

厚生労働科学研究費補助金
食品・化学物質安全総合研究事業

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の
順位付けとヒトでのリスク予測と回避法の研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 船江 良彦

平成15年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の順位付けと
ヒトでのリスク予測と回避法の研究 -----1
船江良彦

II. 分担研究報告書

1. 脳神経細胞膜に存在するビスフェノール A 結合蛋白の生理的意義解明
と内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法の確立 -----10
船江良彦
2. PC12 細胞における Bisphenol-A のドパミン放出機構の解明 -----19
廣井豊子
3. 内分泌かく乱化学物質の新規細胞膜 G 蛋白質連関型受容体に
及ぼす影響とその機序・順位付け—内分泌かく乱化学物質の
新しい毒性評価系に関する研究 -----23
植田弘師
4. 内分泌かく乱化学物質の中枢神経形成過程に及ぼす影響 -----28
今岡進
5. 発達期中枢神経系における Protein Disulfide Isomerase(PDI)の
発現に関する研究 -----33
伏木信次
6. ビスフェノール A が胎仔の脳発達に与える影響に関する研究 -----36
山野恒一
7. 胎児・幼児期曝露による中枢神経系腫瘍発生影響 -----39
福島昭治

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
総括報告書

中枢神経系に影響を与える内分泌かく乱化学物質の順位付けとヒトでのリスク予測と
回避法の研究

主任研究者 船江良彦 大阪市立大学大学院医学研究科 教授

研究要旨

本研究では、内分泌かく乱化学物質のなかで、特にビスフェノール A (BPA) に注目し、中枢神経系への影響を調べるために、BPA のリセプターを解明し、その脳発達における機能や脳内アミノに対する作用機序を検討した。そして、一般的に内分泌かく乱化学物質の中枢神経系に対する作用を予測するためのスクリーニング法を開発した。現在まで得られた研究成果は下記の通りである。

- 1) BPA 受容体タンパク質として Protein disulfide isomerase (PDI) が明らかになった。PDI は T_3 結合タンパク質として知られている。したがって、PDI を用いた T_3 との競合的結合実験に基づいたスクリーニング法により、中枢神経系に影響を及ぼす可能性を調べる事ができる。(船江)
- 2) BPA をラット副腎腫瘍由来の PC12 (pheochromocytoma) 細胞に短時間 (10 分間) 曝露したところ、ドパミン放出が認められた。この反応は G 蛋白及び N 型カルシウムチャネルを介するものであった。以上は、in vitro の実験であるが、生体内でのカテコラミンの攪乱は神経伝達や循環動態に影響を及ぼす可能性があり、本研究により BPA 曝露による急性的な有害作用の可能性が示唆された。(廣井)
- 3) 神経ステロイドの G 蛋白質連関型受容体を介する細胞内カルシウム濃度上昇、及び、脱顆粒応答に対しビスフェノール A 等の多くの内分泌かく乱化学物質が in vitro、in vivo 系において拮抗的に作用し、唯一単独作用を示すものとしてメトキシクロルを見出した。(植田)
- 4) アフリカツメガエルの発生過程およびヒト肝癌細胞における、BPA の影響を調べたところ、低酸素感受性因子の低下による神経板形成異常およびオタマジックシ尾部のアポトーシス誘導が見られた。(今岡)
- 5) 胎生期、早期新生児期のマウス脳における PDI の発現を免疫組織化学的に調べた。PDI は胎齢 10.5 日以降、脳の部域ごとに特徴的な発現パターンを示した。Nestin などとの二重染色から、PDI は分化した神経細胞に強く発現すると考えられた。(伏木)
- 6) Wistar 系ラットの海馬でエストロゲン受容体の α 型 (ER α) の発現を経時的に検索した。ER α の発現は海馬 CA1, CA3 の錐体細胞で生後 4-6 日目にピークに達し、生後 10-15 日目でほぼ成熟ラットの値に下降した。このような時期に BPA に暴露さ

- れると、高次脳機能の中枢である海馬は大きな影響を被ることが示唆された。(山野)
- 7) 神経系腫瘍の発生に及ぼす BPA の経胎盤および授乳曝露による影響をラットを用いて検討した。母動物における各群の出生児数に差はなく、出生児体重ならびに体重の推移にも変動は認められていない。現在、実験を継続中である。(福島)

分担研究者

廣井豊子

大阪市立大学大学院医学研究科講師

植田弘師

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

今岡進

関西学院大学理工学部生命科学科教授

伏木信次

京都府立医科大学教授

山野恒一

大阪市立大学大学院医学研究科教授

福島昭治

大阪市立大学大学院医学研究科教授

A. 研究の目的

近年、内分泌かく乱化学物質が、内分泌系・生殖器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。しかし中枢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、現在問題視されているにも関わらず、未だ作用機序など不明な点が多い。そこで、本研究では、内分泌

かく乱化学物質の中枢神経系への作用を予測するスクリーニング法を開発し、ヒトでのリスク予測とリスク回避法を開発するのが目的である。

B. 研究方法

1. ビスフェノール受容体に対する影響 (船江)

BPA 受容体タンパク質としてラット脳より PDI を精製した。大腸菌で発現させたヒスチジン融合 PDI を用いて T₃ との競合的結合実験をもとに、BPA をはじめとする内分泌攪乱作用を及ぼす可能性のある物質についてスクリーニングを行った。

2. PC12 細胞に対する影響 (廣井)

PC12 細胞に 10~150 μM のビスフェノー

ル A を 10 分間曝露した。細胞内外のドパミンの定量には HPLC を用いた。選択的 L-, N-, P/Q 型カルシウムチャネル拮抗薬、G-蛋白、cyclic AMP/PKA 及びリアノジン受容体各種阻害剤を BPA とともに添加し、ドパミン放出に対する影響を調べた。併せて RT-PCR 法を用いて PC12 細胞におけるリアノジン受容体の存在を調べた。

