

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Y. Nakashima, S. Ikegami: Guar gum reduces trichloroethylene accumulation in the body by reducing TCE absorption and fat tissue mass, J. Agr. Food Chem., 49, 3499-3505(2001)
- 2) X. Wang, J. Wu, Y. Ishida, Y. Muto, N. Ohishi, K. Yagi, S. Ikegami, T. Shinki, N. Udagawa, T. Suda, Y. Ishimi: Effects of geranylgeranoic acid in bone: Induction of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation, J. Bone Min. Research, 47, 91-100 (2002)

2. 学会発表

- 1) 東泉裕子、井下礼子、小菅美樹、山本美樹、中嶋洋子、石見佳子、池上幸江：母親ラットからの胎児・乳児期のゲニステイン暴露の影響：第55回日本栄養食糧学会、平成13年5月7日、京都
- 2) 石見佳子、吉田美紀、脇元聡子、呉堅、千葉大成、王新祥、池上幸江、武田健、宮浦千里：男性の骨粗鬆症モデルマウスの骨量減少に対する大豆イソフラボンの効果：第55回日本栄養食糧学会、平成13年5月7日、京都
- 3) S. Ikegami, Y. Tosen, M. Yamamoto, Y. Nakashima, Y. Ishimi: Hormonal effects of soy isoflavones on pregnant and lacteal rats, and their suckling pups, 17th Int. Congress of Nutrition 2001, August 27-31, Vienna, Austria

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

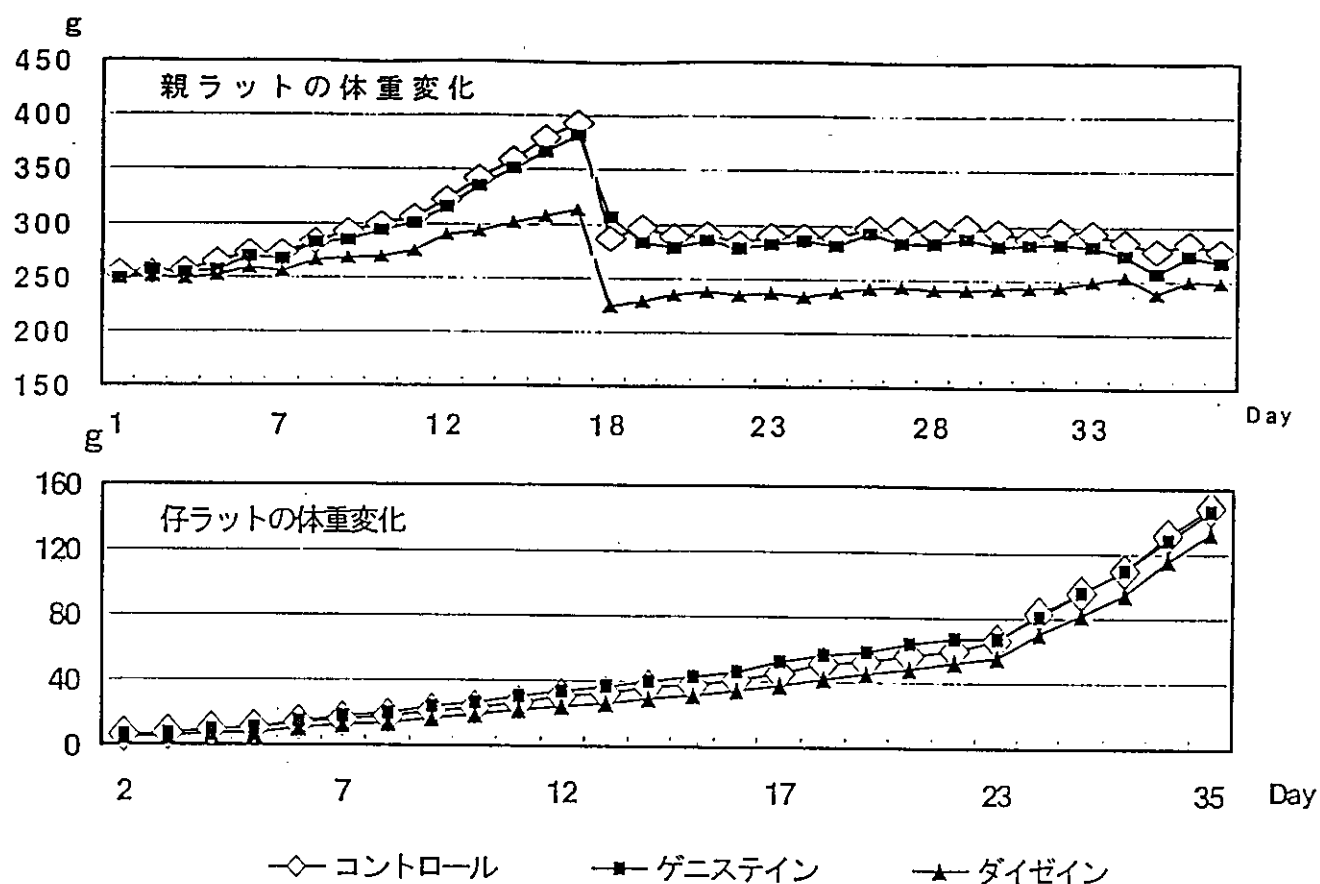


図1 ラットの体重増加量に対するゲニステイン・ダイゼイン暴露の影響

表1 親ラットの臓器相対重量に対する ゲニステイン・ダイゼイン暴露の影響

	コントロール	ゲニステイン	ダイゼイン
出産前の体重	393±22 ^a *	387±24 ^a	313±37 ^b
解剖前の体重	277±9 ^a	267±17 ^a	248±12 ^b
肝臓	3.97±0.11 ^a	4.57±0.25 ^b	5.19±0.21 ^c
腎臓	0.71±0.02	0.67±0.04	0.73±0.03
脾臓	0.20±0.01 ^a	0.22±0.01 ^b	0.26±0.01 ^c
胸腺	0.08±0.00 ^a	0.05±0.00 ^b	0.03±0.00 ^c
肺	0.40±0.01	0.40±0.02	0.43±0.02
心臓	0.37±0.01 ^a	0.30±0.02 ^b	0.30±0.00 ^b
脂肪組織	0.41±0.01 ^a	0.58±0.03 ^b	0.14±0.01 ^c
卵巣	0.04±0.00 ^a	0.05±0.00 ^a	0.03±0.00 ^b
子宮	0.12±0.02 ^a	0.17±0.02 ^b	0.11±0.02 ^a

* 平均値±標準偏差

(g/100gB.W)

表2 仔ラットの臓器相対重量に対するゲニステイン、ダイゼイン暴露の影響

後15日目

	雄			雌		
飼料	コントロール	ゲニステイン	ダイゼイン	コントロール	ゲニステイン	ダイゼイン
体重	42.2±3.4 ^a	41.5±2.0 ^a	34.2±2.7 ^b	41.7±3.5 ^a	41.7±1.9 ^a	32.7±2.6 ^b
肝臓	2.91±0.33	2.69±0.11	2.74±0.13	2.90±0.20	2.91±0.04	2.75±0.02
胸腺	0.30±0.02	0.30±0.05	0.31±0.04	0.31±0.04	0.35±0.04	0.33±0.05
脾臓	0.35±0.02	0.35±0.06	0.36±0.07	0.34±0.02	0.35±0.04	0.39±0.05
精巣	0.36±0.02	0.33±0.02	0.45±0.10			
子宮				0.08±0.00	0.09±0.01	0.09±0.01
脂肪組織	0.42±0.02 ^a	0.45±0.02 ^a	0.30±0.07 ^b	0.38±0.07	0.34±0.04	0.30±0.08
大腿骨湿重量	0.30±0.01	0.33±0.00	0.34±0.01	0.31±0.01	0.32±0.02	0.34±0.03

