

分担研究課題：PC12 細胞でのドパミン分泌に対する影響

分担研究者 長田真優子

## 研究要旨

我々は、胎児期にビスフェノール A (BPA) により暴露された仔マウスの脳内ドパミン量は、非暴露群と比較して減少していることを明らかにした。神経伝達物質の一つであるドパミンの減少は、脳神経発達に大きな悪影響を与えると考えられる。一方、我々は、PC12 細胞において BPA が細胞内のドパミン量を減少させることを明らかにした。PC12 細胞に及ぼす効果を BPA を対照として検討することは、脳内ドパミン量の変化を起こす危険性を有する化学物質を見つけ出す簡便な評価法になると考えた。そこで、これまでホルモンかく乱作用を有することが報告されているさまざまな化学物質を用い、評価法を確立することを目的として実験をおこなった。その結果、BPA を細胞培養液に添加したときに見られた結果と比較して同等もしくはそれ以上の強いドパミン減少作用を有する化学物質が存在することが明らかになった。これらは、BPA と同様に胎児期に暴露されることにより脳神経発達を阻害する可能性が考えられる。

### A. 研究目的

以前から、ビスフェノール A (BPA) 投与の雌マウスから生まれた仔マウスにおいて行動異常が知られている。これは、胎児期に BPA の暴露を受けたことと因果関係があり、このような異常が発生する機構の解明が急がれている。さらに我々は独自の研究結果から、暴露された仔マウスの脳内ドパミン量は、非暴露群と比較して減少していることを明らかにした。一方、我々は PC12 細胞において、BPA は細胞内のドパミン量を減少させることを明らかにした。このとき細胞培養液中のドパミン量が増加したことから、BPA には細胞内ドパミンを細胞外に放出させる作用があると考えられる。BPA 暴露仔マウスの脳内ドパミン量の減少と、培養細胞の BPA によるドパミン放出が同じ機構によるかどうか

かについては明らかになっていないが、BPA の PC12 細胞に対する作用と同様の効果を持つ化学物質は、脳内ドパミン量に影響を及ぼす可能性が示唆される。そこで、これまで報告されているホルモンかく乱作用を有する数十種類の化学物質が PC12 細胞に及ぼす効果を BPA を指標として検討することにより、脳内ドパミン量の変化を起こす危険性を有する可能性のある化学物質を見つけ出す簡便な評価法確立を目的とし実験をおこなった。

また、我々はこれまでに 25 ~ 100  $\mu$ M の BPA が、G 蛋白、カルシウムチャンネルを介して、PC12 細胞でドパミン放出をおこすこと (non genomic action) を明かにしてきたが、BPA が作用するレセプターは不明であった。そこで今回、内分泌かく乱化学物質評価法確

立の一環として、BPA が作用するレセプターの解明を目的として実験を進めると共に、併せて、より低濃度での BPA が PC12 細胞に及ぼす影響を検討することを目的とした。

## B. 研究方法

1.5~2.0×10<sup>6</sup> 個の PC12 細胞をプレートに蒔き、10%ウマ血清および 5%ウシ血清を含む RPMI1650 培地で一晚培養した。培地から Buffer A, pH7.4 (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Glucose) に交換し、それぞれの被検体を添加した。30 分間培養後、Buffer A を取り除き PBS で 2 回洗浄した細胞を PBS 回収した。回収された細胞を超音波破碎し、遠心分離をおこなった。このときの上清に含まれるドパミン量を細胞内ドパミン量として定量した。定量には HPLC を用い、ECD で検出した。このとき、内標準物質としてデオキシエピネフリンを用いることにより、また遠心後の沈渣を用いて蛋白定量することにより補正した。評価をおこなったのは、以下に示す 21 種類の化学物質である。トリブチルスズ、4-オクチルフェノール、ノニルフェノール、フタル酸-n-ブチル、オクタクロロスチレン、ベンゾフェノン、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸-2-エチルヘキシル、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジエチル、アジピン酸-2-エチルヘキシル、トリフェニルスズ、ペンタクロロフェノール、アミトロール、2,4-ジクロロフェノール、4-ニトロトルエン、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジプロピル、BPA、ビスフェノール A 代謝物 (4-メチル-2,4-ビス (p-ヒドロキシフェニル) ペント-1-エン ; MBP)。

エストロゲン受容体阻害剤である 1 μM ICI182780 を 50 μM BPA と共に PC12 細胞に

曝露し、BPA によるドパミン放出が阻害されるかどうかを調べた。また、1 ~ 100 nM の BPA を PC12 細胞に曝露し、細胞内ドパミン量の変化を上記同様 HPLC で評価するとともに、ドパミン合成酵素である tyrosine hydroxylase の mRNA 変化を RT-PCR 法で調べた。

## C. 研究結果

これまでホルモンかく乱作用を有することがすでに知られている 20 被検体による PC12 細胞内ドパミン量の変化について検討した。100 μM BPA は約 30%細胞内ドパミンを細胞外へ放出し、細胞内ドパミン量を約 70%に低下させる。BPA の効果と比較することにより 3 つのグループに分けることができた。まず第 1 のグループは、BPA よりもさらに強い効果を示す化学物質でトリブチルスズ、トリフェニルスズ、ノニルフェノール、ペンタクロロフェノールの 4 種類が含まれる。これら化合物の濃度 50 μM では、細胞内ドパミン量が 50%以下であった。しかし、トリブチルスズおよびトリフェニルスズ添加時には、PC12 細胞を剥がれるなど細胞毒性が見られた。このことから、これらの化学物質による細胞内ドパミンの減少はドパミン放出ではなく、単に細胞死による可能性が考えられる。第 2 のグループは、BPA とほぼ同程度の効果を示した 2 種類の化合物が含まれる。4-オクチルフェノールとオクタクロロスチレンであり、共に濃度 100 μM で細胞内ドパミン量が約 70~80%であった。第 3 のグループは、細胞内ドパミン量をほとんど減少しないかもしくは全く影響しない 13 種類の化学物質であった。

