

142, 3901-3908, 2001

Yano H, Tsutsumi M, Fukura M, Chen WB, Shimanaka K, Tsuchishima M, Takase S, Imaoka S, Funae Y. : Study of cytochrome P4502E1 mRNA level of mononuclear cells in patients with alcoholic liver disease. Alcohol Clin. Exp. Res. 25, 2S-6S, 2001

Imaoka S, Hayashi K, Hiroi T, Yabusaki Y, Kamataki T, Funae Y. : A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 284, 757-762, 2001

Imaoka S, Yoneda Y, Sugimoto T, Ikemoto S, Hiroi T, Yamamoto K, Nakatani T, Funae Y. : Androgen regulation of CYP4B1 responsible for mutagenic activation of bladder carcinogens in the rat bladder: detection of CYP4B1 mRNA by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction. Cancer Lett. 166, 119-123, 2001

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, 1135-1141, 2001

2. 学会発表

船江良彦、廣井豊子

ビスフェノールの脳内アミンに対する作用（シンポジウム）

第74回日本薬理学会年会（2001）

岡田和嗣、廣井豊子、船江良彦

Bisphenol A の中枢神経系に及ぼす作用

環境ホルモン学会第4回研究発表会（2001）

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 胎生期から授乳期にかけてのビスフェノール A(BPA)への曝露により、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生後 9 週齢において出現した。しかし、3 種類のカルシウム結合蛋白質、すなわち parvalbumin, calbindinD28k, calretinin 陽性の脳皮質、扁桃体外側神経核、海馬の神経細胞に関しては BPA 投与群と非投与対照群との間で有意差を認めなかった。さらに Western blot による解析では、チロシン水酸化酵素、parvalbumin, calbindinD28k, calretinin いずれに関しても投与群と非投与群との間で差を認めなかった。すなわち、胎生期から授乳期にかけての BPA 曝露が仔の脳における特定の神経細胞群への影響をもたらすことが判明した。

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

実験デザインは本年度、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 ならびに 8mg/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。大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。Western blot 用には生後 6 週齢の時点で脳を取り出し直ちに液体窒素にて凍結した。

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 日で帝王切開によって胎仔を取り出し脳を採取固定した。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。

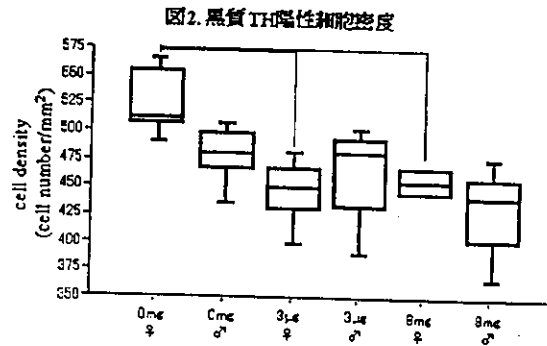
また Western blot に関しては, 上記 calcium binding protein に対する抗体に加えて, anti-GAP43 抗体 (Chemicon International), anti-dopamine D1 receptor 抗体 (D1R, Chemicon International), anti-dopamine D4 receptor 4 抗体 (D4R, Chemicon International), anti-dopamine D5 receptor 抗体 (D5R, Chemicon International) を用いた。なお, 6 週齢全脳のホモジェネートを 15,000 rpm 20 分間遠心して得た上清をさらに 55,000 rpm 1h 超遠心した上清 (可溶性分画) を用いて SDS-PAGE を施行した, メンブレンに転写後, 一次抗体ならびに HRP 標識二次抗体と反応させ, その後, chemiluminescence にて band を可視化, NIH image にて densitometry を行い, 統計学的解析を施した。

(倫理面への配慮) 動物の取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い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 $2\mu\text{g/g}$ ないしは 8mg/g of food 投与された群より得た仔では, TH 陽性黒質神経細胞数が胎齢 18 日 (図 1) において減少傾向を示した。妊娠全期間ならびに

(図 2) で TH 陽性黒質神経細胞密度が非投与対照群雌に比し有意な減少を示した。



実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. 大脳皮質calbindin陽性神経細胞密度

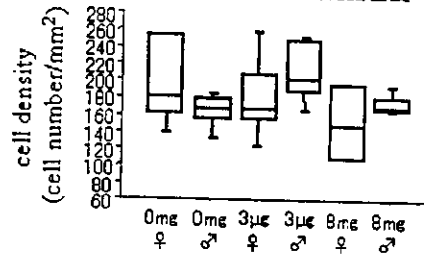


図4. 大脳皮質parvalbumin陽性神経細胞密度

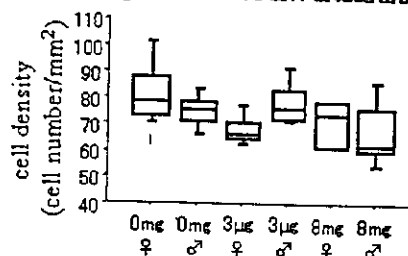
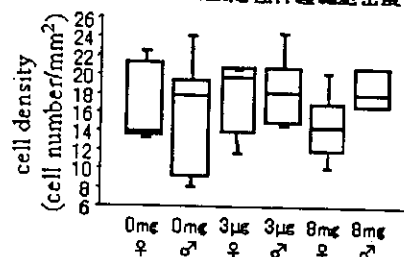
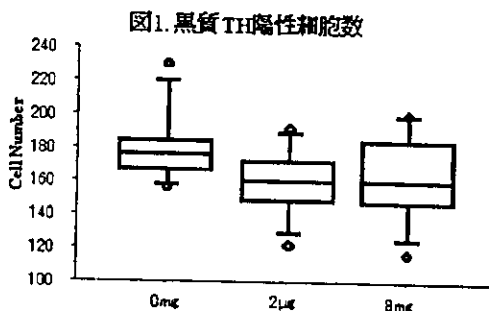


