を添加した。添加後、所定の時間の後、細胞を採取し、粗抽出液を調整し、アクリルアミドゲルにて電気泳動した。泳動後、タンパクをニトロセルロース膜に転写し、乾燥後、抗 c-Jun 抗体と約 1 時間反応させた。そして洗浄後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体と反応させ、その後、化学発光法により c-Jun のバンドを検出した。ロシュ・ダイアグノスティクス社の化学発光・蛍光検出用イメージ・アナライザーを用いて蛍光強度を測定し、相対的なタンパク発現の変化を測定した。また、抗 GAPDH 抗体 (全ての細胞に普遍的に一定量存在し、種々の処置によって大きく変化しないタンパク) をもちいて、同様にウエスタンブロットを行い、泳動タンパク量を標準化した。

培養 PC-12 細胞 (ラット副腎髄質由来の神経株細胞) に  $10^{-8}$ M から  $10^{-5}$ M の PCB を添加し、粗抽出液を調整し、ウエスタンブロットイングによって c-Jun の発現を解析した。その結果、c-Jun の発現は  $10^{-8}$ M の PCB 1 時間の暴露でコントロールに比べ約 240% に上昇した。 $10^{-7}$ M でコントロールの約 350% に達した。 $10^{-6}$ M、 $10^{-5}$ M ではコントロールに比べ高いものの c-Jun の発現は減少する傾向にあった (図 1 2)。一方、甲状腺ホルモン (T3 及び T4) 添加ではこのような c-Jun 発現の促進は生じなかったことから、PCB は TR とは全く関係なく、細胞膜レベルで作用している可能性が示唆された。

さらにPCBによるc-Jun発現の時間経過を調べたところ、作用 2 時間後に最大に達し、その後徐々に減少し、8 時間後にはコントロール値にまで低下した (図省略)。また、PCBによるc-Jun発現の情報伝達機構に細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度の上昇が関与しているかを明らかにするためにL型Ca<sup>2+</sup>チャンネルの阻害剤であるNimodipineを用いてその影響を検討したところ、10<sup>-4</sup>Mのnimodipine処理によりc-Junの発現は有意に抑制された (図 1 3)。

さらにPCBによって引き起こされたc-Jun発現は、細胞外Na<sup>+</sup>流入を阻害するテトロドトキシン (TTX) (0.5 μM) ではほぼ完全に抑制された (図 1 3)。

以上より低用量のPCBはPC-12 細胞においてc-Junの発現を引き起こす。これにはL型電位感受性Ca<sup>2+</sup>チャンネルを介した細胞外Ca<sup>2+</sup>の流入による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が関与していることが明らかになった。また、TTXによりc-Jun発現が抑制されたことから、膜の脱分極はNa<sup>+</sup>チャンネルを介した細胞内Na<sup>+</sup>流入により生じていることも判った。

#### F. 小脳顆粒細胞特異的に変異甲状腺ホルモン受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製

TR は全身に分布しているため、全身的な甲状腺機能低下では、たとえ中枢神経系に異常が生じたとしても、それが間接作用なのか直接作用なのか、はっきりとしない。そのため、中枢神経系のみ、甲状腺機能低下にするような処置が必要である。この目的のため、我々は小脳顆粒細胞特異的に変異 TR を発現させたトランスジェニックマウスを作製し、この細胞のみを「甲状腺機能低下」にする試みを続けている。

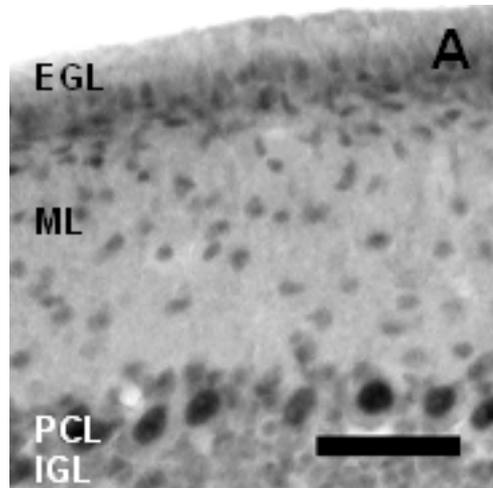
ヒト TR 変異体(Mf-1)はヒト TR β 1 遺伝子の変異体で、DNA とは正常に結合出来るが、T3 と結合できないため、Mf-1 を強制的に発現させると正常の TR の機能を抑制する。transgene 作成に先立ち、我々はまず、Mf-1 が共発現した TR の機能を抑制するかどうか、reporter gene assay を用いて解析した。発現ベクター- pcDNA3 に組み込まれている Mf-1 を野生型 TR とともに CV-1 細胞に導入し、解析した結果、正常 TR 機能 (TR α, β とも) が抑制されることがわかった (図 1 4)。

Mf-1 を小脳顆粒細胞で特異的に発現させるため、同細胞に特異的に発現する Glutamate Receptor ε 3 遺伝子のプロモーター領域を Mf-1 の上流に挿入した。また、Mf-1 とプロモーターとの間にマウスでは発現していない HA タンパク (0.3 キロ塩基対) の遺伝子を組み込んだ。さらに Mf-1 の 3' 末端に組み込む poly A シグナルを持つ塩基配列は、最終的にウシ GH 由来の配列を用いることとした。(図 1 5)

プラスミド完成後、制限酵素で結合させた部位、翻訳や転写の開始部位等、重要な部位の塩基配列はすべて確認した。本プラスミドは 5' 末端に *Srf* I, 3' 末端に *Xmn* I というユニークな制限酵素領域を配置してある。最終的にこの二つの制限酵素で目的とする transgene が切り出されてくることも確認し、大量培養の後、受精卵へ微量注入した。現在、外注先よりの納入を待っている状態である。

## 図1 小脳顆粒細胞における SRC-1 の発現

A P15 のラット小脳。SRC-1 はプルキンエ細胞層 (PCL) に強く発現している。また、内顆粒細胞層 (IGL) にも発現が見られる。外顆粒層 (EGL) では内側の premigratory zone のみに発現していることに注意。



B 隣接切片における calbindin の免疫組織化学。

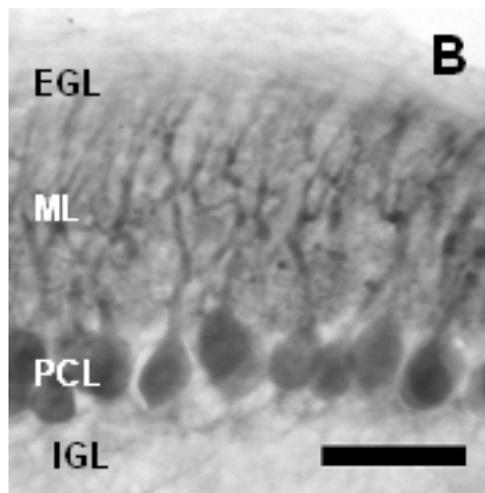
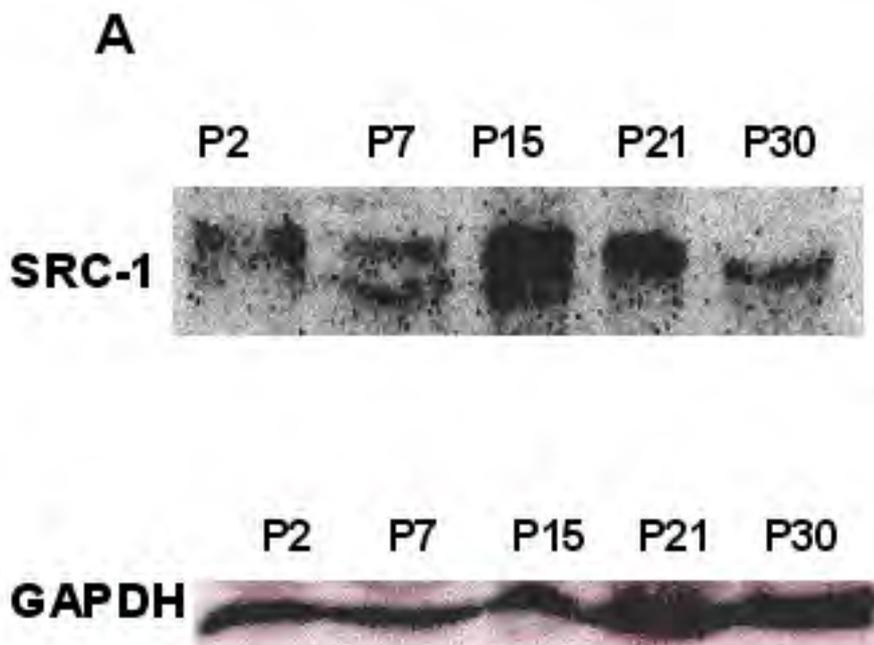


図2 発達期小脳における SRC-1 の発現変化

A ウェスタンブロット像



B 定量解析

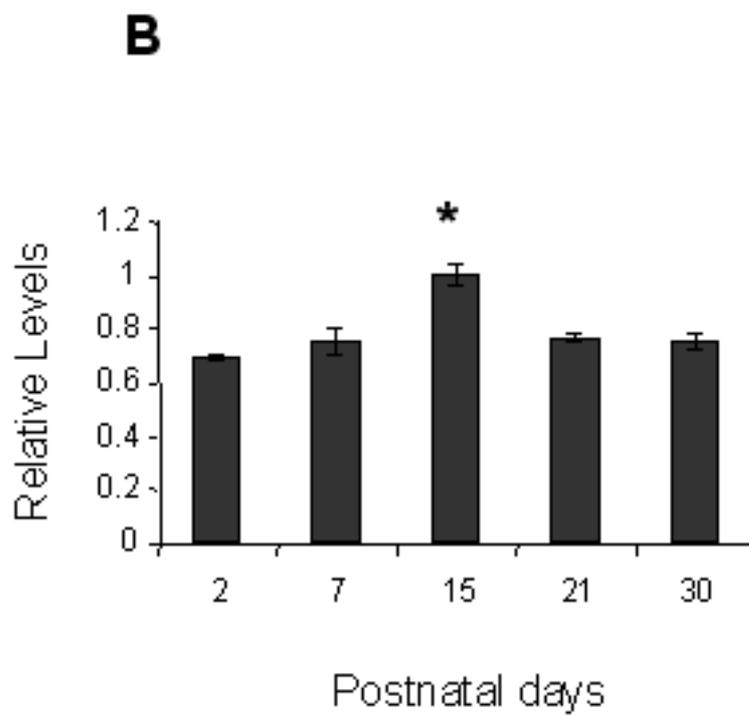
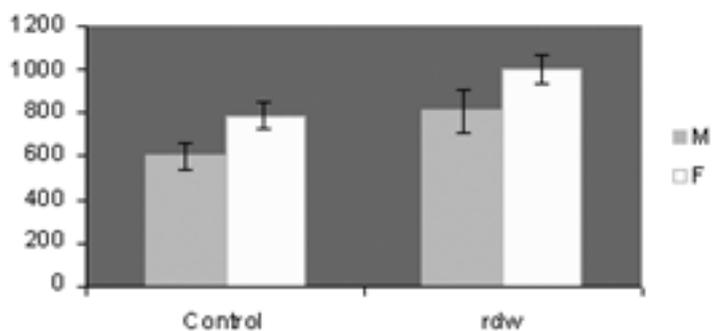


図3 先天性甲状腺機能低下ラットにおける Open field test での自発行動量

A 0-5分までの全行動量



B Aのうち最初の一分(0-1分)の行動量

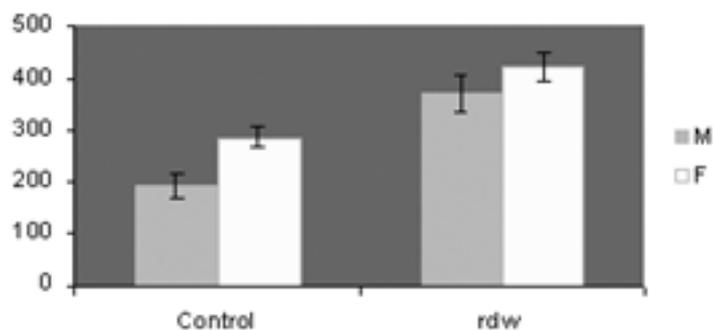


図4 Rota Rod による小脳機能測定 (3分間のうち回転棒の上にいる時間)

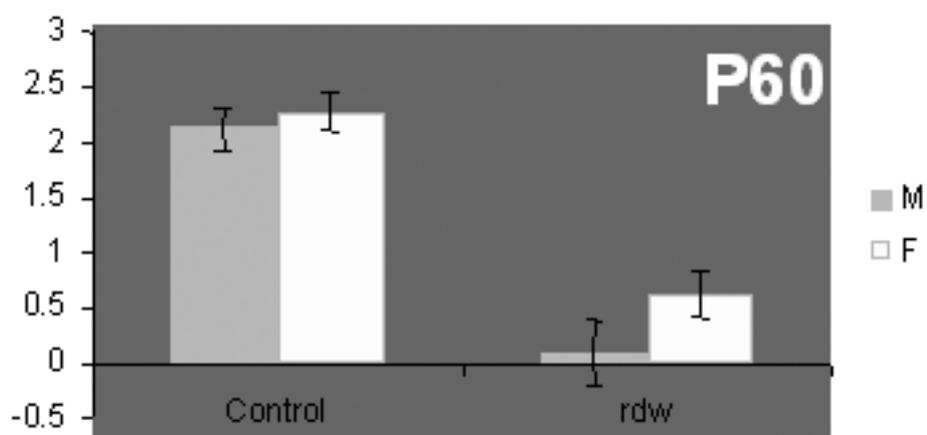
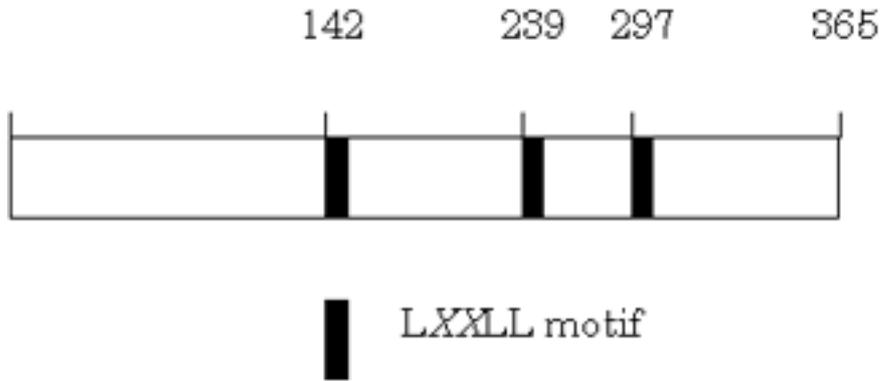
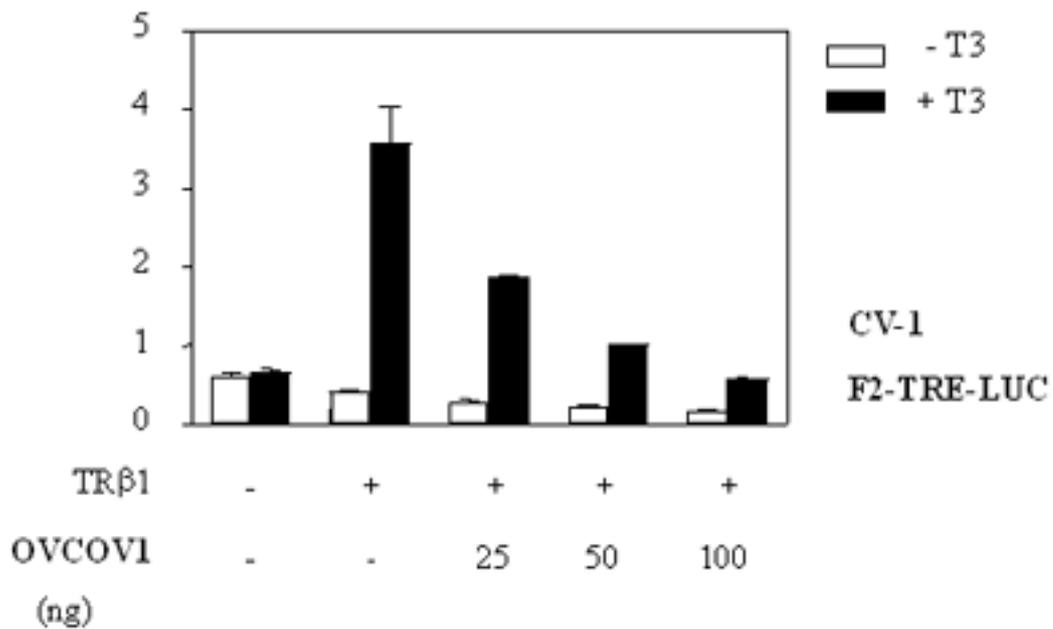


図5 ヒト OVCOV1 の構造



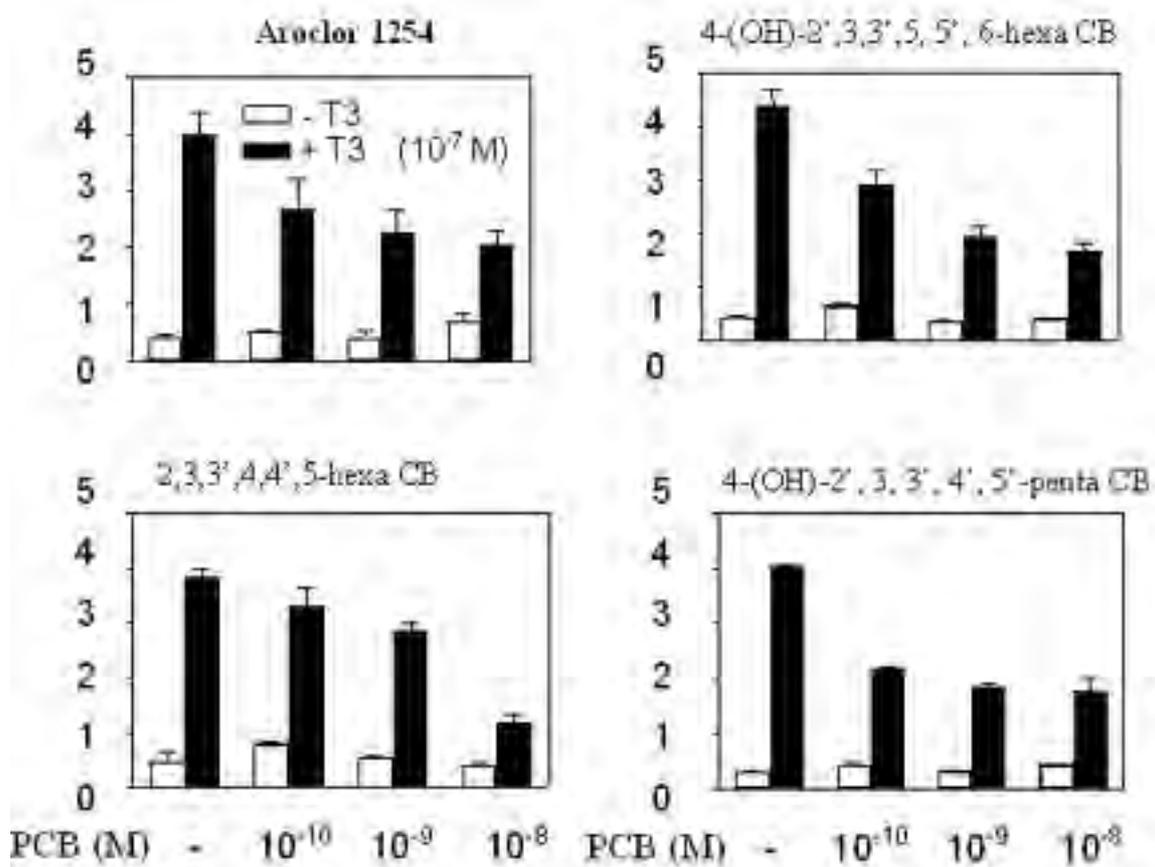
クローニングにより得られたヒト OVCOV1 の構造。番号はアミノ酸（N-末端を 1 とする）の数をあらわす。

図6 OVCOV1 による甲状腺ホルモン受容体を介する転写の抑制



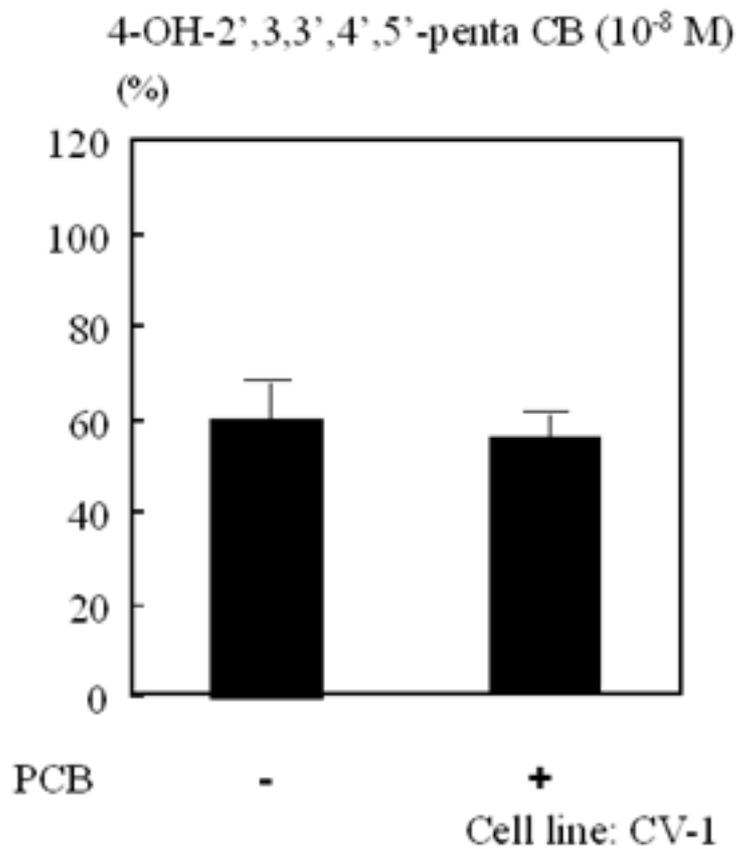
縦軸は転写の比活性をあらわす。

図7 様々な PCB 同族体の TR を介する転写への影響



縦軸は転写比活性をあらわす。

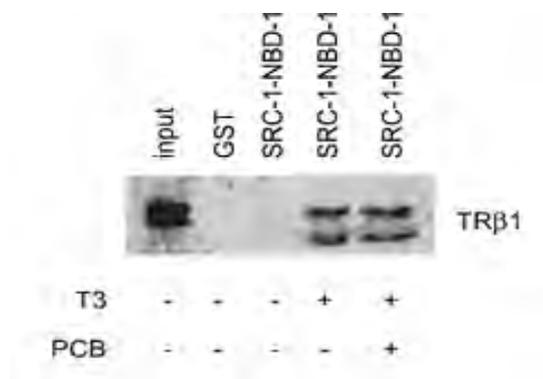
図8 PCB処理は細胞の生存に影響を及ぼさない。



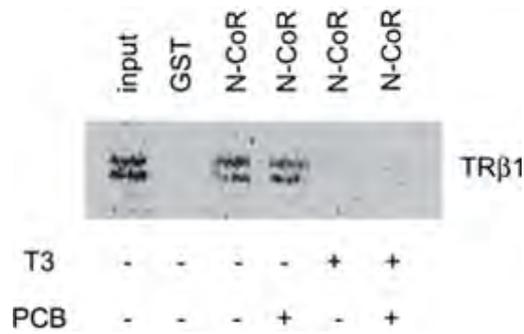
トリパンブルー染色を用いた細胞生存 (%) の判定を行った。

図9 TR と転写共役因子結合に及ぼす PCB の影響

A: PCB は TR から SRC-1 を解離させない



B: PCB は T3 存在下で N-CoR を TR に結合させない



GST-TRLBD融合タンパクと<sup>35</sup>Sで標識したSRC-1（転写コアクチベーター）またはN-CoR（転写コリプレッサー）を反応させ、オートラジオグラフィを行った。inputとは実際の標識タンパクを泳動したもの、GSTとはTRと融合していないGSTのみを泳動したもの。それ以外は、バンドが出現しているもののみがタンパク-タンパク結合が成立している。

図10 TRとTREとの結合に及ぼすPCBの作用（PCB添加によりシグナルが薄くなることに注目されたし）

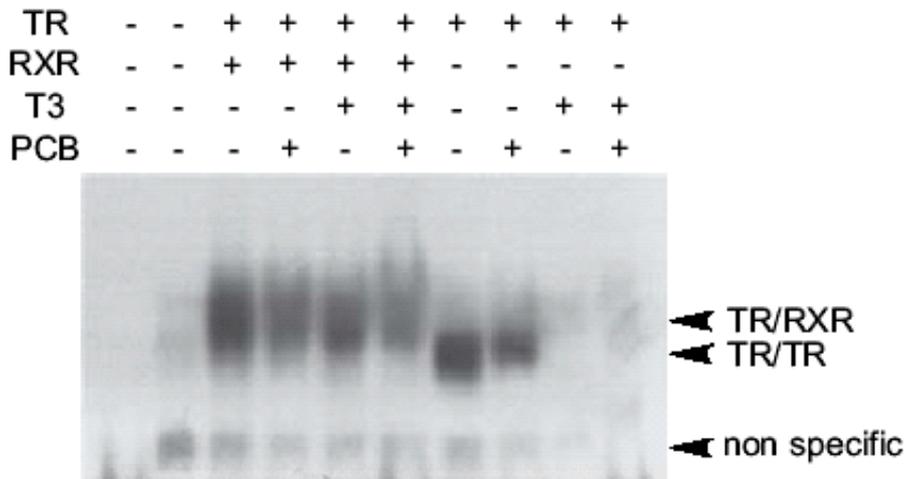
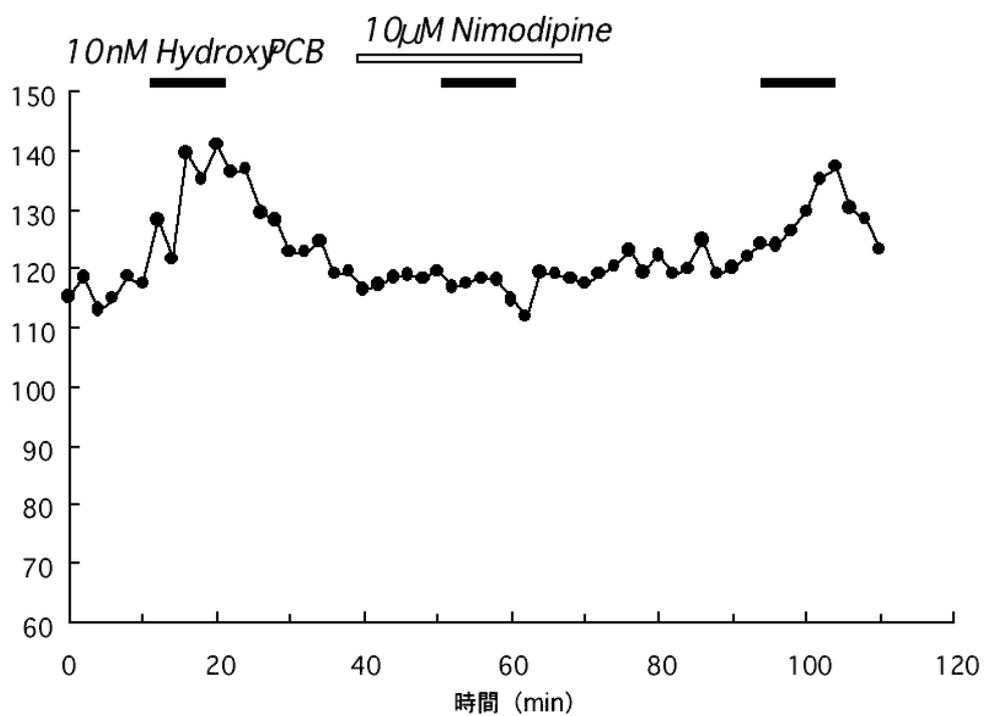


図 1 1 水酸化 PCB による細胞内カルシウム濃度変化と Nimodipine による作用



縦軸はカルシウム流入による蛍光強度の相対的变化を表す。

図12 PCBによるc-Jun発現変化

A ウェスタンブロット

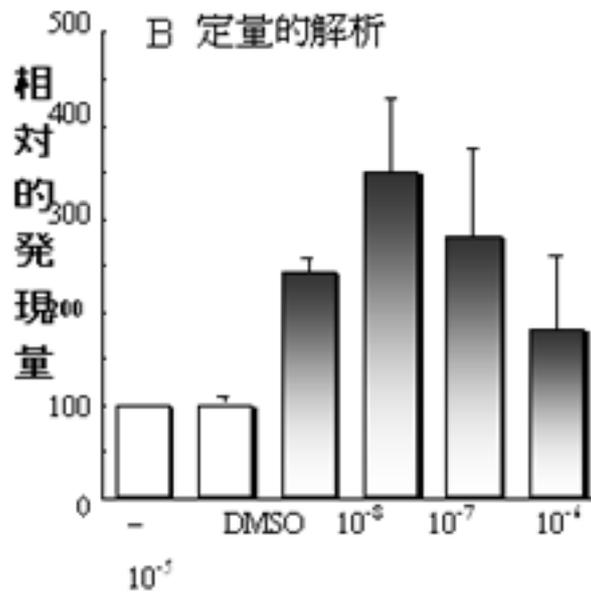
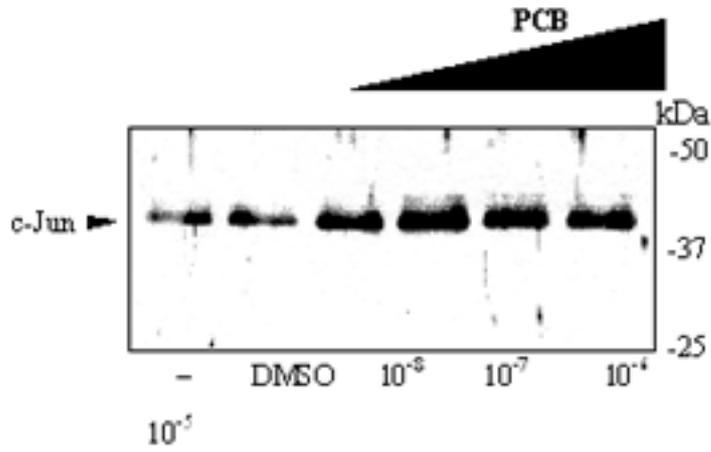
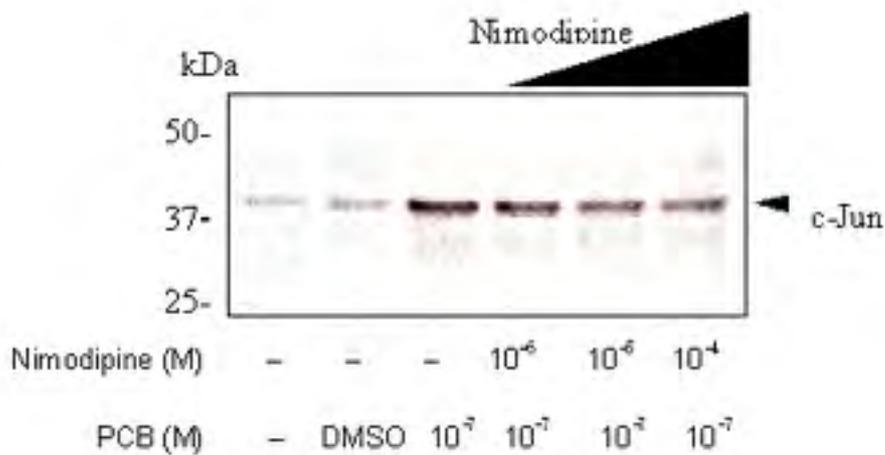
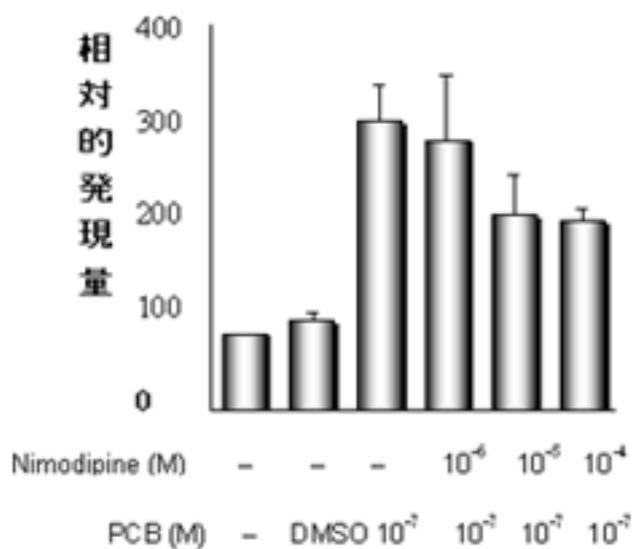


