

### 3. 小脳初代培養細胞を用いた環境化学物質による Purkinje細胞の樹状突起の形態変化

---

#### 方法

生後1日のWister ratから小脳を分離,  
初代培養を開始

培養17日目に免疫反応

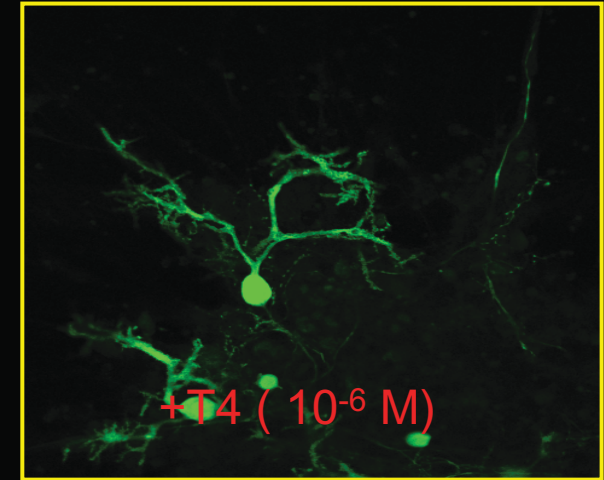
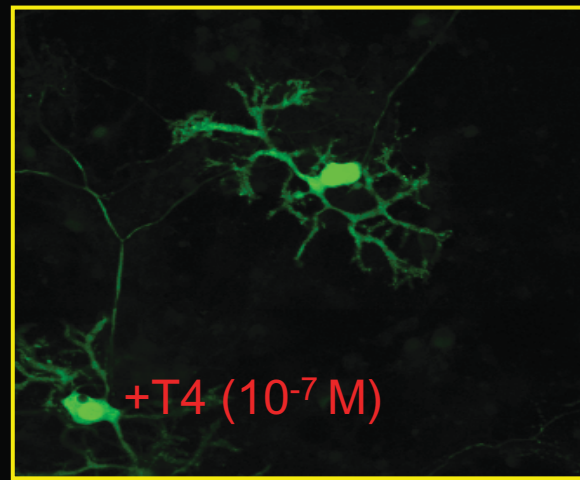
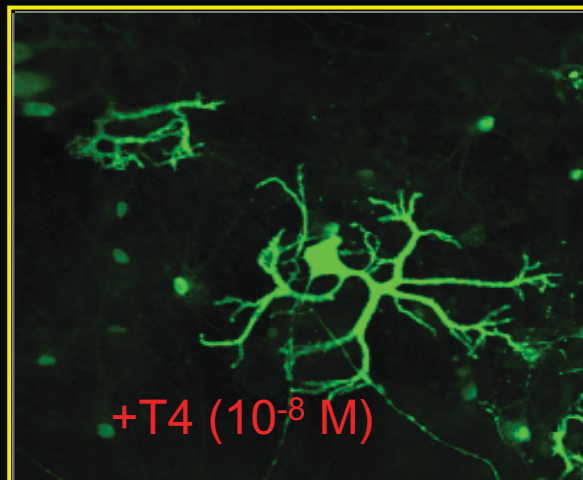
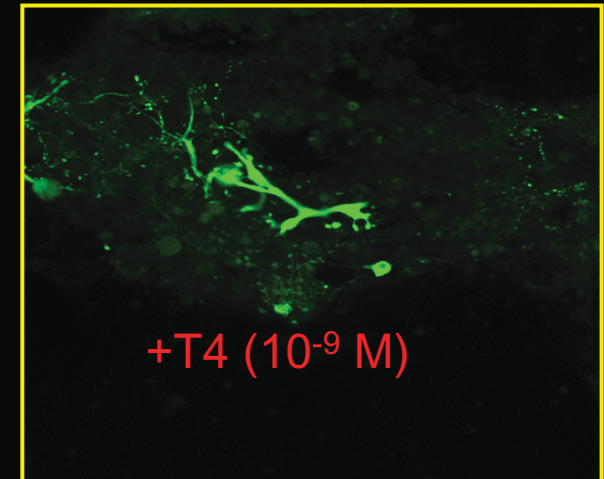
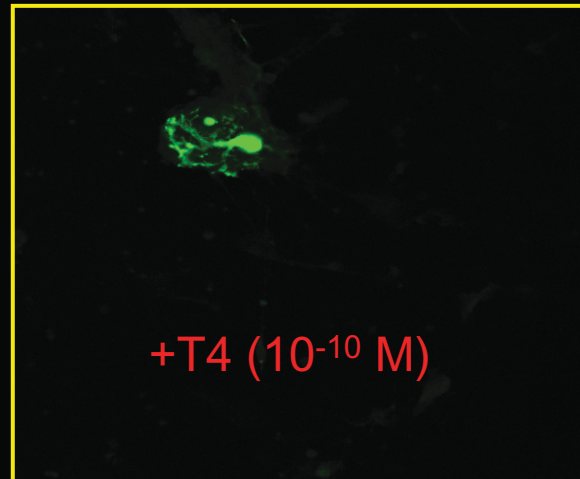
一次抗体: 抗carbodin抗体 (Purkinje細胞に特異的)

