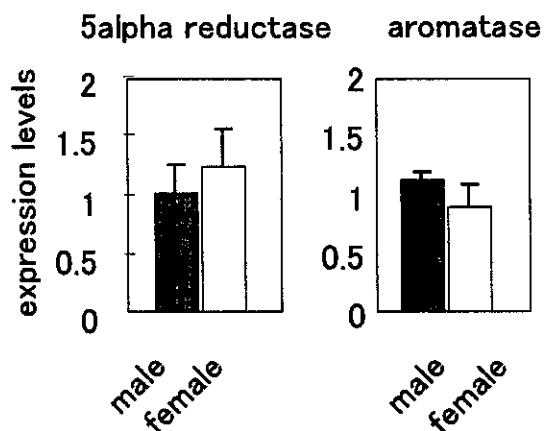


Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations

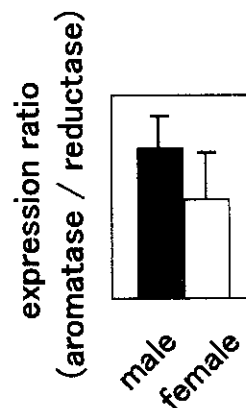
Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

Figure 1



The mRNA expression levels of Testosterone 5alpha reductase and aromatase in rat SDN-POA at gestation day 20. The expression levels were shown as the ratio to GAPDH mRNA.

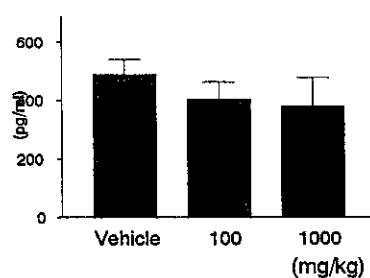
Figure 2



The mRNA expression ratio of Testosterone 5alpha reductase and aromatase in rat SDN-POA at gestation day 20.

Figure 3

Serum testosterone level in rat treated with DEHP



Serum testosterone levels were measured using Testosterone EIA Kit. The standard curves ranged from 7.8 to 500 pg/ml.

Figure 4

Activities of testosterone 5α reductase

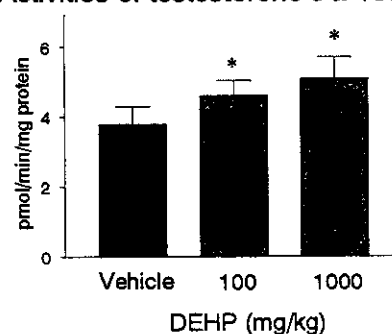
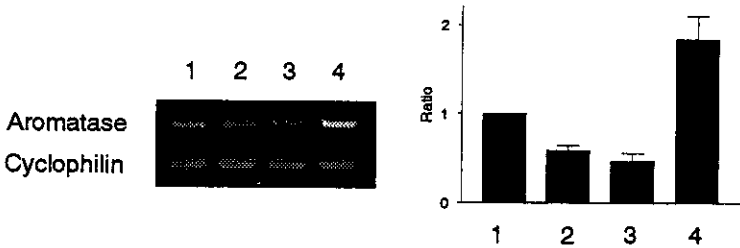


Figure 5

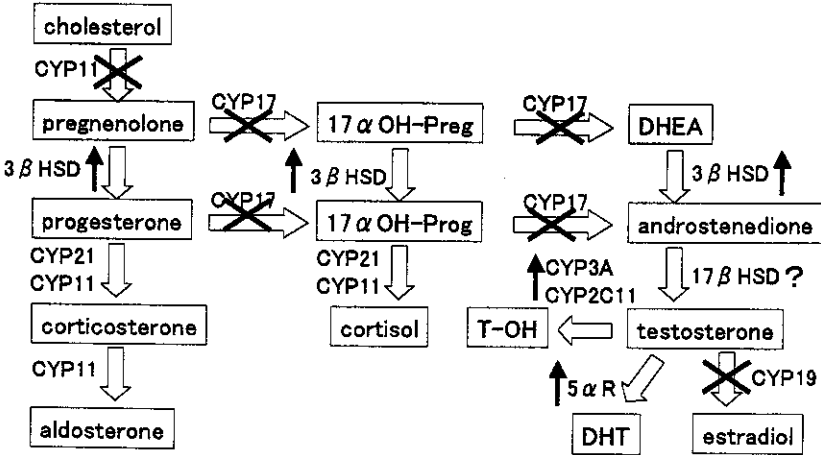
RT-PCR analysis of Aromatase (CYP19) mRNA expression in rat testis treated with DEHP



Lane 1, vehicle control; Lane 2, DEHP -treated (100 mg/kg); Lane 3, DEHP-treated (1000 mg/kg); Lane 4, positive control (ovary).

