

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：PC12 細胞における Bisphenol-A のドパミン放出機構の解明

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

研究要旨

内分泌かく乱物質は細胞の核内受容体を介し、長期的に内分泌系、生殖系、神経系に影響を及ぼすことが知られているが、近年、細胞膜チャネル、受容体を介した短期的な作用が報告され始めている。そこで我々は、ビスフェノール A をラット副腎腫瘍由来の PC12 (pheochromocytoma) 細胞に 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。生体内でのカテコラミンのかく乱は神経伝達や循環動態に影響を及ぼす可能性があり、ビスフェノール A 曝露による急性的な有害作用が示唆された。

A. 研究目的

ビスフェノール A はポリカーボネートプラスチック、エポキシ樹脂、缶詰のコーティング、食品の包装、歯科材料として幅広く使用されており、常に人体暴露の危険性がある。また、ジフェニル化合物のひとつで、弱いながらもエストロゲン作用を有することや、甲状腺ホルモン攪乱作用の報告もあり、細胞の核内受容体を介する内分泌攪乱物質の一種として位置づけられている。一方、最近、ビスフェノール A の膜受容体、膜チャネルを介する作用が報告され始めている。核内受容体を介する長期的な genomic action に対して、膜受容体、膜チャネルを介する短期的な作用は non-genomic action として位置づけられている。今回、神経系での non-genomic action、つまり急性的な作用を調べるために PC12 細胞にビスフェノール A を暴露したところ、ドパミン放

出が認められたため、引き続きその作用機序の解明を行った。

B. 研究方法

(1) ドパミンの定量

1×10^6 個の PC12 細胞を培養し、 $10 \sim 150 \mu\text{M}$ のビスフェノール A を 10 分間曝露した。細胞と培養液を分離後、細胞を超音波破碎した。蛋白除去後、得られた上澄液を細胞内のドパミン測定に用いた。また、細胞外に放出されたドパミンは培地液から測定した。ドパミンの定量には HPLC-ECD (high performance liquid chromatography with electrochemical detection) system を用いた。

次に、 $50 \mu\text{M}$ ビスフェノール A 曝露 30 分前にあらかじめ、選択的 L-, N-, P/Q 型カルシウムチャネル拮抗薬 ($20 \mu\text{M}$ diltiazem, $1 \mu\text{M}$ ω -conotoxin GVIA, $1 \mu\text{M}$ ω

-agatoxin IVA)、G-蛋白阻害剤 (0.5 ~ 3 mM GDP β s)、cyclic AMP 阻害剤 (0.25 ~ 1 mM Rp-cAMPS)、PKA 阻害剤 (10 μ M H7, 100 μ M H89) 及びリアノジン受容体阻害剤 (10 μ M ryanodine) をそれぞれ添加し、各々の場合のビスフェノール A 添加によるドパミン放出の変化を調べた。

(2) RT-PCR 法

PC12 細胞を用いて、リアノジン受容体の mRNA の発現を調べた。PC12 細胞から RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて相補的な DNA を合成した。この RNA-DNA 鎖を鋳型として、1 ~ 3 型リアノジン受容体特異的なプライマー組およびプローブを用いて PCR で増幅し、増幅した特異的 DNA フラグメントから元の mRNA の発現を調べた。

C. 研究結果

(1) ドパミン放出

25 ~ 150 μ M のビスフェノール A を PC12 細胞に 10 分間曝露すると、ビスフェノール A の濃度依存性に細胞内のドパミン含量が減少し、かつ培養液中 (細胞外) のドパミン量が増加した。以上からビスフェノール A 曝露により PC12 細胞からドパミン放出が起こることがわかった。

(2) カルシウムチャネルの関与

あらかじめ選択的 L-, N-, P/Q 型カルシウムチャネル拮抗薬 (20 μ M diltiazem, 1 μ M ω -conotoxin GVIA, 1 μ M ω -agatoxin IVA) をそれぞれ添加し、その 30 分後に 50 μ M ビスフェノール A を曝露した。N 型カルシウムチャネル拮抗薬添加の場合

のみ、有意にビスフェノール A による細胞内のドパミン減少が阻害された。以上からビスフェノール A によるドパミン放出には N 型カルシウムチャネルが関与していることがわかった。

(3) 膜受容体の関与

G-蛋白阻害剤 (0.5 ~ 3 mM GDP β s) を添加し、その 30 分後に 50 μ M ビスフェノール A を曝露した。G-蛋白阻害剤の濃度依存性にビスフェノール A による細胞内のドパミン減少が阻害された。以上からビスフェノール A によるドパミン放出には G 蛋白結合膜受容体が関与していることがわかった。

(4) cyclic AMP/PKA 経路の関与

cyclic AMP 阻害剤 (0.25 ~ 1 mM Rp-cAMPS)、PKA 阻害剤 (10 μ M H7, 100 μ M H89) を各々添加し、その 30 分後に 50 μ M ビスフェノール A を曝露した。cyclic AMP 阻害剤、PKA 阻害剤共にビスフェノール A による細胞内のドパミン減少を阻害した。以上からビスフェノール A によるドパミン放出には cyclic AMP/PKA 経路が関与していることがわかった。

(5) リアノジン受容体の関与

リアノジン受容体阻害剤 (10 μ M ryanodine) を添加し、その 30 分後に 50 μ M ビスフェノール A を曝露した。リアノジン受容体阻害剤はビスフェノール A 添加による細胞内のドパミン減少を阻害した。また RT-PCR 法によりリアノジン受容体の存在が確認された。以上からビスフェノール A によるドパミン放出にはリアノジン受容体が関与していることがわかった。