BPA は生体内で速やかに代謝され排泄されるが、この BPA の代謝課程で生じる MBP

には強力なエストロゲン作用があることが報告されている。我々は、この MBP においても BPA と同様細胞内ドパミンに影響を及ぼすかどうか検討した。その結果、濃度 10  $\mu\text{M}$  で細胞内ドパミン量が 20%にまで減少した。

50  $\mu\text{M}$  BPA 曝露による PC12 細胞からのドパミン放出は、エストロゲン受容体阻害剤である 1  $\mu\text{M}$  ICI182780 で阻害された。

1~100 nM の BPA を PC12 細胞に曝露すると、30 分後から tyrosine hydroxylase の mRNA が増加し始め、約 6 時間でピークに達した。細胞内ドパミン量は 12 時間後に有意に増加を認めた。BPA による tyrosine hydroxylase の mRNA の増加は、1  $\mu\text{M}$  ICI182780、G 蛋白阻害剤である 1mM GDP $\beta$ s で阻害された。

#### D. 考察

今回用いた化学物質は、低濃度で内分泌系のメッセージ伝達のかく乱を介して生殖器の異常や内分泌、免疫、神経系に影響を与えるなど、ホルモンかく乱作用を有することが報告されている。これらは環境調査や多くの実験動物を用いた暴露評価により得られた知見であり、ヒトへの暴露評価および種々の健康影響評価ができる研究を系統的に行う必要がある。とりわけ神経系への影響は脳の発達過程を変化させ正常な脳機能を乱すことから、その同定することと作用機序の解明が急がれている。そのため、脳神経系に及ぼす影響を評価する確かな方法が必要であると考えられる。我々は、PC12 細胞の細胞内ドパミン量の変化を指標として、21 種類のホルモンかく乱物質について検討した。BPA は PC12 細胞内ドパミン量を 30%減少させたが、これ以上の作用を有する 2 種類の化学物質（ノニルフェノール、ペンタクロロフェノール）が存在し、また同様の効力をもつ化学物質（4-オクチルフェノール、オクタクロロスチレン）を加えると BPA 以外に 4 種類の化学物質が見つかった。これらの化合物はフェノールもしくはクロロベンゼンの基本骨格を有しており、現在その他の化学物質においても構造活性相関が考えられるかどうかについてビスフェノール誘導体を用いて検討している。

さらに、強力なエストロゲン作用を有する BPA 代謝物である MBP に細胞内ドパミン量減少効果が存在したことから、脳発達の未成熟な胎児期において BPA の代謝体が脳内ドパミンに影響を及ぼす可能性が考えられる。

また、PC12 細胞における BPA の細胞内ドパミン放出及び合成作用は、エストロゲン受容体阻害剤である ICI182780 及び G 蛋白阻害剤である GDP $\beta$ s で阻害されたことから、BPA の細胞内ドパミンかく乱作用には、膜のエストロゲン受容体が関与している可能性が示唆された。

PC12 細胞でのドパミン放出の機構を明らかにしこの評価法が確立されれば、大量の実験動物を用いることなく簡便なスクリーニングが可能である。今後、BPA やその他の化学物質のさらなる作用機構の解明に取り組む。

PC12 細胞でのドパミン放出の機構を明らかにしこの評価法が確立されれば、大量の実験動物を用いることなく簡便なスクリーニングが可能である。今後、BPA やその他の化学物質のさらなる作用機構の解明に取り組む。

#### E. 結論

我々の評価系では、すでによく知られているホルモンかく乱作用を有する化学物質のいくつかは、BPA と同様に細胞内ドパミン量を減少させる作用を有していた。BPA 以外のホルモンかく乱作用を有することが報告されている化学物質にもドパミン調節を乱す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

Osada M. 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)

Osada M. et al.; Induction of erythropoietin (hypoxia marker) in HEP3B cells by hypoxia depends on NADPH-dependent enzyme.  
International Congress Series, 1233, 273-279 (2002)

Imaoka S, Osada M. et al.; Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. Cancer Lett, 203, 117-125 (2004)

### 2. 学会発表

Osada M. et al.:Function of flavonoid as inducer of erythropoietin by hypoxia inducible factor 1 activity  
第 76 回生化学会大会 (横浜 10 月)

Osada M, Funae Y. et al.: NADPH-cytochrome P450 reductase modulates the activation of hypoxia-inducible factor 1.  
Society for Free Radical Biology and Madison 10th Annual Meeting (Seattle 11 月)

長田真優子  
NADPH-P450 還元酵素の新機能としての HIF-1 活性化  
第 405 回 大阪市医学会例会 (大阪 12 月)

## 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（化学物質リスク研究事業）

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

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

神経機能に重要である微小管の MAP2 依存的な重合能に対し神経ステロイド及び内分泌かく乱化学物質が影響することを明らかにした。その作用としては単独での重合促進・抑制とその作用に対する拮抗的な作用が化学物質ごとに観察された。初代培養海馬神経細胞の突起伸長に対しても、微小管重合に対する作用に対応した促進及び抑制作用が観察され、MAP2 を介して神経ステロイド及び内分泌かく乱化学物質が細胞機能に影響することが示された。さらに、神経突起伸長を抑制するノニルフェノールが、高次中枢神経機能である学習に対しても抑制作用を示し、*in vitro* においてノニルフェノールに拮抗するプロゲステロンやプレグネノロンがこのノニルフェノールによる学習能低下作用を改善することが明らかとなった。このことは新たなステロイド及び内分泌かく乱化学物質の中枢神経機能に対する効果を見いだしたと共に、その有効な評価系として微小管重合測定系が機能することを示したものである。

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、最近その存在が認識されだした核内受容体を介さないステロイドホルモンの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、神経ステロイドが微小管結合蛋白質である MAP2 に作用し微小管重合活性を調節していることを見いだしている。中枢神経系での内分泌かく乱化学物質の作用点としてこの脳内に