図13 PCBの効果はL型カルシウムチャンネルブロッカー及びナトリウムチャンネルブロッカーにより抑制される。

A ウェスタンブロット：ニモジピンの例



B 定量的解析：ニモジピン



C 定量的解析：TTX

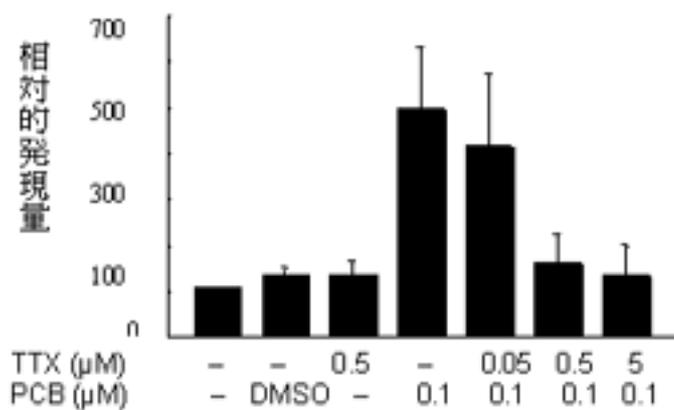


図 1 4 変異 TR (Mf-1) による野生型 TR 機能の抑制

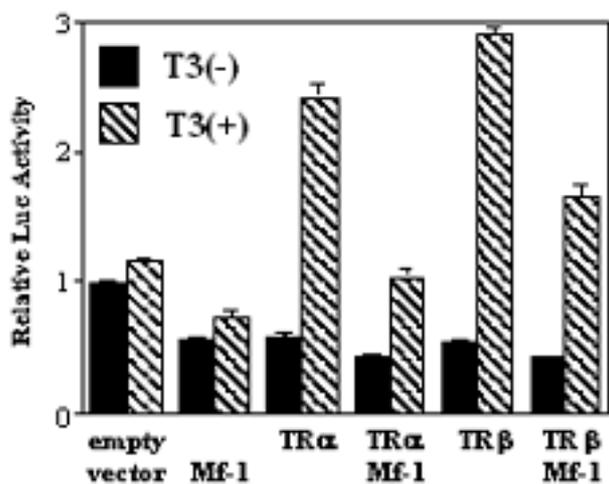
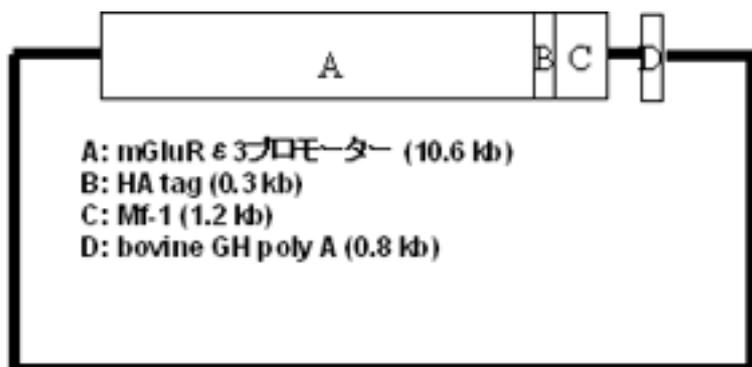


図 1 5 最終的に完成した transgene の構造



### 3. 3 “シナプス形成過程における遺伝子発現変化をモニターするオリジナル DNAマイクロアレイの開発” (田代朋子グループ)

#### (1) 研究内容及び成果

##### [A] 脳機能発達関連遺伝子の発現をモニターするDNAマイクロアレイの開発

DNAマイクロアレイ法は数千～数万種類の遺伝子の発現を網羅的に解析できる新しい有力な方法であるが、他の臓器に比べてはるかに複雑な脳の解析に適用するには更なる感度と定量性の向上が必要である。本研究のように脳機能発達に対する影響を評価する場合、長期間にわたる時間経過の解析が必須であるが、市販のものではコスト面でも十分な解析は不可能である。また、数万種類の遺伝子プローブを搭載した市販の「大集積アレイ」を用いた場合でも、実験ごとに発現変化するものは通常、数% (数百) に過ぎない。従って、「大集積アレイ」は、ある生命現象に伴う遺伝子発現変化の範囲を知るための最初のスクリーニングに利用し、その結果に基づいて個々の現象の解析に適した数百～千種類程度の遺伝子群を集めた「目的別アレイ」を作製するという方向が現実的な選択である。その際、「目的別アレイ」はより高い定量性と感度を具えたものでなければならない。本研究では、これらの問題点を克服し、更に神経系で頻発するmRNAスプライシングやファミリー蛋白など類似性の高いmRNAの検出にも対応して脳機能発達関連遺伝子の発現をモニターする独自のマイクロアレイ「シナプトアレイ」の開発を行った。2002年度以降は、理化学研究所との共同研究により、新しく開発されたアレイ基板を使用して更に定量性が向上した。

シナプトアレイの特徴と性能：シナプトアレイでは、a) プローブ・オリゴDNAの長さ (45塩基長) やGC含量 (55～65%) などの性質を最適化し一定にすることで、より厳密なハイブリダイゼーション条件 (55℃、16時間、攪拌付き) としたこと、2) 一種類のプローブを二回ずつスタンプしてグリッドを作り、一枚のスライド上にこれを三回繰り返すことにより、同一プローブに対して各6スポットとしたこと (図1参照)、3) 新規に開発された表面金蒸着スライドと末端リンカーを使用することで、バックグラウンド値を下げ、S/N比を上げたこと、4) 6種類の内部標準遺伝子を用いた標準化法を確立したこと、などの改良を行った。

実際に生後10日齢マウス小脳由来のcDNAをCy3、Cy5の二種類の色素で蛍光標識し、競合ハイブリダイゼーションを行った結果を図1に示す。三つのグリッドの結果は直線性が良く、それぞれ良く一致していた。

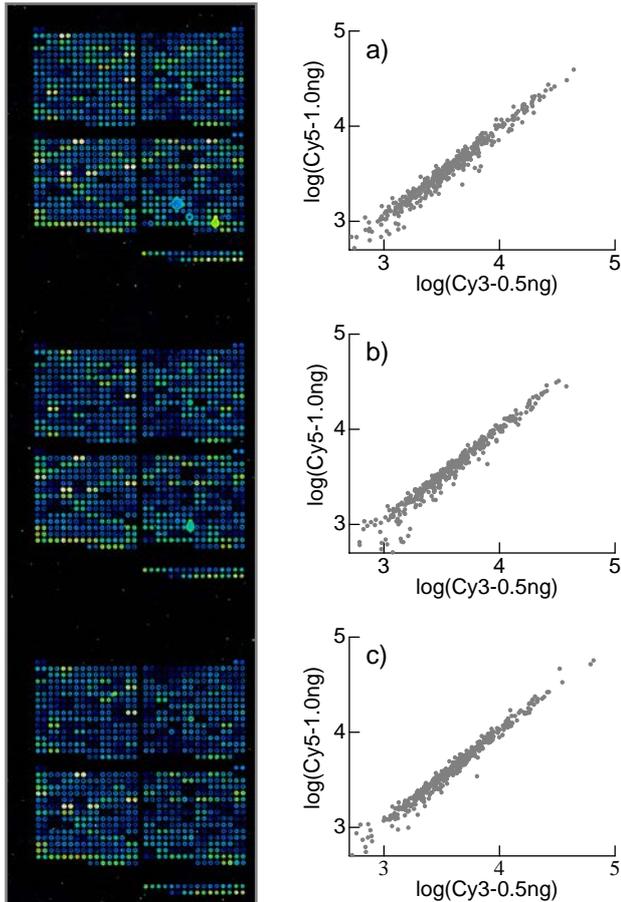


図1：シナプトアレイv. 4のハイブリダイゼーション像。Cy3、Cy5標識した同一サンプル（10日齢マウス小脳由来cDNA）によるself-self 競合ハイブリダイゼーション。各グリッドにおける直線性を右側に示す。

一枚のスライド上にある同一プローブに対する6個のスポット間で蛍光強度比のばらつきは平均約7.5%、90%のスポットで±20%以内であった。ばらつきが大きいのは低蛍光強度のスポットに限られていた。

以上の結果から、このアレイでは±20%以上の発現比であれば信頼性をもって評価できることが確認できた。市販のアレイの多くは2倍以上の差がないと検出できないと言われており、最も性能の良いもので±50%となっている。

アレイ搭載遺伝子の選択：シナプス形成に重要な役割を果たすと考えられるシナプス構造蛋白、細胞骨格およびその調節蛋白、成長因子類、神経伝達物質受容体および代謝酵素などをピックアップするとともに、市販の大集積アレイ（Agilent社、20,800プローブ）を用いて実験的スクリーニングを行った。サンプルとしてシナプス密度の大幅な低下が認められている実験的甲状腺機能低下症マウス小脳を用い、正常マウスのものと比較することで、シナプス形成に関与する遺伝子群の抽出を試みた。

甲状腺機能低下マウスは、母マウスに妊娠15日目より産後28日目まで0.025%メチマゾール(MMI)を飲水投与して作成した。形態的なシナプス密度の差が最も顕著な15日齢(P15)小脳での遺伝子発現を正常P15と比較するとともに、正常7日齢(P7)と正常P15の比較を行った結果、前者の比較(hypo-P15/control-P15)では835プローブ、後者(control-P7/control-P15)では1173プローブで有意な発現差(1.5倍以上または0.5倍以下)が見られた。両者に共通するものは73プローブあった。今回

の目的は独自アレイ用のプローブ選定にあるので、これら発現変化のあったプローブのうち機能既知のもの（約1/3）のみに注目した。

Control-P7/control-P15の組み合わせでP7の方が高い発現を示したのは、細胞周期調節蛋白(cyclin類、cdk4)、ユビキチン-プロテアソーム系の蛋白、転写活性化因子、細胞骨格蛋白および制御蛋白( $\beta$ -チューブリン、thymosin  $\beta$ -1)などの遺伝子であり、この時期における活発な細胞増殖と細胞移動を反映する「成長関連遺伝子群」といえる。一方、P15の方で発現が高かったのはイオン・チャネルやトランスポーター類(電位依存性カリウム・チャネル、Itpr、GLAST-1)、プルキンエ細胞特異蛋白(calbindin、Itpr、zebrin)、ミエリン蛋白(PLP)などの遺伝子、即ち「成熟関連遺伝子群」であった。

これに対し、P15の時点で甲状腺機能低下により発現上昇していた遺伝子群のうち58遺伝子が正常P7で発現の高かったものと共通しており、主として細胞周期調節蛋白およびユビキチン-プロテアソーム系蛋白の遺伝子であった。その他に、正常では検出されなかったストレス応答遺伝子(peroxiredoxin 4、ARS2)が検出された。一方、正常でみられた「成熟関連遺伝子群」に加えて、CAM-kinase II、Kif C3などが発現低下していた。

以上の結果を基に最初の実用アレイとして製作したversion 4には表1に示す172遺伝子496プローブを搭載した。

<b>classification (number of genes)</b>	<b>representative genes</b>
Synaptic proteins (35)	VAMP, Stx, SNAP25
Growth factors & receptors (11)	BDNF, NT-3, TrkB
Cytoskeletal proteins (15)	MAP1B, MAP2, tau
Ion channels & transporters (21)	Cacna1b, Cacna1d, Kir-6.2, EAAT
Translation factors (4)	eIF-1A, eIF-4E, mTOR/FRAP
Cell cycle & apoptosis (21)	Cdc2, p21waf-1, Apaf-1
Signal transduction (16)	Erk-1, MEK, NF- $\kappa$ B
Stress response (7)	Fmr-1, Prdx4, TrxR1
Ubiquitin-proteasome system (5)	Wdr-1, FBX35, Psm5
Steroid/thyroid related proteins (15)	THR, RXR-a, b, ZAKI-4a, b
Others (13)	Glut3, GAD
Standard genes (6)	Cyclophilin, ubiquitin1e, rpL

表1：シナプトアレイversion 4 搭載遺伝子

## [B] シナプトアレイを用いた正常マウス小脳発育過程における遺伝子発現変化の解析

シナプトアレイを用いて、生後4日～28日にわたるマウス小脳での遺伝子発現変化

を解析した結果を図2に示す。この実験では標準サンプル(Std)を用意し、各時点のサンプルは常に標準サンプルと競合ハイブリダイゼーションさせることにより、一連の変化を追跡する方法をとった。標準サンプルとして、各時点のサンプルを等量ずつ混合したものを用いることで、極端に発現量の低いプローブによる不適切な比の値が出ないようにしてある。また、各時点でそれぞれ10個体から抽出したmRNAをプールしてサンプルとした。

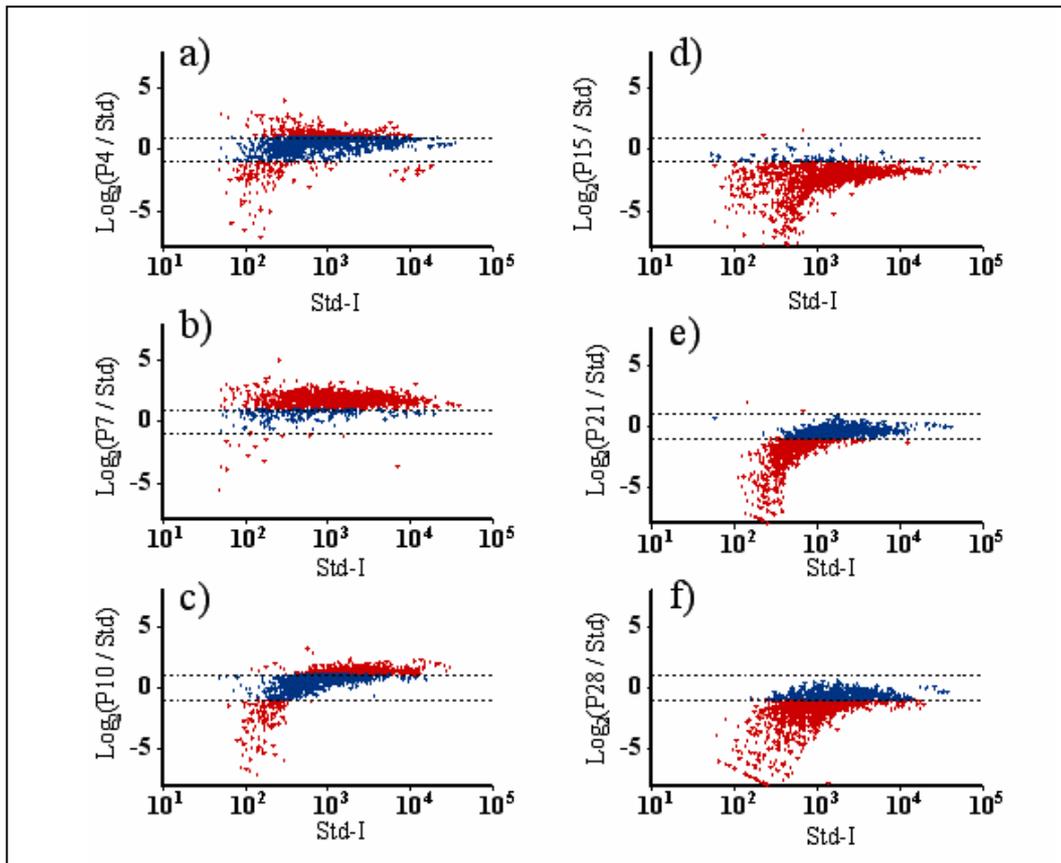


図2：マウス小脳発育過程における遺伝子発現変化。a)P4, b)P7, c)P10, d)P15, e)P21, f)P28の各時点で得られたcDNAをStd(本文参照)と競合ハイブリダイゼーションし、結果を横軸にStdの蛍光強度、縦軸に発現比をlog2で表した(変化なしが0となる)。点線は上が二倍、下が1/2倍を示す。

図から明らかなように、全体としてP7をピークとし、P15を底とする遺伝子発現の波が捉えられている。形態的には小脳におけるシナプス形成はP7から始まりP21で完了するとされている。形態変化は蛋白レベルの蓄積変化を反映すると考えられることから、mRNAレベルの変化がこれに先立つのは妥当である。また、このようにいわば同期した変化には大きな転写スイッチが関与することが予想される。個別的には、細胞周期関連遺伝子や一般的な膜輸送、開口放出関連の遺伝子群の発現はP4で既に高く、発現が早いことが分かる。これらに対してミエリン蛋白、ニューロフィラメント蛋白などは明らかに異なる遅い発現を示す。

このように、シナプトアレイにより、シナプス形成に關与する遺伝子群の発現を一連の波として検出できることが確認され、これを利用すればシナプス形成の遅れといった異常を検出できる可能性が示された。

### [C] シナプトアレイを用いた正常マウスおよび甲状腺機能低下マウス小脳發育過程における遺伝子発現変化の比較解析

前述([A])の方法で、母マウスにMMIを飲水投与することにより実験的甲状腺機能低下マウスを作成した。生後4日~28日の各時点でそれぞれ3個体の甲状腺機能低下マウス小脳からmRNAを抽出して一連のアレイ用蛍光標識サンプルを調製した(hypo実験群A)。更に別の各3個体由来のサンプルをhypo実験群Bとして調製し、独立した二系統のサンプルを得た (n=2)。

図3：正常および甲状腺機能低下マウス小脳發育過程における遺伝子発現比較

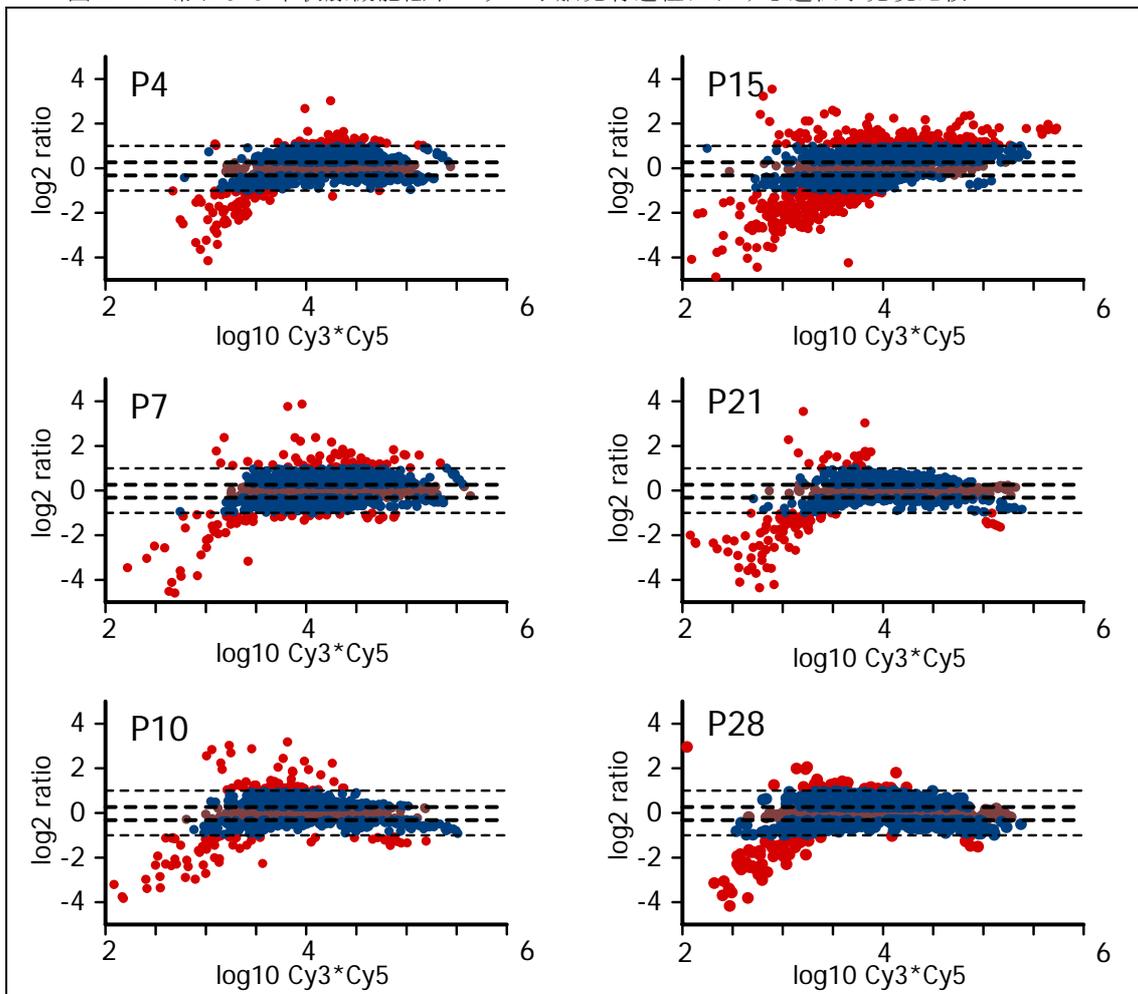
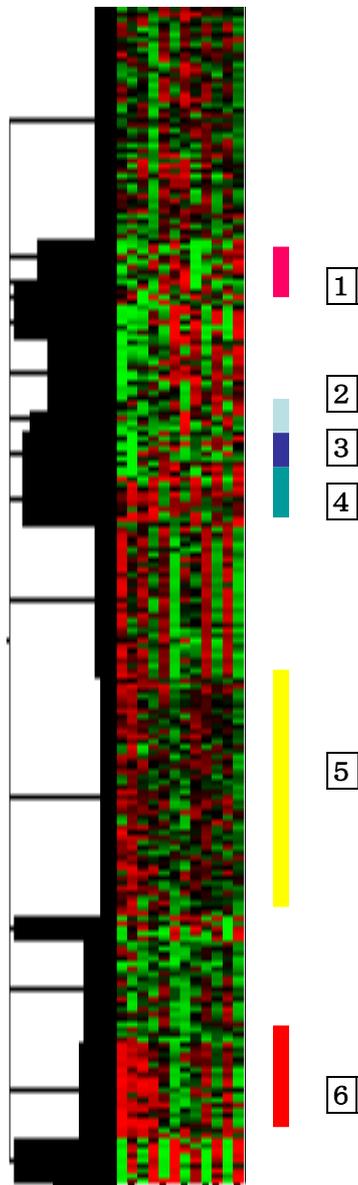


図3から明らかなように、正常とhypoの差異は生後15日（P15）で最も大きいですが、形態的な差があまり見られないP4の時点でも発現には既に差が生じている。

各時点においてhypo>controlの遺伝子を赤、hypo<controlの遺伝子を緑の濃淡で表示し、同じような時間変化を示す遺伝子をグループ化したのが図4のクラスター解析である。各時点でhypoをCy3、controlをCy5標識した場合と逆に標識した場合の二組の結果を左からP4, P7, P10, P15, P21, P28の順に並べている。その結果、図の左に示す6個の遺伝子群が抽出された。



群1はhypo-P15で大きく発現低下したものの、群2はhypo-15で大きく発現上昇したものの、群3はP4でのみhypoの発現が低下したものの、群4は全過程を通してhypoでの発現がやや高いものの、群5はほぼ差がないものの、群6は前半(P4, P7)でhypoの方が発現上昇しているものの、である。

最も特徴的な発現パターンを示す群1～群3に属する個々の遺伝子について、図5に時間経過を示す。群1は、CAMK2 $\alpha$ 、SNAP25、Ppp3ca(カルシニューリンA)など、正常マウスで成熟に伴って発現上昇する遺伝子を含む。群2に属する遺伝子は、細胞周期の進行にかかわるもの(cyclinや脱リン酸化酵素Wee1)や膜輸送にかかわるもの(Rab3a)と、ストレスに対する防御因子群(Fmr-1, Bcl-2, Daxx)の大きく二つに分かれる。前者は[A]で示した成長関連遺伝子群である。一方、群3にはRyR3, ER-1, RXR-aなどが含まれる。

図4：hypo/control発現プロファイルのクラスター解析

このように、甲状腺機能低下マウスではP15で正常と大きく異なる発現パターンを示すのみならず、P4で既に明らかな差があることが分かった。そこでP4の時点で再び大集積アレイを用いてhypoとcontrolを比較したところ、多数のアクチン系制御因子群に差が検出された。Rho GTPase活性化因子を始めアクチン・ダイナミクスの抑制因子はhypoで発現上昇し、活性化因子は発現低下することから、甲状腺

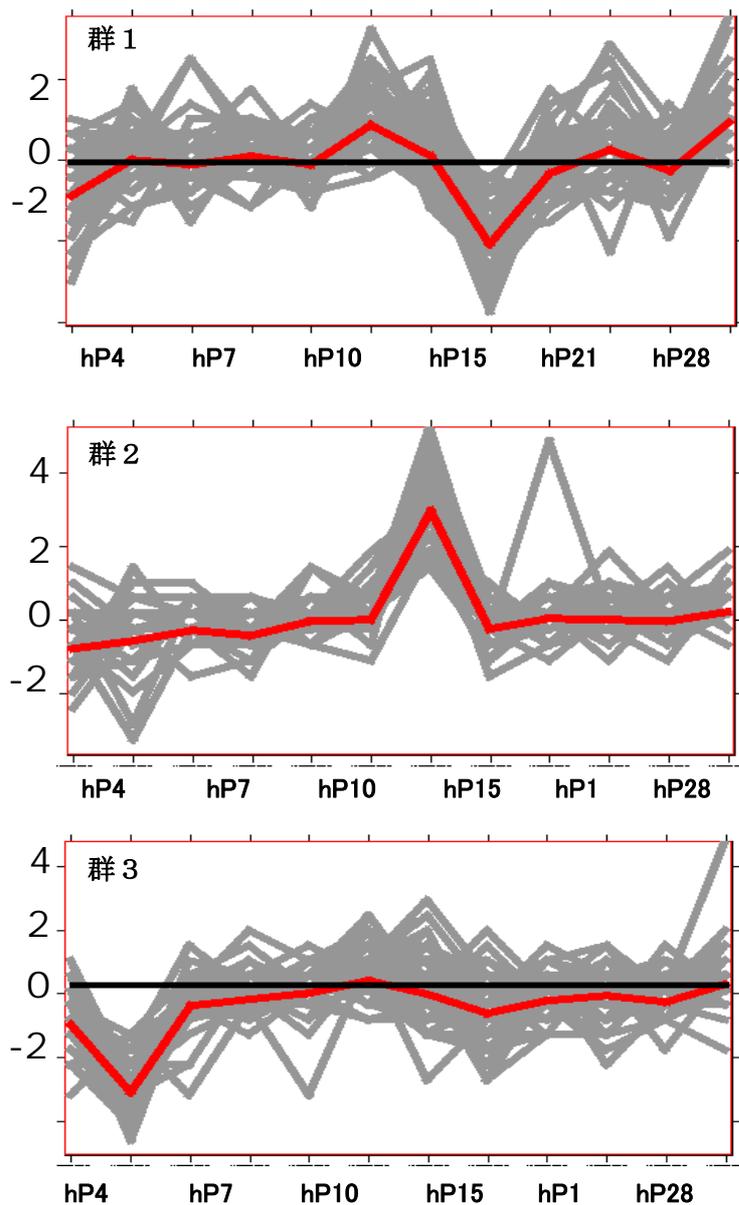


図5：群1～3に属する個々の遺伝子の発現プロファイル

その結果、甲状腺機能低下マウスでは、P15の時点で、1)正常では終了している細胞分裂サイクルの残留、2)プルキンエ細胞樹状突起の発達阻害、3)シナプス密度の低下、4)ストレス応答の出現、に到ると考えられる。

#### [D] 培養神経細胞における神経活動依存性遺伝子の解析

培養神経細胞のシナプス形成系で、電位依存性Na<sup>+</sup>チャネル阻害剤テトロドトキシン (TTX) を用いて神経活動を阻害し、これに伴う遺伝子発現変化をシナプトアレイで解析することによって、シナプス可塑性のカギを握る活動依存性遺伝子群を探索した。胎生18日齢ラット大脳皮質由来細胞を血清添加培地にて14日間培養し、十分に

機能低下によってアクチン・ダイナミクスが抑制されることが判明した。また、ミオシン、ダイニン遺伝子の発現も低下していた。他にhypoで発現低下しているものとしてIGF-1, BDNFの二種類の成長因子、レチノイン酸受容体RaR $\alpha$ などがあった。以上からP4の時点で、1)アクチン系制御因子の発現変化と2)BDNFの発現低下により、神経突起やグリア突起の伸展が阻害され、3)IGF-1の発現低下により全体的な代謝低下と成長遅滞が生じていると推察される。

シナプスを形成させた後に（抗シナプシン抗体により確認）、終濃度 $1\mu\text{M}$ のTTXを添加し、更に24時間培養して回収した。このようなTTX処理条件では細胞死は誘発されず、抗GFAP抗体陽性グリア突起にも変化がないが、抗MAP2抗体陽性神経突起は退縮し始める。TTX投与および非投与の二群の細胞から抽出したmRNAより蛍光標識cDNAおよび増幅したcRNAを作製し、大集積アレイ並びにシナプトアレイを用いて競合ハイブリダイゼーションで比較した。大集積アレイ（Agilent社、20,800遺伝子）の結果は、TTXにより発現上昇した遺伝子は432、発現低下した遺伝子は14であった。発現上昇した遺伝子群に細胞死やストレス応答関連遺伝子は含まれず、この条件で神経活動のみ阻害できていることが確認された。発現上昇した遺伝子群には、電位依存性 $\text{Na}^+$ チャネル(Scn3a, Scn5a)、 $\text{K}^+$ チャネル(Kcnb1)、 $\text{Ca}^{++}$ チャネル(Cacna2)など多数のイオンチャネル遺伝子、カルシニューリンなどが含まれていた。一方、発現低下したものには、Syt2、VAMP2、Synj2、Munc13-1、eps1、Nrgn、PSD95など、主としてシナプス蛋白が含まれていた。これら大集積アレイで検出されたシナプス蛋白はすべてシナプトアレイでも検出され、正常に対するその発現比もよく一致したが、シナプトアレイでのみ検出される遺伝子も5個あった(ATM、Bax、Bcl2、calmodulin 1、Ppp3cb)。また、AgilentアレイはcRNAにしか対応できないが、シナプトアレイはcDNA（断片化なし）にもcRNA（断片化あり）にも対応できることが判明した。