(g/ 100gB.W)

表3 親ラットの血中甲状腺ホルモン濃度に対するゲニステイン、ダイゼインの影響

飼料	コントロール	ゲニステイン	ダイゼイン
T3	1.00± 0.00	1.00± 0.08	1.00± 0.08
T4	41.3± 0.30	49.0± 0.61	46.5± 0.25
TSH	4.68± 2.86	6.03± 0.85	5.10± 0.94

(ng/ml)

表4 仔ラットの血中甲状腺ホルモン濃度に対するゲニステイン、ダイゼインの影響

飼料		コントロール	ゲニステイン	ダイゼイン
雄	T3	1.18± 0.05	1.15± 0.06	1.20± 0.00
	T4	60.3± 1.32	50.5± 0.42	55.3± 0.34
	TSH	6.00± 0.38	5.53± 0.83	5.83± 1.52
雌	T3	1.20± 0.10	1.23± 0.06	1.23± 0.10
	T4	52.0± 0.70	57.7± 0.75	61.5± 0.62
	TSH	5.90± 0.75	5.70± 1.45	5.10± 1.74

(ng/ml)

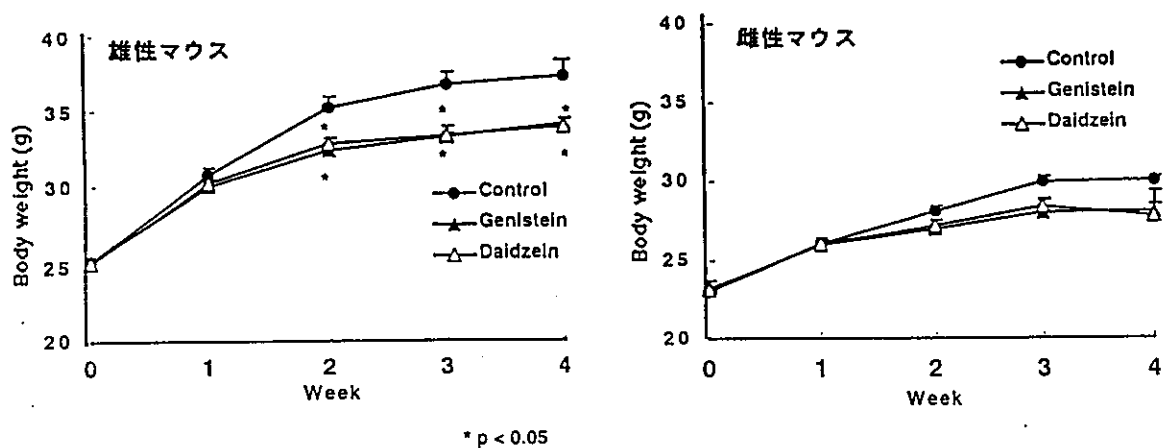


図2 成長期マウスの体重変化に対する大豆イソフラボンの影響

表5 成長期マウスの体重増加量、飼料摂取量及び飼料効率に対する大豆イソフラボンの影響（雄性）

	control	Genistein	Daidzein
体重増加量(g)	12.48±1.13	9.30±0.62 ^a	9.11±0.61 ^a
飼料摂取量(g/4W)	119.95±1.16	122.65±1.78	118.41±1.80
(g/day)	4.44±0.04	4.54±0.07	4.39±0.07
(g/B.M./day)	0.12±0.00	0.13±0.00 ^a	0.13±0.00 ^a
飼料効率(%)	10.40±0.91	7.60±0.52 ^a	7.70±0.51 ^a

a : control に対して有意差あり

表6 成長期マウスの体重増加量、飼料摂取量及び飼料効率に対する大豆イソフラボンの影響（雌性）

	control	Genistein	Daidzein
体重増加量(g)	6.98±0.42	4.83±1.67	4.69±1.05
飼料摂取量(g/4W)	110.01±1.58	111.42±1.26	113.18±1.26
(g/day)	4.07±0.06	4.13±0.05	4.19±0.05
(g/B.M./day)	0.14±0.00	0.15±0.01	0.15±0.01
飼料効率(%)	6.34±0.34	4.38±1.51	4.16±0.93

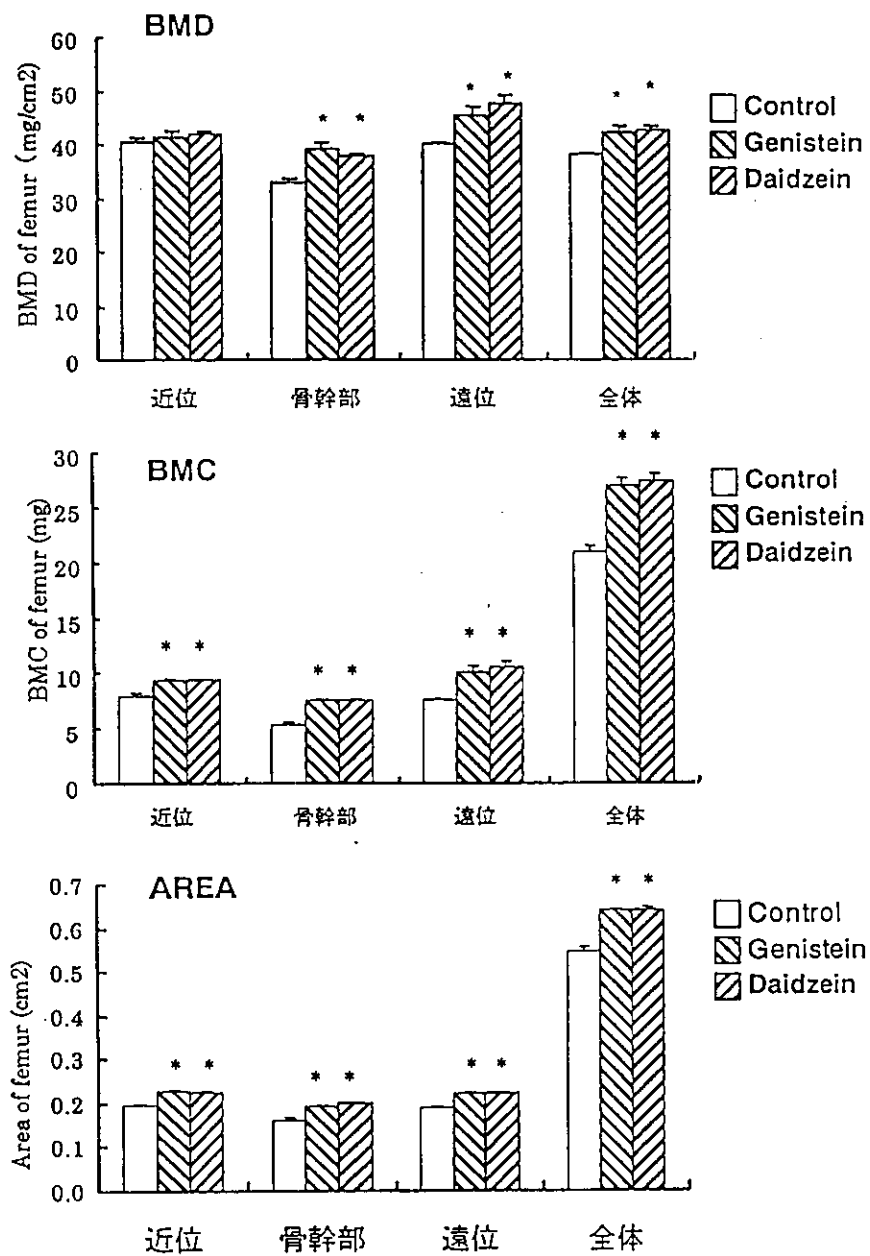


図3 成長期マウスの大腿骨の骨量に対する大豆イソフラボンの効果 (雄性)

