

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。ラット初代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。ステップスルー型の受動的回避学習試験法により個体に対する影響を検討した。

2. 新規細胞膜 G 蛋白質連関型受容体

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由来 RBL-2H3 細胞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。また、マウス個体での末梢疼痛過敏応答測定や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。

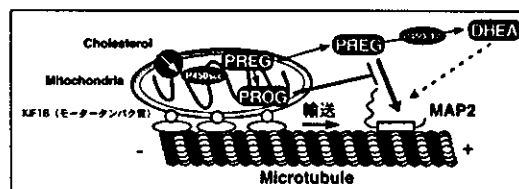
(倫理面への配慮)

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

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(図 1)。初代培養海馬神経細胞の樹状突起伸長に対しても、微小管重合作用

に対応した促進及び抑制作用が観察された。アンタゴニスト物質 NP はマウス脳室内投与により学習機能障害を引き起こし、本作用はアゴニスト神経ステロイド PREG によって改善された。



微小管重合に対する作用分類

	Agonist 重合促進	Inverse Agonist 重合阻害	Antagonist 重合拮抗阻害	Not Effect 無作用
代表的 神経ステロイド	PREG	DHEA	PROG	DHEAS
被験物質	DBP PCP	NP	AMI BP BPA	TBT TBPA

図 1 : 神経ステロイドによる樹状突起ナビゲーション制御(微小管の静と動)

神経ステロイド DHEAS は細胞膜上の受容体に作用し、Gq-PLC 系を介して細胞内カルシウム濃度を上昇させた結果、脱顆粒応答反応を引き起こす。この系に対して殆どの被験化学物質は単独作用を示さなかったが、DHEAS に対して拮抗作用を示した。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(図 2)。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レベルの反応においても相関した。

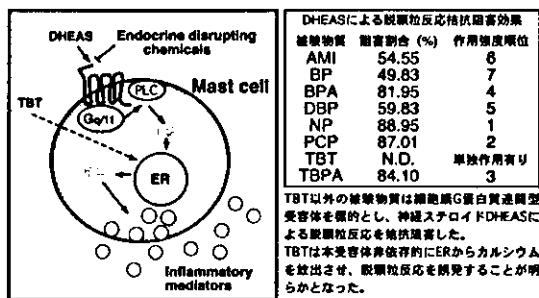


図2：脱顆粒応答反応による作用分類と作用強度順位

D. 考察

以上の被験物質が分子標的に基づいて神経ステロイドの生理的作用を変調し、単独のかく乱作用を有することが明らかとなった。MAP2 依存的微小管重合を変調することから、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。微小管重合調節作用と高次脳機能が連関することが明らかとなれば、今後より多くの知見が蓄積することで、化学物質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。

膜受容体を標的とした測定において、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が、細胞内での応答性のプロファイルと一致することから、RBL-2H3 細胞を用いた脱顆粒反応測定系が *in vivo* の応答性を良く反映することが明らかとなった。今後、受容体を同定し、より精密かつ高感度な測定系を構築することが課題である。

E. 結論

中枢神経かく乱性、並びに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、以下の2つのノンジェノミック作用標的に対する簡便な評価系を開発した。①神経細胞樹状突起伸展に關与する MAP2 を標的とした微小管重合濁度測定法と②G 蛋白質連関型細胞膜受容体を標的としたモデル評価法としての肥満細胞脱顆粒応答測定法である。両方法から被験化学物質が神経ステロイドの作用を変調させることを明らかとし、この変調作用が個体レベルで反映されることを確認した。本評価法によりジェノミック作用とは異なる新たな視点で内分泌かく乱物質の量的・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

Uchida H., Mizuno K., Yoshida A. and Ueda H. (2003) 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.

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.