二次抗体: FITC融合-抗mouseIgG抗体

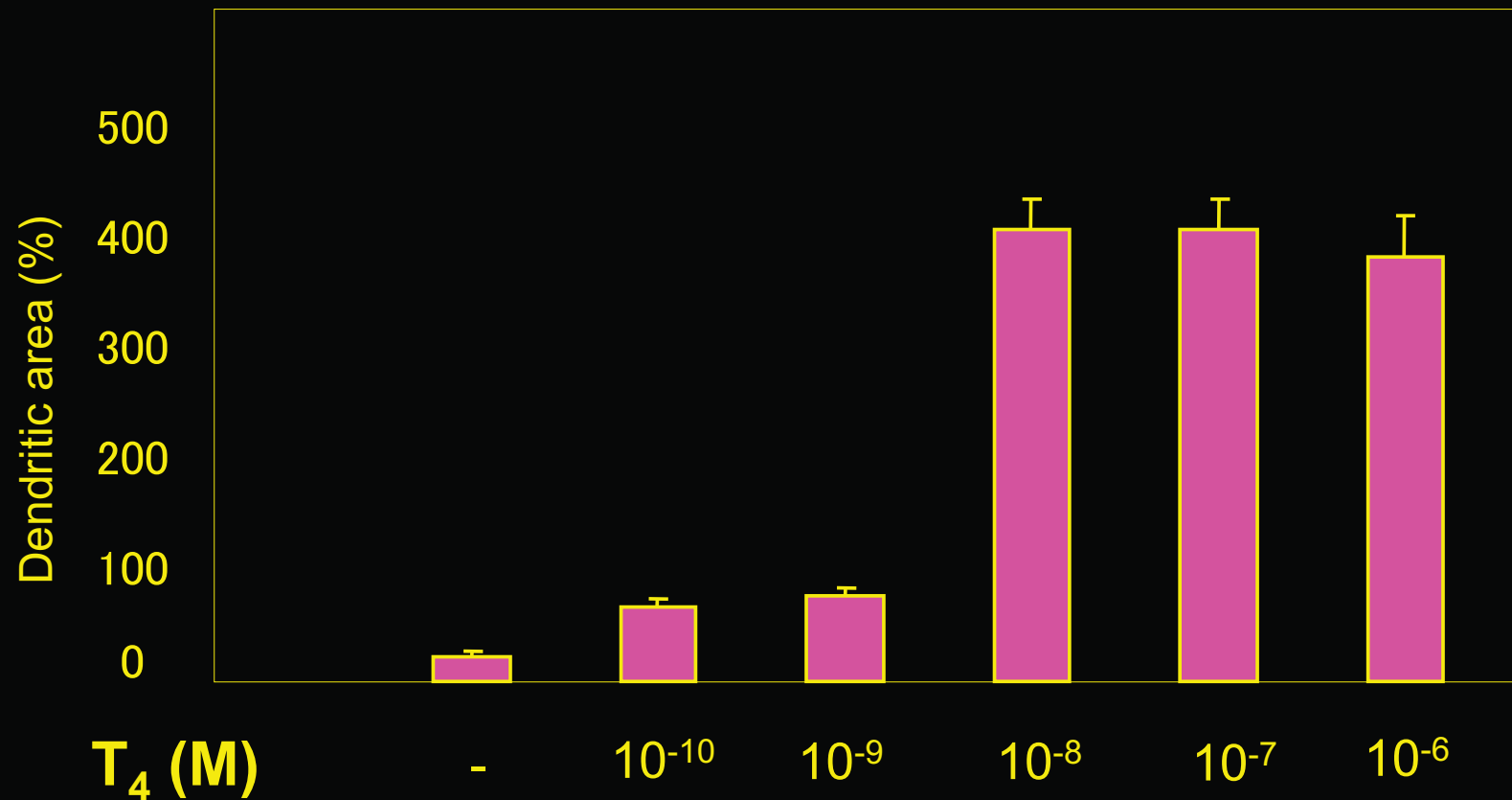
レーザー共焦点顕微鏡で観察 (n=10)  
解析ソフトで定量化

### 3. 