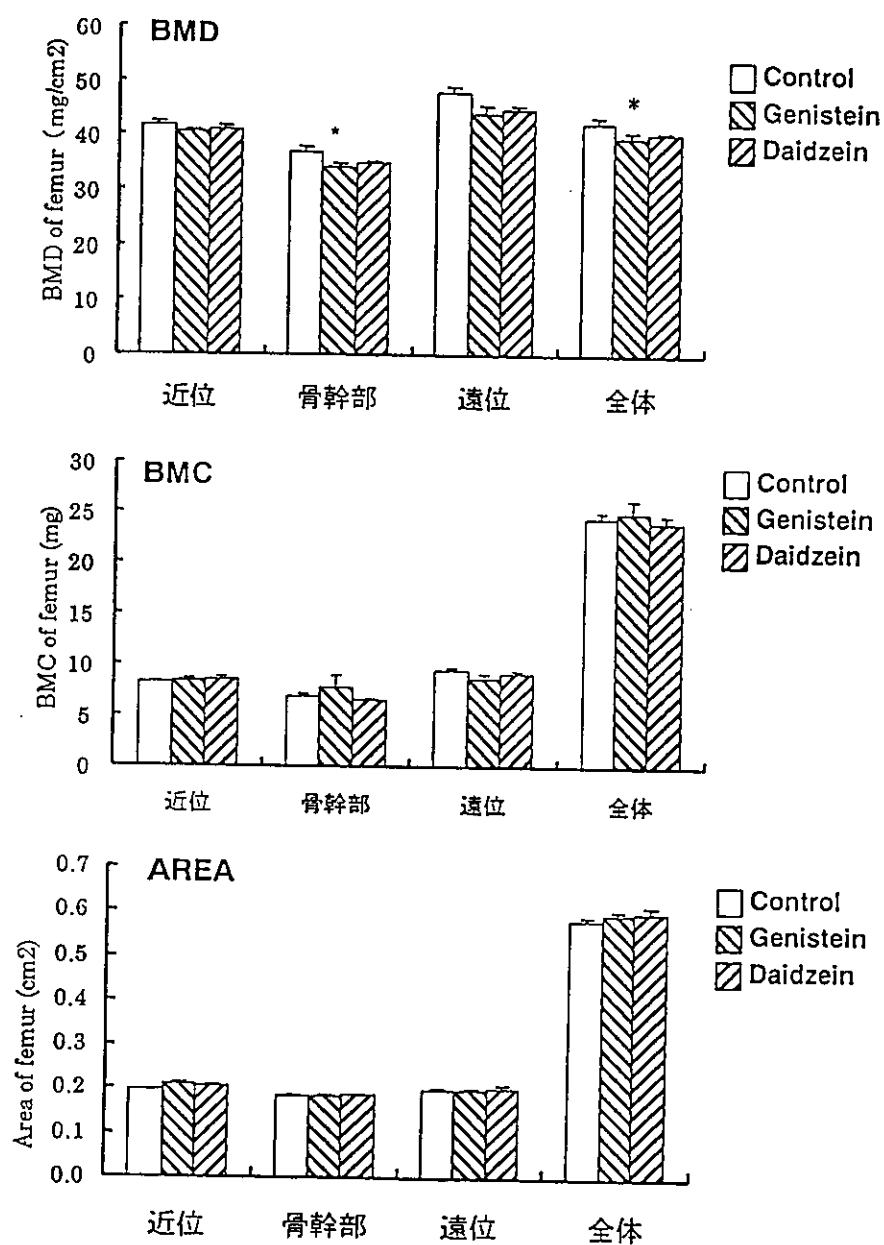


図 4 成長期マウスの大腿骨の骨量に対する大豆イソフラボンの効果 (雌性)

平成 13 年度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 nonylphenol 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、nonylphenol 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 nonylphenol 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 nonylphenol (NP) を基礎飼料に 2、200、2000 ppm の濃度で混じ 11 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、6 週齢より N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) を 2000ppm の濃度で飲水に混じ 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査

を行った。また、BHP 投与を行わない動物群を設定し、母動物の妊娠、出産、授乳期間を通して投与された NP が仔の成長、性成熟、甲状腺機能に与える影響も検索した。なお、性成熟の指標としては、雄では包皮の開裂時期を、雌では膣開口時期を指標とした。

（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

本実験条件下では、NP は母ラットの妊娠期間や出産胎仔数や出生仔の体重などに影響を与えなかった。また母ラットの血中 TSH、T3、T4 値には各群間有意差はみられなかった。BHP を投与しない雌雄の仔ラットに腫瘍の発生はみられず、成長や性成熟に影響はみられなかった。仔ラットの 26 週齢における血中 TSH、T3、T4 値の検索の結果、雄では NP 投与群で T4 値の有意な増加がみられたが、T3、

TSH は各群間に有意差はみられなかった。雌においては 2 ppm NP 投与群で T4 の増加、2000 ppm NP 投与群で T4 の低下がみられたが、T3、TSH は各群間に有意差はみられなかった。甲状腺には組織学的に明らかな変化はみいだされなかった。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、NP 投与による、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。

D. 考察

本実験条件下において NP は、ラットの妊娠、出産に影響を与えることはなく、甲状腺機能に対しても毒性はみられないことが示された。また、これらの雌ラットより生まれた仔ラットにおいては、血中 T4 値に NP 投与群で対照群に比較し差異があるものの、T3、TSH 値に有意差はなく、明らかな甲状腺機能異常をきたす作用はないと考えられるが、動物数を増やし再検索する必要がある。甲状腺を含む肺、肝、食道、胸腺の発癌には、経胎盤的、経乳汁的に投与された NP が有意な発癌修飾作用を示すことはなく、NP 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関与する可能性は乏しいことが示された。

E. 結論

Wistar 系雌ラットに NP を 2 ppm、200ppm、2000ppm の濃度で飼料に混じり 11 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。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、NP 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、NP の暴露が次世代ラットの成長や性成熟の障害、甲状腺機能異常および肺、甲状腺、食道、肝、胸腺の発癌感受性亢進に関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, 87-98, 2001 .