図5. 大脳皮質calretinin陽性神経細胞密度



また妊娠全期間ならびに授乳期間中に BPA を投与した群 ($3\mu\text{g/g}$ of food ならびに 8mg/g of food) で大脳皮質, 扁桃体外側神経核, 海馬における calbindin D28k, calretinin, parvalbumin 陽性神経細胞数を解析したところ, 非投与対照群との間に有意な差を認めなかった (図 3, 4, 5, 6, 7, 8)。



授乳期間中に BPA を投与した群 ($3\mu\text{g/g}$ of food ならびに 8mg/g of food) の雌では, 生後 9 週齢

図6.扁桃体外側神経核calbindin陽性神経細胞数

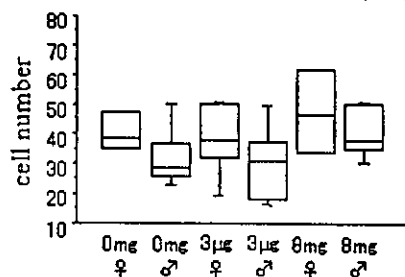


図7.扁桃体外側神経核calretinin陽性神経細胞数

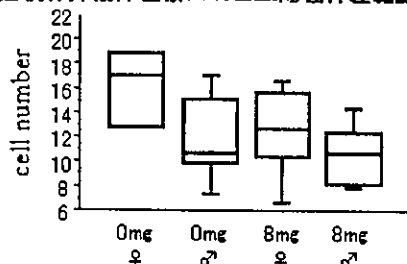


図8.海馬parvalbumin陽性神経細胞数

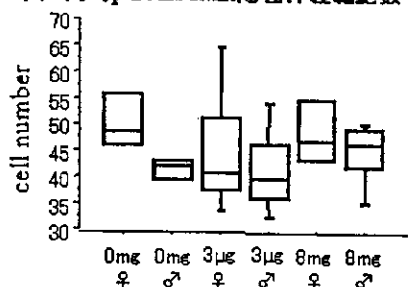


図9. TH Western blot

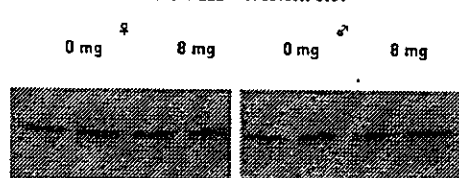
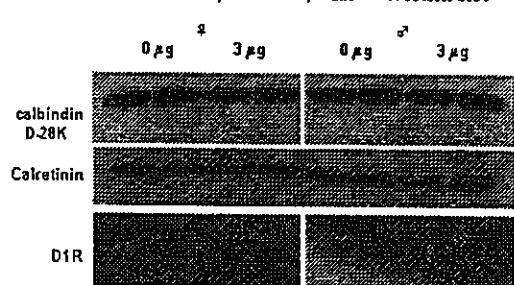


図10. CalbindinD28k, calretinin, D1R Western blot



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 ならびに 8 mg/g of food) より得た全脳可溶性分画に対する Western blot では, TH, calbindinD28k, calretinin, D1R,

parvalbumin, D5R, GAP43, D4R いずれにおいても非投与対照群との間に有意差を認めなかった (図 9, 10, 11, 12, 13, 14)。

図11.parvalbumin Western blot

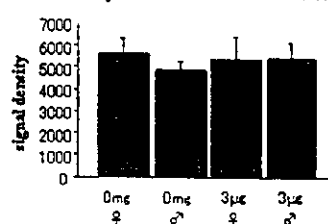


図12. D5R Western blot

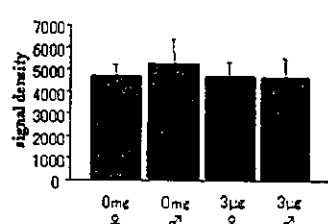


図13. GAP43 Western blot

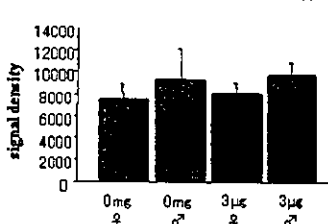
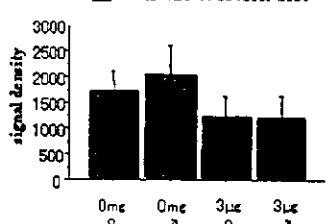


図14. D4R Western blot



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 週を経過し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傾向を示した。しかし全脳可溶性分画を対象とした Western blot では BPA 投与群と非投与対照群との間で TH の発現量に差を認めなかつ

た。免疫組織化学による TH 陽性神経細胞の計測で TH 陽性神経細胞の分布する黒質以外の領域では BPA 投与群で変化がみられなかったこととあわせて考えると、全脳での TH の発現量に差が見出されなかったのは矛盾しないと考える。

他方、calretinin, calbindinD28k, parvalbumin 陽性神経細胞は GABA 作動性神経細胞と考えられるが、これらの細胞数に BPA 投与による変化が出現しなかったことは、これらが BPA 投与による影響を受けにくいことを示すのかもしれない。

黒質の TH 陽性神経細胞に見出された選択的とも呼ぶべき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不明であるが、わたしたちのこれまでの解析によって生後 9 週齢 BPA 投与群雌で ER(estrogen receptor) α 及び ER β mRNA の発現が亢進していることが判明していて ER α ならびに ER β の脳内での発現が選択的であり、黒質には ER β が強く発現するとの過去の報告をも勘案すると、BPA の作用機序に 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特徴的な変化が見られたことから、胎児・幼児への BPA 曝露は、脳形成期から成熟へと至る過程で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 2 μ g/g of food, 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 日で減少傾向を示した。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, 8mg/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

神経細胞に対する BPA の影響が明確に示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Toba H, Fukuyama R, Sasaki M, Shiga K, Ishibashi S, Fushiki S. A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis has different mutations within two functional domains of CYP27. Clin Genet 61, 77-78 (2002)

伏木信次. 脳形成障害の分子病態, 小児の脳神経, 26, 95-101(2001)

Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, Shiota K. In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain. Brain Res Dev Brain Res, 132, 59-67(2001)

