

200401237A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 船江 良彦

平成17（2005）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 船江良彦	..... 1
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 (PDI) の 生理的意義解明と内分泌かく乱物質のスクリーニング法 の確立 船江良彦	..... 10
2. PC12 細胞でのドパミン合成酵素 (TH) に対する影響 吉田徳之	..... 15
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 ー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 植田弘師	..... 18
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 ーヒト培養細胞およびアフリカツメガエル胚を用いた 評価法の開発 今岡進	..... 22
5. 内分泌かく乱化学物質ビスフェノール A (BPA) の脳神経系 形成に及ぼす影響 ーProtein Disulfide Isomerase(PDI) の発現変動に着目して 伏木信次	..... 29
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 山野恒一	..... 32
7. 胎児・幼児期曝露による中枢神経系腫瘍発生影響 福島昭治	..... 37
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	..... 40
IV. 研究成果の刊行物・別刷	..... 41

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
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

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ンや神経ステロイド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) ラット PDI におけるイソメラーゼ活性の阻害性を指標に、内分泌かく乱作用が疑われている化学物質の影響について調べたところ、BPA、*p*-ノニルフェノール、*p*-オクチルフェノールにおいて阻害活性が見られた。(船江)
- 2) BPA をマウスに曝露すると、仔マウス脳内のドーパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素 (TH) が増加する。本研究では、PC12 細胞を用い BPA 投与により TH の増加を確認した。この反応は極低濃度の BPA で起るので、EDC の中枢神経系への影響を評価する高感度な方法として有用である。(吉田)
- 3) 内分泌かく乱化学物質の影響を及ぼす化学物質の作用分類、強さの順位付けに有効な MAP2 評価系、受容体モデル評価系を用い、被験化学物質が標的分子の作用分子である神経ステロイドの作用を模倣、もしくは変調することを明らかにした。(植田)
- 4) ヒト培養肝癌細胞を用いた系で、低酸素感受性因子やエストロゲン受容体などの安定化に関わっているシャペロンタンパク質 HSP90 の機能を BPA が阻害することを見いだした。これは新機構でのホルモンかく乱作用を示唆するものである。(今岡)
- 5) 胎生初期からの低用量 BPA 曝露は、終脳において神経発生に関わる数種の遺伝子発現の変動を惹起するとともに、組織学的には終脳壁、海馬、視床などにおける PDI 発現の増強をきたし、神経前駆細胞の増殖、神経細胞の遊走、分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。(伏木)
- 6) 妊娠中および新生仔期の BPA が生後 2 週間までの仔の海馬のエストロゲン受容体  $\alpha$  ( $ER\alpha$ ) と synaptophysin の発現に及ぼす影響を Western blot 法で検索し、シナプス形成を電子顕微鏡で検討したが、BPA 暴露群と対照群で差異はみられなかった。  
(山野)

- 7) 妊娠期間及び授乳期間中にBPA、さらに妊娠18日目にN-ethyl-N-nitrosourea (ENU)を母動物に投与した。F<sub>1</sub>動物の40週齢における中枢神経系腫瘍発生に対するBPAの影響は病理組織学的に全く認められなかった。(福島)

## 分担研究者

吉田徳之  
大阪市立大学大学院医学研究科助手  
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. BPA結合蛋白(PDI)に対する影響(船江)

ラットPDI遺伝子をクローニングし、大腸菌で発現させたヒスチジン融合PDIを用いて、BPAをはじめとする内

分泌かく乱化学物質としての作用が疑われている化学物質 (22 種) の存在下でイソメラーゼ活性を測定した。PDI のイソメラーゼ活性は PDI によるリフォールディングによって還元型・変性型 RNase が未変性型 RNase に再活性化された時の cCMP 水酸化活性を分光光学的に測定する方法により行った。

## 2. PC12 細胞でのドパミン合成酵素 (TH) に対する影響 (吉田)

PC12 細胞を  $1 \times 10^6$  個培養し、BPA を曝露した。PC12 細胞の TH は mRNA を RT-PCR 法にて測定した。また、細胞内ドパミンは、細胞破細後 HPLC-ECD システムにて定量した。PKC 阻害として H7、および Ro32-0432 を用い TH 増加機構を検討した。

## 3. 神経細胞膜 G 蛋白質関連型受容体に対する影響 (植田)

1. MAP2 評価系：試験管内で精製 MAP2 とチューブリンを再構成し、微小管重合反応を濁度測定法にて測定した。培養海馬神経細胞の樹状突起染色により突起伸展数、伸展長を測定した。受動的回避学習試験法により個体影響を検討した。
2. 受容体モデル評価系：神経細胞膜 G 蛋白質連関型受容体機能のモデル実験として肥満細胞株を用いた脱顆粒応答測定系と細胞内カルシウム濃度測定系により受容体に対する作用を評価した。末梢疼痛過敏応答測定、血管透過性亢進測定により細胞-個体評価が相関することを確認した。

## 4. 低酸素によるエリスロポエチン誘導に対する影響 (今岡)

ヒト培養細胞 Hep3B の低酸素誘導性遺伝子エリスロポエチン (EPO) をマーカーにしたアッセイ系に BPA およびその誘導体を添加して影響を調べた。さらに、低酸素感受性因子 (HIF-1 $\alpha$ ) とその安定化因子である HSP90 の結合について、免疫沈降によって検討した。一方 HSP90 を大腸菌に導入してタンパク質発現させて、精製したものを得た。そして HSP90 と BPA の直接的な相互作用 (結合) を検討した。