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 慢性曝露による神経行動毒性発現と dopamine および serotonin 受容体の可塑的变化
：曝露時期の影響

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：本研究では、妊娠初期から授乳期にかけて bisphenol A を慢性曝露する時期を分けたマウスを用いて、bisphenol A の中枢神経系に対する影響を行動薬理学的ならびに生化学的に検討した。Bisphenol A を妊娠期から授乳期にわたり慢性曝露されたマウスでは、普通飼料で飼育された対照群（B0 群）では全く報酬効果が認められない用量の morphine（MRP）により、著明な報酬効果が観察された。そこで、妊娠期から授乳期のうち、どの期間の bisphenol A の慢性曝露が中枢神経系に影響を及ぼすのかについて検討するために、bisphenol A を妊娠初期（B-2 群）、器官形成期（C-2 群）、周産期（D-2 群）および授乳期（E-2 群）にそれぞれ曝露されたマウスを用いて同様の検討を行なった。その結果、C-2 群および E-2 群においては、MRP ならびに methamphetamine（MAP）により誘発される報酬効果の著明な増強が認められた。さらに、MRP により誘発される自発運動促進作用においても、C-2 群および E-2 群においてのみそれらの作用の著しい増強が観察された。一方、これらのマウスから得られた前脳辺縁部の膜分画標本を用いて、dopamine 刺激による G-タンパク質活性化作用を検討したところ、C-2 群において有意な G-タンパク質活性化作用の増強が引き起こされた。これらの結果から、胎児期、中でも特に器官形成期ならびに授乳期における bisphenol A の慢性曝露が、dopamine 神経系の機能亢進を誘導し、一般行動異常や MRP および MAP による薬理作用の増強を引き起こしている可能性が示唆された。一方、妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A を慢性曝露されたマウスの行動観察において、B0 群と比較して新規環境下における脱糞数の増加、すなわち不安状態が惹起された。さらに、C-2 群および E-2 群においても、新規環境下における脱糞数の有意な増加が認められた。そこで、これらのマウスを用いて、serotonin 5-HT_{1A} 受容体作動薬である buspirone ならびに benzodiazepine 系薬物である diazepam の抗不安作用に及ぼす影響について検討したところ、buspirone の抗不安作用は D-2 群および E-2 群において有意に減弱し、diazepam の抗不安作用は、C-2 群および E-2 群において有意に減弱した。さらに、これらのマウスから得られた視床下部膜分画標本を用いて、5-HT_{1A} 受容体作動薬である carboxamidotryptamine（5-CT）による G-タンパク質活性化作用を検討したところ、C-2 群では対照群と比較して G-タンパク質活性化作用のさらなる増強、および D-2 群ならびに E-2 群では 5-CT による G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。これらの結果から、妊娠期ならびに授乳期における bisphenol A の慢性曝露により不安神経障害が惹起され、その原因の一部には視床下部領域における 5-HT₁ 受容体の機能低下が関与している可能性が示唆された。また、不安神経障害を引き起こす神経変性は周産期ならびに授乳期における bisphenol A の慢性曝露が特に重要である可能性が示唆された。以上、本年度の研究成果より、妊娠初期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露は、主に脳の発達過程において重要な期間である器官形成期および神経系の発達に重要な期間である周産期ならびに授乳期において、dopamine 神経系ならびに serotonin 神経系に可塑的变化をもたらし、異常行動ならびに不安神経障害の惹起、さらには依存性薬物の精神依存性

を増強させる可能性が示唆された。

A. 研究目的

近年、環境中に存在するいくつかの化学物質は、生体内に取り込まれることにより、内分泌系に影響を及ぼすことが明らかにされている。このような物質は内分泌かく乱化学物質 (endocrine disruptor) と呼ばれ、生殖系ならびに免疫系に対して影響を及ぼすことが数多く報告されている。さらに最近では、内分泌かく乱化学物質の中樞神経系に及ぼす影響も懸念されており、我が国のみならず世界中で深刻な社会問題を引き起こしている。

内分泌かく乱化学物質の一つである bisphenol A は、phenol と acetone から合成され、主にプラスチック製の食品容器や歯科用医療品などに使用されているが、加熱により容易に溶出することが知られている。また、bisphenol A は受容体結合実験において estrogen 受容体に対する親和性を有すること、 17β estradiol と比較すると約 1500 分の 1 程度と弱いものの estrogen 作用を示すこと、さらには血漿中の testosterone 濃度の減少を引き起こすことなどが報告されており、bisphenol A の慢性曝露による生体への影響が懸念される。

一方、我々は前年度までに妊娠初期から授乳期にわたり bisphenol A を慢性曝露された親マウスから生まれた仔マウスでは、依存性薬物、特に覚せい剤である methamphetamine (MAP) の精神依存形成が増強されることを明らかにしており、その原因の一部として、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ている可能性を示唆している。しかしながら、妊娠初期から授乳期の期間のうち、どの期間が bisphenol A の慢性曝露による dopamine 神経系の変性に重要な役割を果たしているかについてはいまだ明確になっていない。

また、我々は bisphenol A を妊娠期から授乳期にわたり慢性曝露された親マウスから生まれた仔マウスでは、dopamine 神経系や serotonin 神経系の関与が示唆される head movement, aggression,

spinning syndrome, circling などの異常行動が認められることも明らかにしていることから、胎児期における bisphenol A の慢性曝露により、dopamine 神経系のみならず serotonin 神経系にも何らかの変化が生じている可能性が想定される。

このような bisphenol A の慢性曝露による中枢神経系の機能変化が、どの期間の曝露により引き起こされるかについて詳細に検討することは、内分泌かく乱化学物質問題の対策を考える際に大変重要な意味を持つと考えられる。そこで、本年度は妊娠初期から授乳期にかけて bisphenol A を曝露する時期を分けたマウスを用い、bisphenol A の慢性曝露による dopamine 神経系および serotonin 神経系への影響について行動薬理学的ならびに生化学的検討を行なった。

B. 研究方法

【使用動物および飼育条件】実験動物としては ddY 系雄性マウス (東京実験動物) を用いた。実験には、昨年度と同様妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A を慢性曝露した親マウスから生まれた仔マウス、ならびに妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ混餌により処置し、上記期間以外は普通飼料にて飼育した親マウスから生まれた仔マウスを使用した。また、本研究では離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育してから実験に使用した。マウスはプラスチック製ケージにて飼育し、室温 23 ± 1 °C の恒温室にて、8:00 点燈、20:00 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 の慢性曝露は薬物混入飼料法に従って行なった。昨年度と同様、妊娠初期から授乳期にわたり bisphenol A 0.002、0.5 および 2 mg/g of food を混餌により慢性曝露した。さらに、今年度はどの期間の

bisphenol A の慢性曝露が、中枢神経系に影響を及ぼすのかについて検討するために、bisphenol A (2 mg/g of food) を、妊娠0日目から6日目までの妊娠初期 (B-2 群)、妊娠6日目から15日目までの器官形成期 (C-2 群)、妊娠15日目から分娩日までの周産期 (D-2 群) および分娩日から分娩後21日目までの授乳期 (E-2 群) にそれぞれ混餌により処置し、上記期間以外は普通飼料にてそれぞれ飼育した。なお、すべての期間を普通飼料にて飼育したマウスを対照群 (A 群) とし、各群9-10匹として使用した。

【使用薬物】実験には morphine hydrochloride (三共製薬)、methamphetamine hydrochloride (大日本製薬)、buspirone hydrochloride (SIGMA) および diazepam (Profarma) を使用した。Morphine hydrochloride、methamphetamine hydrochloride および buspirone 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.) あるいは腹腔内 (i.p.) に投与した。Diazepam は原末を 9% Tween 80 (和光純薬) 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。