Cui FD, Kishida T, Ohashi S, Asada H, Yasutomi K, Satoh E, Fushiki S, Imanishi J, Mazda O. Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors. Gene Ther, 8, 1508-1513(2001)

Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H. Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissue. J Neurosci Res, 65, 595-603(2001)

Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M. Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 281, H1637-H1647(2001)

Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S. The 63

cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia. *Eur Neurol*, 46, 35-38 (2001)

Kitaya K, Yasuda J, Fushiki S, Honjo H. Localization of interferon regulatory factor (IRF)-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Fertil Steril*, 75, 992-996 (2001)

Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N. Musashi 1, an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity. *Differentiation*, 68, 141-152(2001)

Nishizawa Y, Goto HG, Tanigaki Y, Fushiki S, Nishizawa Y. Induction of apoptosis in an androgen-dependent mouse mammary carcinoma cell line by methylcobalamin. *Anticancer Res*, 21, 1107-1110(2001)

Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Munesue S, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H. Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: specific expression on syndecan-3. *Cell Struct Funct*, 26, 271-278(2001)

(学会発表等)

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

研究成果の一覧表

書籍

著者名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
白井智之	内分泌かく乱物質研究の最前線	(社)日本化学会	化学総説	学会出版センター	東京	2001	15-31
Davis, B., Harleman, J.H., Heinrich, M., A.Maekawa, McConnell, R.F., Reznik, G., Tucker, M.	Female Genital System	Mohr, U.	International Classification of Rodent Tumours. The Mouse	Springer,	Berlin	2001	211-268
Rehm, S., Harleman, J.H., Cary, M., Creasy, D., Ettlin, R.A., Eustis, S.L., Foley, G.L., LeNet, J.L., Maekawa, A., Mitsumori, K., McConnell, R.F., Reznik, G.,	Male Genital System.	Mohr, U.	International Classification of Rodent Tumours. The Mouse	Springer,	Berlin	2001	163-210
成田年ら	オピオイド受容体と薬物依存 - モルヒネ依存の分子機構 -	佐藤公道 赤池昭紀	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	医歯薬出版株式会社	東京	2001	199-205
伏木信次	痴呆症 基礎と臨床の最前線	中島健二	痴呆の病理学	金芳堂	京都	23-33	23-33

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Imaida, K., Tamano, S., Kato, K., Ikeda, Y., Asamoto, M., Takahashi, S., Nir, Z., Murakoshi, M., Nishino, H., Shirai, T.	Lack of chemopreventive effects of lycopene and curcumin on experimental rat prostate carcinogenesis.	Carcinogenesis	22	467-472	2001
Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Asai, I., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.	Lack of tumor promoting effects of carrageenan on 1,2-dimethylhydrazine-induced colorectal carcinogenesis in male F344 rats.	J. Toxicol. Pathol.	14	37-43	2001
Thamavit, W., Pratoomtone, P., Kongtim, S., Shirai, T., Ito, N.	Inhibition by vitamin E of cholangiocarcinoma induction due to combined nitrite and aminopyrine.	Asian Pac. J. Cancer Prev.	2	69-70	2001
Kimoto, N., Hirose, M., Futakuchi, M., Iwata, T., Kasai, M., Shirai, T.	Site-dependent modulating effects of conjugated fatty acids from safflower oil in a rat two-stage carcinogenesis model in female Sprague-Dawley rats.	Cancer Lett.	168	15-21	2001
Hirose, M., Hoshiya, T., Mizoguchi, Y., Nakamura, A., Akagi, K., Shirai, T.	Green tea catechins enhance tumor development in the colon without effects in the lung or thyroid after pretreatment with 1,2-dimethylhydrazine or 2,2'-dihydroxy-di-n-propylnitrosamine in male F344 rats.	Cancer Lett.	168	23-29	2001
Hagiwara, A., Takesada, Y., Tanaka, H., Tamano, S., Hirose, M., Ito, N., Shirai, T.	Dose-dependent induction of glandular stomach preneoplastic and neoplastic lesions in male F344 rats treated with catechol chronically.	Toxicol. Pathol.	29	180-186	2001
Imaida, K., Sano, M., Tamano, S., Asamoto, M., Ogawa, K., Futakuchi, M., Shirai, T.	Organ dependent enhancement of rat 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl (DMAB) carcinogenesis by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): positive effects on the intestine but not the prostate.	Carcinogenesis	22	1295-1299	2001
Asamoto, M., Hokaiwado, N., Cho, Y.-M., Ikeda, Y., Takahashi, S., Shirai, T.	Metastasizing neuroblastomas from taste buds in rat transgenic for the simian virus 40 large T antigen under control of the probasin gene promoter.	Toxic. Pathol.	29	363-368	2001

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hagiwara, A., Miyashita, K., Nakanishi, T., Sano, M., Tamano, S., Kadota, T., Koda, T., Nakamura, M., Imaida, K., Ito, N., Shirai, T.	Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine.	Cancer Lett.	171	17-25	2001
Mori, T., Imaida, K., Tamano, S., Sano, M., Takahashi, S., Asamoto, M., Takeshita, M., Ueda, H., Shirai, T.	Beef tallow, but not perilla or corn oil, promotion of rat prostate and intestinal carcinogenesis by 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl.	Jpn. J. Cancer Res.	92	1026-1033	2001
朝元誠人, 白井智之	前立腺発癌への食餌要因の影響	腎泌予防医誌	9	22-25	
Yoshida, M., Katsuda, S., Takenaka, A., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.	Effects of neonatal exposure to a high-dose p-tert-octylphenol on the male reproductive tract in rats	Toxicol. Lett.	121	21-33	2001
Yoshida, M., Katsuda, S., Maekawa, A.	Effects of endocrine disrupting chemicals with estrogenic activity on the female reproductive system in rats	J. Toxicol. Pathol.	14	83-86	2001
Takahashi, M., Nishimura, S., Miyajima, K., Sasahara, K., Yoshida, M., Ando, J., Maekawa, A.	Time-dependent promotion activity of 17 β -estradiol on uterine carcinogenesis in mice initiated with N-ethyl-N-nitrosourea	Cancer Lett.	165	123-130	2001
Watanabe, T., Adno- Lu, J., Imai, S., Takano, S., Takahashi, M., Maekawa, A.	Spontaneous tumors in the uterus, testis and other organs of F1 hybrids between Donryu and F344 rats	J. Toxicol. Pathol.	14	99-104	2001
Katsuda, S., Yoshida, M., Kuroda, H., Ando, J., Takahashi, M., Kurokawa, Y., Watanabe, G., Taya, K., Maekawa, A.	Uterine adenocarcinoma in N-ethyl-N1-nitro-N-nitrosoguanidine-treated rats with high-dose exposure to p-tert-octylphenol during adult food	Jpn. J. Cancer Res.	93	1-9	2002
Shimamoto, T., Yoshida, M., Takahashi, M., Maekawa, A.	Sebaceous gland metaplasia in a mammary fibroadenoma developing in a female Donryu rat	J. Toxicol. Pathol.	15	in press	2002