存在し神経機能に重要な役割を担う MAP2 に着目した。本研究では最終的に神経ステロイド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

1. マウス MAP2 及び微小管蛋白質精製  
温度変化を利用した微小管蛋白質の重合—脱重合サイクルを繰り返したのち、超遠心によりマウス脳細胞質画分より微小管蛋白質を調製した。チュブリンはホスホセルロースカラムを用いて精製した。続いて MAP1 を熱変性後に遠心により除去し、MAP2 とタウ蛋白質をハイドロキ

シアパタイトカラムを用いて分離精製した。精製蛋白質は SDS-PAGE により確認した。

## 2. MAP2 依存的微小管重合測定

微小管が形成されると溶液に濁度が上昇し、その濁度は微小管形成量に比例するので定量的測定が可能である。試験管内でチュブリン (1 mg/ml) と MAP2 (0.05 mg/ml) を混合し、37°C の加温により重合反応を開始させ、345 nm の吸光度の時間変化を 15 分間測定した。

## 3. 初代培養海馬神経細胞の突起染色

ラット 17 日胚の海馬より常法に従いトリプシン処理により神経細胞を分散し調製した。10% FBS を含む DMEM/F-12 培地にて懸濁し、 $1 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の細胞密度でポリリジンコートカバーガラスに播種した。培養 1 日後に cytosine  $\beta$ -D-arabinofranoside にて神経細胞以外の増殖性の細胞は除去した。培養開始 2 日目に各化合物を添加し、添加 2 日後に樹状突起、軸索をそれぞれのマーカーである MAP2 及びタウの抗体で免疫染色し蛍光顕微鏡にて観察した。細胞体からの樹状突起伸展数を測定し、突起の長さは NIH imaging を用いて測定した。各化合物処置群について細胞数 200 個以上を観察し、測定した。

## 4. ステップスルー学習能測定法

ddY 雄性マウスの脳室内に各化合物を投与し、投与 1 日後にステップスルー型の受動的回避学習試験装置を用いて、暗室に入ると電気刺激が与えられることをトレーニングし学習させた。トレーニング

の 24 時間後に学習試験として暗室に入るまでの潜時を測定した。潜時のカットオフタイムは 300 秒と設定した。

## (倫理面への配慮)

本実験の実験動物に対する取り扱いは、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

### 1. 神経ステロイドによる MAP2 依存的微小管重合に対する調節作用

MAP2 依存的微小管重合に対する神経ステロイド (プレグネノロン、デヒドロエピアンドロステロン、プロゲステロン) の作用を濁度測定法を用いて測定した。それぞれ 1  $\mu$ M における反応を測定したところ、プレグネノロンは MAP2 依存的微小管重合量を約 3 倍に上昇させた (重合促進)。デヒドロエピアンドロステロンは単独で重合を阻害した (重合抑制)。それぞれの濃度依存性を測定したところ、50 nM から有意な作用が測定された。一方、プロゲステロンは単独作用を有していなかったが、プレグネノロンによる重合促進作用、デヒドロエピアンドロステロンによる重合抑制作用を阻害した (重合拮抗阻害)。また、プロゲステロンはプレグネノロンの重合促進作用の濃度反応曲線を高濃度側にシフトさせ、競合的な抑制であることが示唆された。

MAP2 はチュブリンと低温下で結合してリング構造をつくる。MAP2 がチュブリンの重合を促進するのは、このリング

構造がチューブリン重合の核形成に関与するからである。微小管重合が平衡化した状態にプレグネノロンを処置すると更に重合量は増加したが、デヒドロエピアンドロステロンの処置では平衡化した微小管重合量の減少はみられなかった。このことは、デヒドロエピアンドロステロンの重合抑制作用は脱重合促進によるものではないことを意味すると同時に、神経ステロイドによる微小管重合調節はMAP2によるチューブリン重合の核形成を制御しているものと考えられる。また、別の微小管結合蛋白質であるタウ蛋白質存在下にも微小管重合は促進されるが、この重合反応にはいずれの神経ステロイドも無影響であった。

## 2. 内分泌かく乱化学物質による MAP2 依存的微小管重合能の変調

被験物質のうちビスフェノールA及びノニルフェノールのMAP2依存的微小管重合作用に対する影響を濁度測定法を用いて測定した(濃度:1 $\mu$ M)。ビスフェノールAは単独作用を有していなかったが、プレグネノロンによる重合促進作用を阻害し、プロゲステロンと同様の重合拮抗阻害を示す化合物に分類された。ノニルフェノールは単独で微小管重合をほぼ完全に阻害し、重合抑制型の化合物に分類された。また、MAP2への結合阻害部位が神経ステロイドと競合的であることを確認した。ビスフェノールA及びノニルフェノール共に神経ステロイドと同様にタウ蛋白質依存的な微小管重合反応には無影響であった。

## 3. 培養神経細胞突起伸長に対する神経

### ステロイドの作用

ラット17日胚海馬神経細胞の樹状突起伸長に対する神経ステロイドの作用を検討した。通常、培養開始4日の樹状突起の長さは細胞体より平均7 $\mu$ m程度であるが、*in vitro*において微小管重合促進作用を示したプレグネノロン処置した場合は、その長さが15 $\mu$ mと約2倍に突起伸長が促進された。また、この効果は10<sup>-8</sup>Mから確認された。細胞体からの樹状突起の数も未処置細胞が平均1本であるのに対し、プレグネノロン処置細胞においては平均3本に増加した。プロゲステロンは微小管重合反応に対する作用と同様に単独では樹状突起伸長に対して無影響であったが、プレグネノロンによる樹状突起伸長促進作用及び樹状突起数増加作用を濃度依存的に抑制した。プレグネノロン及びプロゲステロンとも軸索伸展に関しては無影響であることを軸索のマーカーであるタウの免疫染色にて確認した。