Figure 6

DEHP & DBP effects on Steroid Biosyntheses



厚生労働科学研究費補助金 （萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響
ービスフェノール A 周生期曝露による行動への影響ー

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 藤田正一 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 教授

研究要旨

胎生仔期や新生仔期は、神経細胞が分化し、神経ネットワークを形成する重要な時期である。特に、哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定していることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。そこで、本研究では、胎生仔期・新生仔期のラットに低濃度の内分泌攪乱化学物質ビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。

妊娠 1 日目から離乳期まで、母ラットに、連続でビスフェノール A を飲水投与(約 1.5mg/kg/day)し、得られたオス及びメスの仔ラットについて、生後 13 日齢から、自発運動量測定器 SCANET を用いて定期的に自発運動量および探索行動レベルなどを測定した。

ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに eyelid-opening の早期化が観察された。また、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは自発運動量が増加することが分かった。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。性成熟後はオス及びメスでは自発運動量に変化が現れることが分かっている。今回の解析から、ビスフェノール A を曝露した性成熟期の生後 49 日齢のオスラットでは、自発運動量及び探索行動量が一時的に抑制されることが明らかとなった。

A. 研究目的

哺乳類では周生期脳のステロイドホルモンへの曝露が性成熟後の性行動を決定していることが明らかとなっている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる脳インプリンティングを阻害し、正常な性分化や性成熟後の性行動を攪乱することが懸念される。

周生期における脳インプリンティングには、アロマターゼ (CYP19) によるテストステロン→エストラジオールの変換が不可欠である。環境汚染物質の中には、アロマターゼ発現及び活性を阻害するものや、エストロゲン受容体への結合および転写活性化能を有する化合物が報告されている。ビスフェノール A はエストロゲン受容体に結合し、その標的遺伝子の転写を活性化する内分泌攪乱化学物質の一つである。ビスフェノール A は、主にプラスチック樹脂の材料として使用され、国内では年間 350000t が合成されている。近年、ビスフェノール A の食物への移行が問題となり、実際、ヒト臍帯血からはビスフェノール A が検出されることが報告された。これまで、ビスフェノール A はエストロゲン受容体への結合活性がエストロゲンに比べて顕著に弱いため、その毒性は低いと認識されており、ビスフェノール A の最大無作用量 (Non Adverse Effect Observed Adverse Effect ; NOAEL) は、マウス・ラットにおける試験結果から、50mg/ kg/ day とされ

ている。しかし、近年の報告では、①in vivo では薬物代謝酵素群によってビスフェノール A の代謝的活性化が起こる可能性、②胎児期や新生児期などの周生期では、化学物質に対する感受性が高くなる可能性、が報告されている。胎生仔期や新生期仔は、神経細胞が分化し、神経ネットワークを形成する重要な時期であるため、NOAEL 以下の低濃度の曝露でも、この時期には不可逆的な影響を受ける可能性が考えられる。また、近年、ビスフェノール A による酸化障害や DNA adduct の生成など、エストロゲン様作用以外の毒性も報告されている。そこで、本研究では、ラットを胎生仔期・新生仔期に低濃度のビスフェノール A に曝露し、脳の発達や行動に対する影響を調べた。

B. 研究方法

1. ビスフェノール A の曝露

妊娠 6 日目からビスフェノール A (5mg/L) 濃度で飲料水に混ぜ、ラットに毎日経口投与(コントロール群 4 匹、ビスフェノール A 群 4 匹)した。生後 1 日目でラット新生仔の匹数を調整し、1 腹メス 4 匹、オス 4 匹に調整し、生後 7 日目から、自発運動量および探索行動量の測定を SCANET を用いて定期的に行った。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 結果