た。

D. 考察

今回の研究で、25~150 μ M のビスフェノール A を PC12 細胞に曝露すると、ビスフェノール A の濃度依存性に PC12 細胞からドパミン放出が起こることがわかった。また、その機序に G 蛋白結合膜受容体、cyclic AMP/PKA 経路、N 型カルシウムチャンネル、リアノジン受容体がそれぞれ関与していることがわかった。

その経路は、まずビスフェノール A が G 蛋白結合膜受容体に結合することによって cyclic AMP/PKA 経路が活性化され、つぎに PKA により N 型カルシウムチャンネルおよびリアノジン受容体がリン酸化されることが考えられる。N 型カルシウムチャンネルからカルシウムが流入すると、PKA によりリン酸化されたリアノジン感受性カルシウム小胞から calcium induced calcium release が起こりドパミンが放出されるものと思われる。

ビスフェノール A は β -エストラジオールと類似構造を持ち、エストロゲン核内受容体を介して有害作用を及ぼすことが報告されている。膜受容体、膜チャンネルを介する作用として、 17β -エストラジオールでは、PKA とは無関係に、L、N 型カルシウムチャンネル及び 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、今回の研究でビスフェノール A は、PKA を介してドパミン放出を起こすことが確認された。ビスフェノール A は膜受容体・膜チャンネルを介する反応では β -エストラジオールとは異なる様式を示すようである。

E. 結論

ビスフェノール A 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、ビスフェノール A 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、我々はビスフェノール A 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。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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). J Biol. Chem., 277, 23367-23373, 2002

Hiroi T, Chow T, Imaoka S, Funae Y: 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

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

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

研究協力者：米田卓史
(大阪市立大学大学院医学研究科)

2. 学会発表

Hiroi T, Okada K, Yoneda T, Funae Y: 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

Hiroi T, Kishimoto W, Shiraishi M, Osada M, Igarashi T, Funae Y: Neurosteroids regulated by cytochrome P450 2D in the brain, Society for Neuroscience 32nd Annual Meeting, Orland, USA, November, 2002

岡田和嗣、今岡進、廣井豊子、林浩志、広瀬克利、船江良彦: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

丹羽俊朗、廣井豊子、都築大輔、山本重雄、成松鎮雄、福田剛史、東純一、船江良彦:CYP2D6 の代謝活性に影響を及ぼすアミノ酸残基の検討 第17回日本薬物動態学会年会, 2002年11月, 東京

岡田和嗣、今岡進、廣井豊子、林浩志、広瀬克利、船江良彦: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11月, 広島

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：内分泌かく乱化学物質の新規細胞膜 G 蛋白質関連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

分担研究者 植田弘師 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科教授

研究要旨

神経ステロイドの G 蛋白質関連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。

A. 研究目的

現在の生活環境に存在する多量の化学物質が、生体内の内分泌系をかく乱し、人に有害な作用を及ぼす可能性が問題視されている。ステロイドホルモンへのかく乱作用としては、核内受容体を介するジェノミック作用がよく検討されている。一方で、最近その実態が認識されてきた核内受容体を介さないノンジェノミック作用に対するかく乱作用については、まだほとんど解明されていない。我々は、神経ステロイドによる新規細胞膜 G 蛋白質関連型受容体を介するノンジェノミック作用を細胞レベル、或いは個体レベルで確認してきた。本研究では、このノンジェノミック作用に対する様々な内分泌かく乱化学物質の効果を順位付けし、安全性に対して再評価する測定系の開発を目的としている。

B. 研究方法

神経ステロイドのノンジェノミック作用の細胞内情報伝達機構を明らかにするために、肥満細胞由来の株化細胞であるラット好塩基性白血病細胞 RBL-2H3 を用いた脱顆粒応答測定、細胞内カルシウム濃度測定、及び、細胞膜ステロイド受容体標識観察を行った。

脱顆粒応答測定は、肥満細胞分泌顆粒に含まれる β -hexosaminidase 遊離をその酵素活性を指標として測定した。細胞内カルシウム濃度測定は、Fura-2 をロードした RBL-2H3 細胞を 2 波長励起光によるイメージングを行い、細胞内カルシウム濃度上昇と応答細胞数の計測を行った。細胞膜ステロイド受容体標識観察は、細胞膜を透過しない牛血清アルブミンにプロゲステロン及び FITC を共有結合したリガンド (PROG-BSA-FITC) を細胞とインキュベート後、蛍光顕微鏡により観察した。

神経ステロイドがどのような細胞内情報伝達系を駆動しているかを確認するために各種阻害剤存在下での作用をまず検討した。また、G蛋白質の種類を検討のために、Gq α サブユニットのアンチセンスオリゴヌクレオチド (AS-ODN, 5'-ATGGACTCCAGAGT-3') とミスセンスオリゴヌクレオチド (MS-ODN, 5'-AGTGACCTCAGGAT-3') 前処置を行った。蛋白質発現抑制は、抗 G_{q/11} 蛋白質の抗体ウェスタンブロッティング法により確認した。神経ステロイド及び内分泌かく乱化学物質の単独作用以外に、併用作用についても解析を行った。