神経ステロイドによる樹状突起伸長に対する作用が核内受容体を介するかを検討した。エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体の拮抗薬であるICI182780、Mifepristoneによってはプレグネノロンの促進作用は阻害されず、この作用がノンジェノミック作用であることが示唆された。

他の受容体を介する作用としてプレグネノロンの硫酸抱合体(プレグネノロンサルフェイト)がNMDA受容体に作用することが知られている。しかしながら、プレグネノロンの突起伸展作用はNMDA受容体拮抗薬のD-AP5、MK-801によって阻害されなかったことから硫酸体が作用しているのではないことが証明された。

なお、硫酸体は微小管重合に対し拮抗阻害し、樹状突起伸展作用に対しても拮抗阻害することを確認している。プロゲステロンの拮抗阻害作用は、細胞内移行しない BSA-標識プロゲステロンでは観察されなかった。BSA 標識体が微小管重合に対して未標識体と同様に作用することを確認している。

これらの2種のステロイドの作用が MAP2 のリン酸化を介するものであるかの検証を行った。高分子量の MAP2 は多くのリン酸化部位が存在し、リン酸化は *in vitro* の微小管再構成系を用いた解析から微小管重合活性を著しく低下させることが知られている。ステロイド処置の初代培養海馬神経細胞のリン酸化 MAP2 量をウェスタンブロットにより確認したが、リン酸化 MAP2 量には変化が見られなかった。

#### 4. 培養神経細胞突起伸長に対する内分泌かく乱化学物質の作用

MAP2 依存的な微小管重合能に作用を有することが確認されたビスフェノール A 及びノニルフェノールが、培養海馬神経細胞の樹状突起伸長に及ぼす作用を検討した。ビスフェノール A はプロゲステロンと同様に樹状突起伸長に対しても無影響であったが、プレグネノロン ( $10^{-6}$  M) による樹状突起伸長促進作用や突起数増加作用を  $10^{-6}$  M から濃度依存的に抑制した。一方、ノニルフェノールは  $10^{-6}$  M で単独で樹状突起の伸長をほぼ完全に抑制し、この抑制効果はプレグネノロンあるいはプロゲステロンにより濃度依存的に抑制された。これら2種の内分泌かく乱化学物質の効果は、神経ステロイドの効

果と同様に MAP2 のリン酸化には無影響であり、また、核内受容体拮抗薬では阻害されなかった。軸索伸長に対してはやはり無影響であることを確認している。

#### 5. マウス学習行動に対する神経ステロイド及び内分泌かく乱化学物質の効果

海馬神経細胞において単独で樹状突起伸長を抑制したノニルフェノールについてマウスの学習行動への影響を検討した。ステップスルー型の受動的回避学習試験装置を用いて解析を行った。コントロール群の潜時は250秒程度であるのに対し、マウス脳室内に 10 nmol ノニルフェノールを投与した群では、潜時が100秒程度に減少し、学習機能の低下が観察された。この学習機能の低下はプレグネノロンあるいはプロゲステロンをノニルフェノールと同時に投与することにより 10 nmol から用量依存的に潜時が延長し学習効果が改善された。しかしながら、細胞膜非透過性の BSA-プロゲステロンでは、ノニルフェノールにより低下した学習能に対する改善効果はみられなかった。

#### D. 考察

ステロイドのノンゲノミック作用の標的分子の一つとして MAP2 を見だし、MAP2 を介する微小管重合能にステロイドが影響することを見いだした。この作用には単独での促進、抑制作用と促進作用に対する拮抗作用が存在することを明らかにした。更に、蛋白質レベルで確認された各ステロイドの性質に対応した、培養神経細胞の突起伸長に対する作用あるいはマウス個体における学習能に対する効果が観察された。一方、内分泌かく



乱化学物質にも MAP2 依存的微小管重合に対する、抑制あるいは拮抗作用を示す物質が存在することを明らかにした。さらに内分泌かく乱化学物質についても、それぞれの作用形式に対応した培養神経細胞の突起伸長やマウス学習能に対する効果が観察された。

以上の結果から、MAP2 依存的な微小管重合を調節することにより、神経細胞の形態や高次中枢神経機能に対して内分泌かく乱化学物質がかく乱作用を示す可能性が示唆された。

今回見いだしたまったく新規の内分泌かく乱化学物質作用である MAP2 依存的微小管調節作用と高次脳機能がよく連関することから、今後より多くの化合物に対する知見が蓄積することで、これら化合物の安全性に対して簡便に再評価できる測定評価系となる可能性が考えられる。

#### E. 結論

中枢神経系における内分泌かく乱化学物質の新たな標的分子として MAP2 を見出し、*in vitro*、*in vivo* の評価系を確立した。*In vitro* 評価系として MAP2 結合、微小管重合促進作用、神経細胞樹上突起伸展作用に対する効果測定、*In vivo* 評価系として神経樹状突起の組織化学的解析と一試行性受動型学習試験法による記憶・学習能の影響の解析である。本法を用いることで、核受容体を介するジェノミック作用とは異なる新たな視点で各被験物質の量的及び質的な順位付けが可能であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Fujita R, Ueda H. et al.; Protein kinase C-mediated necrosis-apoptosis switch of cortical neurons by conditioned medium factors secreted under the serum-free stress. *Cell Death Differ*, 10, 782-790 (2003)

Fujita R, Ueda H. et al.; Protein kinase C-mediated cell death mode switch induced by high glucose. *Cell Death Differ*, 10, 1336-1347 (2003)

Hamabe W, Ueda H. et al.; Neuronal necrosis inhibition by insulin through protein kinase C activation. *J Pharmacol Exp Ther*, 307, 205-212 (2003)

Inoue M, Ueda H. et al.; *In vivo* pain-inhibitory role of nociceptin/orphanin FQ in spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*, 305, 495-501 (2003)

