

厚生科学研究費補助金（生活安全総合事業）

分担研究報告書

胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響

分担研究者 堤 雅弘 奈良県立医科大学附属がんセンター 腫瘍病理 講師

研究要旨

妊娠および授乳期に bisphenol A を投与した雌ラットより生まれた仔ラットの発癌感受性について、肺および甲状腺を標的として検索を行っている。

A. 研究目的

内分泌攪乱化学物質が世代をこえて悪影響を及ぼすか否かを検索することは、これらの化学物質の安全性を評価するために重要である。本研究の目的は環境中に多く存在し、暴露される機会の多い bisphenol A の安全性を評価するため、暴露を受けた親より生まれた仔における、発癌などの晩発性障害について検索し、内分泌攪乱化学物質の安全性評価のための基礎的情報を得ることにある。

B. 研究方法

Wistar 系雌ラットに 1%の bisphenol A(BA)を基礎飼料および大豆を除いた高カロリー飼料(特殊飼料)に混じり 5 週齢より投与を開始し、妊娠、出産、授乳期間を通して投与した。授乳終了後、母ラットを剖検し、子宮における着床痕の観察、主要臓器の検索を行なった。仔ラットは基礎飼料にて飼育し、性成熟の指標として、雌の膈開口時期、雄の包皮の状態を観察した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、奈良医大動物実験施設の規定に準拠し、倫理面に配慮して行った。

C. 研究結果

動物の体重は、基礎食および特殊飼料に 1%BA を混じり投与した群において、それぞれの対照群と比較して体重増加の抑制がみられた。出生数は 1%BA 特殊飼料群で他の群と比較して有意に少なかった。仔ラットの体重は雌雄とも 1%BA 特殊飼料投与群が最も体重が重く、1%BA 基礎食投与群が最も軽かった。膈開口時期は、特殊飼料投与群において 1%BA 投与群より早い傾向がみられ、包皮の開裂時期は、1%BA 特殊飼料投与群で 1%BA 投与群より早い傾向があった。

D. 考察

1%BA 含有食はラットの体重抑制をきたし、出生数の減少をきたした。また、その影響は特殊飼料投与群でより顕著であった。生まれてきた仔ラットの成長に対して、1%BA 含有食が体重増加を抑制することはなかった。膈の開口時期と包皮の開裂時期を指標とした性成熟の時期の検索においては、BA の作用は不明瞭で、栄養状態など他の要因の影響が大きいと思われた。

E. 結論

Wistar 系雌ラットに 1%の bisphenol A(BA)を基礎飼料または大豆を除いた高カロリー飼料

に混じり5週齢より投与を開始し、妊娠、出産、授乳期間を通して投与した。1%BA 添加飼料投与群で母ラットの体重増加の抑制がみられたが、生まれた仔ラットの成長や性成熟に対する明らかな影響はみだされなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

無

2. 学会発表

無

Bisphenol A の行動影響に関する研究

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授

研究協力者 成田 年 星薬科大学薬品毒性学教室講師

矢島義識 星薬科大学薬品毒性学教室助手

研究要旨：近年、内分泌かく乱化学物質の生体に対する影響が深刻な社会問題となっている。そこで本研究では、内分泌かく乱化学物質の1つである bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウスから生まれたマウスにおける行動影響を検討した。実験には ddY 系マウスを用い、bisphenol A をそれぞれ 2 µg/g of food, 0.5, 2, 8 mg/g of food の濃度に混入した飼料で妊娠期および授乳期に処置した親から生まれたマウスを離乳後4週間以上普通飼料で飼育して使用した。Bisphenol A 処置マウスは用量依存的に異常行動を示し、比較的高用量では新規環境における自発運動量、methamphetamine 誘発自発運動促進作用およびその逆耐性形成を有意に増強した。さらに、methamphetamine の精神依存は bisphenol A の用量に依存して増強された。また、疼痛閾値は warm-plate 法で用量依存的に減少し、morphine 誘発鎮痛効果も有意な減少を示した。一方、bisphenol A 処置マウスは抗葛藤作用を示したが、学習・記憶や運動協調性には著明な変化を示さなかった。また、bisphenol A 処置マウスは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用を示した。妊娠期および授乳期に bisphenol A を処置されたマウスが示した異常行動、新規環境への適応性の低下、methamphetamine 誘発自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存形成の増強、reserpine 誘発体温低下作用における抗 reserpine 作用などは主に dopamine 神経系の変化に由来するものと考えられる。すなわち、bisphenol A の妊娠期および授乳期投与により、dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化が引き起こされてこのような行動変化が発現した可能性が高いと推察される。さらに、bisphenol A 処置マウスにおいて疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛作用の減弱が観察されたことから、opioid 神経系の発達にも不可逆的な変化が引き起こされている可能性が考えられる。

A. 研究目的

内分泌系は神経系および免疫系と並び、生体の恒常性を保つために重要な制御機構を司っている。内分泌系においては甲状腺や卵巣・精巣、また、それらを調節する下垂体や視床下部から産生されるホルモンが伝達物質として重要な役割を担っている。さらに、これらのホルモンは、神経系や免疫系にも作用し、これら3つの系が密接な相互関係を有していることが知られている。

近年、環境中に存在するいくつかの化学物質がホルモンに類似した作用を有することが明らかにされている。このようなホルモン様作用を示す物質は、内分泌かく乱化学物質 (endocrine disruptors) と呼ばれ、世界各地で因果関係の疑われる野生動物の生態異常が報告

されている。1980年代、米国フロリダ州のアポプカ湖において、有機塩素系農薬である 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis-(monochlorophenyl) ethane (DDT) やその代謝物である 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (p-chlorophenyl) ethylene (DDE) に曝露されたワニの雄で明らかな生殖器官の萎縮が認められた。我が国においても、海岸などに生息するイボニシの雌が雄性化したため、絶滅の危機にさらされていることが報告されている。また、ヒトにおいても1960～1970年代に流産防止などの目的のために使用された合成 estrogen である diethylstilbestrol (DES) が、女性の生殖器に遅発性のがんを発生させることが報告されている。

動物実験においても胎児期に polychlorinated biphenyl (PCB) に曝露されたサルにおいて、

月経異常の増加および受胎率の減少が認められることが報告されている。また、dioxin の一種である 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) においても、赤毛ザルにおいて子宮内膜症の発生率の増加が認められている。一方、ラットにおいて、PCB の慢性処置により自発運動の低下および脳内 dopamine level が低下することや、胎児期の曝露により記憶・学習障害が起きることが報告されている。また、サルにおいても PCB や TCDD に曝露により記憶・学習障害が発生することが報告されている。これらのことから内分泌かく乱化学物質は、生殖器系だけでなく中枢神経系にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。

