

# 琵琶湖と淀川に溶存する環境ホルモンの脳神経細胞に 対する評価方法の確立

関西大学 下家 浩二

## 1. はじめに

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）による汚染は個体の成長や生殖に 関与する内在性ホルモンを阻害し、生命活動に深刻な異常を引き起こすとして問題視されている。特に、生物の恒常性維持機構に直接作用する環境ホルモンの特性が 生物界に及ぼす影響は甚大である。高度経済成長期以降の日本では、様々な環境ホルモンが環境中に放出されてきた。例えば、河川では、淀川水系のように周辺の人口が多い大都市を貫く場合、工業用水としてだけでなく飲料水としても使用されることから、ヒトの健康への影響も懸念される。例えば、難分解性で水溶性の環境ホルモンの一つであるビスフェノール A (BPA) は、食品缶詰内面の防蝕塗料（エポキシ樹脂）やポリカーボネート製の食器・容器等の原料として日常製品に幅広く利用されている。その BPA は、河川中へも溶出している。BPA が生殖細胞に対してメス化や細胞死などの悪影響を及ぼすとの研究結果が見られる中（そもそもアメリカ合衆国フロリダ州において BPA を含む工業用水が溶出していた湖で雄ワニの生殖器の矮小化が見られたことが最初の報告である）、フランスでは、食品と直接的に接触する梱包、コンテナ、調理器具の製造が制限され、さらに、それらの製品を輸出入することも制限されている。アメリカでは、飲料製品を販売するために BPA 不含のペットボトルも用いられている。

そこで、本研究では、河川中の BPA の溶存量を調査することにより、ヒトを含む生物への影響を考えるデータの取得を目標とした。その測定と並行して、BPA による PC12 細胞や培養大脳皮質神経細胞への影響を解析したところ、およそ発生時期の神経細胞では、神経細胞が有する神経突起の伸長を抑制していることが分かった。その他、1 細胞あたりの神経突起数や軸索の長さも測定した。河川中の BPA 濃度を測定する際の採水は、毎月一回の頻度で琵琶湖の瀬田川の唐橋付近と淀川の十三付近で行った。そして、約一年の測定結果を評価することとした。その結果、春夏の BPA 溶存量は、秋になると約 2 倍に増加した。しかし、河川中の BPA が直ちに生物に影響を与える濃度（急性毒性を惹起する濃度）ではなかった。その後、BPA の濃度は、冬場に 4 月の測定値に近づく様に減少していた。

## 2. 方法

### 2.1 神経細胞の培養方法と生存率変化の測定方法

#### 2.1.1 細胞培養用培地の調整と培養方法

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM: Sigma 社製) 500 ml に対して、10% fetal bovine serum (FBS: PAA 社製) 及び 0.1% Penicillin-Streptomycin (PS: Gibco 社製) を添加した培地 5/5DMEM を細胞培養用培地とした。一方、DMEM に 0.1% PS のみを添加したものを、BPA を添加する培地である serum-free DMEM 培地 (SF-DMEM) とした。PC12 細胞は、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ中で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 気相下、5/5DMEM を用いて単層培養した。培養大脳皮質神経細胞は、ニューロベサル培地を PC12 細胞と同様に添加物を加えて細

胞培養用培地とした。そして、直径 6 cm の dish 中、37°C と 5%CO<sub>2</sub> 気相条件下で単相培養した。

### 2.1.2 MTT アッセイ法

MTT アッセイとは、生細胞において淡黄色である dimethylthiazol diphenylyltetrazolium bromide (MTT) のテトラゾリウム環が、ミトコンドリア内膜の電子伝達系に存在し、金属フラビンタンパク質であるコハク酸デヒドロゲナーゼにより開裂され、不溶性暗青色色素ホルマザンが生成される現象を用いて細胞の生存活性を測定する方法である。96 well プレートに細胞を播種し、翌日 BPA の添加を行った。BPA 添加から 24 時間後、well 中の培地を除き、MTT 溶液 (5mg/ml MTT in PBS) と SF-DMEM を 1: 4 にて混合した溶液を 100 μl/well 加えた。約 20 分間インキュベーター内で静置させ、80 μl/well の lysis buffer を加え、プレートミキサーで約 1 時間振盪攪拌した。続いて、ピエント (大日本製薬社製) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、{(サンプル添加細胞の数値) - (ブランクの数値) / (サンプル無添加の数値) - (ブランクの数値)} × 100 の計算を行い、サンプル無添加細胞群を 100% として、BPA 添加細胞群のサンプル無添加細胞群に対する割合として算出した。