TTXを除去することにより発現する遺伝子についても現在、解析中である。

#### [E] 培養神経細胞における軽度のミトコンドリア機能阻害の影響

慢性的ミトコンドリア機能阻害によって生じる酸化ストレスは、パーキンソン病を始めとするさまざまな神経変性疾患の要因の一つと考えられているが、環境化学物質の中にはミトコンドリア阻害作用によって神経毒性を示す可能性が疑われるものも少なくない。本研究ではミトコンドリア電子伝達系複合体Iの特異的阻害剤であるロテノンを使用し、培養中脳神経細胞に対する影響を免疫組織化学およびシナプトアレイで評価した。1pM~10nMの低濃度ロテノンに24時間曝露して比較したところ、100pMでは全神経細胞の90%以上が生存しているが、全体の数%を占めるTH(tryptophan hydroxylase)陽性ドーパミン(DA)・ニューロンについてはその約50%しか生存せず、DAニューロンの脆弱性が確認された。10pMロテノンではDAニューロンの細胞死は起こらないが、TH陽性ニューロンに局限した神経突起の退縮がみられた。次いで、100pM、1nM、10nMの各濃度に曝露した全細胞からmRNAを抽出し、増幅・標識した後、シナプトアレイで解析したところ、100pMで多数の遺伝子の発現が上昇していた。これらのほとんどは1nM、10nMでは上昇がみられない群1（100pMのみで上

昇しているもの) と100pMで最も高い発現を示し1nM、10nMでも対照より発現上昇している群2とに大別される。群1には電子伝達系複合体Iの構成蛋白の他、Syntaxin 4a、Munc 13-4、tomosyn、neurograninなどのシナプス蛋白が含まれる。一方、群2には、解糖系酵素やグルコース輸送体、Ca<sup>++</sup>チャネル、カルシニューリン、伝達物質輸送体などが含まれていた。マイクロアレイの結果は、わずかしかなかったDAニューロンではなく、その他の神経細胞やグリア細胞の遺伝子発現を反映すると思われることから、これらの細胞は形態変化のみられないロテノン濃度において有意な遺伝子発現変化を起こしていることが明らかとなった。また、実際に細胞死に関連する遺伝子群の発現が起こってくるのは更に高い濃度(~50nM)からである。

#### [F] シナプトアレイ version 6

[B]~[E]の解析結果を基に、遺伝子の追加選択とプローブの拡充を行った結果、現時点で下表の440遺伝子に対するプローブを搭載したversion 6を完成している。これを用いて、周産期水酸化PCB曝露ラットにおける遺伝子発現の様子を脳内各部位について解析中である。

<b>Exo-, endo-cytosis &amp; membrane trafficking (synaptic proteins)</b> 63	<b>Transcription factors, cofactors, RNA-editing, translation factors</b> 34
<b>Cytoskeleton &amp; regulators</b> 43	<b>Signal transduction</b> 58
<b>Neurotransmitter R. &amp; metabolism</b> 40	<b>Growth factors, cytokines &amp; their receptors</b> 10
<b>Other Ion channels &amp; transporters</b> 24	<b>Cell adhesion, cell recognition</b> 17
<b>Mitochondria &amp; energy metabolism</b> 60	<b>Thyroid, steroid hormone-related</b> 25
<b>Stress response &amp; apoptosis</b> 25	<b>Protein processing &amp; degradation</b> 9
<b>Cell cycle</b> 11	<b>Others: std. &amp; negative controls, etc.</b> 25

表2：シナプトアレイ version 6 搭載遺伝子の分類

#### [G] シナプス形成に伴う神経特異的微小管結合蛋白のmRNAスプライシングおよび局在変化

細胞分裂、細胞内輸送、形態形成などを司る微小管は、神経細胞においては高度に安定化されており、神経突起の形成と維持に中心的役割を果たしている。神経突起に豊富に存在する微小管結合蛋白MAPsが、このような微小管の安定化に寄与すると考えられている。本研究では、神経軸索の主要MAPであるタウ蛋白と、発育期神経細

胞に特異的なMAP1Bについて、生後初期のラット小脳発育過程（個体レベル）および胎生期ラット大脳皮質由来の培養神経細胞（細胞レベル）の二種類の実験系でシナプス形成期におけるスプライシング・アイソフォームや局在の変化を調べた。

タウ蛋白：タウは、アルツハイマー型痴呆症の脳に蓄積する神経原繊維変化（PHF）と呼ばれる異常構造の本体であること、タウ遺伝子の変異（1塩基置換）が家族性側頭葉性痴呆の一部にみられることなどから、神経変性との関連が注目されている蛋白でもある。タウ遺伝子は100kbを超え、1次転写では16のexonを含んでいるが、そのうちの3つ(exon4A, 6, 8)は脳mRNAには現れない、末梢神経タウに特異的なexonである。Exon2, 3, 10は択一的にスプライシングされ、その組み合わせにより、脳では6つのアイソフォームが生じる。Exon10のスプライシングは、微小管結合部位に含まれる特徴的な繰り返し配列が3回のもの(3-リピート)と4回のもの(4-リピート)を生じ、これが微小管との結合力に影響する。胎生期にはexon10のない3-リピート型が、成体においてはexon10を含む4-リピート型が主体である。これに対して、exon2, exon3を含むN末端領域については、微小管以外の細胞骨格成分や細胞膜と相互作用してタウの局在を制御する可能性が挙げられるが、その具体的な機能やスプライシングによる機能変化については不明である。本研究では、tauのN末端領域の機能解析を目的とし、上記二つの実験系を用いて、シナプス形成過程におけるexon2, exon3のスプライシング変化をmRNAレベルと蛋白レベルの両方で調べた。mRNAレベルではRT-PCR法並びにexon特異的プローブを載せたシナプトアレイにより、蛋白レベルでは新しく作成したexon特異的抗ペプチド抗体を用いたWestern Blottingにより、その発現変化を調べた。

ラット小脳では、exon2, 3を含むアイソフォーム（2型および2+3型）は生後11日目から発現し始め、増加するが、逆に、exon2, 3を含まないアイソフォーム（0型）は減少して、生後21日目には各アイソフォームがほぼ等量発現するようになる。exon10に関しては、exon2, 3を含むアイソフォームより少し早く発現し始め、21日目でexon10を含まないものと完全に置き替わり、すべてがexon10を含むものとなった。その結果、ヒト脳とは異なり、成熟後はexon 2, 3の有無による3種類のタウのみが存在することになる。前記シナプトアレイの結果およびシナプス特異的蛋白 synapsin I に対する抗体染色性の増加から、生後7日～14日が小脳におけるシナプス形成期と確認される。即ち、exon2, 3, 10の発現はシナプス形成とともに始まり上昇する。蛋白レベルでは、各成長段階で採取した小脳より可溶性タウと不溶性タウを分画抽出し、部分精製した後、それぞれexon特異的抗体を用いて分析したところ、可溶性タウ、不溶性タウともに、シナプス形成とともに増加することが分かった。また、どちらの分画でも、exon10を含むアイソフォームは2, 3を含むものよりやや早く発現

し始める傾向がみられた。各exonがそろそろ生後14, 21, 42日で両分画のアイソフォーム構成を比較すると、各exonとも95%以上が可溶性であったが、exon3に関してのみ、膜分画のアイソフォームが、可溶性分画のそれに比べてみかけの分子量が大きくなっていることが分かった。これは、リン酸化によるもので、exon2, 3を含む最も大きいアイソフォームのうち、リン酸化程度の高いものが、選択的に膜に分布すると考えられる。一方、培養細胞の系でもシナプス形成期(培養6~8日)にin vivoと同様に各exonが発現し始め、増加した。微小管安定化剤taxolの有無による分布変化を調べた結果、taxolで安定化される微小管、すなわちダイナミックな微小管にexon3を含むタウが選択的に結合する可能性が示唆された。これらの結果は、N末端側の異なる三種のアイソフォームになんらかの機能的差異が存在することを示唆している。

**MAP1B**：発育期の神経系に強く発現するMAP1Bは、7つのexonによりコードされる。Exon3より上流に、蛋白には翻訳されないnon-coding exon3Aと3Uが存在し、mRNAとしては、exon1, 3A, 3Uから始まる3種類のアイソフォームが発現するが、開始コドンはexon1とexon4に存在するため、蛋白としては、exon1から翻訳されるlong isoformと、exon4から翻訳されN末端125アミノ酸残基が欠落したshort isoformの2種類が生成される。MAP1Bには、(1)微小管結合部位が他のMAPsに共通するアミノ酸配列ではなく、KKEEまたはKKEI/Vの21回繰り返しという特徴的な配列を示すこと、(2)疎水性アミノ酸が集合した膜貫通部位様の配列が1ヶ所存在すること、(3) exon5には、17アミノ酸が12回繰り返すヘプタデカリピート配列(以下HDと略)が存在することなど、他のMAPsとは異なる特徴があり、微小管安定化以外の機能が考えられるが、その詳細は不明である。本研究では、MAP1Bが実際に膜貫通蛋白として発現する可能性を中心に、培養神経細胞を用いて、MAP1Bと膜との相互作用について表面ビオチン化を利用した以下の二種類の方法で調べた。

一つは細胞分画と組み合わせた方法(A)で、ビオチン標識を利用して膜の裏打ち構造(膜骨格)を含む細胞膜画分をまず単離し、残りを細胞骨格及び内膜画分と細胞質画分に分画した。それぞれの画分に含まれるMAP1Bの量的変化を調べた結果、全MAP1B量はシナプス形成期を通じてほぼ一定であり、細胞骨格及び内膜画分には常に約40%が局在した。これに対し、細胞膜画分ではMAP1Bは培養7日目から増加し、逆に細胞質画分では培養経過とともに単調に減少した。この系では培養7日から14日がシナプス形成期であることから、シナプス形成に伴いMAP1Bの一部が細胞質から細胞膜に移行することが示唆された。しかし、方法(A)ではMAP1Bが実際に膜貫通蛋白として存在するかどうかを確認できないため、次に免疫沈降法と組み合わせた表面ビオチン化法(B)を行った。もしMAP1Bが膜を貫通していれば、表面ビオチン化によりMAP1

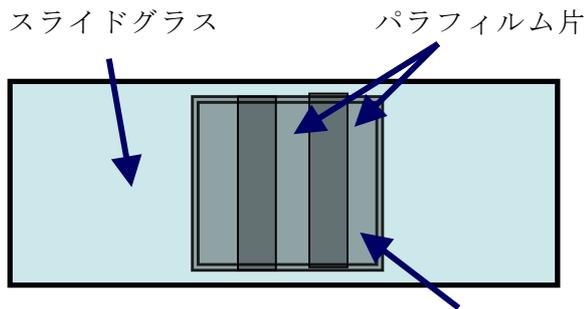
Bもビオチン化され、免疫沈降法で回収されるMAP1Bの中にビオチン化されたものが存在するはずである。実験の結果、MAP1Bの一部はビオチン化されていること、ビオチン化されたMAP1Bの量はシナプス形成に伴い増加することが明らかになり、細胞膜画分のMAP1Bの一部は膜貫通蛋白であることが確認できた。

以上の結果から、一部のMAP1Bはシナプス形成に伴い細胞膜へ移行することにより、細胞内では、アクチンを主体とする膜骨格と相互作用し、微小管と膜骨格間のリンカーとして働き、軸索などの突起をより安定化することが考えられる。また、今回確認された膜貫通型MAP1Bに関しては、細胞外にHDやリン酸化部位が存在するので、HDとの相互作用蛋白を介したもしくはリン酸化による、細胞外からのシグナル伝達や細胞接着などに何らかの役割を果たすことも考えられる。

#### [H] マイクロビーズを用いた細胞骨格ポリマー間相互作用のリアルタイム解析

微小管、中間径フィラメント、アクチン・フィラメントの三種類の蛋白ポリマーから成る細胞骨格は、ポリマー間の相互作用によって細胞の形態や運動性を制御する。神経系においては、神経突起の形成と伸展、シナプス形成、シナプスの可塑的变化など、神経回路そのものを支える重要なシステムである。しかしながら、ポリマーの重合・脱重合や相互作用の調節機構については不明な点も多い。

細胞骨格ポリマー間の相互作用を定量的に調べる方法として一般的に用いられるものに”falling ball”法による粘度測定がある。直径約0.2mmの鋼球が蛋白ゲルをせん断しながら落下する速度を測るこの方法は、粘度というよりはゲルの破壊されにくさを測定するもので、高濃度の蛋白溶液を数百 $\mu$ l必要とする。また、経時変化を追うことも不可能である。これに対して、本研究で開発したマイクロビーズ法は、直径0.5 $\mu$ mまたは0.25 $\mu$ mのLatexビーズを蛋白溶液に混入し、そのブラウン運動を解析するもので、非破壊的に粘度を測定できるばかりでなく、約10 $\mu$ lと微量の溶液でその変化をリアルタイム観察することができる。



加熱圧着したカバーガラス  
6 : マイクロビーズによる解析用チェンバー

この方法で、微分干渉顕微鏡を用いてラット脊髄から抽出・精製したニューロフィラメント(NF)を観察した結果、NF濃度に依存するゲル形成過程を解析できることが確認された。

酵素的に脱リン酸化したNFでは、図ゲル形成速度が速くなるとともに不均一なゲルとなる。また、 $Mg^{++}$ 濃度の上昇やアルミニウムの添加によってゲル形成は大幅に促進され、強度の高いゲルができる。これらの結果から、成熟軸索にみられるようなNFの高度なリン酸化は、NF間相互作用を調節し、均一で強度の高いゲルを形成する要因であることを示唆する。この方法は、さまざまな神経変性疾患で問題となっているNFの凝集や蓄積の生成機構を解明する効率の良い解析システムとなるばかりでなく、他の細胞骨格ポリマー間の高次構造や、新規蛋白と細胞骨格との相互作用などを調べる上で一つの簡便な実験系として利用できる。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

### [A] シナプトアレイ

DNAマイクロアレイは、癌研究の分野で成果を挙げて着た比較的新しい手法であり、神経科学分野への応用についてはまだ2, 3年の実績しかない。内容的にも一次スクリーニングとして利用し、他の方法でこれを確認するというものがほとんどである。また、市販の大集積アレイはコストが高いため利用したくても利用できないのが現状である。本研究の過程で我々が到達した「定量性の高いカスタムアレイ」という考え方は、世界的に見ても今後のマイクロアレイの一つの重要な方向性となりつつある。

シナプス形成に関与する遺伝子群、神経活動依存性に発現変化する遺伝子群、シナプスの維持やシナプス再生に関与する遺伝子群などシナプス関連遺伝子を機能的にグループ分けして、その発現を定量的に解析できるシナプトアレイは、本研究のみならず、加齢や神経変性に伴う変化など、長期にわたる緩慢な変化を正確に追跡する目的に適しており、広い利用範囲が考えられる。

また、cDNAマイクロアレイに代わって今後の主流となるオリゴDNAマイクロアレイでは、プローブとなるオリゴの選定が性能を大きく左右する。シナプトアレイ作

製の過程で、最適オリゴの選定条件や、ハイブリダイゼーション条件の最適化、発育のように細胞を取り巻く状況が大きく変化する場合の標準化方法など、貴重なノウハウを集積したきたが、これらは今後、実験目的に合わせたカスタムアレイを作製し利用していく上で重要な情報となるはずである。

#### **[B] 発育期脳に対する環境因子の影響評価**

発育過程の特定の時期に特定の化学物質に曝露することが脳の機能発達にどのような影響を与えるかという問題は、急性毒性や発がん性、催奇形性などのこれまでの毒性評価法では解決できない重要な課題である。本研究でとった網羅的遺伝子発現解析法は、このような長期にわたる緩慢な影響の蓄積を調べる非常に有効な手段であり、目に見える形態的異常や行動的異常がなくとも、確実に評価できる強力な方法である。本研究の成果を利用して、現在進行中の水酸化 PCB をはじめ、各種の化学物質の影響を今後も引き続き研究していくと同時に、この方法の普及に努めていくつもりである。このような客観性のある定量的データをもとに、成熟後の動物の行動との関連を調べることは、現在、社会的にも教育的にも大きな関心を集めている子供の行動異常や社会的不適応の問題を科学的に解明していく上で必要不可欠な研究であり、その結果がもたらす社会的インパクトは大きい。

### 3. 4 内分泌かく乱物質など環境化学物質の培養細胞系でのシナプス形成、樹状突起伸展への影響（黒田洋一郎グループ）

#### (1) 研究成果

動物実験には、多くの動物数・日数・労力が必要とされる。従って、一次スクリーニングには、簡便な *in vitro* の実験系が不可欠である。内分泌系に対する作用を解析するためには、乳ガン細胞由来の MCF-7 細胞を用いるアッセイ系等が開発されているが、脳神経系については未だ適当なアッセイ系は開発されていない。

本研究で新たに A. 培養大脳皮質細胞間の機能的シナプス形成への環境化学物質の影響を調べるアッセイ系、B. 培養小脳神経細胞からの樹状突起伸展への環境化学物質の影響を調べる系などを開発し、甲状腺ホルモンや水酸化 PCB などの影響を調べるとともに、シナプス受容体などの基礎研究も行った。

A. 培養大脳皮質細胞間の機能的シナプス形成への環境化学物質の影響を調べるアッセイ系  
大脳皮質は脳の各種高次機能を支える神経回路網が集中して存在することが知られている。神経回路形成の要であるシナプス形成への環境化学物質や甲状腺ホルモンなどの影響を調べる系を開発するため、ラット大脳皮質初代培養神経細胞の長期培養系を以下のように確立した。

ラット胎児より得られた神経細胞は、培養後数日で突起を伸展させ、神経細胞同士がシナプスによって結合されるようになる。この、いわばシャーレ上で再形成された神経回路網は、さまざまな神経伝達物質受容体や神経特異的蛋白を発現させるなど、生体内で形成される神経回路網と類似した性質を持っており、しかも、この培養下での神経回路網はシナプス形成が高密度で起こると、自発的に興奮を始める。この神経活動を細胞内  $Ca^{2+}$  濃度同時多点観察システムによって観察したところ約 1 週間で、ほぼ全ての神経細胞で同期した細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の振動 (synchronous oscillation) を生じるようになってくる (図 1)。

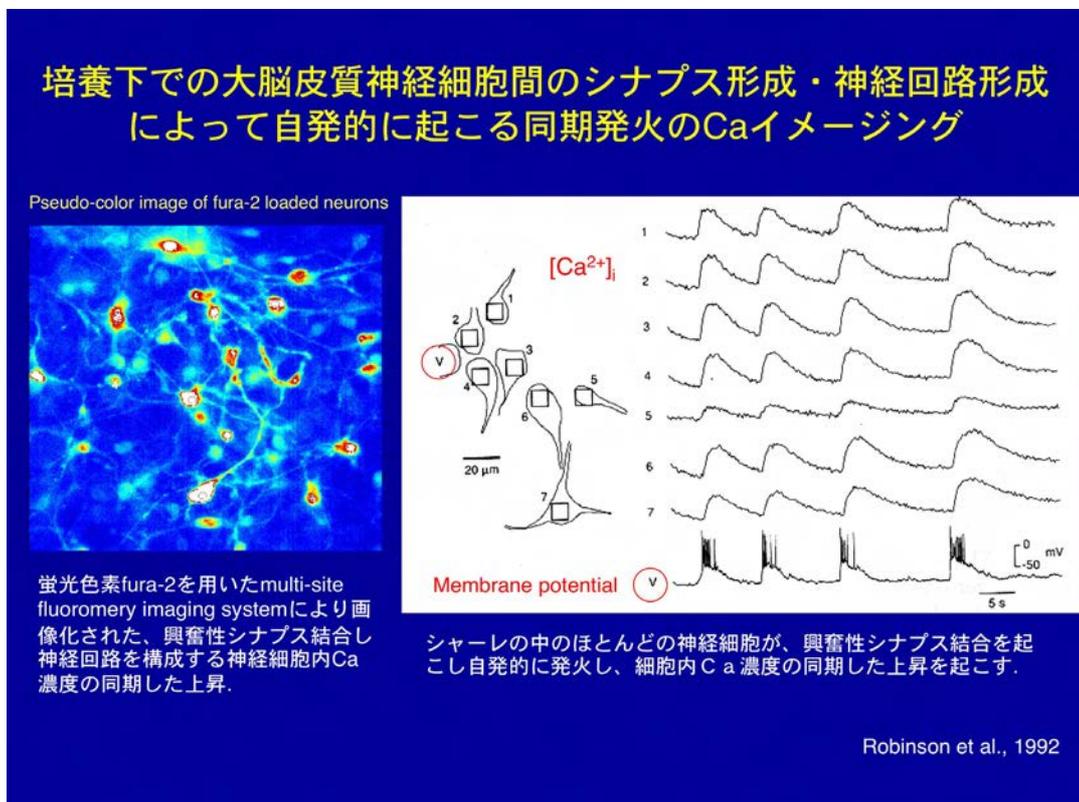


図 1 神経細胞で同期した細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の振動 (synchronous oscillation)

この同期した自発的な細胞内Ca<sup>2+</sup>振動は、興奮に伴うシナプス活動によることが、さまざまな薬理学実験から判明しており、しかも、この振動数は定量的電子顕微鏡観察によって測定されたシナプス密度と良い相関を示すことが明らかになった。言い換えれば、細胞内Ca<sup>2+</sup>振動の振動数を測定することによって、培養神経細胞間のシナプス数を簡便に定量できることになる(図2)。しかも、この培養神経細胞は一ヶ月以上長期間にわたって保持することが可能であり、レーザー共焦点顕微鏡を用いてシナプスの形態変化を定量的に観察することも可能になっている。

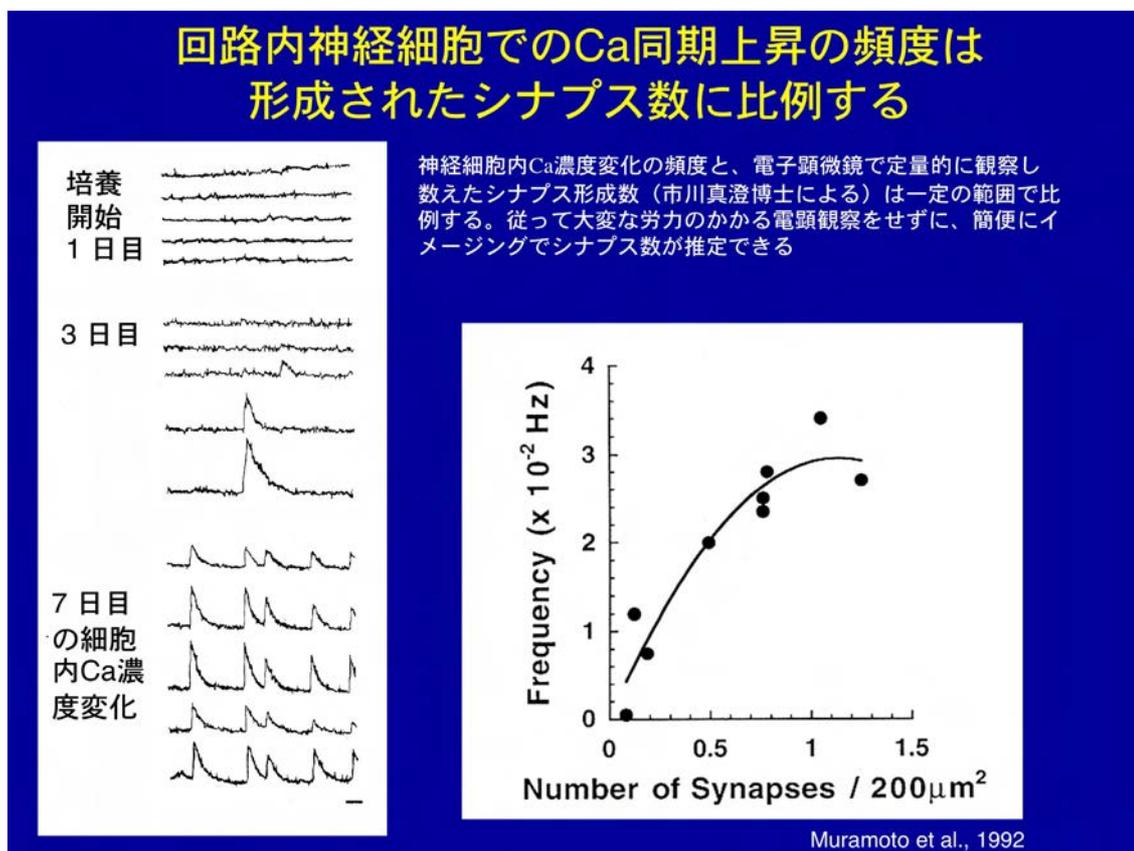


図2 培養下での大脳皮質神経細胞間で形成されたシナプス数は、Ca イメージングで簡便に測定できる

このシナプス形成のアッセイ系を用いて、非常に低濃度の甲状腺ホルモン (T3, T4) がこの大脳皮質初代培養神経細胞のシナプス形成を促進することを見いだした。

従って、甲状腺ホルモンによって促進されるシナプス形成を指標にすれば、甲状腺ホルモン系をかく乱する化学物質の探索が可能となる(図3)。

このスクリーニング系を用い、除草剤 amitrol などの阻害効果を見いだした(図4)。

## 甲状腺ホルモンはラット大脳皮質ニューロンのシナプス活動を促進する

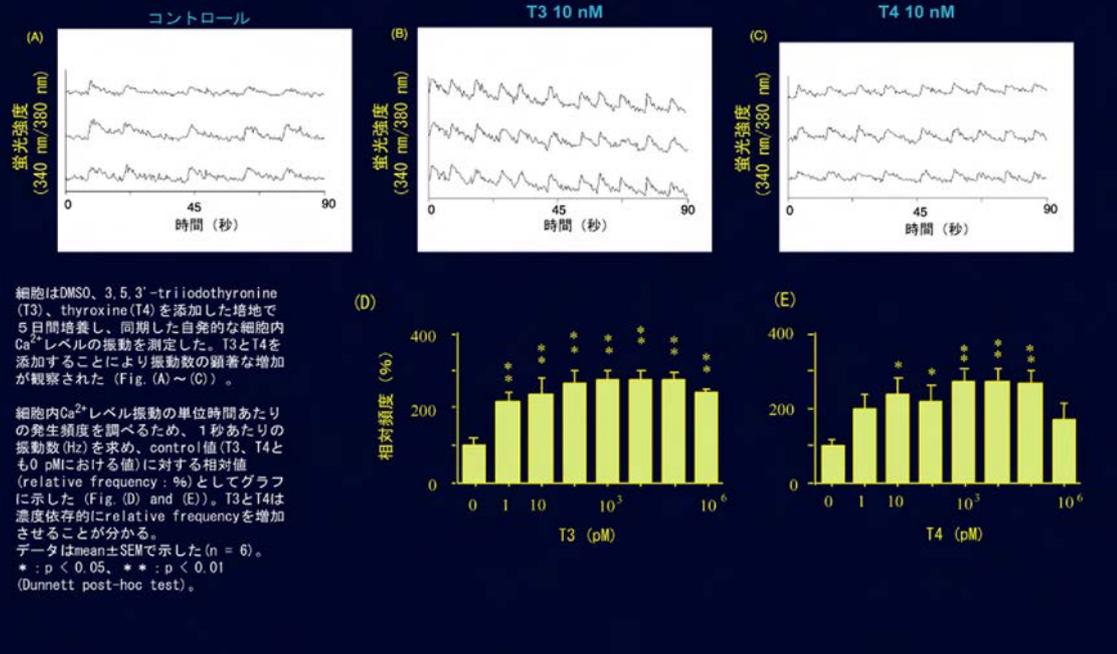


図3 甲状腺ホルモンによる大脳皮質神経細胞間のシナプス形成の促進

## アミトロールは甲状腺ホルモン (T4) の細胞内カルシウムオシレーション頻度増加作用を抑制する

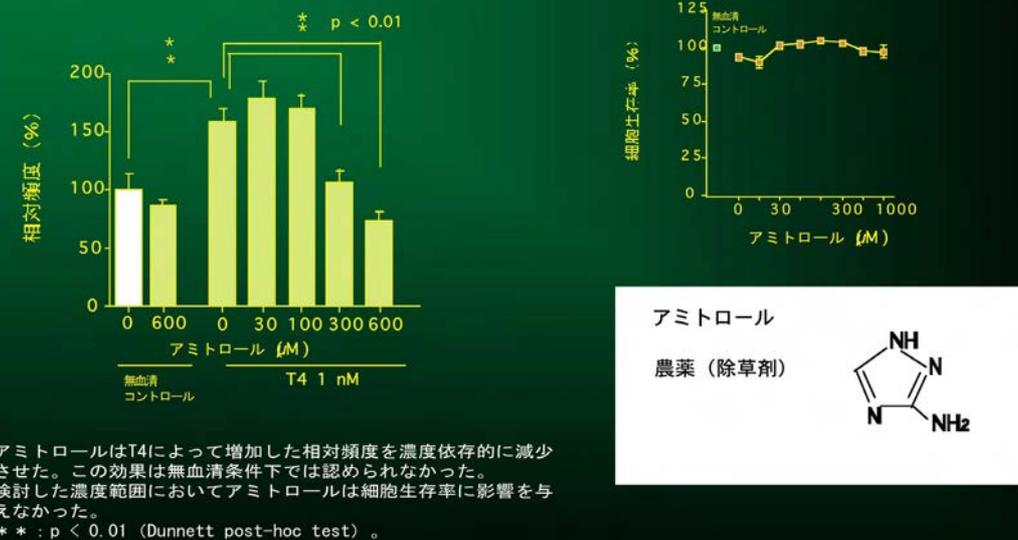


図4 アミトロールによるシナプス形成の阻害

## B. マウス小脳プルキンエ細胞培養系を用いた内分泌かく乱物質アッセイ系の開発と

### その応用解析

#### ——水酸化 PCB など内分泌かく乱物質による甲状腺ホルモン依存性小脳プルキンエ細胞樹状突起伸展の阻害効果

小脳は、クレチン症などの甲状腺ホルモン欠乏症において、外顆粒層消失の遅延、プルキンエ細胞樹状突起伸展の低下、プルキンエ細胞と平行線維、登上繊維とのシナプス形成の低下など、従来から顕著な異常が認められてきた。小脳の唯一の出力神経細胞であるプルキンエ細胞の発達分化には、甲状腺ホルモンが重要であることは明らかであり、核内レセプターも確認されているが、その作用メカニズムは不明の点が多く、また培養も比較的難しいとされてきた。そこで、本研究では安定した小脳プルキンエ細胞培養系を確立して甲状腺ホルモンの働きを確認し、さらに甲状腺ホルモンへの影響が懸念されている水酸化 PCB などの内分泌かく乱物質がそれにどう影響するかを検討した。またプルキンエ細胞の発達分化には、プロジェステロン、硫酸プレグネノロンなどステロイド系ホルモンの関与についても報告があるので、ステロイド系ホルモン及び類似化学物質についても検討した。動物種は従来ラットが多く用いられてきたが、分子生物学的解析が可能なマウスを用いて開発を試みた。

