

傾向がみられたが、有意なものではなかった。生後5日目、15日目では、大腿骨の重量や長さが有意に低下したが、その後はこの影響は消失した。この結果は第1の実験結果とは異なるものであるが、いずれにしてもその影響は軽微であり、骨形成への影響は重大なものではない。

D. 考察

これまでの我々の研究では、大豆イソフラボンとしてはダイゼインとゲニステインのほぼ等量混合物を用い、妊娠・授乳ラットに飼料の混合して投与してきた。その結果、大豆イソフラボンは、母親の胎盤や母乳を介して胎児、乳児に移行することを確認した。また母親ラットの体重増加の抑制、胎児数の減少、血中甲状腺ホルモン濃度の低下を観察してきた。

今年度の研究では、こうした大豆イソフラボンの影響が、ゲニステイン固有のものであるか、またその影響は妊娠期と授乳期のいずれで顕著であるのか、さらに乳児の成長期における生体影響について観察することを目的とした。

その結果、大豆イソフラボン混合物の影響はゲニステイン単独の影響よりも強く、大豆イソフラボン混合物中のダイゼインや他のサポニン等の影響なども示唆された。他方、ゲニステイン単独でもこれまでに混合物で観察された影響が弱いながら認められた。すなわち、胎児数の減少、甲状腺ホルモン濃度の低下傾向などは、有意ではないが観察された。

乳児については、肝臓や腎臓重量の低下、大腿骨の重量や長さが大きくな傾向がみられたが、授乳期のみで、離

後には影響は消失した。この実験では、母親ラットも子どももゲニステイン暴露の影響は、妊娠期と授乳期で違いはみられなかった。

第2の実験からはゲニステイン暴露の母親の子どもでは、離乳後の体重増加の抑制がみられた。大腿骨や生殖器、その他の臓器の重量にはほとんど影響がなく、また子宮のエストゲンレセプターへの影響も無いところから、原因については不明である。実験結果の再現性も含めて、詳細な検討が必要である。

これらの結果から、妊娠期、授乳の母親ラットへの大量のゲニステイン投与は、母親や子どもへの生体影響は軽微ながら観察された。この場合の投与量は日本人が大豆・大豆加工品などで摂取する量に比べると、200~250倍にも及び、直ちに人への影響として問題になるものではない。しかし、とくに甲状腺ホルモンへの影響、ダイゼインとゲニステイン影響の相違、成長期への影響の確認などを検討する必要があると考える。

E. 結論

ゲニステインは妊娠、授乳ラットに経口的に投与すると、妊娠、血中甲状腺ホルモン濃度、乳児の成長期の体重増加の抑制等の生体影響が観察された。しかし、その投与量は日本人が日常摂取するゲニステイン量の200~250倍にもなり、直ちに人の健康影響を示唆するものではない。なお、これまでに得られた大豆イソフラボン混合物による研究結果とゲニステイン単独の影響は一致せず、ダイゼインの生体影響についても検

討する必要性が示唆された。また、成長期の子どもの体重増加の抑制は、ゲニステインの内分秘かく乱作用を示唆するものであり、詳細な検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 石見佳子、池上幸江：卵巣摘出モデル動物における骨髄Bリンパ球の蓄積と骨量減少に対する大豆イソフラボノイドの効果、
Osteoporosis, 1998, 6, 661-665
- 2) 石見佳子、池上幸江：大豆イソフラボンの有効性とリスク、栄養・食糧誌, 1998, 51, 294-298.
- 3) Y. Ishimi, C. Miyaura, M. Ohmura, Y. Onoe, T. Sato, Y. Uchiyama, M. Ito, X. Wang, T. Suda and S. Ikegami: Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency, Endocrinology, 1999, 140, 1893-1900.
- 4) Y. Ishimi, N. Arai, X. Wang, J. Wu, K. Umegaki, C. Miyaura and S. Ikegami :Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice, Biochem. Biophys. Research Comm., 2000, 274, 697-701.

2. 学会発表

- 1) Third International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease, Oct 31-Nov. 3, 1999, Washington, USA
Title: Transfer of Isoflavones from Mother to Suckling Pups

Through Milk in Rats

Authors: Y. Nakashima, Y. Ishimi
K. Umegaki and S. Ikegami

2) 第45回日本栄養食糧学会

平成12年5月14日、松山

演題名：卵巣摘出骨粗鬆症モデル動物における大豆イソフラボン大量投与の生体影響

発表者：石見佳子、荒井直子、梅垣敬三、王新祥、呉堅、宮浦千里、武田明治、池上幸江

3) 第45回日本栄養食糧学会

平成12年5月14日、松山

演題名：母親ラットからの胎児・乳児へのイソフラボン移行とその生体影響

発表者：東泉裕子、中嶋洋子、石見佳子、池上幸江

G. 知的所有権の獲得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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に関する研究
分担研究者 堤 雅弘 奈良県立医科大学腫瘍病理

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、甲状腺および肺を主な標的として検索を行った結果、bisphenol A に有意な発癌促進作用、甲状腺機能に対する影響はみられなかった。

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甲状腺および肺を主な標的として検索し、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% bisphenol A (BPA)を基礎飼料および大豆を除いた特殊飼料に混じり 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、仔ラットは基礎飼料にて飼育し、5 週齢より N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) を 2000ppm の濃度で飲水に混じり 12 週間投与した。BHP 投与開始 20 週後に動物をエーテル麻酔下に屠殺、剖検を行い、甲状腺、肺、食道、肝、腎の腫瘍発生について病理学的検索を行った。

また、低用量での BPA の作用を検索するため、同様の実験スケジュールで母ラットに 0.08ppm、100ppm、1600ppm の BPA を基礎飼料に混じり投与し、仔ラットについて同様の BHP による発癌実験を行った。

（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

BHP を投与しない雌雄の仔ラットに腫瘍の発生はみられなかった。BHP を投与した仔ラットには雌雄ともに甲状腺癌、肺癌、食道癌、肝腺腫、胸腺リンパ腫の発生がみられたが、1%BPA 投与の有無、飼料の差異により、これらの腫瘍の発生頻度、動物 1 匹あたりの発生個数に有意な差異はみとめられなかった。甲状腺ホルモン測定の結果、母ラットにおいて T3、T4 は各群間有意差がないものの、TSH は大豆除去飼料投与ラットにおいて高値を示した。また、組織学的に甲状腺腫がみられたが、BPA 投与による影響はみられなかった。BHP 非投与の仔ラット（25 週齢）においては、T3、T4、

TSH の値に各群間有意な差はみられず、組織学的にも甲状腺に著変はみられなかった。低用量のBPAを用いた実験において、妊娠期間、出生仔数などに各群間有意差はみられず、外表奇形はみられなかった。BHPを投与した仔ラットにおいては、雌雄ともに甲状腺癌、肺癌、食道癌、胸腺リンパ腫の発生がみられたが、BPA投与により、これらの腫瘍の発生頻度、動物1匹あたりの発生個数に有意な差異はみとめられなかった。また、非腫瘍部甲状腺に組織学的な差異もみられなかった。