## 2.2 神経突起長 (軸索長を含む) の測定

2.2.1 4%パラホルム溶液で神経細胞を固定化した後、倒立型位相差顕微鏡 (キーエンス社製) を用いて細胞の様子を観察すると同時に写真として画像を保存した。画像は、顕微鏡に付属の解析ソフトに取り込ませ、細胞体から伸長している神経突起の根本 (細胞体の表面を 0 μm とする点) から伸長している最先端までの長さを直線的に測定した。尚、湾曲している場合には、湾曲部分を複数の短い直線として補正し、数値化した。

## 2.4 BPA 添加後の細胞内分子の変動解析

### 2.4.1 western blotting による特定タンパク質の変動解析

BPA 添加後の細胞の細胞抽出液を音波破碎機でした。そのサンプルを遠心分離 (15,000 rpm、25 分) で上清のみを得た。次に、サンプルのタンパク質量を定量するためにローリー法により、750 nm の吸光度の測定値からタンパク質濃度を算出した。その後、アクリルアミド電気泳動を行い、サンプル中のタンパク質群を分離し、PVDF 膜に転写した。その PVDF 膜は、10%スキムミルクに浸し、4°C で 1 晩静置した。スキムミルクに浸した PVDF 膜は 60 分振盪後に、一次抗体によって 2 時間反応を行った。同様に二次抗体を 1 時間反応させた後、発光基質と発光反応させることにより目的のタンパク質を Image Quant LAS4010 (GE ヘルスケア社製) で検出した。

## 2.5 河川の BPA 濃度の測定用水サンプルの調整

### 2.5.1 河川での採水とその後のろ過処理

琵琶湖を源流として、滋賀県大津市の瀬田川唐橋付近と大阪府大阪市の淀川十三付近において、それぞれ同日に毎月 1 回のペースで採水を実施した。期間は、2016 年 4 月から翌年 3 月までとした。それぞれ約 500 ml を採水し、採水後の水は、氷冷した状態で研究室へ持ち帰り、直ちに、ろ紙 3MM を用いてろ過処理を行った。その後、この水サンプル 500 ml をガラス繊維フィルター (アドバンテック社製、品番 36481047, GS-25 φ 47 mm) で更にろ過した後、固相抽出による濃縮を行い測定用サンプルを調整した。

## 2.5.2 固相抽出による BPA の濃縮

ろ過した水サンプル 100 ml は、予めジクロロメタン 10 ml とメタノール 5 ml および蒸留水（ヘキサン洗浄後の BPA 不含水）5 ml で前処理した固相カートリッジ（ジーエルサイエンス株式会社製、品番 5010-26021、GL-Pak GLASS SPE NEXUS 200 mg/ 6 ml）に通水した。そして、蒸留水 5 ml および 50% メタノール 5 ml で洗浄後、固相カートリッジを 1 時間乾燥させた。乾燥後、ジクロロメタン 6 ml により BPA を溶出させ、窒素ガスを吹きかけることにより溶媒を揮発させ除去した。最後に、10% メタノール 300  $\mu$ l に溶解して測定用サンプルとした。

## 2.5.3 ELISA 法（競合法）

BPA 不含の抗原酵素複合溶液（ペルオキシダーゼ溶液）を 7 ml 調製し、マイクロプレートに、測定サンプルと BPA の検量線サンプルの数に合わせ、それぞれ 100  $\mu$ l/well 注入した。その後、測定サンプルや BPA の検量線用サンプル液（0、0.05、0.3、1.0、10  $\mu$ g/l）を 100  $\mu$ l/well 添加し、抗原酵素複合溶液を調整した。抗 BPA モノクロナール抗体を固相化した 96 well プレートに抗原酵素複合溶液を 100  $\mu$ l/well ずつ分注し、1 時間室温で反応させた。そして、溶液を除去し、0.05% ポリソルベート-20 を含むリン酸緩衝液洗浄液 300  $\mu$ l/well で 3 回洗浄後、発色液（過酸化水素テトラメチルベンジジン）100  $\mu$ l/well を加え、30 分間室温で反応させた。最後に、反応停止液（3M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>）100  $\mu$ l/well を加え反応を停止した後、波長 450 nm での吸光度（OD）を測定した。測定後、検量線をもとに測定用サンプル中の BPA 濃度を算出した。