生後 1 日のマウス (BALB/C) 小脳をパパイんで解離後、無血清培地を用いて、poly-L-lysine コートしたチャンバースライドに播いた。翌日 5pM-500nM 濃度の甲状腺ホルモン (T4 もしくは T3) やステロイドホルモン、環境化学物質などを添加し、3-4 日置きに培地を半量交換して 2-3 週間培養した。培養した小脳細胞は固定し、プルキンエ細胞を特異的に染色する抗カルビンジン抗体で染色し、樹状突起の伸展を、CCD カメラ (Sensys) で撮影し、コンピュータ画像解析装置 (MetaMorph, Universal Imaging) を用いて定量的に解析した。統計解析には ANOVA 解析、Post hoc (Bonferroni/Dunn) 検定を行い、有意差を検出した。

### 1. プルキンエ細胞培養系の確立と甲状腺ホルモンの働き

従来の培養法などを検討した結果、血清やアルブミンを含まない、トランスフェリン (100  $\mu$ g/ml)、インシュリン (10  $\mu$ g/ml)、ナトリウムセレンナイト (30nM) のみを含んだ DMEM/F12 無血清培地に、甲状腺ホルモンを添加し培養した結果、一定したプルキンエ細胞培養が得られた。図 1 に示すように、T4 添加群では、無添加群に比べプルキンエ細胞の樹状突起が著しく発達し、50pM 以上を添加した群で有意な効果がみられた。またこの効果は濃度依存性を示し、さらに T4 を特異的に阻害するアミオダロンによって阻害された。T4 による樹状突起伸展促進効果は、T3 を用いてもほぼ同様の結果を得た。また小脳の他の主要神経細胞である顆粒細胞やグリア細胞を特異抗体で染色して観察したところ、細胞数に有意な差は認められなかったが、T4 添加群では突起が伸張するなどの形態変化が観察された。以上の結果から、プルキンエ細胞樹状突起の発達分化には甲状腺ホルモンが必須であることが *in vitro* で確認された。なお、甲状腺ホルモン添加群では顆粒細胞やアストロサイトにおいても発達分化に伴う突起伸張などの変化がみられたことから、甲状腺ホルモンの影響はプルキンエ細胞に直接及び間接的に働くことが示唆された。

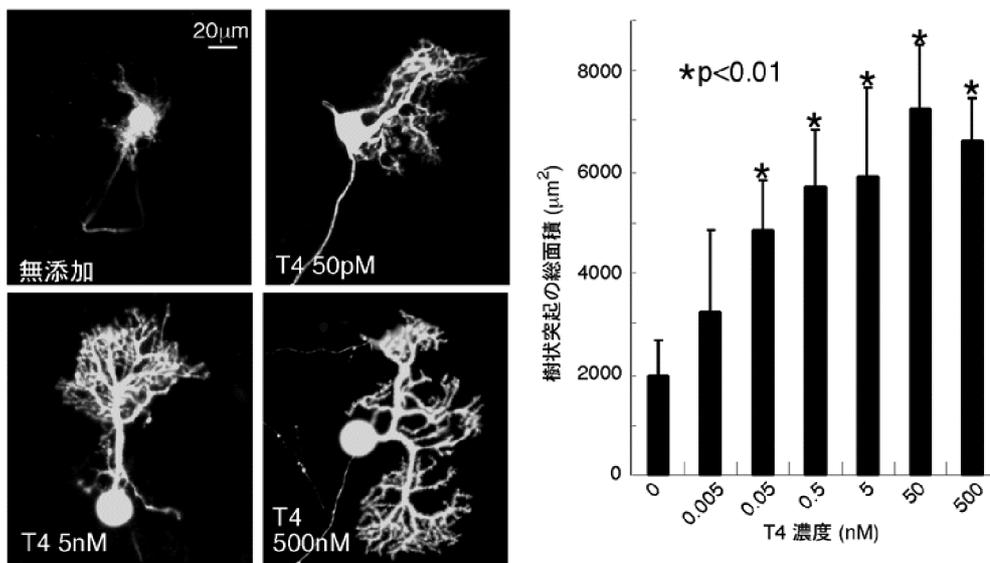


図1.甲状腺ホルモンの小脳プルキンエ神経細胞樹状突起発達への影響

2. プルキンエ細胞樹状突起発達分化における水酸化PCBの影響

PCBの中でも、その代謝産物である水酸化PCBの数種類やビスフェノールAは、図2に示すように、分子構造が甲状腺ホルモンと類似しており、その機能への影響が懸念されている。前述したようにマウス小脳プルキンエ細胞培養系が確立し、その樹状突起の発達分化が甲状腺ホルモン依存性であることが確認されたので、そこでまずこの系に神経系への影響が懸念されている、6種類の水酸化PCB(図3A)、ビスフェノールAを5pM-500nM添加して培養し、その影響を調べた。

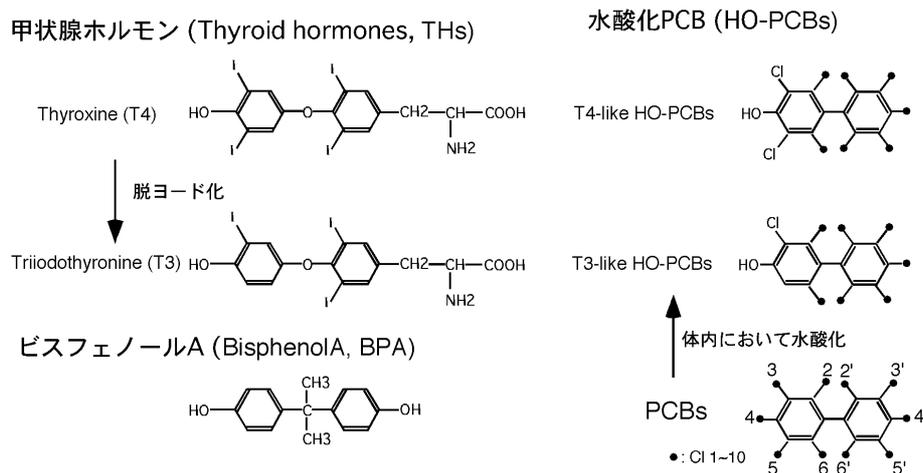


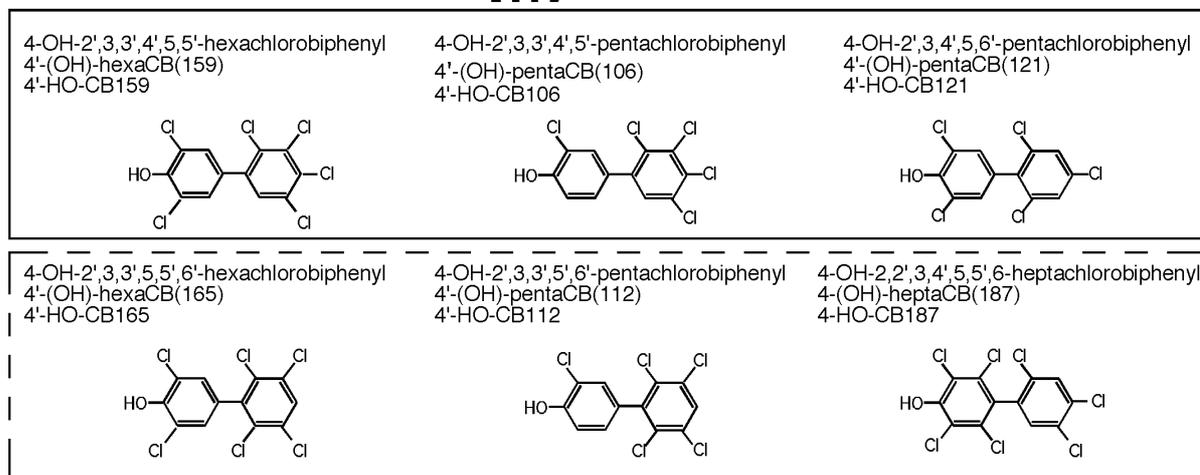
図2 甲状腺ホルモンに類似した水酸化PCB、BPA

甲状腺ホルモンのOH基とそれに隣接するI基を持つ構造は、その活性に重要であるという報告があることから、図3Aの6種を選び検討した。またビスフェノールAは、その構造からも推察できるように、甲状腺ホルモン系にもステロイドホルモン系にもかく乱効果があるという報告がある。図3Bには、使用したステロイド系ホルモン及び類似構造を持つ環境

化学物質を示した。

### A.使用した水酸化PCB

実線四角内は、プルキンエ細胞樹上突起伸展阻害効果のあるPCB  
 点線四角内は、阻害効果の認められなかったPCB



### B.使用したステロイドホルモン及び類似構造を持つ環境化学物質など

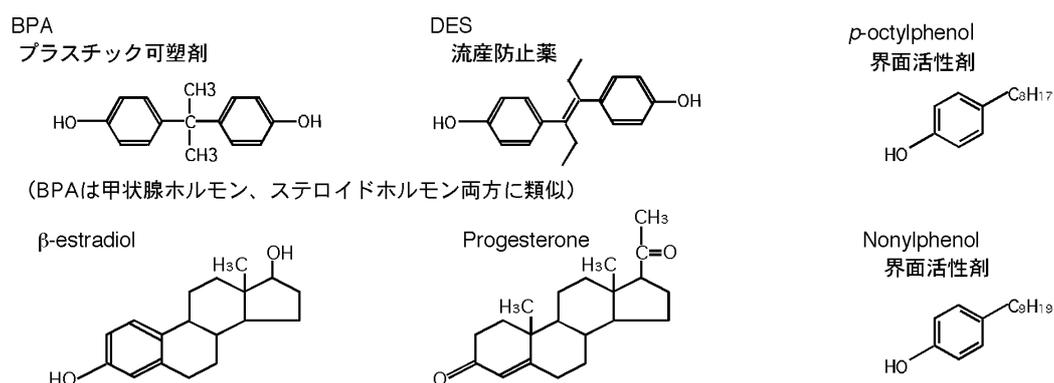


図3 使用した水酸化PCB類や環境化学物質など

図4に示すように、水酸化PCB(106)は、単独では無添加の対照群とほぼ同様でその影響は認められなかったが、甲状腺ホルモン存在下で添加すると、甲状腺ホルモン依存性の突起伸展効果を顕著に阻害した。図6に示すように、その効果はごく低濃度(5x10<sup>-11</sup>M)から有意であった(図6A)。さらに数種の水酸化PCBを試したところ、水酸化PCB(121)や水酸化PCB(159)は同様な阻害効果を示した(図6B,C)。一方水酸化PCB(112),水酸化PCB(165),水酸化PCB(187)はこの様な阻害効果を示さなかった(図6D-F)。これらの結果は、鯉洸等のレポーター遺伝子アッセイによるPCBによる甲状腺ホルモン核内レセプターを介した遺伝子発現への影響と一致した。

さらに甲状腺ホルモン無添加の系に阻害効果のない水酸化PCBを添加した場合、図5に見られるように、コントロールに比べ、樹状突起が細胞体から直接出ているプルキンエ細胞が多く見られ、総面積を測定すると有意に促進されていた(図6D-F)。しかし形態的に成熟したプルキンエ細胞のように、太い1本の樹状突起から細かい葉状の樹状突起を持つものではなく、正常な発達分化には甲状腺ホルモンが必須であることが推察された。また、

この効果はプルキンエ細胞自身が一過性で発現するという報告のある、プロジェステロンを添加した結果（図5，図7B）と類似していた。図6D-F，図7Bで示すように、この促進効果は一定濃度でのみ観察され、比較的濃い濃度では認められなかった。

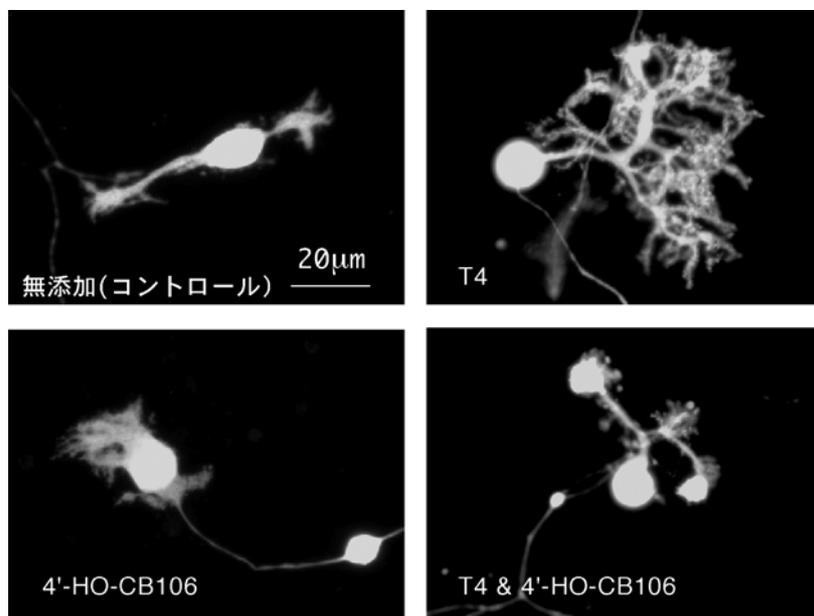


図4 低濃度水酸化PCB(106)による甲状腺ホルモン依存性プルキンエ細胞樹状突起伸展阻害

T4濃度：5nM,水酸化PCB(106)濃度：0.5nM

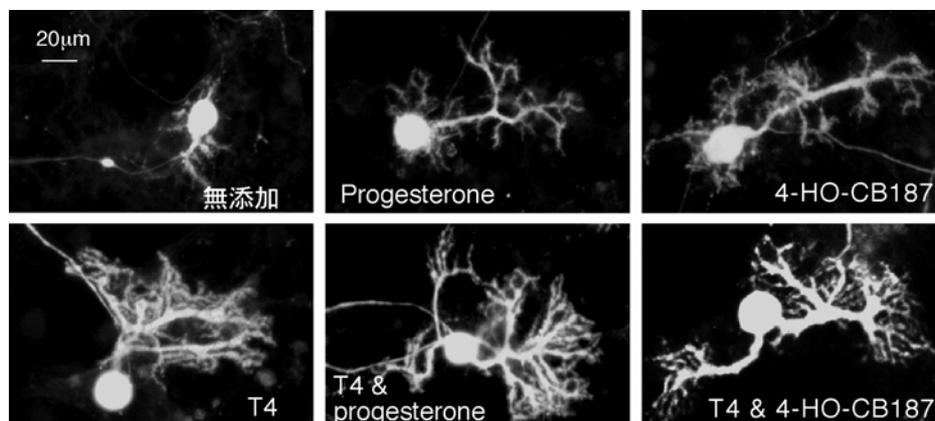
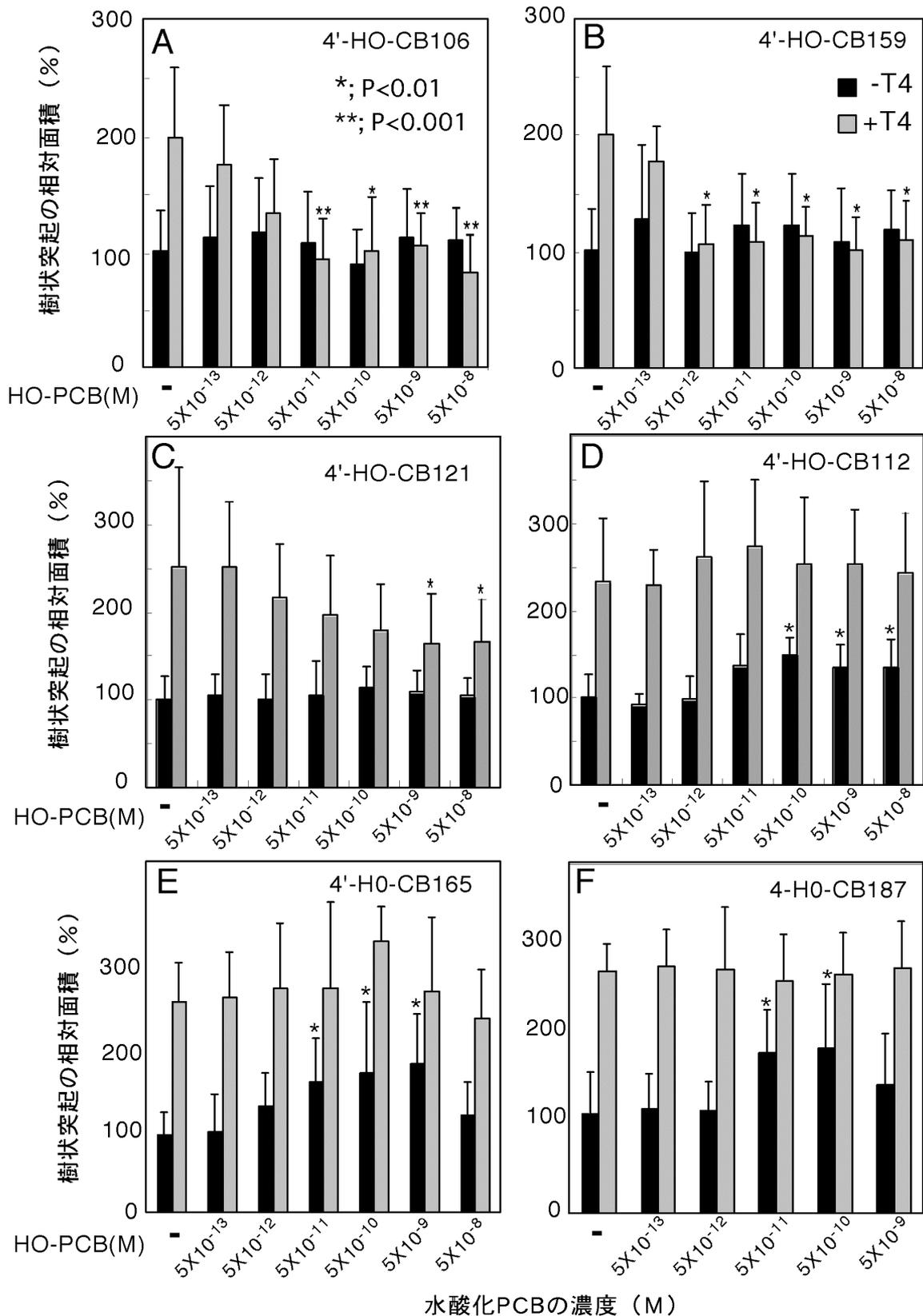


図5 プルキンエ細胞樹状突起伸展における水酸化PCB(187)、progesteroneの影響

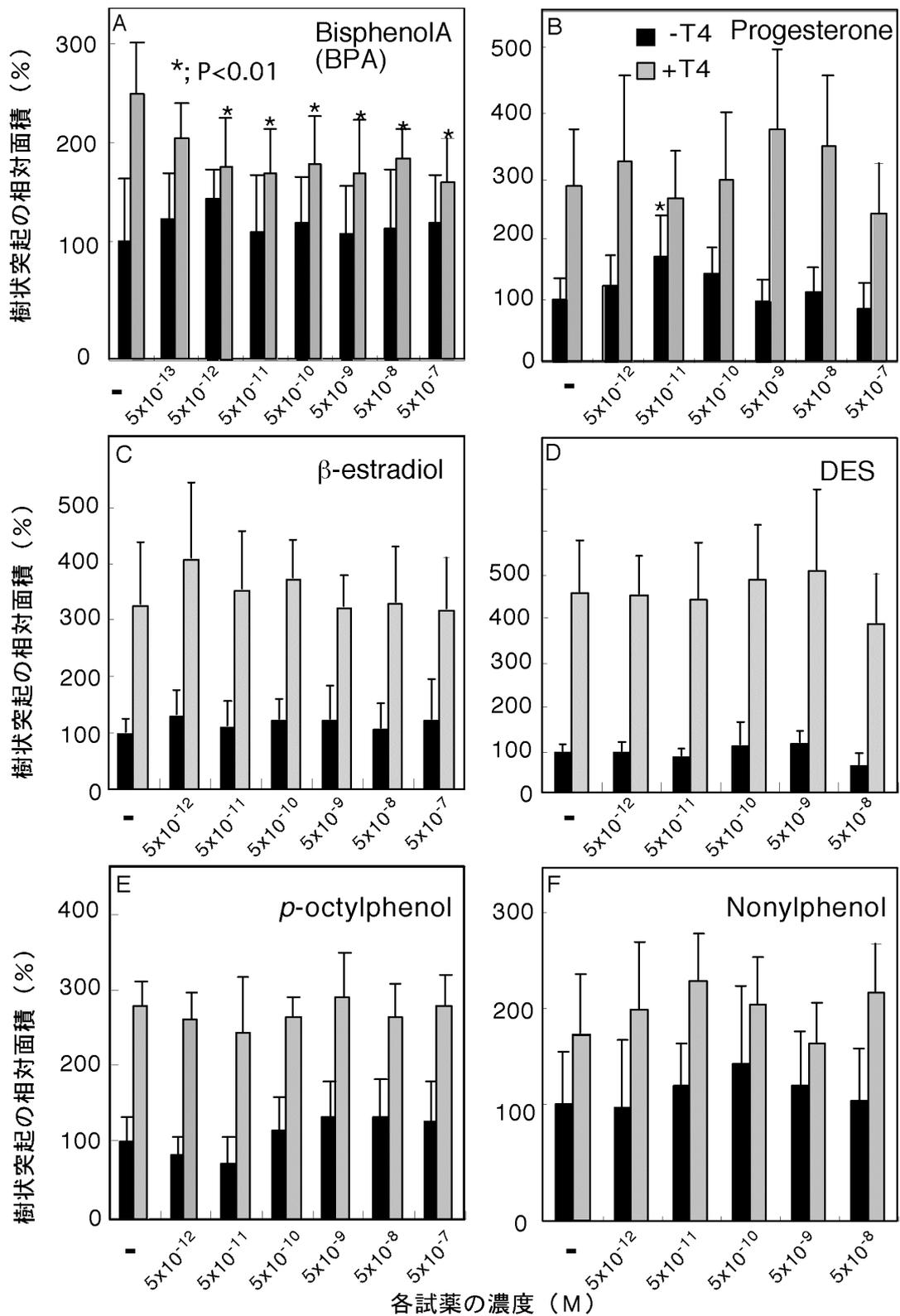
T4濃度：5nM,水酸化PCB(187)濃度：0.5nM, progesterone濃度：0.5nM

またビスフェノール A (BPA) を単独で添加した場合、図7A に示すように、突起伸展阻害する水酸化 PCB 同様、甲状腺ホルモン依存性のプルキンエ細胞樹状突起伸展をごく低濃度から有意に阻害した。



P値はそれぞれT4無添加、添加のコントロールに対してANOVA検定した。

図 6 水酸化PCBのプルキンエ細胞樹状突起伸展への影響



P値はそれぞれT4無添加、添加のコントロールに対してANOVA検定した。

図7 BPA及びステロイド系ホルモン、環境化学物質のプルキンエ細胞樹状突起伸展への影響

### 3. プルキンエ細胞樹状突起発達分化におけるステロイド系ホルモン及び類似構造を持つ環境化学物質の影響

プルキンエ細胞は発生の一時期にプロジェステロンを一過性に産生し、また硫酸プレグネロンを持続して産生するという報告があり、甲状腺ホルモンのみならずステロイド系ホルモンが発達分化に関与している可能性が高い。一方内分泌かく乱物質には、性ステロイドホルモン類似構造を持った化学物質が多数あり、その関与が懸念される。ビスフェノール A は両者のホルモンに類似していることが知られているが、プルキンエ細胞培養系ではビスフェノール A は阻害効果を持ち (図 7 A)、さらにぶろじえすてろんでは、促進効果があることを前述した (図 5, 図 7 B)。そこでさらに、このプルキンエ細胞培養の系に、図 3 B で示す  $\beta$ -estradiol, diethylstilbestrol (DES), nonylphenol, octylphenol などを 5pM-500nM、単独または T4 と同時に添加し、その影響を調べた。 $\beta$ -estradiol, DES, nonylphenol, p-octylphenol は、単独でも T4 と同時に添加しても、樹状突起の伸展に有意な影響はなかった。DES は 500nM 濃度で、細胞毒性が強く、添加後数日で小脳細胞は全て死滅した。

### C. 甲状腺ホルモン低下及び低ヨード下発育マウス脳発達における内分泌かく乱物質の影響

現在、低開発国など低栄養状態が続く地域では、ヨード欠乏による甲状腺ホルモン低下が起こっており、それに伴う子供の発達遅延、異常が危惧されている。またそのような地域においても、内分泌かく乱物質の影響は同等、むしろ劣悪であることも予想され、子供の脳神経系発達への影響が懸念される。そこで本研究では、甲状腺ホルモン低下及び低ヨード下で発育したマウスを作成し、動物実験、培養実験系を用いて内分泌かく乱物質の影響を調べた。

妊娠 BALB/C マウス (胎齢 14 日から) に、1) propiouthiouracil (PTU) 皮下投与、2) PTU 飲料水経由投与、3) 低ヨード飼料投与、4) PTU 飲料水経由投与 + 低ヨード飼料の飼育を行い、産まれてきたマウスの身体症状、体重、脳の大きさを調べ、さらに組織学的に形態異常などを観察した。また異常が予測される小脳は、分散培養、microexplant 培養、組織培養系に移して、プルキンエ細胞や顆粒細胞の発達分化を観察し甲状腺ホルモンなどの影響を調べた。

PTU 投与、PTU 投与及び低ヨード飼料による甲状腺ホルモン低下マウスを作成し、図 1 のように、両マウスは身体が小さく低体重であった。また脳全体を観察しても、外観からは大きな変化は認められず、小脳の大きさにも違いはなかった。さらに小脳を組織形態学的に観察すると、図 2 (PTU 投与マウス) に示すようにプルキンエ細胞樹状突起の発達分化は、対照群に比べ明らかに低下傾向が認められた。

PTU 投与による甲状腺ホルモン低下マウスの小脳を、無血清培地を用い、甲状腺ホルモン添加、無添加の条件で microexplant culture 培養し、顆粒細胞の発達分化に必要な細胞移動を調べた。図 3 に実験の 1 例を示すが、対照群 (青バー: ヨード、T4 有り) に比べ、ヨード、T4 のどちらか、もしくは両方を欠乏した状態では、顆粒細胞の移動は抑制傾向が認められた。

また PTU 及び低ヨード条件による甲状腺ホルモン低下マウスについては、さらに実験的甲状腺ホルモンマウスの発達異常、小脳プルキンエ細胞の樹状突起の発達異常、小脳顆粒細胞の移動抑制などが確認された。

図1. プロピオチオウラシルによる甲状腺ホルモン低下マウスの発達異常



図2. 甲状腺ホルモン低下マウスにおけるプルキンエ細胞の発達異常

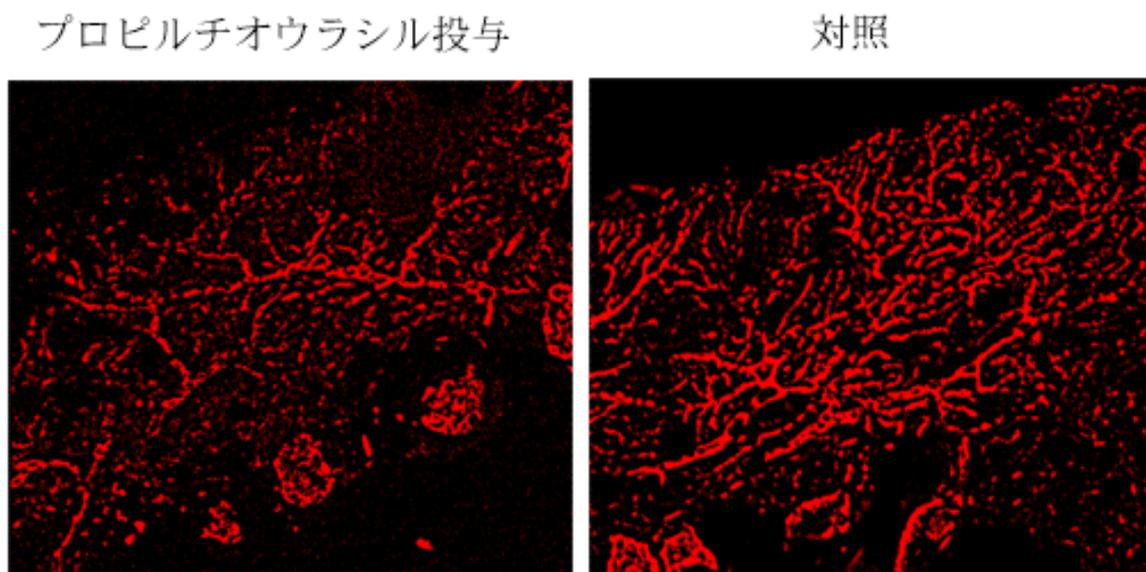
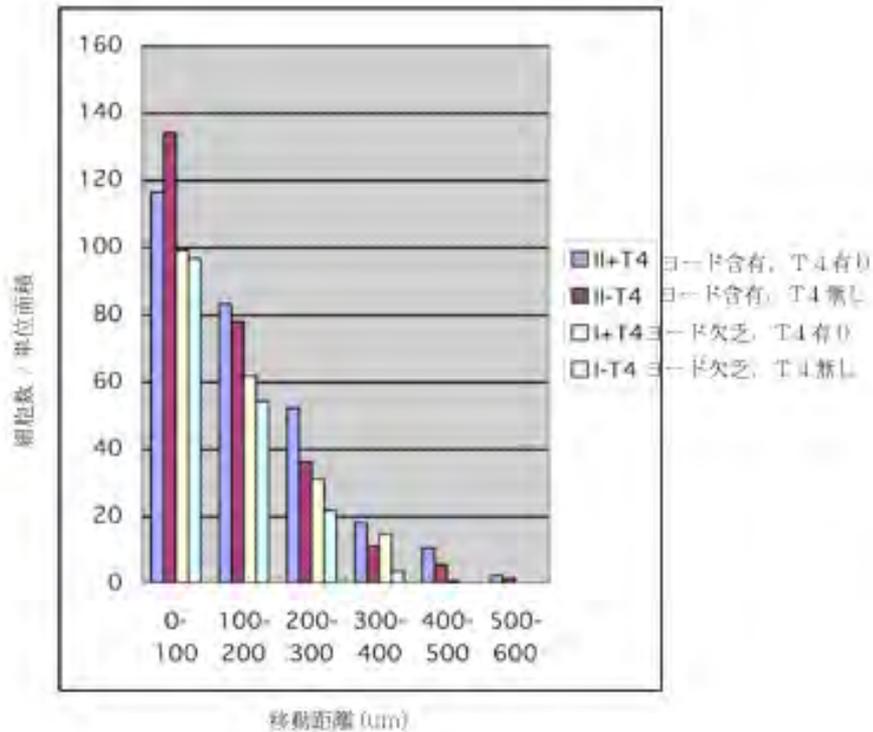


図3 甲状腺ホルモン低下マウスにおける小脳顆粒細胞の移動抑制



抑制効果はヨード、T4 両方を欠乏した状態で、一番大きかった。

#### D. オリゴマー形成によるシナプスに存在する神経伝達物質受容体の新しい調節機構

ゲノム上にはオーファン受容体を含め約 800 個の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) が存在している。これまで GPCR の多様性については、主にゲノム情報のみ (塩基配列の違い) に基づき議論されてきた。しかしながら、この多様性は他の要因からも生じることが近年明らかになってきた。そのひとつとして、受容体同士の相互作用がある。G タンパク質共役受容体 (GPCR) 同士がホモダイマーやヘテロダイマーを形成して受容体の細胞内移動やシグナル伝達を変化させ、機能調節に重要な役割を果たすというものである。