Inoue M, Ueda H. et al.; The algogenic-induced nociceptive flexion test in mice: studies on sensitivity of the test and stress on animals. *Brain Res Bull*, 60, 275-281 (2003)

Inoue M, Ueda H. et al.; Nocistatin and prepro-nociceptin/orphanin FQ 160-187 cause nociception through activation of Gi/o in capsaicin-sensitive and of Gs in capsaicin-insensitive nociceptors, respectively. *J Pharmacol Exp Ther*, 306,

141-146 (2003)

Inoue M, Ueda H. et al.; Locus-specific rescue of GluRepsilon1 NMDA receptors in mutant mice identifies the brain regions important for morphine tolerance and dependence. J Neurosci, 23, 6529-6536 (2003)

## 2. 学会発表

松永隼人、植田弘師等：「神経可塑性と精神疾患－樹状突起伸展作用を持つ物質の探索」第20回日本薬学会九州支部大会

## 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（化学物質リスク研究事業）  
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 関西学院大学教授

### 研究要旨

低酸素感受性因子である HIF-1 は核内では HIF-1 $\alpha$  と Arnt のヘテロダイマーとして働く。マウスにおいてこれらの因子をノックアウトすると胎生致死が起こることから発生過程においても重要な役割をしていると考えられる。ヒトの肝癌細胞である Hep3B は、低酸素下で培養すると HIF-1 が働いて赤血球増殖因子であるエリスロポエチン(EPO)を発現し、低酸素応答の研究にはよく使用されている。そこで、この系を利用して BPA をはじめとして内分泌かく乱物質の評価系を検討した。BPA は低酸素下において Hep3B の EPO 発現を顕著に抑制した。メカニズムを詳しく検討したところ、細胞質では HIF-1 $\alpha$  はシャペロンタンパク質である HSP90 と結合し安定化されているが、BPA がこの結合を阻害し、HIF-1 $\alpha$  を不安定化、分解の方向へ進行させることを明らかにした。さらに、BPA の構造類似体で二つのメチル基の 1 つがない BPE さらに 2 つともない BPF をこの評価系に添加して調べたところ、メチル基の数に依存して効果が少なくなり、BPF ではほとんど阻害効果が出なくなった。すでに当研究室で検討しているアフリカツメガエルの卵を用いた系に添加すると、BPA に対して BPF の発生への影響は顕著に弱かった。今回の検討から、BPA が作用する新しいタンパク質因子が見つかり、これが発生過程においても重要な影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに BPA のジメチル構造がこの作用には重要であることが示された。

### 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 は発生過程で様々な重要な働きをしていると考えられているレチノイドの受容体の発現を

低下させる。また、培養細胞を用いた研究で、カルシウムチャンネルと相互作用することでドーパミンを放出させる作用があることも報告されている。本研究では、BPA の甲状腺ホルモンかく乱作用、さらには当研究室で明らかにした低酸素誘導性遺伝子発現阻害効果の検出系の開発およびそのメカニズムの解明を目指した。

ヒトをはじめとして、哺乳動物は低酸素状態になると赤血球増殖因子であるエリスロポエチン(EPO)を産生して、酸素運

搬量を増やしたり、局所的には例えば癌細胞が異常に増殖すると低酸素状態となり、血管内皮増殖因子(VEGF)を誘導して、血管を新しく作って酸素や栄養分を供給できるようにする。この過程には、低酸素感受性因子である HIF-1 が、必要であることが明らかにされ、HIF-1 が活性化されて EPO や VEGF 遺伝子の発現調節領域に結合することが必要である。HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  と Arnt のヘテロダイマーとして働く。これらの因子をマウスにおいてノックアウトすると、胎生致死になることから、発生過程においても重要な働きをしていることが予測されている。また、最近 EPO がその受容体ノックアウトマウスの解析から中枢神経系の形成過程にも重要であることが示され、新規機能として注目されている。当研究室において、ヒトの肝癌細胞である Hep3B の低酸素下における EPO 誘導が BPA によって阻害されることを見だし、この系が内分泌かく乱物質の評価に利用できるのではないかと考えた。また、このメカニズムを明らかにするため、BPA の結合タンパク質およびこの活性に必要な BPA の化学構造の決定を行った。

アフリカツメガエルを用いた発生過程における、内分泌かく乱物質評価についても甲状腺ホルモンのみならず、HIF-1 も考慮に入れた評価系としての確立を目指す。

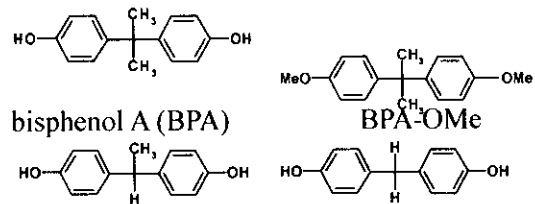
## B. 研究方法

(1) 肝癌細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の影響とその評価法の確立  
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 およびその誘導体 (50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) を添加して検討した。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。 $\beta$ -actin, HIF-1 $\alpha$ , ARNT, NPR, EPO の各プライマーを合成して PCR を行った。

### (2) BPA 誘導体の合成

以下に示した BPA のフェノール性の水酸基をメチル化したもの(BPA-Me)を合成した。BPE, BPF は購入した。



bisphenol A (BPA)

bisphenol E (BPE)

bisphenol F (BPF)

### (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巣と懸濁し、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 およびその誘導体 (1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)を添加して飼育を行った。尾芽胚(stage40)まで各発生段階について顕微鏡で形態変化を観察した。また一方、尾芽胚(stage 35)になった後に BPA を添加して、形態変化を調べた。