## 5. PDI の発現に対する影響 (伏木)

妊娠マウス (ICR) に胎生 0 日から連日、皮下注射によって BPA (0.1 g/kg/day、20 g/kg/day) を投与し、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日、18.5 日で胎仔終脳を摘出、total RNA を回収したのち、マウス由来の約 3 万種の遺伝子断片を対象とするマイクロアレイ解析を実施した。同様に作製した妊娠マウス (ICR) に 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, 12.5mg/kg) を腹腔内単回投与し、1 時間後あるいは 2-3 日後に胎児脳を摘出、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 (船江教授より恵与 1:500)、抗 BrdU 抗体 (1:10000) などを用いた。

## 6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

マウスを用い、BPA 1mg/L を含む飲料水を 4 週間以上投与し、妊娠中およ

び新生仔期も同じ飲料水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。両群の生後 0、4、8、14 日目の海馬での ER $\alpha$  と synaptophysin の発現を免疫組織化学的方法と Western blot 法にて検索した。また、両群の海馬錐体細胞のシナプス形成を電子顕微鏡で経時的に観察した。

## 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、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、ENU を 10 mg/kg 体重の用量で妊娠 18 日目に 1 回、静脈内投与した。F<sub>1</sub> 雄動物を生後 40 週まで無処置で飼育・観察した。本年度は脳、脊髄における変化を病理組織学的に詳細に検討した。

## C. 研究結果と考察

### 1. PDI に対する影響 (船江)

被検物質 100 $\mu$ M の存在下でイソメラーゼ活性を測定した結果、阻害活性 (IC<sub>50</sub> 値) は、T<sub>3</sub>: 3.6  $\cdot$  M、BPA: 113.8  $\cdot$  M、*p*-オクチルフェノール: 62.3  $\cdot$  M、*p*-ノニルフェノール: 42.1  $\cdot$  M であり、比較的高い阻害強度で T<sub>3</sub> と同様の作用を示した。2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、テトラプロモ BPA、テトラクロロ BPA は PDI に対する結合性を示すものの、イソメラーゼ活性には影響しなかった。また、その他の化学物質による阻害性はみ

られなかった。これらの化学物質は生体内において PDI に対する甲状腺ホルモン作用をかく乱し、タンパク質合成に悪影響を及ぼした結果、脳神経系に異常をもたらす可能性が示唆された。

### 2. PC12 細胞での TH に対する影響 (吉田)

PC 細胞に BPA を 1 時間曝露したところ、BPA 濃度依存的に TH の mRNA は増加した。その増加は、BPA 曝露 6 時間まで時間依存的であった。BPA による THmRNA の増加は PKC 阻害剤で阻害された。この BPA による THmRNA 増加は、BPA のナノモル濃度の曝露によって起こることから、この反応はかなり鋭敏であるので、EDC の中枢神経系の影響を検討する方法として大変優れた評価方法であると考えられる。

### 3. 神経ステロイドに対する影響 (植田)

MAP2 依存的な微小管重合に対し神経ステロイド、被験化学物質が以下に分類される作用を有することを明らかとした。重合促進: PREG、DBP、PCP。重合抑制: DHEA、NP。重合拮抗阻害: PROG、AMI、BP、BPA。この分類は海馬神経細胞の樹状突起伸長においても相関した。NP はマウス脳室内投与により学習機能障害を誘発し、本作用は PREG により改善された。DHEAS は細胞膜上の受容体に作用し、Gq-PLC 系を介し細胞内カルシウム濃度を上昇させた結果、脱顆粒応答反応を引き起こす。この系に対し、殆どの被験化学物質は

DHEAS に対して拮抗作用を示した。一方、TBT は受容体非依存的な単独作用として脱顆粒反応を引き起こした。これらの作用は疼痛過敏応答や血管透過性亢進などの個体応答においても相関した。

#### 4. 低酵素によるエリスロポエチン誘導に対する影響 (今岡)

シャペロンタンパク質 HSP90 は HIF-1 $\alpha$ , ダイオキシン受容体(AhR), エストロゲン受容体などを安定化する因子であるが、当該研究によって BPA が HSP90 に結合して、その機能を阻害している可能性を見いだした。この BPA の作用は低酸素化で HIF-1 $\alpha$  依存的に EPO を誘導する Hep3B 細胞を用いれば簡単に検出することができる。BPA は HSP90 と HIF-1 $\alpha$  の結合を解離させることで、HIF-1 $\alpha$  を分解した。さらにこの作用は構造依存的で BPA の中央の 2 個のメチル基を除去すると消失した。さらに HSP90 を大腸菌に発現させ精製して、BPA との直接結合を検出できる系の基礎ができています。これらの系を用いて、HSP90 の機能障害による新しいホルモン受容体かく乱作用検出が可能となった。

#### 5. BPA 受容体の発現に対する影響 (伏木)

胎生初期からの低用量 BPA 曝露により、発生期終脳における神経発生関連遺伝子の変動が見られた。一方、PDI は胎生早期から発生期脳組織に発現し、主として遊走中から遊走後の分化・成熟しつつある神経細胞胞体、突