D. 考察

大豆除去飼料を投与した雌ラットにTSH高値、甲状腺腫が誘発されたが、これらの変化に1% BPA含有飼料投与が影響を与えることはなく、また、低容量のBPAを基礎食に混じ投与しても、甲状腺に変化はみられないことより、BPAの甲状腺に対する毒性作用は乏しいことが示された。また、これらの雌ラットより生まれた仔ラットにおいても、血中甲状腺ホルモン値に著変はみられず、また、甲状腺を含む肺、肝、食道、胸腺の発癌にも、経胎盤的、経乳汁的に投与されたBPAが有意な発癌修飾作用を示すことはなく、BPAの暴露が次世代ラットの甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性の亢進に關与する可能性は乏しいことが示唆された。

E. 結論

Wistar系雌ラットにBPAを1%、1600ppm、100ppm、0.08ppmの濃度で飼料に混じ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、生まれた仔ラットにBHPを投与し甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性について検索した。その結果、BPAを投与されたラットより生まれた仔ラットにおいて、

甲状腺機能、発癌感受性に有意な差はみられず、BPAの暴露が次世代ラットの甲状腺、肺、食道、肝、胸腺発癌感受性の亢進および甲状腺機能異常の誘発に關与する可能性は乏しいと考えられる。

F. 研究発表

論文発表

Takashima Y., Tsutsumi M., Sasaki Y., Tsujiuchi T., Kusuoka O., Konishi Y. Lack of bisphenol A in maternal rats or treatment on response of their offspring to N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine. J.Toxicol. Pathol.13, 2001 in press.

G. 知的所有権の取得状況

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

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による生体に対する影響が懸念されている。そこで本年度の研究においてはヒトの推定一日摂取量に相当する用量の bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウスにおける行動変化ならびにそれに伴う神経系の変化について詳細に検討した。実験には ddY 系マウスを用い、bisphenol A をそれぞれ 0.00003、0.0003 および 0.003 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。低用量の bisphenol A を慢性曝露されたマウスにおいては、morphine 誘発自発運動促進作用および抗侵害効果に有意な変化は認められず、cocaine 誘発報酬効果においても増強傾向は認められるものの有意な差は得られなかった。しかしながら、methamphetamine 誘発報酬効果および自発運動促進作用は control 群と比較して有意な増強が観察された。一方、脳内における dopamine transporter および vesicular monoamine transporter の mRNA およびタンパクレベルは control 群と比較して有意な変化が認められなかったのに対し、脳内の dopamine D₁ 受容体 mRNA レベルの有意な増加が認められた。本研究の結果、低用量 bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により依存性薬物、特に methamphetamine の依存形成が増強されることが明らかとなった。また、このような bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により精神依存形成に重要な役割を担う中脳辺縁 dopamine 神経系に変化が生じるものと推察される。

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かな生殖器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。また、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 への曝露により記憶・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 estrogen 受容体に親和性を示し、17 β -estradiol の約 15,000 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】

ddY 系雄性マウスと雌性マウス(東京実験動物)を交配して妊娠期および授乳期に bisphenol A を混餌 (0.00003, 0.0003 および 0.003 mg/g of food) により処置した。ただし、子供が直接 bisphenol A 混入飼料を摂取することを避けるため、離乳期

の第 3 週より普通飼料とし、離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育したマウスを実験に用いた。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。

【Bisphenol A 慢性曝露】

Bisphenol A 慢性曝露は薬物混入飼料法に従って行った。Bisphenol A をそれぞれ 0.00003, 0.0003 および 0.003 mg/g of food の用量で、交配日より処置を開始し、分娩後仔供を離乳させる 1 週間前 (2 週間) まで処置を行った。Bisphenol A を各用量で処置した親から生まれたマウスを、それぞれ 0.00003 mg/g of food 処置 (B0.00003) 群、0.0003 mg/g of food 処置 (B0.0003) 群および 0.003 mg/g of food 処置 (B0.003) 群とした。また、bisphenol A 非曝露群をコントロール (B0) 群とし、1 群 9~10 匹として使用した。

【使用薬物】

実験には methamphetamine hydrochloride (大日本製薬)、morphine hydrochloride (三共) および cocaine hydrochloride (武田製薬) を使用した。全ての薬物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。なお、用量はすべて塩として表記した。

【自発運動量の測定】

自発運動量の測定は、自発運動測定装置 (小原医科産業 : AMB-M1 型アンピュロメーター) を使用し、tilting cage 法に従って行った。この方法はマウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、マウスの動きに伴うケージの傾きをマイクロスイッチを介してカウントし、これを自発運動量として測定する方法である。この装置にインターフェイスを介してパーソナルコンピューター (PC-98VM : NEC) を接続し、BASIC-プログラム

により測定値を連続的に入力させた。

測定開始後の 30 分間はマウスを新しい環境に適応させるための時間とし、その後、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 (2 mg/kg, s.c.) 処置により引き起こされる自発運動量を 10 分間隔で計 180 分間にわたり連続的に測定した。また、薬物無処置時における測定開始から 60 分間の自発運動総数を新規環境への順応性の指標とした。

各時間ごとの自発運動量の測定値および 180 分間の自発運動量総数はすべて平均値 ± 標準誤差として表示した。統計学的有意差検定は二元配置分散分析を行い、各ポイントの比較は Bonferroni/Dunn 検定に従って行った。

【報酬効果の測定】

精神依存は条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference: CPP) 法に従って行った。CPP 法においては、15 x 30 x 15 cm のアクリル製シャトルボックスを使用した。この装置は、中央に設置した上下に移動可能な仕切り板により等分割されている白・黒の 2-コンパートメントボックスである。条件づけはカウンターバランス方式に従い、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て他方のボックスに 1 時間閉じ込め、これを計 3 回 (6 日間) 繰り返して条件づけを行った。7 日目には薬物も生理食塩液も投与せずに、仕切り板をあげ、マウスが白と黒の両コンパートメントを自由に出入りできる状況にしてから白と黒の 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。なお、各群のスコア (sec) は平均値 ± 標準誤差で

表示し、有意差検定は Wilcoxon の順位和検定を用いて行った。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。

【Morphine 誘発抗侵害効果に及ぼす影響】

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 morphine 5 mg/kg 皮下投与による鎮痛効果は tail-flick 法および warm-plate (51.5°C) 法を用い、マウスが仮性疼痛反応を示すまでの時間 (潜時) により評価した。