小脳初代培養細胞を用いたPurkinje細胞の樹状突起の形態変化: ラット初代培養系の樹立

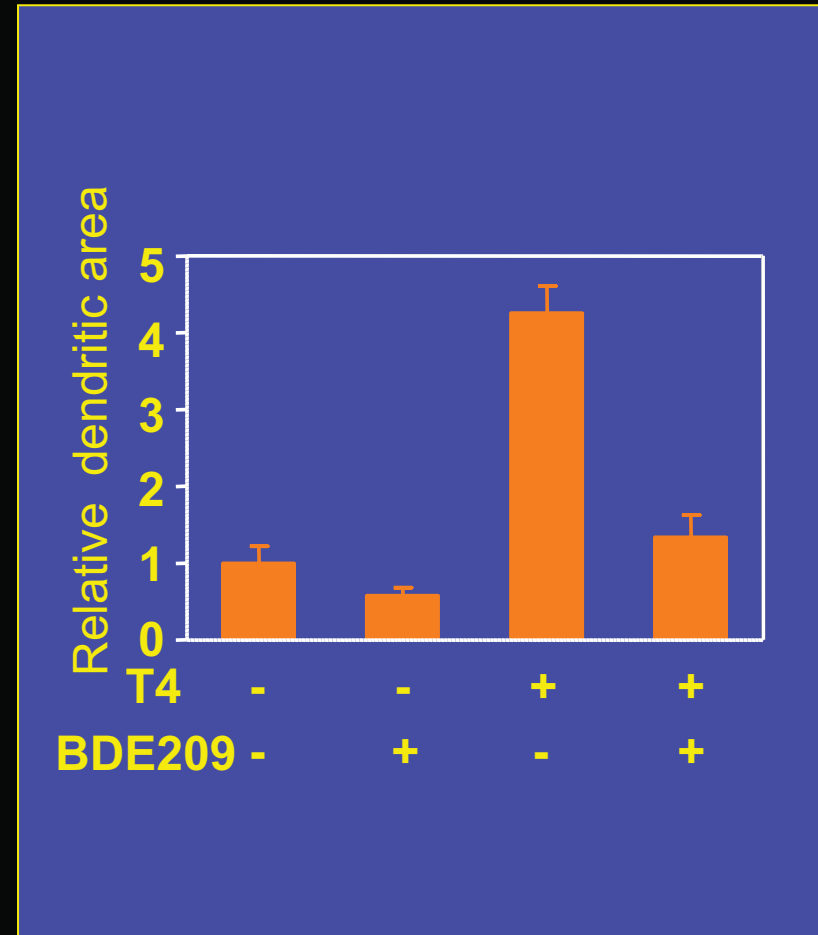
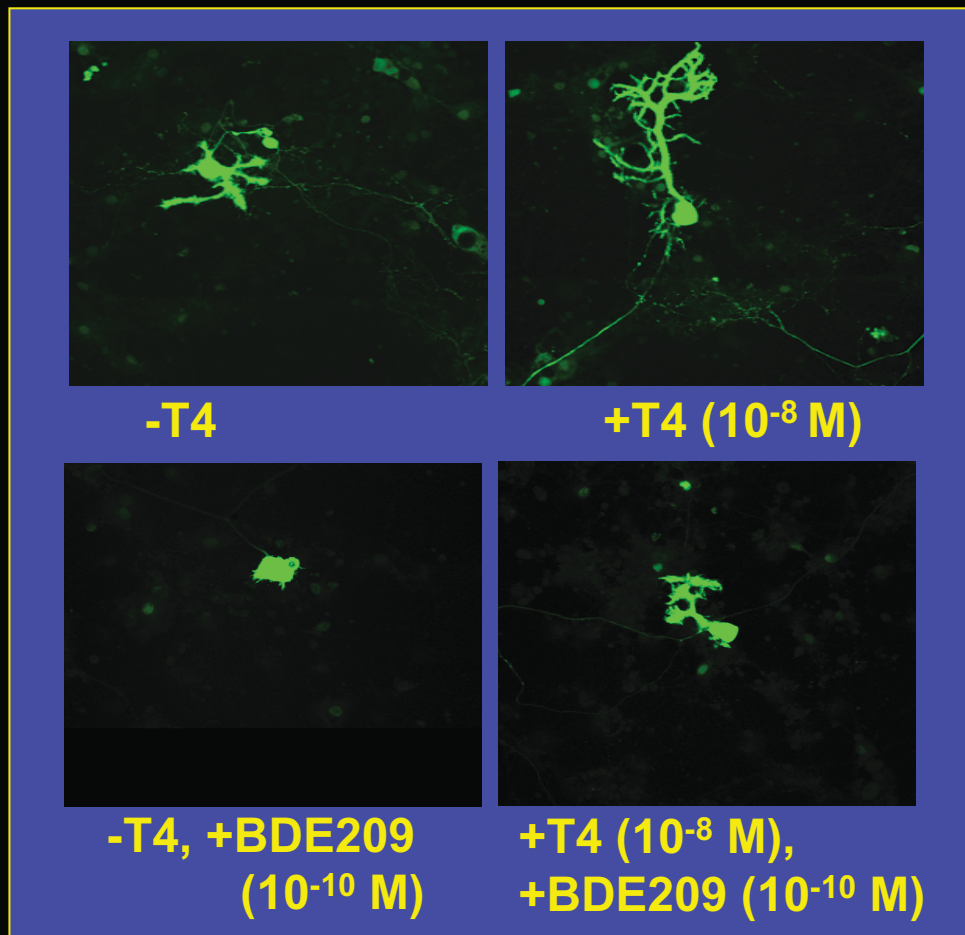
---



