

琵琶湖・淀川水系における環境汚染物質 ビスフェノールAの溶存量と脳神経系に対する影響の 相関的比較研究

関西大学 化学生命工学部 下家 浩二

1. はじめに

内分泌攪乱物質（環境ホルモン）による汚染は特に生殖細胞や組織に作用する内在性ホルモンの機能を阻害し、結果として個体に異常を引き起こすことが知られている。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。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、湖沼や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、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。つまり、得られている生殖組織などのエビデンスから、出来る限りBPAを使用しない方向に政策を傾倒させている。

本研究では、生殖組織ではなく、BPAが蓄積しやすく脂質含量が多い脳神経系に着目した研究を行った。研究では、琵琶湖（瀬田の唐橋付近）と淀川（十三付近）中のBPAの溶存量を定量した。また、モデル神経細胞やラット培養神経細胞に対するBPAの影響を解析した。そして、実験室での神経を培養した際の結果と比較することにより、どの程度の影響を神経系に及ぼすかを予見し得る系を構築し、評価することとした。

2. 実験の方法

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) 500 ml に対して、10% fetal bovine serum (FBS: PAA 社) 及び 0.1% Penicillin-Streptomycin (PS: Gibco 社) 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 cm² 培養フラスコ中で 37°C、5%CO₂ 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、ニューロベイスル培地を 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%CO₂ 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 diphenyltetrazolium 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 μ l/ well 加えた。約 20 分間インキュベーター内で静置させ、80 μ l/ well の lysis buffer を加え、プレートミキサーで約 1 時間振盪撹拌した。続いて、ビエント (サーモ社) を用いて 570 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、 $[\{(サンプル添加細胞の数値) - (ブランクの数値)\} / \{(サンプル無添加の数値) - (ブランクの数値)\}] \times 100$ の計算を行い、サンプル無添加細胞群を 100% として、BPA 添加細胞群のコ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 細胞サンプルの調整と神経突起長の測定

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) 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 μ m 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) 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、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6ml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 μ 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7ml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 μ 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 μ g/l)を100 μ l/well添加し、抗原酵素複合溶液を調整した。抗BPAモノクローナル抗体を固相化した96wellプレートに抗原酵素複合溶液を100 μ 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 μ 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 μ 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 H₂SO₄)100 μ l/wellを加え反応を停止した後、波長450nm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。昨年度の助成の成果報告書にもモデル神経細胞であるPC12細胞と培養大脳皮質神経細胞を用いた結果を記載している(図1Aと1B)。同現象は、平成29年度に行った実験でも再現良く有意に細胞死が観察された(図1Aと1B)。何度実験を行ってもBPAが細胞毒性を有することを確認した。