起に強く見られるが、胎児脳への BPA 曝露は、発生期終脳壁での PDI 発現の増強をきたした。さらに、E12.5 日から E14.5 日での神経前駆細胞増殖、神経細胞遊走が亢進するとともに、神経細胞への分化、投射線維の発達がより促進する傾向が見られた。このことは、BPA が脳形成において、神経前駆細胞増殖、神経細胞遊走のみならず、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。しかし、大脳皮質形成への BPA 曝露の影響から見る限り、皮質形成早期での変化が中・後期よりも大きく、妊娠早期における BPA 曝露を回避できれば、その影響を小さくとどめることのできる可能性が示された。

#### 6. 海馬のエストロゲン受容体に対する影響 (山野)

対照群仔マウスでは ER $\alpha$  の発現は日齢 0 日から認められ、生後 14 日目まで漸次増加していった。対照群の synaptophysin の発現は生後 4 日目から発現し始め、生後 14 日にかけて増加していった。しかし、実験群の海馬での ER $\alpha$  と synaptophysin の発現は対照群とくらべ差異は認められなかった。

電子顕微鏡的観察では対象群の錐体細胞樹状突起の spine 上のシナプスは日齢 8 日頃から認められ、その後シナプス形成が進行していった。微細構造上、実験群との差異は見られなかった。

エストロゲンは発達期の海馬錐体細胞の成熟を促すことが報告されて

いる。海馬は記憶、認知の中枢であり、ER $\alpha$ やPDIの発現がしているのに、BPAがER $\alpha$ の発現やシナプス形成に関与している積極的な結果は得られなかった。

#### 7. 中枢神経系腫瘍発生に対する影響 (福島)

脳ではAstrocytomaが対照群で5例、BPA 0.05 mg/kg 投与群で5例、BPA 120 mg/kg 投与群で3例に、Mixed gliomaがBPA 0.05 mg/kg 投与群で1例に、MeningiomaがBPA 0.05 mg/kg 投与群で1例に、Oligodendrogliomaが対照群で1例、BPA 0.05 mg/kg 投与群で1例、BPA 120 mg/kg 投与群で1例に認められた。脊髄においてはSchwannomaが対照群で2例、BPA 0.05 mg/kg 投与群で1例に認められた。胎児、新生児は臍帯、母乳を介してBPAに暴露されることが指摘されている。しかし、BPAは高用量でも中枢神経系腫瘍発生に対して促進作用を示さなかった。

#### D. 結論

1. PDIのイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響を*in vitro*で検討する事によって、生体内におけるタンパク質合成不全による脳神経系発達異常を引き起こしうる化学物質のスクリーニングが可能となると考える。(船江)
2. PC12細胞にてBPA曝露によって、濃度および時間依存的にTHmRNAの増加が認められた。この方法は、EDCの中枢神経系の影響を評価するための高感度な方法

であることと考えられた。(吉田)

3. 中枢神経かく乱性、並びに内分泌かく乱化学物質の同定と順位付けの動物実験の代替評価法として2つのノンジェノミック評価系を確立し、これまでのジェノミック作用とは異なる視点で化学物質の量的・質的な順位付けが可能となった。(植田)
4. BPAの新しい結合因子HSP90を見いだした。この結合にはBPAのジメチル構造が必要であり、HSP90と結合することでホルモン受容体を不安定化していることが示唆された。この作用を検出するための系を確立した。(今岡)
5. 胎生初期からの胎児脳へのBPA曝露は、終脳での神経発生関連遺伝子の変動を引き起こすとともに、組織レベルでは、大脳皮質、間脳でのPDIの発現増強ならびに神経前駆細胞の増殖、神経細胞への分化、遊走後の神経細胞成熟に影響を及ぼす可能性が示唆された。(伏木)
6. 妊娠中および新生仔期にBPA曝露をこうむった仔マウスの海馬錐体細胞のER $\alpha$ とsynaptophysinの発現は対照群でこれらの発現に差異はみられず、BPAが海馬のER $\alpha$ の発現や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。(山野)
7. ラットを用いて中枢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検討したところ、BPAの高用量でも腫瘍の



発生に影響はみられなかった。  
(福島)

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

Funae Y, Okada K, and Hiroi T.:  
Effect of bisphenol A on central  
nervous systems. *Toxicology and  
Applied Pharmacology*  
197:229-229(2004).

Osada M, Funae Y, and Imaoka S.:  
Apigenin suppresses the expression  
of VEGF, an important factor for  
angiogenesis, in endothelial cells  
via degradation of HIF-1alpha  
protein. *FEBS Lett* 575:59-63(2004).

Kubo, T., Maezawa, N., Osada, M.,  
Katsumura, S., Funae, Y. and Imaoka,  
S.: Bisphenol A, an environmental  
endocrine-disrupting chemical,  
inhibits hypoxic response via  
degradation of hypoxia-inducible  
factor 1 (HIF-1alpha); Structural  
requirement of bisphenol A for  
degradation of HIF-1alpha. *Biochem.  
Biophys. Res. Commun.* 318,  
1006-1011 (2004).

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.  
*Neurochem Int* 42(5):401-407(2003).

Mizota K., Yoshida A., Uchida H.,  
Fujita R., Ueda H. Novel type of  
Gq/11 protein-coupled neurosteroid  
receptor sensitive to endocrine  
disrupting chemicals in mast cell  
line (RBL-2H3). *Br J Pharmacol* in  
press.

