

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 後藤 渉 子

### 論文題目

Prenatal and lactational bisphenol A exposure dose not alter serotonergic neurons morphologically in the murine dorsal raphe nucleus.

### 論文内容の要旨

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネート製品・エポキシ樹脂の製造に広く使用されている内分泌かく乱化学物質の一種で、胎児期や授乳期における BPA 曝露が神経発達に影響を及ぼすことが懸念されている。近年の疫学調査では、母体尿中の BPA 濃度とその出生児の精神・情緒面での問題行動との間に有意な相関がみられたとの報告がなされている。我々の先行研究において、マウスの胎児期における BPA 曝露により、生後の大脳皮質神経細胞構築異常や青斑核の性的二型性の雌雄逆転、黒質のドパミンニューロンの減少が生じること、さらに社会行動の異常とともに、脳内のセロトニン、その代謝物質、ガンマアミノ酪酸 (GABA) の変動がみられることを見出してきた。そこで本研究では、胎児期および授乳期の低用量 BPA への曝露によりセロトニン代謝異常がおこるメカニズムを明らかにするために、セロトニン神経系の一大中枢である中脳背側縫線核の形態学的変化に関して組織計測学的検索を行った。

C57BL/6J マウスのメス成獣を交配させ、臍栓が確認された朝を胎齢 0.5 日 (E0.5) とした。BPA 曝露群 (BPA 群) の母獣には 0.01% のエタノールに溶かした 500 µg/kg 体重の BPA を、vehicle 投与群 (対照群) の母獣には同量のエタノールを、E0.5 から生後 3 週まで 1 日 1 回栄養チューブを用いて経口的に投与した。なお、500 µg/kg 体重/日という濃度は、報告されている最大無毒性量 (NOAEL) の 100 分の 1 の濃度である。出生仔は BPA 曝露群 (n=9: 雄、n=8: 雌)、対照群 (n=8: 雄、n=8: 雌) で、生後 14 週で脳を摘出した。中脳背側縫線核を含む脳領域から 40 µm 厚で連続凍結切片を作製し、浮遊法にて、セロトニン同定のためにトリプトファンヒドロキシラーゼ 2 (TPH2) および GABA ニューロン同定のためにグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) を用いた蛍光二重染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いて、背側縫線核の吻側から尾側までの全切片に対し、4 µm ステップで Z 方向の焦点をずらした画像を取得した (Z-stack)。画像解析ソフトウェア (Image

J、1.47v NIH) を用い、背側縫線核の総細胞数と亜区域各々の細胞数を計測した。背側縫線核は複数の亜区域：吻側、腹側、背側、尾側、外側、後背側に分けられ、それぞれが異なった脳領域に相互的な投射をしているため、機能的に異なる可能性を考え、亜区域ごとに細胞数を算定した。さらに、三次元再構築によって得られた画像から (Image-Pro Analyzer 7.0.1)、総容積・背腹長・長軸長・翼幅長を計測し、BPA 曝露群・対照群、雌雄で比較した。

背側縫線核のセロトニン作動性神経細胞 (TPH2 陽性細胞) 数は、対照群 (7452±168)、BPA 曝露群 (7572±158)、雄 (7527±178)、雌 (7502±150) (mean ± SE) であり、いずれにも有意差はなかった。亜区域：吻側、腹側、背側、尾側、外側、後背側で計測した TPH2 陽性細胞数は、対照群 (95 ± 8, 2550 ± 85, 1601 ± 40, 1150 ± 112, 1765 ± 54, 291 ± 30)、BPA 曝露群 (107 ± 11, 2558 ± 106, 1546 ± 46, 1251 ± 130, 1798 ± 49, 313 ± 18)、雄 (99 ± 9, 2582 ± 105, 1592 ± 49, 1195 ± 141, 1761 ± 57, 298 ± 22)、雌 (103 ± 10, 2528 ± 88, 1555 ± 39, 1209 ± 104, 1802 ± 46, 307 ± 27) (mean ± SE) で、有意差は認められなかった。GAD67 陽性細胞は、すべての群で後背側亜区域のみ、少数認められた。三次元再構築による背側縫線核の容積 (×10<sup>7</sup>µm<sup>3</sup>) は対照群 (4.47±0.21)、BPA 曝露群 (4.48±0.14)、雄 (4.57±0.18)、雌 (4.38±0.17) (mean ± SE) であり、有意差はみられなかった。背側縫線核の背腹長 (吻側、中部、尾側 µm) は、対照群 (732 ± 9, 528 ± 10, 704 ± 6)、BPA 曝露群 (714 ± 11, 516 ± 9, 702 ± 9)、雄 (730 ± 11, 532 ± 10, 700 ± 9)、雌 (716 ± 8, 511 ± 8, 705 ± 7) (mean ± SE)、長軸長、翼幅長 (µm) は、対照群 (1570 ± 29, 816 ± 20)、BPA 曝露群 (1533 ± 21, 794 ± 18)、雄 (1555 ± 32, 815 ± 22)、雌 (1546 ± 13, 794 ± 16) (mean ± SE) であり各群間で有意差はみられなかった。

以上の結果より、マウスの胎児期および授乳期の低用量 BPA 曝露は、中脳背側縫線核のセロトニン作動性細胞数や三次元的な形状、容積に関しては影響を及ぼさないことが明らかとなった。胎児期、授乳期の低用量 BPA 曝露がマウス背側縫線核のセロトニンやその代謝産物など神経伝達物質をかく乱させるメカニズムには、種々のセロトニン受容体、トランスポーター等の機能的関与が考えられ、今後の分子レベルでの検索が望まれる。