### 3. 小脳初代培養細胞を用いたPurkinje細胞の樹状突起の形態変化: ラット初代培養系の樹立



### 3. 小脳初代培養細胞を用いたPurkinje細胞の樹状突起の形態変化: BDE209の作用



# Purkinje細胞への環境化学物質の影響から 明らかとなってきたこと

---

1. Purkinje細胞の形態解析の結果から「Purkinje細胞に対する直接の内分泌かく乱作用」の解析のみでは環境化学物質の正常脳発達に対する影響を説明することが困難であることが分かってきた。
2. そこで、環境化学物質の正常脳発達に対する影響を解析するため、
  - (1) 小脳初代培養顆粒細胞を用いた解析系を樹立した。
  - (2) 細胞内Ca<sup>2+</sup>の変動をリアルタイムで解析した。

## 4. 小脳初代培養細胞を用いた環境化学物質による 顆粒細胞の形態変化

---

### (1) 方法

生後7日のWister ratから小脳顆粒細胞を  
分離，初代培養を開始

培養2日目に凝集細胞塊を別のシャーレ  
に移す＝顆粒細胞塊の単離

光学顕微鏡で観察  
解析ソフトで定量化

#### 4. 小脳初代培養顆粒細胞の形態変化 T3によるneuriteの伸長反応

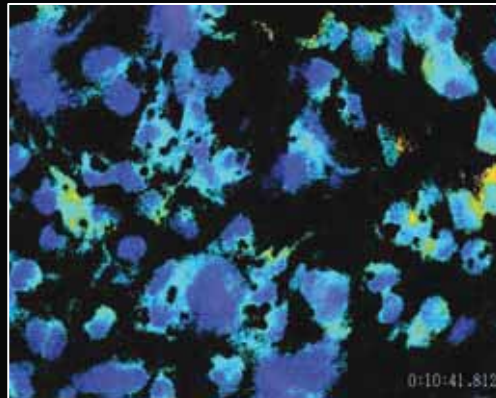


# 5- 小脳初代培養細胞を用いたCa<sup>2+</sup>動態変化 – 方法

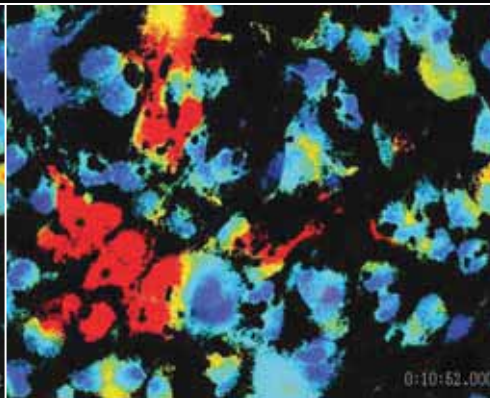


Cortex Primary culture

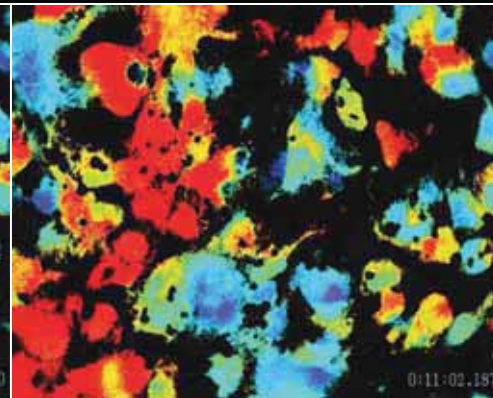
Ca<sup>2+</sup> imaging: Fura2-AM



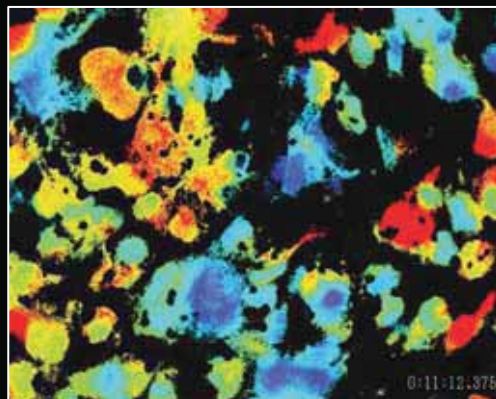
BASE LINE



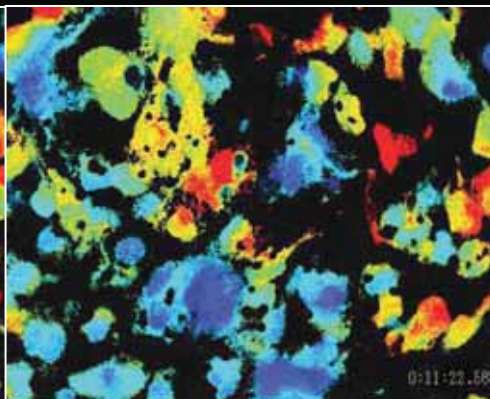
OH-PCB 106 0.1 μM



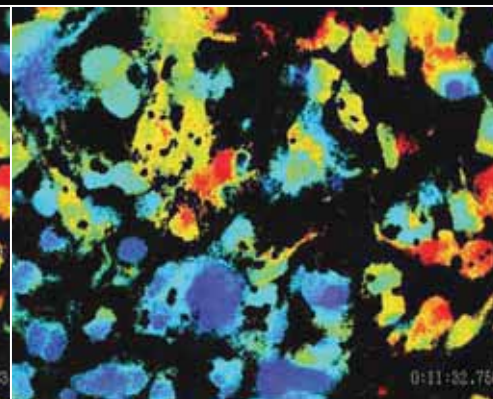
10 sec.



20 sec.



30 sec.