飲水投与ビスフェノール A 曝露によって、仔ラットのオス、メスともに体重や産仔数に変化は見られなかった。しかし、ビスフェノール A 曝露群では、オス・メスともに eyelid-opening の早期化が観察された (Figure 1)。また、メスではオスに比べて eyelid-opening が早期であった。

SCANET を用いた運動量の測定から、胎仔期・新生仔期のビスフェノール A 低濃度曝露によって、新生仔期のオスラットでは有意に自発運動量が増加することが分かった (Figure 2)。しかし、メスでは自発運動量に変化がなかったため、ビスフェノール A 曝露によって、この時期の運動量の性差が消失することが明らかとなった。また、性成熟期の 49 日齢では、オスラットの自発運動量及び探索行動が減少することが明らかとなった (Figure 3、4)。この減少は、その後、aging にともなって消失することも明らかとなった。メスでは、ビス

フェノール A による探索行動の変化は観察されなかった。

D. 考察

エストロゲン曝露によって、eyelid-opening の早期化が報告されている。また、eyelid-opening には明らかに性差が存在し、メスはオスよりも早期である。したがって、今回ビスフェノール A 曝露で同様の結果が得られたのは、エストロゲン作用によるものと考えられた。

生後 13 日齢のオスでは、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意な自発運動量の増加が見られた。また、オスでは、精製熟時の 49 日齢において、ビスフェノール A 投与群はコントロール群に比べて、有意に自発運動量および探索行動量が増加した。オスで観察された変化は、メスでは顕著ではなかった。従って、胎生仔期・新生仔期のビスフェノール A への曝露が、特に雄において、新生仔期のホルモンによる脳インプリンティングを変化させる可能性が考えられた。

E. 結論

ビスフェノール A の胎仔期及び新生仔期曝露は、新生仔期及び性成熟期のラットの自発運動量及び探索行動に影響を与えることが分かった。これらの行動の変化には明かな性差が見られることから、周生期のホルモンによる脳インプリンティング機構に、ビスフェノール A が影響を及ぼしている可能性が考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the behavior following uterus and lactational exposure. (投稿準備中)

2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会
Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on microsomes and drug oxidations

Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Regulates levels of P450 and their metabolic activities in rat testis microsomes

5) 第 135 回日本獣医学会

① マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウロボルフィリン生成の制御機構—鉄による効果—

② Down-regulations of expressions of PPAR-alpha and AhR target genes by AhR and PPAR-alpha ligands, respectively

3. 総説

石塚真由美、藤田正一 「化学物質による野生生物及び生態系への影響とは」化学物質と環境 2003 58:7-10

4. 著書

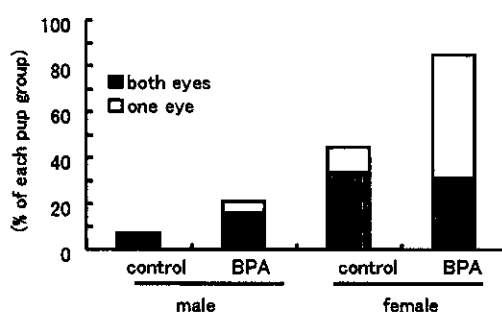
石塚真由美、岩田久人、藤田正一：トキシコロジー7 章 環境毒性 (日本トキシコロジー学会) 2002 (290-303)

板倉隆夫、石塚真由美、藤田正一：シトクロム P450 (講談社サイエンティフィク) 印刷中

藤田正一「臨床薬物代謝化学」(廣川書店) 印刷中

Figure 1

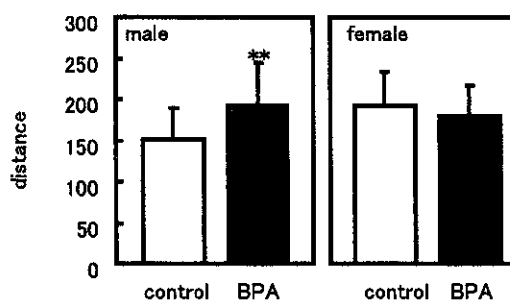
The effects of BPA on the eyelid opening at the postnatal day 17



The eyelid opened pups were examined at the postnatal day 17. During the gestation and lactation periods, dams had been exposed to BPA orally. The number of pups was as follows; control male (n=14), BPA male (n=19), control female (n=18), BPA female (n=13).