個体レベルでの作用解析のために、マウスを用いた侵害性物質誘発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解析した。侵害性物質誘発性疼痛試験法では、生理食塩水に溶解したリガンドをマウス右後肢足蹠に投与した際に観察される、右後肢へのかみつき (Biting) となめる (Licking) といった行動を侵害反応とみなし、投与後 0-10 分間における侵害反応時間を計測した。血管透過性亢進作用については、マウスをペントバルビタール (50 mg/kg, i. p.) で麻酔し、50 mg/kg のエバンスブルーを尾静脈に投与した。エバンスブルー投与 10 分後にリガンドを右後肢足蹠に投与し、左後肢足蹠には対照として生理食塩水を投与した。阻害薬はリガンドを投与する 5 分前に足蹠に投与した。30 分後に頸椎脱臼を行い、後肢皮膚組織を採取した。採取した皮膚組織を風乾し、重さを計測した後、ホルムアミドを加え、55°C、24 時間のインキュベーションによりエバンスブルーを溶出さ

せた。溶出したエバンスブルーは吸光度により測定した。

(倫理面への配慮)

本実験の実験動物に対する取り扱い、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法第 105 号、平成 11 年一部改正) 及び長崎大学における実験動物指針に則り進められ、動物愛護上の配慮に問題はない。

C. 研究結果

神経ステロイドの RBL-2H3 細胞に対する脱顆粒応答について検討を行った。デヒドロエピアンドロステロン (DHEA) で刺激すると、 10^{-10} から 10^{-6} M の濃度範囲において用量依存的な脱顆粒応答が認められた。また、デヒドロエピアンドロステロン硫酸抱合体 (DHEAS) とプレグネノロン硫酸抱合体 (PREGS) に関しても同様の結果が得られた。次に DHEAS (10^{-6} M) による脱顆粒応答を経時的に解析すると、添加後 5 分後に顕著な反応が観察され始め、10 分後に最大反応が観察された。DHEAS (10^{-6} M) を添加しても、細胞の形態や生存活性には変化が認められなかった。一方、プロゲステロン (PROG, 10^{-6} M) 及びエストロゲン (E_2 , 10^{-6} M) は脱顆粒応答を引き起こさなかったが、DHEAS および PREGS の脱顆粒応答に対して拮抗した。また、それらにウシ血清アルブミンを結合した細胞膜を透過しないリガンドである PROG-BSA (10^{-6} M) と E_2 -BSA (10^{-6} M) でも同様の拮抗作用が得られた。

DHEAS による肥満細胞脱顆粒応答の情報伝達機構を、各種阻害薬を用いて解析した。DHEAS の作用は、G_i 蛋白質を不活性化する百日咳毒素 (100 ng/ml) では無影

響であったが、ホスホリパーゼ C (PLC) の阻害薬である U-73122 (10^{-6} M) によって顕著に抑制された。U-73122 の不活性体である U-73343 (10^{-6} M) は無影響であった。さらに、PLC の下流で働くと考えられるイノシトール三リン酸 (IP_3) に着目して IP_3 受容体の阻害薬である xestospongine C (10^{-6} M) の影響を検討したところ、DHEAS の作用を有意に抑制した。よって、DHEAS による脱顆粒応答は百日咳毒素非感受性であり、PLC の活性化とそれに続く細胞内カルシウム濃度の上昇が関与していることが示唆された。次に細胞外カルシウムの関与を調べるために、キレート剤である EGTA (10^{-3} M) を添加したが 13% 程度の抑制しか観察されず、DHEAS による脱顆粒応答には小胞体からのカルシウムの流出による細胞内カルシウム濃度の上昇が大きく関わっていることが示唆された。

神経ステロイドの作用部位を明確にするため、PROG-BSA-FITC の蛍光を指標とした結合実験を行ったところ、細胞膜上に強い蛍光が観察され、この蛍光は PROG (10^{-5} M) 及び DHEAS (10^{-5} M) 共存下で消失した。

細胞内カルシウム濃度変化を解析したところ、DHEAS (10^{-6} M) 添加により全細胞の約 30% の細胞が顕著な細胞内カルシウム濃度の上昇を示した。反応した細胞におけるカルシウム濃度は DHEAS 添加後すぐに上昇し始め、2 分後最大レベルに達し 10 分間以上維持された。DHEAS は 10^{-9} から 10^{-6} M の濃度範囲において用量依存的に作用した。一方、PROG (10^{-6} M) は細胞内カルシウム濃度に影響を及ぼさなかったが、DHEAS による細胞内カルシウム濃度

上昇を顕著に抑制した。

次に、DHEAS による細胞内カルシウム濃度上昇に関与する情報伝達機構を解析した。 $G_{q/11}$ 蛋白質 α サブユニットに対する AS-ODN 処理により、内在性の $G_{q/11}$ 蛋白質 α サブユニットの発現量は有意に減少することをウエスタンブロッティング法により確認した。その時、DHEAS による細胞内カルシウム濃度上昇が顕著に抑制された。しかしながら、 $G_{q/11}$ 蛋白質 α サブユニットに対する MS-ODN 処理では内在性蛋白質とカルシウム濃度変化のどちらに対しても無影響であった。DHEAS による細胞内カルシウム濃度上昇は U-73122 (10^{-6} M) やホスファチジルイノシトール特異的 PLC の阻害薬である ET-18-OCH₃ (10^{-6} M) によって顕著に抑制されたが、U-73343 (10^{-6} M)、百日咳毒素 (100 ng/ml) そしてチロシンキナーゼの阻害薬である herbimycin A (10^{-6} M) はいずれも無影響であった。