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshida, M., Takenaka, A., Katsuda, S., Kurokawa, Y., Maekawa, A.	Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptors and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing rat uteri	Toxicol. Pathol.	30	in press	2002
Masuda, C., Fukushima, S., et al.	Presence of a no-observed effect level for enhancing effects of development of the α -isomer of benzene hexachloride (α -BHC) on diethylnitrosamine-initiated hepatic foci in rats.	Cancer Lett.	163	179-185	2001
Vijayaraghavan, M., Fukushima, S., et al.	Dimethylarsinic acid induces 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in the kidney of NCI-Black-Reiter rats.	Cancer Lett.	165	11-17	2001
Seike N., Fukushima, S., et al.	Lack of promoting effect due to oral administration of dimethylarsinic acid on rat lung carcinogenesis initiated with N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine.	Cancer Lett.	175	113-119	2002
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
成田 年ら	Morphine誘発自発運動促進作用に対する逆耐性形成時の m-opioid 受容体機能変化	日本神経精神薬理学会雑誌	21	55-61	2001
T. Suzuki et al.	Mechanism of opioid dependence and interaction between opioid receptors	Eur. J. Pain	5	63-65	2001
M. Narita et al.	Up-regulation of the Gq/11a protein and protein kinase C during the development of sensitization to morphine-induced hyperlocomotion	Neuroscience	in press		
M. Narita et al.	Intensification of the development of ethanol dependence in mice lacking dopamine D3 receptor	Neurosci. Lett.	in press		
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

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	142	3901-3908	2001
Yano H, Tsutsumi M, Fukura M, Chen WB, Shimanaka K, Tsuchishima M, Takase S, Imaoka S, Funae Y.	Study of cytochrome P4502E1 mRNA level of mononuclear cells in patients with alcoholic liver disease.	Alcohol Clin. Exp. Res.	25	2S-6S	2001
Imaoka S, Hayashi K, Hiroi T, Yabusaki Y, Kamataki T, Funae Y.	A transgenic mouse expressing human CYP4B1 in the liver.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	284	757-762	2001
Imaoka S, Yoneda Y, Sugimoto T, Ikemoto S, Hiroi T, Yamamoto K, Nakatani T, Funae Y.	Androgen regulation of CYP4B1 responsible for mutagenic activation of bladder carcinogens in the rat bladder: detection of CYP4B1 mRNA by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction.	Cancer Lett.	166	119-123	2001
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	1135-1141	2001
Toba H, Fukuyama R, Sasaki M, Shiga K, Ishibashi S, Fushiki S.	A Japanese patient with cerebrotendinous xanthomatosis has different mutations within two functional domains of CYP27.	Clin Genet	61	77-78	2002
伏木信次	脳形成障害の分子病態	小児の脳神経	26	95-101	2001
Hinoue A, Fushiki S, Nishimura Y, Shiota K.	In utero exposure to brief hyperthermia interferes with the production and migration of neocortical neurons and induces apoptotic neuronal death in the fetal mouse brain.	Brain Res Dev Brain Res	132	59-67	2001
Cui FD, Kishida T, Ohashi S, Asada H, Yasutomi K, Satoh E, Kubo T, Fushiki S, Imanishi J, Mazda O.	Highly efficient gene transfer into murine liver achieved by intravenous administration of naked Epstein-Barr virus (EBV)-based plasmid vectors.	Gene Ther	8	1508-1513	2001

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H.	Developmental expression of a unique carbohydrate antigen, Tn antigen, in mouse central nervous tissue.	J Neurosci Res	65	65	2001
Shiraishi J, Tatsumi T, Keira N, Akashi K, Mano A, Yamanaka S, Matoba S, Asayama J, Yaoi T, Fushiki S, Fliss H, Nakagawa M.	Important role of energy-dependent mitochondrial pathways in cultured rat cardiac myocyte apoptosis.	Am J Physiol Heart Circ Physiol	281	H1637-H1647	2001
Fukuyama R, Izumoto T, Fushiki S.	The cerebrospinal fluid level of glial fibrillary acidic protein is increased in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients and correlates with severity of dementia.	Eur Neurol	46	35-38	2001
Kitaya K, Yasuda J, Fushiki S, Honjo H.	Localization of interferon regulatory factor (IRF)-1 in human endometrium throughout the menstrual cycle.	Fertil Steril	75	992-996	2001
Kanemura Y, Mori K, Sakakibara S, Fujikawa H, Hayashi H, Nakano A, Matsumoto T, Tamura K, Imai T, Ohnishi T, Fushiki S, Nakamura Y, Yamasaki M, Okano H, Arita N. Musashi 1	an evolutionarily conserved neural RNA-binding protein, is a versatile marker of human glioma cells in determining their cellular origin, malignancy, and proliferative activity.	Differentiation,	68	141-152	2001
Nishizawa Y, Goto HG, Tanigaki Y, Fushiki S, Nishizawa Y.	Induction of apoptosis in an androgen-dependent mouse mammary carcinoma cell line by methylcobalamin.	Anticancer Res	21	1107-1110	2001
Akita K, Fushiki S, Fujimoto T, Munesue S, Inoue M, Oguri K, Okayama M, Yamashina I, Nakada H.	Identification of the core protein carrying the Tn antigen in mouse brain: specific expression on syndecan-3.	Cell Struct Funct.	26	271-278	2001