本研究で、神経伝達の調節など様々な生理作用に関与する GPCR 型プリン受容体ファミリー (アデノシン受容体と P2 受容体に分類される) における受容体間ヘテロダイマーの可能性を探索して興味深い結果を得た。すなわち、1. A1 タイプのアデノシン受容体と P2Y1 タイプの P2 受容体の cDNA を培養細胞に同時にトランスフェクションして各受容体を発現させると、免疫組織化学的分析でも両受容体は細胞の同部位に局在すること、2. 免疫沈降や BRET 測定により両受容体がヘテロダイマーを形成すること、3. リガンド結合およびセカンドメッセンジャー系の測定で受容体の薬理学的特性が P2 受容体の特異性をもつアデノシン受容体というハイブリッド的受容体活性に変化すること、4. さらに、重要なことであるが、A1 受容体と P2Y1 受容体のヘテロダイマー形成は、実際の脳組織でも起こっていることも証明できた。これらの結果、プリン受容体による神経伝達の抑制的調節が従来考えられているようにアデノシン受容体を介するのみならず、P2 受容体および両者のヘテロダイマーによっても起こること、すなわちアデノシンに変換する前に ATP 自身でもアデノシン様の生理的活性が発現して神経伝達調節をおこなう可能性を提唱するものであろう。

これらの研究は、GPCR のダイマー形成は特殊な現象ではなく、多くの受容体間で生ずるもので、受容体の多様性調節機構として様々な役割を果たすものであり、その異常は疾病の要因ともなりうることを示す。医薬品の開発を含めた GPCR 研究の新たな展開の糸口になることはいうまでもない。

## (2) 考察と今後の展望

A. の培養大脳皮質神経細胞の系では、甲状腺ホルモンのシナプス形成促進作用はきれいに証明でき、甲状腺ホルモンの脳機能発達への重要性の細胞レベルでのメカニズムとして、甲状腺ホルモンは正常なシナプス形成に必須であることが明らかになった。しかしながら条件検討の膨大な実験結果では、無添加コントロール実験でシナプス形成を大量に行わせ、自発発火に伴う神経細胞内 Ca の変動でモニターするには、血清のある程度の濃度が必要で、無血清化できないことが判明した。そのため化学物質添加では、ことに脂溶性の高いものなどでは、血清タンパク、成分への吸着が考えられ、低濃度での効果が出にくいことが考えられた。水酸化 PCB での preliminary な結果では顕著な抑制作用が観察されたが、多くの薬物の検討、濃度依存性などより詳しい実験は、無血清化できた小脳プルキンエ細胞系を中心に行うことにした。

B. の培養小脳神経細胞の系では、小脳の重要な出力神経細胞であるプルキンエ細胞の樹状突起の発達分化には、甲状腺ホルモンが必須であること、ある種の水酸化 PCB やビスフェノール A は、甲状腺ホルモン依存性の樹状突起伸展を有意に抑制することが明らかとなった。水酸化 PCB の抑制効果は、鯉鰯等の遺伝子発現抑制の結果とほぼ一致していることから、核内レセプターを介した抑制によるものと推測される。一方ビスフェノール A は、鯉鰯等のレポーターアッセイ系では、遺伝子レベルで抑制効果が認められなかったことから、別の経路で抑制効果が起きた可能性が考えられる。ビスフェノール A はエストロゲン活性の報告がある一方で、甲状腺ホルモンとの関与も指摘されており、性ステロイド系ホルモンや類似構造を持った化学物質にはこの抑制効果が認められなかったことから、ビスフェノール A の抑制効果は、何らかの甲状腺ホルモンの働きを介して起きている可能性が示唆された。甲状腺ホルモン核内レセプターの存在は、小脳を含む神経系では、神経細胞やオリゴデンドロサイトなどにおいては確認されているが、アストロサイトにおいては未だはっきりと確認されておらず、nongenomic な働きの可能性が指摘されており、ビスフェノール A はこれを介しているのかもしれない。詳細を検討中である。

また preliminary な結果であるが、抑制効果のある水酸化 PCB は、小脳培養系においてバグマングリア特異的なグルタミン酸トランスポーター GLAST の発現を有意に阻害した。このことから、抑制効果のある水酸化 PCB は、神経細胞のみならず、アストロサイトにも影響を及ぼしている可能性が示唆された。

一方で、使用した水酸化 PCB の中で、甲状腺ホルモン依存性の樹状突起伸展阻害効果を持たないものは、甲状腺ホルモン無添加条件で、樹状突起伸展を促進する傾向が認められた。この効果はプルキンエ細胞自身が一過性に発現するプロジェステロンの効果と類似していることから、これらの水酸化 PCB はプロジェステロンのアゴニストとして働いた可能性が考えられた。

またステロイド系の化学物質は、樹状突起伸展抑制効果を示したビスフェノール A や甲状腺ホルモン無添加条件で促進効果を示したプロジェステロン以外は、有意な相違を示さなかったが、形態観察からは、甲状腺ホルモン無添加条件で、プロジェステロン同様の突起伸展促進効果の傾向が認められた。最近、大阪大・小倉等によって、小脳培養細胞系で、エストロゲンによって誘導される細胞死に対する感受性が雌雄で異なるという報告が発表されており、小脳神経細胞を雌雄に分けて培養すると、エストロゲン系の環境化学物質に対する影響が明らかとなるのかもしれない。現在この点から検討中である。

以上、マウス小脳培養プルキンエ細胞の樹状突起伸展において、水酸化 PCB やビスフェノール A などが様々に影響を及ぼしていることが明らかとなり、生体レベルでの正常な発達分化のかく乱の可能性が懸念される。神経細胞樹状突起の伸展は、正常な神経回路の形成、シナプス形成において必須であることから、何らかの影響で正常に発達しないと、様々な発達異常の可能性が考えられる。PCB の使用は既に 1970 年に中止されているが、その安定性、脂溶性から生体への汚染は深刻で、世界中で汚染が確認されている。PCB は 209 種、その代謝産物である水酸化 PCB も多くの種類があり、どういう構造を持った PCB がどのように働き、生体に影響を及ぼすのか、さらに神経系の発生・分化をかく乱するのか、さら

なる研究が重要と考える。

C. の PTU 及び低ヨード条件による甲状腺ホルモン低下マウスについては、ヨード欠乏マウス群を含めて、小脳の発達分化に焦点を絞り、培養系における解析さらに行動学的解析を進めることが興味深い。内分泌かく乱物質の投与も平行して行い、それぞれの実験において、実際の甲状腺ホルモン濃度も測定することが重要である。

### 3. 5 内分泌かく乱物質など環境化学物質の脳機能発達に与える影響のサル等を用いた多角的評価（吉川泰弘グループ）

#### (1) 研究内容及び成果

本グループでは内分泌かく乱物質など環境化学物質が高等動物における脳神経系機能発達にどのような影響を与えるかを評価することを目標とした。そのため、モデル動物に適した多面的な「行動学的」評価系を確立することを第一の目的とした。また用いる動物も齧歯類（ラット）はもちろん、最もヒトに近い実験動物であるサル類を加え、種差を検討しながら、ヒトにおけるリスク評価に外挿する事を目指した。また基盤研究として複雑なメカニズムを有する内分泌かく乱物質の影響を細胞レベルで解析するための評価系の確立も試み、とくに脳内でも高次機能を特異的につかさどるモノアミン系のかく乱を評価するための実験系の確立を第二の目的とした。本グループで内分泌かく乱物質として選択したのはダイオキシシン（2, 3, 7, 8-TCDD）、PCB類、ビスフェノールA、およびノニルフェノールである。

#### A サルを用いた行動学的評価

本グループの最重要課題であったサルの行動試験開発の結果、およびその応用についての結果を報告する。サルの行動を毒性学的指標として測定しうる行動試験系として、

- 1) 母子行動（母親と次世代個体間の行動を多項目に分類し評価する:A)
- 2) 4段指迷路試験（どの個体でも適用できる記憶学習能力試験:B)
- 3) 出合わせ試験（同世代2個体の相互行動を分類し社会性を評価する:C 行動発達をみるため1年の間隔をおき2回行った)
- 4) アイコンタクト試験（観察者（ヒト）に対する意識を定量化する簡便な試験:D) を確立した（図1）。

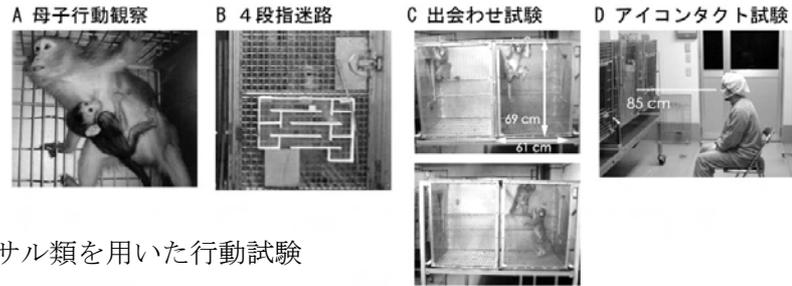


図1 サル類を用いた行動試験

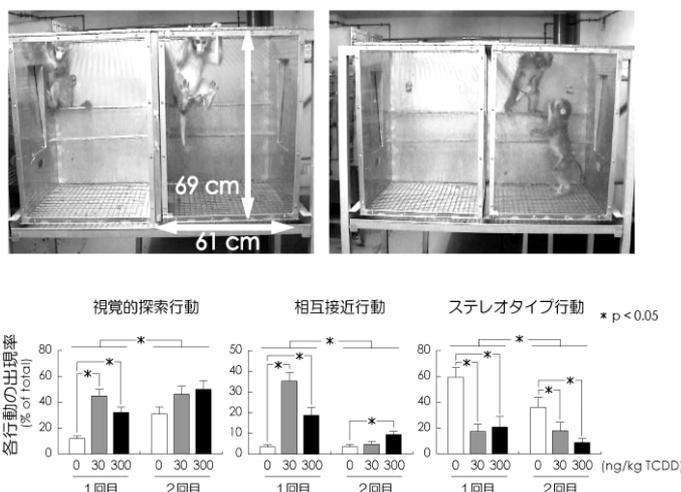
以下、これらの試験法を利用して得られた胎生期・授乳期化学物質暴露の行動発達への影響についての知見を報告する。

#### A-1 アカゲザルにおける妊娠期・授乳期ダイオキシン暴露と次世代個体の行動発達

アカゲザルにおいて周産期ダイオキシン暴露が次世代個体の行動発達に与える影響を評価した。妊娠アカゲザル（妊娠20日目）に対し、ダイオキシンを0、30、300ng/kgで皮下投与をおこなった後、1ヶ月毎に5%の追加投与により体内ダイオキシン濃度を維持した。暴露による明らかな身体発育障害は見られなかった。行動学的評価の結果、周産期ダイオキシン暴露は4段指迷路における学習能力に有意な影響を与えなかった。アイコンタクト試験における観察者（ヒト）に対する意識にはダイオキシン暴露は影響を与えなかった。しかし、同世代個体との出会わせ試験の結果に有意な影響を与えた。暴露個体は出会わせテスト用特別ケージという新規場面における恐怖心が比較的希薄で、他個体に対してより多く接近することを試みた（図2）。この傾向は年齢を経るにつれ減少した（図2）。ダイオキシンの行動発達への影響をサルというヒトに近縁な動物を用いて発達行動学的に評価した研究は社会的にも非常に重要である。

図 2

アカゲザルにおける胎生期・授乳期TCDD暴露  
 出合わせ試験の結果（1回目：1歳時、2回目：2歳時）



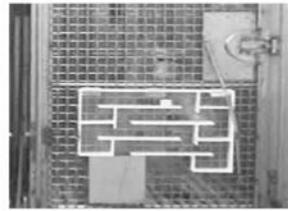
#### A-2 カニクイザルにおける妊娠後期母体血中PCB濃度と次世代個体の行動表現型の関係

カニクイザル (n=6) における妊娠中の母体血漿中PCB濃度と次世代個体の行動発達の関係を検討した。次世代個体について生後8から9ヶ月時にアイコンタクト試験、生後16から18ヶ月時に4段指迷路試験を行い、その成績と妊娠131日目における母体血漿中PCB濃度の相関関係を調べた。PCBについては22種類の異性体について濃度測定を行った。母体血漿中の総PCB濃度は平均95.2 pg/mL (35~190 pg/mL) であった。観察者に対する意識を測ることができると考えられる一定時間内のアイコンタクトの回数と総PCB濃度には相関が見られなかった ( $R^2=0.0013$ ,  $p>0.8$ ) が、4段指迷路の成績 (課題をクリアするのに必要とした試行回数) と総PCB濃度との間には弱い正の相関関係がある傾向がみられた ( $R^2=0.502$ ,  $p=0.18$ ) (図3)。また同時に測定した各異性体濃度と行動学的指標との相関を見た結果、異性体によって相関の度合いは異なり、異性体間で神経系への影響の強さに差があることが予測された。本研究のようにサルにおいて実験的手法を用いて疫学的に関係を調べることはヒトでのリスクを評価するために非常に有益である。しかしながらこの調査は例数が6と少ないため、現在、さらに例数を増やし検討している。

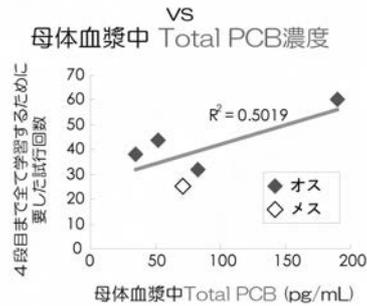
図 3

カニクイザルにおける妊娠母体血漿中PCB濃度と次世代個体の行動

・ 4段指迷路の成績



4段指迷路試験成績（累積試行回数）



A-3 カニクイザルにおける胎生期ビスフェノールA暴露と次世代個体の行動発達

ビスフェノールAは従来の弱エストロゲン様作用だけでなく、甲状腺ホルモン系にもその影響が懸念されている物質である。ラットを用いた研究では低用量でも行動発達に影響を与えうることが明らかになっているが（B-3参照）、未だサルを用いた研究は無い。我々は妊娠カニクイザルに皮下ポンプを用いて極低濃度（10  $\mu$ g/kg/day）暴露を行った。現在母子行動、出会わせ試験、指迷路試験、アイコンタクト試験、薬物負荷試験等を行いその膨大なデータを解析中であり結果が出次第公表する予定である。

B ラットを用いた行動学的評価

内分泌かく乱物質の影響を行動学的に評価する系として注意力の測定系開発を試みた。また、神経伝達物質特異的回路の障害を検出する行動試験系の開発に取り組んだ。その他に従来の行動試験を加え、一連の行動試験群を用いて被験物質の行動発達に与える影響を包括的に検出しようとする系を確立した。以下、各被験物質の影響についての結果等を報告する。

B-1 ラットの注意力（ヴィジランス）測定法の開発

ラットを被験体としてその衝動性（ポーキング維持時間）の検討とcaffeine投与による注意力（ヴィジランス）の変化を観察した。ノーズポーキング（鼻端挿入）型のオペ

ラントチャンバーを用いてF 3 4 4系の雄ラット8匹にポーキング訓練を行った。ラットは2000Hz音提示後20秒以内にノーズポークを行い、維持時間の後提示される5000Hz音提示後5秒以内に鼻を抜けば報酬を得ることができた。維持時間は始め0.5秒とし、1日100試行の訓練を行った。同一条件下で85%以上正反応のセッションが2日連続することを基準とし、基準を達成した翌日から維持時間を0.5秒増加させ、最終的に4秒維持できるまで訓練した。ランダム訓練では、ポーキングの維持時間を0.5秒、1秒、2秒、3秒、4秒の5条件設定し、これをランダムな順番で提示した。したがって、ラットは維持時間が終了し、5000Hz音を聞いてから鼻を抜くことを要求された。ランダム訓練は正反応率が85%を超えるセッションが10日続くまで行った。薬物テストではsaline、caffeine 5mg/kg、caffeine 10mg/kgのうちいずれか1条件の薬物を投与して10分後にランダム訓練と同様の手続きによる薬物条件テストを行った。薬物テストは1日おきに行い、テスト日とテスト日の間に薬物を投与せずにランダム訓練と同様の手続きを行う無投与セッションをおいた。無投与セッションにおいて正反応率が85%を維持していることを確認した。実験の結果、caffeine投与により、鼻抜き潜時が短縮したポーキング訓練の獲得率や鼻抜き潜時の変化を観察することでADHDモデル動物のテストが可能であると考えられた。

この実験系を用いて周産期プロピオチオウラシル(抗甲状腺剤；PTU)投与ラットの衝動性をテストした結果、周産期PTU投与ラットはポーキング訓練機において維持時間が長くなるにつれてポーキング訓練から脱落する個体が増え、学習能力は維持されているものの注意力の持続性が低くなっていることが明らかとなった。

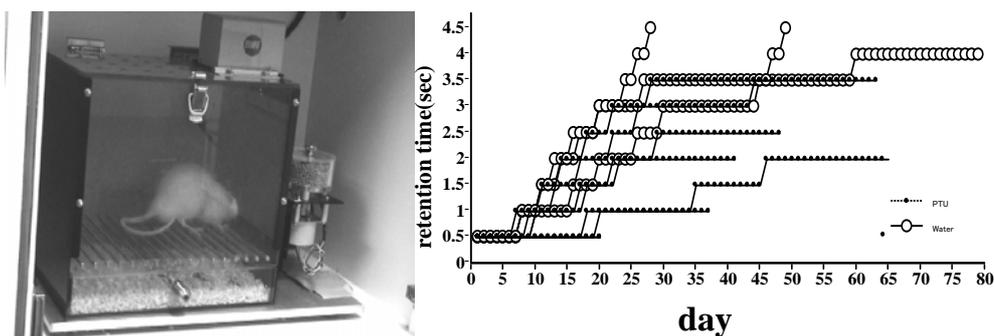


図4 ラットのノーズポーキング (左) と周産期 PTU 投与ラットのノーズポーク訓練 (右)

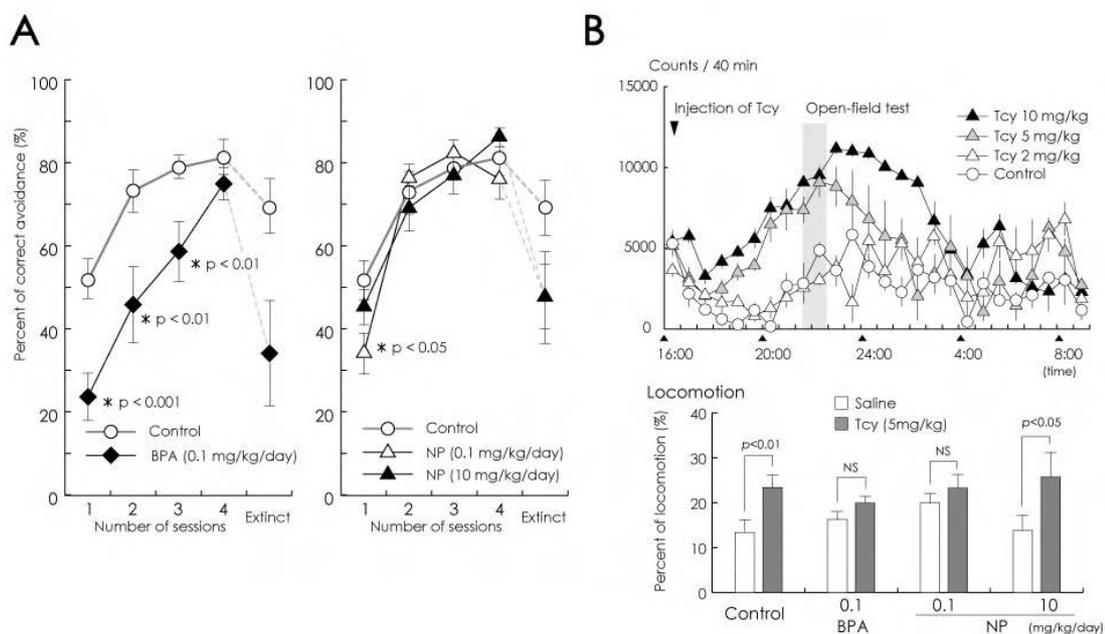
## B-2 周産期甲状腺機能攪乱が生後の行動発達に与える影響：注意欠陥多動性様行動の惹起

近年、ヒトにおいて内分泌攪乱化学物質の中でもPCBを含む甲状腺ホルモン作用を攪乱する物質の中樞神経系発達への悪影響および、その後の精神活動に与える影響が懸念され、特に注意欠陥多動性障害 (ADHD) の危険因子の一つとしての可能性が指摘されている。本実験ではラットを用いて抗甲状腺剤プロピオチオウラシル (PTU) による実験的周産期甲状腺機能低下状態がADHD様の行動発達異常をもたらす可能性について検証した。オープンフィールド試験、受動的回避学習能力試験、能動的回避学習能力試験、および夜間自発運動量測定の結果から、周産期甲状腺機能低下により記憶学習能力の低下、新奇場面における恐怖心の欠如、電気刺激に対する恐怖心の低下、無刺激下での活動周期の変調が明らかとなった、これらの結果から、PTUにより学習障害、注意力低下および静止行動を嫌う多動性といったADHD様の行動学的特質をもたらされたと考えられる。

## B-3 ラットにおける周産期ビスフェノールAおよびノニルフェノール暴露が行動発達に及ぼす影響

ラットにおける低濃度BPA (0.1mg/kg/day)、およびノニルフェノール (NP) (0.1および10 mg/kg/day) の周産期暴露が次世代オスの行動発達におよぼす影響を検討した。BPAおよびNP暴露は次世代オスの夜間自発運動量、オープンフィールド行動、高架式十字迷路試験における行動に有意な影響を与えなかった。受動的回避学習能力試験ではBPAおよびNP暴露群は対照群に比べ電気刺激を回避する傾向がみられた。能動的回避学習能力試験ではNP (0.1 mg/kg/day) 暴露群はわずかに条件刺激 (音) による回避率の低下がみられた一方、BPA暴露群は顕著な条件刺激による回避率の低下、および非条件刺激 (電気刺激) からの逃避 (移動) の失敗の増加がみられた。これら一連の行動学的試験から、周産期BPAおよびNP暴露個体は、電気刺激という恐怖条件に対し過敏であると考えられた。さらにモノアミンオキシダーゼ阻害剤投与により誘発される移動量の増加がBPAおよびNP暴露個体においては減弱していたことから (図5) 脳内モノアミン系の異常が推察された。

図5 A: 周産期ビスフェノール A(BPA) (左)、ノニルフェノール(NP) (右) 暴露が学習能力に与える影響 B: モノアミンオキシダーゼ阻害剤 (トラニルサイプロミン, Tcy) 投与による一過性の活動量増加 (上) と周産期 BPA および低濃度 NP 暴露による Tcy 誘発活動量増加応答性の消失 (下)



#### B-4 ラットにおける周産期水酸化PCB暴露が行動発達に及ぼす影響

鯉淵グループの実験により甲状腺ホルモンと拮抗することが明らかとなった水酸化PCB(5005)のラットにおける胎生期暴露が行動発達に及ぼす影響を検討した。妊娠7日目から生後13日まで計28日間、皮下埋設ポンプを用いて水酸化PCBを低濃度(0.01mg/kg/day)、高濃度(1.0mg/kg/day)で投与した。今回の水酸化PCB暴露は母体体重、出生日、出生数、次世代の体重増加等には全く影響を与えなかった。また行動試験としてオープンフィールドテストを行ったが新奇場面における一般行動には影響が見られなかった。今後、本グループで確立している一連の特異的行動試験を行い、学習能力、恐怖反応等を評価する予定である。

#### C サル・ラットを用いたin vitro評価系の確立

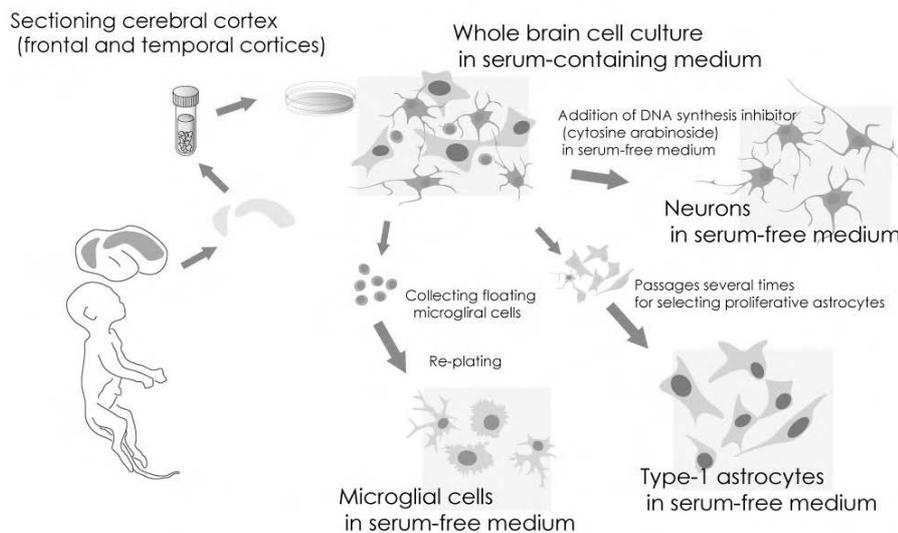
細胞レベルでの種差、特に齧歯類と霊長類間の種差を論じる場合、サルを用いた初代培養系が望まれるため、サル胎仔由来の神経細胞初代培養系の確立を試みた。また、ビスフェノールAがもたらす脳機能障害のメカニズムの一因としてプログラム細胞死のかく乱の可能性を提示した。さらに、ビスフェノールAやPCB等の内分泌かく乱物質が脳機

能を傷害するメカニズムの一つとして脳内モノアミン系のかく乱が色濃くなってきたことから、モノアミン系の障害を評価しうる *in vitro* 系の確立を試みた。

### C-1 サル胎仔大脳皮質由来初代神経細胞、アストロサイト、およびミクログリアの無血清選択培養法の確立

カニクイザル胎仔由来大脳神経細胞の初代培養を作成するために胎齢80, 93, 102日齢の胎仔の大脳を液体窒素にて長期保存した。それぞれの胎齢の神経細胞を血清含有培養液で培養した結果、材料としては組織重量あたりの得られる細胞数および培養後の生存率の点で80日齢胎仔が最良と考えられた。さらに機能的シナプスを形成させ、神経活動を観察することに成功した。さらにカニクイザル胎仔由来神経細胞、アストログリアおよびミクログリアの無血清培養液中選択培養法の確立を試みた。神経細胞はDNA合成阻害剤の添加によるグリア系細胞の増殖阻止によって無血清培養液中で高純度に生存させる事に成功した。アストログリアは血清添加培養液中での高い増殖能を利用し継代を3回程度繰り返し、無血清培養液中で維持した。ミクログリアは他の細胞に比べ接着性が弱いため浮遊して存在することを利用し血清添加混合培養系の弱接着性細胞を培養液攪拌により回収し、再度まき直して無血清培養液中で維持した。化学的に限定された無血清培養液中での神経系細胞の選択的培養は微量の化学物質の影響を神経系異種細胞間の相互作用を排して評価することが可能であり、内分泌攪乱化学物質の影響評価に非常に有用である。

図6 カニクイザル胎仔大脳皮質由来神経系細胞の無血清初代培養法



## C-2 ビスフェノールAおよびノニルフェノールによるStaurosporine誘発神経細胞死の阻害

正常な中枢神経系の発達は細胞の増殖、移動、分化そしてプログラム細胞死によって厳密に制御されている。我々は、内分泌攪乱化学物質の中でも弱いエストロゲン様作用を有することで知られるビスフェノールA (BPA) およびノニルフェノール (NP) の神経細胞死に対する影響を検討する目的で、大脳皮質または海馬由来初代培養神経細胞においてBPA、およびNPの暴露がStaurosporine誘発神経細胞死に与える影響を評価した。大脳皮質由来神経細胞においてBPAは有意な細胞死抑制効果を示し、NPも若干の細胞死抑制効果を示した。海馬由来神経細胞においてBPAは有意な細胞死抑制効果を示し、NPも若干の細胞死抑制効果を示した。細胞死誘発 6 時間後のCaspase-3活性を定量した結果、大脳皮質由来神経細胞においてBPAおよびNP暴露は有意にStaurosporineによるCaspase-3活性の上昇を抑制した。海馬由来神経細胞ではBPAおよびNP暴露は有意にCaspase-3活性上昇を抑制した。さらに大脳皮質、海馬由来神経細胞において低濃度BPA (10nM) も同様に有意にCaspase-3の活性上昇を抑制した。本実験の結果より、BPAおよびNPはStaurosporineによる神経細胞死に対しCaspase-3の活性上昇の阻害を伴う細胞死抑制効果を示す事が明らかとなった。

## C-3 マウス中脳由来初代培養下神経細胞における自発的細胞内カルシウム変動における内因性ドーパミンの役割

ビスフェノールAやPCB等の内分泌かく乱物質が脳機能を傷害するメカニズムの一つとして脳内モノアミン系のかく乱が色濃くなってきた。そこで我々は脳内モノアミン系の発達および化学物質によるそのかく乱を評価しうる *in vitro*系の確立を目指してきた。マウス初代培養中脳神経細胞が、シナプスを介して自発的かつ周期的な発火を起こし、その現象を細胞内カルシウム濃度の周期的変化 (シンクロナスオシレーション) として観察することが可能であることを初めて明らかにした。さらにこの現象における内因性ドーパミンの役割を検索した。中脳神経細胞における細胞内カルシウムシンクロナスオシレーションは、D1レセプターアンタゴニストであるSCH-12679 によりシンクロナスオシレーションは停止し、D2レセプターアンタゴニストであるRacloprideにより細胞内カルシウム上昇とオシレーションの停止が見られた。このことから、内因性ドーパミンは、作用機序の異なるD1およびD2レセプターを介したメカニズムによりオシレーションを維持していると考えられる。さらにAP5存在下ではRacloprideによって細胞内カルシウムの上昇が生じるのに対し、AP5同様にオシレーションを停止させる電位依存性LタイプカルシウムチャネルアンタゴニストNifedipine存在下ではRacloprideによって細胞内カルシウムの上昇が生じないことから、D2Rの細胞内カルシウム流入に対する抑

制作用は、NMDAレセプターを介してではなく、電位依存性Lタイプカルシウムチャンネルを介して生じている可能性が示唆された。ここで確立した系の特徴は起始核である中脳由来の細胞を材料としながらもその中で機能的シナプスを介した回路網を形成しているという従来の系よりもより生体内に近い*in vitro*系という点である。

#### C-4 セロトニンによるラット大脳皮質由来初代培養下神経細胞における自発的細胞内カルシウム変動の頻度の低下

ここではラット胎仔大脳皮質由来神経細胞における神経活動を伴う自発的細胞内カルシウム変動の頻度にセロトニンが抑制的に働くことを明らかにした。さらにセロトニン受容体のうち5HT1Aが特に寄与していることも明らかにした。この事実は発達期における神経活動依存的回路網発達をセロトニンがコントロールしていることを示唆する。今後、この大脳皮質神経回路網発達に対するセロトニンの役割を明らかにし、ここに化学物質等がどのように影響を与えるかを検討したい。この系の特徴的な点は、モノアミン系を調べるといっても、その起始核ではなく、その投射先の一つで脳の高次機能の要である大脳皮質を材料とし、モノアミンによる投射先の神経回路の発達・成熟を指標としたところにある。また、セロトニンだけでなくドーパミン、ノルアドレナリンについても同様に評価系を確立し、最終的には大脳皮質発達におけるモノアミンの重要性、またその発達の化学物質によるかく乱の有無、程度を簡便に妥当性高く評価できる系を確立したい。