肥満細胞に対する神経ステロイドのノンジェノミック作用に対して、ステロイドホルモン様作用を有する内分泌かく乱化学物質の影響を検討した。内分泌かく乱化学物質として、ビスフェノール A (BPA)、アルキルフェノール類 {ノニルフェノール (NP)、オクチルフェノール (OP)}、フタル酸エステル類 {フタル酸ジブチル (DBP)、フタル酸ジエチルヘキシル (DEHP)} そしてジエチルスチルベストロール (DES) について検討を行った。これらの内分泌かく乱化学物質は単独では無作用であったが、DES を除く全ての内分泌かく乱化学物質が DHEAS による肥満細胞脱顆粒応答を顕著に抑制した。また、BPA (10^{-6} M) と NP (10^{-6} M) は DHEAS によ

る細胞内カルシウム濃度上昇を抑制した。さらに NP (10^{-5} M) は PROG-BSA-FITC の結合を阻害したことから、神経ステロイドの結合部位に作用していることが明らかになった。

次に神経ステロイドの作用に対する内分泌かく乱化学物質の影響を *in vivo* の系で検討した。マウスの足蹠皮下に DHEAS を投与すると、かみつき (Biting) 及びなめる (Licking) といった侵害に反応した行動が用量依存的に観察された。DHEAS (10 fmol) による侵害反応は等量の PROG、NP そして BPA によって顕著に抑制された。PROG、NP そして BPA は単独では無作用であった。

血中のアルブミンと結合するエバンズブルーは血管透過性の指標として用いられる。DHEAS (10 fmol) をマウスの足蹠皮下に投与すると、顕著な血管透過性亢進が観察された。この DHEAS による血管透過性亢進は PROG と内分泌かく乱化学物質である p, p'-DDE によって有意に抑制された。さらに、DHEAS をマウスの足蹠皮下に投与すると熱刺激と機械刺激に対して過敏応答が観察され、これらも内分泌かく乱化学物質によって顕著に抑制された。

多くの内分泌かく乱化学物質は、神経ステロイドの作用に対し拮抗作用のみを示したが、メトキシシクロル (10^{-7} M) は RBL-2H3 細胞に対し脱顆粒応答を引き起こすことができた。この脱顆粒応答は PROG あるいは BPA により神経ステロイドの場合と同様に拮抗された。メトキシシクロルは RBL-3H2 細胞に対し、細胞内カルシウム濃度上昇を引き起こしたが、神経ステロイドの場合とは異なり、持続相がなく一過性の上昇のみであった。メトキ

シクロルは血管透過性亢進作用も有し、神経ステロイドと同じく、また、細胞での応答と同様に PROG あるいは BPA により拮抗された。

D. 考察

以上の結果より、DHEAS は RBL-2H3 細胞の細胞膜上に存在する $G_{\alpha 11}$ 蛋白質連関型受容体を介して PLC を活性化し、 IP_3 受容体を介して細胞内カルシウム貯蔵部位よりのカルシウム動員を引き起し、その結果脱顆粒応答を引き起こすことが確認された。またその後の細胞内カルシウム濃度の持続的な上昇は、細胞外に EGTA (10^{-3} M) を添加することにより静止レベルまで戻ったため、この持続的な上昇は細胞外からの流入が関与していることが示唆された。しかしながら脱顆粒応答に対しては殆ど影響しなかったため、この持続相は分泌応答には寄与していないことが示された。

DHEAS による細胞応答に対して、ビスフェノール A をはじめとする多くの内分泌かく乱化学物質は拮抗作用を示した。細胞膜上へのステロイド結合に対しても拮抗作用を示し、同一の受容体に作用していることが明らかとなった。これらの多くの内分泌かく乱化学物質は単独作用は観察されなかったが、唯一、メトキシシクロルのみが脱顆粒応答、及び、細胞内カルシウム動員能において単独作用を示した。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。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。DHEAS に対する場合と同様、PROG あるいは BPA によりこの作用が拮抗されたことから、同一の受容体への作用であると考えられるが、メトキシクロルによる細胞内カルシウム濃度上昇は、持続相のない一過性のものであり、神経ステロイドの作用様式とは異なる様式である可能性が示唆された。

マウス個体レベルでの疼痛過敏応答測定や血管透過性亢進測定で観察された現象も、細胞での応答性のプロファイルとよく一致し、神経ステロイドや内分泌かく乱化学物質の RBL-2H3 細胞を用いた評価系が、*in vivo* 応答性を良く反映することが明らかとなった。

E. 結論

神経ステロイドのノンジェノミック作用として、細胞膜 G 蛋白質連関型受容体・Gq・PLC 系を介した細胞内カルシウム動員を明らかにすることができた。この神経ステロイド作用が、多くの内分泌かく乱化学物質の標的となることを細胞及び個体レベルで確認することができた。この結果、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。また、内分泌かく乱化学物質の作用としては、多くのものは拮抗的であったが、単独作用を示すものも存在し、それらのバランスを評価することが、今後必要となると考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Uchida H. Mizuno K. Yoshida A. and UEDA H.; Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical; *Neurochemi. Int.*; 2003, 42:401-407.