### 2. 学会発表

岡田和嗣、船江良彦等：  
Characterization of Xenopus protein  
disulfide isomerase. 2004年10月，  
横浜 第77回日本生化学大会（生化学  
第76巻，第8号，1061頁）

Funae Y, Okada K et al. : Effect of  
bisphenol A on central nervous  
systems. 2004年7月, Finland 10th  
International congress of  
toxicology (*Toxicology and Applied  
Pharmacology* 197:229)

岡田和嗣、船江良彦：内分泌攪乱化学  
物質の脳神経系発達異常への作用の  
検討 -PDI を介したイソメラーゼ活性  
への影響- 2004年12月，名古屋  
第7回日本内分泌攪乱化学物質学会  
（日本内分泌攪乱化学物質学会第7回  
研究発表会要旨集 312頁）

第24回日本神経科学・第44回日本神  
経化学合同大会

「神経ステロイドによる微小管タン  
パク質重合攪乱」、松永隼人、植田弘  
師

「神経ステロイドによる肥満細胞脱

顆粒応答」、吉田明、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」、内田仁司、植田弘師

第75回日本薬理学会年会

「神経ステロイドの新規作用点：膜受容体応答反応と微小管タンパク重合攪乱」、松永隼人、内田仁司、植田弘師

第5回環境ホルモン学会

「Neurosteroid-induced nociception through a histamine release is regulated by endocrine disrupting chemicals.」、内田仁司、植田弘師

第46回日本神経化学会・第41回日本生物物理学会合同大会

「神経ステロイド・内分泌かく乱物質によるMAP2を介する微小管重合及び神経突起伸展の変調」、松永隼人、吉田明、水野恭伸、植田弘師

「神経ステロイド・内分泌かく乱物質による細胞膜G蛋白質受容体を介する分泌調節」、吉田明、内田仁司、井上誠、溝田香緒里、植田弘師

第76回日本生化学大会（シンポジウム発表）

「Common non-genomic molecular targets for neurosteroids and endocrine disruptors.」、植田弘師、吉田明、水野恭伸、松永隼人

第56回日本薬理学会西南部会

「神経ステロイド及び内分泌攪乱物質の細胞膜受容体を介した肥満細胞脱顆粒応答調節」、溝田香緒里、吉田明、植田弘師

第20回日本薬学会九州支部大会

「神経可塑性と精神疾患—樹上突起伸展作用を持つ物質探索—」、松永隼人、吉田明、水野恭伸、植田弘師

第21回日本薬学会九州支部大会

「神経ステロイド及び環境ホルモンによる肥満細胞におけるGq/11を介した脱顆粒応答の調節」、溝田香緒里、藤田亮介、植田弘師

Yamazaki, Y. Okada, K. Kinoshita, T. Funae, Y. and Imaoka, S.:  
Characterization of Xenopus protein disulfide isomerase (PDI).  
(第77回日本生化学会大会)

今岡 進, 久保智子, 森 智裕, 村口太一, 澤田知子, 岡真優子 ビスフェノールAのHIF-1 $\alpha$ 分解促進による低酸素応答阻害 (第19回日本薬物動態学会年会)

内分泌かく乱化学物質ビスフェノールAの脳神経系形成に及ぼす影響-遺伝子発現と組織発生に着目して-藤原康弘、伊東恭子、矢追 毅、伏木信次  
第45回日本神経病理学会学術研究会  
(2004年5月26日~28日、於 前橋市)

徳原大介、横井俊明、市場俊明、妹尾

早苗、石田博、田中勝治、服部英司、松岡収、山野恒一：妊娠中のビスフェノール A が仔の海馬の ER  $\alpha$  と synaptophysin の発現に及ぼす影響。第 46 回日本小児神経学会（2004、7、15-17）

Mitsuhashi M, Fukushima S. et al; Di-n-butyl phthalate is toxic to the male reproductive system and its toxicity is enhanced by thioacetamide induced liver injury. J Toxicol Pathol, 17, 177-185 (2004)

#### H. 知的財産の出願・登録状況

環境中および生体中の定量のための「ビスフェノールA蛍光・光親和性プローブの開発」

（特許申請中）

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：脳神経細胞膜に存在するビスフェノール A 結合蛋白 (PDI) の  
生理的意義解明と内分泌かく乱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

我々はこれまでに、ビスフェノール A (BPA) の脳内における結合タンパク質として、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) の存在を見だし、BPA は PDI における 3,3',5-トリヨードチロニン ( $T_3$ ) の結合を阻害する事を示してきた。PDI は *in vitro* においてタンパク質のジスルフィド結合の異性化を行うイソメラーゼ活性を有しており、タンパク質の高次構造形成において非常に重要な役割を果たしていると考えられている。本年度の研究では、PDI のイソメラーゼ活性に及ぼす環境化学物質の影響を検討した。その結果、BPA、*p*-ニルフェノール、*p*-オクチルフェノールがイソメラーゼ活性を阻害する事が明らかとなった。これらの化学物質は PDI のイソメラーゼ活性を阻害し、正常なタンパク質の合成系に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。PDI のイソメラーゼ活性への影響を指標に環境化学物質を評価する事は、脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある化学物質を選定する上で重要であると考えられる。

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質 (EDCs) の中枢神経系への影響が数多く報告されており、EDCs の曝露が学習障害や知能指数低下、また注意欠陥多動性症候群を引き起こす可能性が指摘されているが、その作用機序は解明されておらず、EDCs と脳神経系発達異常との関連性は証明されていない。脳神経細胞に BPA の標的となる分子が存在する可能性が考えられた事から、BPA の標的分子となる結合タンパク質の探索を行った。BPA 結合タンパク質を単離・精製する事