## 3. 結果

### 3.1 BPA がおよぼす神経細胞への影響

#### 3.1.1 細胞死を惹起する際の BPA 濃度

BPA が神経細胞に与える影響の一つとして細胞死が惹起されることが知られている。本研究では、モデル神経細胞である PC12 細胞を用いていることから、その細胞に対する BPA の細胞死惹起作用を解析した。その結果、100  $\mu$ M を超える BPA 濃度で有意な細胞死が観察された（図 1A）。また、初代培養大脳皮質神経細胞に於いては、160  $\mu$ M を超える BPA 濃度で有意な細胞死が観察された（図 1B）。

#### 3.1.2 形態変化作用を引き起こす BPA

これまで知られている BPA の作用は、主に生殖細胞に対する女性ホルモン様作用や細胞死誘導作用であった。それらの作用以外に、細胞死を引き起こす BPA の濃度以下では、PC12 細胞を培養した際、神経突起の伸長作用があることを見出した。PC12 細胞では、60  $\mu$ M 添加 24 時間後で双極化した 2 本の神経突起を有する細胞に形態変化することが分かった（図 2A と）。そして、初代培養大脳皮質神経細胞に於いては、100  $\mu$ M で有意な双極化見られなかったが、PC12 細胞と同様に双極化した神経突起の伸長を伴う形態変化が観察された（図 3）。興味深いことに、神経突起の枝分かれの数や 1 細胞あたりの神経突起の本数は、100  $\mu$ M の BPA の添加で有意な減少が観察された（図 4 と 5）。さらに、神経突起の中でも興奮伝播を担う軸索に着目し、BPA 添加後の長さを免疫染色後に測定した結果、神経突起全体では有意な伸長作用の増加が観察されたのに対し、軸索の伸長は抑制されていることが分かった（図 6）。これらの結果は、BPA が胎児期における発生途