【Western blot 法】

脳分画標本の作製はマウス全脳を摘出し、前脳辺縁部を脳アトラスに従って分画した。組織をテフロン-ガラスホモジナイザーにてホモジナイズし、高速遠心機 (HITACHI CF-15D) にて 1,000 x g (3,500 rpm)、10 分で遠心分離し、得られた上清を 100,000 x g (33,000 rpm)、30 分で遠心分離することにより、得られた上清を細胞質分画とした。沈渣はさらにホモジナイズし、再度 100,000 x g、30 分で遠心分離することにより、得られた沈渣を細胞膜分画とした。Western blot 法は、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE 法) に従って、4-20 % の濃度勾配のゲル (CAP™-GEL, TRIS-SDS, ICN Pharmaceuticals Inc., CA, USA) 中の各レーンに 2 % SDS、10 % glycerol と 0.2 M dithiothreitol (Research Biochemicals Inc., MA, USA) を含む loading dye (AMRESCO, OH, USA) と 8-20 µg の細胞膜分画あるいは細胞質分画の混合液を注入し、抗原蛋白を分子量の差によって分離した。分離完了後、速やかにゲルを取出し、電気泳動した抗原蛋白を 25 mM Tris と 192 mM glycine を含む Tris-glycine buffer (AMRESCO, OH, USA) に浸したニトロセルロースメンブランにトランスブロットセル (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を用い電氣的に移行させた。ニトロセルロ

ースメンブランに移行後、メンブランを 5 % nonfat dried milk (ナカライテスク株式会社、京都) を含む Tris-buffered saline (TBS) 中でブロッキングし、さらに 5 % nonfat dried milk 中で 1,000 倍に希釈した vesicle monoamine transporter 2 (VMAT2) 抗体、dopamine transporter 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と抗原蛋白をメンブラン上で反応させるため、一晚インキュベーションを行った。その後、0.05 % Tween20 (Research Biochemicals, Inc., MA, USA) を含む TBS (TTBS) で洗浄し、膜上で抗原と結合した抗体を 5 % nonfat dried milk 中で 10,000 倍希釈された horseradish peroxidase (HRP) 標識の二次抗体 (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) と室温にて 2 時間インキュベートを行い、反応させた。インキュベート後、TTBS で洗浄し、ケミルミノエッセンス法に従い蛍光発色性の基質 (SuperSignal, PIERCE, IL, USA) を用いて、目的とする蛋白を検出した。

【RT-PCR 法】

Total RNA は、マウス全脳および中脳領域より SV Total RNA Isolation System (Promega, WI, U.S.A.) を用いて抽出した。First strand cDNA 作製のために、抽出した total RNA 1 μ g を oligo (dt) 12-18 1 μ L および diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水と共に 70 °C、10 分間インキュベートした。その後、氷上で 1-2 分間急冷し、このサンプルに 10 x PCR buffer 10 μ L、0.1 M dithiothreitol (DTT) 10 μ L、50 mM MgCl₂ 5 μ L、10 mM dNTPmix 1 μ L を加え、42 °C、5 分間のインキュベートを行った。その後、200 U reverse transcriptase II (Gibco-BRL, NY, U.S.A.) を 1 μ L 加え、42 °C、45 分間、70 °C、10 分間のインキュベートをそれぞれ行った。PCR はマウスの D₁ 受容体 DNA 配列に基づいた primer (sense: 5'-CTC ATA AGC TTT TAC ATC CCC G-3', antisense: 5'-CCC TCT CCA AAG CTG AGA TG-3') および VMAT2 DNA 配列に基づいた primer (sense: 5'-TCC AAT TCC CAT GTT TGC TGG ATT C-3', antisense: 5'-GGT AGC CCA TGA

TAG GCA TC-3') を用いて、それらを加えた first strand cDNA 10 μ L、10 x PCR buffer 4 μ L、50 mM MgCl₂ 0.5 μ L、10 mM dNTPmix 0.8 μ L、sense 2.5 μ L、antisense 2.5 μ L、DNA polymerase (3.5 U/ μ L) 0.5 μ L および超純水 27.7 μ L からなる混液を用いて、サーマルサイクラー (The Minicycler, MJ Research, MIT, U.S.A.) により増幅した。1 cycle は、denature 95 °C、3 min、annealing 55 °C、1 min、extension 72 °C、1 min を行い、2-40 cycles まで、denature 95 °C、30 sec、annealing 55 °C、1 min、extension 72 °C、1 min の条件下で行った。生成した DNA の分析にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。Trizma base (Research Biochemicals Inc., MA, U.S.A.)、0.2 M acetic acid (和光純薬工業、大阪) および 0.5 M EDTA (Research Biochemicals Inc., MA, U.S.A.) の混液 (TAE 溶液) を溶媒として 1 % アガロースゲル溶液を作製し、室温で約 30 分間放置してゲルを固めた。固まったゲルは電気泳動 buffer (TAE 溶液) を満たした電気泳動槽 (GelMate; TOYOBO, 東京) に入れ、40 pcr cycle におけるサンプル DNA 9 μ L に対して 1 μ L の 10 x Loading buffer を加えて、ウェルに 8.5 μ L ずつ流し込み、100 V にて 50 分間電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを ethidium bromide 溶液 (和光純薬工業、大阪) 中にて 30 分間染色し、蛍光強度を落射式蛍光読取装置で測定した。

【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。したがって、倫理的問題はないが、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

【自発運動に及ぼす影響】

低用量 bisphenol A 慢性曝露マウスにおける新規環境への順応性には、コントロール群に比べ有意な差は認められなかった。一方、bisphenol A 慢性曝露マウスにおける methamphetamine (2

mg/kg, s.c.) 誘発自発運動促進作用の 180 分間の総運動量を図 1 に示した。B0 群および B0.003 群における自発運動量総数はそれぞれ $1,951 \pm 527.3$ counts/180 min および $1,779 \pm 409.2$ counts/180 min であり、B0.003 群においては B0 群と比較して有意な差は認められなかった。一方、B0.00003 群および B0.0003 群における自発運動量総数は $3,411.4 \pm 312.8$ counts/180 min および $4,215 \pm 462.1$ counts/180 min であり、B0 群と比較して有意な自発運動量の増加が認められた。(p<0.05, p<0.01)

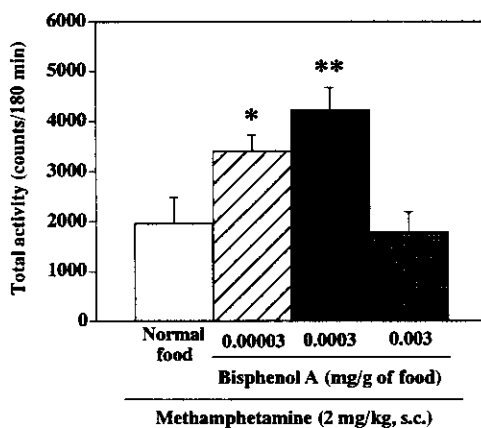


Fig. 1. Methamphetamine-induced total locomotor activity in mice prenatally exposed to Bisphenol A. *P<0.05, **P<0.01 vs. normal food.