2. 学会発表

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）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

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）

分担者研究報告書

分担研究課題：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

分担研究者 今岡進 関西学院大学理工学部教授

研究要旨

ビスフェノールA（BPA）の発生過程への影響を明らかにするため、アフリカツメガエルとヒト肝癌細胞を用いて検討した。まず、オタマジャクシにBPAを投与したところ、尾部にアポトーシスが観察された。通常、甲状腺ホルモンがこのアポトーシスを引き起こすと考えられており、BPAはカエルにおいて甲状腺ホルモンと相互作用する可能性が示唆された。一方、ヒト肝癌細胞Hep3BにBPAを投与して様々な遺伝子の発現を検討したところ、低酸素感受性因子(HIF-1 α)レベルの顕著な低下が見られた。この因子は発生初期過程においても重要な役割をしていることが報告されているので、アフリカツメガエルの受精卵にBPAを投与して、初期発生過程における影響を検討した。その結果、BPAは卵分割にはほとんど影響を与えなかったが、神経板形成の遅延を誘起した。そこでHIF-1 α 依存性遺伝子の一つである血管増殖因子の発現を調べたところ顕著な低下が見られた。以上の結果からBPAが何らかのメカニズムでHIF-1 α を低下させ、これによってVEGFの低下が発生過程にお影響を及ぼしている可能性が示唆された。

A. 研究目的

BPAは内分泌かく乱化学物質の一つでエストロゲン様の作用を持つと考えられ、性ホルモンとの相互作用が詳しく検討されているが、その作用はとても弱いと報告されている。最近、胎児期からの甲状腺の機能低下によって知能低下が引き起こされるクレチン症が15年間で3倍に増加しているという報告があり、母体への内分泌かく乱化学物質暴露が原因とも言われている。さらに、BPAなどが甲状腺ホルモン受容体と相互作用する可能性が報告され、妊娠期の母胎への暴露によって胎児の発達、特に神経系の形成過程に影響を及ぼす可能性が示唆されているが、その詳細は明らかではない。本研究では、

BPAの甲状腺ホルモンかく乱作用の確認およびその検出系の開発を目指した。さらに、発生系におけるBPAの影響を調べるため、アフリカツメガエルの幼生（オタマジャクシ）および受精卵を用いて検討した。さらにヒトの肝癌細胞にも同様にBPAを添加して影響を検討した。

オタマジャクシの尾部消失すなわちアポトーシスには甲状腺ホルモンおよびその受容体（ β タイプ）が重要な働きをすることが明らかにされている。そこで、この系を利用してBPAが甲状腺ホルモンと相互作用をするかどうか検討することとした。さらに、この系が確立すれば、これまであまり有効な方法がない甲状腺

ホルモン様物質のスクリーニングにも応用できると考えられる。

また、一方ではヒトへの影響を明らかにすることを考慮してヒトの肝癌細胞での BPA の影響を調べた。特に発生過程でも重要と考えられる低酸素感受性因子 (HIF-1 α) の関係する遺伝子を中心に検討した。癌細胞の増殖過程や発生過程において、細胞が分裂すると細胞の酸素濃度の低下が引き起こされ、これを何らかのメカニズムで認識すると HIF-1 α の活性化が起こる。そして、活性化された HIF-1 α はエリスロポエチン(EPO)や血管増殖因子(VEGF)の発現調節領域にある低酸素応答領域(HRE)に結合して、これらの遺伝子を発現させる。BPA のこれらの遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

(1) オタマジャクシの変態に及ぼす BPA の影響

アフリカツメガエルのオタマジャクシは 53 stage のものを業者から購入し使用した。各群 5 匹ずつのオタマジャクシの飼育水槽に BPA (0 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 50 μ M, 100 μ M)および甲状腺ホルモン T3 (10 nM, 100nM) さらに BpA+T3 (0.1 μ M+10 nM, 10 μ M+100 nM)を添加して 1 週間飼育した。1 週間後形態変化を観察するとともに、尾部から DNA を回収して、アガロース電気泳動によって、DNA の断片化を調べた。

(2) 肝癌細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の影響

0.1% FCS を含む DMEM 培地中で Hep3B を一晩培養の後、酸素吸着剤であるアネロパックによって低酸素状態を作成し、

37°C で 6 時間培養した。そこへ BPA (50 μ M, 100 μ M, 200 μ M)添加して検討した。さらに、比較のためにこれまで我々が明らかにしている低酸素誘導阻害剤 DPIC, resveratrol を添加して検討した。DPIC は後述の NPR の阻害剤であり、resveratrol はポリフェノール的一种であるが阻害メカニズムは明らかにされていない。窒素気流下で Isogen を用いて RNA を回収の後、逆転写酵素で cDNA に変換し RT-PCR を行った。 β -actin, HIF-1 α , ARNT, NPR, EPO の各プライマーを合成して PCR を行った。なお、ARNT は HIF-1 α とヘテロダイマーを形成して HRE に結合する因子である。EPO は Hep3B 細胞では低酸素で顕著に誘導されるマーカーとして使用されるものである。NPR は NADPH-P450 還元酵素で我々の研究で癌細胞の低酸素応答では必要であることを明らかにしているものである。一方、塩化コバルトは、通常の酸素濃度でも EPO を誘導することが知られ、NPR を介さないことを明らかにしているので、同様に BPA 添加して検討した。

(3) アフリカツメガエルの初期発生過程に及ぼす BPA の影響

アフリカツメガエルの成体の雌に胎盤性性刺激ホルモン (ゲストロン) を背部皮下注射し、16°C, 6 時間、23.5°C, 6 時間でホルモン誘導し産卵させた。産卵させた未受精卵は、直ちに雄から摘出した精巢と懸濁し、人工授精させた。受精卵は、チオグリコール酸ナトリウムでゼリー層を除去の後、BPA (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)添加して飼育を行った。尾芽胚まで各発生段階について顕微鏡で形態変化を観察した。さらに、各段階で RNA を回