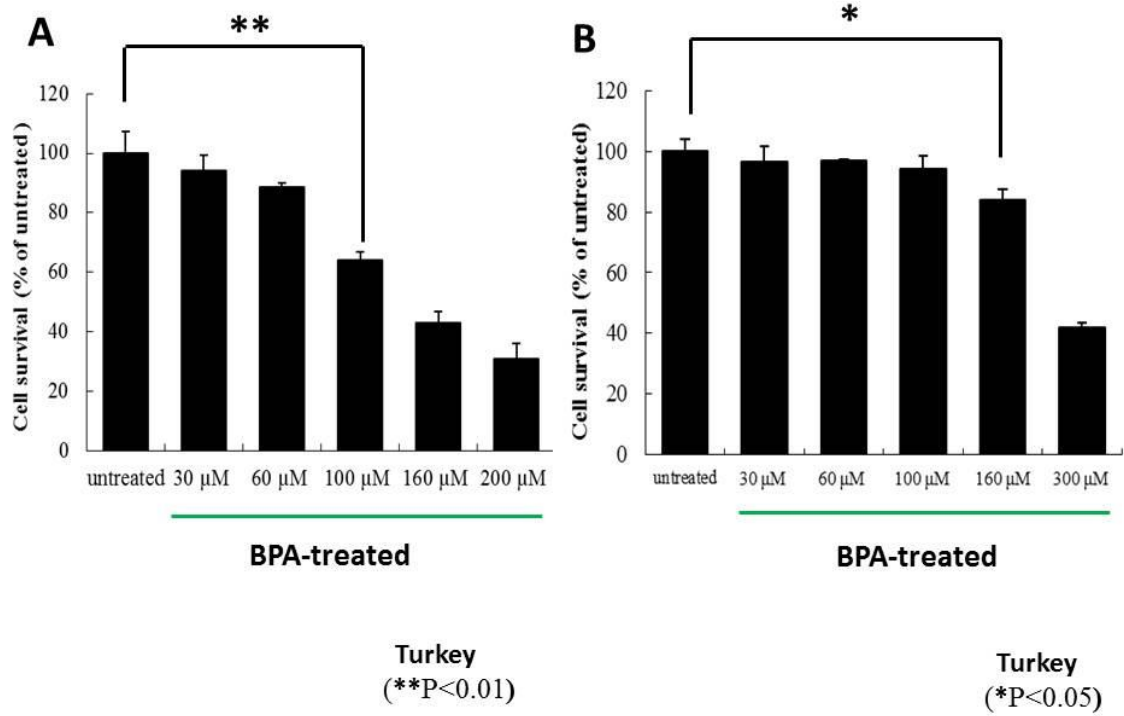


図1 PC12細胞（A）と培養大脳皮質神経細胞（B）に対するBPAの細胞生存率への作用

上の神経細胞に対して大まかに2つの悪影響を及ぼす作用があることを示唆している。1つ目に、発生段階の未分化細胞から神経細胞へと分化する際、神経突起の伸長が促進さ

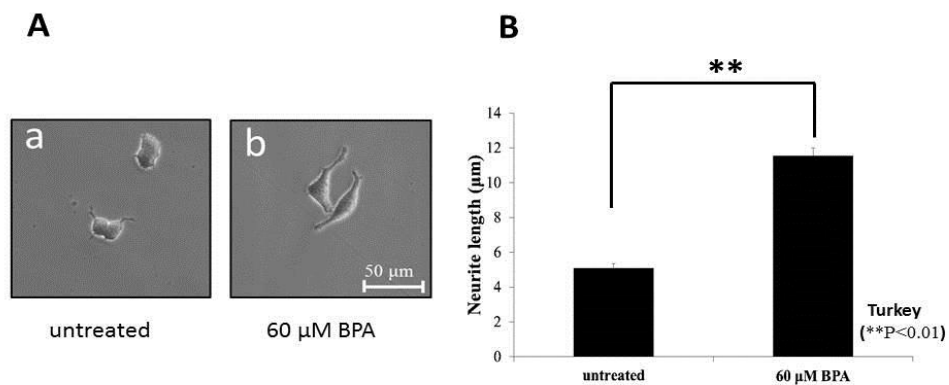


図2 PC12細胞に対するBPA添加24時間後の神経突起伸長作用

れることにより正しくシナプス結合を形成できなくなることが予測される。また、発生段階の神経細胞に運命決定された後にも樹状突起の神経突起の伸長を促進し、正しくシナプス結合が形成されずに活動電位のコントロールが出来なくなることが予測される。