Bisphenol A は phenol と acetone から合成され、主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料として食品容器や缶詰の被膜などに使用されている。この bisphenol A は binding 実験により弱いながらも estrogen 受容体に親和性を示し、17 β -estradiol の約 15000 分の 1 程度の弱い estrogen 作用を示すことが報告されている。また、環境中に存在するような低濃度の bisphenol A に曝露されたマウスにおいても、その仔の性的成長に影響を与えることが報告されている。しかし、bisphenol A についての検討は少なく、特に中枢神経系に対する影響についての検討はいまだほとんど行われていない。

そこで、本研究ではマウスの妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により投与し、次世代のマウスに及ぼす行動影響を行動薬理学的に検討した。

B. 研究方法

【使用動物および飼育条件】実験には ddY 系雄性マウス(東京実験動物)に2日間 bisphenol A を混餌により (2 μ g/g of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food) 処置し、この雄性マウスと雌性マウス(東京実験動物)を交配してその妊娠期および授乳期にそれぞれの濃度の bisphenol A 混入飼料を処置した。離乳後4週間以上普通

飼料で飼育し、実験に使用した。マウスはプラスチック製ケージにて飼育し、室温 23 \pm 1 $^{\circ}$ C の恒温室にて、8:00 a.m. 点燈、8:00 p.m. 消燈の 12 時間サイクルの明暗条件下で飼育した。なお摂餌(固形飼料 MF:オリエンタル酵母工業)および飲水(水道水)は自由とした。

【使用薬物】実験には bisphenol (和光純薬工業)、methamphetamine hydrochloride (大日本製薬)、morphine hydrochloride (三共)、diazepam (セルシン; 武田薬品工業) および reserpine (アポプロン; 第一製薬) を使用した。Methamphetamine hydrochloride および morphine hydrochloride は原末を生理食塩液(大塚製薬)に溶解し、マウスの体重 10 g あたり 0.1 ml の割合で背部皮下 (s.c.) に投与した。Diazepam および reserpine は生理食塩液で希釈し、それぞれ腹腔内および皮下に投与した。なお、用量はすべて塩として表記した。

1. 一般行動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスの一般行動観察を行い、無処置マウスと比較した。

2. 自発運動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスの自発運動量を3時間に渡り測定した。自発運動量は tilting cage 法に従って測定した。Tilting cage 法とはマウスをバケツ型ケージに1匹づつ入れ、マウスの移所行動に伴うケージの傾きをマイクロスイッチで感知し、このカウント数を運動量とした。また、methamphetamine 2mg/kg を bisphenol A 処置群および無処置群に皮下投与し、3時間に渡り自発運動量を同様に測定した。さらに、この操作を1週間に1回ずつ、計4回繰り返し、methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性の形成を検討した。

3. Methamphetamine の精神依存

精神依存は条件づけ場所嗜好性試験により測定した。白と黒の 2-コンパートメントボックスを用い、methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.) 投与後一方のボックスに、また翌日には生理食塩液を投与し他方のボックスに 1 時間閉じ込め、これを計 2 回 (4 日間) 繰り返して条件づけを行った。5 日目には薬物も生理食塩液も投与せずに、白と黒の 2-コンパートメントボックスの中央に設置したプラットホーム上にマウスを乗せ、マウスが床面に降りてからの白および黒ボックスへの滞在時間を 15 分間測定した。薬物で条件づけしたボックスへの滞在時間より生理食塩液で条件づけしたボックスへの滞在時間を引いた値がプラスであれば報酬効果、マイナスであれば嫌悪効果として評価した。このような方法で妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果を比較検討した。

4. 疼痛閾値に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける疼痛閾値は tail-flick 法および warm-plate (51.5°C) 法を用い、それぞれマウスが反性疼痛反応を示すまでの時間 (潜時) により評価した。また、morphine 5 および 10 mg/kg をそれぞれ皮下投与し、その 30 分後に morphine による潜時の延長を測定し、morphine 誘発鎮痛効果を比較検討した。

5. 葛藤に及ぼす影響

抗葛藤 (コンフリクト) 作用の測定には 18 × 12 × 10 cm の vogel 型コンフリクト装置 (小原医科産業) を使用した。電気刺激はマウスが drinking tube を 20 回なめるごとに 1 回与えるように設定した。電流は 0.35 mA、通電時間は 200 msec とした。マウスをホームケージで 3 日間飼育した後 24 時間絶水し、装置内にマウスを入れて電気刺激を与えずに

10 分間自由に水を飲ませた。その後 3 日間自由摂餌条件で飼育し、再度 24 時間絶水させたマウスを装置内に入れ、電気刺激を与える条件で 10 分間テストを行ない、マウスが受けた電気刺激の回数を測定した。このような方法に従い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける情動性を比較検討した。

6. 学習・記憶に及ぼす影響

学習・記憶実験には step down 法を用いた。前面が透明なボックス (9 × 15 × 35 cm) の床面をステンレス製グリッドにして通電 (0.4 mA) させ、ゴム栓 (4.5 × 4.5 cm) を置きその上にマウスを乗せる。床に降りると感電するのでゴム栓上に留まることを試験前日に 10 分間学習させ、その後 3 分間マウスをゴム栓上に乗せ、床に降りたそれぞれのマウスを記録し、失敗したマウスの匹数と時間の関係を測定した。このような方法を用い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスにおける学習・記憶について検討した。

7. 運動協調性に及ぼす影響

運動協調性は rota-rod 法により評価した。妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスをそれぞれ回転棒上 (1 分間に 5 回転) に 3 分間以上乗れるようになるまでの試行回数を最大 7 回まで測定した。翌日、回転数を 1 分間に 10 回に速めて同様の測定を行った。後日、diazepam 5 mg/kg を腹腔内投与し、30、60、120 および 180 分後に何秒間回転棒上に乗っているかを 3 分間測定した。

8. 体温に及ぼす影響

サーミスター (芝浦電子) を用い、妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび無処置マウスの直腸体温を測定した。また、それぞれに reserpine (0.75 mg/kg) を皮下投与し、1、2 および 3 時間後の

直腸体温を同様に測定した。

各試験結果を平均値および標準誤差で示し、統計解析は Student's-t test あるいは Mann-Whitney の U 検定で評価した。なお、有意水準は $p<0.05$ および $p<0.01$ とした。

【倫理面への配慮】これらの実験手法は本学動物委員会（倫理規定）で審査を受け、倫理的に問題がないと判断されているが、その他についても倫理面への十分な配慮を行い、実験を行った。