3. 神経ステロイドに対する影響 (植田)

神経ステロイド受容体を介する細胞内情報伝達機構を肥満細胞由来 RBL-2H3 を用いた β -hexosaminidase 遊離を指標とした脱顆粒応答測定系、及び細胞内カルシウム濃度測定系に各種阻害剤やアンチセンスオリゴヌクレオチドを処置することにより解析した。また、各種内分泌かく乱化学物質による単独及び拮抗作用を上記細胞機能測定系、及び、マウス個体を用いた末梢性疼痛試験法による疼痛過敏応答測定や、エバンスブルーを用いた血管透過性亢進測定によりを解析した。

4. 甲状腺ホルモンによるオタマジャクシ尾部のアポトーシスに対する影響

(今岡)

アフリカツメガエルの受精卵および甲状腺ホルモンによって尾部のアポトーシスが誘導されることが明らかにされているオタマジャクシに BPA を様々な濃度で添加して、発生過程における影響を調べた。また、肝癌細胞 Hep3B を用いて、低酸素応答すなわち低酸素感受性因子 (HIF-1 α) を介した遺伝子発現への影響を検討した。

5. BPA 受容体の発現に対する影響

(伏木)

妊娠マウス (ICR) を用いて、胎生 10.5 日, 12.5 日, 14.5 日, 16.5 日, 18.5 日, 生後

0 日に胎仔または新生マウスの脳を摘出し、PLP 固定液で固定, パラフィン包埋切片を作成し, 免疫組織化学的染色 (ABC 法) を施行した。一次抗体として, 抗 PDI 抗体 (船江教授より恵与), 抗 Nestin 抗体, 抗 TUJ1 抗体, 抗 MAP2 抗体, 抗 Neurofilament 抗体を用いた。

6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

実験動物は Wistar 系ラットを用い、日齢 0-15 日および 8 週齢の雄ラットの海馬について ER α の免疫組織化学染色法と Western blotting を用いて海馬における ER α の半定量を行なった。また、8 週齢の雄ラットにカイニン酸 (12mg/kg) を腹腔内投与し、痙攣重積後 21 日後の海馬についても、ER α の免疫組織化学染色を行なった。

7. 中枢神経系腫瘍発生に対する影響 (福島)

11 週齢の F344 ラットを用い、発情期を示している雌と雄を交配させ、妊娠を確認した母動物に妊娠 0 日から出生児の離乳まで BPA を 0, 0.05, および 200 mg/kg 体重/日の用量で毎日、強制経口投与した。また、N-ethyl-N-nitrosourea, 10 mg/kg 体重を妊娠 18 日目 1 回、静注した。分娩 21 日後に F₁ 動物を離乳し、無処置で飼育し、離乳後 27 週まで飼育・観察する。交配から屠殺までの飼育・観察期間は 33 週である。屠殺後、中枢神経系の腫瘍発生を病理組織学的に検索する。

C. 研究結果と考察

1. BPA 受容体に対する影響 (船江)

試験した物質のうち、nonylphenol, BPA, pentachlorophenol,

tetrabromobisphenol A,

tetrachlorobisphenol A が甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。これらの物質は PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事により、内分泌攪乱作用を示す事が示唆された。また本スクリーニング法は中枢神経系において甲状腺ホルモンの働きを攪乱する可能性のある化学物質を選定する上で有用なものとなり得ると考えられる。

2. PC12 細胞に対する影響 (廣井)

PC12 細胞に BPA を曝露すると濃度依存性にドパミン放出が生じた。N 型カルシウムチャネル拮抗薬 (ω -conotoxin GVIA)、G-蛋白阻害剤 (GDP β s)、cyclic AMP 阻害剤 (Rp-cAMPS)、PKA 阻害剤 (H7, H89) 及びリアノジン受容体阻害剤 (ryanodine) で各々ドパミン放出が有意に阻害された。RT-PCR 法により 2 型リアノジン受容体の存在が確認された。(17 β -エストラジオールは、PKA とは無関係に、L-, N-型カルシウムチャネル及び P2X 受容体に作用しカテコラミン放出を起こすことが報告されている。一方、今回の研究でエストロゲンと類似構造を持つと言われる BPA は、PKA を介してドパミン放出を起こすことが確認された。BPA は膜受容体・膜チャネルを介する反応様式ではエストロゲンとは異なるようである。

3. 神経ステロイドに対する影響

(植田)

DHEAS をはじめとする神経ステロイドは、細胞膜上の受容体に作用し、Gq-ホスホリパーゼ C 系を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させた結果、脱顆粒応答を引き起こした。この系に対して、BPA をはじめとする多くの内分泌かく乱化学物質は、

単独作用は示さなかったが、神経ステロイドに対して拮抗作用を示した。唯一、単独作用を示すものとしてメトキシクロルを見出した。一方、神経ステロイドは疼痛過敏応答や血管透過性亢進などの個体レベルの反応も引き起こすことができ、これらの効果が肥満細胞からのヒスタミン遊離を介することを明らかにしたが、この個体レベルの作用に対しても、多くの内分泌かく乱化学物質は顕著に抑制し、メトキシクロルのみが単独作用を示した。

4. 甲状腺ホルモンによるオタマジャクシ尾部のアポトーシスに対する影響 (今岡)

BPA はオタマジャクシ尾部のアポトーシスを促進したことから、カエルにおいて甲状腺ホルモン様の作用をしていることが示唆されたが、個体差が大きく、尾部の初代培養細胞などを用いたさらに詳細な検討が必要と考えられる。一方、BPA を受精卵に添加すると低酸素誘導性因子である VEGF が抑制され、神経板形成に異常が生じた。VEGF は HIF-1 α によって発現調節されていることが明らかにされているが、肝癌細胞を用いた検討から BPA は HIF-1 α のレベルを低下させていることが明らかとなった。現在このメカニズムは明らかでない。また、VEGF の神経板形成過程における役割も明らかでない。今後、あわせて検討したい。