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総合研究報告書

内分泌かく乱化学物質の胎児，幼児への影響等に関する研究

主任研究者 白井 智之 名古屋市立大学医学部 教授

研究要旨

本研究では平成 11 年度から平成 13 年度の 3 年間、内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質を妊娠および授乳期の実験動物に投与した場合、その動物の出生仔の成長後に生殖障害、学習・精神障害が出現するのか、また、がんの発生が増加するのかなどを *in vivo* の立場から検討を行った。現在まで得られた研究成果は下記の通りである。

- 1) F344 雌ラットに妊娠 0 日から離乳までの間ビスフェノール A およびノニルフェノールをそれぞれ単独あるいは複合投与しても、性成熟齢 F1 雄動物の生殖器系へ影響を示さず、さらに 60 週間の前立腺発がん性試験においてもビスフェノール A は影響しないことが明らかとなった。（白井）。
- 2) 妊娠・授乳期の母ラットへ低用量から高用量にわたるビスフェノール A およびノニルフェノールを単独あるいは併用にて強制経口投与した結果、母動物の繁殖成績、仔の雌性生殖器系に変化が観察されなかったことから、この実験条件下におけるビスフェノール A およびノニルフェノール投与は雌性生殖器へ影響を及ぼさない可能性が高いと考えられた。しかし一部で未だ実験中であることから、実験終了後に総合的な結論を出す予定である。また、母および仔ラットは環境中のビスフェノール A に曝露されている可能性が示された。（前川）。
- 3) ビスフェノール A の親マウスへの妊娠期、授乳期投与は高用量で雄児マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが明らかとなった。しかしノニルフェノールの雄児生殖器系への影響はみられなかった。また、スチレンモノマー、ダイマーおよびトリマーはラット肝発がん性を示さないことが結論づけられた（福島）。
- 4) 大豆イソフラボンの生体影響はエストロゲン作用以外にも観察され、種差や性差もみられた。日常大豆食品のみで摂取するレベルであれば、その影響は小さいが、大豆食品以外でも摂取する大豆イソフラボンにも注目して安全性を確認する必要がある（池上）。
- 5) Wistar 系雌ラットにビスフェノール A あるいはノニルフェノールを飼料に混じ、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結果、ビスフェノールAあるいはノニルフェノール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關与する可能性は乏しいと考えられた（堤）。

- 6) 妊娠期および授乳期におけるビスフェノール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ネットワーク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、特にドーパミン神経系ならびにセロトニン神経系に不可逆的な変性をもたらし、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（鈴木）。
- 7) ビスフェノールAは、胎児期の曝露によって、離乳後においても仔脳内のドーパミン動態を変動させていた。このようなビスフェノールAの中樞神経系への影響は、胎児期や乳児期といった中樞神経細胞の発達分化が活発に行われている時期に曝露を受けることによって生じ、その作用機序には、神経細胞膜画分に存在する受容体様蛋白(ビスフェノールA受容体)を介した、甲状腺ホルモンの作用のかく乱（種々の神経細胞発達・分化作用の異常）が、關与している可能性が強く示唆された（船江）。
- 8) 妊娠全期間から授乳期に至るまでビスフェノールAを投与された雌（3 $\mu\text{g/g}$ of food, 8 $\mu\text{g/g}$ 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。さらに生後9週齢雌では ER α 及び ER β の mRNA 発現亢進が見出された。本研究によって、黒質のドーパミン系神経細胞に対するビスフェノールAの影響が明確に示された（伏木）。

分担研究者

前川 昭彦	（財）佐々木研究所 所長
福島 昭治	大阪市立大学医学部 教授
池上 幸江	大妻女子大学家政学部 教授
堤 雅弘	奈良県立医科大学腫瘍病理 助教授
鈴木 勉	星薬科大学 教授
船江 良彦	大阪立大学医学部 教授
伏木 信次	京都府立医科大学 教授

ヒトにおいても女性生殖器、男性生殖器、甲状腺、視床下部・下垂体等への影響が懸念されている。しかし、環境中の内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質の胎児期、乳児期曝露により、出生児が成長したのちに、学習・精神障害、発がん、生殖機能の異常などが発現する可能性がある。そこで、本研究では内分泌かく乱作用が疑われているビスフェノールA、ゲニスタイン等の化学物質の生殖機能、学習・精神障害および発がん性などに及ぼす影響を *in vivo* の立場から解析することを目的とする。

A. 研究の目的

近年、環境中に存在する内分泌かく乱化学物質が、野生ならびに水生動物などの生態に影響を与えていることが指摘されている。また、

B. 研究方法

1. 雄性生殖器系に及ぼす影響（白井）

【実験1】11週齢より交配を開始し、妊娠を確認した雌F344ラットに妊娠0日から離乳までの間、ビスフェノールAを0, 0.05, 7.5, 30および120 mg/kg/dayの投与量で毎日強制経口投与した。作出されたF1雄動物には5週齢から20週間、DMABを50 mg/kgの投与量で2週間に1回皮下投与した。その後65週齢で屠殺剖検し、DMABによる前立腺発がんに対するビスフェノールAの影響を検索した。