## C. 研究結果

(1) 肝癌細胞 Hep3B の低酸素応答に対する BPA の影響とその構造  
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  $\mu$ M, 100  $\mu$ M)の添加で、顕著な EPO 誘導抑制が見られた。そこで、BPA のどの部分の構造が、この活性発現に必要なのかを明らかにするため、いくつかの BPA 誘導体を用いて検討を行った。まず、BPA の 2 個の水酸基をメチル基でブロックした BPA-OMe を添加して、低酸素での EPO の誘導をみたところ、BPA とほとんど同じ効果がみられた。次に、BPA 内部のメチルが 1 個ないもの BPE、2 個ないもの BPF を用いて同様の検討を行ったところ、BPA, BPE, BPF の順でその効果が少なくなった。すなわち、この活性発現には内部の 2 個のメチル基が必要ということである。このメカニズムを解明する目的で、まず EPO の低酸素下の発現調節因子である、HIF-1 $\alpha$ , Arnt さらにこれらを調節していることを明らかにしている NPR について mRNA の発現さらにタンパク質の発現を検討した。これら 3 者について BPA を添加しても、mRNA の発現レベルには全く差がなかった。タンパク質の発現レベルで検討したところ、Arnt, NPR の発現には差がなかったが、HIF-1 $\alpha$  の発現に顕著な低下がみられた。また、この効果は BPA が最も強く、BPF ではみられず、EPO の誘導とよい相関を示した。このことは、BPA による低酸素応答阻害は HIF-1 $\alpha$  の分解促進にあると考えられた。

#### (2) BPA による HIF-1 $\alpha$ 分解促進メカニズム解明へのアプローチ

上記の結果から、BPA による低酸素応答阻害は HIF-1 $\alpha$  のタンパク質レベルでの分解促進であり、さらに BPA の構造がきちんと認識されていることが明らかになった。そこで、次にこの分解促進がどのようなメカニズムで起こっているのかを検討した。コバルトイオンは低酸素状態と

同じように Hep3B 細胞において EPO を誘導することが明らかになっているが、低酸素による誘導とメカニズムが異なると考えられている。Hep3B にコバルトイオンを投与すると HIF-1 $\alpha$  のタンパク量増加に伴って、EPO の誘導がみられたが、BPA は HIF-1 $\alpha$  を低下させ、EPO の誘導を抑制した。BPA は低酸素、コバルトイオンによるそれぞれ異なるメカニズムの EPO 誘導を抑制した。このことから、BPA が直接的に HIF-1 $\alpha$  に働きかけて、その分解促進をしている可能性が示唆された。最近、HIF-1 $\alpha$  にシャペロンタンパク質である HSP90 が結合して、HIF-1 $\alpha$  を安定化しているという報告がなされた。そこで、低酸素培養した Hep3B 細胞破砕液に HIF-1 $\alpha$  抗体を添加して、免疫沈降した。沈殿物について HSP90 抗体を用いてイムノブロッティングすると、報告通り HSP90 のバンドが検出された。この結果は HIF-1 $\alpha$  と HSP90 が結合していたことを示している。BPA を HIF-1 $\alpha$  の抗体と同時に添加すると HSP90 のバンドは検出されなくなった。このことは BPA が HIF-1 $\alpha$  と HSP90 の結合を阻害して、HIF-1 $\alpha$  を不安定化することで、分解を促進している可能性を示唆する結果である。

#### (3) アフリカツメガエル初期発生過程における BPA 誘導体の影響

アフリカツメガエルの受精卵に、BPA, BPE, BPF を添加した。BPA は 25  $\mu$ M で神経盤形成抑制などの影響がでたが、BPE, BPF では影響がでなかった。この傾向は、先の Hep3B を用いたときの低酸素応答抑制とよい相関がある。さらに、尾芽胚に BPA を投与して影響を調べたところ、いくつかの個体に背骨の湾曲がみられた。内分泌かく乱物質の一つであるダイオキ

シンは、強い催奇形性があることが明らかにされ、その受容体 (Ah 受容体) が明らかになっている。そこで、Hep3B 細胞を用いて BPA が Ah 受容体と相互作用する可能性があるかどうかを調べたところ、結合する可能性が示唆された。このことは、BPA による尾芽胚の奇形が Ah 受容体による可能性が示唆された。

#### D. 考察

今回、ヒトの培養細胞を用いた検討で BPA が低酸素応答を抑制することが明らかになった。VEGF や EPO など低酸素応答遺伝子は発生過程において重要な働きをしていると考えられている。特に最近 EPO が発生過程における神経系形成において重要な役割をしている可能性が示唆され、この研究から BPA がそのような過程に影響を与えている可能性が示唆された。今後、妊娠ラットに BPA を投与して、EPO の発現を調べる必要があると思われる。また、この効果を発揮するには BPA のフェノール部分はあまり関与せず、内部の 2 つのメチル基が重要であることが明らかになり、今後、毒性の低い化合物合成の手がかりになるかもしれない。さらに、今回の EPO 誘導の試験系を確立すれば、BPA の新しい影響である低酸素抑制効果のスクリーニングも簡単にできると考えられる。さらに、同時に開発中のアフリカツメガエルの初期発生過程における試験においても低酸素応答抑制と同じ効果が現れ、BPA にくらべてメチルのない BPF は発生異常がほとんど観察されなかった。これらの試験法を組み合わせれば、ヒトでの発生への影響も十分評価できる系ができると考えている。

#### E. 結論

今回ヒトの癌細胞を用いた系で BPA の低酸素応答抑制という新しい影響を見いだした。この効果は中枢神経形成過程に影響を与える可能性があり、このスクリーニング系を確立する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kinoshita A, Imaoka S. et al;  
Phenobarbital at low dose exerts hormesis in rat hepatocarcinogenesis by reducing oxidative DNA damage, altering cell proliferation, apoptosis and gene expression. *Carcinogenesis*, 24, 1389-1399 (2003)

Mizuno D, Imaoka S. et al.; A novel transcriptional element which regulates expression of the CYP2D4 gene by Oct-1 and YY-1 binding. *Biochim Biophys Acta*, 1627, 121-128 (2003)