5. BPA 受容体の発現に対する影響

(伏木)

PDI は胎齢 10.5 日には神経管腔側に発現し、胎生 12.5 日には preplate, 14.5 日には cortical plate, 基底核, 視床に瀰漫性に発現, 16.5 日には大脳皮質 (体性感覚野, 梨状葉に高度) の神経細胞, subplate の神経

細胞, 海馬錐体細胞, 基底核, 視床, 視床下部, 脳幹諸核, 小脳プルキンエ細胞がドット状に染色され, 18.5 日では大脳皮質の放射状線維が明瞭に染色された. 生後 0 日の染色パターンは 18.5 日に類似した. PDI 陽性細胞は, 胎生早期には TUJ1, 後期には MAP2 陽性細胞と一致したが, Nestin と PDI とを同時に発現する細胞は見られなかった. 以上から PDI は主として分化した神経細胞に強く発現すると考えられ, PDI が神経細胞の軸索伸長, 投射, シナプス形成などに関わる可能性を示唆している.

6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

ER α は生後 2 日目ころから海馬 CA1, CA3 領域の錐体細胞層に発現し, その発現は日齢 4-6 日目でピークに達し, その後低下し生後 15 日頃には成熟ラットの値となる.

痙攣重積後のラット海馬では CA1 領域で錐体細胞の著明な脱落とグリオーシスが認められ, これらの領域でアストログリアに ER α の発現が強く認められた. 生後 0-10 日目のラット海馬では錐体細胞が樹状突起の伸展やシナプス形成など活発な成熟をなしている時期であり, ヒトでは妊娠 7 カ月目から新生児期に相当する. このような時期に何らかの原因で仔が BPA に暴露されると, 高次脳機能をつかさどる海馬は大きな影響を被ることは容易に想像される. なお, ER α の発現はアストログリアにも認められることが判明した.

7. 中枢神経系腫瘍発生に対する影響 (福島)

母動物に特記すべき臨床症状を認めな

った. また, 妊娠期間, 体重推移, 摂餌量と飲水量に有意な差は見られなかった. F₁ 動物については, 分娩時の平均 F₁ 動物数は対照群, 7.9 匹に対して, BPA の 0.05 mg/kg 投与群, 8.8 匹, 200 mg/kg 投与群, 8.0 匹と群間に有意差を認めなかった. 現在, F₁ 雄動物の飼育・観察中であるが, 体重の推移には群間による変動は認められていない. BPA 投与ラットにおいて, ENU 投与による影響として, 死産児数の増加が推測されたが, その傾向は全くなく, また, 妊娠期間の変動も認められなかった. 現在, 実験を継続中である.

E. 結論

1. PDI への親和性を指標にしたスクリーニング法は, 甲状腺ホルモンの働きを攪乱する物質を選定する上で有用なものである事が考えられる. 本法を用いてリスク評価を行うことにより, 中枢神経系に影響を及ぼす恐れのある物質を選定できる事が期待される. (船江)

2. BPA を PC12 細胞に曝露すると, G 蛋白及び N 型カルシウムチャンネルを介してドパミン放出が生じた. 従来より, BPA の核内受容体を介する長期的な有害作用の報告は多くされてきているが, 今回, 我々は BPA が膜受容体, 膜チャンネルを介して急性的な有害作用を誘発する可能性を示した. (廣井)

3. 神経ステロイド及び内分泌かく乱化学物質の G 蛋白質連関型受容体を介する *in vivo*, *in vitro* 評価系を確立することができ, 内分泌かく乱化学物質作用の順位付けの手がかりをつかんだ. (植田)

4. BPA は, アフリカツメガエルの発生過程およびヒト肝癌細胞において甲状腺

ホルモン受容体、低酸素感受性因子を介して、様々な遺伝子発現に影響を与えている可能性が示唆された。特に、VEGFを介した神経板形成不全は今後詳細な検討が必要である。(今岡)

5. PDI は胎生早期から発達期脳組織に発現、胎生 16.5 日から 18.5 日で最も広汎かつ特有の分布を示し、主として遊走後の分化・成熟しつつある神経細胞に局在していた。(伏木)

6. BPA の受容体の一つである ER α の発現はラット海馬では生後 0-10 日目に CA1, CA3 の錐体細胞で強く、このような時期に BPA に暴露されると、高次脳機能の中樞である海馬は大きな影響を被ることが示唆された。

また、ER α はグリオシスを形成するアストログリアにも認められ、BPA がアストログリアにも作用する可能性があることが判明した。(山野)

7. 神経系腫瘍の発生に及ぼす BPA の経胎盤および授乳曝露による影響をラットを用いて検討したが、現在まで、妊娠、出産、F1 動物への影響は見られていない。(福島)

F. 研究発表

1. 論文発表

Hashizume T, Funae Y. et al.: Involvement of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism of ebastine in human intestinal microsomes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300: 298-304, 2002

Osada M, Funae Y. et al.: NADPH-P450 reductase in the plasma membrane modulates the activation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). *J Biol. Chem.*, 277, 23367-23373,

2002

Kamada T, Funae Y. et al.: Metabolism of selegiline hydrochloride, a selective monoamine B-type inhibitor, in human liver microsomes. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 17, 199-206, 2002

Yamaguchi Y, Funae Y. et al.: Contribution of CYP4A8 to the formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid from arachidonic acid in rat kidney. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 17, 109-116, 2002

Kojima Y, Funae Y. et al.: Blood glucose lowering and toxicological effects of zinc(II) complexes with maltol, threonine and picolinic acid. *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, in press

Venhorst J, Funae Y. et al.: Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D(CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand binding specificities. *J. Med. Chem.*, 46, 74-86, 2003