【実験2】実験1と同様に、妊娠動物にノニルフェノールを0, 0.1, 10および100 mg/kg/dayの投与量で毎日強制経口投与した。作出されたF1雄動物には5週齢から20週間、PhIPを100 mg/kgの投与量で1週間に1回強制経口投与した。その後65週齢で屠殺剖検し、PhIPによる前立腺発がんに対するノニルフェノールの影響を検索する。（現在、動物実験継続中である）また、PhIPを投与しない群を設け、性成熟齢である13週齢で屠殺剖検し、ノニルフェノールの雄性生殖器系への影響について検索した。【実験3】実験1と同様に、妊娠動物に実験1および2で使用した最低用量であるビスフェノールA 0.05 mg/kg/dayおよびノニルフェノール 0.1 mg/kg/dayをそれぞれ単独あるいは複合で毎日強制経口投与した。作出されたF1雄動物は13週齢で屠殺剖検し、精子検査をはじめ、雄性生殖器系への影響を検索した。（倫理面への配慮）動物実験は本大学の動物委員会の承諾を得て、動物愛護にそったプロトコールに従って行った。

2. 子宮に及ぼす影響（前川）

動物には子宮癌好発系のドンリュウラット用いた。ビスフェノールA単独投与群では0、

0.006 および 6 mg/kg、ノニルフェノール単独投与群では0、0.1、10 および 100 mg/kg、併用投与群ではビスフェノールA 0.05 mg/kg・ノニルフェノール 0.1 mg/kg、ビスフェノールA 100 mg/kg・ノニルフェノール 100 mg/kg およびビスフェノールA 100 mg/kgを妊娠および哺育期にわたり母動物に強制経口投与し、母ラットの繁殖成績、経時的な発育分化の観察や卵巣機能検査を含む仔の雌性生殖器系への影響について検索した。さらに各単独投与群では発癌への修飾作用を、併用投与群ではエストロゲンに対する感受性について検索した。また母および仔動物の血清組織中および飼育環境中のビスフェノールA濃度を測定した。全ての実験は実験動物に対するWHO等の指針に基づき実施され、本実験期間中指針を逸脱する事項は認められなかった。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに及ぼす影響（福島）

胎児期、新生児期に及ぼす影響については、雌マウスの妊娠0日から出生児の離乳までの間、ビスフェノールAとノニルフェノールをヒト曝露レベルを考慮した低用量を含む用量で経口投与した。雄児動物を13週齢まで飼育した。さらにスチレンモノマー、ダイマーおよびトリマーの肝発がん性については、ラット肝中期発がん性試験法（伊東法）を用いて検索した。いずれも大阪市立大学医学部動物飼育施設規定に準拠し、動物を飼育した。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響（池上）

本研究では主に、妊娠期・授乳期のラットに、飼料に混合して大豆イソフラボンを投与した。胎児、母乳へのイソフラボンの移行量と母親と乳児、成長期への生体影響を観察した。骨

代謝への影響については、マウスを用いた。動物実験は総理府告示に則って倫理的な配慮のもとに行った。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響（堤）

Wistar 系雌ラットにビスフェノール A またはノニルフェノールを種々の濃度で基礎飼料に混じ妊娠、出産、授乳期間を通して投与した。生まれた仔ラットに 2000 ppm の N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (BHP) を飲料水に混じ 12 週間投与し、BHP 投与開始 20 週後にエーテル麻酔下に屠殺、剖検を行い病理学的検索を行った。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。

6. 行動異常に及ぼす影響（鈴木）

妊娠期および授乳期の親マウスへのビスフェノール A 慢性曝露は、薬物混入飼料法に従って行なった。なお、すべての期間を普通飼料にて飼育されたマウスを対照群とし、各群ともに離乳後 4 週間以上普通飼料で飼育してから以下の検討を行なった。1) 薬物無処置による一般行動解析。2) メタアンフェタミン誘発自発運動促進作用ならびに報酬効果の測定。3) モルヒネ誘発鎮痛作用、自発運動促進作用ならびに報酬効果の測定。4) Buspirone ならびに diazepam 誘発抗不安作用に及ぼす影響。5) Western blot 法による脳内ドーパミン関連タンパク質の検出。6) RT-PCR 法による脳内ドーパミン受容体 mRNA の検出。7) GTP γ S 結合実験によるドーパミンおよびセロトニン受容体作動薬誘発 G-タンパク質活性化作用の検討。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン（船江）

中枢神経系への影響：ビスフェノール A を

親 ddY マウスに混餌で投与し、その親から生まれ、授乳した仔マウスの脳を用いて、脳内アミンの定量と脳内ドーパミン動態に関連する各種蛋白質の発現量の測定を行った。

ビスフェノール A 受容体の探索・精製：ビスフェノール A の中枢神経系への作用の作用機序を明らかにする為に、ラット脳膜画分でのビスフェノール A 受容体の探索、さらにビスフェノール A アフィニティーカラムを開発してのビスフェノール A 受容体の精製を行った。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。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析（伏木）

妊娠初期から授乳期まで ddY マウスに種々の濃度のビスフェノール A を経口投与し成熟した段階で脳を解析する系と妊娠 10 日目から母マウスにビスフェノール A を経口投与し胎仔脳を調べる系を用いた。脳の連続切片に対し、tyrosine hydroxylase (TH) やカルシウム結合蛋白の免疫組織化学を施し定量的解析を行なった。一方 TH、カルシウム結合蛋白、GAP43、dopamine receptor (D1R, D4R, D5R) に関する Western blot ならびに TH、エストロゲン受容体 (ER α , ER β) mRNA の定量 PCR を実施した。（倫理面への配慮）動物の取扱い・処置は、京都府立医科大学実験動物取扱い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