Figure 2

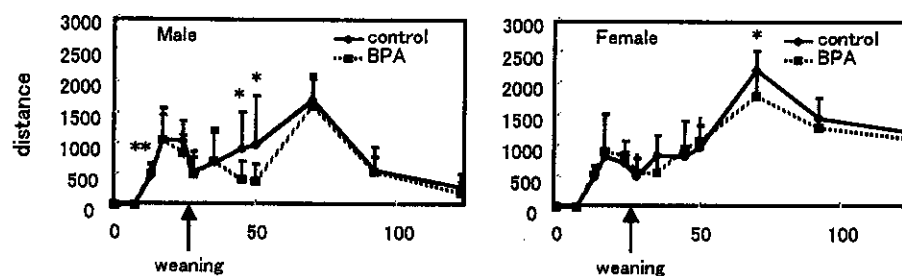
Motor activities of pups at the postnatal day 13



The effect of BPA on motor activities of pups at the postnatal day 13 were determined. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10. n=13-19, ** p<0.01 (from control)

Figure 3

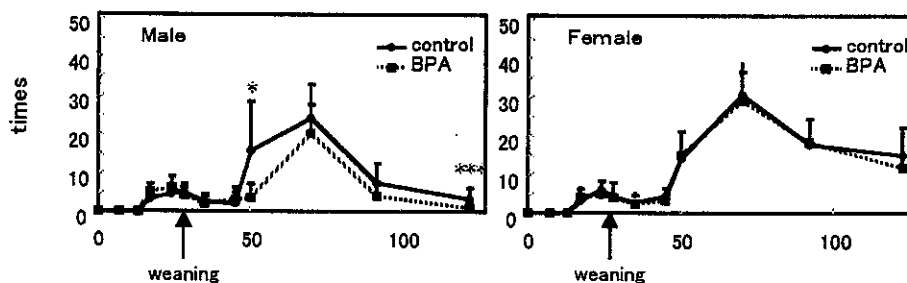
Alterations in motor activities of pups during developing and aging periods



The effect of BPA on motor activities of pups during developing and aging. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10 for 1 min. $n=12-19$ in each group. * $p<0.05$ (from control).

Figure 4

Effects of BPA on rearing during the developing and aging periods



The effect of BPA on rearing times of pups during developing and aging. Observations were carried for 1min using SCANET MV-10 for 1 min. $n=12-19$ in each group. * $p<0.05$ (from control).

厚生労働科学研究費補助金 （萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

周生期の脳神経細胞における環境化学物質の影響
ービスフェノール A 曝露後の小脳のマイクロアレイ解析ー

主任研究者 石塚真由美 北海道大学大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助手

分担研究者 数坂昭夫 北海道大学・大学院獣医学研究科
環境獣医科学講座 助教授

研究要旨

哺乳類では周生期のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることが報告されている。従って、この時期の内分泌攪乱化学物質への曝露は、ステロイドホルモンによる神経細胞の正常な分化・増殖を攪乱することが懸念される。また、ビスフェノール A の胎仔期・新生仔期曝露によって、生後 7 日齢のラットでは、視床下部重量には変化が無かったが、小脳重量が有意に減少することが明らかとなった。そこで、本研究では、新生仔期のラット脳において、ビスフェノール A などエストロゲン作用を持つ環境汚染物質への低濃度曝露によって発現が変動する遺伝子群を、cDNA マイクロアレイ法を用いて解析した。

ビスフェノール A 曝露によって、G 蛋白質 α 及び β サブユニットの発現量が増加していた。 α は G_i (inhibiting) に比べ、 G_s (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、ホスホリパーゼ C の発現量は変わっていなかったが、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。bax-alpha (bcl2-associated X protein membrane isoform alpha) や caspase3 などアポトーシスを引き起こす因子については、発現量の増加が認められた。