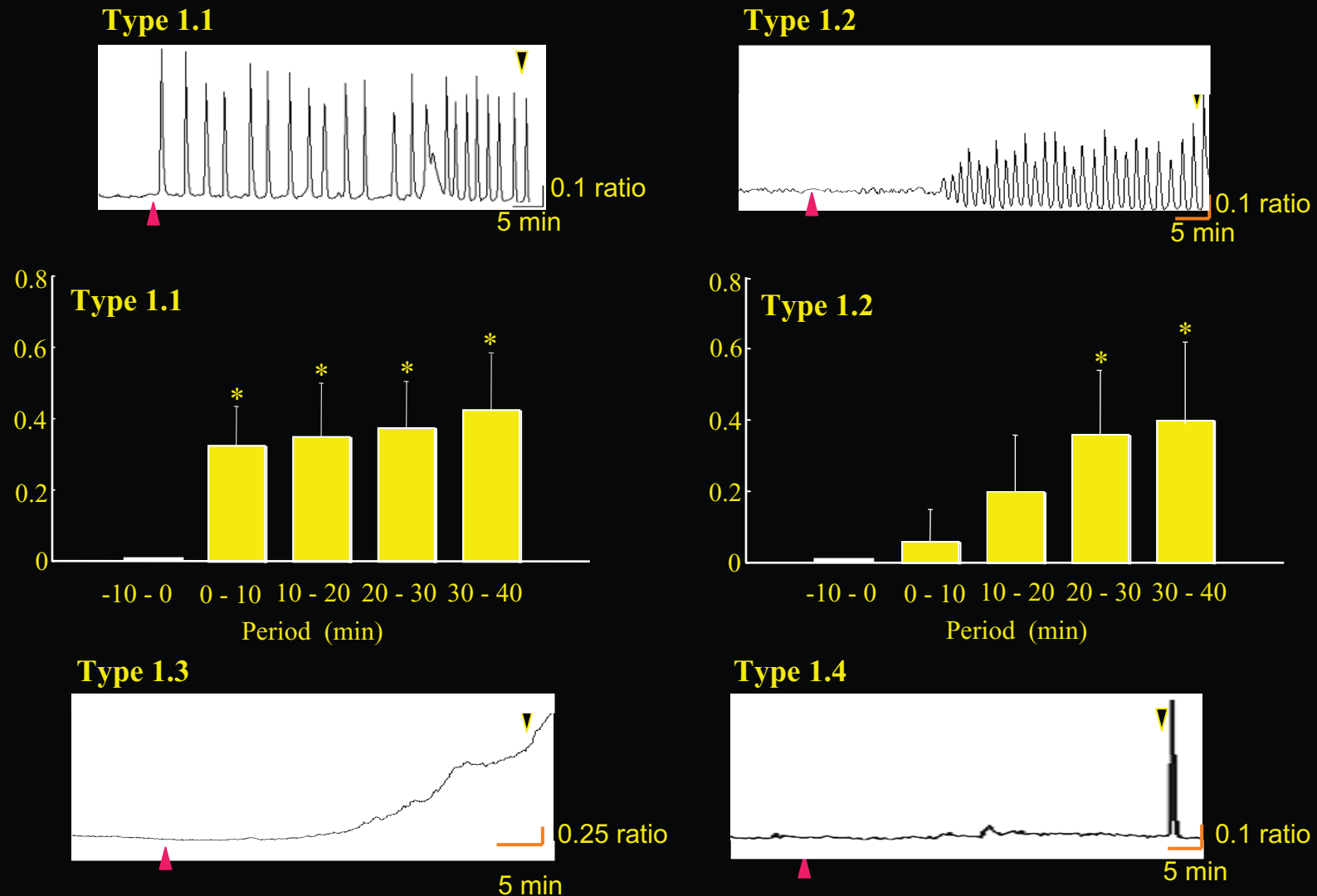


40 sec.



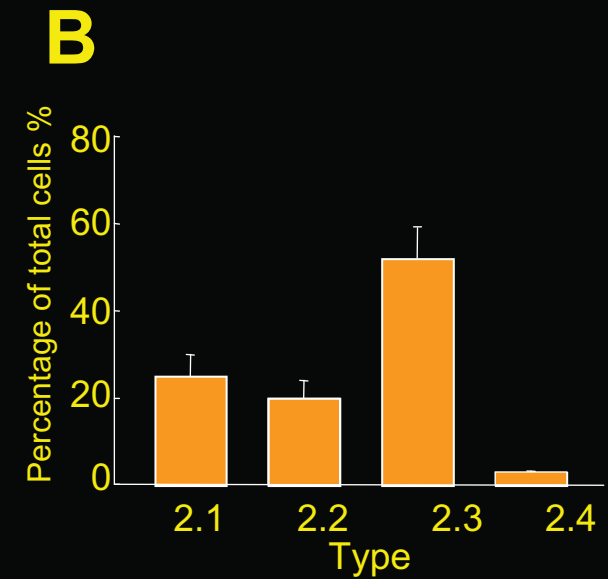