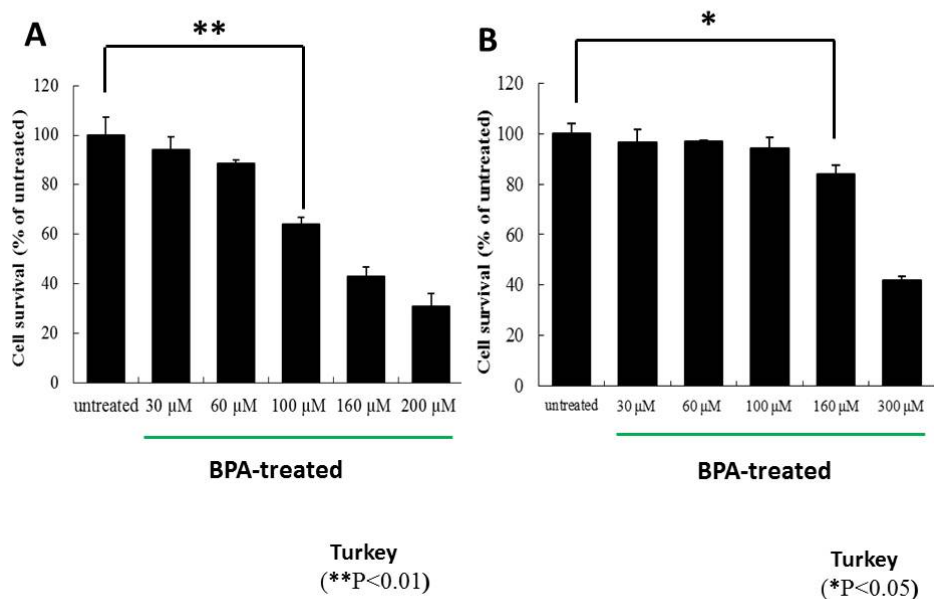


図1 PC12細胞(A)と培養大脳皮質神経細胞(B)に対するBPAの細胞生存率への作用

3.1.2 神経突起の伸長を引き起こす BPA

私は、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昨年度に見出している。この現象についても再現性を確認した (図 2)。更に、初代培養大脳皮質神経細胞に於いては、100 μM で有意な神経突起の伸長作用を有することも観察した (図 3)。神経突起は、大まかに樹状突起と軸索に分類されることから、本年度は、伸長した突起がどの突起に分類され、それがどのように変化するかを解析した。その結果、BPA 添加後 48 時間と 72 時間後に細胞を固定し、成熟神経細胞の樹状突起 (図 3 の MAP2 の写真) や軸索 (図 3 の Tau-1) を免疫染色後にそれぞれの長さを測定した結果、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 3 の棒グラフ)。これらの結果は、BPA が胎児期における神経細胞が有する軸索の形成過程が途中段階で止まってしまい、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。逆に、発生のかなり初期の段階では、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とも予測される。

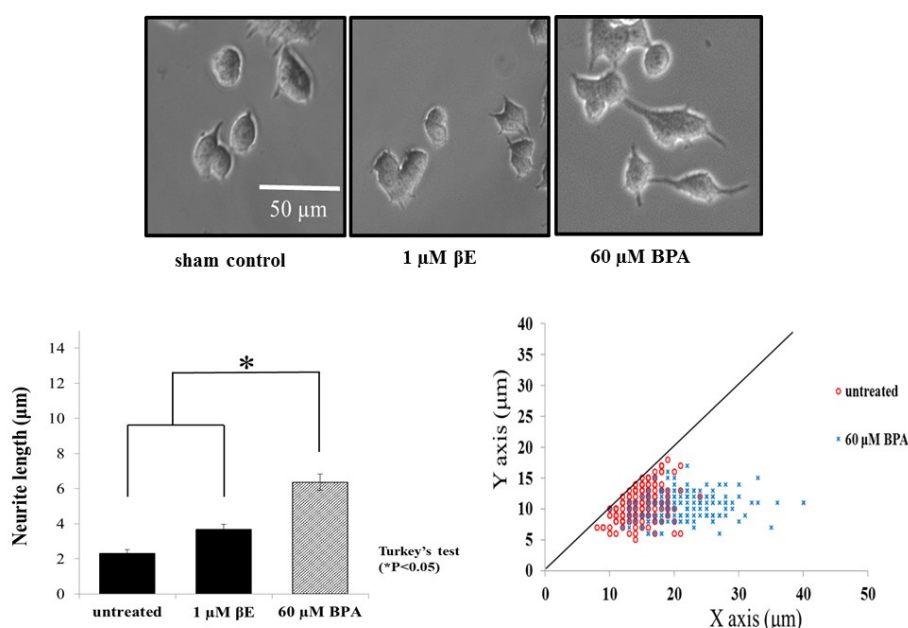


図 2 PC12 細胞に対する BPA 添加 24 時間後の形態変化作用

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脳神経へ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、感覚、運動、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 胎生期における神経幹細胞から成熟神経細胞への分化に対する BPA の作用