また、小脳の初代培養細胞を用いた実験から、ビスフェノール A 曝露は細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

A. 研究目的

哺乳類周生期では、脳神経のエストロゲン・アンドロゲン曝露が神経細胞アポトーシスの調節を行っていることが報告されている。ビスフェノール A はエストロゲン受容体への結合性が極めて弱いとされてきた。しかし、化学物質への感受性の高い発達期の脳神経系に影響は不明である。そこで、ビスフェノール A の脳発達への影響についてその原因を明らかにする為に、ビスフェノール A を妊娠ラットに連続投与し、小脳重量やニューロフィラメントの発現量に差の見られた生後 7 日目において、新生仔の小脳を採取し、発現量が変動する mRNA を cDNA マイクロアレイによって解析した。

B. 研究方法

1. ビスフェノール A の曝露 in vivo

妊娠 6 日目からビスフェノール A (0.25mg/kg) あるいはコントロールとしてコーンオイルをラットに毎日経口投与 (コントロール群 4 匹、ビスフェノール A 群 4 匹) した。生後 1 日目でラット新生仔の匹数を調整し、1 腹メス 4 匹、オス 4 匹に調整し、生後 7 日目に新生仔から脳 (視床下部及び小脳) を採取し、RNA 抽出を行って、コントロール群とビスフェノール A 曝露群の脳 (各 4 匹分を pool) において発現量に差のある mRNA を解析した。解析には、クロンテック RAT TOXICOLOGY Ver1.0

グラスアレイを用い、GSI Lumonics ScanArray 4000 によってスキャンニングした。

2. 1. ビスフェノール A の曝露 in vitro

生後 2 日齢のラット新生仔から小脳細胞を採集し、DMEM によってポリリジンコートディッシュを用いて初代培養を行った。ビスフェノール A はプレ培養 2 日後に 100nM、100uM の濃度で曝露し、細胞増殖率を WST-1 法によって測定した。また、増殖したグリア細胞のマーカー蛋白 GFAP (glial fibrillary acid protein) 発現量を、GFAP 抗体を用いてウェスタンブロット法により定量した。

(倫理面への配慮)

ヒトの組織及び動物を用いた全ての実験は北海道大学および同大学大学院獣医学研究科の定める実験ガイドラインに従って研究を実施した。動物実験計画の立案は、動物の導入から、飼育、実験操作、終了後の処置までを、科学的にはもとより動物福祉の観点に立って十分な検討を行い、動物実験の範囲を研究目的に必要な最小範囲にとどめるため実験操作の十分な検討を行った。

C. 結果

1. 脳セクション重量への影響

ビスフェノール A 曝露によって、生後 7 日齢のオスでは、有意に小脳の重量が減少した (Figure 1)。視床下部については、ビスフェノール A 曝露の影響は見られなかった。また、メスでは、小脳、視床下部ともに、ビスフェノール A 曝露によって脳セクションの重量は変化しなかった。小脳重量は、2 ヶ月後にはコントロール群とビスフェノール A 曝露群とで差は消失していた。そこで、生後 7 日齢のオス小脳を用いて、ビスフェノール A 曝露によって発現変動する mRNA をスクリーニングした。

2. 新生仔期における小脳発現遺伝子のマイクロアレイ解析

ビスフェノール A を曝露した生後 7 日目の新生オスラットの小脳において、発現量が減少する遺伝子は、hormonal receptor、G proteins、tumor suppressors & oncogene、calcium binding protein など約 50 種、発現レベルが上昇する遺伝子は hormonal receptor、G proteins、tumor suppressors や oncogene、TGF beta、protease、neuronal transmitter receptor など約 120 種が同定された。その中で、2 回の実験によって再現性が認められた遺伝子を Table 1 に示す。今回の解析では、ビスフェノール A 曝露によって、小脳に発現する G 蛋白質 α 及び β サブユニットの発現量が増加していた。 α は G_i (inhibiting) に比べ、 G_s (stimulating) 蛋白の発現量が顕著に増