Morphine (10 mg/kg, s.c.) 誘発自発運動促進作用の 180 分間の総運動量は B0 群においては 419.6 ± 131.3 counts/180 min であった。一方、B0.00003 群、B0.0003 群 および B0.003 群における自発運動量総数は 676.6 ± 257.3 counts/180 min、 537.8 ± 189.8 counts/180 min および 379.7 ± 115.7 counts/180 min であり、B0 群と比較して有意な差は認められなかった。

【精神依存に及ぼす影響】

Bisphenol A 慢性曝露マウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果を図 2 に示した。B0 群において、saline 処置によるスコアは -9.3 ± 65.0 sec であった。一方、methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.) 処置によるスコアは 22.4 ± 26.1 sec で

あり、saline 処置のスコアと比較して、有意な報酬効果は認められなかった。しかしながら、B0.00003 群、B0.0003 群、B0.003 群における methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.) 処置によるスコアはそれぞれ 289.1 ± 99.1 、 197.6 ± 82.5 、 190.6 ± 109.6 sec であり、いずれの用量においても有意な報酬効果が認められた(p<0.01, p<0.05, p<0.05)。

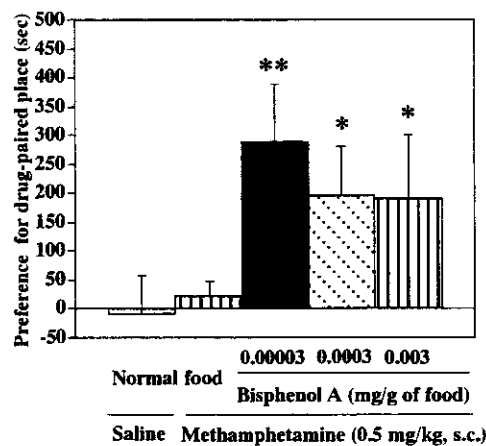


Fig. 2. Methamphetamine-induced place preference in mice prenatally exposed to Bisphenol A. *P<0.05, **P<0.01 vs. normal food.

Bisphenol A 慢性曝露マウスにおける cocaine (2 mg/kg, s.c.) 誘発報酬効は B0 群において、 104.5 ± 104.1 sec であったが、B0.00003 群、B0.0003 群、B0.003 群ではそれぞれ 166.4 ± 118.6 、 280.1 ± 79.0 、 246.5 ± 70.9 sec であり、いずれの用量においても増強傾向が認められるものの、有意な報酬効果の増強は認められなかった。

【Morphine 誘発抗侵害効果に及ぼす影響】

Tail-flick 法を用いた morphine 5 mg/kg による抗侵害作用は妊娠期および授乳期に bisphenol A を処置したマウスにおいても有意な変化は認められなかった。また、warm-plate 法を用いた morphine 5 mg/kg による抗侵害作用は妊娠期および授乳期に bisphenol A を処置したマウスにおいても有意な変化は認められなかった。

【脳内 monoamine transporter および dopamine

受容体の変化]

脳内における dopamine transporter および vesicle monoamine transporter の mRNA およびタンパクレベルはコントロール群と比較して有意な変化が認められなかったのに対し、脳内の dopamine D₁ 受容体 mRNA レベルの有意な up-regulation が認められた。

D. 考察

本研究では、低用量の bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウスにおける methamphetamine 誘発報酬効果、自発運動促進作用およびその逆耐性形成の変化について行動薬理学的な検討を行った。

低用量 bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいて、コントロール群では有意な報酬効果の発現しない用量の methamphetamine によって著明な報酬効果が発現した。これらの結果より、低用量の bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により methamphetamine 誘発報酬効果は著明に増強されることが明らかとなった。

また、B0.00003 群および B0.00003 群においては、methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) 処置により、薬物無処置時と比較して有意な自発運動促進作用の増強が認められた。

一般に依存性薬物の報酬効果ならびに自発運動促進作用の発現には中脳辺縁 dopamine 神経系が深く関与することが知られている。また、methamphetamine は 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になっている。一方、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いるが、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明らかにされている。さらに 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が報告されている。本研究の結果とこれらの報告から、bisphenol A は estrogen と同様に dopamine 遊離

作用の増強ならびに dopamine の再取り込みを低下させることにより、methamphetamine 誘発報酬効果ならびに自発運動促進作用を増強した可能性が考えられる。すなわち、bisphenol A 慢性曝露により、自発運動や報酬効果発現に深く関与している中脳辺縁 dopamine 神経系の過剰興奮が誘導されるため、methamphetamine による dopamine 依存性の行動発現が著明に増強されたものと考えられる。しかしながら、methamphetamine の作用点である dopamine transporter や methamphetamine の作用発現に重要な役割を果たしている vesicular monoamine transporter の発現は bisphenol A 慢性曝露によって変化を受けなかった。また、低用量 bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露マウスにおいては、特に dopamine 神経活性に依存するような異常行動は認められなかった。これらの事実や、すでに我々が明らかにしているように、bisphenol A の単回処置によって methamphetamine によるいわゆる精神行動毒性に変化がなかったことから、bisphenol A は単に estrogen 受容体に結合して dopamine 神経の興奮を引き起こすばかりでなく、慢性曝露により、定常状態の dopamine 神経活性には大きな変化をもたらさないものの、活性化された dopamine 神経を持続的に過剰興奮させる可塑的な変化を引き起こしている可能性が考えられる。また、bisphenol A 慢性曝露によって dopamine 取り込み阻害作用を示す cocaine の行動変化には影響を与えなかったことや、morphine などのような間接的な dopamine 遊離を誘導する薬物による効果もまた有意な変化がなかったことから、直接的な dopamine 過剰遊離に伴ったシナプス後膜側の反応性の増大や negative feedback 機構の低下などの複雑な変化がこれらの反応を誘導しているものと推察される。

そこで、シナプス後膜において薬物による報酬効果発現に重要な関与を示すことが明らかにされている dopamine D₁ 受容体の mRNA の発現量を検討した結果、低用量の bisphenol A を妊娠期および授乳期に曝露したマウス脳内

dopamine D₁ 受容体 mRNA の有意な増加が認められた。従って、本研究で得られた methamphetamine 誘発数種薬理作用の増強に dopamine D₁ 受容体の増加が一部関与しているものと考えられる。

一方、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 受容体拮抗薬を前処置することや、serotonin を側坐核に投与すること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 δ -opioid 神経系の関与も示唆され、bisphenol A 慢性曝露により、これらの神経系の変化が複合的に引き起こっている可能性も無視できない。