Kishimoto W, Imaoka S. et al.;  
Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology*, 145, 699-705 (2004)

Imaoka S. et al.; Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett*, 203, 117-125 (2004)

##### 2. 学会発表

T. Mori, Imaoka S. et al.: The role of NADPH-P450 reductase in development of *Xenopus laevis* (第76回日本生化学会大会)

Kubo N, Imaoka S. et al.: Inhibition of EPO induction in hypoxia by polyphenols -Relationship between inhibitor function and its structure- (第76回日本生化学会大会)

Osada M, Imaoka S. et al: Function of flavonoid as inducer of erythropoietin by hypoxia inducible factor 1 activity (第76回日本生化学会大会)

H. 知的財産の出願・登録状況  
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

分担研究課題：内分泌かく乱化学物質 Bisphenol A (BPA)の脳神経系形成に及ぼす影響  
-Protein Disulfide Isomerase(PDI)の発現変動に着目して

分担研究者 伏木信次 京都府立医科大学医学研究科分子病態病理学教授

### 研究要旨

Protein disulfide isomerase(PDI)は 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を、特に PDI の中枢神経系での発現変動に着目して調べた。胎生 12.5 日から 18.5 日における胎児脳への BPA 曝露は、大脳皮質板での PDI 発現の異常、皮質板の成熟のかく乱をきたし、神経細胞の遊走後の分化、成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

Protein disulfide isomerase(PDI) は主に粗面小胞体に存在し、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。PDI は発達期脳神経系において、時空間的に特徴ある発現パターンを示すことは既に報告した。今回、BPA が発生期中枢神経に及ぼす作用を、特に PDI の中枢神経系での発現変動に着目して調べた。

#### B. 研究方法

妊娠マウス(ICR)に胎生12.5日から18.5日までBPA(3mg/g混餌)を投与し、胎生18.5日で胎仔脳を摘出、PLP固定液で固定後パラフィン包埋切片を作成し、免疫組織化学的染色を施行した。一次抗体として、抗PDI抗体(舩江教授より恵与

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。胎生18.5日の脳ホモジネートでWestern blotを行った。以上をBPA投与群、非投与群で比較した。

(倫理面への配慮)本実験計画に関しては、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

免疫組織化学的には、PDIの発現パターンは、嗅球、海馬、基底核、視床、視床下核ではBPA投与群、非投与群間で差異は見られなかった。背側の終脳壁からなる皮質板、subplateでは、BPA投与群でPDIの発現が明らかに低下し、正常の中枢神経系発生のいずれの時期にも観察されないパターンを示した。皮質板では、PDI免疫染色性



の radial pattern の消失、MAP2 の皮質板浅層から深層へかけての gradient の消失、TUJ1 発現線維の減少と Nestin 陽性線維の残存などが見られた。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るが、胎児への BPA 曝露は、正常の脳皮質発生過程に影響を及ぼすことが示唆された。

#### D. 考察

PDI は胎生早期から発達期脳組織に発現し、主として遊走後の分化、成熟しつつある神経細胞に強く見られるが、胎児脳への脳皮質発生時期に一致した BPA 曝露は、皮質板での PDI 発現に異常をきたした。このことは、BPA が神経細胞の軸索伸長、投射、シナプス形成などにも影響を及ぼす可能性を示唆している。今後さらに低用量 BPA の胎児期曝露による脳形成過程への影響を分子レベルから組織レベルに至るまで解析することによって、その生物影響を解明したい。

#### E. 結論

胎生 12.5 日から 18.5 日における胎児脳への BPA 曝露は、脳皮質板での PDI 発現のかく乱など神経細胞の遊走後の分化、成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された。

#### F. 健康危険情報

該当項目なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

Fushiki S. et al.: Prenatal and neonatal exposure to bisphenol A affects substantia nigra and hippocampus. Symposium “Effects of endocrine disruptors on the development of brain”, 第 76 回日本生化学会大会、2003 年 10 月 15 日-18 日、横浜.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

該当項目なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告

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医学研究科発達小児医学教授

### 研究要旨

BPA 1mg/L を含む飲料水を 4 週間以上投与したのち妊娠させ、妊娠期間中および仔の飼育期間も同量の BPA で飼育した母マウスから生まれた生後 5-13 日目の仔マウスの脳重は対照群にくらべ、低値であり、その神経細胞の密度（DNA 量/蛋白量）は高くなっていた。正常新生仔では生後 4 日以降に海馬で ER $\alpha$  と synaptophysin が強く発現し始め、生後 10-15 日目にピークに達した。しかし、胎生期および新生仔に BPA に曝露された仔でも正常新生仔にくらべ、ER $\alpha$  と synaptophysin の発現に差異は認められなかった。また、BPA に曝露された仔の甲状腺機能も正常であった。

### A. 研究目的

出生前の内分泌攪乱化学物質（環境ホルモン）が仔の生殖・内分泌系に作用することはよく知られている。一方、臨床的には母体の血中 PCB 濃度と児の神経学的発達を調査した研究では PCB が児の記憶や集中力に影響を及ぼすことが報告されている。しかし、環境ホルモンが中枢神経系に及ぼす機序については十分解明されていない。環境ホルモンの一つであるビスフェノール A(BPA)はエストロゲン受容体 (ER) や T3 結合蛋白である Protein disulfide isomerase を介して作用を及ぼすことが報告されている。これらの視点に立ち、母体の BPA が仔の脳の発達におよぼす影響について検討した。

### B. 研究方法

ICR-JCL 系マウスを用い、BPA 1mg/L を含む飲料水を 4 週間以上投与したのち妊娠させ、妊娠期間中および仔の飼育期間

も同量の BPA で飼育した母マウスから生まれた仔マウスを実験群、正常飲料水で飼育された母マウスからの仔マウスを対照群とした。(1) 両群各 12 匹の生後 5、8、13 日目の脳重(大脳+脳幹+小脳、wet weight)と大脳(大脳皮質+線状体+海馬)の DNA 量、蛋白量を測定し、細胞密度(DNA 量/蛋白量)を検討した。(2) 両群の生後 0、4、8、10、15 日目の海馬での ER $\alpha$  と synaptophysin の発現を免疫組織化学的に検索した。(3) 両群の生後 5 日目の仔の血中甲状腺刺激ホルモン (TSH) を測定した。