収し RT-PCR を行った。β-actin, HIF-1α, NPR, N-cadherin, E-cadherin, VEGF の発現を検討した。

C. 研究結果

(1) オタマジヤクシの変態に及ぼす BPA の影響

高濃度の BPA(50 μM, 100 μM)ではオタマジヤクシに衰弱が見られ、死亡するものもあった。低濃度においては弱いながら T3 と同じ効果すなわち尾部の消失や四肢の出現が見られた。尾部の DNA を単離して、アガロース電気泳動で分析したところ、T3 および BPA を投与したものについては DNA の断片化が観察され、アポトーシスが起きていることが示された。一方、T3 と BPA の両方を投与したものについては若干抑制が見られる傾向にあったが、個体差が大きく明らかな変化は見いだせなかった。

(2) ヒト肝癌由来細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の影響

BPA を Hep3B 細胞に投与して、低酸素遺伝子誘導マーカーである EPO の誘導を検討した。BPA (50 μM, 100 μM)の添加で、顕著な EPO 誘導抑制が見られた。さらに、塩化コバルトによる EPO の誘導についても BPA は阻害した。HIF-1α, ARNT, NPR の mRNA の発現レベルは BPA 添加によって変化しなかった。このことは、BPA による EPO の誘導抑制はこれらの因子の発現レベルでの調節ではないと考えられる。そこで、Western blotting で HIF-1α と NPR のタンパク質レベルでの発現を調べた。NPR は BPA の添加によって変化しなかったが、HIF-1α の顕著な低下が見られた。対照実験として、DPIC は NPR の活性を

阻害し、HIF-1α のタンパク質レベルを低下させた。また、DPIC は低酸素による EPO 誘導は阻害したが、コバルトによる誘導は阻害しなかった。一方、resveratrol は低酸素による EPO の誘導とコバルトによる誘導の両方を阻害した。しかし、HIF-1α のタンパク質量は変化させなかった。また、BPA は NPR の活性は阻害しなかった。

(3) アフリカツメガエルの初期発生過程に及ぼす BPA の影響

初期発生過程における BPA の影響を検討するためにアフリカツメガエル受精卵に BPA を添加して検討した。BPA 50 μM 以上の添加では、卵が死亡した。BPA 10 μM の添加で、卵の分割は正常に起こったが神経胚の段階で神経板形成に遅延が見られた。BPA 1 μM では、見かけ上異常は認められなかった。そこで、この原因を明らかにする目的で様々な遺伝子の誘導を検討した。まず、神経板形成に最も重要と考えられる E-cadherin と N-cadherin の発現を検討したが BPA 添加による抑制は見られなかった。そこで、低酸素応答性の遺伝子について検討したところ、NPR や HIF-1α については変化がなかったが、VEGF の mRNA 発現量に顕著な低下が見られた。BPA 1 μM の添加では、表現型としては顕著な変化は観察されなかったが、VEGF はすでに低下傾向にあった。

D. 考察

両生類は幼生の段階、また変態期において内分泌かく乱に非常に敏感である。特に変態の進行は甲状腺ホルモンによって調節されており、暴露される時期によって様々な異常が生ずる可能性がある。こ

の実験では、内分泌かく乱化学物質の甲状腺ホルモン相互作用を検出する系の開発もかねて、アフリカツメガエルの幼生すなわちオタマジャクシに BPA を投与して、表現型や遺伝子レベルでの検討を行った。BPA (30 μ M)投与では、T3 より効果は弱いながら (投与濃度から計算すると 1000 分の 1 以下と推定) T3 と同様の変態促進効果がみられ、尾部の細胞に DNA の断片化すなわちアポトーシスの誘導が見られた。一方、T3 と BPA 同時投与すると、逆に T3 の効果を抑制しているようにも見られるが、個体差が大きく再現性に乏しいので、尾部の初代培養細胞などを用いた検討が必要と考えている。

次にヒトでの影響を調べるために、我々が確立している癌細胞の低酸素応答の系に添加してみた。この系は、癌細胞の増殖に対する効果や発生の初期過程における遺伝子発現への影響を調べることができる。その結果、BPA は低酸素における Hep3B の EPO 誘導を顕著に抑制することがわかった。これは、これまで我々が見いだしている阻害剤である DPIC や resveratrol とは違うメカニズムであることが明らかとなった。すなわち HIF-1 α のタンパク質レベルを低下させるという点では DPIC と類似しているが、BPA は NPR と結合しないことやコバルトによる EPO の誘導も阻害するという点では異なっている。今後、このメカニズムを解析していきたい。

BPA が低酸素応答を阻害したということから、次に初期発生過程における影響を調べた。アフリカツメガエルの受精卵に BPA (10 μ M) を投与すると卵分割は正常に起こったが、神経胚において神経

板形成不全が見られた。細胞接着に最も関係の深い cadherin の発現を調べたが異常はなく、低酸素応答性遺伝子である VEGF に発現低下が見られた。この結果は Hep3B 細胞を用いた検討とよくあうが、今後こちらもさらにメカニズムの検討が必要と考えている。

E. 結論

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。さらに、この系を利用して、内分泌かく乱化学物質の甲状腺ホルモンとの相互作用検出法開発の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 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**(1): 298-304, 2002.

Hiroi T, Chow T, Imaoka S and Funae Y, Catalytic specificity of CYP2D isoforms in rat and human. *Drug Metab. Dispos.* **30**(9): 970-976, 2002.