【実験方法】

1. Morphine 誘発自発運動促進作用

妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび普通飼料により飼育されたマウスに、morphine 10 mg/kg を皮下投与し、投与後 10 分間隔で計 180 分間にわたり自発運動量を測定した。自発運動量の測定には tilting cage 法を用い、マウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、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、このカウント数を自発運動量とした。なお、マウスを新しい環境に適應させるために、薬物投与前に 60 分間バケツ型ケージ内に放置した。各時間の自発運動量および 180 分間の総自発運動量はすべて平均値±標準誤差

として表示した。各群間における統計学的有意差検定には、二元配置分散分析を用い、各時間での比較は一元配置分散分析のあと Bonferroni/Dunn の多重比較検定を用いた。

2. Morphine ならびに methamphetamine 誘発報酬効果

妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび普通飼料により飼育されたマウスにおける morphine および methamphetamine 誘発報酬効果は、条件づけ場所嗜好性試験 (conditioned place preference: CPP 法) に従って測定した。CPP 法では、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と黒の 2-コンパートメントボックス (15×30×15 cm) を用いた。条件づけは、カウンターバランス方式に従い、morphine (1 mg/kg) および methamphetamine (0.5 mg/kg) 投与後、白あるいは黒のいずれか一方の区画に、また翌日にはその溶媒である生理食塩液を投与し他方の区画に 60 分間閉じ込め、これらの操作をそれぞれ計 3 回 (6 日間) 繰り返して条件づけを行った。条件づけ最終日の翌日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白および黒区画への滞在時間を 15 分間測定した。実験結果は、薬物で条件づけした区画への滞在時間 (sec) から生理食塩液で条件づけした区画への滞在時間 (sec) を引いた値を算出し、この値がプラスであれば報酬効果を、マイナスであれば嫌悪効果を発現したとして評価した。なお、各群の値は平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は一元配置分散分析のあと、Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行なった。

3. Dopamine ならびに 5-carboxamidotryptamine 誘発 G-タンパク質活性化作用

妊娠初期から授乳期の各期間にそれぞれ

bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび普通飼料により飼育されたマウスから、側坐核を含む前脳辺縁部あるいは視床下部を摘出し、細胞膜分画標本を作製した。膜分画標本を dopamine あるいは serotonin 5-HT_{1A/1B} 受容体作動薬である 5-carboxamidotryptamine (5-CT) と guanosine diphosphate (GDP) および ³⁵S でラベルした GTP の非水解性アナログである guanosine-5'-O-(3-thio) triphosphate (GTPγS) を含む assay buffer にて、25℃ で2時間インキュベートした。その後、濾過、洗浄を行い、Solvent-350 および Hionic Fluor を含む scintillation counting vial に移し、室温で12時間放射活性を測定した。

4. 新規環境下における脱糞数の検討

妊娠初期から授乳期の各期間にそれぞれ bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび普通飼料により飼育されたマウスを行動観察用ケージに1匹ずつ入れ、10分間におけるマウスの脱糞数を測定した。なお、各群の値は平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は一元配置分散分析のあと、Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行なった。

5. 明暗試験における buspirone 誘発抗不安作用

Serotonin 5-HT_{1A} 受容体作動薬である buspirone による抗不安作用の評価は明暗試験法に従い、縦18×横31×高さ18 cm のアクリル製シャトルボックスを使用した。この装置は白側の区画が縦18×横18×高さ18 cm、黒側の区画が縦18×横13×高さ18 cm となっており、上下に移動可能な仕切り板により分割された白・黒の2-コンパートメントボックスである。また、仕切り板中央には縦5×横5 cm の穴が開いており、マウスが両区画を自由に行き来できる環境になっている。妊娠初期から授乳期の各期間にそれぞれ bisphenol A を混餌により処置されたマウスおよび普通飼料により飼育されたマウスに、buspirone 1 mg/kg および生理食塩液の腹腔内投与後、黒側の区画に入れ、10分間における白側の区画への

滞在時間を測定した。実験結果は、生理食塩液処置による白側の区画への滞在時間を100%とした時の buspirone 処置による白側の区画への滞在時間の割合として表した。また、buspirone を処置した動物の白側の区画への滞在時間が100%以上であれば、buspirone による抗不安作用の発現が認められたとして評価した。なお、各群の値は平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は一元配置分散分析のあと、Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行なった。

6. Vogel 型コンフリクト試験における diazepam 誘発抗不安作用

抗コンフリクト (葛藤) 作用の測定には、縦18×横12×高さ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給水瓶のノズルを20回なめるごとに1回与えられるように設定し、電流は0.35 mA、通電時間は200 msec とした。実験開始前に、あらかじめマウスを24時間絶水させ、その翌日に装置内で電気刺激を与えない条件下でマウスに10分間自由に飲水させた。その後、3日間は水および餌を自由に摂らせた環境で飼育し、再度24時間絶水させた翌日にテストを行なった。テスト時には、給水瓶を20回なめるごとに1回の電気刺激が与えられるように設定した条件下で、24時間絶水させたマウスを装置内で10分間自由に水を飲ませ、その時にマウスが受けた電気刺激の回数を測定した。なお、テストは diazepam 0.5 mg/kg を皮下投与した30分後に行なった。各群の値は平均値±標準誤差で表示し、統計学的有意差検定は一元配置分散分析のあと、Bonferroni/Dunn の多重比較検定を行なった。

【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

1. Morphine 誘発自発運動促進作用に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ bisphenol A (2 mg/g of food) を曝露されたマウスを用いて、morphine (10 mg/kg, s.c.) により誘発される自発運動促進作用について検討したところ、器官形成期 (C-2 群) および授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においてのみ、対照群 (A 群) と比較して約 3 倍以上の著しい自発運動促進作用の増強が観察された。

2. Morphine 誘発報酬効果に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

Morphine 1 mg/kg は、普通飼料で飼育したマウス (B0 群) では有意な報酬効果も嫌悪効果も示さなかったが、妊娠期から授乳期にわたり bisphenol A 0.5 および 2 mg/g of food を慢性的に曝露された群 (B0.5 群および B2 群) では用量依存かつ有意な報酬効果を示した。一方、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期にそれぞれ bisphenol A 2 mg/g of food を曝露したマウスを用いて同様の検討を行なったところ、器官形成期 (C-2 群) および授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においてのみ、普通飼料にて飼育されたコントロール群 (A 群) では影響を受けない morphine 1 mg/kg の処置により、著明な報酬効果が認められた。

3. Methamphetamine 誘発報酬効果に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A (2 mg/g of food) をそれぞれ慢性曝露されたマウスを用いて、methamphetamine により誘発される報酬効果への影響について検討した。その結果、器官形成期 (C-2 群) および授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においてのみ、普通飼料で飼育したマウス (A 群) では有意な報酬効果も嫌悪効果も示さない用量の methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.) の処置により、