3.2.1 分化マーカータンパク質の神経分化過程での発現変動

細胞内の遺伝子発現の変化は、当然ながら細胞の形態変化にも影響を与える。その結果として、分化マーカーとなる遺伝子が知られている。本研究では、未成熟な神経細胞

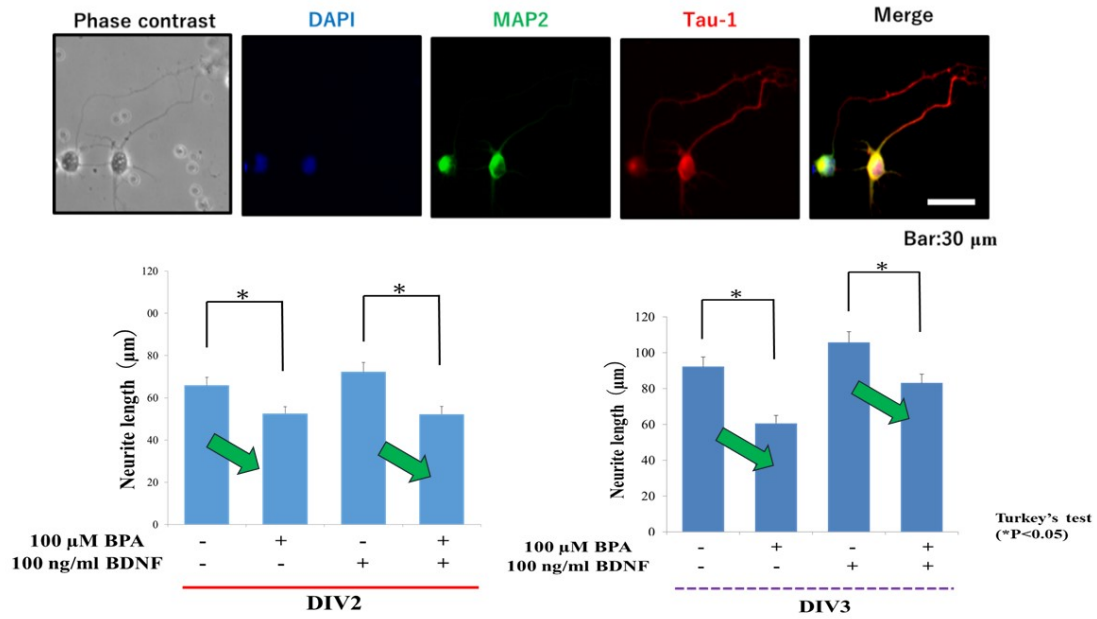


図3 培養大脳皮質神経細胞に対するBPA添加48時間と72時間後の形態変化作用

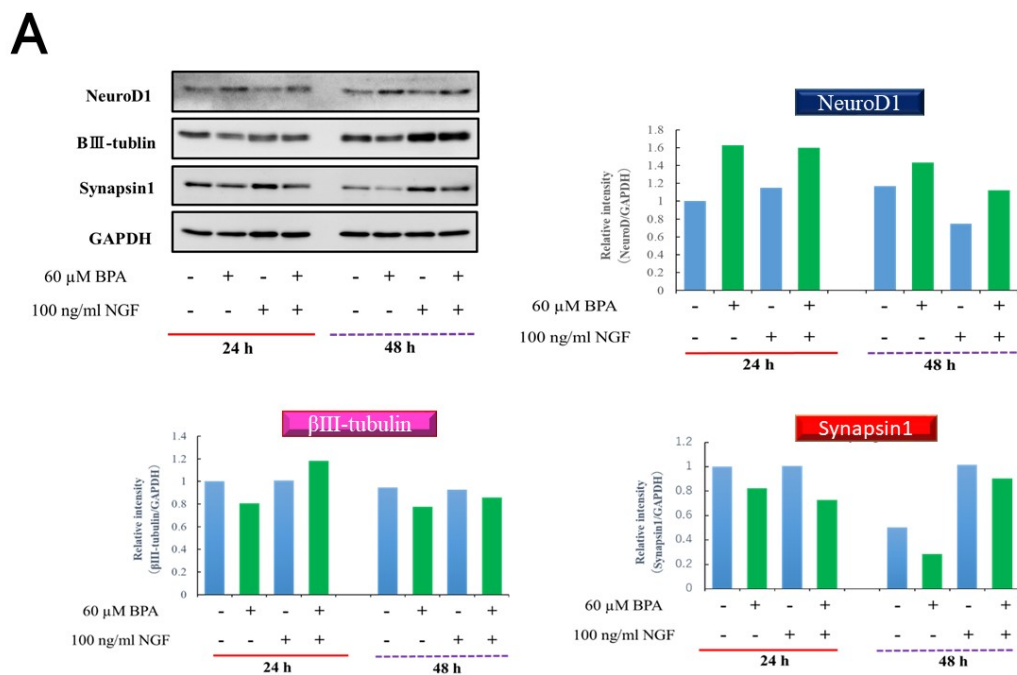


図4A PC12細胞におけるBPA添加24時間と48時間後の分化マーカータンパク質の発現変動

(未成熟ニューロン)のマーカーとしてNeuroD1とDCX、成熟した神経細胞(成熟ニューロン)のマーカーとして β III-TubulinとSynapsin1を採用し、免疫染色によって発生過程のどの段階にあるかを解析した。この実験では、PC12細胞を完全に未分化な細胞(未成熟ニューロンでも成熟ニューロンでもない細胞)とし、BPAによって神経突起を伸長させる分化を解析した。そして、培養大脳皮質神経細胞(E17)を未成熟ニューロン