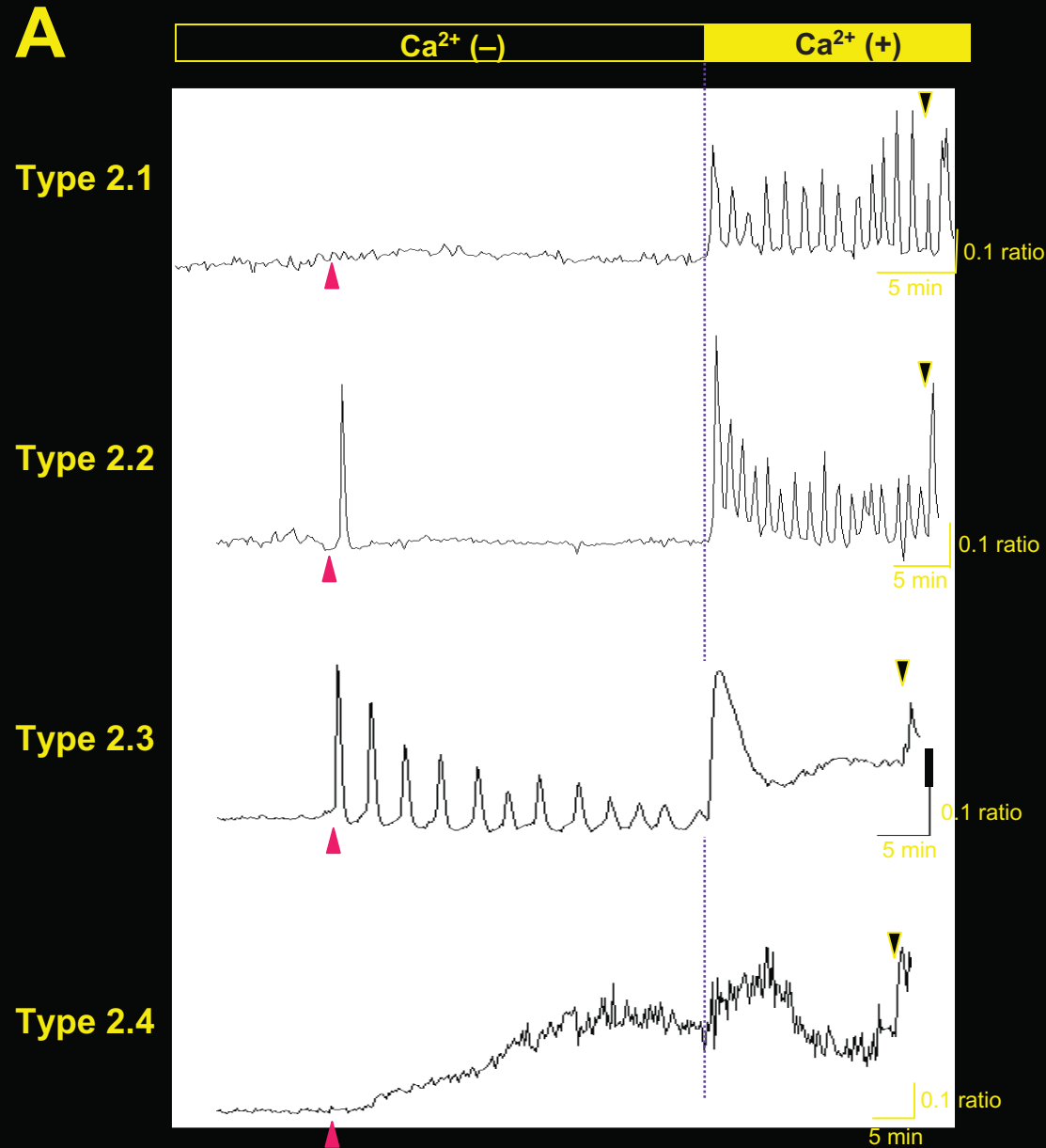
## 5. 小脳初代培養細胞を用いたCa<sup>2+</sup>動態変化