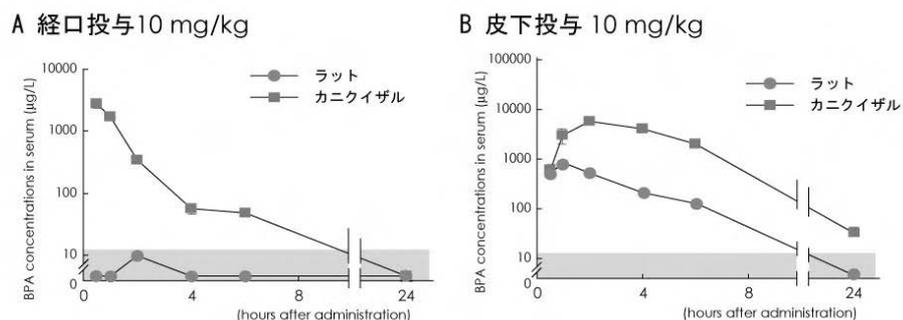
#### D ADME（吸収、分布、代謝、排泄）の検討

ここではビスフェノールAの薬物動態における種差を検討した。またサルにおけるビスフェノールAの母体・胎仔分布を検討した。

##### D-1 ラットとサルにおけるビスフェノールAの薬物動態における種差の検討

カニクイザルとラットの間に存在するビスフェノールA(BPA)の吸収代謝排泄能力における種差を検討した。雌カニクイザルおよび雌ラットに対し10mg/kgあるいは100mg/kg BPAをそれぞれ経口あるいは皮下へ単回投与し、血中ビスフェノールA濃度を経時的に測定した。その結果、経口と皮下投与どちらの経路でもサルはラットにくらべ吸収能力が数十倍高く、排泄能力は低かった。これらの結果は、従来ラットに対して用いられる毒性を示さないと考えられる濃度（NOAEL）でも、サルに対して有害作用を発現する可能性を示唆する。

図7 ビスフェノール A の血中動態におけるラット・サル間の種差



#### D-2 妊娠前期、中期、後期サルにおけるビスフェノールAの母体-胎仔分布

妊娠カニクイザル（前期GD50、中期GD80、後期GD120）について一部<sup>3</sup>H標識したBPAを単回皮下投与(8mg/kg)したときの母体および胎仔組織中のBPA分布を投与後4および24時間で測定した。妊娠時期によらず、投与後4および24時間のいずれにおいても胎仔血中BPAは母体血中BPAに比較し高値を示し、胎仔血中および羊水中BPAは妊娠が進むにつれ高値を示した。妊娠中期および後期では投与後4および24時間いずれにおいても胎仔脳脊髄液、大脳、視床、中脳および橋にBPAの存在が確認された。これらの結果はサルにおいては妊娠時期が進むにつれBPAの胎盤移行度は高まり、そして胎仔脳内にBPAが移行することを示唆する。中枢神経系発達の感受性期であるこの時期に胎仔脳内に移行したBPAは中枢神経系発達に障害をもたらす可能性が考えられる。

#### (2) 研究成果の今後期待される効果

サル類を用いた同様の研究は90年代前半に行われた研究を最後に進んでいなかった。本研究により従来心理学的研究としての対象であったサル類の行動を毒性学的指標として確立することに貢献できたと考える。本グループの最重要課題として位置づけていた、毒性試験に適用可能つまり神経毒性を評価する行動試験は、今後も増えるであろうさまざまな化学物質の脳機能への影響を行動学的に評価できる系として利用されると考えられる。また、ラットにおいても1被験物質の実験系に対し、一連の行動試験を行うことにより包括的に影響を評価できる。本グループの結果は当初の目的を充分達成したと考えられる。

また、脳神経系への影響をin vitroで評価する系として初代培養神経細胞を用いた系の確立を目指したが、材料として最もヒトに近縁な実験動物であるサル由来の初代培養系、しかも血清という未知なる生理活性を有する因子を含まない状態で数種の細胞からなる神経系の細胞の選択的培養系を完成させたことは神経毒性学分野に非常に大きく

貢献したと考えられる。もちろん、このサル由来の細胞と齧歯類由来のそれとを比較することにより、今後脳機能の霊長類と齧歯類との種差についても数多くの知見をもたらすと考えられる。また神経伝達物質特異的な経路、特に高次精神機能を司ると考えられているモノアミン系を標的とし、その発達に対する化学物質の影響を評価する系の開発を押し進めることは化学物質の行動学的影響を分子細胞生物学的レベルから説明するために非常に有用な系となるであろう。

以上、吉川グループは内分泌かく乱物質の高等動物における脳機能発達に対する影響を評価する系として主に行動学的評価系の確立、そしてその利用を試み成功した。また、神経伝達物質特異的発達の障害をも検討しうる系の開発を試みている。ここでの知見は今後の毒性試験法開発の手本になり、近い将来の神経毒性学分野の発展に少なからぬ貢献が期待される。

### 3. 6 海馬での記憶・学習の分子・細胞メカニズムと慢性アルコール投与の記憶学習過程への影響

#### (1) 研究内容及び成果

内分泌かく乱物質、とくに甲状腺ホルモン類似物質が記憶・学習の形成にどのように影響を与えるかを検討するにあたり、基礎研究として未知のことの多い(1)海馬での記憶・学習の分子・細胞レベルでのメカニズムの検討と(2)低濃度・慢性アルコール投与による記憶・学習の細胞過程への影響を調べた。

甲状腺ホルモンは標的細胞内に入ると細胞内受容体と結合し、受容体複合体がDNAに作用して多くのメッセンジャーRNAへの転写の促進・抑制に働く。また、cyclic AMP(cAMP)濃度を上げて $\beta$ -アドレナリン受容体活性を高めるなどの作用があり、神経系においては神経伝達物質の作用を増強・減弱させる作用がある。甲状腺ホルモン類似内分泌かく乱物質の母胎内および発達期における被曝はこのメカニズムをかく乱することで、中枢神経発達を阻害し、記憶・学習障害を誘引する可能性がある。

血液中に取り込まれたアルコールは、血液脳関門のみならず神経細胞膜を自由に通過し、高濃度での暴露は細胞機能を麻痺させる。一方、ごく低濃度・長期間のアルコール暴露についてはその影響はほとんど知られていない。しかしながら、アルコール分子は細胞膜を自由に通過しcAMP代謝にも少なからぬ影響を与える可能性があり、Akinaseを介して転写因子であるcAMP response element binding protein (CREB)のリン酸化などをかく乱する可能性がある。実際、母胎内でアルコールに被曝した小児では中枢神経系の発育遅延や障害が生じるがそのメカニズムについてはよくわかっていない。

上記にある甲状腺ホルモン類似内分泌かく乱物質とアルコール分子との作用類似点に着目し、神経毒性を持つ細胞膜透過性がある低分子物質の長期間・低濃度暴露がどのようなメカニズムで記憶・学習の素過程に影響を与えるかを検討した。

## A. 海馬での記憶・学習の分子・細胞レベルでのメカニズム研究とその問題点

記憶・学習との関係で注目される海馬シナプスの現象に長期増強（long-term potentiation: LTP）がある。LTPは、海馬シナプスの興奮性入力線維束に短時間、高頻度刺激（テタヌス刺激）を与えると、その経路のシナプス伝達効率が著しく亢進し、その状態が場合によっては数日から数週間持続する現象である。LTPは人工液中に取り出した脳スライスで誘発できることから、現在、多くの研究がなされ、その実態を裏付ける重要な知見が得られている。

海馬スライス標本上でも、興奮性入力線維束であるシャッファー側枝にテタヌス刺激（100 Hz, 100 発）を与えるとLTPが誘導され、少なくとも2時間以上シナプスの伝達効率が持続して増大する。その機序は次のように考えられている（図1）。テタヌス刺激で放出された大量のグルタミン酸はnon-NMDA型受容体を介してシナプス後膜を強く脱分極する一方、NMDA型受容体・カルシウムチャンネル複合体を活性化する。シナプス後膜が強く脱分極するとNMDA型受容体・カルシウムチャンネルからマグネシウムが外れてシナプス後細胞内に大量のCa<sup>2+</sup>が流入する。また、電位依存型カルシウムチャンネル（VDC）が活性化してCa<sup>2+</sup>が流入する。NMDA型受容体や電位依存性チャンネルの活性化による細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇はテタヌス刺激後数秒以内に終息するが、LTP誘導に必要な細胞内2次情報伝達系を賦活し、グルタミン酸に対するAMPA受容体反応を増大させてシナプス伝達を増強する（図1）。

LTP誘導への代謝型グルタミン酸受容体の関与が報告されている。図1で示すように、テタヌス刺激で放出されたグルタミン酸は代謝型グルタミン酸受容体（mGluR）を介してphospholipase C（PLC）を活性化する。PLCはシナプス後膜のリン脂質（phosphatidyl inositol biphosphate :PIP2）をinositol 1, 4, 5-triphosphate（IP3）とdiacylglycerol（DAG）に加水分解する。DAGはprotein kinase C（PKC）を活性化させてLTP誘導に寄与する。

シナプス前終末からグルタミン酸とともにATP / adenosinが放出されるが、ATPは細胞外リン酸化反応の基質として働き、NMDA型受容体をリン酸化してLTP誘導に関与する可能性がある。また、adenosineはGs-protein共役型受容体と結合して細胞内cAMP濃度を上昇させて、A kinaseを活性化してセリン・スレオニン残基をリン酸化する。これが細胞内たんぱく質を機能化してLTPに関与する可能性がある。さらに、cAMPはA kinaseを介して転写因子であるcAMP response element binding protein（CREB）をリン酸化する。CREBは二量体となり、DNA上の特定塩基配列（TGACGTCA）に結合してその下流の遺伝子を活性化することでシナプスを形態学的に変化させる可能性が指摘されている。

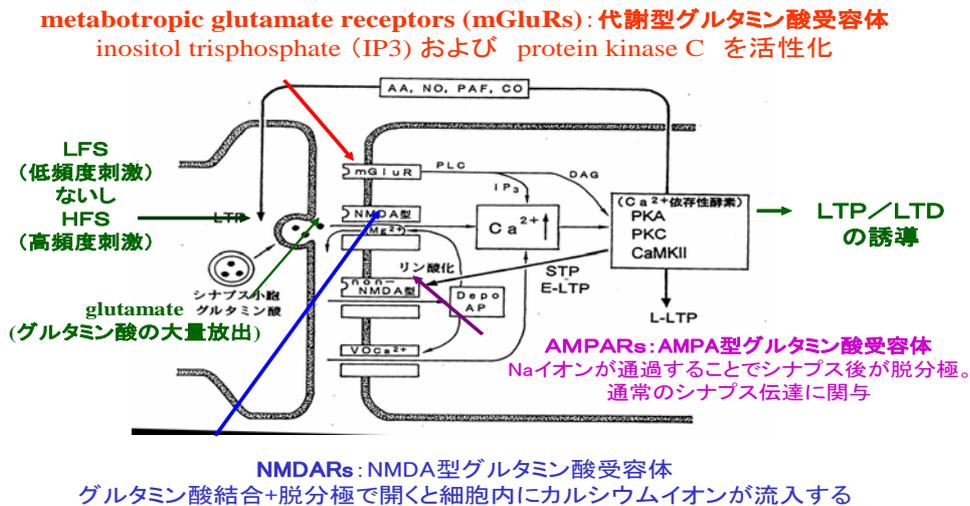


図1 海馬 CA1 シナプスでの activity - dependent LTP の細胞内メカニズム

シナプス入力にテタヌス刺激を与えると、シナプス前終末より大量のグルタミン酸と ATP が放出されて NMDA 型グルタミン酸受容体、代謝型グルタミン酸受容体および ATP/adenosine 受容体を同時に活性化するが、LTP 誘導においてはよく判っていないのが実情であった。そこで本研究ではまづ、海馬スライス標本を用いて化学的に各受容体を単独活性化および共活性化して LTP 誘導を検討した。

## B. 海馬 LTP の分子・細胞メカニズムに関する研究とその成果

海馬スライス標本上で CA1 ニューロンの入力線維束に電気刺激を与えて field EPSP を導出した。N-methyl-D-aspartate (NMDA)型グルタミン酸受容体 agonist, 代謝型グルタミン酸受容体 agonist および ATP を海馬 CA1 ニューロンに与え化学的に Long-term potentiation (LTP)誘導し、シナプス可塑性への NMDA 型受容体と代謝型受容体活性化の共役関係について検討した。

まづ、海馬 CA1 シナプスでは上記 agonist の投与で代謝型受容体と NMDA 型受容体が同時に化学的に活性化させると LTP が誘導される事を実証した(図 2)。

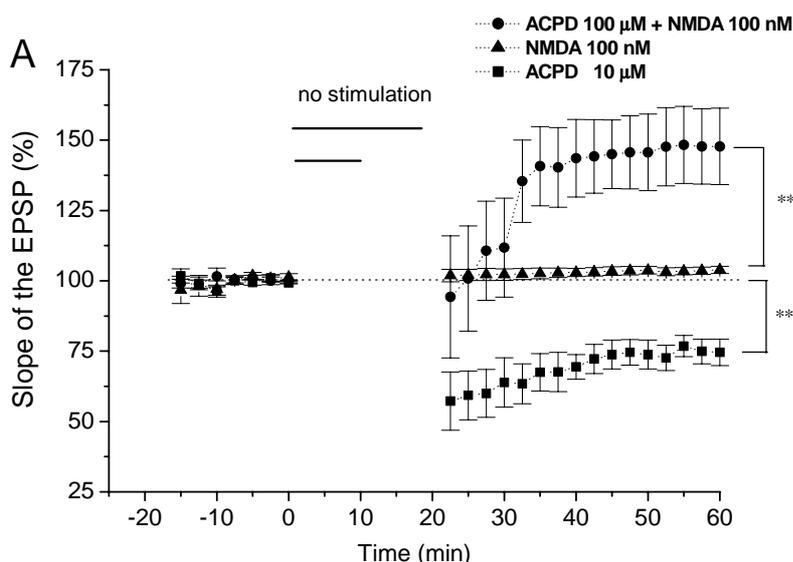


図 2. 電気刺激をとめた状態で代謝型グルタミン酸受容体 agonist, ACPD と NMDA を投与すると LTP が誘導された (filled circles, n=6). ACPD 単独投与では LTD が誘導され (filled squares, n=6)、NMDA 単独投与では LTP も LTD も誘導されなかった (filled triangles, n=6)。

次いで ATP と NMDA 受容体が共役すると LTP が誘導され、細胞外リン酸化を抑制した状態で ATP を投与すると化学的 LTP 誘導が抑制されることを明らかにした(図 3)。この LTP 誘導抑制は、予め adenosine 受容体を阻害しておくことと起こらない。ATP/細胞外リン酸化は adenosine 受容体の活性化を阻害している可能性がある」と結論した。

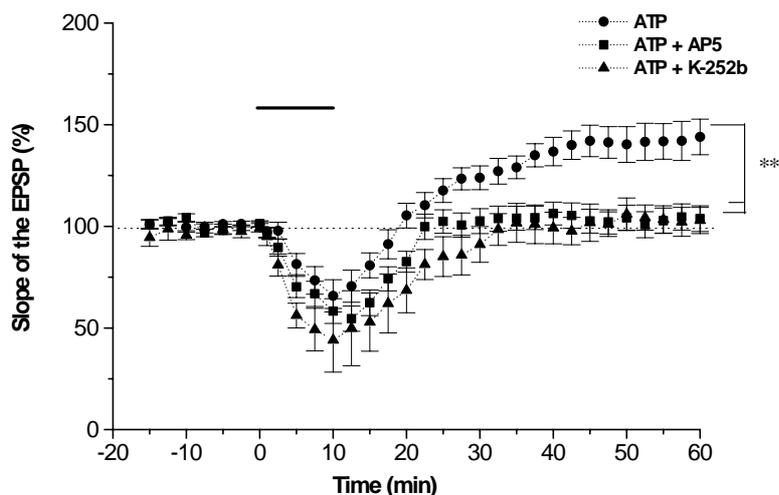


図3. 海馬 CA1 シナプスで ATP 投与により誘導された LTP に対する細胞外リン酸化酵素阻害薬 K-252b, ないし NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬 AP5, の効果。10  $\mu$ M ATP 単独投与では LTP が誘導される (filled circles, n = 16) .ATP とともに 40 nM K-252b ないし 5  $\mu$ M AP5 (filled triangles and filled squares, respectively; n = 6)を投与すると LTP 誘導が抑制された。

従って、LTP/LTD 誘導への ATP, adenosine およびグルタミン酸の関与様態は、以下のように考えられる。

- (1) NMDA 型受容体活性化+ATP・細胞外リン酸化：LTP 誘導
- (2) NMDA 型受容体活性化+adenosine 受容体活性化：LTP 抑制
- (3) NMDA 型受容体活性化+代謝型受容体活性化：LTP 誘導

LTP 誘導/抑制には上記受容体および関連する 2 次情報伝達系の活性化が必要であると結論できた。ATP は細胞外リン酸化反応により adenosine 受容体の活性化を積極的に阻害することで、LTP 誘導に関与する可能性があると結論した。

#### C. 低濃度慢性アルコール暴露と海馬 LTP 誘導に関する研究とその成果

生後 7 週より 19 週までの 12 週間に、アルコール含有飼料を与えて低濃度のアルコールを慢性的に投与したラットの海馬を取り出してスライス標本を作製した。アルコール血中濃度は 0.01-0.02% で、ヒトであれば軽度の酔いの状態が持続している状態のアルコール濃度である。CA1 シナプスより導出した field EPSP にごく弱いテタヌス刺激(100 Hz, 20-25 発)を与えたところ、アルコールを慢性的に投与したラットでは LTP 誘導が有意に増強していた(図 4)。

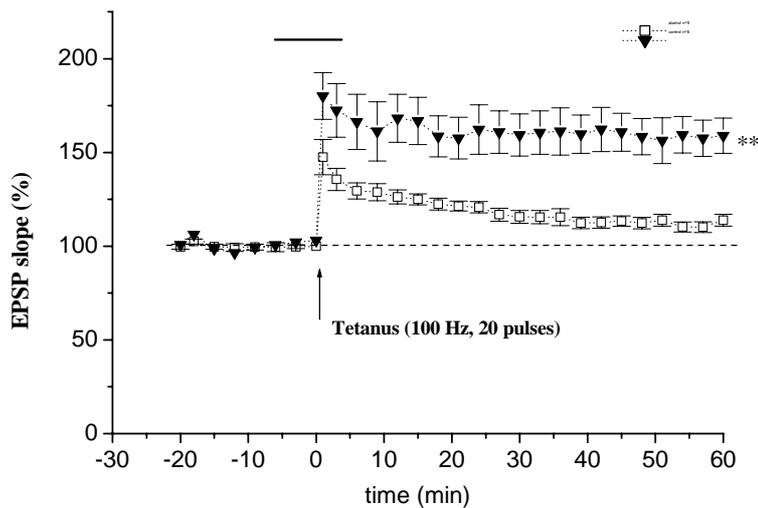


図4. 慢性低濃度アルコール投与による LTP 誘導促進。弱いテタヌス刺激(100Hz, 20 発)を与えても非投与ラットの海馬シナプスでは LTP は誘導されない (open squares, n = 6) が、アルコール投与ラットでは LTP が誘導されている (closed triangles, n = 6)。

さらに薬理学的な検討を加えたところ、アルコールを慢性投与したラットの LTP 誘導においては

- (1) NMDA 受容体の活性が非投与ラットよりも増強している。
- (2) Adenosine 受容体を介した LTP 誘導抑制が弱い。

ことが示唆された。NMDA 受容体および adenosine 受容体はともにカスケード下流に cAMP および PKA を有し、慢性アルコール投与は細胞内 cAMP 代謝や PKA 活性を持続的に上昇させて LTP 誘導を促進している可能性が示唆された。

## (2) 研究成果の今後期待される効果

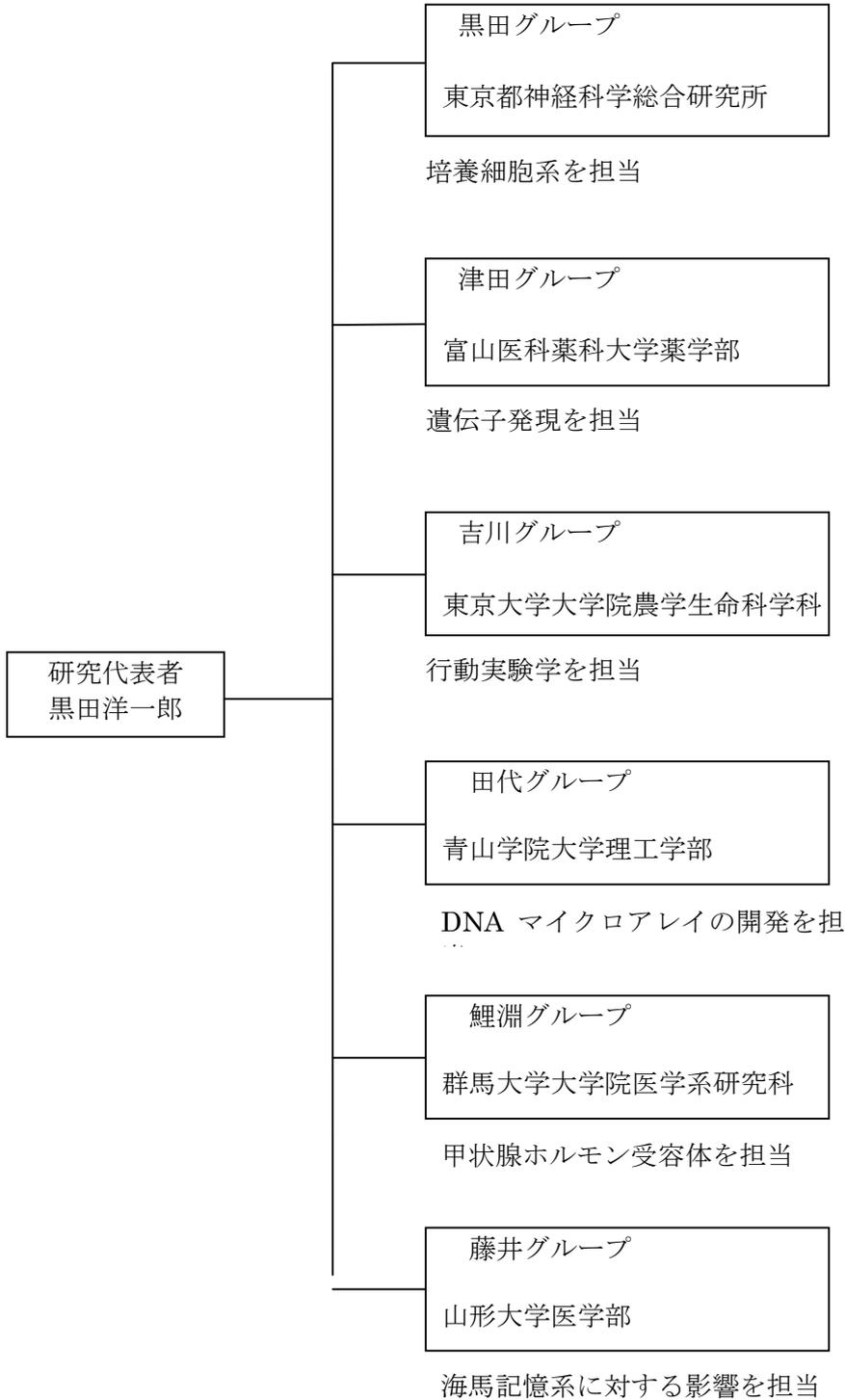
甲状腺ホルモンは標的細胞内に入ると細胞内受容体と結合し、受容体複合体が DNA に作用して多くのメッセンジャーRNA への転写の促進・抑制に働く。また、cAMP 濃度を上げて  $\beta$ -アドレナリン受容体活性を高めるなどの作用があり、神経系においては神経伝達物質の作用を増強・減弱させる作用がある。

本研究の結果から、アルコールの慢性投与により PKA 活性が持続的に亢進すると、cAMP 活性が増強されるのみならず核内で CREB などの遺伝子の転写過程が影響され、LTP 誘導・固定が促進される可能性があることが判明し今後詳しい検討が必要である。

記憶や学習では LTP などでシナプス伝達効率が一定の秩序を持って可塑的に増減する事が重要であるが、本研究ではこのメカニズムが低濃度慢性アルコール投与で破壊される事が明らかになった。同様に、甲状腺ホルモン類似内分泌かく乱物質の母胎内および発達期における被曝もこのメカニズムをかく乱することで、中枢神経発達を阻害し、記憶・学習障害を誘引する可能性があるかと考察した。

#### 4. 研究実施体制

##### (1) 体制



## (2)メンバー表

## 1. 黒田グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
黒田 洋一郎	東京都神経科学総合研究所	研究代表者	研究総括	H11.11～
中田 裕康	東京都神経科学総合研究所	副参事研究員	シナプスなど微細観察	H11.11～
川原 正博	東京都神経科学総合研究所	主事研究員	機能アッセイ	H11.11～H15.3
齊藤 修	東京都神経科学総合研究所	主事研究員	シナプスなど微細観察	H11.11～H16.3
長井 孝紀	東京都神経科学総合研究所	客員研究員		H11.11～H13.3
永田 功	東京都神経科学総合研究所	主任研究員	突起伸展など微細観察	H11.11～
黒田 純子	東京都神経科学総合研究所	主事研究員	突起伸展など微細観察	H11.11～
松原 四郎	東京都神経科学総合研究所	兼務研究員	病理観察	H11.11～
横須賀 誠	東京都神経科学総合研究所	客員研究員	機能アッセイ	H12.4～
前田 信明	東京都神経科学総合研究所	副参事研究員	機能アッセイ	H14.4～
市川 真澄	東京都神経科学総合研究所	主任研究員	機能・形態発生	H14.11～
小柳 清光	東京都神経科学総合研究所	副参事研究員	病理観察	H15.3～
紀平 為子	東京都神経科学総合研究所	客員研究員	病理観察	H15.4～
細田 律子	派遣先	CREST 技術員	機能アッセイ	H12.9～H14.9
関口 真理子	派遣先	大学研究生	機能アッセイ	H12.4～H13.3
本田 幸子	派遣先	研究補助員	機能アッセイ	H13.4～H14.8
江口 麻耶	派遣先	研究補助員	チーム事務員	H12.1～

## 2. 津田グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
津田 正明	富山医科薬科大学薬学部	教授	遺伝子発現への影響	H11.11～
今村 理佐	富山医科薬科大学薬学部	助手	遺伝子発現への影響	H11.11～
田淵 明子	富山医科薬科大学薬学部	助手	遺伝子発現への影響	H11.11～

福地 守	派遣先	大学院生	遺伝子発現への影響	H13.6～
表野 充暁	派遣先	大学院生	遺伝子発現への影響	H12.4～H15.3
松野 朋哉	派遣先	大学院生	遺伝子発現への影響	H13.6～H14.10
伏木 洋司	派遣先	大学院生	遺伝子発現への影響	H14.4～H15.3

### 3. 吉川グループ

氏名	所属	役職（身分）	担当する研究項目	参加時期
吉川 泰弘	東京大学大学院農学生命科学研究科	教授	行動学実験	H11.11～
河村 晴次	東京大学大学院農学生命科学研究科	助教授		H11.11～H12.3
久和 繁	東京大学大学院農学生命科学研究科	助教授	サル神経細胞培養	H12.7～
根岸 隆之	東京大学大学院農学生命科学研究科	大学院生	サル神経細胞培養	H12.4～
安本 史恵	東京大学大学院農学生命科学研究科	大学院生		H15.4～
下村 裕美	派遣先	大学院生	行動学実験 (データ解析)	H13.8～H13.8
石垣 ゆうき	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H15.1～H16.3
上田 彩子	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H15.1～
竹嶋 夕美子	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H15.1～
中神 明子	派遣先	研究補助員	行動学実験 (データ解析)	H15.2～
中村 正芳	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H15.7～H16.3
石井 桃子	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H16.4～
石塚 綾	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H16.4～
大森 幸	派遣先	学部生	行動学実験 (データ解析)	H16.4～
小林 篤史	派遣先	大学院生	行動学実験 (データ解析)	H16.4～
川崎 勝義	星薬科大学薬学部	講師	行動学実験	H12.4～
小山 高正	日本女子大学人間社会学部	教授	行動学実験	H13.7～

#### 4. 田代グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
田代 朋子	青山学院大学理工学部	教授	グループ全体の統括と研究指導	H12.6～
野呂 美幸	青山学院大学理工学部	助手	シナプス形成に伴うMAP1Bの発現変化	H13.4～H16.3
佐野 浩樹	青山学院大学理工学部	助手	マイクロビーズを用いた蛋白間相互作用解析法の開発	H16.4～
内田 敦子	青山学院大学理工学部	共同研究者	発育期に伴うニューロフィラメントの構成および構造変化	H12.6～H14.3
北村 主悦	青山学院大学理工学部	大学院生	シナプス形成に伴うMAP1Bの発現および局在変化	H15.11～
高橋 理貴	青山学院大学理工学部	大学院生	シナプトアレイの開発および甲状腺機能低下マウスの解析	H15.11～
今村 誠	青山学院大学理工学部	大学院生	ミトコンドリア機能阻害による遺伝子発現変化の解析	H16.4～
川合 克宏	青山学院大学理工学部	大学院生	シナプトアレイの開発及び神経活動依存性遺伝子発現の解析	H16.4～

#### 5. 鯉淵グループ

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
鯉淵 典之	群馬大学大学院医学系研究科	教授	甲状腺ホルモン	H13.4～
太田 美佐江	群馬大学大学院医学系研究科	CREST 技術員	甲状腺ホルモン	H13.6～
岡田 純一	群馬大学大学院医学系研究科	助教授	甲状腺ホルモン	H14.4～
神宮 久香	群馬大学大学院医学系研究科	助手	甲状腺ホルモン	H14.4～
岩崎 俊晴	群馬大学大学院医学系研究科	助手	甲状腺ホルモン	H14.4～
宮崎 航	群馬大学大学院医学系研究科	大学院生	甲状腺ホルモン	H14.8～
Yousefi Behnaz	群馬大学大学院医学系研究科	大学院生	甲状腺ホルモン	H14.8～
下川 哲昭	群馬大学大学院医学系研究科	講師	甲状腺ホルモン	H14.9～

6. 藤井グループ

氏名	所属	役職	担当する研究項目	参加時期
藤井 聡	山形大学医学部	助教授	海馬記憶系に対する影響	H15.4～

5. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成12年 3月17日	黒田洋一郎チーム平成11年度班会議 (第1回)	東京大学赤門前学士会館分館	14人	各グループ紹介、研究の進め方についての全体会議
平成13年 3月17日	黒田洋一郎チーム平成12年度班会議 (第2回)	(財)神奈川婦人会館	17人	研究報告、及び研究の進め方についての全体会議
平成13年 4月7日から原則月1回(毎月第一土曜日)	研究情報交換打ち合わせ会	東京大学(本郷)	7-10人	グループ間の研究情報の交換と次の研究の打ち合わせ
平成14年 11月26日	黒田洋一郎チーム平成14年度班会議 (第3回)	広島中区民センター(アステールプラザ)	22人	研究報告、及び研究の進め方についての全体会議
平成15年 10月7日	鯉淵グループ「内分泌かく乱物質」検討会	群馬大学大学院医学系研究科器官機能学分野	30人	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻分子薬理学研究室より竹下先生をお招きしてセミナーを行った。
平成15年 10月7日	田代グループ勉強会	青山学院大学理工学部化学科田代研究室	12人	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科より、吉田明助教授をお招きし、「新規ホルモン受容体と内分泌かく乱物質」について講演をお願いした。また、内分泌かく乱物質、ことに新しいホルモン受容体のかく乱メカニズムについての遺伝子レベルでの研究打ち合わせを行った。
平成15年 11月17日	第1回黒田チーム神経科学セミナー	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	15人	神戸大学大学院医学系研究科より寺島先生をお招きし、神経発生学の立場から情報・助言をいただいた。
平成16年 3月30日	第2回黒田チーム神経科学セミナー	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物	26人	大阪大学大学院生命機能研究科より小倉先生をお招きし、記憶・学習の脳内での形成、発達