投稿準備中：2報

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

「脳障害治療剤及び脳障害治療方法」出願番号：特願2002-156446

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
—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

分担研究者 今岡 進 関西学院大学教授

研究要旨

ビスフェノール A (BPA) は内分泌かく乱化学物質の一つと考えられ、弱いながらもエストロゲン様作用があることが明らかにされている。最近 BPA が protein disulfide isomerase (PDI) と結合することが明らかにされ、BPA の非エストロゲン様作用が注目されている。そこで、ヒトの肝癌細胞である Hep3B およびアフリカツメガエル胚に BPA を添加してその影響を検討した。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。低酸素応答遺伝子としてはこの他に、血管内皮増殖因子 VEGF やドパミン合成酵素チロシンヒドロキシラーゼなどがあり、さらには発生過程でもこの応答反応は重要と考えられている。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 α 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 α 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。一方、アフリカツメガエル原腸胚に BPA を添加したところ、尾芽胚において目や頭部の形成に遅延が見られた。メカニズムを検討したところ、BPA が Notch signal を阻害、特に家族性アルツハイマー病の原因遺伝子である presenilin を阻害している可能性が示唆された。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、これが神経系発生過程において、ホルモン合成などに重要な影響を及ぼしている可能性が示唆された。これらの因子をマーカーとした内分泌かく乱化学物質の新しい評価法の基礎が確立された。

A. 研究目的

BPA は内分泌かく乱化学物質の一つとして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。さらに実験動物を用いた検討で母胎が内分泌かく乱化学物質に暴露されると生まれてきた仔に学習障害や多動性が現れるとの報告もある。そこで、本研究では、内分泌かく乱化学物質の一つであるBPAの神経系形成過程のホルモン合成やホルモン受容(シグナル伝達)に関わる新規相互作用タンパク質を明らかにして、それをマーカーとした新規評価法の確立を目指す。

最近中枢神経系の形成に必要であることが明らかになった赤血球増殖ホルモンであるエリスロポエチン(EPO)は細胞の低酸素応答によって発現誘導される。また、神経伝達物質ドーパミンの合成酵素チロシンヒドロキシラーゼ(TH)遺伝子も低酸素応答性である。これらのホルモンや因子の発現におけるBPAの影響を検討した。低酸素応答過程鍵因子はHIF-1で、HIF-1が活性化されてEPOやTH遺伝子の発現調節領域に結合することでこれらの遺伝子の発現が調節される。HIF-1はHIF-1 α 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。一方、元々Arntはダイオキシンの受容体AhRと結合する因子として見いだされたものであり、HIF-1 α の系とAhRの系のクロストークも最近問題となっている。ヒトの肝癌細胞Hep3Bは低酸素応答の研究にはよく利用される細胞で、低酸素下で顕著なEPO誘導が起こる。この系にBPAを添加したところ低酸素下で顕著なEPO誘導抑制が見られた。そこで、この阻害メカニズムの解析と低酸素応答阻害による内分泌かく乱化学物質評価法の確立を検討した。

一方、内分泌かく乱化学物質の発生過程への直接的な影響を調べるため、アフリカツメガエル胚を用いて検討した。アフリカツメガエルの胚発生は観察が容易で、さらに短期間での検討が可能である。神経系形成が始まる原腸胚期にBPAを添加して、中枢神経系形成がほぼ完了する尾芽胚期での表現形を調べた。

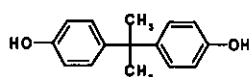
B. 研究方法

(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 μ M, 100 μ M, 200 μ 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

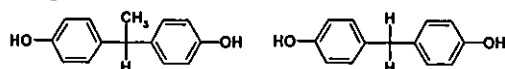
RT-PCRを行った。 β -actin, HIF-1 α , ARNT, NPR, EPOの各プライマーを合成してPCRを行った。一方、今回明らかにしたBPA相互作用因子HSP90を大腸菌でタンパク発現して精製した。

(2) BPAとその誘導体

以下に示したBPAとその誘導体BPE, BPFを利用した。



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、原腸胚(stage 10.5)でBPAおよびその誘導体(1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M)を添加して飼育を行った。尾芽胚(stage 40)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、各ステージでRNAを単離し、脳・神経系(中脳及び目: pax-6、前脳: otx-2、後期神経系: nrp-1、初期神経系: sox-2, N-tubulin、接着因子:

N-CAM, N-cadherin)、中胚葉マーカー(MyoD)、内胚葉マーカー(sox-17 α)遺伝子についてRNAレベルでの変化をRT-PCRで調べた。

C. 研究結果

(1) 肝癌細胞Hep3Bの低酸素応答に対するBPAの阻害効果と阻害メカニズム

低酸素下におけるHep3BのEPO誘導はBPA添加によって、完全に阻害された。その誘導体であるBPE, BPFでは阻害効果はBPAに比べて少なく、BPFではほとんど見られなかった。一方、BPAはAhRを介して異物代謝酵素CYP1A1も誘導した。この誘導効果にはBPA, BPE, BPFにおいて顕著な差は見られなかった。低酸素下のHep3B細胞へのBPA添加によって、HIF-1 α のmRNAの発現には差がなかったが、Western blottingによってタンパク質レベルでHIF-1 α の低下が起こっていた。HIF-1 α は通常酸素濃度では、そのプロリン残基が水酸化され、それをVHLというユビキチン化酵素が認識して、プロテアソームによって代謝されている。低酸素下ではプロリンの水酸化が阻害されて、HIF-1 α が安定化して、核内移行する。この結果からBPAは何らかのメカニズムで低酸素下のHIF-1 α の安定化を阻害していると考えられた。VHL欠損細胞である786-0細胞は通常酸素下でもHIF-1 α の分解が起こらず、EPOの発現が見られる。ここにBPAを添加するとEPOの発現が抑制され、このことからBPAはHIF-1

α をユビキチン化以外の経路で、分解していることが推測された。最近、HIF-1 α がシャペロンタンパク質である HSP90 によって安定化されているという報告がなされた。そこで、低酸素培養した Hep3B のホモジェネートに HIF-1 α 抗体を添加して免疫沈降した。沈降物を Western blot して HSP90 の抗体で染色したところ、BPA を添加しないものでは HSP90 が検出されたが、BPA を添加したものでは検出されなかった。さらに阻害効果のなかった BPF では HSP90 が検出された。このことは、BPA が HSP90 と結合することで、HIF-1 α を不安定化し、これまで明らかになっていない経路で分解されていることを示唆している。そして、大腸菌に発現させ精製した HSP90 を用いて、BPA と HSP90 の直接結合も検討した。さらに、同様の EPO 誘導抑制効果が、*in vivo* で起こるかどうかを、調べるため妊娠ラットに BPA を投与して、胎児の脳および肝臓での遺伝子発現を検討した。胎児の脳では HIF-1 α の顕著な発現が見られた。BPA は胎児脳における EPO の発現を抑制した。一方、胎児肝臓において CYP1A1 を誘導した。

(2) 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原腸胚に、BPA, BPE, BPF を添加した。BPA は 50 μ M で尾芽胚の段階で背骨の湾曲、頭部および目の形成抑制が観察された。一方、BPE, BPF についてはこの濃度でほとんど外形変化はなかった。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った。そこで、尾芽胚期における脳や目などの発現マーカーを調べた。その結果、中脳及び目のマーカーである pax-6、前脳のマーカーである otx-2、接着因子 N-CAM の各遺伝子発現に顕著な抑制が見られた。一方、後期神経系マーカー nrp-1、初期神経系マーカー sox-2, N-tubulin、中胚葉マーカー MyoD、内胚葉マーカー sox-17 α 遺伝子についてはその発現に変化が見られなかった。神経系の発達は chordin によって引き起こされる。そこで animal cap assay を用いて chordin を添加し、N-CAM, pax6 誘導についての BPA の影響を調べたが、ほとんど阻害効果は見られなかった。最近 pax6 や神経系形成に必要な ESR1 の発現調節には Notch signal 系が関わっていることが報告された。そこで、これについて検討した。Notch の ligand である Delta を添加しても BPA による pax6 や ESR1 の抑制は、回復しなかったが、Notch の核内移行ドメイン (NICD) を添加すると、抑制は回復された。このことから BPA は Notch signal の ligand 結合反応かまたは ligand が結合したのち Notch から Presenilin が NICD を切り出す部分を阻害している可能性が示唆された。