Kamada T, Chow T, Hiroi T, Imaoka S, Morimoto K, Ohde H and Funae Y, Metabolism of seleginine hydrochloride, a selective monoamine B-type inhibitor, in human liver microsomes. *Drug Metabol. Pharmacokin.* **17** (3): 199-206, 2002.

Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Ogawa M, Masuda C, Morimura K, Funae Y and Fukushima S, Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell-cycle arrest in the rat liver via generation of oxidative stress by phenobarbital: association with expression profiles of p21(WAF1/Cip1), cyclin D1 and Ogg1. *Carcinogenesis* **23** (2): 341-349, 2002.

Osada M, Imaoka S, Sugimoto T, Hiroi T and Funae Y, NADPH-cytochrome P-450 reductase in the plasma membrane modulates the activation of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* **277** (26): 23367-23373, 2002.

Sukata T, Uwagawa S, Ozaki K, Ogawa M, Nishikawa T, Iwai S, Kinoshita A, Wanibuchi H, Imaoka S, Funae Y, Okuno Y and Fukushima S, Detailed low-dose study of 1,1-bis(p-chloro-phenyl)-2,2,2-trichloroethane carcinogenesis suggests the possibility of a hormetic effect. *Int. J. Cancer* **99** (1): 112-118, 2002.

Yamaguchi Y, Kirita S, Hasegawa H, Aoyama J, Imaoka S, Minamiyama Y and Funae Y, Contribution of CYP4A8 to the formation of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid from arachidonic acid in rat kidney. *Drug Metabol. Pharmacokin.* **17** (2): 109-116,

2002.

2. 学会発表

岡田和嗣, 今岡進, 廣井豊子, 林浩志, 広瀬克利, 船江良彦 ラット脳に存在する Bisphenol A 受容体の精製 (第 75 回日本生化学会大会)

長田真優子, 今岡進, 廣井豊子, 船江良彦 NADPH-P450 還元酵素の新機能としての HIF-1 活性化 (第 75 回日本生化学会大会)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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：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

分担研究者 伏木信次 京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学
部門教授

研究要旨

胎生期、早期新生児期のマウス脳における Protein disulfide isomerase(PDI) の発現を免疫組織化学的に検索した。PDI は胎齢 10.5 日に神経管腔側で正中部に強く発現し始め、胎齢の進行とともに脳の部域毎に特徴的な発現パターンを示した。Nestin、TUJ1、MAP2 との二重染色の結果から、PDI は分化した神経細胞により強く発現するものと考えられた。

A. 研究目的

Protein disulfide isomerase(PDI) は主に粗面小胞体に存在し、S-S 結合の触媒、分子シャペロンとして機能するほか、estradiol, 3,3',5-triiodo-L-thyronine (T3)などのホルモンと内分泌かく乱化学物質の一つである Bisphenol A (BPA)が競合的に結合するサイトを持つ。BPA が、発生期中枢神経系に及ぼす作用のメカニズムを知る手がかりを得ることを目的として、BPA と親和的に結合する能力を有する PDI の発達期中枢神経系での分布を詳細に調べることとした。

B. 研究方法

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 1:1000)、抗 Nestin 抗体 (1:500)、抗 TUJ1 抗体 (1:400)、抗 MAP2 抗体 (1:1000)、抗 Neurofilament 抗体 (1:1000) を用いた。また、胎齢 12.5 日、18.5 日、生後 0 日の脳ホモジネートで Western blot を行った。

(倫理面への配慮) 本研究における動物の飼育、取り扱いに関しては、京都府立医科大学動物実験委員会の承認を得た。

C. 研究結果

免疫組織化学的に、PDI は胎齢 10.5 日には神経管腔側で正中部に強く発現し、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

に特に高度)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の核周囲細胞質にドット状に染色され、18.5日では、さらに大脳皮質の放射状線維の染色性が明瞭になった(図)。生後0日では、染色パターンは18.5日に類似したが全体に染色性が低下した。PDI陽性細胞は胎生早期にはTUJ1陽性細胞と重なり、後期にはさらにMAP2陽性細胞と一致するようになったが、NestinとPDIとを同時に発現する細胞は見られなかった。このような所見からPDIは、主として、分化した神経細胞に強く発現するものと考えられた。

D. 考察

PDIは胎生早期から発達期脳組織に発現するが、胎生16.5日から18.5日で最も広汎に、しかも特徴的な分布を示し、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た。このことは、PDIが神経細胞の軸索伸長、投射、シナプス形成などに重要な役割を果たす可能性を示唆しており、T3、estradiolなどのホルモンレセプターとしてのPDIの機能を考え合わせると興味深い。

E. 結論

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た。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki T, Mizuo 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* 2003; 117: 639-44.

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* 2002; 61: 77-8.

Fukuyama R, Nakayama A, Nakase T, Toba H, Mukainaka T, Sakaguchi H, Saiwaki T, Sakurai H, Wada M, Fushiki S. 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* 2002; 277: 41455-62.