### C. 研究結果

(1) 生後 5、8、13 日目の対照群の脳重は  $191 \pm 11\text{mg}$ 、 $300 \pm 42\text{mg}$ 、 $391 \pm 57\text{mg}$ 、であるのに対し実験群の脳重は  $177 \pm 24\text{mg}$ 、 $237 \pm 67\text{mg}$ 、 $351 \pm 48\text{mg}$  と有意に低値を示した (いずれも  $p < 0.001$ )。生後 5 日と 13 日目の DNA 量/蛋白量は対照

群ではそれぞれ  $2.31 \pm 0.17$ ,  $1.15 \pm 0.07$  であるのに対し、実験群では  $2.42 \pm 0.17$ ,  $1.30 \pm 0.43$  と高値を示した。

(2) 対照群仔マウスでは  $ER\alpha$  の発現は出生直後には認められなかった。生後 4 日目頃から錐体細胞にわずかに発現し始め、生後 10 日まで増強していった。生後 15 日の  $ER\alpha$  の発現は生後 10 日のそれとほぼ同等であった。また、synaptophysin の発現は生後 4 日までほとんど認めなかったが、生後 4 日から生後 15 日にかけて多型細胞層、放線層、網状層、分子層で増強していった。しかし、実験群の海馬での  $ER\alpha$  と synaptophysin の発現は対照群のそれと差異は認められなかった。

(3) 対照群 8 例、実験群 6 例の血中 TSH 値はそれぞれ  $2.02\text{--}3.53\text{ng/ml}$  および  $2.94\text{--}3.50\text{ng/ml}$  の範囲にあり、実験群で異常な高値を示していなかった。

#### D. 考察

中枢神経系の発生は細胞レベルからみれば、神経細胞の生成母体である母細胞の増殖、母細胞から神経細胞の産生、幼弱神経細胞の移動、樹状突起・軸索の伸展、シナプス形成、髄鞘形成からなっている。実験群で対照群に較べ脳重が軽く、細胞密度が高値であったことは BPA が中枢神経系の発生に何らかの影響を及ぼしていることを示唆している。

海馬は記憶、認知、学習などの高次脳機能の中核である。エストロゲンは神経細胞の樹状突起の伸展やその棘 (spine) でのシナプス形成を促進することが報告されている。本研究では海馬での  $ER\alpha$  は日齢 4 日以降、漸次強く発現していった。これらの時期は海馬で錐体細胞の樹状化やシナプス形成が活発に進んでいる時期

で、エストロゲンが重要な役割を果たしていることが示唆される。

synaptophysin は錐体細胞の樹状突起に inputs するシナプス終末に存在する蛋白である。正常マウスでは出生 4 日から生後 15 日にかけて漸増していた。すなわち、生後 4 日以降に海馬では活発なシナプス形成が進んでいることを示唆するものである。BPA は  $ER$  や神経細胞膜にある protein disulfide isomerase に結合して作用することが報告されている。それゆえ、BPA に曝露された発達期の海馬錐体細胞は、樹状突起の伸展やそのシナプス形成に影響を被ることが予測される。しかし、 $ER\alpha$ 、synaptophysin とその発現について実験群と対照群に差異は認められず、BPA が海馬のシナプス形成に影響を与える積極的な結果は得られなかった。

近年わが国で施行されている新生児マススクリーニングで、新生児一過性高 TSH 血症の頻度が増加してきている。BPA は T3 結合蛋白である Protein disulfide isomerase を介して作用を及ぼすことが報告されている。それゆえ、仔の甲状腺ホルモンのかく乱が予測されたが、われわれのマウスを用いた研究では異常は認められなかった。今後、新生児一過性高 TSH 血症を呈した母乳中の BPA 濃度について測定してゆく予定である。

#### E. 結論

BPA  $1\text{mg/L}$  を含む飲料水を 4 週間以上投与したのち妊娠させ、妊娠期間中および仔の飼育期間も同量の BPA で飼育した母マウスから生まれた仔マウスの脳重は対照群にくらべ、低値であり、その神経細胞の密度は高くなっていた。またこれらの仔脳の海馬での  $ER\alpha$  と

synaptophysin は共に生後 4 日目ころから発現し始め、生後 10-15 日目にピークに達した。これらの発現様式は正常新生仔のそれと差異はみられなかった。また、BPA に曝露された仔の TSH 値は正常であった。

F. 健康危険情報  
なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hattori H, Yamano T. et al.; Magnetic resonance imaging in occipital lobe epilepsy with frequent seizures. *Pediatr Neurol*, 28, 216-218 (2003)

Ichiba H, Yamano T. et al.; Three-year follow up of term and near-term infants treated with inhaled nitric oxide. *Pediatric International*, 45, 290-293 (2003)

Takaura N, Yamano T. et al.; Attenuation of ganglioside GM1 accumulation in the brain of GM1 gangliosidosis mice by neonatal intravenous gene transfer. *Gene Therapy* 10, 1487-1493 (2003)

Tanaka A, Yamano T. et al.; Different attenuated phenotypes of GM2 gangliosidosis variant B in Japanese patients with HEXA mutations at codon 499, and five novel mutations responsible for infantile acute form. *J Hum Genet*, 48, 571-574 (2003)

Nakajima R, Yamano T. et al.; Effects of leptin to cultured growth plate chondrocytes. *Horm Res*, 60, 91-98 (2003)

#### H. 知的所有権の出願・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 徳原大介、横井俊明、  
市場博幸