加していた。また、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。ビスフェノール A 曝露のオスラット小脳では、ホスホリパーゼ C の発現量は変わっていなかったが、カルモジュリン発現量は顕著に減少していた。カルモジュリン結合性の ras ファミリー・Kir (kinase-inducible ras-like) の発現量は変わらず、PKC (protein kinase C) や同じく ras ファミリーである Rin (ras-like protein in neurons) の発現量は増加していた。また、NMDA (N-methyl-D-aspartate receptor) 受容体 2A、2B、AMPA (3H-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxasole-4-propionate) 受容体、GluR2 (glutamate receptor 2) 発現量に変動は見られなかった。一方、ビスフェノール A の曝露によって、mGluR (metabotropic glutamate receptor) のうち、mGluR 2、mGluR 5、mGluR 6、mGluR 7 の発現量は増加していたが、小脳に分布の多い GluR1 の発現量に変化は見られなかった。

3. 初代培養細胞へのビスフェノール A 曝露の影響

生後 7 日目におけるオスの小脳重量は減少していたが、初代小脳培養細胞では、ビスフェノール A の曝露によって細胞増殖が抑制されることが示された (Figure 2)。アストロサイトの指標蛋白である GFAP 発

現量は、蛋白 mg あたりでは、ビスフェノール A 曝露による影響は認められなかった。

D. 考察

1. ビスフェノール A 曝露への脳セクション重量の影響

ビスフェノール A を曝露したオス新生ラットでは、小脳重量が減少していた。しかし、視床下部重量に変化は見られなかった。小脳細胞は、他のセクションとは異なり、生後数週間に細胞増殖・分化のピークを迎える。従って、生後 7 日齢で小脳重量にのみの増加が抑制されたのは、脳セクションにおける発育ステージの違いと考えられた。

2. ビスフェノール A 曝露で変動する新生仔・小脳の遺伝子スクリーニング

ビスフェノール A の曝露によって、神経伝達物質受容体の中で、ドパミン D2、D4 受容体、ニコチン性やムスカリン性アセチルコリン受容体の発現量も増加することが示された。従って、ビスフェノール A 曝露によって、特にアセチルコリンやドパミンなどの神経伝達に影響がある可能性が考えられた。実際、in vitro 実験では、ビスフェノール A 曝露によって、アセチルコリンによるチャネル活性化・細胞膜脱分極が阻害されることが報告されている。また、ドパミン受容体 D4 などではエストロゲン曝露で発現が増加することが報告されている。今回のビスフェノール A 曝露による

ドパミン D2、D4 受容体発現量の増加は、エストロゲン様作用によることが考えられた。

また、マイクロアレイの解析から、アポトーシス関連遺伝子では、bcl-2、bax-alpha (bcl2-associated X protein membrane isoform alpha)、caspase3 のいずれの発現量も増加していた。ビスフェノール A は Ca(2+) ATPase 機能を阻害し、アポトーシスを誘導することが、精巣由来細胞では報告されている。また、神経培養細胞において、Ca(2+) ATPase をブロックすると bcl2 発現量の増加が報告されている。ビスフェノール A はミトコンドリアにおいて ATP 代謝を阻害することも報告された。前述したように、ビスフェノール A 曝露によって、カルモジュリン発現量が減少することから、神経組織においても、同様にカルモジュリンを介する Ca(2+) ATPase などの活性化が阻害され、アポトーシスを引き起こす可能性が考えられた。

3. 小脳初代培養へのビスフェノール A 曝露の影響

小脳初代培養では、ビスフェノール A 曝露によって、細胞増殖が抑制されていた。1 のマイクロアレイ解析の結果から、ビスフェノール A 曝露では、アポトーシスを誘発する bax の増加が認められた。また、カルモジュリン発現量が減少することから、ビスフェノール A 曝露が細胞増殖を抑制する可能性が考えられた。

E. 結論

ビスフェノール A 低濃度でも、胎生仔期・新生仔期の曝露は、発達段階の脳神経に発現する遺伝子群の発現量を変動させることが明かとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

Ishizuka M, Kim Eun-Young, Iwata H, Tateishi Y, Shimamoto Y, Yoon Seok-Joo, Maruyama Y, Chiba I, Ibrahim SZ, Kazusaka A, Fujita S. The effect of bisphenol A on the cerebellum development in neonatal male rats following uterus and lactational exposure. (投稿中)

Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates Testosterone Metabolism in Testis of Prepubertal Rats. Arch Toxicol. (in press)

Sakamoto KQ, Kunisue T, Watanabe M, Masuda Y, Iwata H, Tanabe S, Akahori F, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Accumulation patterns of polychlorinated biphenyl congeners and organochlorine pesticides in Steller's sea eagles and white-tailed sea eagles,

threatened species, in Hokkaido, Japan. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):842-7.