に成功した。N 末端アミノ酸配列の解析の結果から、本タンパク質が PDI である事を明らかにした。PDI は小胞体内腔に多く含まれるタンパク質で、甲状腺ホルモン ( $T_3$ ) 結合タンパク質として知られている。

PDI は甲状腺ホルモン結合タンパク質としてだけでなく、タンパク質の酸化、還元、異性化などのチオール - ジスルフィド交換反応を触媒する酵素であり、還元型タンパク質、変性型タンパク質のリフォールディングを行うイソメラーゼ活性を有している。このため PDI は、新生タンパ

ク質の正常な立体構造形成に必要な不可欠であると考えられている。また、このイソメラーゼ活性は  $T_3$  の存在下で抑制される事が報告されている。胎児期・新生児期は複雑な神経ネットワークが形成される時期であり、脳内では様々なタンパク質が盛んに合成されている。このような時期に、環境化学物質によってPDIを介したイソメラーゼ活性が影響を受けると、タンパク質の合成に異常が生じ、結果的に脳神経系発達に悪影響が及ぶ危険性が考えられる。そこで本年度は、PDIのイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響について検討を行い、脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある可能性のある化学物質の評価を行う事を目的とした。

## B. 研究方法

### 1.被検物質

本研究で用いた被検物質は、内分泌かく乱化学物質としての作用が疑われている以下の 22 種類である。BPA、*p*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノール、2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、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、トリブチルスズ、トリフェニルスズ、フタル酸ブチルベンジル、フタル酸ジブチル、フタル酸ジシクロヘキシル、フタル酸ジエチル、フタル酸ジエチルヘキシル、フタル酸ジヘキシル、フタル酸ジペンチル、フタル酸ジプロピル、アジピン酸ジエチルヘキシル、アミトロール、ベンゾフェノン、4-ニトロトルエン、オクタクロロスチレン

### 2.イソメラーゼ活性の測定

PDI のイソメラーゼ活性測定は、Lylesらの方法に従って行った。すなわち、PDIによるリフォールディングによって還元型・変性型 RNase が未変性型 RNase に再活性化された時の cCMP 水酸化活性を分光光学的に測定する方法により行った。RNase の還元・変性は、RNase (10 mg/mL) を変性緩衝液(140 mM DTT, 2 mM EDTA, 6 M グアニジン塩酸塩を含む 100 mM Tris-HCl, pH 8.0) 中で室温にて一昼夜、反応させる事によって行った。変性緩衝液は Bio-Gel P6 spin column を用いて 0.1%酢酸に置換し、使用するまで $-20^{\circ}\text{C}$ にて保存した。還元型・変性型 RNase の濃度は、280 nm にて吸光度を測定し、分子吸光度係数  $9300\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$  を用いて算出した。4.5 mM cCMP、1 mM グルタチオン、0.2 mM 酸化型グルタチオン、2mM EDTA、100 mM Tris-HCl(pH 8.0)を含む反応液に 0.1 mg/mL rPDIを加え、 $25^{\circ}\text{C}$ にて3分間プレインキュベーションを行った後、反応液に  $8\mu\text{M}$  となるように還元型・変性型 PDI を加える事により反応を開始した。296 nm における吸光度の経時的变化を 30 分間測定した。一分間あたりの吸光度変化を算出し、化学物質を加えない時の値を 0%として、各種化学物質存在下での活性阻害率を算出した。

## C. 研究結果

### 1.化学物質によるイソメラーゼ活性への影響

被検物質  $100\mu\text{M}$  の存在下で、イソメラーゼ活性を測定した。その結果、BPA (20%阻害)、*p*-オクチルフェノール (40%

阻害)、*p*-ノニルフェノール(20%阻害)において、阻害効果が見られた。2,4-ジクロロフェノール、ペンタクロロフェノール、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は、PDIに対する結合性を示すものの、イソメラーゼ活性には影響しなかった。また、その他の化学物質による阻害性はみられなかった。

## 2. BPA、*p*-オクチルフェノール、

### *p*-ノニルフェノールによるイソメラーゼ活性の阻害性

前試験において、イソメラーゼ活性の阻害効果が見られた BPA、*p*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノールについて、阻害効果の濃度依存性を  $10^{-7}$ ~ $10^{-3}$  M の範囲で検討した。その結果、いずれの化学物質も濃度依存的な阻害活性を示し、用量-反応曲線はシグモイド曲線を描いた(図:1)。

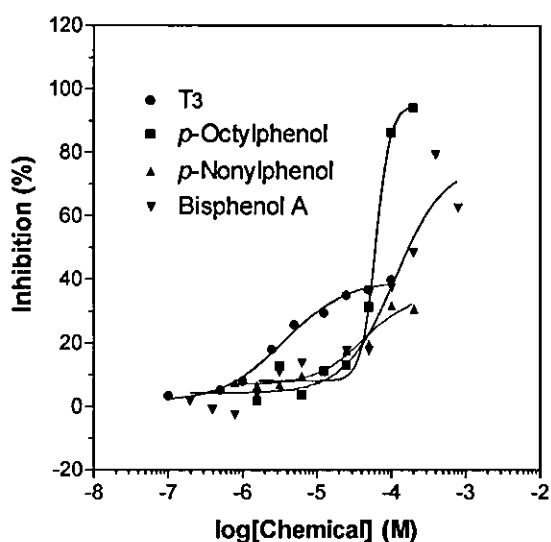


図1:イソメラーゼ活性の阻害性

この時の阻害活性 ( $IC_{50}$  値)は、

BPA:113.8  $\mu$ M、*p*-オクチルフェノール:62.3  $\mu$ M、*p*-ノニルフェノール:42.1  $\mu$ M であった。一方、イソメラーゼ活性の抑制作用が知られている  $T_3$  の  $IC_{50}$  値は 3.6  $\mu$ M であった。このことから、これらの化学物質の影響は、 $T_3$  と同様の作用を示し、数十分の一程度の阻害強度であることが分かった。