		学教室		過程について、基礎的な知識と最近の長期記憶過程の実験系の開発と遺伝子発現の関係について討論した。
平成16年 4月6日	黒田洋一郎チーム平成16年度班会議 (第4回)	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	18人	これまでの成果報告、及び今後の研究打ち合わせ
平成16年 6月5日	第3回黒田チーム神経科学セミナー	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	28人	アスペルガー症候群など高機能自閉症児の臨床像、ことに行動の特性について、長年児童精神科医として子どもたちを診てきた、九州大学大学院人間環境学研究院の神尾先生から講演をうかがい、モデル動物実験の評価を検討する。
平成16年 10月16日 (予定)	黒田洋一郎チーム主催国際シンポジウム “Autism and Related Developmental Disorders---- Gene-environment interaction in the brain.”	東京大学(弥生会館)	100人程度	内分泌かく乱物質のうちPCBなどが子どもの脳の発達障害を起こす可能性を示す研究結果が多数出たので、国内外の自閉症を中心とする、発達障害及びその関係学問領域の専門家を招き、その因果関係、リスク評価について、高い学問レベルで、「何をどこまで言えるか」国際レベルで討論する。
平成16年 10月23日 (予定)	黒田洋一郎チーム主催一般向けシンポジウム LD, ADHD, 高機能自閉症、アスペルガー症候群の子どもたちの教育・支援と脳の発達のしくみ・シンポジウム	日本大学会館(大講堂)	500人程度	内分泌かく乱物質のうちPCBなどが子どもの脳の発達障害を起こす可能性を示す研究結果が出たので、研究チームの成果及び、LD, ADHD, 自閉症の専門家の方々のお話を中心に、この問題に関心のある方々(親、関係学会会員、行政、教育関係者など)に情報発信する。

## (2) 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
Prof. Marie-Claude Potier (Professor, Laboratoire de Neurobiologie, CNRS, Ecole Supérieure Physie Chimie Industrielle)	DNAマイクロアレイの研究打ち合わせ 及び情報交換	東京都府中市 (東京都神経科学総合研究所) 及び京都国際会館(京都市左京区)	平成13年9月22日～28日
吉田明 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻分子薬理学研究室 助教授)	田代グループ研究会での講演 及び研究打ち合わせ	青山学院大学理工学部化学科 田代研究室	平成15年10月7日
竹下章 (沖中記念成人研究所研究員・虎ノ門病院内分泌代謝科医員)	鯉淵グループ「内分泌かく乱物質」検討会での講演 及び研究打ち合わせ	群馬大学大学院医学系研究科器官機能学分野	平成15年10月7日
寺島俊雄 (神戸大学大学院 医学系研究科 脳科学講座神経発生学分野 教授)	第1回黒田チーム神経科学セミナーでの講演 及び研究打ち合わせ	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	平成15年11月17日～18日
小倉明彦 (大阪大学大学院 生命機能研究科・理学研究科生物科学専攻 教授)	第2回黒田チーム神経科学セミナーでの講演 及び研究打ち合わせ	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	平成16年3月30日～31日
神尾陽子 (九州大学大学院 人間環境学研究院 人間共生システム 助教授)	第3回黒田チーム神経科学セミナーでの講演 及び研究打ち合わせ	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	平成16年6月5日～6日
神尾陽子 (九州大学大学院 人間環境学研究院 人間共生システム 助教授)	黒田グループ、吉川グループと研究打ち合わせ	東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室	平成16年6月17日～18日
Eric Fombonne (Director of Psychiatry, Montreal Children's Hospital of the McGill University)	LD、ADHD、高機能自閉症など脳の発達障害について討論、検討	東京都神経科学総合研究所、青山学院大学理工学部、大阪国際会議場	平成16年9月16日～22日

## 6. 主な研究成果物、発表等

### (1) 論文発表

1. 黒田洋一郎 子どもの行動異常・脳の発達障害と環境化学物質汚染：PCB、農薬などによる遺伝子発現のかく乱 科学、73 1234-1243 (2003)
2. 田代朋子、黒田洋一郎 トキシコジェノミックスと新しいDNA マイクロアレイ 科学、74, 28-30 (2004)
3. 黒田洋一郎 現代日本での「毒」問題- 身近な毒の知識を得るシステムを 科学、74, 16-17 (2004)
4. Kuroda Y, Effects of endocrine disruptors on brain development –development of novel assay systems for risk assessment–, *Environmental Sciences* 10, Supplement (2003) 023-033
5. Kimura-Kuroda J, Nagata I, Negishi-Kato M, Kuroda Y. Thyroid hormone-dependent development of mouse cerebellar Purkinje cells in vitro. *Develop. Brain Res.* 2002, vol.137, 55 –65
6. Kawahara M. and Kuroda Y. : Effects of endocrine-disrupting chemicals on the proliferation and the toxicity of immortalized hypothalamic neurons. *Environ. Sci.* vol. 9, 319-328 (2002).
7. Hosoda R., Kawahara M., Nakayama K. and Kuroda Y. (2002) Effects of thyroid hormones on the formation of functional neural networks between cerebral cortical neurons: establishment of a novel *in vitro* assay system, *Env. Sci.* 9, 140.
8. Nagata, I. and Kimura-Kuroda, J. : Cellular deficiency of taurine affects stage-specific migration of granule cells In mouse cerebellar microexplant culture. *Recent Res. Devel. Neurosci.*, 3, 317-328 (2000)
9. 黒田洋一郎、内分泌攪乱物質の中樞神経系への影響、*最新医学*、第57巻第2号、40-44、2002.
10. Nakata, H., Yoshioka, K. and Saitoh, O. : Hetero-oligomerization between adenosine A<sub>1</sub> and P2Y<sub>1</sub> receptors in living cells: Formation of ATP-sensitive adenosine receptors. *Drug Development Research* (2003) 58:340-349
11. Nakata, H. : Stimulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) pathway by suramin with concomitant activation of DNA synthesis in cultured cells. (2004) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 308:744-753
12. Kamiya, T., Saitoh, O., Yoshioka, K. and Nakata, H. : Oligomerization of adenosine A<sub>2A</sub> and dopamine D<sub>2</sub> receptors in living cells. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306: 544-549
13. Yoshioka, K. and Nakata, H. : Purinergic receptor complex: generating adenine nucleotide-sensitive adenosine receptors. (2004) *J. Pharmacol. Sci.* 94:88-94
14. Yoshioka, K., Hosoda, R., Kuroda, Y. and Nakata, H. (2002) Hetero-oligomerization of adenosine A<sub>1</sub> receptors with P2Y<sub>1</sub> receptors in rat brains. *FEBS Lett.* 531:299-303
15. Masuho, I., Itoh, M., Itoh, H., and Saitoh, O. The mechanism of membrane-translocation of RGS8 induced by Ga expression. *J. Neurochem.* 88, 161-168 (2004)
16. Saitoh, O. and Odagiri, M. RGS8 expression in developing cerebellar Purkinje cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 309, 836-842 (2003)
17. Nakata, H., Yoshioka, K., and Saitoh, O. Hetero-oligomerization between

- adenosine A1 and P2Y1 receptors in living cells: Formation of ATP-sensitive adenosine receptors. *Drug Development Research* 58, 340-349 (2003)
18. Kamiya, T., Saitoh, O., and Nakata, H. Oligomerization of adenosine A2a and dopamine D2 receptors in living cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 306, 544-549 (2003)
  19. Saitoh, O., and Kubo, Y. Biochemical and physiological properties of regulator of G protein signaling 8. in *Recent Research Developments in Biophysics and Biochemistry (Research Signpost)* 3, 269-289 (2003)
  20. Saitoh, O., Masuho, I., Itoh, M., Abe, H., Komori, K., and Odagiri, M. Distribution of regulator of G protein signaling 8 (RGS8) protein in the cerebellum. *THE CEREBELLUM* 2, 154-160 (2003)
  21. Saitoh, O., Murata, Y., Odagiri, M., Itoh, M., Itoh, H., Misaka, T., and Kubo, Y. Alternative splicing of RGS8 gene determines inhibitory function of receptor type-specific Gq signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10138-10143 (2002)
  22. Yoshioka, K., Saitoh, O., and Nakata, H. Agonist-promoted heteromeric oligomerization between adenosine A(1) and P2Y(1) receptors in living cells. *FEBS Lett.* 523, 147-51 (2002)
  23. Itoh, M., , Odagiri, M., Abe, H., and Saitoh, O. RGS8 protein is distributed in dendrites and cell body of cerebellar Purkinje cell. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 287, 223-228 (2001)
  24. Yoshioka, K., Saitoh, O., and Nakata, H. Heteromeric association creates a P2Y-like adenosine receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7617-7622 (2001)
  25. Saitoh, O., Masuho, I., Terakawa, I., Nomoto, S., Asano, T., and Kubo, Y. Regulator of G protein signaling 8 (RGS8) requires its N-terminus for subcellular localization and acute desensitization of G protein-gated K<sup>+</sup> channels. *J. Biol. Chem.* 276, 5052-5058 (2001)
  26. Tabuchi A., Nakatani C., Nakaoka R., Naruse Y., Kojima T., Mori N. and Tsuda M. Silencer-mediated repression and non-mediated activation of BDNF and c-fos gene promoters in primary glial or neuronal cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 261: 233-7, 1999.
  27. Fujita Y., Katagi J., Tabuchi A., Tsuchiya T. and Tsuda M. Coactivation of secretogranin-II and BDNF genes mediated by calcium signals in mouse cerebellar granule cells, *Brain Res Mol Brain Res*, 63: 316-24, 1999.
  28. Imamura L., Hasegawa H., Kurashina K., Hamanishi A., Tabuchi A. and Tsuda M. Repression of activity-dependent *c-fos* and brain-derived neurotrophic factor mRNA expression by pyrethroid insecticides accompanying a decrease in Ca(2+) influx into neurons, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 295: 1175-82, 2000.
  29. Tabuchi A., Nakaoka R., Amano K., Yukimine M., Andoh T., Kuraishi Y. and Tsuda M. Differential activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoters I and III by Ca<sup>2+</sup> signals evoked via L-type voltage-dependent and N-methyl-D-aspartate receptor Ca<sup>2+</sup> channels, *J. Biol. Chem.*, 275: 17269-75, 2000.
  30. Tabuchi A., Koizumi M., Nakatsubo J., Yaguchi T. and Tsuda M. Involvement of endogenous PACAP expression in the activity-dependent survival of mouse cerebellar granule cells. *Neurosci Res*, 39: 85-93, 2001.
  31. Tabuchi A., Koizumi M. and Tsuda M. Novel splice variants of PACAP gene in mouse cerebellar granule cells, *Neuroreport* 12: 1181-6, 2001.
  32. Tabuchi A., Sakaya H., Kisukeda T., Fushiki H. and Tsuda M. : Involvement of an upstream stimulatory factor as well as cAMP-responsive element-binding

- protein in the activation of brain-derived neurotrophic factor gene promoter I. J. Biol. Chem. 277: 35920-35931, 2002.
33. Tabuchi A., Yamada T., Sasagawa S., Naruse Y., Mori N. and Tsuda M.: REST4-mediated modulation of REST/NRSF-silencing function during BDNF gene promoter activation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 290: 415-420, 2002.
  34. Imamura L., Hasegawa H., Kurashina K., Matsuno T. and Tsuda M.: Neonatal exposure of newborn mice to pyrethroid (permethrin) represses activity-dependent c-*fos* mRNA expression in cerebellum. Arch. Toxicol. 76: 392-397, 2002.
  35. Tabuchi A., Funaji K., Nakatsubo J., Fukuchi M., Tsuchiya T., and Tsuda M.: Inactivation of aconitase during the apoptosis of mouse cerebellar granule neurons induced by a deprivation of membrane depolarization. J. Neurosci. Res. 71: 504-15, 2003.
  36. Kawahara M., Kato-Negishi M., Hosoda R., Imamura L., Tsuda M., and Kuroda Y.: Brain-derived neurotrophic factor protects cultured rat hippocampal neurons from aluminum maltolate neurotoxicity. J. Inorg. Biochem. 97: 124-31, 2003.
  37. Konoha K., Imamura L., Tsuda M., and Kawahara M.: Aluminum maltolate inhibits brain-derived neurotrophic factor-induced intracellular free calcium elevations in cultured rat hippocampal neurons. Biomed. Res. Trace Elements 14: 290-292, 2003
  38. Fukuchi M., Sakuragawa S., Tabuchi A. and Tsuda M. Calcium signal-mediated expression of the vasoactive intestinal polypeptide gene and its small contribution to activity-dependent survival of mouse cerebellar granule cells. J Neurosci Res, 77: 26-34, 2004.
  39. Tabuchi A., Ishii A., Fukuchi M., Kobayashi S., Suzuki T. and Tsuda M. Activity-dependent increase in beta-amyloid precursor protein mRNA expression in neurons, Neuroreport 15: 1329-1333, 2004.
  40. Fukuchi M., Tabuchi A. and Tsuda M. Activity-dependent transcriptional activation and mRNA stabilization for cumulative expression of PACAP mRNA controlled by calcium and cAMP signals in neurons, J Biol Chem, 2004.
  41. Imamura L., Kurashina K., Kawahira T., Omoteno M. and Tsuda M. Additional repression of activity-dependent c-*fos* and BDNF mRNA expression by lipophilic compounds accompanying a decrease in Ca<sup>2+</sup> influx into neurons, NeuroToxicology, 2004
  42. Kubo N, Koyama T, Kawasaki K, Tsuchida J, Sankai T, Terao K, Yoshikawa Y. Behavioral compensations in a positional learning and memory task by aged monkeys. Behavioural Processes 2001; 56: 15-22.
  43. Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). Neuroscience Letters 2002; 328: 21-24.
  44. Negishi T, Kawasaki K, Takatori A, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the behavior of offspring in F344 rats. Environmental Toxicology and Pharmacology 2003; 14: 99-108.
  45. Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) fetuses. Journal of Neuroscience Methods 2003; 131: 133-140.
  46. Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in

- primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience Letters* 2003; 353: 99-102.
47. Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology* 2004; 24: 51-61.
48. Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Experimental Animals*; in press
49. Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcpromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in rats. *Environmental Health Perspectives*; submitting.
50. Negishi T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. *Behavioural Brain Research*; submitting.
51. Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Affects Social Behaviors between Two Infants in Developing Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Environmental Health Perspectives*; submitting
52. Suzaki S, Negishi T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Amiodarone induced a novel perinatal thyroid hormone-disrupting model in rats. *Neurotoxicology*; submitting.
53. Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Signal from mGluR controls frequency of synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured mouse cortical neurons. *Brain Research*; submitting.
54. Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Methamphetamine inhibits or reduces the frequency of synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured mouse midbrain neurons. *Brain Research*; submitting.
55. Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, Yoshikawa Y. Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel but does not regulate NMDA receptor in synchronous oscillation of intracellular calcium of primary cultured mouse midbrain neurons. *Experimental Animals*; submitting.
56. Lizcano F, Koibuchi N, Fukuda H, Dangondo F, Chin WW. : Cell type-specific roles of histone deacetylase in TR ligand-independent transcriptional repression. (2001) *Mol Cell Endocrinol* 172: 13-20.
57. Koibuchi N, Yamaoka S, Chin WW. : Effects of altered thyroid status on neurotrophin gene expression during postnatal development of the mouse cerebellum. (2001) *Thyroid* 11:205-210.
58. Kia HK, Krebs CJ, Koibuchi N, Chin WW, Pfaff DW. : Co-expression of estrogen and thyroid hormone receptors in individual hypothalamic neurons. (2001) *J Comp Neurol* 437: 286-295
59. Sajdel-Sulkowska EM, Ronca AE, Baer LA, Sulkowski GM, Koibuchi N, Wade CE. : Effects of hypergravity exposure on the developing central nervous system: possible involvement of thyroid hormone. (2001) *Proc Soc Exp Biol Med* 226: 790-798.

60. Takeshita A, Koibuchi N, Oka J, Taguchi M, Shishiba Y, Ozawa Y. : Bisphenol-A, an environmental estrogen-like substance, activates the human orphan nuclear receptor SXR/PXR-mediated transcription. (2001) *Eur J Endocrinol* 145: 513-517.
61. Vasudevan N, Zhu Y-S, Daniel S, Koibuchi N, Chin WW, Pfaff DW. : Crosstalk between oestrogen receptors and thyroid hormone receptor isoforms results in differential regulation of the preproenkephalin gene. (2001) *J Neuroendocrinol.* 13: 779-90.
62. Vasudevan N, Koibuchi N, Chin WW, Pfaff DW. : Differential crosstalk between estrogen receptor (ER) alpha and ER beta and the thyroid hormone receptor isoforms results in flexible regulation of the consensus ERE. (2001) *Mol Brain Res* 95: 9-17.
63. Vasudevan N, Davidkova G, Zhu Y-S, Koibuchi N, Chin WW, Pfaff DW. : Differential interaction of estrogen receptor and thyroid hormone receptor isoforms on the rat oxytocin receptor promoter leads to differences in transcriptional regulation. (2001) *Neuroendocrinology* 74: 309-24.
64. Shimokawa N, Kumaki I, Takayama K. : MafG-2 is a novel Maf protein that is expressed by stimulation of extracellular H<sup>+</sup>. (2001) *Cell Signal* 13, 835-839
65. Iwasaki T, Chin WW, Ko L. : Identification and characterization of RRM-containing coactivator activator (CoAA) as TRBP-interacting protein, and its splice variant as a coactivator modulator (CoAM). (2001) *J Biol Chem* 276: 33375-83.
66. Sakai, H., Koibuchi, N., Ohtake, H., Tamai, K., Fukui, N., Oda, H. and Saotome, K. : Type I and type III procollagen gene expressions in the early phase of ligament healing in rabbits: an in situ hybridization study. (2001) *J Orthopaed Res* 19: 132-135.
67. 鯉淵典之、神宮久香 : 中枢神経系発達に対する甲状腺ホルモンの作用 (2001) *内分泌・糖尿病科* 13: 208-215.
68. 鯉淵典之 : 胎児と新生児の生理学 オックスフォード生理学 (植村慶一 ed.) (2001) 丸善 pp. 431-446
69. Ueda S, Sakakibara S, Watanabe E, Yoshimoto K, Koibuchi N. : Vulnerability of monoaminergic neurons in the brainstem of the mutant rat with oxidative stress. (2002) *Prog Brain Res* 136: 293-302
70. Shimokawa N, Okada J, Koibuchi N, Miura M. : Central chemosensitivity and respiratory regulation: Identification of H<sup>+</sup>-sensitive neurons and analysis of hypercapnia-induced genes. (2002) *Res Dev Biochem* 3: 581-594.
71. Shimokawa N, Okada J, Haglund K, Dikic I, Koibuchi N, Miura M. 2002. Past-A, a novel proton-associated sugar transporter, regulates glucose homeostasis in the brain. *J Neurosci* 22: 9160-9165.
72. Haglund K, Shimokawa N, Szymkiewicz I, Dikic I. 2002. Cbl-directed monoubiquitination of CIN85 is involved in regulation of ligand-induced degradation of EGF receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12191-12196.
73. Takeshita A, Taguchi M, Koibuchi N, Ozawa Y. 2002. Putative role of the orphan receptor SXR in the mechanism of CYP3A4 inhibition by xenobiotics. *J Biol Chem* 277: 32453-32458
74. Koibuchi N. 2002. Thyroid hormone and cerebellar development. In: *The Cerebellum and its disorders*, M. Manto, M Pandolfo (eds.) Cambridge University Press, Cambridge pp. 305-315
75. Koibuchi N. 2002. Molecular mechanisms of thyroid hormone action in brain

- development. In: *Neuroplasticity, Development, and Steroid Hormone Action*, R. Handa, S. Hayashi, E. Terasawa, and M. Kawata (eds),. CRC Press, Boca Raton. pp. 45-58.
76. Ko L, Cardona GR, Iwasaki T, Bramlett KS, Burris TP, Chin WW. 2002. Ser-884 adjacent to the LXXLL motif of coactivator TRBP defines selectivity for ERs and TRs. *Mol Endocrinol* 16: 128-140.
77. Ueda S, Sakakibara S, Watanabe E, Yoshimoto K, Koibuchi N. 2002. Vulnerability of monoaminergic neurons in the brainstem of the mutant rat with oxidative stress. *Prog Brain Res* 136: 293-302
78. Sajdel-Sulkowska EM, Koibuchi N. 2002. Impact of thyroid status-disrupting environmental factors on brain development. *Rec Res Dev Endocrinol* 3: 101-117
79. Iwasaki, T., Miyazaki, W., Takeshita, A., Kuroda, Y., and Koibuchi, N. (2002) : Polychlorinated bisphenyls (PCBs) suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochem Biophys Res Commun.* 299 : 384-388.
80. 鯉淵典之、神宮久香、太田美佐江、岩崎俊晴 2002 甲状腺ホルモンの発達期中枢神経系に及ぼす作用-げっ歯類小脳を用いた解析- *ホルモンと臨床* 50: 149-155.
81. Koibuchi N, Ohta M, Miyazaki W, Jingu H, Yousefi B, Shimokawa N, Iwasaki T, Okada J. 2003. The effect of thyroid hormone on gene expression in the developing nervous system, and the influence of endocrine disrupters in its process. *Environ Sci* 10: 35-42.
82. Takayama K, Shimokawa N. 2003. Central barosensitivity and cardiovascular regulation: Identification of barosensitive neurons and analysis of genes induced by baroreceptor stimulation. *Rec Res Dev Life Sci* (in press).
83. Koibuchi N, Jingu H, Iwasaki T, Chin WW. 2003. Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum. *Cerebellum* 2: 279-289.
84. 鯉淵典之 2003 セットポイント カレントセラピー 21: 86
85. 鯉淵典之、ユセフィ ベヘナヅ、邱春紅、神宮久香、梅津元昭 2003. 甲状腺ホルモン作用解析のための動物モデル *ホルモンと臨床* 51: 867-874.
86. Qiu C-H, Ohe M, Koibuchi N, Matsuzaki S. 2004 Apoptosis in the epididymal epithelium of adult male golden hamster exposed to diethylstilbestrol. *J Histochem Cytochem* 52: 187-192
87. Mashitori H, Sakai H, Koibuchi N, Ohtake H, Tashiro T, Tamai K, Saotome K. 2004. Effect of hyperbaric oxygen on the ligament healing process in rats. *Clin Orthopaed Relat Res* (in press)
88. Miyazaki W, Iwasaki T, Takeshita A, Kuroda Y, Koibuchi N. 2004. Suppression of the thyroid hormone (TH) receptor (TR) -activated transcription by polychlorinated biphenyls through a novel mechanism. *J Biol Chem* (in press).
89. Shimokawa N, Qiu C-H, Seki T, Dikic I, Koibuchi N. 2004. Phosphorylation of JNK is involved in regulation of H<sup>+</sup>-induced c-Jun expression. *Exp Cell Res* (in press)
90. Li GH, Post J, Koibuchi N, Sajdel-Sulkowska EM. 2004. Impact of thyroid hormone (TH) on the developing CNS: cerebellar glial and neuronal protein expression in rat neonates exposed to antithyroid drug propylthiouracil. *Cerebellum* (in press)
91. Haglund K, Ivankovic-Dikic I, Shimokawa N, Kruh G, Dikic I. 2004. Recruitment of Pyk2 and Cbl to lipid rafts mediates signals important for actin reorganization in growing neurites. *J Cell Sci* 117 (in press)

92. Iwasaki T, Koibuchi N. 2004. Coactivator and disease. In: *Clinical Endocrinology* (Lizcano F, ed). (in press)
93. 鯉淵典之, 岩崎俊晴 2004 内分泌攪乱物質の甲状腺ホルモン系への影響 *現代化学* 396: 62-66.
94. 岩崎俊晴, 鯉淵典之 2004. Coactivator activator (CoAA)の多様な機能 *ホルモンと臨床* (in press)
95. 鯉淵典之 2004 甲状腺の発達と小脳機能- 内分泌攪乱の蓋然性- *高次生命系と内分泌攪乱化学物質* 井口泰泉, 井上達 (eds.) Springer-Verlag, Tokyo. (in press).
96. Kumaki I, Shimokawa N, Yang D, Koibuchi N, Takayama K. Neuronal expression of nuclear transcription factor MafG in the rat brain after baroreceptor stimulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol* (in revision).
97. Dangond F, Grey SG, Iglesias A, Lizcano F, Villanueva R, Camelo S, Jingu H, Teh BT, Koibuchi N, Chin WW, Kokkotou E, Ladias JAA. Functional characterization of JPTR1, a histone deacetylase- and retinoblastoma-binding protein. *J Cell Biol* (Submitted)
98. Iwasaki T, Koibuchi N, Chin WW. Synovial sarcoma translocation gene (SYT) encodes a nuclear receptor coactivator. *Endocrinology* (submitted)
99. Okada J, Koibuchi N. Low dose effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) on proton sensitivity of culture neuron derived from the rat ventral medullary surface. *Neurosci Lett* (submitted)
100. Fujii, S., Mikoshiba, K., Kuroda, Y., Ahmed, T.M., Kato, H., Cooperativity between activation of metabotropic glutamate receptors and NMDA receptors in the induction of LTP in hippocampal CA1 neurons. *Neuroscience Research* 46 (2003) 509 - 521.
101. Fujii, S., Sasaki, H., Mikoshiba, K., Yamazaki, Y., Kuroda, Y., Ahmed, T.M., Kato, H., A chemical LTP induced by co-activation of metabotropic and N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in hippocampal CA1 neurons. *Brain Research*, 999(1) (2004) 20-28.
102. Fujii S., ATP and adenosine-mediated signaling in the central nervous system: The role of extracellular ATP in hippocampal long-term potentiation. *Journal of Pharmacological Sciences*, Vol. 94, No. 2 (2004);103-106.
103. 藤井聡、黒田洋一郎：記憶と時間、*Brain medical*, 15 (2003) 163-172.

(2) 口頭発表

1. M. Tsuda, H. Hasegawa, A. Tabuchi and L. Imamura, INHIBITION OF NEURAL ACTIVITY-DEPENDENT GENE EXPRESSION BY PYRETHROID INSECTICIDES AND DDT ACCOMPANYING A DECREASE IN Ca<sup>2+</sup> INFLUX INTO NEURONS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 2000 (New Orleans) Nov. 6, 2000
2. M. Kato, K. Muramoto, M. Kawahara, M. Ichikawa, Y. Kuroda, THREE-DIMENSIONAL QUANTITATIVE ANALYSIS OF GABAERGIC SYNAPSES IN CORTICAL CULTURE SYSTEM, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE 2000 (New Orleans) Nov. 5, 2000
3. 黒田洋一郎 (東京都神経科学総合研究所)、内分泌攪乱物質の脳神経系機能発達への影響と実験系の開発、第73回日本神経化学会 (パシフィコ横浜)、平成12年12月13日
4. 村本和世、細田律子、川原正博、黒田洋一郎 (東京都神経科学総合研究所)、甲状腺ホルモンによる脳内シナプス機能にかかわる遺伝子発現の変化、第3回環境ホルモン学会研究発表会 (パシフィコ横浜) 平成12年12月15、16日
5. 今村理佐、川平朋美、表野充暁、田渕明子、津田正明 (富山医科薬科大学薬学部)、

- 小脳顆粒細胞における神経活動依存的な遺伝子発現に対する内分泌攪乱物質の影響、第3回環境ホルモン学会研究発表会（パシフィコ横浜）、平成12年12月15日
6. 根岸隆之、石井寿幸、川崎勝義、吉川泰弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、脳神経系機能の発達に対する内分泌攪乱物質の影響を知るための *in vitro* 評価法の開発：サル大脳由来神経細胞の初代培養法の確立、第3回環境ホルモン学会研究発表会（パシフィコ横浜）、平成12年12月15、16日 ポスター発表
  7. 黒田洋一郎 甲状腺ホルモンのシナプス形成など脳の機能発達への影響 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 平成13年9月25-28日 京都
  8. 木村-黒田純子、黒田洋一郎、根岸-加藤みどり、永田功、小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達分化における甲状腺ホルモン依存性、第24回日本神経科学大会、平成13年9月、京都
  9. 細田律子、中山憲司、村本和世、川原正博、黒田洋一郎 甲状腺ホルモンはラット大脳皮質ニューロンのシナプス形成を促進する 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 平成13年9月25-28日 京都
  10. 津田正明、今村理佐、田淵明子 BDNF など神経活動依存遺伝子の発現と環境化学物質による攪乱 第24回日本神経科学・第44回日本神経化学合同大会 平成13年9月25-28日 京都
  11. 黒田洋一郎 培養下での神経細胞ネットワークの機能発達- 内分泌攪乱物質の脳発達への影響を調べるイン・ビトロでのアッセイ系 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  12. 細田律子、中山憲司、川原正博、黒田洋一郎 甲状腺ホルモンが大脳皮質機能発達に与える影響；*in vitro* スクリーニングの開発 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  13. 木村-黒田純子、永田功、根岸-加藤みどり、黒田洋一郎 小脳プルキンエ細胞の発達分化に及ぼす甲状腺ホルモン、ビスフェノールAの影響 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  14. Ohtani-Kaneko R., Yokosuka M., Yamashita K., Hirata K., Kuroda Y., and Watanabe C., Endocrine disruptors influence synaptogenesis in primary cultures of fetal hypothalamic cells. 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  15. 今村理佐、松野朋哉、表野充暁、田淵明子、津田正明 甲状腺ホルモンによるシナプス形成関連遺伝子発現への影響 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  16. 根岸隆之 胎生期および新生児期におけるビスフェノールA暴露が行動に及ぼす影響 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  17. 鯉淵典之、太田美佐江、神宮久香 小脳プルキンエ細胞特異的に変異甲状腺ホルモン受容体を発現するトランスジェニックマウスの作製と解析 第4回環境ホルモン学会・内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウム 平成13年12月14-17日 つくば
  18. Koibuchi, N. In vivo model to study the thyroid hormone action in developing brain. 第4回内分泌攪乱物質問題に関する国際シンポジウムセッションI（座長および追加発言） 平成13年12月15-16日 つくば
  19. 鯉淵典之 Targeted overexpression 法による甲状腺ホルモン作用の細胞特異的阻害-脳発達研究への応用 日本下垂体研究会第16回学術集会シンポジウム「個体レベルでの遺伝子・細胞改変研究-内分泌分野での応用」 平成13年8月27-29日 名