著明な報酬効果が観察された。

4. Dopamine 誘発 G-タンパク質活性化作用に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A (2 mg/g of food) を慢性曝露されたマウス (B2 群) から得られた前脳辺縁部の膜標本を用いて、dopamine による G-タンパク質活性化作用について検討したところ、普通飼料で飼育された対照群 (B0 群) と比較して dopamine による G-タンパク質活性化作用は有意に増強された。さらに、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A (2 mg/g of food) をそれぞれ慢性曝露されたマウスならびに普通飼料で飼育されたマウスから得られた前脳辺縁部の膜標本を用いて、dopamine 誘発 G-タンパク質活性化作用について検討した。その結果、対照群 (A 群) の前脳辺縁部では、dopamine の濃度に依存した G-タンパク質活性化作用の増強が認められた。一方、bisphenol A 処置群においては、いずれの群においても増強傾向が認められるものの、器官形成期に bisphenol A を慢性曝露された群 (C-2 群) においてのみ有意な dopamine 誘発 G-タンパク質活性化作用の増強が認められた。

5. Bisphenol A 慢性曝露による新規環境下における脱糞数の検討

妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A (0.003 mg および 2 mg/g of food) を慢性曝露されたマウス (B0.003 群および B2 群) では、対照群 (B0 群) と比較して新規環境下における脱糞数が有意に増加した。さらに、妊娠初期から授乳期の各期間に bisphenol A (2 mg/g of food) をそれぞれ慢性曝露したマウスにおいても同様の検討を行なったところ、器官形成期 (C-2 群) ならびに授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においてのみ、普通飼料で飼育された対照群 (A 群) と比較して、新規環境下における脱糞数が有意に増加した。

6. Buspirone の抗不安作用に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

明暗試験における buspirone の抗不安作用を検討したところ、普通飼料により飼育された対照群 (A 群) では、溶媒処置群と比較して buspirone (1 mg/kg) による白区画への滞在時間の有意な延長、すなわち抗不安作用が発現した。それに対し、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A (2 mg/g of food) をそれぞれ慢性曝露されたマウスでは、buspirone による有意な抗不安作用は認められず、特に周産期 (D-2 群) ならびに授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においては、A 群と比較して buspirone の抗不安作用が著しく減弱した。

7. Diazepam の抗不安作用に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

Vogel 型のコンフリクト試験を用いて、diazepam の抗不安作用を検討したところ、普通飼料により飼育された対照群 (A 群) では、diazepam (0.5 mg/kg, s.c.) の処置により明らかな抗不安作用を示したのに対し、器官形成期 (C-2 群) および授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においては、diazepam の抗不安作用が有意に減弱した。

8. 5-Carboxamidotryptamine 誘発 G-タンパク質に及ぼす bisphenol A 慢性曝露の影響

妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A (2 mg/g of food) を慢性曝露されたマウス (B2 群) から得られた視床下部の膜分画標本を用いて、serotonin 5-HT_{1A/1B} 受容体作動薬である 5-carboxamidotryptamine (5-CT) による G-タンパク質活性化作用について検討したところ、普通飼料で飼育された対照群 (B0 群) と比較して、5-CT の G-タンパク質活性化作用は有意に減弱した。さらに、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A (2 mg/g of food) をそれぞれ慢性曝露されたマウスならびに普通飼料で飼育したマウスから得られた視床下部膜分画標本を

用いて、5-CT による G-タンパク質活性化作用について検討した。その結果、普通飼料で飼育されたマウス (A 群) の視床下部では、5-CT (10⁻⁵M) による著しい G-タンパク質活性化作用が認められたのに対し、器官形成期に bisphenol A を慢性曝露された群 (C-2 群) においては、A 群と比較して 5-CT による G-タンパク質活性化作用の有意な増強が認められた。一方、周産期 (D-2 群) および授乳期 (E-2 群) に bisphenol A を慢性曝露された群においては、5-CT による G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。

D. 考察

前年度までに我々は、妊娠初期から授乳期を通して bisphenol A を慢性曝露することにより、methamphetamine の報酬効果が増強されることを明らかにしているが、この原因の一部は側坐核領域における dopamine D₁ 受容体の up-regulation に起因していることを明らかにしている。そこで本年度は、このような bisphenol A の慢性曝露による中枢神経系の機能変化が、どの期間の曝露により引き起こされるかについて明らかにするために、妊娠初期から授乳期までそれぞれ bisphenol A を曝露する期間を分けたマウスを用いて行動薬理学的ならびに生化学的に検討した。

Morphine により誘発される自発運動促進作用は、器官形成期ならびに授乳期に bisphenol A をそれぞれ慢性曝露された群では、対照群と比較して著しい自発運動促進作用の増強が認められた。また、bisphenol A の器官形成期ならびに授乳期曝露群では、対照群で全く報酬効果が認められない用量の morphine によっても明らかな報酬効果が認められた。一方、我々は前年度および本年度の研究結果から、妊娠初期から授乳期のうち、特に器官形成期ならびに授乳期に bisphenol A を慢性曝露されたマウスでは、methamphetamine の報酬効果が著しく増強されることを明らかにした。

一般的に、依存性薬物の自発運動促進作用ならびに報酬効果の発現には、中脳辺縁 dopamine

神経系が深く関与していることが知られており、methamphetamine は dopamine 神経終末において、dopamine 放出の促進ならびに再取り込みを阻害することにより、シナプス間隙での dopamine 量を増加させ、自発運動の亢進ならびに報酬効果を誘発するものと考えられている。一方、morphine は中脳辺縁 dopamine 神経系の起始核である腹側被蓋野の γ -aminobutyric acid (GABA) 神経上に存在する μ -opioid 受容体に作用し、GABA 神経の抑制作用に起因した脱抑制機構により dopamine 神経を興奮させ、投射先における dopamine の遊離量を増加させることで、自発運動量の亢進ならびに報酬効果を誘発することが知られている。

上述したように、我々はこれまでに妊娠期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露により、methamphetamine の報酬効果が増強されることを明らかにしているが、その原因の一部には中脳辺縁 dopamine 神経系の機能が亢進している可能性を示唆している。本研究において、morphine によっても自発運動促進作用ならびに報酬効果が著しく増強されたことから、methamphetamine のみならず、morphine によるこれらの作用の増強には、dopamine 神経系の機能亢進が一部関与している可能性が推察される。そこで、妊娠初期から授乳期までそれぞれ bisphenol A の曝露期間を分けたマウスから得られた前脳辺縁部の膜標本を用いて、dopamine による G-タンパク質活性化作用について検討した。その結果、対照群の前脳辺縁部では、dopamine の濃度に依存した G-タンパク質活性化作用の増強が認められたのに対し、bisphenol A 曝露群においては、いずれの群においても dopamine による G-タンパク質活性化作用の増強傾向が認められ、特に器官形成期に bisphenol A を慢性曝露された群では有意な増強が引き起こされた。

これらの結果から、妊娠期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露により、dopamine 神経系の機能亢進が誘導され、morphine あるいは methamphetamine の作用が増強される可能性が示唆された。また、これら一連の反応を引き起こ

す変化には、bisphenol A の器官形成期および授乳期における曝露が特に重要である可能性が示唆された。

一方、前年度までに我々は、bisphenol A を妊娠初期から授乳期にわたり慢性曝露された親から生まれた仔マウスでは、dopamine 神経系や serotonin 神経系の関与が示唆される circling, head movement, aggression, spinning syndrome などの異常行動が認められることを明らかにしている。また、本研究において bisphenol A 曝露マウスの行動観察を行なったところ、動物の不安状態の一部を反映していると考えられている新規環境下における脱糞数の増加が認められた。これらのことから、妊娠初期から授乳期にわたる bisphenol A の慢性曝露により、不安状態が惹起されやすい状態に陥っている可能性が示唆される。このように、妊娠期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露は、dopamine 神経系のみならず serotonin 神経系にも何らかの変化を与えている可能性が推察される。