## D. 考察

今回、PDI のイソメラーゼ活性に及ぼす化学物質の影響を検討する事によって、BPA、*p*-オクチルフェノール、*p*-ノニルフェノールがイソメラーゼ活性を抑制する事が明らかとなった。PDI は *in vitro* においてタンパク質の酸化、還元、異性化などのチオール - ジスルフィド交換反応を触媒するため、生体内における新生タンパク質の正常な立体構造形成に必要不可欠であると考えられている。また、また、このイソメラーゼ活性は *in vitro* において  $T_3$  の存在下で抑制される事や、ラット下垂体由来細胞である GH3 細胞において、PDI の発現抑制が  $T_3$  の存在下で誘導される事が報告されており、PDI によるタンパク質のフォールディングを甲状腺ホルモンが制御していると考えられる。昨年度までの研究において我々は、フェノール基含有化合物が PDI の  $T_3$  結合を阻害する事を明らかにしてきたが、今回 PDI のイソメラーゼ活性を阻害した化学物質は、フェノール基含有化合物のなかでも、側鎖にハロゲン基を持たないものだけに限定された。この結果は化学物質の構造活性相関を明らかに示しており、今後、PDI を介したタンパク質の

フォールディングに影響を及ぼす化学物質を、その構造から予測する事も可能である。

甲状腺ホルモンは軸索形成、神経突起の伸長、細胞遊走、ミエリン形成など正常な脳神経発達に重要な役割を果たしている。特に胎児期・新生児期は複雑な神経ネットワークが形成される時期であり、脳内では様々なタンパク質が盛んに合成されている。この様な時期に環境化学物質によってPDIを介したイソメラーゼ活性が影響を受けると、タンパク質の合成に異常が生じ、結果的に脳神経系の発達異常があらわれる危険性が考えられる。その為、本研究で用いたスクリーニング法は、脳神経系発達に影響を及ぼす危険性のある環境化学物質の評価を行う上で、非常に重要であると考えられる。

## E. 結論

環境化学物質によるPDIのイソメラーゼ活性の阻害性を試験する本評価法は、脳神経系発達に影響を及ぼす可能性のある化学物質を選定する上で、有用であると考えられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Funae Y, Okada K, et al. Effect of bisphenol A on central nervous systems. *Toxicology and Applied Pharmacology*

197:229-229(2004).

Narimatsu S, Funae Y, et al. The roles of amino acid residues at positions 43 and 45 in microsomal contents and enzymatic functions of rat CYP2D1 and CYP2D2. *Biochem Biophys Res Commun* 324:627-33(2004).

Niwa T, Funae Y, et al. Effect of genetic polymorphism on the metabolism of endogenous neuroactive substances, progesterone and p-tyramine, catalyzed by CYP2D6. *Brain Res Mol Brain Res* 129:117-23(2004).

Osada M, Funae Y, et al. Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1alpha protein. *FEBS Lett* 575:59-63(2004).

Minamiyama Y, Funae Y, et al. CYP3A induction aggravates endotoxemic liver injury via reactive oxygen species in male rats. *Free Radic Biol Med* 37:703-12(2004).

Furukawa M, Funae Y, et al. Cytochrome p450 gene expression levels in peripheral blood mononuclear cells in comparison with the liver. *Cancer Sci* 95:520-9(2004).

Kubo T, Funae Y, et al. Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting

chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha): structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 318:1006-11(2004).

Imaoka S, Funae Y, et al. Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett* 203:117-25(2004).

Minamiyama Y, Funae Y, et al. Continuous administration of organic nitrate decreases hepatic cytochrome P450. *J Pharmacol Exp Ther* 308:729-35(2004).

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

## 2. 学会発表

岡田和嗣、船江良彦等: Characterization of *Xenopus* protein disulfide isomerase. 2004年10月, 横浜 第77回日本生化学大会(生化学 第76巻, 第8号, 1061頁)

Funae Y, Okada K et al. :Effect of

bisphenol A on central nervous systems. 2004年7月, Finland 10th International congress of toxicology (Toxicology and Applied Pharmacology 197:229)

岡田和嗣、船江良彦: 内分泌攪乱化学物質の脳神経系発達異常への作用の検討 -PDIを介したイソメラーゼ活性への影響- 2004年12月, 名古屋 第7回日本内分泌攪乱化学物質学会(日本内分泌攪乱化学物質学会第7回研究発表会要旨集 312頁)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

中枢神経作用性内分泌かく乱化学物質のスクリーニング法 特願 2002-246351 船江良彦 平成14年8月27日

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

研究協力者: 岡田和嗣

(大阪市立大学大学院医学研究科)



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：PC12 細胞でのドパミン合成酵素（TH）に対する影響