Suzuki T, Funae Y. et al.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-644

Watanabe K, Funae Y. et al.: Major cytochrome P450 enzymes responsible for microsomal aldehyde oxygenation of 11-Oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol and 9-anthraldehyde in

human liver. *Drug Metabol. Pharmacokin*, 17, 516-521

Hiroi T, Funae Y et al.: Catalytic Specificity of CYP2D Isoforms in Rat and Human. *Drug Metab. Dispos.*,30, 970-976, 2002

廣井豊子: 内分泌かく乱性化学物質の中
枢神経系への作用、*日薬理誌*、120、361、
2002

Uchida H. Ueda H. et al.; Neurosteroid-
induced hyperalgesia through a histamine
release is inhibited by progesterone and
p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical;
Neurochemi. Int.; 42, 401-407. 2003

Hashizume T, Imaoka S. et al.: Involvement
of CYP2J2 and CYP4F12 in the metabolism
of ebastine in human intestinal microsomes.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 300, 298-304, 2002.

Osada M, Imaoka S. et al.:
NADPH- cytochrome P-450 reductase in the
plasma membrane modulates the activation
of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.*
277, 23367-23373, 2002.

Toba H, Fushiki S. et al.: A Japanese patient
with cerebrotendinous xanthomatosis has
different mutations within two functional
domains of CYP27. *Clin Genet*; 61, 77-78,
2002

Fukuyama R, Fushiki S. et al.: A newly
established neuronal rho-0 cell line highly
susceptible to oxidative stress accumulates

iron and other metals. Relevance to the origin
of metal ion deposits in brains with
neurodegenerative disorders. *J Biol Chem*;
277, 41455-41462, 2002

Tamamori A, Yamano T et al.: Neonatal
intrahepatic cholestasis caused by citrin
deficiency: severe hepatic dysfunction in an
infant requiring liver transplantation. *Eur J
Pediatr* 161:609-613, 2002

Ning X, Yamano T et al.: Alterations and
diversity in the cytoplasmic tail of the fusion
protein of subacute sclerosing
panencephalitis virus strains isolated in
Osaka, Jpn. *Virus Research* 86, 123-131,
2002

Tanaka A, Yamano T et al.: Molecular
analysis of the α -N-acetylglucosaminidase
gene in seven Japanese patients from six
unrelated families with
mucopolysaccharidosis IIIB(Sanfilippo type
B), Including two novel mutations. *J Hum
Genet* 47, 484- 487, 2002.

Hirai C, Yamano T et al.:Trophic effect of
multiple growth factors in amniotic fluid or
human milk on cultured human fetal small
intestinal cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*
34, 524-528, 2002

Tachibana D, Yamano T et al.: Decreased
plasma tetrahydrobiopterin in pregnant
women is caused by impaired 6-pyruvoyl
tetrahydropterin synthase activity.
International Journal of Molecular Medicine

9, 49-52, 2002

Sukata T., Fukushima S et al.: Detailed low-dose study of 1,1-bis(*p*-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect. *Int. J. Cancer*, 99, 112-118, 2002

Nishikawa T., Fukushima S et al.: Promoting effects of monomethylarsonic acid, dimethylarsinic acid and trimethylarsine oxide on induction of rat liver preneoplastic glutathione *s*-transferase placental form positive foci: a possible reactive species mechanism. *Int. J. cancer*, 100, 136-139, 2002

Wei M., Fukushima S et al.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in male F344 rats and genetic alterations in induced urinary bladder tumors. *Carcinogenesis*, 23, 1387-1397, 2002

Salim E. I., Fukushima, S et al.: Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in p53 heterozygous knockout and wild-type C57BL/6J mice. *Carcinogenesis*, 24, 335-342, 2003

2. 学会発表

Hiroi T, Funae Y. et al.: Prenatal and lactational exposure of bisphenol A to mice effects on monoaminergic neurons. 第45回日本神経化学学会大会, 2002年7月, 札幌

Funae Y. et al.: Highlights of MDO2002 in Japanese language: Extrahepatic drug

metabolism. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2002年7月, 札幌

Kishimoto W, Funae Y. et al.: Involvement of CYP2D isoforms in the biosynthesis of neurosteroids. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2002年7月, 札幌

Mizuno D, Funae Y. et al.: Regulation of *CYP2D4* gene expression in rat brain via a novel transcriptional element. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2002年7月, 札幌

Ng, P.-S, Funae Y. et al.: Production of inhibitory antibodies recognizing CYP2C8, CYP2C9, and CYP2C19 specifically. 14th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations, 2002年7月, 札幌

岡田和嗣、船江良彦等：ラット脳に存在する Bisphenol A 受容体の精製, 第75回生化学会大会, 2002年10月, 京都

船江良彦：チトクローム P450 の分子多様性と薬物代謝, 第17回日本薬物動態学会年会, 2002年11月, 東京

水野大、船江良彦等：CYP2D の発現調節機構：ラット脳 CYP2D4 を中心に, 第17回日本薬物動態学会年会, 2002年11月, 東京

岡田和嗣、船江良彦等：ビスフェノール A の甲状腺ホルモン攪乱作用, 環境ホルモン

学会第 5 回研究発表会, 2002 年 12 月, 広島

Hiroi T, Funae Y et al: Prenatal and lactational exposure of bisphenol A to mice effects on monoaminergic neurons.