そこで本研究では、妊娠初期から授乳期のうち bisphenol A に曝露される期間を分けたマウスを用い、bisphenol A の慢性曝露による serotonin 神経系の変化について、行動薬理学的ならびに生化学的検討を行なった。

Bisphenol A の器官形成期および授乳期曝露により、新規環境下における脱糞数は対照群と比較して有意に増加した。さらに、動物の不安状態の評価法の一つとして使用されている明暗試験に従い、bisphenol A 慢性曝露による serotonin 5-HT_{1A} 受容体作動薬である buspirone の抗不安作用に及ぼす影響を検討した。その結果、対照群では buspirone の有意な抗不安作用が観察されたのに対し、妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A をそれぞれ慢性曝露されたマウスでは、buspirone の抗不安作用は認められず、特に周産期ならびに授乳期に bisphenol A を慢性曝露された群においては、対照群と比較して有意に buspirone の抗不安作用が減弱した。また、動物の不安あるいは葛藤状態を評価できる

コンフリクト試験においても、器官形成期および授乳期に bisphenol A を慢性曝露された群では、対照群と比較して benzodiazepine 系薬物である diazepam による抗不安作用の有意な減弱が認められた。

背側縫線核を起始核として視床下部に投射している serotonin 神経終末には、serotonin 5-HT_{1A} 受容体が局在しており、serotonin の放出を抑制的に調節する自己受容体として機能している。Serotonin 5-HT_{1A} 受容体作動薬である buspirone は、不安状態時において増加した視床下部での serotonin の遊離を抑制することにより、抗不安作用を発現すると考えられている。しかしながら、本研究において妊娠初期、器官形成期、周産期および授乳期に bisphenol A をそれぞれ慢性曝露されたマウスでは、buspirone の抗不安作用は認められなかったことから、これらの時期における bisphenol A の慢性曝露により、視床下部の serotonin 5-HT₁ 受容体に機能変化が生じている可能性が推察される。そこで、これらのマウスから得られた視床下部膜標本を用いて、serotonin 5-HT_{1A/B} 受容体作動薬である 5-carboxamidotryptamine (5-CT) による G-タンパク質活性化作用について検討したところ、bisphenol A の器官形成期曝露群においては、対照群と比較して 5-CT による G-タンパク質活性化作用の有意な増強が認められた。一方、周産期および授乳期曝露群においては、5-CT による G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。これらの結果から、妊娠期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露により引き起こされる不安神経症状は、5-HT₁ 受容体の発現あるいはその機能異常に基づいている可能性が示唆され、このような変化が正常な serotonin 神経のバランスを崩し、不安状態を惹起するものと想定される。さらに、周産期および授乳期は正常な神経ネットワークを構築するのに重要な期間であり、これらの時期に bisphenol A に曝露されることにより、神経ネットワークの構築が妨げられ、強い不安状態を生じやすい神経変性が誘導された可

能性も考えられる。

また、本研究において胎児期における bisphenol A の慢性曝露では、diazepam による抗不安作用も減弱されたことから、これらの期間における bisphenol A の慢性曝露により、serotonin 神経系だけでなく、GABA 神経系の機能変化も引き起こされ、それにより不安状態が惹起された可能性も否定できない。

以上、本年度の研究成果より、妊娠初期および授乳期における bisphenol A の慢性曝露は、主に脳の発達過程において重要な期間である器官形成期および神経系の発達に重要な期間である周産期ならびに授乳期において、dopamine 神経系ならびに serotonin 神経系に可塑的变化をもたらし、異常行動ならびに不安神経障害の惹起、さらには依存性薬物の精神依存性を増強させる可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 発表論文

1. 成田 年、瀧本 淳、相馬 仁、矢島義識、水尾圭祐、黒木由夫、鈴木 勉: Morphine 誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成時の μ -opioid 受容体機能変化 日神精薬理誌 21, 55-61, 2001
2. Suzuki T, Kishimoto Y, Ozaki S and Narita M: Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors. Eur J Pain 5, 63-65, 2001
3. 成田 年、鈴木 勉: オピオイド受容体と薬物依存 -モルヒネ依存の分子機構- 別冊・医学のあゆみ, 7 回膜貫通型受容体研究の新展開 - ポストゲノム時代の受容体研究のゆくえ, 199-205, 2001
4. Narita M, Mizuo, Shibasaki M, Narita M and Suzuki T: Up-regulation of the Gq/11 α protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion. Neuroscience,

In press

5. Narita M, Soma M, Tamaki H, Narita M and Suzuki T: Intensification of the development of ethanol dependence in mice lacking dopamine D₃ receptor. Neurosci Lett, In press

2. 学会発表

1. 鈴木 勉、水尾圭祐、成田 年 妊娠期および授乳期にビスフェノール A に曝露されたマウスの行動変化 第 4 回日本薬理学会年会, 2001 年 3 月, 横浜
2. 坂田 守、成田 年、水尾圭祐、鈴木 勉 Bisphenol A 胎児期慢性曝露マウスにおける行動に及ぼす影響 第 7 回 日本行動薬理研究会, 2001 年 8 月, 福島
3. 水尾圭祐、成田 年、坂田 守、鈴木 勉 Bisphenol A の妊娠期および授乳期曝露による dopamine 関連行動に及ぼす影響 第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会, 2001 年 9 月, 京都
4. 鈴木 勉、水尾圭祐、坂田 守、成田 年 ビスフェノール A の脳神経系への影響 フォーラム 2001, 2001 年 10 月, 金沢

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

分担研究者：船江良彦 大阪市立大学大学院医学研究科教授

研究要旨：内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への作用機構を解明するために、中樞神経系への作用が知られている Bisphenol A (BPA)を用いて、BPA 膜受容体 (BPAR)の探索・精製を行った。ラット神経細胞膜画分から BPA アフィニティーカラムにて精製された蛋白質は、SDS-PAGE 上、53 KDa の蛋白質であった。この蛋白質を大腸菌で発現させ、BPA との結合能の有無を確認したところ、結合能を有していることが確認され、この膜蛋白質が BPA 受容体であると考えられた。

A.研究目的

近年、内分泌かく乱化学物質が、内分泌系・生殖器官系に対してのみならず、神経系や免疫系にも様々な影響を与えていることが報告されている。これまでの多くの研究から、内分泌かく乱化学物質のエストロゲン様作用発現に関しては、「エストロゲン受容体を介した分子生物学的機構」が解明され、「エストロゲン様作用を示す化学物質のスクリーニング法」などの開発も進んでいる。しかし中樞神経系への作用に関しては、内分泌かく乱化学物質と行動異常や知能低下との関連性が示唆され、問題視されているにも関わらず、作用機序など不明な点が多い。これまでに我々は、ビスフェノール A (BPA) の胎生期曝露によって新生児の脳内アミンの動態が変動し、その新生児に異常行動が見られることを見出している。本研究では、BPA の中樞神経系への作用発現にはエストロゲン受容体とは異なる受容体を関与していると考え、ラット神経細胞膜に存在する、BPA 受容体 (BPAR) と考えられる膜蛋白質の単離・精製を試みた。