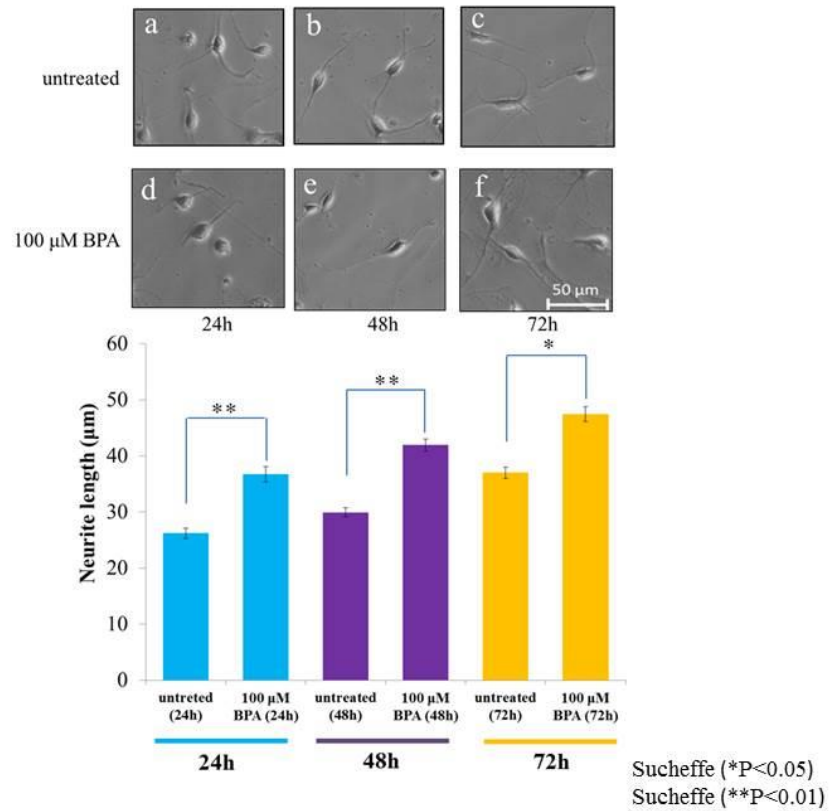


図3 培養大脳皮質神経細胞に対する BPA 添加 24-72 時間後の神経突起伸長作用

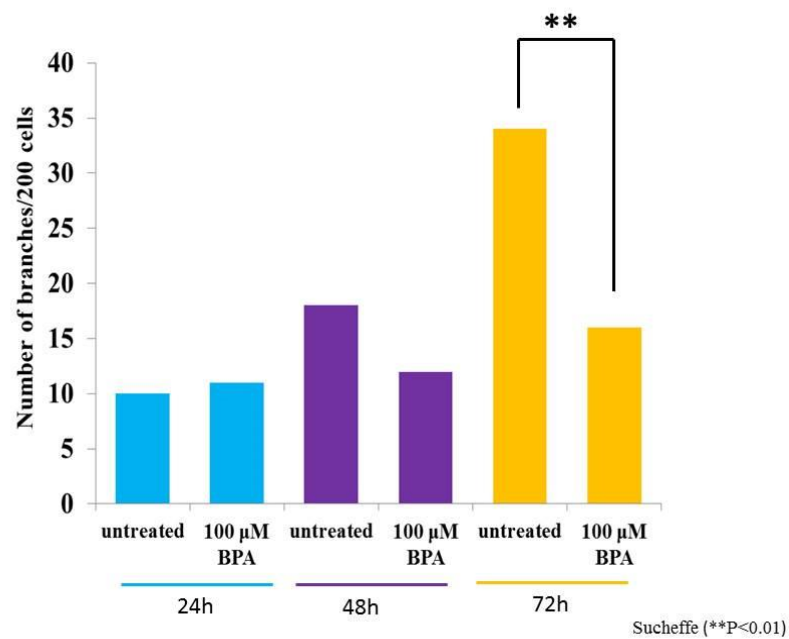


図4 培養大脳皮質神経細胞に対する BPA 添加 24-72 時間後の突起の枝分かれ減少作用

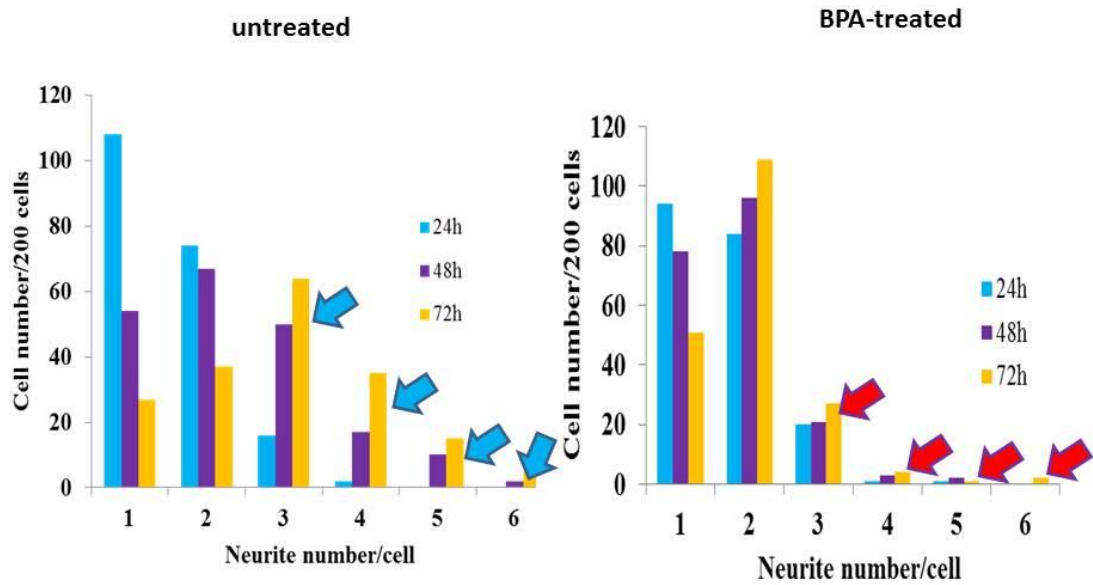


図5 培養大脳皮質神経細胞に対する BPA 添加 72 時間後の 1 細胞あたりの突起数

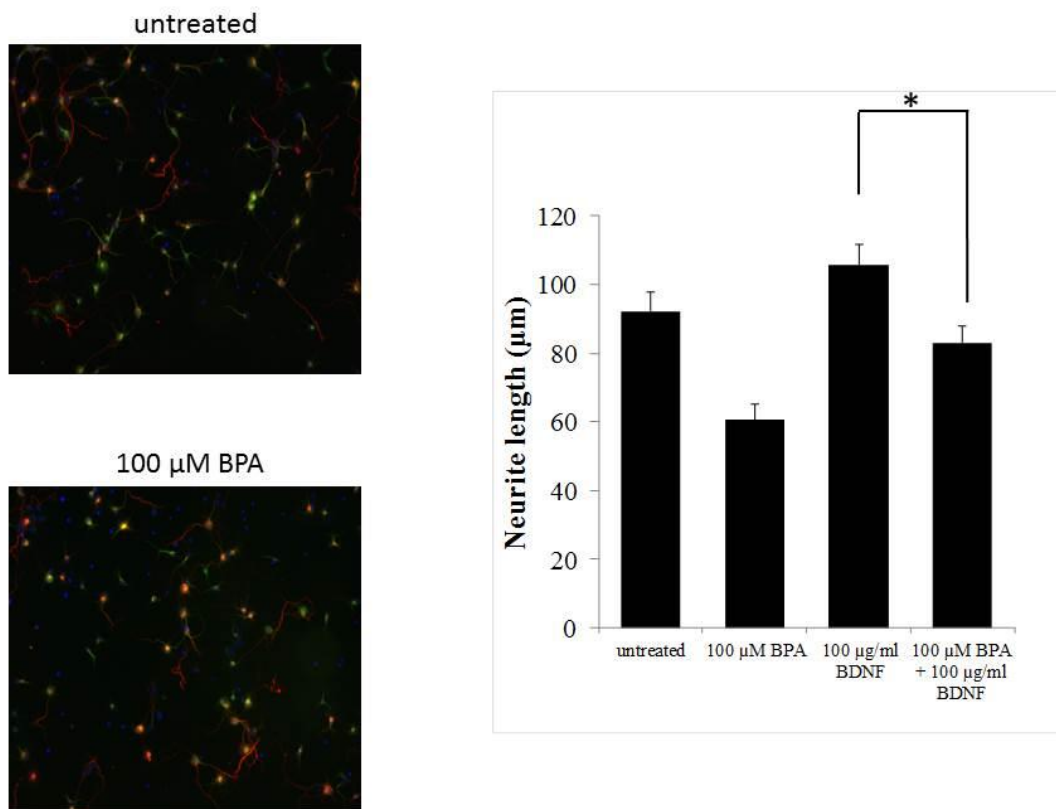


図6 抗 Tau-1 抗体を用いた免疫染色による軸索伸長度の計測

さらに、神経細胞 1 つあたりの神経突起の数が増加したことも活動電位のコントロールを出来なくする原因になり得る。2 つ目に、軸索の伸長が抑制されることに正常な神経細胞同士の興奮信号の伝播が出来なくなる可能性がある (図 6)。このことは、知覚神経などで受け取った信号を活動電位として伝播させることを阻害することを意味していることから、運動や行動に異常を表す様な疾患を惹起する可能性を示唆している。