以上、本研究において、低用量の bisphenol A 慢性曝露により methamphetamine 誘発報酬効果ならびに自発運動促進作用が増強することが明らかとなり、低用量であっても bisphenol A は胎児期における中枢神経系の発達に著明な影響を与える可能性が示唆された。

E. 結論

本研究の結果、低用量 bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により依存性薬物、特に methamphetamine の依存形成が増強されることが明らかとなった。また、このような bisphenol A の妊娠期および授乳期の曝露により精神依存形成に重要な役割を担う中脳辺縁 dopamine 神経系に変化が生じるものと推察される。

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、本研究で得られた結果は、こうした問題に一石を投じた貴重なものであると確信している。

F. 研究発表

発表論文

Narita, M, Aoki, T and Suzuki, T Molecular evidence for the involvement of NR2B subunit containing *N*-methyl-D-aspartate receptors in the development of morphine-induced place preference. *Neuroscience* **101**, 601-606, 2000

成田 年、青木 健、鈴木 勉 モルヒネ依存およびその報酬効果の形成機序—NMDA 受容体サブユニットの関与— *日薬理誌* **117**, 13-19, 2001

成田 年、鈴木 勉 モルヒネ依存の分子機構 *脳の科学* **22**, 417-425, 2000

成田 年、尾崎 覚、鈴木 勉 精神依存と耐性の分子機構:オピオイドを中心に *脳* **21** **4**, 9-18, 2001

Narita, M, Funada, M and Suzuki, T Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacology and Therapeutics* **89**, 1-15, 2000

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 に関する研究

神経系に及ぼす影響：脳内モノアミン動態に対する影響

分担研究者：船江良彦 大阪市立大学医学部教授

研究要旨：低用量ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン動態へ及ぼす影響を調べた。本年度の検討の結果、親へのビスフェノール A 投与によって、胎児期・乳児期に間接的にビスフェノール A の暴露を受けた仔マウスの脳では、脳内モノアミンの量には有意な変動は見られなかった。しかし、チロシン水酸化酵素やドパミン受容体の mRNA 発現量に変化が見られた。このことから、暴露されるビスフェノール A の量が低用量であっても、脳内のモノアミン動態に変化が起きていることが明らかとなった。脳内のモノアミン動態に変化がおきることにより、これらの仔動物において、脳内モノアミンが関与している脳高次機能（運動、感情や情動発現、脳報酬系）になんらかの影響を及ぼしている可能性が考えられた。

A. 研究目的：

ビスフェノール A (BPA) 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ある。BPA は、エストロジェンに比べ非常に弱いながらも、エストロジェン活性を有している事が知られており、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 BPA の胎児期・乳児期暴露による生体への影響を明らかにする事を目的としている。

我々の昨年度の研究から、胎児期・乳児期の BPA 暴露実験動物で、脳内ドパミン量に変化が生じ、脳内のモノアミン動態が変動している事が明らかとなった。脳内モノアミンは、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性疾患、また、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している可能性が考えられている。脳内ドパミン量は合成・代謝・取り込みによって複雑に制御され、さらに、ドパミン作用は、ドパミン量だけでなくドパミン受容体発現量によっても調節されている。このことから、昨年度の研究結果は、BPA 暴露が脳内モノアミン動態に変化をおこし、それらの動物の行動や情動に影響を及ぼしている可能性が示唆するものであった。本年度の研究では、BPA によるこのような中枢神経系への影響が、低用量の BPA 暴露によっても起きるのかを調べることを目的とした。本年度は、低用量の BPA 投与量を減らし、チロシン水酸化酵素やチトクロム P450 を含むドパミンの合成・分解酵素の発現量および脳内ドパミン量等の定量を行い、脳内ドパミン動態への影響の有無を検討した。

また、現在、化学物質の内分泌かく乱性の評価法としては、生殖機能・内分泌系への影響の指標となる、細胞質内に存在するエストロゲン受容体に対する結合親和性を測定する方法や、in vivo 投与でのエストロゲン様作用の測定などのいくつかの方法が広く行われている。昨年度の検討で、BPAは、エストロゲン受容体に対する結合親和性が低いにもかかわらず、神経系への影響が見られた。内分泌かく乱物質の神経系に対する影響の作用機序はまだ全く明らかにされていないが、昨年度のBPAの結果から、内分泌かく乱物質の内分泌系への影響と神経系への影響とでは、その作用機序が異なり、脳内ドパミン動態変動や行動異常など神経系に対する影響は、エストロゲン受容体とは異なる受容体様物質の存在を介して生じている可能性が強く示唆された。よって従来のエストロゲン受容体に対する試験方法では、モノアミン動態の変動や行動異常といった神経系に対する影響を評価することはできないと考えられ、神経系作用に対しては、新規に試験法の確立が必要であると考えられた。そこで、我々は、内分泌かく乱化学物質の神経系作用の作用機序を調べ、さらに神経系作用を評価するための簡便な in vitro 試験系を確立するために、本年度は、BPAの in vivo の胎児期・乳児期暴露でみられた「BPA暴露による脳内ドパミン量の減少」現象が、神経系細胞を用いた in vitro 試験系においても観察されるかどうかを検討した。

B 研究方法

[I]低用量ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による、脳内モノアミン動態へ及ぼす影響
ビスフェノール A (BPA) 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。

BPA 投与量は、昨年度の投与量より減量し、0.03、0.3、3 $\mu\text{g} / \text{g}$ of food とした。これら 3 種の投与群では、雄、雌各 7 匹の offspring を分けて、それぞれを一群とした。コントロール群は、正常食を親に摂食させた。offspring マウスは、離乳後親から離し、3 週間正常食で飼育した 6 週齢を用いた。6 週齢 offspring から、全脳を摘出し、直ちに正中二等分し、液体窒素を用いて凍結し保存した。実験動物の使用に関しては、当施設（大阪市立大学医学部実験動物実験施設）の倫理規定に基づき、動物への倫理的な配慮をおこなった。

(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) モノアミン動態および作用に関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量

半脳を用いて、モノアミン動態および作用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、DNase 処理を行った。さらに、逆転写酵素、ランダムプライマーを用いて、組織総 RNA に相補的な 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、特異的 DNA フラグメントを PCR で増幅し、増幅した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 Quantitative PCR (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水酸化酵素、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チトクロム CYP2D などのタンパク質を測定した。また、各サンプルの補正に用いる蛋白 mRNA としては、GAPDH を測定した。