1. 雄性生殖器系に及ぼす影響（白井）

【実験 1】ビスフェノール A 120 mg/kg/day 投与群で母動物の妊娠期間中の

体重が有意な増加抑制を示したが、授乳期間中では差は認められなかった。また妊娠期間、出生率などに影響を認めなかった。F1 雄仔動物の体重変化、生殖器系器官重量、下垂体、甲状腺重量において有意な差は認めなかった。また前立腺における PIN、癌および精囊における異形過形成の発生率は群間に差を認めなかった。【実験 2】ノニルフェノール 100mg/kg/day 投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示し、妊娠期間も 24.0 日間と延長傾向を示した。この変化は F344 ラットである母動物に対するノニルフェノールの毒性変化と考えられた。出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄仔動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査（精子数、精子運動率および異常形態発生率）および精巣の精細管ステージングには有意な差を認めなかった。現在、PhIP を投与した発がん実験は実験第 42 週（47 週齢）を経過中であり、その体重変化には群間に有意な差を認めていない。【実験 3】ノニルフェノール 0.05mg/kg/day 単独投与群で妊娠期間中の母動物の体重が有意な増加抑制を示したが、人為的影響と推察される 3 例の出産しなかった動物が含まれており、被験物質の影響ではないと考えた。授乳期間中では有意な差を認めなかった。そのほか、妊娠期間、出生児の数や性比には影響を認めなかった。13 週齢で屠殺した F1 雄仔動物の体重変化、生殖器系器官重量、精子検査（精子数、精子運動率および異常形態発生率）および精巣の精細管ステージングにおいて有意な差を認めなかった。また、屠殺時の血清中テストステロン濃度にも群間に差を認めなかった。現在、精巣の精細管ステージングおよび生殖器系器官の H.E.標本による病理組織学的検査

実施中である。

2. 子宮に及ぼす影響（前川）

全投与群の母ラットの繁殖成績において対照群と投与群の間で有意な差は認められなかった。仔の体重、子宮重量・子宮腺の形成・腔開口時期など雌性生殖器の発育分化、性周期および排卵数において、対照群と投与群の間で有意な差異は観察されず、ビスフェノール A 単独投与群では子宮の増殖性病変の増加も認められなかった。ノニルフェノール単独および併用実験は平成 14 年 3 月現在実施継続中である。6 mg/kg 群の母ラット血清中のビスフェノール A 濃度が有意に増加したが、乳汁、仔の血清、肝臓中のビスフェノール A 濃度には差は認められなかった。しかし、対照群を含む全ての血清・組織中にビスフェノール A が検出され、自動給水装置中の水および固形飼料の飼育環境中にもビスフェノール A が検出された。

3. 精巣に及ぼす影響および発がんに及ぼす影響（福島）

ビスフェノール A 投与により、雄児マウスにおいて前立腺腹葉の重量増加と精巣における精子数の増加が、また精子運動能の亢進が高用量群で認められた。さらに、ノニルフェノールの高用量投与の雄児マウスでは non-head な精子が多く認められた。スチレンモノマー、ダイマーおよびトリマーにはラット肝発がん性がないことが判明した。

4. ゲニステインの胎児および新生児に及ぼす影響（池上）

大豆イソフラボンには 3 種あるが、ゲニステイン単独ではその生体影響はラットでは弱く、ダイゼインの方が強かった。ラットで観察した生体影響では、母親と仔ラットの体重増加の抑制、胎児数の減少、肝臓重量の増加、胸

腺重量の低下、血中甲状腺ホルモンへの影響が観察された。しかし、日本人が日常摂取する大豆・大豆加工品からの摂取では内分泌かく乱作用は懸念されるものではない。

5. 胎児および新生児の甲状腺に及ぼす影響（堤）

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、各濃度のビスフェノールAあるいはノニルフェノールの投与により、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、ビスフェノールAあるいはノニルフェノール投与による、母ラットの妊娠や出産の異常、仔ラットの成長や性成熟障害および明らかな甲状腺機能異常はみいだされなかった。

6. 行動異常に及ぼす影響（鈴木）

1) 妊娠期および授乳期にビスフェノールAを処置されたマウスは、薬物無処置時において明らかな異常行動、新規環境への適応性の低下ならびに疼痛閾値の低下などを示した。さらには、メタアンフェタミン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、モルヒネ誘発鎮痛作用の減弱を示した。2) ヒトの推定一日摂取量に相当する用量のビスフェノールAの妊娠期および授乳期の曝露によっても、メタアンフェタミン誘発自発運動促進作用ならびに報酬効果が増強された。また、これらのマウスの脳内において、ドーパミン D_1 受容体 mRNA の有意な増加が認められた。

3) ビスフェノールAの器官形成期ならびに授乳期曝露群では、モルヒネおよびメタアンフェタミン誘発自発運動促進作用ならびに報酬効果の著明な増強が認められた。また、周産

期ならびに授乳期曝露群では不安神経症状が認められた。さらに、ビスフェノールAの器官形成期曝露マウスの側坐核あるいは視床下部領域の膜標本において、ドーパミンあるいはセロトニン受容体作動薬誘発 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の視床下部領域の膜標本では、セロトニン受容体作動薬誘発 G-タンパク質活性化作用の有意な減弱が認められた。

7. 行動異常ラット脳における p450 誘導とドーパミン（船江）

中枢神経系への影響：ビスフェノールAを親を介して胎児期・乳児期に曝露を受けた仔マウスでは、脳内のドーパミン量が減少していた。また、ドーパミン生成に関与するチロシン水酸化酵素やドーパミン受容体蛋白質の mRNA 発現量が有意に増減しており、ビスフェノールA曝露によって脳内ドーパミン動態に変動が生じていることが明らかとなった。また、ビスフェノールAの曝露時期に関しては、乳児期曝露より胎児期曝露によって、より大きな変動が見られ、胎児期が危険期である事が示唆された。ビスフェノールA受容体の探索・精製：ラット脳膜画分でのビスフェノールA受容体の探索を行ったところ、ラット脳 P2 膜画分にビスフェノールA結合活性が存在し、ビスフェノールAアフィニティーカラムで精製を行い、53 KDa の蛋白質を精製することに成功した。

8. 行動異常ラット脳の分子病理学的解析（伏木）

胎齢 10 日以降 8 日間ビスフェノールAを投与された胎仔脳で TH 陽性黒質神経細胞数が減少傾向を示した。妊娠全期間から授乳期が終るまでビスフェノールAを投与した群 (3 $\mu\text{g/g}$