C. 研究結果

1. 一般行動に及ぼす影響

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に投与されたマウスは無処置マウスでは観察されない、head movement, sniffing, aggression, Straub tail, circling および spinning syndrome などの異常行動は bisphenol A の用量に依存して観察された。

2. 自発運動に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A の 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 0.5 mg/g of food を混餌により処置されたマウスは無処置マウスの新規環境における自発運動量と比較し有意な変化は認められなかったが、bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスは自発運動量の有意な増加を示した。また、methamphetamine 2 mg/kg 誘発自発運動促進作用も同様に、bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスにおいて有意な増加が認められた。さらに、methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性の形成を bisphenol A 2 mg/g of food 処置マウスにおいて検討したところ、対照群に比較して有意に強度な逆耐性の形成が観察された。

3. Methamphetamine の精神依存

Methamphetamine 0.5 mg/kg は普通飼料で飼育したマウスでは生理食塩液群と同様に有意な報酬効果も嫌悪効果も示さなかったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of

food、0.5 および 2 mg/g of food で処置したマウスでは用量依存的で有意な methamphetamine 誘発報酬効果を示した。

4. 疼痛閾値に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food、0.5、2 および 8 mg/g of food で処置したマウスの疼痛閾値は無処置マウスに比較して tail-flick 法で有意な変化は認められなかったが、warm-plate 法では用量依存的に減少し、bisphenol A 2 および 8 mg/g of food で有意な減少を示した。一方、tail-flick 法を用いた morphine 5 および 10 mg/kg による鎮痛作用は普通飼料で飼育したマウスではそれぞれ約 38% および 88% であったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 2 mg/g of food で処置したマウスでは morphine 誘発鎮痛効果が bisphenol A の処置濃度に依存して減少し、morphine 10 mg/kg 誘発鎮痛効果では有意な減少を示した。また、warm-plate 法を用いた morphine 5 および 10 mg/kg による鎮痛効果は普通飼料で飼育したマウスではそれぞれ約 40% および 76% であったが、妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food および 2 mg/g of food で処置したマウスでは morphine 誘発鎮痛効果が bisphenol A の処置濃度に依存して減少し、bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food 処置では morphine 10 mg/kg、また bisphenol A 2 mg/g of food 処置群では morphine 5 および 10 mg/kg 誘発鎮痛効果において有意な減少を示した。

5. 葛藤に及ぼす影響

葛藤（コンフリクト）試験において妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food、0.5 および 2 mg/g of food で処置されたマウスは対照群に比較し、飲水時にショックを受けた回数が増加した。しかし、bisphenol A 8 mg/g of food 処置群においては有意な変化が認められなかった。

6. 学習・記憶に及ぼす影響

Step down 法による学習習得過程では妊娠

期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間に有意な差は認められなかった。一方、記憶保持能試験では bisphenol A 8 mg/g of food 処置群において有意な減弱が認められた。

7. 運動協調性に及ぼす影響

回転棒試験において妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間に有意な差は認められなかった。また、diazepam 5 mg/kg 誘発運動協調性障害を妊娠期および授乳期に bisphenol A 2 $\mu\text{g/g}$ of food, 0.5, 2 および 8 mg/g of food で処置されたマウスと無処置マウス間で比較したが一貫した結果は得られなかった。

8. 体温に及ぼす影響

妊娠期および授乳期に bisphenol A 0.5 および 8 mg/g of food で処置された群の雄性マウスは対照群に比べ有意な体温低下を示したが、用量依存性は認められなかった。また、reserpine (0.75 mg/kg, s.c.) 投与により明らかな体温低下作用が認められたが、妊娠期および授乳期に bisphenol A で処置されたマウスでは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用が認められた。

D. 考察

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスは一般行動変化として、無処置マウスでは見られない head movement, sniffing, aggression, Straub tail, circling および spinning syndrome などの異常行動を bisphenol A の用量に依存して発現した。これらの異常行動には dopamine 神経系や serotonin 神経系が関与することが知られている。特に、head movement 以外の異常行動には主に dopamine 神経系が関与していることが明らかにされている。したがって、bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスは脳内

dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化を引き起こしている可能性が考えられる。

Bisphenol A を妊娠期および授乳期に慢性的に曝露されたマウスの 180 分間の自発運動量は、無処置群と比較して、bisphenol A の比較的高用量群 (2 mg/g of food) において有意に高い値を示した。また、新規環境への順応性の指標となる測定初期 (約 60 分間) の自発運動量においても同様に有意に高い値を示した。これらのことより、比較的高用量の bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露されたマウスは新規環境への順応性が低下している可能性が示唆された。一方、結果には示さなかったが、bisphenol A 8 mg/g of food 群では自発運動量の有意な減少を示した。しかし、この高用量群では行動観察において rearing, sniffing などの常同行動が多く観察されたことから、おそらく、妊娠期および授乳期における bisphenol A 慢性曝露により dopamine 神経系に何らかの変化が生じた結果、常同行動が増加し、自発運動量が見かけ上低下したのではないかと考えられる。

Methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) 処置により、すべての群において有意な自発運動促進作用が認められた。さらに、bisphenol A の比較的高用量群 (2 mg/g of food) では無処置群と比較して有意に高い自発運動促進作用を示した。自発運動には主に中脳辺縁 dopamine 神経系が関与することが知られており、methamphetamine はこの dopamine 神経終末において dopamine の放出促進および再取り込み阻害作用を示すことが明らかとなっている。近年、estradiol の投与により amphetamine による常同行動の増強が観察され、同時に線条体において dopamine 放出量の増加が起こることが報告されている。また estradiol の投与により、側坐核における dopamine の再取り込みが低下することも報告されている。さらに、ラットにおいて 17β -estradiol を 2 週間慢性処置すると、線条体における pre 側の D_2

受容体の mRNA が減少することが報告されている。Bisphenol A は estrogen 受容体に結合して作用を発現することが知られており、estrogen に類似した作用を発現することにより自発運動量が増加したものと考えられる。また、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、自発運動と深く関与している中脳辺縁 dopamine 神経系の変化、すなわち dopamine 受容体の数や感受性、またドパミントランスポーターの機能的変化などが起こり、methamphetamine の効果が増強した可能性が考えられる。また、amphetamine 誘発自発運動促進作用が AMPA/kainate 受容体拮抗薬である DNQX および δ -opioid 受容体拮抗薬の前処置や、serotonin の側坐核投与により抑制されることが報告されていることから、methamphetamine 誘発自発運動促進作用には glutamate 神経系、serotonin 神経系および opioid 神経系の関与も示唆され、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、これらの神経系が変化している可能性も示唆される。一方、結果には示さなかったが、bisphenol A 8 mg/g of food 群では methamphetamine 誘発自発運動促進作用も無処置群と比較して減少傾向を示した。しかし、この群では methamphetamine 処置により、常同行動の 1 つである circling が観察されたマウスが多く、移所行動が減少し、移動範囲が狭小化したため十分に運動量としてカウントされず自発運動促進作用が見かけ上低下したと考えられる。

Methamphetamine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成について検討を行った結果、methamphetamine の投与回数に伴い、すべての群において有意な自発運動量の増加が認められ、methamphetamine 反復投与による逆耐性の形成が確認された。また、この逆耐性形成は bisphenol A 2 および 8 mg/g of food 群において増強傾向を示した。これらの変化も bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、自発運動と深く関与している中脳辺縁

dopamine 神経系に不可逆的な変化が起きたことに起因しているものと考えられる。

Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、無処置群では報酬効果を示さない用量の methamphetamine で著明な報酬効果が発現し、bisphenol A の処置濃度に依存して報酬効果は増強された。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露は methamphetamine 精神依存を増強させることが明らかとなった。Methamphetamine の精神依存発現にも自発運動と同様に中脳辺縁 dopamine 神経系が関与することが知られている。したがって、先の考察と同様に bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、精神依存の形成に深く関与している中脳辺縁 dopamine 神経系に不可逆的な変化が起き、methamphetamine の精神依存が形成されやすくなったものと考えられる。

本研究において、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が観察された。疼痛閾値の変化には、痛覚伝導路における種々の神経伝達物質や受容体などが関与している。しかし、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、代表的 opioid である morphine 誘発鎮痛効果が減弱したことも合わせて考えると、脳内 opioid 神経系の発達に不可逆的な変化が引き起こされ、疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が引き起こされた可能性が考えられる。

一方、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による葛藤、学習・記憶、運動協調性に及ぼす影響も検討したが、顕著な影響は観察されなかった。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露は葛藤、学習・記憶、運動協調性に関わる神経系に強度の変化を引き起こさないものと考えられる。

Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露されたマウスは reserpine 誘発体温低下作用に対する拮抗作用、すなわち抗 reserpine 作用を示した。Reserpine は脳内、特に視床下部における

アミン類を枯渇し、体温の低下作用を示すと考えられている。また、chlorpromazine のような dopamine D₂ 受容体拮抗薬も体温低下作用を示す。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、視床下部に投射している dopamine 神経系が障害され、reserpine の効果が十分に発現できないために抗 reserpine 作用が誘発されたものと考えられる。

近年、内分泌かく乱化学物質に関する問題が多く取り上げられている。しかし、提起された問題点の多くは未解決あるいは仮説段階にある。特に、ヒトに対する曝露の影響については十分に解明されていない。これらの問題点を明らかにしていくためには、世代を超えた長期的な研究と細胞および分子レベルにおける作用機序の解明が必要であると思われる。本研究において、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいて dopamine 神経系が関与していると考えられる明らかな異常行動や新規環境への適応性の低下、また methamphetamine 誘発自発運動促進作用、その逆耐性形成および精神依存形成の増強、さらには抗 reserpine 作用などが観察された。したがって、bisphenol A の妊娠期および授乳期における曝露は、脳内 dopamine 神経系の発達に不可逆的な変化を引き起こしている可能性が考えられる。さらに、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいて疼痛閾値の低下や morphine 誘発鎮痛効果の減弱が観察されたことから、脳内 opioid 神経系の発達にも不可逆的な変化が引き起こされる可能性が考えられる。

E. 結論

本研究により、bisphenol A を妊娠期および授乳期に投与されたマウスは1) 一般行動の異常、2) 新規環境への適応性の減弱、3) methamphetamine 誘発自発運動促進作用およびその逆耐性形成の増強、4) methamphetamine 誘発精神依存の増強、5) morphine 誘発鎮痛作用の減弱などの明らかな変化を示すことを

明らかにした。これらの結果から、bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露により、dopamine 神経系や opioid 神経系を含む中枢神経系に幅広く不可逆的な変化が生じている可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

T. Suzuki, H. Kato, et al.: Life Sci. 64, PL151-156, 1999

T. Suzuki, Y. Ise et al.: Eur. J. Pharmacol. 369, 159-162, 1999

T. Suzuki, T. Aoki, et al.: Eur. J. Pharmacol. 385, 99-102, 1999

厚生科学補助金（生活安全総合 研究事業）

分担研究報告書

内分泌攪乱化学物質の胎児・幼児への影響等に関する研究（神経系に及ぼす影響）に関する研究

- ビスフェノール A の脳内アミンに対する影響

分担研究者：船江良彦 大阪市立大学医学部教授

研究協力者：廣井豊子 大阪市立大学医学部助手

研究要旨： ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露マウスにおける脳内アミンの変動を調べた。親へのビスフェノール A 投与によって、胎児期・乳児期に間接的に暴露をうけた仔マウスの脳では、ドパミン等のモノアミンの量が減少していた。特に、雌仔マウスにおけるドパミンの減少が著しく、コントロールに比較して 50%程度にまで減少していた。離乳後、親とは離して飼育し、3週間ビスフェノール A の暴露を解除しても、仔マウスのドパミンの減少は継続しており、この減少が、なんらかの不可逆的な変異によって引き起こされている可能性が示唆された。

A. 研究目的：

ビスフェノール A は、ポリカーボネイトなどのプラスチック製品の可塑剤や歯科用樹脂として使用されているジフェニル化合物の一つで、エストロゲン活性を有している事が知られている。エストロゲンに比べ非常に弱いながらもエストロゲン活性を有していることから、内分泌かく乱化学物質として作用する可能性が考えられ、現在多くの研究者によって生体に対する影響について検討がなされつつある。本研究では、このビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による神経系への影響を明らかにする事を目的としている。特に、本年度は、ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による脳内チトクローム P450 や生体アミンの変動を調べる事を計画した。

生体の脳内のアミンレベルは、運動、感情や情動発現、脳報酬系に関与していると考えられ、躁鬱病や感情障害といった多くの精神疾患、

近年問題となっている小児期の ADHD（注意力欠如・多動症候群）の発症、更に近年「きれやすさ」などと表現されている「衝動性」「攻撃性」「抑制の欠如」といった行動障害などに関与する可能性が考えられている。