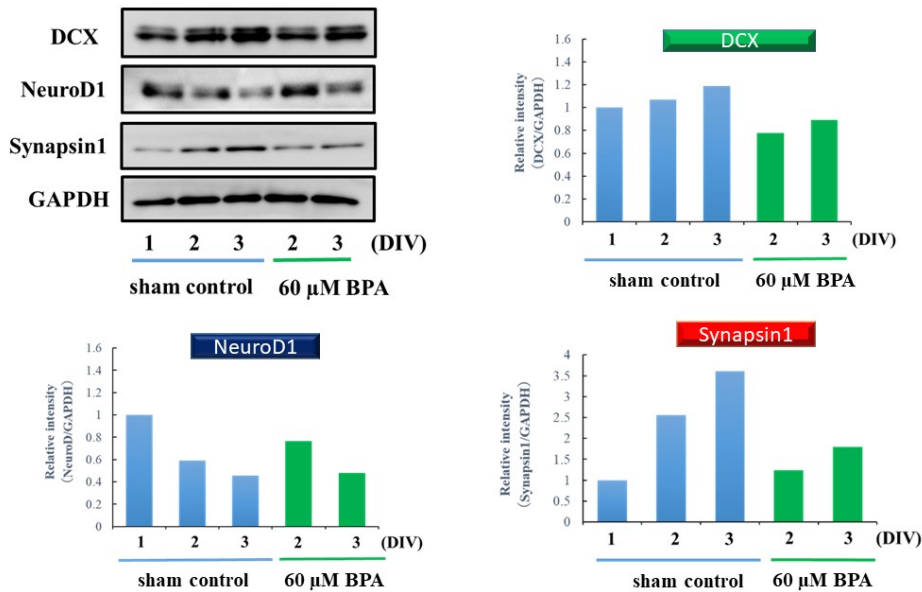
B

図 4B 培養大脳皮質神経細胞における BPA 添加 24 時間と 48 時間後の分化マーカータンパク質の発現変動

からの分化とした解析を行った。その結果、PC12 細胞を用いた実験では、BPA を添加した細胞群では、未成熟ニューロンのマーカーが添加 24 時間後と 48 時間後で有意に発現上昇していた。一方、成熟ニューロンのマーカーは、ほぼ変化がない（有意な変化がない）状況であった（図 4A）。一方、培養大脳皮質神経細胞（E17）を用いた実験では、BPA 添加 24 時間後と 48 時間後共に、神経前駆細胞マーカーの発現は上昇していた。未成熟ニューロンマーカーの発現は、control と比較して減少傾向であった。また、成熟ニューロンのマーカーの発現は、抑制されていた（図 4B）。