第 4 5 回日本神経化学学会大会, 2002 年 7 月, 札幌

Hiroi T, Funae Y et al.: Neurosteroids regulated by cytochrome P450 2D in the brain, Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orlando, USA, November, 2002

内田仁司、植田弘師：神経ステロイドによるヒスタミン遊離を介した熱刺激過敏応答, 第 25 回神経科学大会, 2002 年 7 月 (東京)

長田真優子、今岡進等：NADPH-P450 還元酵素の新機能としての HIF-1 活性化, 第 75 回生化学学会大会, 2002 年 10 月, 京都

Kinoshita A., Fukushima S et al: Inhibitory and promoting effects of low and high doses of phenobarbital on rat liver carcinogenesis. 93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 6-10, San Francisco, California, U.S.A., 2002

Kalim R., Fukushima S. et al: Prompting effects of ethanol on low dose MeIQx-induced hepato-carcinogenesis in rats. 93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 6-10, San Francisco, California, U.S.A., 2002

Hoshi M., Fukushima S. et al: Lacl mutation frequency and glutathione-S-transferase

placental form (GST-P)-positive foci in the livers of Big Blue Rats treated with MeIQx at low-doses. 93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 6-10, San Francisco, California, U.S.A., 2002

Mitsuhashi M, Fukushima, S et al: Lack of modifying effects of atrazine in a multiorgan carcinogenesis test in F344 rats. 93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 6-10, San Francisco, California, U.S.A., 2002

Morimura K, Fukushima S et al: Differences in cDNA expression profiles of rat urinary bladder carcinomas induced by genotoxic and non-genotoxic carcinogens. 93rd Annual Meeting, American Association for Cancer Research Apr. 6-10, San Francisco, California, U.S.A., 2002

厚生労働科学研究費補助金（食品・化学物質安全総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：脳神経細胞膜に存在するビスフェノール A 結合蛋白の生理的
意義解明と内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法の確立

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

内分泌攪乱化学物質（EDCs）のエストロゲン様作用に関しては、その作用の発現の分子メカニズムが解明され、その作用を有する化学物質のスクリーニング法も開発されつつある。しかし EDCs の中枢神経系への作用に関しては、その適切な評価法が見いだされていないし、作用機序を含む多くの点が不明なままである。BPA が中枢神経系に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられた事から、BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みた。BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーによって精製されたタンパク質が protein disulfide isomerase（PDI）と相同性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。発現 PDI を用いて競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。BPA の中枢神経系への作用は、PDI に結合する甲状腺ホルモンに影響を与えた結果起こる事が推察されたことから、内分泌攪乱作用を及ぼす可能性のある物質として知られる数種類の化学物質について、甲状腺ホルモンとの競合的結合実験によりスクリーニングを行った。その結果、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノールなどが甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。これらの物質は PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事により、内分泌攪乱作用を示す事が示唆された。従って、本スクリーニング法は中枢神経系において甲状腺ホルモンの働きを攪乱する可能性のある化学物質を選定する上で有用なものとなり得ると考えられる。

A. 研究目的

これまでに EDCs の生殖器系・免疫系への影響に関しては膨大な数の報告があり、その分子メカニズムも明らかになりつつある。しかし、近年問題視されている学習障害や知能指数の低下、また注意欠陥多動性症候群（ADHD）との関連性が指摘されているにも関わらず、その作用機序などに関しては不明のままである。我々

はこれまでに BPA を胎仔期・授乳期に暴露されたマウスにおいて、脳内のドパミン動態に変動が生じる事を見いだしている。脳におけるドパミンは、運動・感情・情動発現・脳報酬系に関与していると考えられている神経伝達物質である。BPA はドパミンの減少を引き起こす事で中枢神経系に影響を及ぼしている可能性が考

えられた事から、ラット脳より BPA 結合タンパク質の単離・精製を試みたところ、精製されたタンパク質が protein disulfide isomerase (PDI) と相同性を示す事が明らかとなった。PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られている。ヒスチジン融合 PDI を用いて競合的結合実験を行ったところ、BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなった。

BPA は PDI を介して甲状腺ホルモンの働きを模倣する事により中枢神経系に影響を及ぼす事が考えられた事から、本研究では競合的結合実験により PDI における甲状腺ホルモンの結合阻害を調べる事により、化学物質の生体への影響を予測する事を目的として行った。

被験物質としては、トリブチルスズ（船底塗料・漁網の防腐剤）、ノニルフェノール（界面活性剤の原料等）、フタル酸ジブチル・フタル酸ジエチルヘキシル（プラスチックの可塑剤）、ベンゾフェノン（医薬品合成原料・芳香剤等）、ペントクロロフェノール（防腐剤・除草剤・殺菌剤）、アミトロール（除草剤・分散染料・樹脂の硬化剤）、ビスフェノール A（樹脂の原料）、テトラプロモビスフェノール A・テトラクロロビスフェノール A（難燃剤）を対象とした。

B. 研究方法

I. BPA 結合タンパク質の精製

(1) BPA 結合実験

BPA の結合活性は、BPA の放射性同位体 (^3H -Bisphenol A) とタンパク質標品を 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中で 4°C にて 2 時間インキュベーションした後、遠沈法あるいは PEG 沈澱法により

Bound/Free 分離を行い、沈澱に含まれる放射活性を測定する事により求めた。

【遠沈法】

反応後の反応液を遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) した後、上澄をアスピレーターにより除去した。沈澱を 1.0 mL の洗浄バッファー (150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回、洗浄した。

【PEG 沈澱法】

反応後の反応液に等量の 12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M ZnCl_2 を含む 50mM Tris-HCl (pH 7.0) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、沈澱を 1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M ZnCl_2 を含む 50mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。

(2) ラット脳 P2 画分の調製

以下の操作は全て 4 °C にて行った。ラット脳をバッファー A (0.32 M sucrose / 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 0.05 % of protease inhibitor cocktail を含む) で 2 回洗浄した後、湿重量に対して 9 倍量のバッファー A を加え、teflon-glass ホモジナイザーにてホモジナイズ (900 – 1,000 rpm, 10 strokes) した。ホモジネートを遠心分離 (1,500×g, 20 min) して得られた上澄を S1 画分とした。S1 画分を遠心分離 (17,000×g, 15 min) して得られた沈澱をバッファー A にて懸濁し、P2 画分とした。P2 画分をさらに遠心分離 (17,000×g, 15 min) して得られた沈澱を P2' 画分 (粗シナプトゾーム画分) とした。P2' 画分は実験に使用するまで -80 °C にて保存した。