チトクローム P450 (CYP450)は、非常に多くの分子種が存在し、その機能は多岐にわたっており、ステロイドホルモン、脂肪酸およびプロスタグランジン類など多くの生理活性物質の合成および代謝、薬物などの外来性物質の代謝など、多くの生理機能を有している。これに加え、近年、神経伝達物質であるカテコールアミンの合成活性を有する分子種も見いだされ、アミンレベルの制御に関わっている可能性も考えられている。CYP450 のいくつかの分子種の発現は、TCDD や DDT といった外来生物質やホルモンによって誘導を受けることが明らかとなっている。このような機能を有する P450 の変動は、種々の生理活性

物質の量的・質的変動につながり、生体に種々の変化をもたらすと考えられる。

様々な内分泌かく乱化学物質の暴露を受けながら生活を行っている我々にとって、環境中のどのような物質によって、アミンやホルモンなどの生体内生理活性物質がどの程度変動するか、多くの生理機能を有するどの P450 分子種の発現が変動するか、を明らかにすることは、様々な内分泌かく乱化学物質が我々に与える影響を知る上で非常に重要であると考えられる。特に、内分泌かく乱化学物質は、その作用から、P450 の発現、機能に大きく影響を与える可能性が考えられ、さらにその結果、ステロイドホルモンやアミンなどの生理活性物質が変動し、行動、成長・発育、代謝などに異常・変動がみられる可能性が考えられる。

B 研究方法

ビスフェノール A を Sire および Dam ddy マウスに混餌で投与し、それら親マウスから生まれた offspring マウスを用いて検討を行った。

ビスフェノール A 投与群は、親のビスフェノール A の量により、 $2\mu\text{g} / \text{g of food}$, $0.5, 2, 8\text{ mg} / \text{g of food}$ の 4 種に分け、それら 4 種それぞれ、雄、雌各 7 匹の offspring を一群とした。コントロールは群は、正常食を摂食させた。offspring マウスは、離乳直後の 3 週齢と 6 週齢を用い、それらから、全脳、肝臓、副腎を摘出し、脳に関しては直ちに正中二等分した。各組織は、液体窒素を用いて凍結し保存した。実験動物に対する動物愛護上の配慮として、マウスへのビスフェノール A の投与は苦痛を伴わない混餌で行い、組織摘出は断頭法による安楽死後速やかに行った。

(1) 脳内のアミンの定量

半脳を用いて、モノアミン系の脳内神経伝達物質の定量を行った。凍結組織に内部標準物質としてイソプロテレノールと、脳組織重量に合わせて過塩素酸を加えてヒスコトロンで懸濁し蛋白を変性させた後、遠心分離を行い変性蛋白を除去した。遠心上清に酢酸ナトリウムを添加して pH を 3.0 付近に調整後、HPLC 分析に供した。検出は、多電極型電気化学検出器を用いた。測定項目は、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンの脳内の主要なモノアミン系神経伝達物質とした。

(2) モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量

半脳を用いて、モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量を行った。凍結組織から組織総 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて相補的な DNA を合成した。この RNA-DNA 鎖を鋳型として、各タンパク質特異的なプライマー組およびプローブを用いて PCR で増幅し、増幅した特異的 DNA フラグメント量から元の mRNA の定量を行った。通常の PCR では定量性に欠けることから、本試験では、増幅過程をリアルタイムでモニターするリアルタイム PCR を行った。定量の標準には、濃度のわかった各蛋白の全長 cDNA を用いて PCR の鋳型として用いた。これら各蛋白の全長 cDNA は、あらかじめ、PCR を用いて作成した。モノアミンに関わるタンパク質として、カテコールアミンの生成律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ、ドパミンの各タイプ受容体、モノアミンの代謝酵素であるモノアミンオキシダーゼ、チラミンからドパミンを生成する

CYP2D、ドパミントランスポーターなどのタンパク質を考え、脳内アミンの結果からこの中のいくつかの項目を選択し測定した。また、各サンプルの補正に用いる蛋白としては、GAPDH を測定した。

C 研究結果

(1) 脳内のアミンの定量

3 週齢、6 週齢の雌雄 offspring マウスの半脳を用いて、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンの定量を行った。

A) ドパミン

3 週齢の雄：

最高用量の 8 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少した。

6 週齢の雄：

2 μg / g of food および 0.5 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少したが、更に高容量の 2 および 8 mg / g of food 群では、有意な差は見られなかった。

3 週齢の雌：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。最低用量の 2 μg / g of food 群で既に有意水準 0.01 で有意差が見られた。ビスフェノール A の投与量が、2 μg / g of food から 8 mg / g of food へ増加するに従って、ドパミン量が減少していく傾向にあった。

6 週齢の雌：

3 週齢の雌と同様に、ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。最低用量の 2 μg / g of food 群で既に有意水準 0.01 で有意差が見られ、コントロール群の約 70% 程度に、最高用量の 8 mg / g of food 群ではコ

ントロール群の約 50% 程度まで減少した。

B) ノルエピネフリン

3 週齢の雄：

最高用量の 8 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少した。

6 週齢の雄：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 μg / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、ノルエピネフリンの減少量は変化せず、いずれもコントロール群の約 80% 程度であった。

3 週齢の雌：

ビスフェノール A の投与量が 2 μg / g of food から 2 mg / g of food へ増加するに従って、ノルエピネフリン量も増加する傾向にあった。しかし、統計的に有意に増加したのは、2 mg / g of food 群だけであった。また、最高用量の 8 mg / g of food 群では増加傾向も見られなかった。

6 週齢の雌：

ビスフェノール A の投与量 2 μg / g of food から 8 mg / g of food へ増加するに従って、ノルエピネフリン量は減少する傾向にあった。しかし、統計的に有意に減少したのは、8 mg / g of food 群だけであった。

C) セロトニン

3 週齢の雄：

2 μg / g of food と 0.5 mg / g of food の群で、コントロール群に比して有意に増加したが、高容量の 2 および 8 mg / g of food 群では、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

6 週齢の雄：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

3 週齢の雌：

0.5 mg / g of food の群のみで、コントロール群に比して有意に減少した。統計的に有意ではあるものの、その減少量は 10%程度で少なかった。他の投与群では、変化はなかった。

6 週齢の雌：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 µg / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、ノルエピネフリンの減少量は大きく変化せず、いずれもコントロール群の約 85%程度であった。

これらをまとめると、

ドパミンは、雌のビスフェノール A 投与群すべてにおいて、コントロール群に比して、有意に減少していた。その減少は、ビスフェノール A 投与量に応じて変化していく傾向にあり、最大投与量群ではコントロール群の 50%程度にまで減少していた。また、この変化は、3 週齢および 6 週齢いずれの週齢においても見られた。しかし、雄では、雌のような顕著な減少は見られなかった。