D. 考察

ヒト肝癌細胞 Hep3B を用いた検討から、BPA はシャペロンタンパク質である HSP90 に結合することで、EPO などのホルモン (サイトカイン) の発現を

抑制していることが明らかとなった。さらに、*in vivo* 実験で、BPA を投与した妊娠ラットの胎児脳でも EPO 発現の顕著な低下が見られた。HSP90 は様々な核内因子あるいはステロイドホルモン受容体に結合することが報告されている。例えばエストロゲン受容体の安定化にも関与していることが明らかにされ、HSP90 の機能阻害剤である Geldanamycin を投与するとエストロゲンレセプターの分解が起こり、これによって細胞のエストロゲンに対する応答が消失する。今回の検討およびこれらの報告から、内分泌かく乱化学物質のシャペロンタンパク質機能阻害によるホルモンかく乱という新しい機構の可能性が明らかにできた。これは、またこのシャペロンタンパク質機能阻害によるホルモンかく乱の系を用いた内分泌かく乱化学物質の新しい評価系の基礎にもなると考えている。

アフリカツメガエル胚を用いた検討では BPA が Notch signal 系を阻害しているという新しい機構を見いだした。Notch signal は、一回膜貫通型の Notch タンパク質と先に述べたように Delta などの ligand と、そして Notch の細胞内ドメインの NICD で構成されている。ligand の結合によって Presenilin という酵素が働いて NICD が切り出されて、核内に移行し、核内因子として働く。BPA はこの過程を阻害した。現在の検討では Presenilin の活性を阻害している可能性が高い。Presenilin は家族性のアルツハイマー病の原因遺伝子であることが最近

明らかにされ、Presenilin の遺伝的な活性低下はアルツハイマー病の原因となる。このことから、BPA が Presenilin 活性阻害をすれば、何らかの精神活動を阻害する可能性が示唆される。一方で、エストロゲン依存性の癌では Notch signal とエストロゲン受容体を介する系にクロストークが見られ、それぞれが複雑に関わっていることが報告されている。現在、これらについては十分解明が進んでいないが、今回見いだした事実から、この分野の研究が深まると考えている。さらに、このアフリカツメガエルの胚を用いる評価系が、上記阻害メカニズムを解明することで、一般的な内分泌かく乱化学物質の評価系に発展できる可能性を示唆している。

E. 結論

今回ヒト肝癌細胞を用いて、BPA の HSP90 結合による核内因子あるいはホルモン受容体機能阻害を見いだした。これはこれまで報告されていない新しい機構によるホルモンかく乱メカニズムであり、内分泌かく乱化学物質の新しい評価系となりうる。アフリカツメガエル胚を用いた検討では、BPA の Notch signal 阻害という新しい作用を見いだした。Notch signal は神経系形成には重要な因子で、BPA によって尾芽胚の目や頭部の形成抑制がかかることから、この系も *in vivo* での内分泌かく乱化学物質評価系になりうる。しかし、これについては今後さらに機構を明らかにしていく必要がある。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Imaoka, S., Osada, M., Minamiyama, Y., Yukimura, T., Toyokuni, S., Takemura, S., Hiroi, T. and Funae, Y. : Role of phenobarbital-inducible cytochrome P450s as a source of active oxygen species in DNA-oxidation. *Cancer Lett.* 203, 117-125 (2004).

Kishimoto, W., Hiroi, T., Shiraishi, M., Osada, M., Imaoka, S., Kominami, S., Igarashi, T. and Funae, Y. : Cytochrome P450 2D catalyze steroid 21-hydroxylation in the brain. *Endocrinology* 145, 699-705 (2004).