(3) BPA 結合タンパク質の精製

以下の操作は「BPA-Sepharose 樹脂の作製」以外すべて 4℃にて行った。

【可溶化】

250 mg-protein P2' 画分 (10 mg / mL) に終濃度 0.5 %となるように sucrose monolaurate を加え、スターラーを用いて 60 分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (100,000×g, 60 min) して得られた上澄を可溶化画分とした。

【陰イオン交換カラムクロマトグラフィー】

可溶化画分を Whatman DE52 カラム (25 mL-bed, 2.5×5 cm) に供した。NaCl によるステップワイズにてタンパク質を溶出し、BPA との結合活性の高い画分を採取した。

【BPA-Sepharose 樹脂の作製】

BPA のメチル基を置換した BPA 誘導体 (図) の合成は、神戸天然物化学株式会社に依頼した。BPA を CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) とカップリング反応により結合させ、BPA アフィニティーカラムを作製した。

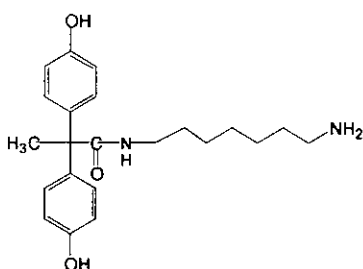


図 BPA 誘導体の構造

【BPA アフィニティークロマトグラフィー】

陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいて BPA との結合活性の高かった画分を限外濾過にて濃縮した。濃縮したサ

ンプルを BPA-Sepharose カラム (2.0 mL wet vol) と混合し、2 時間、ローテータを用いて穏やかに攪拌した。スラリーをカラム (ポリプレップエンブティーカーラム, BIO-RAD) に移し、8 mL の洗浄バッファ (バッファ A + 0.15 M NaCl) で洗浄した。5 mL の溶出バッファ (2 mM BPA を含むバッファ A + 0.15 M NaCl) を加え、スラリーを 1 時間、穏やかに攪拌した。スラリーをカラムに移し、溶出液を採取した後、さらに 5 mL の溶出バッファにて溶出した。

(4) ラット PDI 遺伝子 (rPDI) のクローニングと His-tag 融合発現

ラットより脳を摘出し、ISOGEN (QIAGEN) を用いて mRNA を調製した。RT-PCR 法により cDNA を調製し、ラット肝臓 PDI の塩基配列をもとに設計したプライマーを、二つの組み合わせを用いて PCR を行い、遺伝子の増幅を行った。

組み合わせ A (全長 PDI 前半部分)

sense : 5'-GGG GGG ATC CTC CGA CAT GCT GAG CCG TGC-3'

antisense : 5'-AGC GAT GAC GAT ATT CTC AT-3'

組み合わせ B (全長 PDI 後半部分)

sense : 5'-ACC TGA TGA GCC AGG AAC TG-3'

antisense : 5'-CCC TCG AGA GAT CTG GCT TCT GCA CTA C-3'

組み合わせ A で増幅された PCR 産物を *EcoR* I と *Bam*HI により制限酵素消化し、pBluescript KS+ (TOYOBO) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞 (DH5 α COMPITENT high, TOYOBO) に導入し、形質転換させた。Ampicillin を含む LB 寒天培地で培養し、コロニーの出現を確

認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*EcoR*I と *Xho*I により制限酵素消化した。これに組み合わせ B で増幅された PCR 産物を *EcoR*I と *Xho*I により制限酵素消化したのち組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillin を含む LB 寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、*Sac*I と *Kpn*I により制限酵素消化した。rPDI 全長を含む DNA 断片を pQE-80L (QIAGEN) に組み込んだ。このプラスミドをコンピテント細胞に導入し、形質転換させた。Ampicillin を含む LB 寒天培地上で培養し、コロニーの出現を確認した。アルカリ法によりプラスミドを調製し、rPDI の全長が含まれている事を確認した。

(5) His-tag 融合 PDI の精製

上記の方法によって得られたクローンのグリセロールストックより 2×YT 培地に植菌し、一晚培養した。10 mL の培養液を 500 mL の培養液に植菌し、 $OD_{600}=6.0$ に達するまで振盪培養を行った。培養液に IPTG を 1.0 mg/mL となるように加え、さらに 4 時間、振盪培養を行った。遠心分離により細胞を回収し、PBS に再懸濁した後、遠心分離により洗浄菌体を得た。50 mL の溶菌バッファー (6 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 0.5 % protease inhibitor cocktail, 1 mg/mL lysozyme, pH 8.0) で懸濁し、氷上に 30 分間おいた。氷中にて 5 分間の超音波処理を行った後、sucrose monolaurate を 0.5% となるように加え、スターラーを用いて 4 °C にて 60 分間、穏やかに攪拌した。遠心分離 (50000 ×g, 30min, 4 °C) により得られた上澄

を可溶化画分とし、Ni-NTA agarose カラム (1.0 mL, QIAGEN) に供した。5 mL の洗浄液 (溶菌バッファー + 0.1 % sucrose monolaurate + 0.5 % protease inhibitor + 10 mM imidazole) でカラムを洗浄した後、imidazole によるステップワイズにて溶出した。それぞれの画分を SDS-PAGE 分析に供し、必要な画分を集めて 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 8.0) に対して透析を行った。得られた最終画分を His-tag 融合 PDI 精製標品とした。

II. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

(1) 競合的結合阻害実験

本実験に用いた試験物質は全て Wako 社より購入した。

T_3 の結合活性は、試験物質の存在下で、 T_3 の放射性同位体 ($[^{125}I]$ -3, 5, 3'-triiodothyronine, 1.0 nM) と His-tag 融合 PDI (0.1 mg/mL protein) とを 150 mM NaCl を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) 中で 3 時間、4 °C にてインキュベーションした。反応後の反応液に等量の 12% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.2M $ZnCl_2$ を含む 50mM Tris-HCl (pH 7.0) を加えて攪拌した後、遠心分離 (14,500 rpm, 5 min, 4 °C) を行った。上澄をアスピレーターにより除去した後、沈澱に 1.5 mL の洗浄バッファー (6% PEG 6,000, 150 mM NaCl, 0.1M $ZnCl_2$ を含む 50mM Tris-HCl, pH 7.0) で 2 回洗浄した。沈澱に含まれる放射活性をシンチレーションカウンターにより測定する事により求めた。 T_3 の非特異的結合量を測定するために、過剰量 (30 μ M) の T_3 を加えた系を用意した。また試験物質を溶解するため

のエタノール濃度は、事前に試験を行い、 T_3 の結合に影響を与えない濃度を検討した結果、終濃度 4 %とした。

T_3 の結合率 B / B_0 (%) は次式により求めた。

$$B / B_0 (\%) = (TB - NB) / (T_0B - NB) \times 100$$

TB : 試験物質存在下での T_3 の結合量

T_0B : 試験物質非存在下での T_3 の結合量

NB : 非特異的結合量

(2) データ解析

得られたデータは、GraphPad PRISM

(GraphPad Software Inc.) により解析を行い、 IC_{50} 値を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究における実験動物を用いた実験は、大阪市立大学大学院医学研究科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動物実験指針に従い施行した。脳の摘出の際には苦痛を伴わない断頭法により行った。

C. 研究結果

I. BPA 結合タンパク質の精製

(1) ビスフェノール A 結合実験ラット脳 P2 画分に対する $[^3H]$ -BPA の結合は、過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。その結果、ラット脳 P2 画分には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。

(2) BPA 結合タンパク質の精製

【陰イオン交換カラムクロマトグラフィー】

Whatman DE52 カラムを用いて NaCl によって 0.1 M, 0.2 M, 0.5 M とステップワイズにて溶出した結果、0.2 M NaCl で溶出した画分においてタンパク質あたりの BPA の結合活性の最も高い値が得られた。この画分をさらに BPA アフィニティークラムクロマトグラフィーに供した。

【BPA アフィニティークロマトグラフィー】

BPA-Sepharose アフィニティークロマトグラフィーによって本タンパク質を SDS-PAGE 上で単一にまで精製した。さらにこのタンパク質を PVDF メンブレンにトランスファーし、アミノ酸の N-末端配列の分析を行った結果、33 残基の配列 DALEEDNVLVLKKS NFAEALAAHNYLLVEFYA が得られた。この配列をもとに Web 上のデータベース、BLAST によりホモロジー検索を行った結果、PDI と 100% の相同性を示した。

(3) 発現 PDI に対する $[^3H]$ -BPA の結合性

発現 PDI に対する $[^3H]$ -BPA の結合性は、過剰量の BPA (1 mM) を加えたときの値を非特異的結合とし、特異的結合は、全結合から非特異的結合を差し引いた値で算出した。その結果、発現 PDI には BPA が特異的に結合する部位が存在する事が明らかになった。また、PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質 (T_3 結合タンパク質) と知られている事から、標準リガンドとして $[^{125}I]$ - T_3 に対する競合的結合阻害実験を行ったところ、BPA は T_3 の約 1/20 の

強さで $[^{125}\text{I}]\text{-T}_3$ の結合を阻害した。

II. PDI に対する甲状腺ホルモンの競合的結合阻害試験

トリブチルスズ, ノニルフェノール, フタル酸ジブチル, フタル酸ジエチルヘキシル, ベンゾフェノン, ペンタクロロフェノール, アミトロール, BPA, テトラブロモビスフェノール A, テトラクロロビスフェノール A について競合的結合阻害実験を行った。ノニルフェノール, ペンタクロロフェノール, BPA, テトラブロモビスフェノール A, テトラクロロビスフェノール A において T_3 の結合阻害がみられた。またベンゾフェノンは弱い結合阻害がみられた (表)。

表 His-tag 融合 PDI に対する各種化合物による T_3 の結合阻害

化合物名	IC ₅₀
トリヨードサイロニン	0.48 μM
(塩化) トリブチルスズ	N. D.
ノニルフェノール	5.25 μM
フタル酸ジブチル	N. D.
ベンゾフェノン	> 0.2mM
フタル酸ジエチルヘキシル	N. D.
ペンタクロロフェノール	22.3 μM
アミトロール	N. D.
ビスフェノール A	17.3 μM
Tetrabromobisphenol A	1.1 μM
Tetrachlorobisphenol A	0.2 μM

N. D. : 阻害なし

D. 考察

I. BPA 結合タンパク質の精製

ラット脳における BPA のレセプター様タンパク質の探索を行った結果、P2 画分に、BPA が特異的に結合するタンパク質の存

在が明らかになった。本タンパク質を精製し、アミノ酸の N 末端配列の分析を行った結果、N-末端の 33 残基は PDI と 100% の相同性を示した。

PDI は多機能タンパク質として知られており、イソメラーゼ活性を有する他、iodothyronine 5'-monodeiodinase, prolyl 4-hydroxylase の β サブユニットとしての機能を有する事が知られている。その他、特に注目すべきは、本タンパク質が thyroid hormone binding protein として、甲状腺ホルモンである T_3 の結合能をも有している事である。我々はこの点に着目し、 T_3 との競合結合実験を行った。その結果、BPA と T_3 の結合は、PDI において同一の部位である事が明らかになり、BPA は生体内においても T_3 の結合を阻害する事によりその働きを模倣・阻害しうる可能性が示唆された。