ノルエピネフリンは、6 週齢の雄で、ビスフェノール A 投与群でコントロール群に比して、有意に減少していたが、ビスフェノール A 投与群間では差はなかった。

セロトニンは、6 週齢の雌で、ビスフェノール投与群でコントロール群に比して、有意に減少していたが、ビスフェノール A 投与群間では差はなかった。

(2) モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量

(1) の検討で、雌の 6 週齢でドパミンの減少量が大きかったことから、この雌の 6 週齢の脳組織を用いて、ドパミンに関わる種々のタンパク質 mRNA の測定を行った。各サンプルの補正には GAPDH の mRNA を用い、標的タンパク質の mRNA 量は、すべて、GAPDH の mRNA との比で示した。本年度は、標的タンパク質としては、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、モノアミンの代謝酵素であるモノアミンオキシダーゼタイプ A (MAO-A)、ドパミンの D4 受容体を選び、そらの mRNA を測定した。

A)チロシンヒドロキシラーゼ (TH)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に増加した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 µg / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、チロシンヒドロキシラーゼ mRNA の増加量大きく変化しなかった。

B)モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

C)ドパミンの D4 受容体 (D4R)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群の約 300%程度まで有意に増加した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 µg / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、チロシンヒドロキシラーゼ mRNA の増加量大きく変化しなかった。

これらをまとめると、

チロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびドパミ

ンの D4 受容体は、ビスフェノール A 投与群全て有意に増加したが、ビスフェノール A 投与群間にその差は見られなかった。

D 考察

今回測定した主要なモノアミン系神経伝達物質（ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニン）のうち、雌においてドパミンが顕著に減少した。ドパミンの脳内の機能から考えると、これらの動物は、運動、感情や情動発現、脳報酬系に異常をきたしている可能性が考えられた。また、このドパミンの減少は、3 週齢および 6 週齢の両週齢で見られた事から、この異常が、母親を介してビスフェノール A の間接暴露を受けている間から生じ、さらにその後ビスフェノール A 暴露から解除されても持続していることが明らかとなった。このことは、ビスフェノール A の胎児期・幼児期暴露によるドパミン量の減少が、不可逆的変異を伴っている可能性を示している。このドパミンが減少している時の脳内のタンパク質 mRNA を調べると、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびドパミンの D4 受容体が、ビスフェノール A 投与群であればその量に関係なく増加していた。このドパミン生成酵素の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) および受容体の増加は、減少したドパミン量に対する生体応答 (up-regulation) である可能性が考えられる。チロシンヒドロキシラーゼ (TH) が増加しているにも関わらず、ドパミン量が減少したままであることから、このドパミン量の減少がチロシンヒドロキシラーゼの減少によるものではないことが明らかとなった。そして、分解酵素であるモノアミンオキシダーゼ A が変化していないことから、分解系の酵素の過剰

発現でもないと考えられた。これらのことから、ビスフェノール A の胎児期・幼児期暴露によるドパミン量の減少は、暴露を受けていた時期の脳内におけるなんらかのドパミン神経系傷害によるものである可能性が強く示唆された。分解系の酵素には、今回測定したモノアミンオキシダーゼ A 以外にも、モノアミンオキシダーゼ B や COMT が存在しているので、それらを含めてさらにドパミントランスポーターや他のドパミン受容体など標的タンパク質を広げて mRNA の測定を継続しなければ全体的な論議が出来ないが、ビスフェノール A が胎児期や乳児期の脳でどのような作用を有しているのか、そのような機能分子（蛋白等）に結合しているのかを検討する必要があると考えられた。また、ノルエピネフリン、セロトニンの変動に関しても、さらに検討を行わなければ今回の検討だけでは評価が出来ないと考えられた。

E 結論

親へのビスフェノール A 投与によって、胎児期・乳児期に間接的に暴露をうけた仔マウスの脳では、ドパミン等のモノアミン神経伝達物質の量が減少していた。その減少は、ビスフェノール A の暴露から解除されても継続する事が明らかとなり、なんらかの不可逆的な変異によって引き起こされている可能性が示唆された。

F 研究発表

1. 論文発表

Komatsu K, Ito K, Nakajima Y, Kanamitsu Si, Imaoka S, Funae Y, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Sugiyama Y., Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide

- and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments., *Drug Metab Dispos* Apr;28(4) : 475-81, 2000
- Ishiguro N, Senda C, Kishimoto W, Sakai K, Funae Y, Igarashi T., Identification of CYP3A4 as the predominant isoform responsible for the metabolism of ambroxol in human liver microsomes., *Xenobiotica*. Jan; 30 (1):71-80, 2000
- Hase, I., Imaoka, S., Oda, Y., Hiroi, T., Nakamoto, T., Asada, A. and Funae, Y., Area under the plasma concentration-time curve of inorganic fluoride following sevoflurane anesthesia correlates with CYP2E1 mRNA level in mononuclear cells, *Anaesthesiology*, in press
- Nakamoto, T., Hase, I., Imaoka, S., Hiroi, T., Oda, Y., Asada, A. and Funae, Y., Quantative competitive RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes., *Pharmacogenetics*, in press
- Fukuda, T., Nishida, Y., Imaoka, S., Hiroi, T., Funae, Y. and Azuma, J., The decreased disposition of venlafaxine in vivo possibly caused by instability of CYP2D6: 2D6*10 expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* in press
- Hagiwara A, Miyata E, Tamano S, Sano M, Masuda C, Funae Y, Ito N, Fukushima S, Shirai T., Non-carcinogenicity, but dose-related increase in preneoplastic hepatocellular lesions, in a two-year feeding study of phenobarbital sodium in male F344 rats., *Food Chem Toxicol*, Aug;37(8):869-79, 1999
- Chow, T., Imaoka, S., Hiroi, T. and Funae, Y., Developmental changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rats., *Drug Metab. Dispos.*, 27, 188-192, 1999.
- Nakamura, A., Hirota, T., Morino, A., Imaoka, S., Funae, Y., Yamamoto, Y., Tasaki, T., Masuda, M., Kazusaka, A. and Fujita, S., Cytochrome P450 isoforms responsible for the N-deethylation and cyclohexane-hydroxylation of NS-21., *Xenobiotica*, 29, 243-252, 1999.
- Takemura, S., Minamiyama, Y., Imaoka, S., Funae, Y., Hirohashi, K., Inoue, M. and Kinoshita, H., Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia., *J. Hepatol.*, 30, 1035-1044, 1999.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y. and Okada, S., Isoforms of cytochrome P450 on organic

nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels., FEBS Lett., 452, 165-169, 1999.