### 3.2 神経細胞内における特定遺伝子の発現制御の分子機構

#### 3.2.1 形態変化作用を誘導するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構

細胞内の遺伝子発現制御機構の一つとして塩基配列の変化を伴わないエピジェネティックな制御機構が近年の生物学の研究において注目されている。この制御機構では、DNA の 2 重鎖がヒストンに巻き付き、転写因子群が DNA に接近できないヘテロクロマチン構造と特定の遺伝子上流配列に転写因子群が DNA に結合できるユークロマチン構造が存在する。前者では、転写因子群が接近できないことから遺伝子発現が抑制される。逆に後者では、転写因子群が接近し得るプロモーター配列を有する遺伝子 (群) が発現上昇する。BPA 添加後には、神経突起を伸長させるために必要な遺伝子群が発現上昇していると考えられることから、ゲノム中の特定の部位がユークロマチン構造化しているはずである。さらに詳細に述べると、ヒストン内の特定リシン残基にアセチル化やメチル化が引き起こされた際には、ヒストンの電荷が正にならない部位ができることから、負に帯電している DNA の 2 重鎖が弛緩している。それを解析するために、ヒストンのアセチル化やメチル化に特異的な抗体を用いた western blotting による検出を行う必要がある。解析結果、PC12 細胞ではヒストン H3 の 14 番目のリシン残基のアセチル化 (AcetylH3K14) の亢進が観察された (図 7)。しかし、ヒストン内の 3 か所のメチル化 (トリメチル化) に変動は見られなかった。