ならびに 8 $\mu\text{g/g}$ of food) の雌では、生後 9 週齢で TH 陽性黒質神経細胞密度が非投与群雌に比し有意な減少を示した。一方、大脳皮質などの calbindin D28k, calretinin, parvalbumin 陽性神経細胞数は、ビスフェノール A 投与による影響を受けなかった。Western blot では、TH, calbindinD28k, calretinin, parvalbumin, D1R, D4R, D5R, GAP43 何れにおいても両群間で有意差をみとめなかった。定量 PCR によりビスフェノール A 投与群雌で $\text{ER}\alpha$ 及び $\text{ER}\beta$ の mRNA 発現亢進が判明した。

D. 考察

前年度の報告でビスフェノール A もしくはノニルフェノール単独曝露は F1 仔雄動物の性成熟齢 (13 週齢) での生殖器系に対して影響を示さないことを述べたが、今回、60 週間の DMAB 発がんモデルを用いてビスフェノール A は前立腺発がんに対して影響を及ぼさないことが示された。ノニルフェノールの前立腺発がんに及ぼす影響については現在動物実験継続中である。さらに、ビスフェノール A およびノニルフェノールの低用量複合投与においても 13 週齢 F1 の雄仔動物の生殖器系に対する影響はないことが示された (白井)。

全投与群の母ラットの繁殖成績において投与に関連した変化は観察されなかった。全投与群における仔の発育曲線、発育分化および卵巣機能を含む雌性生殖器系の検査において、投与による影響は認められなかった。またビスフェノール A 単独投与では子宮癌への修飾作用は認められないと考えられた。しかし現在ノニルフェノール単独および併用投与群においては実験途中である。また、仔ラット体内の BP はむしろ飼育環境中のビスフェノール

A に曝露された結果である可能性が示された (前川)。

ビスフェノール A の高用量投与は雄児マウスの生殖器系に影響を及ぼしたが、低用量では作用を示さなかった。今後、この事実を再確認するとともにその作用機序を追究する必要がある。さらに、ノニルフェノール投与による non-head の精子発生についてはアーチファクトの可能性が強く、ノニルフェノールは雄児マウス精巣に影響を及ぼさないと考えられた (福島)。

大豆イソフラボンとしては、ゲニステインがエストロゲン作用が強いために内分泌かく乱作用が懸念されていたが、ダイゼインについてはラットではむしろ強い生体影響があった。今後はその機構や代謝とも関連した検討が必要であろう (池上)。

本実験条件下においてビスフェノール A およびノニルフェノールは、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も、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。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ビスフェノール A およびノニルフェノールが有意な発癌修飾作用を示すことはなく、ビスフェノール A およびノニルフェノール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唆された (堤)。

これらの結果から、妊娠期、特に器官形成期ならびに授乳期におけるビスフェノール A の慢性曝露が、ドーパミン神経系の機能亢進を誘導し、一般行動異常やモルヒネおよびメ

タアンフェタミンによる精神依存形成の増強を引き起こしている可能性が示唆された。一方、妊娠期ならびに授乳期におけるビスフェノール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不可逆的な神経変性は、周産期ならびに授乳期におけるビスフェノールAの慢性曝露が特に重要である可能性が示唆された。一方、ビスフェノールA処置マウスでは、疼痛閾値の低下やモルヒネ誘発鎮痛作用が減弱したことから、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ている可能性が考えられる(鈴木)。

胎児期・幼児期にのみ間接的にビスフェノールAに曝露しただけで、仔の脳内のドーパミン動態の変動が離乳後にも起きていることから、このビスフェノールAの中樞神経系への影響は、脳内における、なんらかのドーパミン神経系の傷害によるものであり、不可逆的な変異を伴っている可能性が示唆された。その作用機序を明らかにするためにビスフェノールA受容体の探索・精製を行ったところ、53 KDa の膜蛋白質が精製され、この膜蛋白質には、ビスフェノールAだけでなく甲状腺ホルモンもビスフェノールARに結合することから、内分泌かく乱化学物質の中樞神経系への作用は、このビスフェノールARを介した甲状腺ホルモンの関与が考えられた(船江)。

ビスフェノールA投与中止後 6 週を経過した成熟脳で見出された TH 陽性黒質神経細胞減少は胎生期由来が推定されたため、胎仔脳を調べたところ黒質 TH 陽性神経細胞数は減少傾向を示した。一方、全脳での Western blot や定量 PCR では TH 発現量に差を認めなかつ

た。黒質以外の領域ではビスフェノールA投与による TH 陽性細胞数の変化を認めなかったことを併せ考えると、全脳での TH 発現量に差が見出されなかったのは矛盾しないと考ええる。ビスフェノールA投与雌で ER α 及び ER β mRNA 発現が亢進していたこと、黒質には ER β が強く発現するとの過去の報告を勘案すると黒質へのビスフェノールAの選択的影響は ER を介してのものである可能性が示唆される(伏木)。

E. 結論

現在まで得られた結論は次の如くである。

- 1) F344 雌ラットに妊娠 0 日から離乳までの間ビスフェノール A およびノニルフェノールをそれぞれ単独あるいは複合投与しても、性成熟齢 F1 雄動物の生殖系へ影響を示さず、さらに 60 週間の前立腺発がん性試験においてもビスフェノール A は影響しないことが明らかとなった。(白井)。
- 2) 妊娠・授乳期の母ラットへ低用量から高用量にわたるビスフェノールAおよびノニルフェノールを単独あるいは併用にて強制経口投与した結果、母動物の繁殖成績、仔の雌性生殖系に投与に関連した変化が観察されなかったことから、この実験条件下におけるビスフェノールAおよびノニルフェノール投与は雌性生殖器へ影響を及ぼさない可能性が高いと考えられた。しかし一部で未だ実験中であることから、実験終了後に総合的な結論を出す予定である。また、母および仔ラットは環境中のビスフェノールAに曝露されている可能性が示された(前川)。
- 3) ビスフェノールAの親マウスへの妊娠期、授乳期投与は高用量で雄児マウスの前立腺と精巣に影響を及ぼすことが明らかとなった。