以上から、BPA は、神経細胞への分化を誘導するが、その後の発生過程は途中で終了し、未分化な神経細胞のまま維持する作用を有していることが明らかになった。

3.3 淀川と琵琶湖に含まれる BPA

3.3.1 BPA 含量の経年変化

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、昨年の研究結果からも河川や湖水に溶存していることが分かった。しかし、その溶存量が単年度の計測データでは不十分であると考えられるため、今年度も昨年度と同じ場所（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 29 年 4 月から 8 月にかけて約 $0.01 \mu\text{g}/\text{l}$ 以内で推移していた値が、同年 9 月から 10 月にかけて約 1/2 倍の $0.005 \mu\text{g}/\text{l}$ 程度に低下していることが明らかになった（図 5）。この濃度では、培養で神経細胞に影響を与えた濃度には達しない。約 1/1000 の濃度である。また、この事実は、降雨などによる水量の変化（事実、上昇していた）や河川に生育している植物が吸収することにより上昇を抑えている可能性があるが、現在の所は不明のままである。従って、完全なデータを得るためには、河川流域に生息している植物の葉や茎などに含まれる BPA の含有量も測定

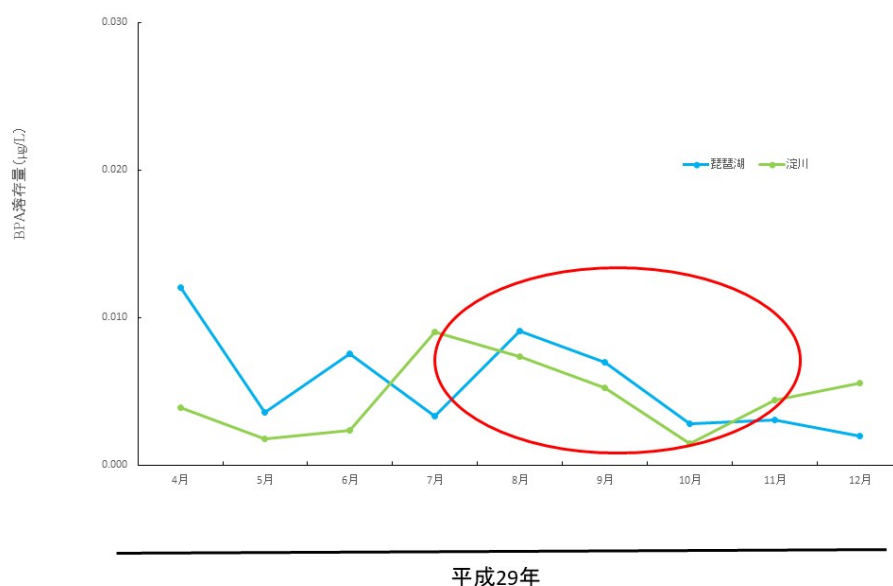


図5 淀川と琵琶湖（瀬田川）におけるBPA溶存量の年内変動

し、BPAが人類に影響を及ぼさない濃度に保っているのかどうかを検証する必要がある。護岸工事は、降雨時に急激な河川の水量変化を引き起こすだけでなく、河川に含まれる化学物質をも溶存させたまま保たせることも考えられる。この仕組みがあるとなれば、我々が口にしている野菜や米などにBPAが吸収している可能性があり、危険性を調査する必要がある。ビオトープなどからBPAの溶存量が測定できるならば、自然の摂理の中で人工化学物質が上手く人間の社会の中で悪影響を避ける仕組み（或いは、野菜や米などの植物に取り込まれる事実）を作り出していることが見いだせると考えられる。