この BPAR が精製され cDNA がクローニングで

できれば、ヒトの BPAR の cDNA が得られ、ヒトでの BPA による影響の研究が可能になる。内分泌かく乱化学物質の生体への影響は、主に実験動物で行われているが、その結果がかならずしもヒトに当てはまるかどうかはわからない。ヒトでの結果を明らかにすることが厚生行政の務めであるとする。BPAR の性質が解明されれば、これまで世に出ているのみならず、新規合成された化合物に対し、事前検査が可能になる。こうすることによって、内分泌かく乱化学物質による被害を未然に防ぐことが可能になる。

B.研究方法

ラット脳 P2 画分の調製

ラット脳組織は、ホモジネートバッファー（10 mM Tris-HCl, pH 7.5 - 320 mM Sucrose - 0.05% protease inhibitor cocktail）で洗浄した後、脳湿重量の 10 倍量のホモジネートバッファーを加え、氷中でホモジナイズ（800-900 rpm で 10 up-down strokes）した。ホモジネート液を遠心分離（1,500 g, 10 分）し、その上澄をさらに遠心分離（17,500 g, 20 分）し、得られた沈査を

P2 画分とした。P2 画分は、実験に使用するまで、-80℃にて保存した。

受容体結合実験

ラット脳 P2 画分と ^3H 標識 BPA (^3H -BPA) を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中、氷冷下にて 90 分間反応させた。反応終了後、P2 画分は遠心分離 (14,500 rpm, 10 分) にて bound/free の分離を行った。膜画分に存在する蛋白質に結合した ^3H -BPA の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。非特異的な結合はディスプレイサーとして過剰量の非標識 BPA を加えることにより測定した。

BPA 受容体 (BPAR) の精製

ラット 60 匹分の脳から P2 画分を調製したところ、蛋白質量として 1.0 g を得た。この P2 画分 (5 mg/ml) に Sucrose monolaurate を終濃度 0.5% となるように加え、4℃で 60 分攪拌後、遠心分離 (100,000 g, 60 分, 4℃) を行い、得られた上澄を可溶性画分とした。この可溶性画分をホモジネートバッファーで平衡化した Whatman DE 52 イオン交換カラム (50 ml) にかけた。可溶性蛋白質は、0.1 M, 0.2 M, 0.5 M の NaCl によりステップワイズに溶出した。受容体結合実験にて最も BPA 結合能が高かった 0.2 M NaCl 溶出画分は、さらに BPA にスパーサーをつけセファローズに共有結合させ作成した BPA アフィニティークラムを用いたクロマトグラフィーに供した。ホモジネートバッファーに平衡化した BPA アフィニティークラム (4 ml) に試料を供し、20 ml のホモジネートバッファーで洗浄した後、2 mM BPA を添加したホモジネートバッファーで溶出した。溶出画分を 20 mM Tris-HCl に対し透析を行った後、凍結乾燥を行い濃縮した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、大阪市立大学動物実験委員会にお

いて審査承認された実験計画に基づき、動物倫理、動物愛護に配慮した実験動物指針に従い実施した。

C. 研究結果

BPAR の脳での局在

6 週令のオスラットの脳を摘出後、大脳、中脳、小脳、視床下部、海馬、線条体、橋、視床、延髄の 9 部位に分割し、各部位で P2 画分の調製を行った。これら 9 部位を用いて、BPA 結合能を指標にして、BPAR の局在を調べた。その結果、全部位で BPA 結合活性はほぼ同程度であり、BPAR は脳内の様々な部位に発現していると考えられた。また、この BPAR は、BPA だけでなく甲状腺ホルモンとの結合活性も有することが確認された。

BPAR の精製

P2 画分に BPA 結合活性が検出されたので、本研究では、P2 画分を BPA 精製の出発試料とした。膜タンパク質の精製には、まず、可溶化するための界面活性剤の選択が重要である。多くの可溶化試薬を試した結果、今回用いた非イオン性界面活性剤が最も効率よく膜を可溶化し、また BPA との結合活性も失わなかった。可溶化後、膜を構成している脂質類を除くために DE52 を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行い、次の BPA アフィニティークロマトグラフィーがより効率的に進むようにした。今回の精製においての特長は、BPA のアフィニティークラムを用いたクロマトグラフィーを行なったことであった。従って BPA のアフィニティークラムの作成に努力した。BPA の 2 つのベンゼン環に挟まれた炭素よりスパーサーを延長したものと、ベンゼン環に結合した水酸基からスパーサーを延長したものの 2 種類、計 3 種類の

BPA を合成し、比較検討した。その結果、2 つのベンゼン環に挟まれた炭素からスペーサーを延ばし、末端をアミノ基にした BPA リガンドを CNBr 活性化セファローズに結合させたカラムが著しく精製度を上げた。このカラムに対しては、蛋白質の非特異的吸着も少なく、また、BPA を添加すると BPA と結合する特異的タンパク質のみが溶出され、見事な BPA アフィニティークロマトグラフィーに成功した。この BPA-セファローズカラムを用い、2 mM の BPA を含むホモジネートバッファーで溶出した結果、SDS-PAGE で 53 KDa と 38 KDa の 2 本のバンドを検出した。両バンドを切り出し N-末端アミノ酸配列を決定した。得られた情報をもとに、53 KDa の蛋白質の cDNA をクローニングし大腸菌で発現させたところ、このリコンビナント蛋白質は、BPA との結合活性を有していることが確認された。

D. 考察

これまで内分泌かく乱化学物質が作用する受容体としては、核内受容体であるエストロゲン受容体(ER)が報告されており、内分泌かく乱化学物質の生殖器系への影響は、ER への結合がその作用機序である事が明らかになっている。しかし、内分泌かく乱化学物質のもう一つの作用として、中枢神経系に影響を与え行動異常や知能低下をもたらすことが知られている。我々はこれまで、BPA は ER への結合が弱いにも関わらず中枢神経系への作用を有していることを報告しており、この作用は ER 結合とは異なる作用機序で生じていると考えられている。今回、我々が精製した BPAR は、膜画分に存在し、BPA だけでなく甲状腺ホルモンも BPAR に結合することから、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系

への作用は、この BPAR を介した甲状腺ホルモン作用のかく乱によって生じている可能性が考えられた。

E. 結論

内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用機構を解明するために、中枢神経系への作用が知られている BPA を用いて、BPA 膜受容体(BPAR)の探索・精製を行った。ラット神経細胞膜画分から精製された蛋白質は、SDS-PAGE 上 53 KDa の蛋白質であった。この蛋白質を大腸菌で発現させ、BPA との結合能を有しているかどうかを調べたところ、結合能を有していることが確認され、この膜蛋白質が BPA 受容体であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Hashizume T, Imaoka S, Mise M, Terauchi Y, Fujii T, Miyazaki H, Kamataki T, Funae Y.: Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300, 298-304, 2002

Minamiyama Y, Imaoka S, Takemura S, Okada S, Inoue M, Funae Y.: Escape from tolerance of organic nitrate by induction of cytochrome P450. *Free Radic. Biol. Med.* 31, 1498-1508, 2001

Hiroi T, Kishimoto W, Chow T, Imaoka S, Igarashi T, Funae Y.: Progesterone oxidation by cytochrome P450 2D isoforms in the brain. *Endocrinology.*