# OH-PCB106による細胞内Ca<sup>2+</sup>の変化



*Londono et al., J Appl Toxicol. 2010*

# 5. OH-PCB106によるCa<sup>2+</sup>動態における細胞外Ca<sup>2+</sup>の影響



*Londono M. et al.,  
J Appl Toxicol. 2010*

## まとめ

	<u>転写</u>	<u>Purkinje</u>	<u>顆粒細胞</u>	<u>Ca<sup>2+</sup></u>
<u>OH-PCB</u>	抑制	抑制	実施予定	多様
<u>PBDE</u>	抑制	抑制	抑制	実施予定
<u>HBCD</u>	抑制	抑制	実施予定	実施予定
<u>4-NP</u>	促進	促進	実施予定	実施予定

## ExTEND 2005 結 語

環境化学物質はTRを介する転写に対する影響以外に神経細胞の形態や脳細胞におけるCa<sup>2+</sup>動態をはじめとした複数の系に影響を及ぼす.

このため脳発達に対する影響を解析するには甲状腺ホルモンシグナリングを中心に形態変化, 行動解析を含む総合的な解析が必要である.

# 今後の計画

---

実験の中心を、レポーターアッセイやインビトロアッセイから、細胞機能への影響の解析や動物実験に移行させる。

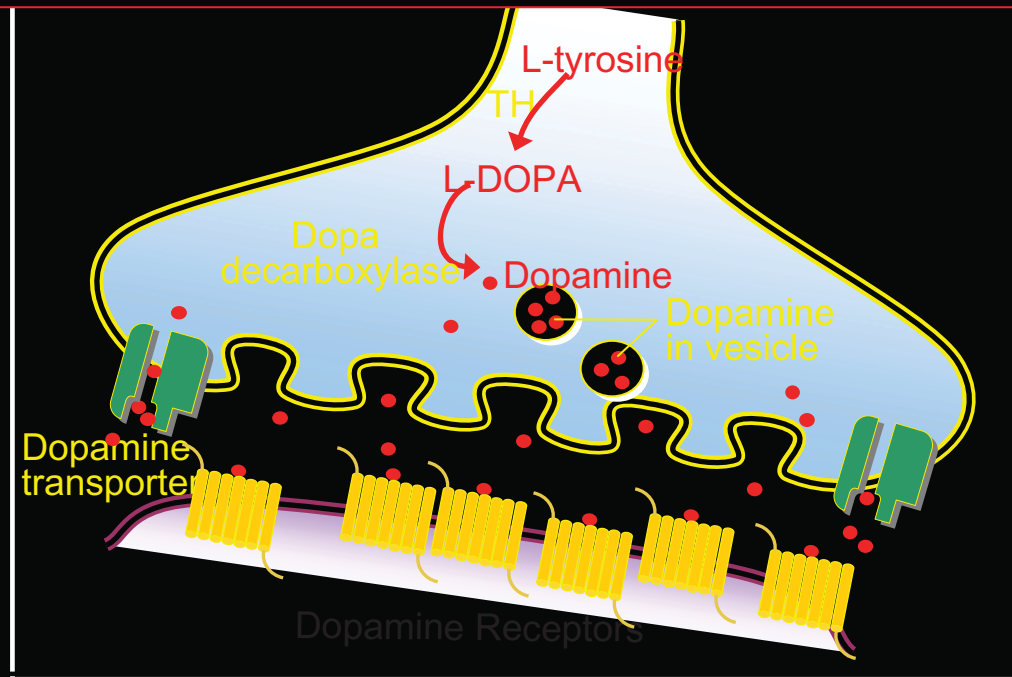
- (I) 一般に、甲状腺ホルモン低下状態では多動を示す。
- (II) 近年、我々はCIN85 KOマウスの解析からドーパミンが多動に関与することを見出した。

1) GFP標識タンパクを用いた培養細胞内の受容体や共役因子の動態に及ぼす環境化学物質の影響のリアルタイムの解析、およびプルキンエ細胞にGFPを発現するトランスジェニックマウスを用いて、2光子共焦点レーザー顕微鏡で*in vivo*でプルキンエ細胞の形態を解析するシステムを立ち上げる。

2) 先天性甲状腺機能低下症ラット/マウスの生理的特性の解析と、甲状腺機能を様々に変化させた際の環境化学物質の影響の解析