Minamiyama, Y., Takemura, S., Toyokuni, S., Imaoka, S., Funae, Y., Hirohashi, K., Yoshikawa, T. and Okada, S. : CYP3A induction aggravates endotoxemic liver injury via reactive oxygen species in male rats. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 703-712 (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-1 α); Structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318, 1006-1011 (2004).

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

2. 学会発表

Muraguchi, T. Yamazaki, A. Kinoshita, T. and Imaoka, S. : Role of HIF-1 α in early development of *Xenopus laevis*. (第77回日本生化学会大会)

Kubo, T. Osada, M. Funae, Y. and Imaoka, S. : New pathway of HIF-1 α degradation. (第77回日本生化学会大会)

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 α 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)

今岡 進 酸化ストレス・レドックス制御が関わる病態とその生化学的解析 (139回日本獣医学会学術集会)

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

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)

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

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ひとつである 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、PDI の脳での発現と大脳皮質形態形成、終脳における神経発生関連遺伝子発現の変動に着目して調べた。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。

A. 研究目的

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物質のひとつである BPA が競合的に結合するサイトを持つ。そこで、本研究では、低用量 BPA 曝露が発生期の脳神経系形成に及ぼす影響を、PDI の脳での発現変動と大脳皮質形態形成、終脳における神経発生関連遺伝子発現の変動に着目して調べた。

B. 研究方法

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 μ g/kg/day、20 μ 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、胎生 12.5 日、14.5 日、16.5 日、18.5 日に 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、4%パラホルムアルデヒドで浸漬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 1:500）、抗 BrdU 抗体(1:10000)、抗 Histone H3 抗体(1:100)、抗 Musashi 抗体(1:200)、抗 Nestin 抗体(1:500)、抗 TUJ1 抗体 (1:5000)、抗 MAP2 抗体 (1:1000) を用いた。以上を BPA 投与群、非投与群で比較した。

C. 研究結果

cDNA マイクロアレイ解析では、検索した 3 万種の遺伝子の約 2% に 2 倍以上の発現変動が見られ、神経発生、分化に関連する興味ある遺伝子：Numb、そのリガンドである Lnx ファミリーなどの発現変動が定量 PCR で確認された。免疫組織化学的には、PDI の発現は BPA 投与群において、胎生 12.5 日から胎生 16.5 日にかけて背側終脳壁の皮質板表層、サブプレート、中間層、海馬 CA 領域で増強し、皮質板では PDI 免疫染色性の radial pattern がより明瞭であった。終脳壁における BrdU 陽性細胞密度は、BPA 投与群において全層（脳室層、中間層、皮質板）で胎生 12.5 日から胎生 14.5 日で増加しており、神経前駆細胞の増殖、遊走の時期がより胎生早期に移行する傾向が見られた。さらに、中間層における TUJ1 陽性の投射線維の束形成がより明瞭であった。以上より、胎児への BPA 曝露は、分子レベル、組織レベル双方において正常の脳形成に影響を及ぼすことが示唆された。

D. 考察

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。形態学的には、発生期終脳壁での PDI 発現が増強、胎生 12.5 日から胎生 14.5 日での神経前駆細胞増殖、神経細胞の遊走が亢進するとともに、神経細胞への分化、投射線維の発達に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。

E. 結論

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同時に、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、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。

F. 健康危険情報

該当項目なし

G. 研究発表

1. 論文発表 (現在準備中)

2. 学会発表

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当項目なし

2. 実用新案登録

該当項目なし

3. その他

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医学研究科発達小児医学教授

研究要旨

妊娠中および新生仔期のビスフェノール A (BPA) が仔の脳、ことに記憶や認知の中枢である海馬の発達に及ぼす影響について検討した。妊娠 4 週間前から BPA 1mg/L を含む飲料水で飼育した母マウスから生まれた仔脳の花馬エストロゲン受容体 α (ER α) と synaptophysin の発現を免疫組織化学と Western blot 法で検索した。ER α の発現は出生直後から認められたが、その発現には BPA 暴露の影響は受けなかった。また、synaptophysin は生後 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。BPA 暴露群と対照群でこれらの発現にも差異はみられなかった。海馬錐体細胞樹状突起の spine でのシナプス形成を電子顕微鏡を用いて検討したが、両群に有意な差異は求められなかった。