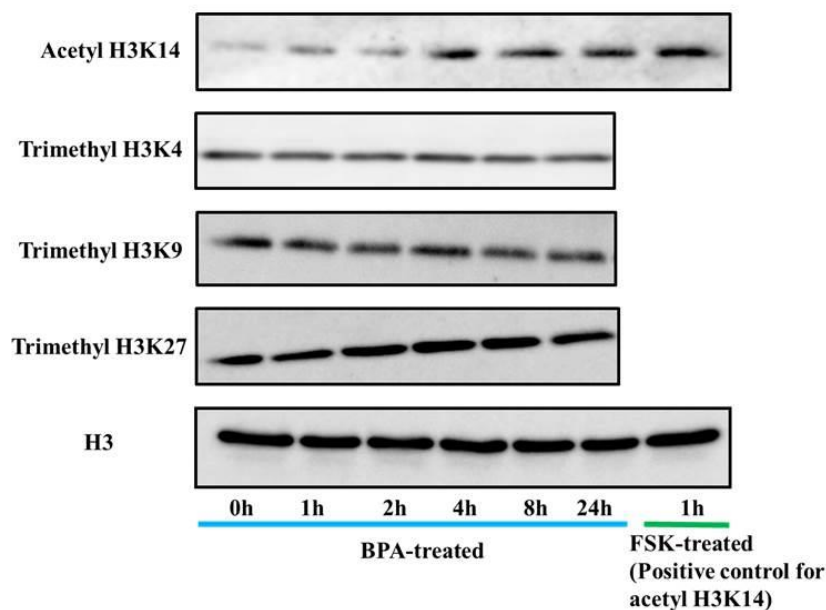


図 7 BPA による PC12 細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構



同様に、培養大脳皮質神経細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構を解析した結果、BPA を添加すると AcetylH3K14 の減弱が抑制されていることが分かった (図 8)。つまり、特定の遺伝子発現が持続していることが示唆された。しかし、ヒストン内の 3 か所のメチル化 (トリメチル化) に変動は見られなかった。そこで、BPA 添加後に発現上昇する遺伝子を探索した結果、PC12 細胞では neuroD 遺伝子の発現が上昇していることが明らかになった。大脳皮質神経細胞では、neuroD 遺伝子の発現が持続的に上昇していることが分かった。