Chiba I, Sakakibara A, Iwata TH, Ishizuka M, Tanabe S, Akahori F, Kazusaka A, Fujita S. Hepatic microsomal cytochrome p450s and chlorinated hydrocarbons in largha and ribbon seals from Hokkaido, Japan: differential response of seal species to Ah receptor agonist exposure. Environ Toxicol Chem. 2002 Apr;21(4):794-806.

2. 学会発表

1) 第 133 回日本獣医学会 (平成 14 年春)

① 妊馬ホルモン・Equilenin による異物代謝酵素の誘導

② マウス海馬におけるビスフェノール A 投与の影響

2) 北海道薬物作用談話会

雌性ホルモンが Ah レセプター介在性・非介在性 CYP1A サブファミリー発現機構に及ぼす影響

3) 環境ホルモン学会 第 5 回研究発表会
Short Period Exposure of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate Regulates

Testosterone Metabolism in Testis of
Prepubertal Rats

4) 14th International symposium on
microsomes and drug oxidations

Di-(2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP)
Regulates levels of P450 and their
metabolic activities in rat testis
microsomes

5) 第135回日本獣医学会

①マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウ
ロボルフィリン生成の制御機構－鉄による
効果－

② Down-regulations of expressions of
PPAR-alpha and AhR target genes by AhR
and PPAR-alpha ligands, respectively

5) 日本トキシコロジー学会

①マウス肝における CYP1A2 誘導に伴うウ
ロボルフィリン生成の制御機構－鉄による
効果－

Table 1 List of genes showing up- and down-regulation in cerebellum by BPA exposure

Induced genes

Accession number	Gene name	Expression	Gene function
Y00396	c-myc proto-oncogene	2.20	Basic Transcription Factors
U49729	bax-alpha	3.29	Bcl Family Proteins
AF019973	neuron-specific enolase	2.69	Energy Metabolism
AJ002745	chemokine receptor-like 1	2.72	G Protein-Coupled Receptors
AF001953	guanine nucleotide-binding protein beta subunit 5 (GNB5)	2.36	G Proteins
M17525	guanine nucleotide-binding protein alpha stimulating activity polypeptide	3.23	
M17526	guanine nucleotide-binding protein G(0) alpha subunit	7.48	
X05137	low-affinity nerve growth factor receptor (NGF receptor)	3.02	Growth Factor & Chemokine Receptors
U03491	transforming growth factor beta 3 (TGF-beta3)	2.96	Growth Factors, Cytokines & Chemokines
U92289	prostaglandin D2 receptor	4.09	Hormone Receptors
M84009	dopamine receptor D4	4.83	

L34542	Ctk; non-receptor protein tyrosine kinase	2.21	Intracellular Kinase Network Members
L01702	R-PTP-A; receptor protein-tyrosine phosphatase alpha	2.35	Intracellular Protein Phosphatases
L26525	epithelial discoidin domain receptor 1	2.44	Intracellular Transducers, Effectors & Modulators
L31619	neuronal acetylcholine receptor protein alpha 7 subunit (NACHRA7)	2.04	Ligand-Gated Ion Channels
X03362	erbB2 proto-oncogene	2.03	Oncogenes & Tumor Suppressors
U10995	Ear-3; V-erbA related protein; COUP-TFI transcription factor	2.43	
J05166	solute carrier family 4 member 2	2.73	Other Membrane Channels & Transporters
U87305	transmembrane receptor unc5 homolog 1	2.17	Other Receptors (by Ligands)
D28512	synaptotagmin III (SYT3)	5.04	Other Trafficking & Targeting Proteins
X63434	urokinase-type plasminogen activator	2.02	Serine Proteases