大阪市の新生児マススクリーニング（新生児数：2400～2600 名/年）での一過性高 TSH 血症の頻度は 1996 年度から 2000 年度まで増加傾向にあったが、2001 年から 2003 年にかけてむしろ減少傾向を示していた。

A. 研究目的

ビスフェノール A (BPA) は環境ホルモンの一つである。発達期に脳が BPA 暴露を受けたラットは成長すると、自発運動量や探索行動量が増加することが報告されている。これらの結果から、発達期の BPA 暴露が注意欠陥多動障害や自閉症の原因になるのではないかと推測した報告もある。しかし、BPA 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。

ところで、BPA は ER や T3 結合蛋白である Protein disulfide isomerase

(PDI) を介して作用を及ぼすことが報告されている。本研究では妊娠中や新生仔期の BPA 暴露が仔の脳、ことに記憶や認知の中枢である海馬の発達に及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 を含む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。

- (1) 両群の生後0、4、8、14日目の海馬でのER α 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。
- (2) 両群の海馬錐体細胞のspineでのシナプス形成を電子顕微鏡で経時的に観察した。

大阪市の新生児一過性高 TSH 血症の頻度の推移を新生児マススクリーニングの結果から調査した。

C. 研究結果

(1) 対照群仔マウスでは ER α の発現は免疫組織化学的方法で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14日のER α の発現は生後10日のそれとほぼ同等であった。しかし、Western blot法ではER α の発現は日齢0日から認められ、日齢が進むに従って生後14日間で漸次増加していった。

対照群仔マウスの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14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。Western blot法でも生後4日から発現し始め、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 α とsynaptophysinの発現は免疫組織化学的方法のみならずWestern blot法でも、対照群とくらべて差異は認められな

かった。

(2) 電子顕微鏡的観察では対照群の錐体細胞樹状突起のspineとそのシナプス形成は日齢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。

(3) 新生児一過性高TSH血症の頻度1996～2003年間の大阪市の新生児マススクリーニング（新生児数：2400～2600名/年）での一過性高TSH血症の頻度の推移は、0,013%, 0,016%, 0,019%, 0,022%, 0,026%, 0,023%, 0,024%, 0,017%であった。大阪市では、一過性高TSH血症の頻度は1996年から2000年にかけて増加傾向にあったが、2001年から2003年にかけて、むしろ減少傾向を示していた。

D. 考察

海馬は記憶、認知、学習などの高次脳機能の中枢である。海馬の錐体細胞にはER α が出生直後から発現していることが本研究で判明した。また、BPAと結合するPDIも海馬神経細胞に存在することが報告されており、海馬は中枢神経系の中でもBPAの影響を被りやすい部位である。

エストロゲンが海馬に及ぼす影響の一つとして、錐体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。そこで、本研究では妊娠中と新生仔期のBPAの暴露が発達期の海馬錐体細胞のER α の発現とそのシナプス形成に及ぼす影響を検討した。

対照群の海馬での ER α の発現は出生直後に認められ、日齢 4 日以降、漸次強く発現していった。本研究では ER α の発現は妊娠中あるいは新生仔期の BPA の暴露によっても、影響を被らないことが判明した。

海馬のシナプス形成を検討するために、synaptophysin の発現と電子顕微鏡による検討をおこなった。synaptophysin は錐体細胞の樹状突起の spine に入力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。このような所見は電子顕微鏡的検索でも確認できたが、synaptophysin の発現や電子顕微鏡によるシナプス形成について、対照群と実験群に有意な差異は認められなかった。すなわち、BPA が海馬の ER α 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。