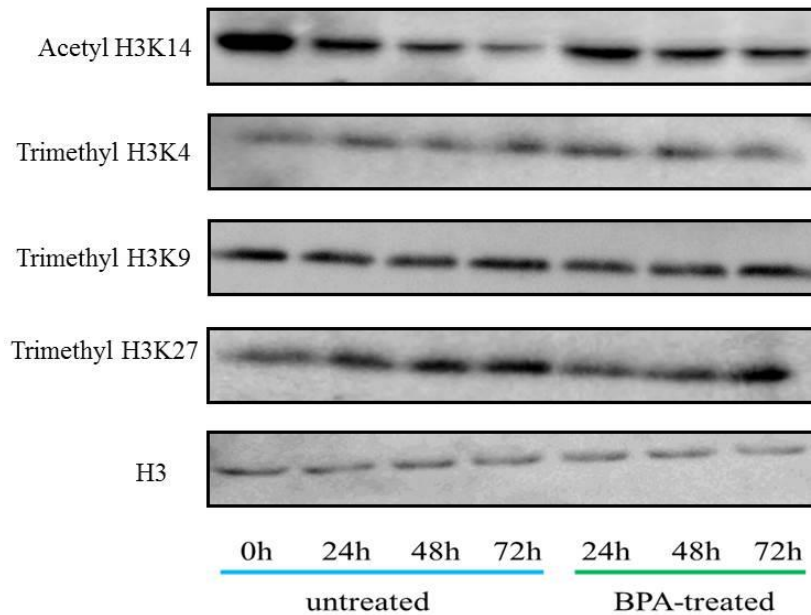


図 8 BPA による大脳皮質神経細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現制御機構

### 3.3 河川中に溶存する BPA の定量化

#### 3.3.1 琵琶湖と淀川における BPA 濃度の 1 年間の経時変化

BPA は、プラスチック類の可塑剤などとして汎用されていることから、難分解性で水溶性であるならば河川や湖水をはじめとする我々の身近な環境中に溶存していることが想定される。そこで、瀬田の唐橋付近の琵琶湖と十三付近の淀川における BPA 濃度を測定し、脳神経細胞に対して影響を及ぼし得るのかを解析した。その結果、平成 28 年 4 月から 8 月にかけて約  $0.01 \mu\text{g}/\text{l}$  で推移していた値が、同年 9 月から 10 月にかけて約 2 倍の  $0.02 \mu\text{g}/\text{l}$  に急激に上昇していることが明らかになった (図 9)。さらに、上昇した値は、同年 12 月から平成 29 年 3 月にかけて徐々に減少することも明らかになった。BPA の濃度上昇は、BPA がより可溶化し易い水温が上昇する夏に引き起こされると予想していた。しかし、実際は秋に上昇していたことから、その要因を考察しているが、降雨などによる水量の変化、河川周辺の人口の増減、河川周辺の工場の増減などの多岐にわたる調査が必要であり、現在の所は不明のままである。それに加え、本研究では、平成 28 年 4 月から平成 29 年 3 月の 1 年間における BPA の濃度変化を調査したが、平成 29 年 4 月から 1 年間の BPA の濃度変化を調査することで何らかの原因が見いだされる可能性



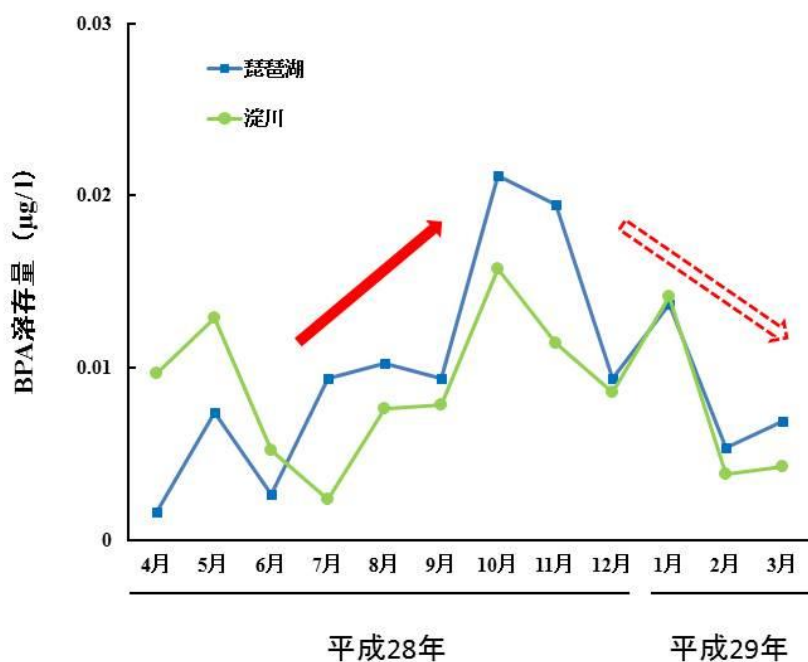


図9 琵琶湖と淀川に溶存するBPAの濃度変化

もある。毒性に関しては、BPAが $0.02 \mu\text{g}/\text{l}$ に上昇し、脳内に全てが移行したとしても急性毒性が現れることは考えられないものであった。ただ、ヒトは食物連鎖の頂点に位置しており、貝や魚類を摂取し続けることで生物濃縮による悪影響が現れる可能性は否定できない。さらに、妊娠ラットに低濃度のBPAを摂取させた後、生後のラットでは行動や記憶に異常が見られたとする報告もみられることから、例え低濃度であっても妊婦への危険性がある可能性も否定できない。低濃度でも神経系に悪影響を及ぼし得るかを今後の課題として解析する必要があると考えている。