II. PDI に対する甲状腺ホルモンの結合阻害試験

今回試験した化合物のうち、 T_3 の結合を阻害した化合物は 5 種類であった。今回用いた方法では、試験物質のアゴニスト / アンタゴニスト作用の識別を行う事はできないが、甲状腺ホルモンの作用を攪乱する化合物のスクリーニング法としては有用なものである事が明らかとなった。これらの物質の生体への影響に関しては、精巣・精巣上体・前立腺・精囊・凝固腺・子宮重量の減少、精子産生の減少、精子形態の異常、胎児数・新生児数の減少、化骨遅延、早期死胚数の増加などが報告されており、ペンタクロロフェノールについては血清中の下垂体ホルモン・甲状腺ホルモンの低下、肺・肝臓重量の増加、

胸腺重量減少、肝薬物代謝酵素活性の増加などが報告されている。ペンタクロロフェノールは血清中の甲状腺ホルモン濃度を低下させるとの報告があるが、PDI との相互作用を示した報告はない。また、テトラブロモビスフェノール A、テトラクロロビスフェノール A の内分泌攪乱作用に関する報告はほとんどなく、また毒性も低い事からこれまであまり注目されなかった物質である。しかし両物質は環境モニタリング調査の結果から、土壌・河川底質中に検出されており、環境汚染物質の一つとされている。また職業暴露の可能性もあることから、ヒトの体内に蓄積された結果の危険性は十分考えられる。その他の物質の甲状腺ホルモン攪乱作用に関するこれまでの研究は、circulate hormone の濃度を指標にしているが、外因性化合物の細胞内での作用に視点を置く事は、EDCs と疑われる化合物の新たな作用機構を明らかにする目的で非常に重要であると考えられる。今後、ヒト PDI における結合親和性を指標にしたスクリーニング法により、その他の EDCs として疑われる化合物のリスクアセスメントに対する情報を提供できる事が期待される。

D. 結論

EDCs の中枢神経系への影響は、行動異常・発達障害などとの関連性が示唆されているにもかかわらず作用メカニズムに関しては不明な点が多い。

BPA 結合タンパク質である PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としても知られており、本研究により BPA は甲状腺ホルモンの結合を阻害する事が明らかとなっ

た。

PDI への親和性を指標にしたスクリーニング法により、ノニルフェノール、BPA、ペンタクロロフェノール、テトラブロモビスフェノール A、テトラクロロビスフェノール A が、甲状腺ホルモンの作用を攪乱する可能性のある化合物として挙げられた。

今後、ヒト PDI における結合親和性を指標にしたスクリーニング法を実施し、ヒトにおいて中枢神経系に影響を及ぼす可能性のある物質を選定していく予定である。得られた結果をもとにリスク評価を行い、障害性を明確にし、さらには EDCs の回避法を開発する事で国民の EDCs に対する不安感・危機感を払拭できる事が期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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

Osada M, Imaoka S, Sugimoto T, Hiroi T, Funae Y.: NADPH-P450 reductase in the plasma membrane modulates the activation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). *Biol. Chem.*, 277, 23367-23373, 2002

Kamada T, Chow T, Hiroi T, Imaoka S,

Morimoto K, Ohde H, Funae Y.: Metabolism of selegiline hydrochloride, a selective monoamine B-type inhibitor, in human liver microsomes. *Drug Metabol. Pharmacokin.*, 17, 199-206, 2002

Yamaguchi Y, Kirita S, Hasegawa H, Aoyama J, Imaoka S, Minamiyama S, Funae Y., Baba T, Matsubara T.: Contribution of CYP4A8 to the formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid from arachidonic acid in rat kidney.

Drug Metabol. Pharmacokin., 17, 109-116, 2002

Kojima Y, Yoshikawa Y, Ueda E, Kondo M, Takahashi S, Matsukura T, Sakurai H, Hiroi T, Imaoka S, Funae Y.: Blood glucose lowering and toxicological effects of zinc(II) complexes with maltol, threonine and picolinic acid. *Res. Commun. Pharmacol. Toxicol.*, in press

Venhorst J, Laak M. A, Commandeur N.M.J, Funae Y., Hiroi T, Vermeulen P.E.N.: Homology modeling of rat and human cytochrome P450 2D(CYP2D) isoforms and computational rationalization of experimental ligand binding specificities. *J. Med. Chem.*, 46, 74-86, 2003

Suzuki T, Mizuno K, Nakazawa H, Funae Y., Fushiki S, Fukushima S, Shirai T, Narita M.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-

induced abuse state. *Neuroscience*, 117, 639-644

Watanabe K, Matsunaga T, Kimura T, Funahashi T, Funae Y., Ohshima T, Yamamoto I: Major cytochrome P450 enzymes responsible for microsomal aldehyde oxygenation of 11-Oxo- Δ^8 -tetrahydrocannabinol and 9-anthraldehyde in human liver.

Drug Metabol. Pharmacokin., 17, 516-521

2. 学会発表

Effect of bisphenol A on central nervous system. 岡田 和嗣, 廣井 豊子, 船江 良彦 2001年12月, 筑波 日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会 (日本内分泌攪乱化学物質学会 第4回研究発表会要旨集 73頁)

Thyroid hormonal-disrupting activity of bisphenol A. 岡田 和嗣, 廣井 豊子, 船江 良彦 2002年11月, 広島 日本内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会 (日本内分泌攪乱化学物質学会 第5回研究発表会要旨集 71頁)

ラット脳に存在する Bisphenol A 受容体の精製. 岡田 和嗣, 今岡 進, 廣井 豊子, 林 浩志, 広瀬 克利, 船江 良彦 2002年10月, 京都 第75回日本生化学大会 (生化学 第74巻, 第8号, 965頁)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究協力者：岡田和嗣

(大阪市立大学大学院医学研究科)