[II]. 培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質の神経作用の検討

BPA の胎児期・乳児期暴露でみられた「BPA 暴露による脳内ドパミン量の減少」現象が、神経系細胞を用いた *in vitro* 試験系においても観察されるかどうかを検討した。神経系細胞としては、ラット副腎髄質由来の樹立細胞で、ドパミンの生成能を維持し、カテコールアミン系神経細胞のモデル細胞として研究によく用いられる PC12 細胞を用いた。PC12 細胞の細胞数を計算し、一定細胞密度になるよう細胞培養用ディッシュに播いた。37℃ 5% CO₂ 存在下で 24 時間培養し細胞が安定した後、細胞培養液を一定濃度の BPA が存在する新しい細胞培養液に交換した。BPA を含んだ細胞培養液で、37℃ 5% CO₂ 存在下で数時間培養後、細胞を回収し、細胞内のドパミン量を、HPLC および多電極型電気化学検出器を用いて測定した。

C 研究結果

[I] 低用量ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露

による、脳内モノアミン動態へ及ぼす影響

(1) 脳内のアミンの定量

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。

昨年度の結果では、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンといったこれら脳内モノアミンのうち、ドパミンが BPA 投与によって有意に減少した。しかし、本年度の低用量の BPA 投与では、昨年度のような明確な脳内モノアミン量の変動は見られなかった。

(2) タンパク質 mRNA の発現量の定量

6 週齢の雌雄 offspring マウスの半脳を用いて、モノアミン動態および作用に関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量を行った。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、チロシン水酸化酵素、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、ドパミンの D₄、D₂ 受容体、チラミンからドパミンを生成するチトクロム CYP2D の 5 種とした。

A) チロシン水酸化酵素 (TH)

BPA 投与群のうち、0.3 および 3 μg / g of food 投与群で、コントロール群に比して有意に増加した。昨年度の BPA 投与群においても、チロシン水酸化酵素 mRNA はコントロール群に比して有意に増加しており、本年度の結果は、昨年度の結果と一致している。しかし、BPA の投与量が 0.3 から 3 μg / g of food に増加しても、チロシン水酸化酵素 mRNA の増加量は大きく変化しなかった。また、0.03 μg / g of food では、チロシン水酸化酵素 mRNA はコントロール群に比して変化しなかった。

B) モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A)

BPA 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。この結果は昨年の結果に一致している。

C) ドパミン D4 受容体 (D4R)

チロシン水酸化酵素と同様に、BPA 投与群のうち、0.3 および 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ 投与群で、コントロール群に比して有意に増加した。昨年度の BPA 投与群においても、ドパミン D4 受容体 mRNA はコントロール群に比して有意に増加しており、本年度の結果は、昨年度の結果と一致している。また、BPA の投与量が 0.3 から 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ に増加しても、ドパミン D4 受容体 mRNA の増加量は大きく変化せず、0.03 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ ではコントロール群に比して変化しなかった。

D) ドパミン D2 受容体 (D2R)

BPA 投与群のうち、0.3 および 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ 投与群で、コントロール群に比して有意に減少した。しかし、BPA の投与量が 0.3 から 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ に増加しても、ドパミン D2 受容体 mRNA の減少量は大きく変化しなかった。また、0.03 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ では、ドパミン D2 受容体 mRNA はコントロール群に比して変化しなかった。

E) チトクロム CYP2D (CYP2D)

BPA 投与群のうち、0.3 および 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ 投与群で、有意な変化ではないものの、コントロール群に比してやや上昇傾向にあった。

これら mRNA の発現量の結果をまとめると、

チロシン水酸化酵素およびドパミン D4 受容体 mRNA 発現量は、0.3 および 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ の BPA 投与群でコントロール群に比して有意に増加した。ドパミン D2 受容体 mRNA 発現量は、0.3 および 3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ の BPA 投与群でコントロール群に比して有意に減少した。モノアミンオキシダーゼ A は、昨年度と同様に、BPA 投与で変化しな

かった。

[II]. 培養細胞を用いた内分泌かく乱化学物質の神経作用の検討

PC12 細胞を用いた *in vitro* 系においても、培地に含まれる BPA 濃度が高くなるに従って、PC12 細胞内のドパミン量が減少した。また、BPA 暴露時間依存的に、PC12 細胞内のドパミン量が減少する傾向にあった。

D 考察

本年度の低用量の BPA 暴露では、脳内モノアミン量に顕著な変化がみられなかった。しかし、脳内モノアミン動態および作用に関与する様々な蛋白の mRNA 発現量に、昨年度の結果と同じ変動が見られていることから、低用量の BPA 暴露においても、脳内モノアミン動態・作用に変化が起きている事が明らかとなった。本研究で用いた BPA 投与方法においては、BPA の 0.03 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ の暴露では、様々な蛋白の mRNA 発現量にコントロール群と比較して変化がなかったが、0.3 $\mu\text{g} / \text{g of food}$ 以上の暴露では、有意な変化が見られた。今後更に詳細な追加検討が必要ではあるが、これらの濃度付近に、BPA の神経作用の低限值があるのかもしれないと考えられた。また、PC12 細胞を用いた実験から、胎児期・乳児期 BPA 暴露によってみられるようなドパミン量の減少が、*in vitro* の培養細胞実験系においても BPA 濃度依存的に起きることが明らかとなった。胎児期・乳児期 BPA 暴露による脳内ドパミン減少現象と、この培養細胞での細胞内ドパミン減少現象が同じ作用機序であるかどうかは、今後更に検討が必要である。しかし、内分泌かく乱化学物質の神経系への作用機序が明らかになり、これら異なる二つ系の作用機序が同じ

である事が明らかになれば、このPC12細胞を用いて、内分泌かく乱化学物質の神経系作用の in vitro 試験法が確立出来ると考えられ、様々な化学物質の神経系に及ぼす影響の簡便なスクリーニングが可能となると考えられる。

E 結論

低用量のBPA暴露では、脳内モノアミン量に顕著な変化がみられないものの、脳内ドパミン動態・作用に関与する様々な蛋白のmRNA発現量に変動が見られ、ドパミン動態・作用に変化が生じていると考えられた。このことから、たとえ低用量であっても、胎児期・幼児期のBPA暴露が、出生・成長後の仔のドパミン系の神経作用になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。

F 研究発表

1. 論文発表

Hashizume T., Imaoka S., Hiroi T., Terauchi Y., Fujii T., Miyazaki H., Kamataki T., Funae Y.: cDNA cloning and expression of a novel cytochrome P450 (cyp4f12) from human small intestine., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 1135-41, 2001.

Imaoka S., Yoneda Y., Sugimoto T., Hiroi T., Yamamoto K., Nakatani T., Funae Y.: CYP4B1 is a possible risk factor for bladder cancer in humans., *Biochem. Biophys. Res., Commun.* 277: 776-80, 2000.

Nakamoto T., Hase I., Imaoka S., Hiroi T., Oda Y., Asada A., Funae Y.: Quantitative RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes: induction of CYP3A4 in lymphocytes and in liver by rifampicin., *Pharmacogenetics* 10:571-5,

2000.

Hase I., Imaoka S., Oda Y., Hiroi T., Nakamoto T., Asada A., Funae Y.: Area under the plasma concentration-time curve of inorganic fluoride following sevoflurane anesthesia correlates with CYP2E1 mRNA level in mononuclear cells., *Anesthesiology* 92:1661-6, 2000.