### 3) 注意欠陥多動性障害(ADHD)発症に関わる内分泌系因子の同定とかく乱物質の影響に関する研究

研究の中心：ドーパミンを介するシグナル伝達系



鯉淵 典之 (こいぶちのりゆき)  
群馬大学 大学院医学系研究科 応用生理学分野

# 研究の背景、目的と成果

## 環境化学物質の内分泌かく乱作用

### 多動症 モデル動物

### 多動症の病態と発症機序の解明

#### 研究の目的

1. 新規多動症モデルマウスと多動性を示す甲状腺機能低下症ラットを用いてADHDの発症や病態における内分泌系の関与と環境化学物質の影響を解析すること。
2. 環境化学物質の神経毒性に対する作用点と作用機序を明らかにすること。

#### 期待される成果

1. ADHDを始めとする多動症発症機序の理解の深化。
2. 環境化学物質による神経毒性機序の詳細。
3. 内分泌かく乱化学物質の環境基準の見直しの基礎資料。

22.6.19 読売30

**ADHD「新原因メカニズム発見**

群馬大・下川准教授ら

落ち着きがなく、教室を走り回るなどの行動をとる子供にみられる「注意欠陥・多動性障害（ADHD）」の原因について、群馬大の下川哲昭准教授らの研究チームが新たなメカニズムを発見した。15日、生命科学分野で権威のある「欧州分子生物学機構学術誌」の電子版に掲載された。

下川准教授らは、ドイツのチームと共同で2000年から研

究を開始。細胞膜の表面で情報を仲介するたんぱく質「受容体」の作用が過剰になり、多動症が起ることを解明した。

動物が行動を止めるには、細胞内の「CIN85」というたんぱく質が受容体を取り込んで壊すという過程を経る。下川准教授らが「CIN85」を持たないマウスを作製したところ、正常なマウスより総移動量や平均速度などが上がっていることが分

かった。

さらに、行動量などを調節する神経伝達物質「ドーパミン」の分泌量と受容体との結合量を測定。正常なマウスより分泌量が多く、受容体が壊れずに残り、行動を促す情報を細胞に与え続けていることが発見した。

下川准教授は「将来的には人にも応用し、ADHDの診断基準として『CIN85』を調べたマウスを作製したところ、正常なマウスより総移動量や平均速度などが上がっていることが分