BPA 暴露によって発達期の神経細胞はその樹上突起の伸展やシナプス形成、あるいは神経細胞死について影響を被ると言っただいくつかの報告がある。また BPA 暴露を被った動物が多動を示すと言った報告もなされている。しかし、前者の多くの研究は培養神経細胞を用いた研究であり、後者の多くの研究は頭蓋内に直接 BPA を注入した研究である。経口的 BPA 摂取によって発達期中枢神経系の神経細胞を検討し、明確な結果が判明した報告はきわめて少ない。これらのことは、BPA

は直接神経細胞に作用すれば影響を被るが、経口摂取では BPA と神経細胞の間に代謝過程が存在し、BPA が脳の神経細胞に作用が及びにくいのではないかと推測される。BPA の代謝、胎仔や新生仔での BPA の脳への移行について検討する必要があると思われる。

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 PDI 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先の研究では異常は認められなかった。

また、大阪市の新生児マススクリーニングにおける一過性高 TSH 血症の頻度は 1996 年から 2000 年にかけて増加傾向にあったが、2001 年から 2003 年にかけて、むしろ減少傾向を示していた。このような推移が環境ホルモンによる新生児の甲状腺ホルモンのかく乱を示唆するものであるのかどうか今後検討を要すると思われる。

E. 結論

妊娠中および新生仔期に BPA 暴露をこうむった仔マウスの海馬錐体細胞のエストロゲン受容体 α (ER α) の発現は出生直後から認められ、海馬は BPA の影響をこうむる部位であることが判明した。しかし ER α の発現には BPA 暴露の影響は受けなかった。また、海馬のシナプス形成の指標として synaptophysin の発現を検討したが、

BPA 暴露群と対照群でこれらの発現に差異はみられず、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。また、大阪市の新生児一過性高TSH血症の頻度の推移は1996年から2000年にかけて増加傾向にあったが、2001年から2003年にかけてむしろ減少傾向を示していた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hattori H, Ohnishi S, Nakagawa Y, Ikemiya M, Yamato K, Matsuoka O, Yokoyama T, Yamano T. An infant with idiopathic orbital myositis poorly responsive to steroid therapy: a case report. *Brain Dev.* 2005;27:160-2.

Okano Y, Hase Y, Kawajiri M, Nishi Y, Inui K, Sakai N, Tanaka Y, Takatori K, Kajiwara M, Yamano T. In vivo studies of phenylalanine hydroxylase by phenylalanine breath test: diagnosis of tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Pediatr Res.* 2004;56(5):714-9.

Tamamori A, Fujimoto A, Okano Y, Kobayashi K, Saheki T, Tagami Y,

Takei H, Shigematsu Y, Hata I, Ozaki H, Tokuhara D, Nishimura Y, Yorifuji T, Igarashi N, Ohura T, Shimizu T, Inui K, Sakai N, Abukawa D, Miyakawa T, Matsumori M, Ban K, Kaneko H, Yamano T. Effects of citrin deficiency in the perinatal period: feasibility of newborn mass screening for citrin deficiency. *Pediatr Res.* 2004;56(4):608-14

Saito M, Ichiba H, Yokoi T, Hirai C, Yamano T, Kusuda S. Mitogenic activity of tracheal effluents from premature infants with chronic lung disease. *Pediatr Res.* 2004;55:960-5.

Yamamoto H, Yamano T, Niijima S, Kohyama J, Yamanouchi H. Spontaneous improvement of intractable epileptic seizures following acute viral infections. *Brain Dev* 26:377-379, 2004

H, Ayata M, Shingai M, Matsunaga I, Seto Y, Katayama Y, Iritani N, Seya T, Yanagi Y, Matsuoka O, Yamano T, Ogura H. Infection of different cell lines of neural origin with subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) virus. *Microbiol. Immunol.*, 48(4), 277-287, 2004.