Ichihara, T., Wanibuchi, H., Taniyama, T., Okai, Y., Yano, Y., Otani, S., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S., Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)., Cancer Lett., 141, 211-218, 1999.

Ayajiki, K., Okamura, T., Fujioka, H., Imaoka, S., Funae, Y. and Toda, N. Possible involvement of CYP 3A-derived arachidonic acid metabolite in responses to endothelium-derived K⁺ channel opening substance., Br. J. Pharmacol., 128, 802-808, 1999.

Chow, T., Hiroi, T., Imaoka, S., Chiba, K. and Funae, Y., Isoform-selective metabolism of mianserin by cytochrome P-450 2D., Drug. Metab. Dispos., 27, 1200-1204, 1999.

今岡進, CYP4 ファミリーを中心としたチトクローム P450 分子種の機能解明, 薬物動態, 14, 139-147, 1999.

2.学会発表

船江良彦, チトクローム P-450 の分子多様性と
その生理機能, 第 19 回 アルコール医学生物学
研究会学術集会 (大阪 1999)

成松鎮雄, 丸尾剛, 山本重雄, 廣井豊子, 船江良彦, 酵母発現 CYP2D 酵素による光学活性薬物酸化反応の速度論的解析, 第 119 回 日本薬学会年会 (徳島 1999)

南山幸子, 竹村茂一, 今岡進, 亀川美佳, 船江良彦, 井上正康, 岡田茂, 有機ニトロ化合物からの NO 遊離とチトクローム P450 分子種の関与およびヒト心臓血管におけるその局在, 第 21 回磁気共鳴医学会 (札幌 1999)

長田真優子, 血管系および神経系培養細胞における酸素濃度変化とストレス蛋白の発現, 第 6 回 大阪市立大学薬理学教室研究会 (大阪 1999)

北野光昭, 榊田周佳, 鰐淵英機, 菊崎泰枝, 今岡進, 日高隆義, 船江良彦, 中谷延二, 福島昭治, 植物由来化合物クマペリンのラット肝発癌に対する抑制作用の検討, 第 58 回 日本癌学会総会 (広島 1999)

南山幸子, 竹村茂一, 今岡進, 豊國伸哉, 船江良彦, 井上正康, エンドトキシン肝障害におけるチトクローム P450 の役割と活性酸素・フリーラジカルの意義, 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜 1999)

今岡進, 浅井哲, 杉本俊門, 廣井豊子, 船江良彦
ヒト CYP4B1 の発現と膀胱癌について, 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜 1999)

長田真優子, 今岡進, 金勝慶, 廣井豊子, 岩尾洋,

船江良彦, 血管系および神経系培養細胞における
酸素濃度変化とストレス蛋白の発現, 第72回 日
本生化学会大会 (横浜 1999)

都築大輔, 山本重雄, 片岡洋行, 成松鎮雄, 今岡
進, 船江良彦, 部位特異的変異導入法による
CYP2D6 バリエントの作成と酵母における発現,
薬学会中国四国支部例会 (高知 1999)

都築大輔, 竹味千恵, 山本重雄, 片岡洋行, 成松
鎮雄, 今岡進, 船江良彦, 酵母発現 CYP2D6 バ
リエントの酵素活性, 薬学会中国四国支部例会
(高知 1999)

成松鎮雄, 丸尾剛, 都築大輔, 片岡洋行, 山本重
雄, 佐藤哲男, 廣井豊子, 今岡進, 船江良彦, 酵
母発現ラットおよびヒト CYP2D 酵素による光
学活性基質酸化反応の特性: 肝ミクロゾーム画
分との比較, 第14回 日本薬物動態学会年会 (浜
松 1999)

今岡進, 中本達夫, 長谷一郎, 杉本俊門, 小田裕,
廣井豊子, 船江良彦, ヒトにおける薬物代謝酵素
誘導の検出: リンパ球の P450 mRNA の定量的
PCR を用いた検出法の開発, 第14回 日本薬物
動態学会年会 (浜松 1999)

福田剛史, 西田裕子, 今岡進, 廣井豊子, 山本勇,
船江良彦, 東純一, CYP2D6*10 の特性および
in vitro 代謝パラメーターによるヒト薬物動態予
測の可能性, 第14回 日本薬物動態学会年会 (浜
松 1999)

中島由起子, 伊藤清美, 船江良彦, 今岡進, 島田
典招, Green, C.E., Tyson, C.A., 杉山雄一, In
vitro 代謝試験に基づいたヒト in vivo 薬物肝代
謝能の定量的予測: ヒト肝ミクロソームおよびヒ
ト CYP 発現系の有用性, 第14回 日本薬物動
態学会年会 (浜松 1999)

水野大, 廣井豊子, 今岡進, 船江良彦, Toluene に
よるラット CYP 各分子種酵素誘導, 第14回 日
本薬物動態学会年会 (浜松 1999)

廣井豊子, 長敏夫, 今岡進, 船江良彦, ヒトおよ
びラット CYP2D 分子種の基質特異性, 第14回
日本薬物動態学会年会 (浜松 1999)

田口美緒, 吉井一良, 小林カオル, 田井中均, 今
岡進, 船江良彦, 島田典招, 細川正清, 千葉寛,
CYP と cytochrome P450 reductase の含量比
による Km 値の変化, 第14回 日本薬物動態学
会年会 (浜松 1999)

Hiroi, T., Yoshura, K., Kishimoto, W., Chow,
T., Imaoka, S., and Funae, Y., Steroids
metabolism by CYP2D., International
Symposium on Molecular Steroidogenesis
(Nara, 1999)

Imaoka, S., Asai, S., Sugimoto, T., Hiroi, T.,
and Funae, Y., Comparison of human
CYP4B1 with that of other species., 11th
International Conference on Cytochrome
P450 (Sendai, 1999)

Narimatsu, S., Maruo, G., Kataoka, H., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S. and Funae, Y. , Characterization of optically active drug oxidation by rat CYP2D enzymes (CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4) expressed in yeast cells

11th International Conference on Cytochrome P450 Sendai 1999

Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y., and Okada, S. , Cytochrome P450 isoform, CYP3A4, plays a major role in organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels.

3.