古屋

20. 津田正明 (富山医科薬科大学薬学部)、脳・神経系発達に関わるニューロトロフィン遺伝子の発現と内分泌攪乱物質の与える影響、日本内分泌学会、大阪市国際会議場、平成 14 年 6 月 28 日
21. 神宮久香、鯉淵典之 (群馬大学医学部)、発達期ストレスによる脳内 Fos およびグルココルチコイド受容体発現、第 25 回日本神経科学大会、東京ビッグサイト、平成 14 年 7 月 4 日
22. 木村-黒田純子、永田功、黒田洋一郎、小脳プルキンエ細胞樹状突起の発達分化におけるステロイド系ホルモンと内分泌攪乱物質の影響、第 25 回日本神経科学大会、東京、平成 14 年 7 月
23. 細田律子 (東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門)、Disturbance of thyroid hormone-dependent synapse formation incultured rat cortical neurons by environmental chemicals. 第 45 回日本神経化学会 (札幌) 大会、かでの 2.7、ホテル札幌ガーデンパレス、平成 14 年 7 月 17 日
24. 倉知正 (群馬大学医学部)、萩川慎平、小野れい、Jean-Francois Leterrier、小宮義璋、田代朋子 (青山学院大学理工学部)、Direct observation and characterization of gels formed from isolated neurofilaments in vitro、第 45 回日本神経化学会、かでの 2.7、ホテル札幌ガーデンパレス、平成 14 年 7 月 18 日
25. 北村主悦、若山勇太、梶野正樹、野呂美幸、田代朋子 (青山学院大学理工学部)、Expression of tau isoforms containing exon 2 and 3 during synaptogenesis *in vivo* and *in vitro*、第 45 回日本神経化学会、かでの 2.7、ホテル札幌ガーデンパレス、平成 14 年 7 月 17 日
26. 鯉淵典之 (群馬大学医学部)、Action of endocrine disrupting chemicals mediated by steroid / thyroid hormone receptor superfamily、アジア・オセアニア生理学会 Post-congress satellite symposium、マレーシア・クアラルンプール、平成 14 年 9 月 27 日
27. 鯉淵典之 (群馬大学医学部)、Mechanisms of thyroid hormone action in brain development and influences of environmental factors and endocrine disrupters、第 5 回アジア・オセアニア生理学会、マレーシア・クアラルンプール、平成 14 年 9 月 23 日
28. 岩崎俊晴、鯉淵典之 (群馬大学医学部)、W. W. Chin (Eli Lilly and Company)、Multiple Functions of Wild Type Synovial Sarcoma Translocation Gene (SYT), Thyroid Hormone and Brain Development、NIEHS Research Triangle Park, North Carolina, USA
29. 黒田洋一郎、細田律子、木村-黒田純子、永田功、根岸-加藤みどり、中山憲司、村本和世、川原正博 (東京都神経化学総合研究所)、Thyroid hormone-dependent synapse formation and dendritic extension in cultured cortical neurons; effects of polychlorinated bisphenyls and bisphenol A. Thyroid Hormone and Brain Development、NIEHS Research Triangle Park, North Carolina, USA
30. 今村 理佐<sup>1,2)</sup>、松野 朋哉<sup>1,2)</sup>、又井 宏和<sup>1)</sup>、表野 充暁<sup>1,2)</sup>、田渕 明子<sup>1,2)</sup>、津田 正明<sup>1,2)</sup> 1) 富山医科薬科大学薬学部分子神経生物学研究室、2) CREST、神経活動および甲状腺ホルモン依存的なシナプス形成関連遺伝子発現と環境化学物質の与える影響、フォーラム 2002 衛生薬学・環境トキシコロジー、アステールプラザ (広島市中区加古町 4-17)、平成 14 年 10 月 25 日
31. 川原正博 (東京都神経科学総合研究所)、トリブチルスズによる神経細胞死のメカニズムの検討、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
32. 永田功、木村-黒田純子、黒田洋一郎 (東京都神経科学総合研究所)、甲状腺ホル

- モン低下処理した次世代マウス小脳顆粒細胞の分化・発達遅延と T4 添加による回復、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 26 日
33. 木村- 黒田純子、永田功、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、小脳プルキンエ細胞の未分化発達に及ぼす内分泌攪乱物質の影響、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25-26 日
  34. 松野朋哉、今村理佐、又井宏和、表野充暁、田淵明子、津田正明（富山医科薬科大学薬学部）、シナプス形成関連遺伝子発現に対する甲状腺ホルモンの影響、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
  35. 根岸隆之、石井寿幸、久和茂、吉川泰弘（東京大学大学院農学生命科学研究科）、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、エストロジェン様化学物質による Staurosporine 誘発神経細胞死の阻害、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 26 日
  36. <sup>1</sup>Masaki Takahashi, <sup>1</sup>Yuta Wakayama, <sup>2</sup>Yasumitsu Kondo, <sup>2</sup>Hideo Tashiro, <sup>3,4</sup>Misae Ohta, <sup>3,4</sup>Noriyuki Koibuchi, & <sup>1,4</sup>Tomoko Tashiro, <sup>1</sup>Department of Biochemistry, School of Science and Engineering, Aoyama-Gakuin University; <sup>2</sup>Advanced Engineering Center, RIKEN; <sup>3</sup>Department of Physiology, Faculty of Medicine, Gunma University; <sup>4</sup>CREST, JST, Effects of perinatal hypothyroidism on gene expression during early postnatal development of mouse cerebellum: a study using original oligo DNA microarrays、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
  37. 岡田淳一、太田美佐江、小池祐哉、斉藤良、鯉淵典之（群馬大学医学部）、ラット延髄腹側表面由来培養細胞の H+ 感受性に与える PCB の影響、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
  38. 神宮久香、太田美佐江、鯉淵典之（群馬大学医学部）、シンコフェンがラット神経内分泌細胞の生後発達に及ぼす影響、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
  39. 下川哲昭、岡田淳一、鯉淵典之（群馬大学医学部）、Post-A は細胞外 pH 環境の変化に応じて発現する新しい糖輸送体である、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 26 日
  40. 宮崎航、岩崎俊晴（群馬大学医学部）、竹下彰（虎ノ門病院（財）沖中紀年成人病研究所）、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、鯉淵典之（群馬大学医学部）、polychlorinated bisphenyls (PCBs) による甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性の制御、環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会、広島国際会議場、平成 14 年 11 月 25 日
  41. 岩崎俊晴（群馬大学医学部）、Synovial Sarcoma Translocation Gene (SYT) plays Multiple Functions Synovial Sarcoma Translocation Gene (SYT) の核内受容体転写共益因子としての機能、第 80 回日本生理学会大会、福岡県福岡市、平成 14 年 11 月
  42. 鯉淵典之（群馬大学医学部）、甲状腺ホルモンによる脳発達の調整機構と PCB によるかく乱作用、第 2 回分子予防環境医学研究会シンポジウム、東京大学大学院医学系研究科、平成 14 年 12 月 20 日
  43. 木村- 黒田純子（東京都神経科学総合研究所）、甲状腺ホルモン依存性マウス小脳プルキンエ細胞の発達分化：無血清培養系の改良点、第 18 回神経組織培養研究会、東京・順天堂大学医学部、平成 15 年 2 月 22 日
  44. 藤井聡<sup>a,b</sup>、黒田洋一郎、アーメド トーフィック<sup>a,b</sup>、佐々木寛<sup>a</sup>、金子健也<sup>a</sup>、加藤宏司<sup>a</sup>、<sup>a</sup>山形大学医学部生理学第 2 講座、<sup>b</sup>CREST/科学技術振興事業団、代謝型および NMDA 型受容体アゴニスト投与で化学的に誘導した海馬 LTP への細胞外 ATP の増強効果、ATP・アデノシン研究会「第 8 回学術シンポジウム」合同発表会、東京慈恵会医科大

- 学、平成 15 年 3 月 22 日
45. 鯉淵典之 (群馬大学医学部)、発達期中枢神経系における甲状腺ホルモン作用隣家領域の形成機構、第 3 回環境生理シンポジウム、福岡市・九州大学医学部、平成 15 年 3 月 23 日
  46. ユセフィ・ベヘナツ (群馬大学医学部)、ラット発達期小脳におけるステロイド核内受容体転写共益因子 (SRC-1) の発現、第 80 回日本生理学会大会、福岡国際会議場、平成 15 年 3 月 24 日
  47. 宮崎航 (群馬大学医学部)、Polychlorinated bisphenyls (PCBs) による甲状腺ホルモン受容体を介する転写の抑制機構、第 80 回日本生理学会大会、福岡国際会議場、平成 15 年 3 月 24 日
  48. 今村 理佐<sup>1,2)</sup>、松野 朋哉<sup>1)</sup>、又井 宏和<sup>1)</sup>、表野 充暁<sup>1,2)</sup>、津田 正明<sup>1,2)</sup>、1) 富山医科薬科大学薬学部分子神経生物学研究室、2) CREST、甲状腺ホルモンおよび神経活動依存的なシナプス形成関連遺伝子発現と環境化学物質の与える影響、日本薬学会第 123 年会、長崎県立総合体育館 (長崎市油木町 7-1)、平成 15 年 3 月 28 日
  49. 岩崎俊晴 (群馬大学医学部)、Multiple Functions of Coactivator Activator (CoAA)、第 10 回国際甲状腺シンポジウム、長野県松本市、平成 15 年 4 月 11 日-13 日
  50. 宮崎航、岩崎俊晴、竹下彰、黒田洋一郎、鯉淵典之 (群馬大学医学部、他)、Polychlorinated Biphenyls (PCBs) の種々の核内ホルモン受容体への影響、第 76 回日本内分泌学会学術総会、神奈川県横浜市、平成 15 年 5 月 10 日
  51. 岩崎俊晴、宮崎航、鯉淵典之 (群馬大学医学部)、Polychlorinated Biphenyls (PCBs) による甲状腺ホルモンにより活性化された転写の抑制機構、第 76 回日本内分泌学会学術総会、神奈川県横浜市、平成 15 年 5 月 10 日
  52. ユセフィ・ベヘナツ、神宮久香、梅津元昭、鯉淵典之 (群馬大学医学部、他)、Localization of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) during postnatal period of development of rat cerebellum.、第 76 回日本内分泌学会学術総会、神奈川県横浜市、平成 15 年 5 月 11 日
  53. Toshiharu Iwasaki, Wataru Miyazaki, Akira Takeshita, Yoichiro Kuroda and Noriyuki Koibuchi、Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Suppress Thyroid Hormone-induced Transactivation、The Endocrine Society's 85th Annual Meeting, Philadelphia, U. S. A. 平成 15 年 6 月 21 日
  54. 川崎勝義、神谷誠、山海直、小山高正、寺尾恵治、吉川泰弘、黒田洋一郎 (星薬科大、他) 画像差分を応用したオープンフィールド行動の自動解析法、第 9 回画像センシングシンポジウム、横浜、平成 15 年 6 月 13 日
  55. 鯉淵典之 (群馬大学医学部)、中枢神経系に及ぼす内分泌かく乱物質の作用機構-甲状腺ホルモン系を介する作用-、内分泌攪乱特別シンポジウム、神奈川県葉山市、平成 15 年 6 月 14 日
  56. Satoshi Fujii<sup>1, 2)</sup>, Yoichiro Kuroda<sup>2)</sup>, Hiroshi Kato<sup>1)</sup>, Yoshihiko Yamazaki<sup>1)</sup>, Kenya Kaneko<sup>1)</sup>, Taufiq Ahmed<sup>1)</sup>, Hiroshi Sasaki<sup>1)</sup>, Katsuhiko Mikoshiba<sup>3)</sup>: <sup>1</sup>Dept. Physiol. Yamagata Univ. Sch. Med., <sup>2</sup>CREST, Japan Science and Technology Corp., <sup>3</sup>Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo.、Cooperativity between metabotropic and NMDA glutamate receptors in the induction of LTP and LTD in hippocampal CA1 neurons (海馬シナプス可塑性への代謝型およびNMDA型グルタミン酸受容体の関与様態)、第 26 回日本神経科学大会、愛知県名古屋市、平成 15 年 7 月 24 日
  57. <sup>1,3</sup>木村-黒田純子、<sup>1,3</sup>永田功、<sup>2,3</sup>黒田洋一郎 1. 東京都神経研・脳構造、2. 東京都神経研・分子神経生物学、3. CREST 科学技術振興事業団、Hydroxy-polychlorinated biphenyls (PCBs) inhibit thyroid-hormone-dependent development of cerebellar Purkinje cell dendrites、第 26 回日本神経科学大会 (名古屋)、平成 15 年 7 月 24 日

58. 永田功、木村-黒田純子、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、Effect of thyroid hormones on differentiation of granule cells in cerebellar microexplant cultures and mitochondrial membrane potentials, (甲状腺ホルモンが小脳顆粒細胞の分化プロセスに与える影響とミトコンドリア膜電位)、第 26 回日本神経科学大会（名古屋）、平成 15 年 7 月 24 日
59. 黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、脳機能発達での甲状腺ホルモンの重要性と環境ホルモンによる攪乱：PCB 類による甲状腺ホルモン依存性の遺伝子発現及び神経細胞分化の抑制、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 25 日
60. 高橋理貴、若山勇太、近藤恭光、田代英夫、太田美佐江、鯉淵典之、田代朋子（青山学院大学、理化学研究所、群馬大学医学部）、Effect of perinatal hypothyroidism on gene expression in the developing mouse cerebellum (発達期マウス小脳における遺伝子発現とこれに対する実験的甲状腺機能低下の影響)、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 24 日
61. 小野れい、中林和也、森田泰介、倉知正、小宮義璋、田代朋子（青山学院大学）、Real-time observation of the effect of dephosphorylation on neurofilament gel formation using microbeads (ニューロフィラメント・ゲル形成過程に対する脱リン酸化の影響：マイクロビーズによるリアルタイム観察)、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 25 日
62. 若山勇太、高橋理貴、近藤恭光、田代英夫、田代朋子(青山学院大学、他)、Development of a quantitative oligoDNA microarray “Synapto-array” for monitoring synaptic status、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 24 日
63. 根岸隆之<sup>1,3</sup>、石井寿幸<sup>1</sup>、久和茂<sup>1</sup>、吉川泰弘<sup>1,3</sup>、黒田洋一郎<sup>2,3,1</sup>（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻実験動物学教室、<sup>2</sup> 東京都神経科学総合研究所分子神経生物学研究部門）、Environmental estrogens, bisphenol A and nonylphenol, inhibit staurosporine-induced cell death of primary cultured hippocampal and cortical neurons、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 25 日
64. Fumie Yasumoto(1,3) Takayuki Negishi(1,3) Yoshiyuki Ishii(1) Shigeru Kyuwa(1) Yoichiro Kuroda(2,3) Yasuhiro Yoshikawa(1,3) Dept. Biomed. Sci., Grad. School of Agri. and Life Sci., The Univ. of Tokyo(1), Dept. of Mol. and Cell. Neurobiol., Tokyo Metropolitan Inst. for Neurosci. (2), CREST, JST(3)、Dopamine receptor 2 regulates L-type voltage-gated calcium channel in synchronous oscillation of intracellular calcium of primary cultured mouse midbrain neurons、第 46 回日本神経化学会・第 41 回日本物理学会合同年会、新潟、平成 15 年 9 月 24 日
65. 川崎勝義、高橋阿貴、柏木由美、鈴木梨恵、小山高正、吉川泰弘、黒田洋一郎（星薬科大、他）、Kine-Cluster system を用いた diazepam 投与ラットならびに caffeine 投与ラットのオープンフィールド行動解析、第 33 回日本神経精神薬理学会年会 奈良（奈良県文化会館）、平成 15 年 10 月 10 日
66. 黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、Effects of endocrine disruptors on brain development---Novel Assay systems for risk assessment and toxicogenomics of “low-dose effects、第 76 回日本生化学会大会、横浜、平成 15 年 10 月 18 日
67. 鯉淵典之（群馬大学医学部）、Suppression of thyroid hormone receptor-mediated transcription by polychlorinated bisphenyls、第 76 回日本生化学会大会、横浜、平成 15 年 10 月 18 日
68. 川崎勝義、中村正芳、小山高正、吉川泰弘、黒田洋一郎（星薬科大、他）、音刺激

- を用いたラットのヴィジランス測定、第63回日本動物心理学会、つくば（つくば国際会議場）、平成15年11月1日
69. 鯉淵典之（群馬大学医学部）、甲状腺ホルモンの脳への作用と内分泌かく乱物質による修飾作用、第46回日本甲状腺学会学術集会、愛知県名古屋市、平成15年11月21日
  70. 永田功、木村-黒田純子、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、Attenuation of inhibitory effects of environmental disruptors on differentiation and survival of granule cells in cerebellar microexplant cultures by addition of thyroid hormones（甲状腺ホルモン添加による内分泌攪乱物質の小脳顆粒細胞分化阻害の回復効果）、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  71. 木村-黒田純子、永田功、黒田洋一郎（東京都神経科学総合研究所）、低濃度水酸化PCBによる甲状腺ホルモン依存性小脳プルキンエ細胞発達分化の阻害、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  72. 根岸隆之（東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室）、周産期ビスフェノールAおよびノニルフェノール暴露が行動に及ぼす影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  73. 根岸隆之（東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室）、ラットとサルにおけるビスフェノールAの薬物動態における種差の検討、および妊娠前期、中期、後期サルにおけるビスフェノールAの母体-胎仔分布、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  74. 又井 宏和、今村 理佐、倉光 梢、表野 充暁、安田 誠、田淵 明子、津田 正明（富山医科薬科大学薬学部分子神経生物学研究室）、神経活動依存的なBDNF遺伝子発現に対する環境化学物質の影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  75. 高橋理貴<sup>1</sup>、今村誠<sup>1</sup>、近藤恭光<sup>2</sup>、田代英夫<sup>2</sup>、鯉淵典之<sup>3,4</sup>、田代朋子<sup>1,4</sup>（<sup>1</sup>青山学院大学理工学部、<sup>2</sup>理化学研究所計測工学研究室、<sup>3</sup>群馬大学医学部、<sup>4</sup>CREST, JST）、甲状腺機能低下マウス及び正常マウス小脳の発育過程における遺伝子発現変化の経時比較：オリジナル・オリゴDNAマイクロアレイを用いた研究、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  76. 岩崎俊晴、宮崎航、六反田奈和、長岡りん、竹下章、青木康展、遠山千春、黒田洋一郎、鯉淵典之（群馬大学医学部、他）、様々なDioxin類およびpolychlorinated bisphenyls (PCB)による甲状腺ホルモン受容体を介した転写での影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  77. 長岡りん、岩崎俊晴、六反田奈和、竹下章、宮崎航、鯉淵幸生、堀口淳、飯野佑一、森下靖雄、鯉淵典之（群馬大学大学院医学系研究科、他）、乳癌細胞におけるタモキシフェン及びPCBによるsteroid and xenobiotic receptor (SXR)を介するcytochrome P450 (CYP) 3A4転写への影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  78. 岡田淳一、佐藤栄秀、鯉淵典之（群馬大学大学院医学系研究科）、ラット培養神経細胞のカルシウムホメオスタシスにおけるPCBの影響、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  79. 下川哲昭、鯉淵典之（群馬大学大学院医学系研究科）、低濃度PCBはPc-12細胞においてc-Jun発現を促進する、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  80. Behnaz Yousefi<sup>1,2,3,4</sup>、神宮久香<sup>3,4</sup>、梅津元昭<sup>1,2</sup>、鯉淵典之<sup>3,4</sup>（東京農工大学大学院連合農学研究科、<sup>2</sup>宇都宮大学農学部生物生産科学科動物生産学講座、<sup>3</sup>群馬大学大学院医学系研究科器官機能学分野、<sup>4</sup>独立行政法人科学技術振興機構戦略的創造研究推

- 進事業)、Changes in Locomotor Activity of Congenital Hypothyroid (*rdw*) rats、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
81. 宮崎航、岩崎俊晴、竹下彰、黒田洋一郎、鯉淵典之(群馬大学大学院医学系研究科、他)、PCBsによる甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性の抑制機構、環境ホルモン学会第6回研究発表会、宮城県仙台市、平成15年12月2日-3日
  82. 鯉淵典之(群馬大学大学院医学系研究科)、Comment on Dr. Winneke's presentation、第6回内分泌かく乱物質問題に関する国際シンポジウム、宮城県仙台市、平成15年12月5日
  83. 萩原 亮<sup>1</sup>、恒枝 宏史<sup>2</sup>、喜助田 知央<sup>1</sup>、田淵 明子<sup>1, 3</sup>、今村理佐<sup>1, 3</sup>、津田 正明<sup>1, 3</sup>(1、富山医薬大・薬・分子神経生物、2、富山医薬大・院薬・臨床薬理、3、CREST)、脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子プロモーターの転写活性化に及ぼす小胞体Ca<sup>2+</sup>ストアの影響と電気刺激時による活性化、第26回日本分子生物学会年会、神戸市、平成15年12月12日
  84. 伏木 洋司<sup>1</sup>、福地 守<sup>1,2</sup>、窪田 たかね<sup>1</sup>、田淵 明子<sup>1,2</sup>、津田 正明<sup>1,2</sup>(1 富山医薬大・薬・分子神経生物学、2CREST)、カルシウムシグナル依存的なBDNF遺伝子活性化における転写制御因子CREB, USFの役割、第26回日本分子生物学会年会、神戸市、平成15年12月12日
  85. 藤井聡<sup>2</sup>、黒田洋一郎<sup>2</sup>、佐々木寛<sup>1</sup>、山崎良彦<sup>1</sup>、金子健也<sup>1</sup>、加藤宏司(山形大・医・神経機能統御学部門<sup>1</sup>、CREST/科学技術振興事業団<sup>2</sup>)、温度上昇に伴う海馬CA1シナプス伝達の変化とシナプス可塑性、第14回日本病態生理学会、東京都文京区本郷、平成16年1月25日
  86. 今村理佐<sup>1,2</sup>、又井宏和<sup>1</sup>、倉光梢<sup>1</sup>、安田誠<sup>1</sup>、津田正明<sup>1,2,1</sup>(富山医科薬科大、薬学部、分子神経生物学研究室<sup>2</sup>CREST科学技術振興機構)、神経活動依存的なBDNF遺伝子発現に対する環境化学物質の影、日本薬学会第124年会、大阪市、平成16年3月29日
  87. Yoichiro Kuroda, Inst. of Med. Sci., Univ. of Tokyo, ENDOCRINE DISRUPTOR CHEMICALS : A POSSIBLE CAUSE OF AUTISM AND OTHER DEVELOPMENTAL BRAIN DISORDERS----GENE EXPRESSION RESEARCH, International Meeting for Autism Research 2004. 5. 7-8
  88. Noriyuki Koibuchi, Possible mechanisms of polychlorinated bisphenyls action thyroid hormone-mediated brain development, The 4<sup>th</sup> China-Japan-Korea Conference, 24. may. 2004
  89. 根岸隆之、東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室、周産期甲状腺機能攪乱が生後の行動発達に与える影響：注意欠陥多動性様行動の惹起、第51回日本実験動物学会、長崎市、平成16年5月22日
  90. 根岸隆之、東京大学大学院農学生命科学研究科実験動物学教室、内分泌攪乱化学物質による行動発達異常；毒性学的指標として行動を観る、第51回日本実験動物学会、長崎市、平成16年5月20日
  91. 宮崎航、群馬大学大学院医学系研究科、PCB類による甲状腺ホルモン受容体を介した転写活性の抑制機構、第81回日本生理学会、札幌国際プラザコンベンションセンター、札幌市、平成16年6月2日
  92. 鯉淵典之、岩崎俊晴、群馬大学大学院医学系研究科、Coactivator activator (CoAA)とRNAの相互作用、第77回日本内分泌学会総会、京都市、平成16年6月26日
  93. 宮崎航、群馬大学大学院医学系研究科、環境ホルモンPCBによるTR-TER結合の解離、第77回日本内分泌学会総会、京都市、平成16年6月25日
  94. ベヘナゾ・ユセフィ、群馬大学大学院医学系研究科、The affect of congenital hypothyroidism on the locomotor activity、第77回日本内分泌学会総会、京都市、平成16年6月25日
  95. 田代朋子、青山学院大学理工学部、Real-time observation of neurofilament gel

- formation using microbeads: effect of dephosphorylation on the gel formation rate and property of the gel、16<sup>th</sup> International Congress of the IFAA (International Federation of Associations of Anatomists)、京都市、平成16年8月23日
96. Takayuki Negishi, Department of Chemistry and Biological Science, Faculty of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, Correlation between the concentration of serum polychlorinated biphenyls (PCBs) in pregnant cynomolgus monkeys and their offspring's behavioral scores in eye-contact test and finger maze learning test, Dioxin2004, Berlin
  97. 川崎勝義・高橋阿貴・小山高正・吉川泰弘・黒田洋一郎、Kine-Cluster systemを用いたラットのオープンフィールド行動解析- 抗不安薬と繰り返しの効果-、第64回日本動物心理学会 大阪市、平成16年8月31日
  98. 田代朋子、青山学院大学理工学部、脳機能発達に対する環境化学物質の影響を評価するための定量的オリゴDNAマイクロアレイ「シナプトアレイ」の開発:Development of a quantitative oligonucleotide microarray "Synptoarray" to monitor the effect of environmental chemicals on brain development、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月21日
  99. 佐野浩樹、小野れい、中林和也、倉知正、田代朋子:青山学院大学理工学部、ニューロフィラメントゲル形成に対する脱リン酸化の影響-リアルタイム観察と生物物理的解析:Dephosphorylation effect on neurofilament gel formation-real-time observation and biophysical analysis、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月22日
  100. 北村主税、白井京子、田代朋子:青山学院大学理工学部、膜蛋白として発現する微小管結合蛋白MAP1Bとシナプス形成:Expression of some microtubule-associated protein 1B as a transmembrane protein during synaptogenesis *in vitro*、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月22日
  101. 高橋理貴、今村誠、近藤恭光、田代英夫、田代朋子:青山学院大学理工学部、理化学研究所・分子計測工学、オリジナルオリゴDNAマイクロアレイを用いたマウス小脳における周産期甲状腺機能低下症の影響:Effect of perinatal hypothyroidism on gene expression in the developing mouse cerebellum studied with an original oligoDNA microarray、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月22日
  102. 今村誠、根岸隆之、田代朋子:青山学院大学理工学部、日本学術振興会、初代培養マウス中脳神経細胞におけるミトコンドリア機能阻害の影響:Effect of mild mitochondrial dysfunction on primary cultured mouse neurons、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月22日
  103. 木村-黒田純子<sup>1,3</sup>、永田功<sup>1,3</sup>、黒田洋一郎<sup>2,3</sup> 1. 東京都神経科学総合研究所・脳構造研究部門、2. 東京都神経科学総合研究所、3. 科学技術振興機構、CREST、小脳アストロサイトにおける甲状腺ホルモン依存性GLASTの発現調節と水酸化PCBによる影響:Effects of hydroxy-polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) on thyroid-hormone-dependent expression of GLAST, Bergmann glial specific glutamate transporter, in cerebellar astrocytes、第47回日本神経化学学会・第27回日本神経科学学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月21日
  104. 津田 正明<sup>1</sup>、今村 理佐<sup>1</sup>、安田 誠<sup>1</sup>、川原 正博<sup>2</sup>、福地 守<sup>1</sup>、田淵 明子<sup>1</sup> (1. 富山医薬大・薬・分子神経生物、2. 九州保健福祉大・薬・分析学)、活動依存的な脳由来神経栄養因子(BDNF)遺伝子の発現制御系と環境化学物質の与える影

響：Effect of environmental disruptors on the activity-dependent expression of brain derived neurotrophic factor (BDNF) gene in neurons、第47回日本神経化学会・第27回日本神経科学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月21日

105. 福地 守<sup>1,2</sup>、田渕 明子<sup>1,2</sup>、津田 正明<sup>1</sup>、(1. 富山医薬大・薬・分子神経生物、2. CREST, JST)、活動依存的な PACAP 遺伝子の転写および転写後調節機構の解析：Activity-dependent transcriptional and post-transcriptional regulation of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) coordinated by calcium and cAMP signals in neurons、第47回日本神経化学会・第27回日本神経科学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月23日
106. 鯉淵典之、群馬大学大学院医学系研究科 器官機能学分野、Suppression of thyroid hormone receptor-mediated transcription by polychlorinated biphenyls、第47回日本神経化学会・第27回日本神経科学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月21日
107. 根岸隆之、青山学院大学理工学部、Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics by perinatal hypothyroidism in rats、第47回日本神経化学会・第27回日本神経科学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月22日
108. 安本史恵<sup>1,3</sup> 根岸隆之<sup>1,3</sup> 石井寿幸<sup>1</sup> 久和茂<sup>1</sup> 黒田洋一郎<sup>2,3</sup> 吉川泰弘<sup>1,3</sup>  
<sup>1</sup>東京大院・農学生命科学・実験動物、<sup>2</sup>東京都神経科学総合研究所、<sup>3</sup>戦略的基礎研究推進事業(CREST)、代謝型グルタミン酸レセプターは初代培養大脳皮質神経回路網における自発的カルシウム発火頻度を調節する、第47回日本神経化学会・第27回日本神経科学会合同大会 (Neuro2004)、大阪、平成16年9月21日

(3)特許出願

特になし

(4)新聞報道等

1. 朝日新聞  
平成14年8月27日朝刊「脳への影響 新たな懸念」
2. 朝日新聞  
平成15年10月13日朝刊「PCB微量で脳発達阻害」
3. 教育医事新聞  
平成16年3月25日号「PCB微量でも脳形成・発達阻害」

(5)その他特記事項

## 7. 結び

当初の目的、脳の階層性を意識し、遺伝子・分子レベル、細胞レベル、個体行動レベルでの新しい実験系を確立しようとする目標は期限内の5年ではほぼ達成できた。また脳発達にもっとも重要なホルモンである甲状腺ホルモン、その働きを、かく乱すると目星をつけていたPCB、水酸化PCBの神経毒性が各レベルで定量的に検出できたことも大きな成果で、代表責任者として研究者冥利につきる。さらに活動依存性の遺伝子発現のかく乱をおこす環境化学物質群も検出可能になった。しかしながら初めは杞憂かも知れないと思っていたLD, ADHD, 高機能自閉症との関係を次々に示唆するデータがでてきていることは、従来の記憶の基礎研究では問題なかった、研究の成功をてばなしで喜ぶ気分になれないのが残念である。

各グループ・リーダーの先生方のこの問題の社会的重要性を意識して下さった熱心さ、有能さを改めて感じると共に、メンバーの方々の働きのお陰と感謝する次第である。これらの系は故宮本領域アドバイザーのご示唆、ご鞭撻の通り、これからの脳発達毒性の毒性評価試験法として更に磨きをかけ改良して、グローバル・スタンダードとなるべきものであろう。

さらにトキシコジェノミックスばかりでなく、あらゆる疾患、障害研究に役立つ高感度の国産オリジナルDNAマイクロアレイ技術の開発に成功したことは、理化学研究所の貢献もおおきいが、米国製の高価な市販品を安易に使わず自主独立で行こうと清水の舞台から飛び降りる気分で決断した当時を思い出すと、万感迫るものがある。田代グループの学生さんたちが、頑張ったことも成功の大きな要素であり、田代先生の聡明さと指導力の賜であろう。この系は今後、基礎・臨床医学、発生・発達生物学で強力な武器になることは確実で、内分泌かく乱物質というハッキリした目的研究でも、きちんとやれば、結局基礎研究としても重要な成果が得られるという、「戦略的基礎研究」のコンセプトを実現したものではないかと自賛したい。

有能さを証明したリーダーの先生方、メンバーの方々が、この業績、経験をもとにさらに素晴らしい仕事をなさることを確信しつつ、改めて感謝したい。

末筆になりましたが、鈴木研究総括、領域アドバイザーの先生方、実際面で大変お世話になった領域研究事務所の方々、無理をずいぶん聞いてくれた江口さんをはじめCREST関係者の方々に厚く御礼申し上げます。