2. 学会発表

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 α 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）

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許出願

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

厚生科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題：胎児・幼児期曝露による中枢神経系腫瘍発生影響

分担研究者 福島昭治 大阪市立大学大学院医学研究科都市環境病理学

研究要旨

妊娠期間及び授乳期間中に Bisphenol A (BPA)、さらに妊娠 18 日目に N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)を母動物に投与した。F₁ 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。

A. 研究目的

内分泌かく乱作用が指摘されている化学物質(内分泌かく乱化学物質)のヒトへの影響、特に中枢神経系に及ぼす影響が最近注目されている。内分泌かく乱化学物質はエストロゲン作用あるいは抗アンドロゲン作用を有し、乳腺や生殖器系腫瘍発生との因果関係が指摘されている。しかし、中枢神経系腫瘍発生との関連は疫学的にも実験的にも全く不明である。さらに、一般に化学物質の胎児期および新生時期曝露による影響は成人曝露と比較して、明らかに異なり、内分泌かく乱化学物質の場合にはその影響が特に顕著であることが推測されている。そこで本研究では内分泌かく乱化学物質の妊娠および授乳曝露による次世代における中枢神経系腫瘍発生への影響を実験動物を用いて検討した。

また、内分泌かく乱化学物質の実験動物を用いた生体影響へのデータの多くは、高用量域での研究が主体である。そこで、本研究ではヒトが曝露されるレベルでの低用量を考慮して研究を進めた。

B. 研究方法

10 週齢の F344 ラット、雌 30 匹、雄 20 匹を用いた。11 週齢の時点で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(F₁)の離乳までの間、コーンオイルに溶解した Bisphenol A(BPA)を 0, 0.05, および 120 mg/kg 体重/日の用量で毎日、強制経口投与した。投与量は 5 ml/kg 体重である。また、発がん物質である N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)を妊娠の 18 日目に 10 mg/kg 体重の割合で 1 回、静注した。分娩 21 日後に F₁ 動物を離乳した。その後 F₁ 雄ラットを無処置で飼育し、離乳後 37 週(生後 40 週)まで飼育・観察した。交配から屠殺までの飼育・観察期間は 43 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した。また、離乳後 10 週(生後 13 週)の時点で一部のラットを屠殺し、脳ドパミンの測定を行った。本年度は病理組織学的検査を中心に検索を実施した。

なお、飼育動物にあたっては動物飼育倫理規定に従って飼育・観察し、エーテル麻酔下にて屠殺した。

C. 研究結果

<F₁40 週齢時の病理学的検査結果>

1. 肉眼的病理検査

脳で spot、discolored area、enlargement、softening が、脊髄で enlargement、nodule が見られたものの群間に有意な差は認められなかった。

2. 病理組織学的検査

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。

D. 考察

40 週齢時における肉眼的所見において脳で Spotting、Discolored Area、Enlargement、Softening が、脊髄で Enlargement、Nodule が認められたものの群間に有意な差を認めず、病理組織学的検査においても脳で Astrocytoma、Mixed glioma、Oligodendroglioma、および Meningioma が認められ、脊髄では Schwannoma が認められたが群間に有意な差は認められなかった。

E. 結論

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。F₁ 雄ラットの中枢神経

系に病理組織学的に種々の腫瘍発生が認められたが、BPA の中枢神経系腫瘍の発生に及ぼす影響はないと結論する。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Wanibuchi H, Fukushima S. et al.;
Understanding arsenic
carcinogenicity by the use of animal
models. Toxicology and Applied
Pharmacology, 198, 366-376 (2004)

Kuroda K, Fukushima S. et al.;
Microbial metabolite of
dimethylarsinic acid is highly toxic
and genotoxic. Toxicology and
Applied Pharmacology, 198,
345-353 (2004)

Mitsubishi 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)

2. 学会発表

沈 鈞、福島昭治等：
Trimethylarsine Oxide のラットにお
ける発癌性の検討. 2003 年 1 月，東
京 第 19 回日本毒性病理学会(第
18 回日本毒性病理学会講演要旨
集 P-24, p.62)