G 知的所有権の取得状況

1.特許取得：なし

2.実用新案登録：なし

3.その他：なし

厚生科学研究費補助金生活安全総合研究事業
分担研究報告書

ビスフェノール A が脳・神経系の形成・成熟に及ぼす影響の分子病理学的解析

分担研究者 伏木信次 京都府立医科大学教授 (附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門)

研究要旨 ビスフェノール A の胎生期曝露は神経突起伸長に関与する GAP43 の発現変化、ドーパミン系や GABA 系の神経細胞数の変動をもたらすことが示唆された。結果の重要性に鑑み、今後さらに精緻な解析が必要である。

A. 研究目的

本研究は、胎児期から出生後早期にかけてマウスがビスフェノール A に曝露された際に、脳神経系の器官形成や組織形成にどのような影響が及ぶかを、遺伝子レベルから組織レベルに至るまで多面的かつ詳細に解析することを目的とする。また同様の時期にビスフェノール A に曝露された場合、行動や学習に及ぼす影響が危惧されるので、生後の脳を対象として組織構築や神経伝達物質に注目して何らかの変化が出現するか否かを明らかにすることを第二の目的とする。

ビスフェノール A の幼児・胎児への曝露が脳形成や発達段階にある脳に悪い影響を及ぼすのではないかと不安が国民の間に広がっている中、実験動物を対象としてその生物影響、とりわけ脳への影響を正確に把握することは緊急性が高くかつ社会的意義も大きいと考える。

B. 研究方法

ddY 系雄性マウスに 2 日間ビスフェノール A を種々の濃度に混じた食餌(2 μ g, 0.5mg, 2mg, 8mg/g of food)を与えたのち、この雄性マウスと雌性マウスを交配して、その妊娠期ならびに授乳期にそれぞれの濃度のビスフェノール A 混入飼料を投与した。

妊娠 18 日の時点で帝王切開により胎児を取り出し、パラフォルムアルデヒドによる浸漬固定ないしは液体窒素による凍結を行い試料とした。また出生後 3 週、4 週の時点で全身麻酔下にパラフォルムアルデヒドによる経心

的灌流固定を施行ないしは脳を取り出し凍結標本とした。大脳新皮質ならびに海馬中央部を通る面、また視交叉ならびに medial preoptic area を通る面で切片を作成し、ニッスル染色、HE 染色、さらに神経伝達物質関連酵素やカルシウム結合蛋白などに対する各種抗体を用いた免疫組織染色を実施した。また胎児期の脳についてはアポトーシス検出のため TUNEL 染色も施した。一部の動物については妊娠 10 日目以降にビスフェノール A を混じた飼料を与え出生前に胎児を採取した。

(倫理面への配慮) 動物の取り扱いおよび処置については動物愛護に十分配慮した。

C. 研究結果

受精前からビスフェノール A を摂取せしめた場合、出生した児に抗不安効果の増強や運動協調性障害など行動学的異常を生じることが鈴木らにより見出された。

そこで、そのような行動異常に関わるものが予想されるドーパミンや GABA、セロトニンなどに注目して脳での分布を調べた。ドーパミン産生細胞に特異的に検出されるチロシン水酸化酵素(TH)や GABA の合成に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、アセチルコリン合成に関わるコリンアセチル転移酵素(ChAT)、セロトニンの免疫組織化学を施行したところ、ビスフェノール A (8mg/g of food)投与群において、TH 陽性神経細胞数ならびに神経突起の減少、大脳皮質における GAD 陽性神経細胞数の増加、calbindin 陽性神経細胞数の減少がみられた。

また胎児期大脳皮質における変化としては成長円錐部に発現する GAP43 の分布に投与群と対照群との間で差をみとめた。すなわちビスフェノール A 摂取群では GAP43 陽性領域の縮小を示した。

なお、妊娠前からビスフェノール A に曝露された母体から採取した胎児において、肉眼的に明らかな脳の形成障害は認めなかった。

D. 考察

大脳皮質においてみられた GAD 陽性神経細胞の増加、calbindin 陽性神経細胞の減少、大脳基底核における TH 陽性神経細胞の減少は、胎生期に摂取されたビスフェノール A がドーパミン系や GABA 系に影響を及ぼしたことを示唆している。

また、神経突起の伸長やシナプス形成に関わると想定される GAP43 の胎児大脳皮質における分布がビスフェノール A 摂取群で抑制される傾向を示したことは神経細胞分化や神経回路形成にビスフェノール A が好ましからざる影響を残す可能性を示唆する。しかしながら、胎生後期に採取した胎児において脳神経系に肉眼的異常を認めなかったことから、少なくとも脳に関する限り、胎児の器官形成そのものには影響を及ぼさないと考えられた。

E. 結論

ビスフェノール A の胎生期曝露は形成途上の脳における神経突起伸長に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。またその影響は成熟脳におけるドーパミン系や GABA 系の神経細胞数の増減やシナプス形成に反映する可能性が示唆された。

ビスフェノール A 投与量の異なる動物すべてについては未だ検討し得ていないので、今後検索匹数を増やすとともに、定量的解析を組み合わせることにより、ビスフェノール A 胎生期曝露の脳形成への影響をさらに詳細に解明したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

伏木信次、田口泰子、木下周子、石川裕二、広部知久. 胎

生期放射線照射による大脳皮質形成障害.放射線の生体影響とその修飾—実験発がんを中心として—(荻生俊昭、小木曾洋一編)、放射線科学 臨時増刊号 42(6): 162-168,1999 実業公報社

Shiga, K., Fukuyama, R., Kimura, S., Nakajima, K., Fushiki, S. Mutation of the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67: 675-677, 1999.

Yuh, I., Yaoi, T., Watanabe, S., Okajima, S., Hirasawa, Y., Fushiki, S. Up-regulated uridine kinase gene identified by RLCS in the ventral horn after crush injury to rat sciatic nerves., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:104-109, 1999.

Hirai, K., Yoshioka, H., Kihara, M., Hasegawa, K., Sakamoto, T., Sawada, T., Fushiki, S. Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study., *Dev. Brain Res.* 114: 63-67, 1999.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushiki S. Effects of ethanol on neuronal migration and neural cell adhesion molecules in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study., *Dev. Brain Res.* 118: 205-210, 1999.

Kanemura, Y., Hiraga, S., Arita, N., Ohnishi, T., Izumoto, S., Mori, K., Matsumura, H., Yamasaki, M., Fushiki, S., Yoshimine, T. Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the *Drosophila glial cells missing (gcm)* gene., *FEBS Lett.* 442: 151-156, 1999.

Matsushita, H., Takeuchi, Y., Kosaka, K., Fushiki, S., Kawata, M., Sawada, T. Changes in serotonergic neurons in the brain of pyriithiamine-induced acute thiamine-deficient mice., *Acta Neuropathol.* 98: 614-621, 1999.

2. 学会発表 該当なし

G. 知的所有権の取得状況 該当事項なし