分担研究者 吉田徳之

研究要旨

我々はこれまでにマウスによる *in vivo* の実験で BPA 曝露による、脳内のドパミン合成酵素である TH (tyrosine hydroxylase) の増加を確認している。一方、ヒトの血中で確認されている BPA の濃度は nM (nanomolar) レベルであるとの報告が多い。そこで今回我々は、神経系モデルとして PC12 (rat pheochromocytoma) 細胞を用い、nM レベルの BPA を曝露して PC12 細胞における TH やドパミン量の変化を *in vitro* で調査したところ、TH および細胞内ドパミン共に増加を認めた。したがってこの方法は、中枢神経系に影響を与える化学物質の高感度な評価法として有用であると考えられる。

A. 研究目的

BPA 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、常に人体曝露の危険性がある。また、ジフェニル化合物の一つで、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、内分泌攪乱物質の一種として位置づけられているが、その作用機序はまだまだ不明な点も多い。一方、我々はこれまでにマウスによる *in vivo* の実験で BPA 曝露による、脳内のドパミン合成酵素である TH の攪乱作用を確認している。そこで今回我々は、神経系モデルとして PC 細胞を用い、BPA を曝露して PC12 細胞に

おける TH やドパミン量の変化を *in vitro* で検討し、その作用機序の解明を目指すと共にスクリーニング法確立の糸口を見いだすことを目的とした。

B. 研究方法

PC12 細胞  $1 \times 10^6$  個を 10% ウマ血清および 5% ウシ血清を含む RPMI1640 培地で一晚培養した後、培地を pH7.4 (10 mM HEPES、140 mM NaCl、6 mM KCl、1.2 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM Glucose) 組成の Buffer と交換し、BPA を曝露した。PC12 細胞の TH の mRNA は RT-PCR 法を用いて測定した。また、PC12 細胞内のドパミンは、細胞破碎後、HPLC-ECD (high performance liquid chromatography with electrochemical

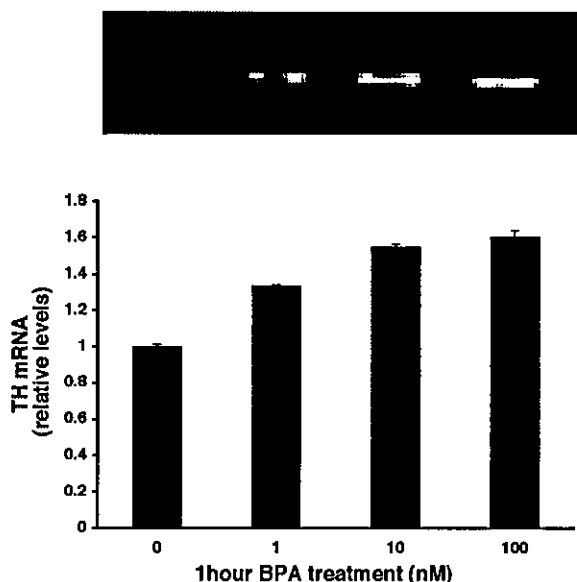
detection) system で定量した。

具体的には、まず BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を 1 時間曝露し、BPA の曝露濃度と TH mRNA の変化との関連を調べた。次に、100 nM の BPA を各 0.5、1、3、6、12 時間曝露し、BPA の曝露時間と TH mRNA の変化の関連をしらべた。さらに、PKC 阻害剤である H7 (10  $\mu$ M)、Ro 32-0432 (100 nM) を添加し、BPA の作用機序を調べた。

実際に PC12 細胞内のドーパミン量に変化が生じているかどうかを、BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を 12 時間曝露して、BPA の曝露濃度と細胞内ドーパミン量変化との関連を調べた。また、100 nM の BPA を各 1、12、24 時間曝露し、BPA の曝露時間と細胞内ドーパミン量の変化との関連をしらべた。

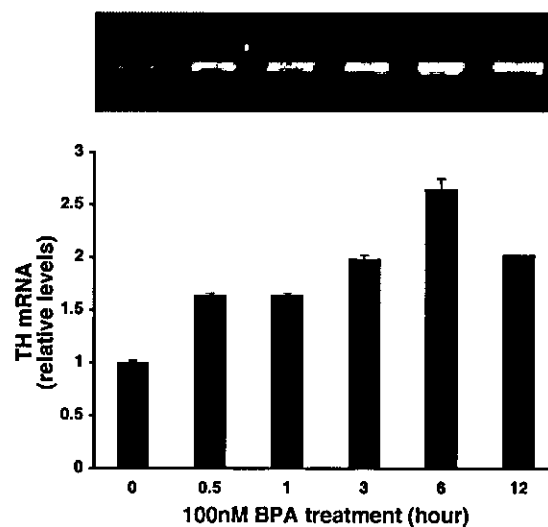
### C. 研究結果

BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を PC12 細胞に 1 時間曝露したところ、濃度依存性に TH の mRNA が増加した (図 1)。



### 図 1 : BPA 濃度依存性

また、100 nM の BPA を各 0.5、1、3、6、12 時間曝露したところ、曝露 6 時間まで時間依存性に TH の mRNA の増加を認めた (図 2)。