2. 学会発表

船江 良彦、廣井豊子 :ビスフェノールAの脳内モノアミンに対する作用、第74会日本薬理学会年会シンポジウム、2001年3月、横浜

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 の胎生期曝露により、チロシン水酸化酵素を有する黒質神経細胞数の有意な減少が胎齢 18 日、生後 2 週齢と 9 週齢において出現した。また parvalbumin 陽性の脳皮質神経細胞も生後 21 日齢にて有意な減少を示した。さらに mRNA レベルの検討により、dopamine β -hydroxylase、estrogen receptor(ER) α ならびに β の mRNA レベルが、生後 9 週齢で非投与対照群に比し有意に亢進した。

A. 研究目的

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(BPA)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 BPA 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、生後早期ならびに成熟期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も第二の目的である。

B. 研究方法

実験デザインは以下の二通りを用いた。

①妊娠初期から授乳期に至るまで BPA を経口投与する実験：雄性 ddY マウスには交尾前から、雌性マウスには交尾後から BPA を混餌(3 μ g/g of food)で与えたのち出生させ、授乳期間中（生後 3 週間）も母マウスに BPA を混餌として与え仔を育てさせた。その後は BPA を含まない飼料を与え生後 9 週齢で灌流固定、脳を取り出し試料とした。一部は全

脳より RNA を抽出したのち、real time PCR 装置にて dopamine β -hydroxylase (DBH)、tyrosine hydroxylase (TH)、glutamic acid decarboxylase (GAD)、estrogen receptor(ER) α 、ER β ならびに dopamine receptor D₄ (DRD4)各遺伝子の mRNA 量を測定した。脳新皮質ならびに黒質を含む連続切片を作成し、tyrosine hydroxylase(TH)やカルシウム結合蛋白(calbindinD28k, calretinin, parvalbumin)に対する免疫組織化学を施行した。

②妊娠 10 日目から BPA を経口投与する実験：BPA を混じた餌を妊娠 10 日目以降、母マウスに与えた群 (2 μ g/g of food ならびに 8mg/g of food) を作製し、胎齢 18 日では帝王切開によって胎仔を取り出し脳を採取固定、生後 2 ないし 3 週齢では灌流固定後に脳を取り出した。なお本実験でも生後 3 週間は母マウスに BPA を混餌として与え仔を育てさせた。固定した脳をパラフィン包埋し、その連続切片に対し TH やカルシウム結合蛋白に対する免

疫組織染色を施した。

①、②いずれの場合においても、定量的解析には camera lucida 装置を用いて免疫反応陽性細胞をカウントし、各群間での統計学的検定を行った。

(倫理面への配慮) 動物の取り扱いおよび処置については京都府立医科大学実験動物取扱ガイドラインを遵守し、動物愛護に十分配慮した。

C. 研究結果

胎齢 10 日目以降 BPA を投与した群より得た仔では、TH 陽性黒質神経細胞数 (8mg/g of food) が胎齢 18 日 (図 1, 2)、生後 2 週齢で、また大脳皮質 parvalbumin (PV) 陽性神経細胞が生後 21 日齢で有意に減少した (2µg/g of food 群ならびに 8mg/g of food 群)。妊娠全期間ならびに授乳期間中に BPA を投与した群 (3 µg/g of food) の雌では、生後 9 週齢 (図 3) で TH 陽性黒質神経細胞密度が有意に減少した。

図 1. 胎齢 18 日黒質 TH 免疫組織化学

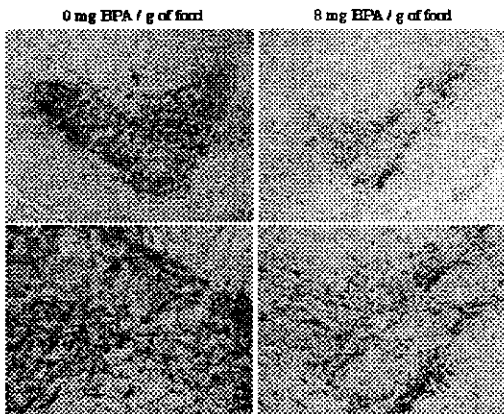
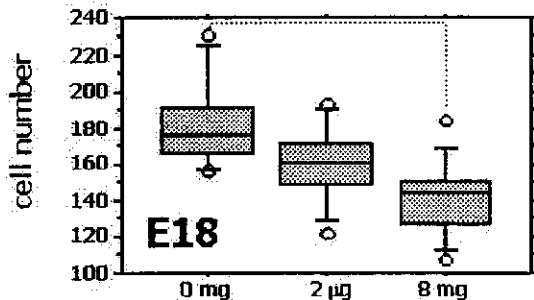
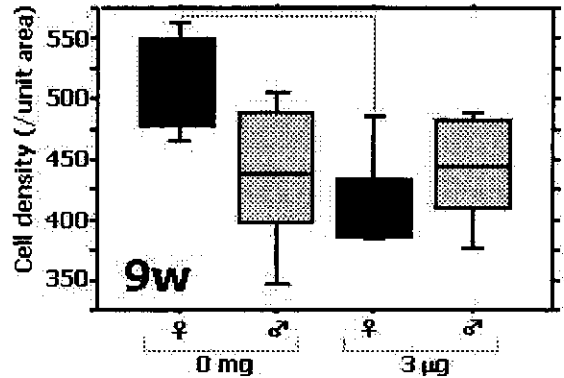


図 2. 黒質 TH 陽性細胞数



破線で結ばれた群間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

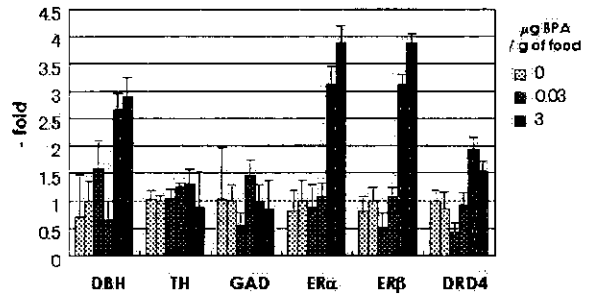
図 3. 黒質 TH 陽性細胞密度



破線で結ばれた群間で統計学的有意差 ($p < 0.05$) を認めた。

またこれらの動物 (雌) では、dopamine β -hydroxylase、ER α ならびに ER β の mRNA レベルが生後 9 週齢で有意に亢進していた (図 4)。