Reduced genes

Accession number	Gene name	Expression	Gene function
J04629	sodium/potassium-transporting ATPase beta 2 subunit	0.46	ATPase Transporters
X13817	calmodulin	0.32	Calcium-

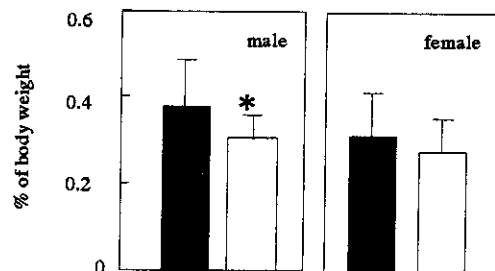
			Binding Proteins
M75153	Rab-11A	0.36	G Proteins
J05189	neuromedin K receptor (NKR)	0.48	Hormone Receptors
U13396	Janus tyrosine-protein kinase 2	0.34	Intracellular Kinase Network Members
X13058	cellular tumor antigen p53 (TP53)	0.43	Oncogenes & Tumor Suppressors
D10754	proteasome delta subunit	0.42	Other Immune System Proteins
D83598	sulfonylurea receptor	0.48	Other Receptors

During the gestational and the lactational periods, dams were orally treated with BPA (5 mg/L) dissolved in distilled water. The expression levels of various genes were examined by cDNA microarray technique using male rat cerebellum mRNA at the postnatal day 7. The determinations were carried out twice and the expression values represent average from the two independent experiments.

Figure 1

Effects of BPA on the weight of brain sections from pups at the postnatal day 7. During the gestation and the lactation periods, dams were orally treated with BPA dissolved in distilled water (5 mg/L). Mean values ($\pm$ SD) indicate % of cerebellum or hypothalamus weight / body weight. Closed bar indicates the weight values from control pups and open bar shows BPA treated animals. N=12-16 in each group. * $p < 0.05$. A) cerebellum. B) hypothalamus.

A Cerebellum



B: Hypothalamus

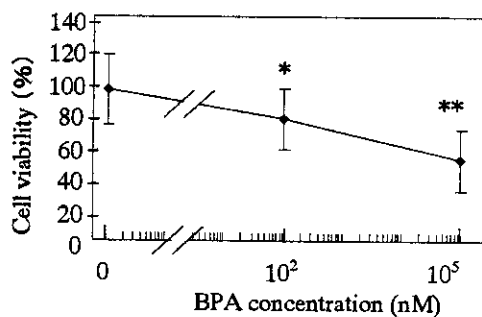
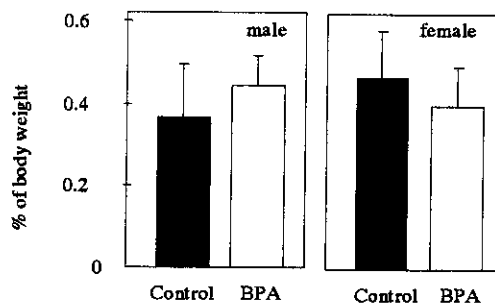


Figure 2

Comparison of cell viability (%) in harvested cerebellums treated with DMSO or BPA. Cerebellums of male rat pups at postnatal day 2 were collected and harvested. The cells were maintained under the conditions of 37 C, 5 % CO₂. After the 2 days of pre-culture, the cells were treated with DMSO or BPA at the dose of 100 nM or 100 μ M for 7 days. The cell proliferation rate was determined using WST-1. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	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
Ishizuka M. Yamamoto Y. Takada A. Kazusaka A. Fujita S.	The loss of enzyme activities by a single amino acid substitution of a newly cloned rabbit CYP2D isozyme, CYP2D24.	Ishimura R	International Congress Series. 1223	Elsevier	Amsterdam	2002	121-126
石塚真由美、 岩田久人、藤田正一	環境毒性	日本トキシコロジー学会教育委員会	トキシコロジー	朝倉書店	東京	2002	290-303

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ishizuka M, Yonemoto J, Tohyama C, Sone H	Perinatal Exposure to Low Doses of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Alters Sex-dependent Expression of Hepatic CYP2C11 and 5a-reductase	Endocrinology		(投稿中)	