### 図 2 : BPA 曝露の時間の影響

BPA による TH の mRNA の増加は PKC 阻害剤である H7 (10  $\mu$ M)、Ro 32-0432 (100 nM) で阻害された。

BPA 各 1 nM、10 nM、100 nM を PC12 細胞に 12 時間曝露したところ、濃度依存性に細胞内のドーパミン量の増加を認めた (図 3)。

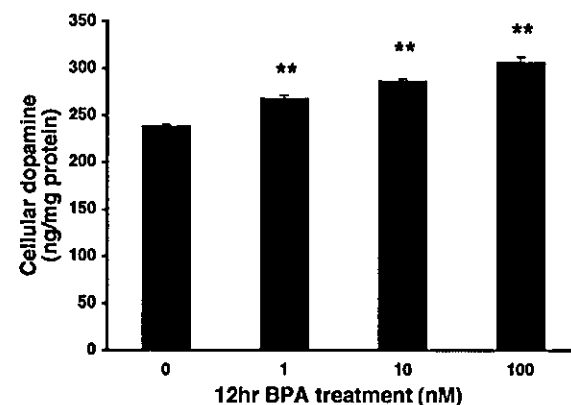


図3: BPAによる細胞内ドパミンへの影響  
また、100 nMのBPAを各1、12、24時間曝露すると、時間依存性に細胞内ドパミン量の増加を認めた(図4)。

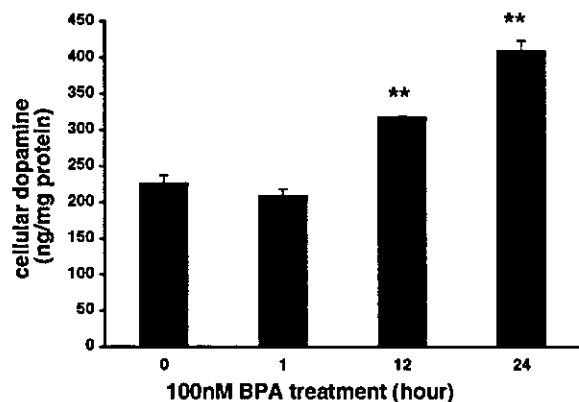


図4: BPA曝露時間の影響

#### D. 考察

今回の研究で、低濃度のBPAをPC12細胞に曝露すると、濃度依存性および時間依存性にTHおよび細胞内ドパミンの増加が生じることから、低濃度のBPAにより神経系が攪乱される可能性が示唆された。曝露0.5時間後にTHの有意な増加を認めることから(図2)、BPAがnon-genomicに作用していることが考えられる。BPAによるTHのmRNAの増加はPKC阻害剤であるH7(10 $\mu$ M)、Ro 32-0432(100 nM)で阻害されたことから、PKCの経路が関わっていると考えられるが、BPAのfirst attack pointは現時点ではわかっていない。我々はこれまでにBPAがPDIに結合することを報告し、種々の内分泌攪乱物質のスクリーニングにPDIが有用であることを研究してきたが、THの増加についても今後PDIとの関連性を調べていく必要があると考えられる。

#### E. 結論

PC12細胞にBPAを曝露すると、ドパミン合成酵素であるチロシン水酸化酵素(TH)の発現が上昇することを見出した。これらPC12細胞を用い、二つのドパミンおよびTHの変化を測定する方法はEDCsの中枢神経系への影響を評価するための有効な方法と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Hoshino Y., Yokoo M., Yoshida N., Sasada H., Matsumoto H. and Sato E. (2004) Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt participate in the FSH-induced meiotic maturation of mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 69:77-86

Yano Y., Saito R., Yoshida N. Yoshiki A., A. Wynshaw-Boris, Tomita M. and Hirotsune S. (2004) A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J. Mol. Med.*, 82: 414-422

##### 2. 学会発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許出願

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

内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への新規作用分子標的として、樹状突起伸展を制御する微小管結合蛋白質：MAP2、Gq 蛋白質連関型細胞膜受容体、2つの分子を基盤とした以下の評価系を構築した。①MAP2 評価系：微小管重合測定-海馬神経細胞樹状突起伸展測定-学習試験、②受容体モデル評価系：肥満細胞脱顆粒応答測定-細胞内カルシウム濃度測定-疼痛過敏応答測定・血管透過性亢進測定。下記の8つの被験化学物質について評価を行ったところ、標的分子の内在性作用分子である神経ステロイドの作用を模倣、もしくは変調することを明らかとした。本作用は試験管-細胞-個体レベルで相関することから動物実験の代替評価法として、本研究において構築した「微小管重合測定系」・「脱顆粒応答測定系」が簡便且つ有効な評価系として機能することを示している。

被験物質：アミトロール；AMI、ベンゾフェノン；BP、ビスフェノール A；BPA、フタル酸ジブチル；DBP、P-ノニルフェノール；NP、ペンタクロロフェノール；PCP、塩化トリブチルスズ；TBT、テトラブロモビスフェノール A；TBPA

#### A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の中枢神経系への作用に関して、その作用機序を基盤とした「影響を及ぼす化学物質の作用分類、強さの順位付けを行うこと」を目的としている。本研究では核内受容体を介するジェノミック作用ではなく、ノンジェノミック作用の新規標的である微小管結合蛋白質：MAP2、G 蛋白質連関型細胞膜受容体、2つの

標的分子に対する直接作用と脳で合成される内在性作用分子である神経ステロイドの機能変調作用を基に被験化学物質の作用分類と強さの順位付けを行った。

#### B. 研究方法

1. 微小管結合蛋白質：MAP2  
試験管内で精製 MAP2 とチューブリ