図 4. 全脳における各 mRNA 種の相対的発現量の比較



D. 考察

TH 陽性黒質神経細胞密度の減少が生後 9 週齢という BPA 投与中止後 6 週を経た時点で認められたことから、この変化は不可逆的な胎生期の変化に由来することが推定されたが、事実、胎生期において黒質 TH 陽性神経細胞数を調べると減少していた。また PV 陽性大脳皮質神経細胞数の減少がみられたことは GABA 作動性 interneuron への BPA の影響を示している。胎齢 18 日において、calbindinD-28k 陽性大脳皮質神経細胞数が BPA 投与群にて統計学的有意差はみられ

なかったものの減少傾向を示したことは、これらの細胞が PV 陽性大脳皮質神経細胞と同様に GABA 作動性であることから、GABA 作動性神経細胞は BPA 投与による影響を受けやすいことを示唆するかもしれない。

黒質にせよ大脳皮質にせよ、ある特定の神経細胞群の選択的変化が一体どのようなメカニズムにより現れるのか現時点では全く不明であるが、生後 9 週齢 BPA 投与群雌で ER α 及び ER β mRNA の発現が亢進していたこと、また ER α ならびに ER β の脳内での発現が選択的であり、黒質や大脳皮質には ER β が強く発現するとの過去の報告を勘案すると、BPA の作用機序として ER の関与する可能性が示唆される。

今回の一連の定量的解析により、特定の脳領域の神経細胞群に変化が見られたこと、しかも mRNA レベルでの変動が成熟脳においても観察されたことから、胎児・幼児への BPA 曝露は、脳形成に影響を及ぼすのみならず、その後の成熟過程にも影響を残すことが明らかとなった。しかし本研究においてマウスに変化をもたらした投与量は、ヒトの BPA 日常曝露レベルに比しはるかに高いため、今回の成果をそのままヒトに外挿することはできない。

E. 結論

胎齢 10 日目以降 BPA 8mg/g of food を投与した群では TH 陽性黒質神経細胞数が胎齢 18 日、生後 2 週齢で有意に減少した。また生後 21 日齢雌で大脳皮質 PV 陽性神経細胞数が 2 μ g/g of food ならびに 8mg/g of food 群において有意な減少を示した。妊娠全期間から授乳期に至るまで BPA を投与された雌 (3 μ g/g of food) では、生後 9 週齢で黒質 TH 陽性神経細胞密度が有意に減少した。つまり本研究によって、ドーパミン系ならびに GABA 系神経細胞に対する BPA の影響が明確に示された。

また妊娠期間中から授乳期にかけて BPA を投与されていた生後 9 週齢雌の全脳で、ER α と ER β の mRNA レベルが有意に亢進していた。

BPA 投与が中止されてから 6 週を経過した時点であるにもかかわらず mRNA レベルでのこのような変化が見られることは特記すべきことと考えられる。今後はこのような変化がいつ頃から出現するのか、週齢を遡って検討を進めたい。

F. 研究発表

1. 論文発表

本研究成果自体を報告する論文は現在準備中である。

Shiga K, Fushiki S. Proliferative capacity persists most tenaciously in the murine proximal rostral migratory stream. *Acta Histochem Cytochem* 33: 275-9, 2000.

Tsutsumi Y, Fushiki S. Comparison of cell kinetics between the boundary and the interboundary areas during hindbrain segmentation in the chick embryo. *Acta Histochem Cytochem* 33: 141-7, 2000.

Morimoto S, Sasaki S, Miki S, Kawa T, Nakamura K, Itoh H, Nakata T, Takeda K, Nakagawa M, Fushiki S. Nitric oxide is an excitatory modulator in the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Hypertens* 13: 1125-34, 2000.

Saiwaki T, Shiga K, Fukuyama R, Tsutsumi Y, Fushiki S. A unique junctional palindromic sequence in mitochondrial DNA from a patient with progressive external ophthalmoplegia. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 53: 333-5, 2000.

Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Yanagisawa K, Nakajima K, Fushiki S. Age-dependent decline in the apolipoprotein E level in cerebrospinal fluid from control subjects and its increase in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Eur Neurol* 43: 161-9, 2000.

Kitaya K, Yasuda J, Yagi I, Tada Y, Fushiki S, Honjo H. IL-15 expression at human

- endometrium and decidua. *Biol Reprod* 63:683-7,2000.
- Tomiyasu K, Oda Y, Nomura M, Satoh E, Fushiki S, Imanishi J, Kondo M, Mazda O. Direct intra-cardiomuscular transfer of β_2 -adrenergic receptor gene augments cardiac output in cardiomyopathic hamsters *Gene Ther* 7: 2087-93, 2000.
- Fukuyama R, Mizuno T, Mori S, Nakajima K, Fushiki S, Yanagisawa K. Age-dependent change in the levels of A β 40 and A β 42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of A β 42 to A β 40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients. *Eur Neurol* 43: 155-60, 2000.
- Tamai M, Okajima S, Fushiki S, Hirasawa Y. Quantitative analysis of neural distribution in human coracoacromial ligaments. *Clin Orthop* 373:125-34, 2000.
- Fukuyama R, Ohta M, Ohta K, Saiwaki T, Fushiki S, Awaya A. A synthesized pyrimidine compound, MS-818, promotes walking function recovery from crush injury of the sciatic nerve through its indirect stimulation of Schwann cells. *Restor Neurol Neurosci* 17: 9-16, 2000.
- Wei YP, Kita M, Shinmura K, Yan XQ, Fukuyama R, Fushiki S, Imanishi J. Expression of IFN- γ in cerebrovascular endothelial cells from aged mice. *J Interferon Cytokine Res* 20:403-9, 2000.
- Arai Y, Kubo T, Fushiki S, Mazda O, Nakai H, Iwaki Y, Imanishi J, Hirasawa Y. Gene delivery to human chondrocytes by an adeno associated virus vector. *J Rheumatol* 27: 979-82, 2000.
- Inaba M, Fushiki S, Yaoi T, Iwata T, Kamoi K, Okihara K, Ukimura O, Kawauchi A, Miyashita H, Kojima M, Miki T. Changes in extracellular matrix components of bladder detrusor in relation to bladder hypertrophy and compliance in patients with benign prostatic hyperplasia. *Acta Histochem Cytochem* 33: 131-9, 2000.
- Matsushita H, Takeuchi Y, Kosaka K, Fushiki S, Kawata M, Sawada T. Changes in nitric oxide synthase-containing neurons in the brain of thiamine-deficient mice. *Acta Histochem Cytochem* 33: 67-72, 2000.
- 佐々木征行、橋本俊顕、島田司巳、飯沼一宇、伏木信次、高野知行、岡 鉄次、近藤郁子、三池輝久、アンケートによる片側巨脳症全国調査。 *脳と発達* 32: 255-60, 2000.
2. 学会発表
- 伏木信次：脳神経系の形成・成熟に及ぼすビスフェノール A の影響に関する病理学的解析、シンポジウム「内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への影響」、第 74 回日本薬理学会年会、2001 年 3 月 22 日、横浜市。
- 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