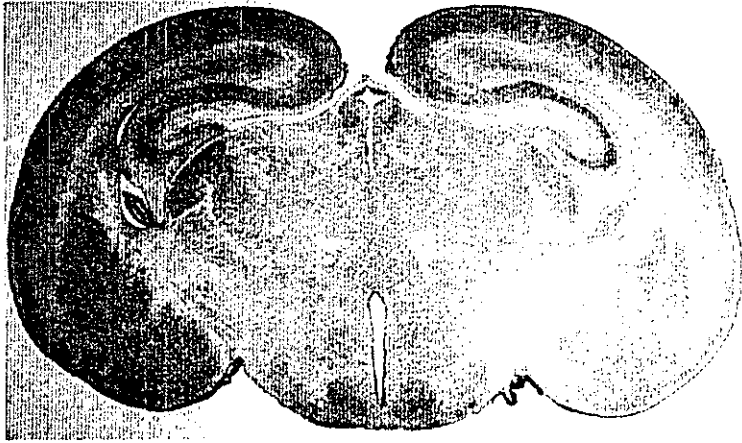
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究協力者：伊東恭子、丹藤 創、矢追毅（京都府立医科大学附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門）



図：PDI に対する免疫組織化学；大脳冠状断（胎齢 18.5 日）
大脳皮質（とりわけ体性感覚野、梨状葉に高度）、subplate、海馬錐体細胞、扁桃体、
視床、外側膝状体、視床下部が明瞭に染色されている。

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：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

分担研究者 山野恒一 大阪市立大学大学院発達小児医学教授

研究要旨

Wistar 系ラットの海馬でビスフェノール A (BPA) の受容体の一つであるエストロゲン受容体の α 型 (ER α) の発現を経時的に免疫組織化学的方法で、また Western blotting によって検討した。また、カイニン酸誘発痙攣重積をおこした成熟ラットのけいれん重積後 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。

ER α の発現は正常ラット海馬では 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 日目ではほぼ成熟ラットの値に下降することが判明した。けいれん重積ラットでは海馬 CA1 領域で錐体細胞の著明な脱落が起こり、グリオーシスの部位で肥大したアストログリアに ER α の発現が強く認められた。以上の結果から、BPA は海馬の幼若な錐体細胞やグリオーシス部位の反応性アストログリアに作用することが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質である BPA が中枢神経系の発生、すなわち神経細胞の産生、移動、軸索や樹状突起の伸展、シナプス形成に与える影響について解明するのが本研究の主目的である。

BPA が幼若神経細胞に作用する際の受容体の一つにエストロゲン受容体 (ER) がある。近年エストロゲンの神経保護作用が注目されており、BPA の中枢神経系への影響を考える上で、ER の局在や経時的推移の解明が必須である。今年度はラットの海馬における ER の α 型 (ER α) の発現の局在と経時的推移について検討するとともに、カイニン酸誘発痙攣重

積後の海馬についても、ER α の発現を検討した。

B. 研究方法

実験動物は Wistar 系ラットを用い、日齢 0・2・4・6・8・10・15 日および 8 週齢の雄ラットを還流後、脳を取り出し、4%PFA で固定し、パラフィン包埋した。冠状切片を用い、ER α の免疫組織化学染色を行なった。またこれら雄ラットの還流後、海馬を取り出し 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

C. 研究結果

免疫組織化学的研究では ER α の発現は日齢 0 日目の新生仔ラットではほとんどみられなかったが、生後 2 日目ころから海馬 CA1, CA3 領域の錐体細胞層に認められるようになった。これらの発現は日齢 4-6 日目で最も強くなり、その後低下し生後 15 日頃には日齢 8 週目のラットと差異は認められなくなった。

Western blotting では全日齢のラットの海馬で ER α の発現を認めた。日齢 0-10 日目のラット海馬では ER α の 2 種類のバンド(67kD, 65kD)が検出された。65kD のバンドは日齢 10 日以降消失し、67kD のバンドが日齢 8 週目まで残存していた。半定量の結果では 2 種類のバンドとも日齢 4-6 日目で最も強い発現を認め、以後低下し、日齢 10 日から 15 日目で日齢 8 週目ラットとほぼ同値となった。

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が起こり、グリオーシスに発展していった。これらの領域で肥大したアストログリアの核及び細胞質に ER α の発現が強く認められた。

D. 考察

BPA のレセプターの一つである ER α の発現はラット海馬では 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することが判明した。その上、Western blotting では日齢 10 日目まで 2 つのバンドが認められたことも新生仔ラットで特徴的であった。生後 0-10 日目のラット海馬では錐体細胞が活発に軸索や樹状突起を伸展させ、シナプス形成を行

っている時期であり、エストロゲンが海馬錐体細胞の成熟に大きく関与していることが伺える。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、ラットの日齢 0-10 日の脳はヒトの妊娠 7 カ月目から新生児期の脳に相当する。

また、本研究では ER α の発現はグリオーシスを形成するアストログリアにも認められた。これは BPA が神経細胞のみならずアストログリアにも作用する可能性があることが示唆している。

E. 結論

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 の錐体細胞で強く発現していた。このような時期に BPA に暴露されると、高次脳機能の中核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 の発現はグリオーシスを形成するアストログリアにも認められ、BPA が反応性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。

F 研究発表

1. 論文発表

Tamamori A, Okano Y, Ozaki H, Fujimoto A, Kajiwara M, Fukuda K, Kobayashi K, Saheki T, Tagami Y, Yamano T : 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, Ayata M, Kimura M, Komase K, Furukawa K, Seto T, Ito N, Shingai M, Matsunaga I, Yamano T, Ogura H. 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, Kimura M, Lan HTN, Takaura N, Yamano T: 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, Ichiba H, Saito M, Shintaku H, Yamano T, Kusuda S: 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, Fukumasu H, Shintaku H, Fukumasu Y, Yamamasu S, Ishiko O, Yamano T, Ogita S. Decreased plasma tetrahydrobiopterin in pregnant women is caused by impaired 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase activity. *International Journal of Molecular Medicine* 9:49-52,2002

2.学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし