

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、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。

(3) 両群の海馬錐体細胞の樹状突起のspine上のシナプス形成を電子顕微鏡で経時的に観察した(4) 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

ラット海馬のER α の発現:

ER α の発現は免疫組織化学的には生後3日頃から海馬CA1, CA3の錐体細胞核に認められ、漸次ER α 陽性錐体細胞が増加し、10日頃に最高となり、以後変化しなかった。Western blot法では出生直後から発現が認められ、生後4日頃から成熟ラットと同程度の発現を呈していた。

BPA暴露仔マウスに関する結果

(1)生後5、8、13日目の対照群の脳重は191 \pm 11mg, 300 \pm 42mg, 391 \pm 57mg, であるのに対し実験群の脳重は177 \pm 24mg, 237 \pm 67mg, 351 \pm 48mgと有意に低値を示した(いずれもp<0.001)。生後5日と13日目の大脳の細胞密度(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 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の発現は対照群のそれと差異は認められなかった。

(3)電子顕微鏡的観察では正常群の錐体細胞樹状突起のspineでのシナプス形成は日齢8日ころから観察され、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。

(4)対照群8例、実験群6例の血中TSH値はそれぞれ2.02~3.53ng/mlおよび2.94~3.50ng/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。実験群で対照群に比べ、大脳の細胞密度が高値であった。このような結果はBPAが神経細胞の成熟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樞である。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、本研究では妊娠中あるいは新生仔期も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いたい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の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は直接神経細胞に反応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。

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大脳の細胞密度は対照群にくらべ、高くなっていたことから、BPAは神経細胞の成熟が抑制される可能性が示唆された。また、

これらの仔脳の高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、高馬は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、高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が高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。BPAに曝露された仔のTSH値は正常であった。

3. BPA の胎児・幼児期曝露による中枢神経系腫瘍発生への影響

研究要旨

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。11 週齢の母動物の妊娠 0 日から出生児の離乳まで 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。また、N-ethyl-N-nitrosourea, 10 mg/kg 体重を妊娠 18 日目に 1 回、静注した。母動物における各群の出生児数に差はなく、出生児体重ならびに体重の推移にも変動は認められなかった。13 週齢時の脳ドーパミン濃度、40 週齢時の脳重量、肉眼的所見および中枢神経系腫瘍の病理組織学的所見において群間に差は認められなかった。したがって BPA の経胎盤および授乳曝露による中枢神経系腫瘍発生への影響はないと結論する。

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 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、脳ドーパミンの測定を行った。

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

<母動物>

1. 臨床症状

すべての動物に特記すべき臨床症状を認めなかった。

2. 妊娠期間

群間による有意な差は認められなかった。

3. 体重の推移

群間による有意な差は認められなかった。

4. 摂餌量

群間による有意な差は認められなかった。

<F₁動物>

1. 平均 F₁動物数

分娩時の平均 F₁動物数は対照群、7.9 匹に対して、BPA の 0.05 mg/kg 投与群、8.8 匹、200 mg/kg 投与群、8.0 匹と群間に有意差を認めなかった。

2. 体重

体重の推移は群間による変動は認めなかった。

3. 摂餌量

摂餌量は群間による差は認めなかった。

<F₁離乳後 10 週>

1. 肉眼的病理検査

肉眼的所見は何も認められなかった。

2. 最終体重および器官重量

最終体重および肝臓、腎臓および脳の絶対、相対重量に有意な差は認められなかった。

3. 脳ドーパミン量

脳ドーパミン量は群間による差を認めなかった。

4. 病理学的検査

病理学的所見に特記すべき所見は何も認められなかった。

<F₁離乳後 37 週>

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. 最終体重および器官重量

最終体重および肝臓、腎臓および脳の絶対、相対重量に有意な差は認められなかった。

3. 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。

末梢神経では Schwannoma が対照群で 4 例、BPA 0.05 mg/kg 投与群で 1 例、BPA 120 mg/kg 投与群で 5 例に認められた。

D. 考察

分娩状況において、分娩時の平均出生児数は対照群と BPA 投与群との間に有意差を認めず、妊娠期間にも有意差を認めなかった。雄児動物の飼育期間中における体重増加および摂餌量に差を認めなかった。13 週齢での脳ドーパミン濃度測定においては差を認めなかった。40 週齢時における肉眼的所見において脳で Spot、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

BPA は経胎盤的、また授乳を介して F₁ 動物に移行することが知られている。そこで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。妊娠、出産および F₁ 動物の成長に影響は見られず、最終屠殺時の脳の重量および病理組織学的に中枢神経系腫瘍発生において群間に差が見られなかった。この結果より BPA の経胎盤および授乳曝露による中枢神経系腫瘍の発生に及ぼす影響はないと結論する。

ヒトでのリスク予測と回避法

ヒトへの影響

EDCsによる被害は、人類にとって世代を超えて大きな問題を投げかけている。あくまでもEDCsの中樞神経系への影響をもたらす対象はヒトである。したがって、EDCsの作用の評価法としてはヒトでも起こり得る方法の開発が望まれる。我々は、ラットPDIに関する評価法を開発してきたが、ヒトリコンビナントPDIを用いて、ラットPDIでの結果を比較しヒトでの可能性を検討した。

ヒトPDIを用いた時の甲状腺ホルモン結合への競合的阻害実験の結果を以下の表1に示した。ヒトPDIを用いた競合的結合阻害においても、その解離定数(Ki値)はラットと比べて大きな差は見られなかった。

Test chemical	Ki (μ M)	
	Rat	Human
T3	0.79	3.82
Tributyltin	N.D.	N.D.
<i>p</i> -Octylphenol	2.90	9.10
<i>p</i> -Nonylphenol	5.68	81.20
Dibutyl phthalate	N.D.	N.D.
Octachlorostylene	N.D.	N.D.
Dicyclohexyl phthalate	N.D.	N.D.
Pentachlorophenol	22.10	10.46
BPA	22.05	70.29
2,4-Dichlorophenol	37.36	168.70
Tetrabromobisphenol A	1.16	3.35
Tetrachlorobisphenol A	1.89	3.41

表1:リコンビナント His-tag 融合 PDI に対する各種化合物による T₃ の結合阻害 (Ki 値)

ラットとヒトでの PDI の相同性は、93.3 %と高い。しかしながら、PDI の T₃ 結合ドメインは同定されておらず、T₃ の結合親和性の差などは不明である。今回ヒトリコンビナント PDI を用いた検討では、ラットリコンビナント PDI とほ

ば同じ親和性 (Kd 値;ラット: 1.8 μ M, ヒト : 3.3 μ M) を示し、またリガンド選択性の差もみられなかった。そのため、PDI の甲状腺ホルモン結合に及ぼす化学物質の影響を検討するに当たっては、ラットでの結果をヒトに外挿する事は可能であると考えられた。

動物実験にて BPA などの EDC s によって、甲状腺ホルモンがかく乱される可能性が示唆されたが、果たしてこのようなことがヒトではどうなるかを検討するために、我々は、新生児について次の検討を行った。

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。

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, 0.013%, 0.016%, 0.019%, 0.022%, 0.026%, 0.023%, 0.024%, 0.017%であった。

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 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 EDC s 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。

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。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
船江良彦	ビスフェノールAによる 甲状腺ホルモン攪乱	井口泰泉、井上達編	高次生命系と 内分泌攪乱 化学物質	シュプリンガー フェアラク社	東京	2005年	119-124

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Suzuki T., Mizuno K., Nakazawa H., Funae Y., Fushiki S., Fukushima S., Shirai T., Narita M.	Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state.	Neuroscience	117	639-644	2003
Yoneda T., Hiroi T., Osada M., Asada A., Funae Y.,	Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol-A in PC12 cells	J.Neurochem.	87	1499-1508	2003
Uchida H., Mizuno K., Yoshida A., Ueda H.	Neurosteroid-induced hyperalgesia through a histamine release is inhibited by progesterone and p,p'-DDE, an endocrine disrupting chemical.	Neurochem Int.	42	401-407	2003
Kubo T., Maezawa N., Osada M., Katsumura S., Funae Y., 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.	318	1006-1011	2004
Osada M., Imaoka S., Funae Y.	Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis in endothelial cells via degradation of HIF-1 alpha protein	FEBS LETT.	575	59-63	2004
Funae Y., Okada K., Hiroi T.	Effect of bisphenol A on central nervous systems	Toxicol.Appl. Pharmacol.	197	229	2004
Mitsuhashi M., Morimura K., Wanibuchi H., Hayashi S., Kiyota A., Wada S., Nakatani T., Fukushima S.	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
Mizota K., Yoshida A., Uchida H., Fujita R., Ueda H.	Novel type of Gp/11 protein-coupled neurosteroid receptor sensitive to endocrine disrupting chemicals in mast cell line (RBL-2H3).	Br.J.Pharmacol.	In press		2005

2. ビスフェノールAによる甲状腺ホルモン攪乱

松江良彦

2. 1. はじめに

内分泌攪乱化学物質による生殖系への影響に関しては、多くの報告があり、性ステロイドホルモン受容体に作用し、性ステロイド様作用を示すことによって生体へ重大な影響をもたらすと考えられている。一方、ミシガン湖のポリ塩化ビフェニル(PCB)で汚染された魚をたくさん食べた母親や、PCBで汚染された食用油を食べた母親から生まれてきた子供では知能指数の低下、記憶、読解力の低下など脳発達への重大な影響を与えることが報告されている^[1]。新生児では低甲状腺ホルモン症により脳の各領域の神経細胞の増殖、遊走、神経突起やシナプスの発達およびミエリンの形成に影響を与えることが報告されているので、脳発達への影響に関しては、甲状腺ホルモンの関与が考えられる。しかし、甲状腺ホルモンを攪乱する環境化学物質やそのスクリーニング法などに関してはいまだよくわかっていない。これらの問題を解決するためにも、内分泌攪乱化学物質が甲状腺ホルモン作用を攪乱する機構を明らかにする必要がある。

胎児期および乳児期にビスフェノールA(BPA)に曝露されたマウスでは、行動異常がみられたり、脳内ドパミン量が低下していることをわれわれは報告してきた^[2]。したがって、BPAが脳の神経細胞に作用すると考えられるので、結合実験によってBPA結合タンパク質がラットの脳P2画分に存在することを確認し、そのタンパク質を精製した。そのBPA結合タンパク質はタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)として知られているもので、甲状腺ホルモンのリザーバーの機能を有することからBPAが甲状腺ホルモン作用を攪乱する機構が考えられた。その新たな甲状腺ホルモン攪乱機構について述べる。

2. 2. BPA 結合タンパク質の検索

ダイオキシンやメチルコラントレンのような多環芳香族炭化水素は強力な発がん性を有することはよく知られている。これらの化合物は細胞内に入り、まずAhRとよばれる多環芳香族炭化水素受容体に結合し、続いて核内に入り、発現調節エレメントのXREに結合し、CYP1A1その他のタンパク質を発現する。われわれはBPAにもAhRのような結合タンパク質が脳内に存在すると考え、結合実験でその存在を検索した。BPA結合タンパク質に対する特異的結合を確認するために、放射性標識リガンドとして³H-BPAを用いて、ラット脳画分とインキュベーションし、B/F分離は遠心分離で行い、放射活性を測定した。ラット脳P2画分に高い特異的結合活性がみられ、BPA結合タンパク質の存在が示唆された。その結果を図2・11に示した。スキッチャード解析より得られた K_d 値は23.7 μ Mと比較的高い値であった。内分泌攪乱化学物質として知られる化合物で、脳発達に影響を与える物質としてPCBなどの報告がみられる。脳発達に影響を与える物質を予測するためにも、また、

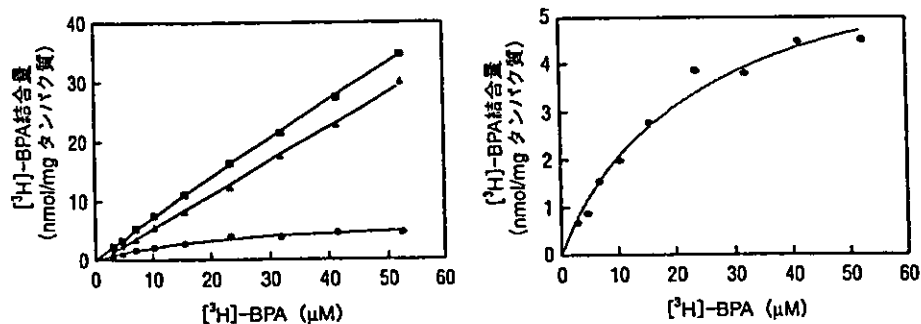


図2-1 ラット脳P2画分に対する $[^3\text{H}]$ -BPAの特異的結合。■：全結合，▲：非特異的結合，●：特異的結合。【組み込み図，見えにくいので右に移動しました。説明をお願いします】

その機構を解明するためにも，BPAをはじめそれら化合物に特異的に結合するタンパク質を同定することが重要である。ラット脳P2画分にBPA特異的結合タンパク質の存在が明らかになったので，BPA結合タンパク質の精製を試みた。BPAの特異的結合タンパク質を精製するには，BPAをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーが最適である。BPAの中央の炭素およびフェノール性OHから6個のメチレン鎖をスペーサーとして導入し，その末端は -NH_2 あるいは -COOH とし，セファロース4Bゲルに結合させアフィニティークロマトグラフィーを作製した。中央のメチルがついた炭素からスペーサーをのびたゲルが効率よく働いてくれた。ラット脳P2画分を出発材料として，ワットマン社DE-52を用いたイオン交換クロマトグラフィーを行った後，BPAをリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーを行い，BPAで溶出されてくる画分を採取した。SDS-PAGEで単一バンドを示し，分子量は53,000であった。得られたN末端アミノ酸配列はDALEEEDNVLVLKKS NF AEALAAHNYLLVEFYAであった。この配列からBPA結合タンパク質は，ラットのPDIと同定された。

2. 3. PDIの機能

PDI (EC5.3.4.1)は，Anfinsenらのグループによって，還元リボヌクレアーゼの再活性化を触媒するタンパク質として初めて見出された^[61]。その後，PDIはジスルフィド結合の形成，還元，再構成を行うことが明らかになり，タンパク質の正しいフォールディングのために必須のタンパク質であることが示された^[62]。PDIは，イソメラーゼ活性を有するだけでなく，シャペロン活性，甲状腺ホルモン脱ヨウ素酵素，甲状腺ホルモン結合タンパク質^[63]，カルシウム結合タンパク質など，さまざまな機能をもっており“多機能タンパク質”として知られている。

甲状腺ホルモンの細胞内への取り込みは，以前は，受動性の拡散によるものと考えられていた。しかしながら，甲状腺ホルモン結合部位は細胞膜，ミトコンドリア，細胞質，核エンベロープにおいても見出されており，甲状腺ホルモンの取り込みの一部はタンパク質を介した能動輸送であると考えられ，甲状腺ホルモン結合タンパク質の存在が示唆されてきた。山内らは，種々の標的細胞の

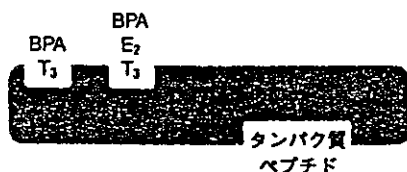


図2・2 PDIの構造。Primm and Gilbert⁽¹⁰⁾の論文を改変した。E₂:エストラジオール, T₃:3,3',5'-トリイオドサイロニン, BPA:ビスフェノールA。

膜面分に3,3',5'-トリイオドサイロニン(T₃)に特異性の高い分子量55,000のタンパク質の存在を見出し、そのタンパク質のcDNAのクローニングを行った。その結果、そのタンパク質はPDIと同一であることを明らかにしてきた⁽¹¹⁾。

PDIには、複数のホルモン結合部位が存在することが明らかにされている⁽¹⁰⁾。その概要を図2・2に示した。異なった2種類のホルモン結合部位と、タンパク質やペプチドが結合する部位の3つの結合部位が存在する。T₃は2つの異なる両ホルモン結合部位に結合するが、エストラジオール(E₂)は片方の部位のみに結合する。PDIに対するこれらのホルモンの結合は、PDIのイソメラーゼ活性を制御している。また細胞内の90%以上のT₃はPDIに結合して存在していると考えられている。われわれの結合実験の結果から、図2・2に示したように、BPAは2つの異なるT₃結合部位に結合することが明らかになった。この結果は、BPAのこれらの結合部位に対する親和性はT₃に比べて低いが、BPAが μ M以上になればPDIに結合しているT₃がBPAで置換され、T₃が細胞内へ追い出されると考えられる。すなわち、BPAによって、細胞内T₃レベルが攪乱されることになる。

2. 4. 甲状腺ホルモン攪乱化学物質

PDIに対するBPAおよびその他環境化学物質の結合性について調べるため、ラットPDI遺伝子(*rPDI*)をクローニングし、ヒスチジン融合PDIを大腸菌内で発現し、精製した。このヒスチジン融合PDIに対するT₃の結合が、BPAその他内分泌攪乱性が報告されている環境化学物質によって阻害されるかを競合的結合試験により検討し、IC₅₀値を算出した。B/F分離はポリエチレングリコールを加え遠心分離を行った。競合的結合試験の結果を図2・3に、IC₅₀値は表2・1にまとめた。BPAはT₃のPDIに対する結合を阻害することが明らかになり、その強さはT₃に比べ1/10~1/100程度であった。BPAのエストロゲン受容体に対する親和性はE₂の1/2000ぐらいとの報告がなされているが、それと比べると、BPAのT₃に対する影響はより強く現れると考えられる。BPA以外の環境化学物質では、*p*-ノニルフェノール、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、T₃のPDIへの結合を阻害することが明らかになった。阻害活性の差こそあるものの、T₃のPDIへの結合阻害活性を有する化合物は、いずれもフェノール基を有しており、構造活性相関が認められた。

PCBが甲状腺ホルモン作用へ影響を及ぼすことは以前より知られていたが、最近になってPCBが甲状腺ホルモン受容体(TR)による転写活性を抑制するといった分子レベルでのメカニズムが明らかにされた⁽¹²⁾。また、BPAもTRに結合し、TR依存性の転写活性を阻害する⁽¹³⁾。また、テトラプロモBPAやテトラクロロBPAもTRに結合し、GH3細胞においてT₃応答性の細胞増殖や成長ホルモンの

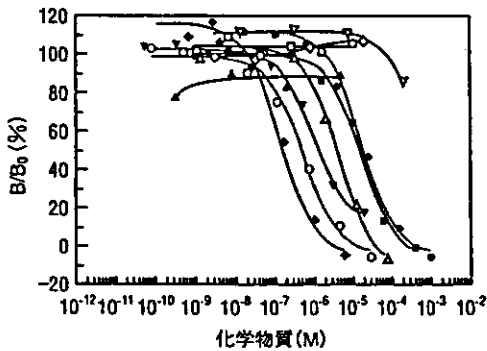


図2-3 3,3',5'-トリヨードサイロニン競合結合阻害試験。
 B/B_0 : [^{125}I]-3,3',5'-トリヨードサイロニンの結合率。被換物質を加えないときの [^{125}I]-3,3',5'-トリヨードサイロニンの結合量を100%とした。○: 3,3',5'-トリヨードサイロニン, ●: ビスフェノールA (BPA), △: *p*-ノニルフェノール, ▲: アミトロール, □: トリプチルスズ, ■: ペンタクロロフェノール, ▽: ベンゾフェノン, ▼: テトラプロモBPA, ◇: フタル酸ジエチルヘキシル, ◆: テトラクロロBPA。

表2-1 PDIに対する化学物質の3,3',5'-トリヨードサイロニン結合阻害

化学物質	IC ₅₀
3,3',5'-トリヨードサイロニン	0.53 μM
ビスフェノールA	17.8 μM
<i>p</i> -ノニルフェノール	4.68 μM
アミトロール	阻害なし
トリプチルスズ	阻害なし
ペンタクロロフェノール	17.4 μM
ベンゾフェノン	阻害なし
テトラプロモBPA	0.96 μM
フタル酸ジエチルヘキシル	阻害なし
テトラクロロBPA	0.15 μM

産生を誘導するとの報告がある^[13]。このように、BPA,あるいはBPAのハロゲン化体は、TRを介したgenomicな作用を有することが報告されている。これまで内分泌攪乱化学物質の作用機構は、それらの化学物質が性ステロイドホルモン受容体などの核内受容体に結合することによって、本来の受容体の活性が攪乱されるgenomicなモデルが提唱されてきた。しかしながら、甲状腺ホルモンの作用機序はけっしてTRを介したものだけでなく、細胞膜や細胞質の甲状腺ホルモン結合タンパク質に作用するnongenomicな作用も報告されている^[14]。今回明らかにしたPDIは甲状腺ホルモン結合タンパク質であり、BPAをはじめとする各種環境化学物質がPDIに対するT₃の結合を阻害することによって起こるnongenomicな作用であると考えられる。BPAやテトラプロモBPA,テトラクロロBPAなどは、PDIに結合し、かつTRにも結合する。これらの化学物質は、genomicにもnongenomicにも作用すると考えられる。しかし、*p*-ノニルフェノールやペンタクロロフェノールはTRに対するT₃の結合阻害活性がみられたとの報告はないので、これらの化学物質はPDIを介したnongenomicな作用のみを有すると思われる。

2. 5. ヒトへの影響

ヒトへの影響を考えると、胎児期および授乳期にBPAの曝露を受けると、BPAは血液脳関門から自由に脳内へ取り込まれる。正常な女性の臍帯血や母乳中のBPA濃度にばらつきはあるが、数10 nMという報告がある。甲状腺ホルモンのPDIへの結合定数 K_d 値は数 μ Mであった。缶詰のシーリングや歯科用シーラントに高濃度のBPAが含まれているという報告がみられるので、もし妊娠時に高濃度のBPAを摂取すると、一時的に胎児の脳内BPA濃度が上昇し、PDIに結合している甲状腺ホルモンレベルに影響を与え脳発達に重篤な影響を与えてしまう可能性が考えられる。しかし、胎児期および授乳期を過ぎれば、BPAによる甲状腺ホルモン攪乱による脳発達への影響は少なくなってくると考えられる。

2. 6. おわりに

内分泌攪乱化学物質が甲状腺ホルモン作用を攪乱することによって脳発達へ影響を与えることは明らかである。内分泌攪乱化学物質のターゲットの1つとしてPDIが考えられる。PDIが細胞内で甲状腺ホルモンを蓄えるリザーバーとしての役割を果たしていると考えられているが、内分泌攪乱化学物質がPDIに結合した後、実際どのように甲状腺ホルモンが攪乱されるのかは今後の研究を待たなければならない。また、PDIに対する影響は現在まだBPAなどの一部の環境化学物質についてしか検討されていないが、もっと多くの化学物質について検討されなければならない。内分泌攪乱化学物質の脳発達への影響を検討する場合は、このPDIの関与を考慮する必要があると考えられる。

参考文献

1. Jacobson JL, Jacobson SW (1996) Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N. Engl. J. Med.* 335:783-789
2. Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Koong SL, Shih LY, Taylor JS, Wu YC, Yang D, Ragan NB, Hsu CC (1998) Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 241:334-336
3. Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, Funae Y, Fushiki S, Fukushima S, Shirai T, Narita M (2003) Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* 117:639-644
4. Yoneda T, Hiroi T, Osada M, Asada A, Funae Y (2003) Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol-A in PC12 cells. *J. Neurochem.* 87:1499-1508
5. Goldberger RF, Epstein CJ, Anfinsen CB (1963) Acceleration of reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by a microsomal system from rat liver. *J. Biol. Chem.* 238:628-635
6. Noiva R, Lennarz WJ (1992) Protein disulfide isomerase. A multifunctional protein resident in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 267:3553-3556
7. Gilbert HF (1997) Protein disulfide isomerase and assisted protein folding. *J. Biol. Chem.* 272:29399-29402
8. Yamauchi K, Yamamoto T, Hayashi H, Koya S, Takikawa H, Toyoshima K, Horiuchi R (1987) Sequence of membrane-associated thyroid hormone binding protein from bovine liver: its identity with protein disulfide isomerase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 146:1485-1492

9. Cheng SY, Gong QH, Parkison C, Robinson EA, Appella E, Merlino GT, Pastan I (1987) The nucleotide sequence of a human cellular thyroid hormone binding protein present in endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 262:11221-11227
10. Primm TP, Gilbert HF (2001) Hormone binding by protein disulfide isomerase, a high capacity hormone reservoir of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 276:281-286
11. Iwasaki T, Miyazaki W, Takeshita A, Kuroda Y, Koibuchi N (2002) Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299:384-388
12. Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K (2002) Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:5185-5190
13. Kitamura S, Jinno N, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N. (2002) Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:554-559
14. Giguere A, Fortier S, Beaudry C, Gallo-Payet N, Bellabarba D. (1996) Effect of thyroid hormones on G proteins in synaptosomes of chick embryo. *Endocrinology* 137:2558-2564

PRENATAL AND NEONATAL EXPOSURE TO BISPHENOL-A ENHANCES THE CENTRAL DOPAMINE D1 RECEPTOR-MEDIATED ACTION IN MICE: ENHANCEMENT OF THE METHAMPHETAMINE-INDUCED ABUSE STATE

T. SUZUKI,^{a,*} K. MIZUO,^a H. NAKAZAWA,^b Y. FUNAE,^c S. FUSHIKI,^d S. FUKUSHIMA,^e T. SHIRAI^f AND M. NARITA^g

^aDepartment of Toxicology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

^bDepartment of Analytical Chemistry, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan

^cDepartment of Chemical Biology, Osaka city University Medical School, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

^dDepartment of Pathology and Applied Neurobiology, Research Institute for Neurological Disease and Geriatrics, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji, Kamikyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

^eDepartment of Pathology, Osaka city University Medical School, 1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan

^f1st Department of Pathology, Nagoya city University Medical School, one Kawasumi, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan

Abstract—Bisphenol-A (BPA), one of the most common environmental endocrine disruptors, has been extensively evaluated for toxicity in a variety of tests in rodents, including developmental and reproductive toxicity, and carcinogenicity. However, little is known about its action on the CNS. In this report, we show that prenatal and neonatal exposure to BPA in mice leads to the enhancement of the dopamine D1 receptor-dependent rewarding effect induced by a psychostimulant methamphetamine. Furthermore, this treatment with BPA markedly enhanced hyperlocomotion and its sensitization induced by methamphetamine, which reflects extensive abuse associated with sociological and psychiatric problems. We also demonstrated that chronic exposure to BPA produced an up-regulation of dopamine D1 receptor function to activate G-protein in the mouse limbic forebrain, which is thought to be a critical site for the expression of rewarding effects by abuse drugs. Additionally, chronic BPA exposure produced a significant increase in levels of the dopamine D1 receptor mRNA in the whole brain. In contrast, no change in protein levels of methamphetamine-targeted proteins, dopamine transporter or the type 2 vesicle monoamine transporter in the brain was observed by prenatal and neonatal exposure to BPA. The present data provide the first evidence that prenatal and neonatal exposure to BPA can potentiate the central dopamine D1 receptor-dependent neurotransmission, resulting in supersensitivity of methamphetamine-induced pharmacological actions related to psychological dependence on psychostimulants. © 2003 IBRO. Pub-

*Corresponding author. Tel./fax: +81-3-5498-5831.

E-mail address: suzuki@hoshi.ac.jp (T. Suzuki).

Abbreviations: BPA, bisphenol-A; DAT, dopamine transporter; EGTA, ethylene glycol-bis (2-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid; GDP, guanosine-5'-diphosphate; GTP γ S, guanosine-5'-[γ -thio]-triphosphate; TBS, Tris-buffered saline; VMAT2, vesicle monoamine transporter type 2.

0306-4522/03/\$30.00+0.00 © 2003 IBRO. Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
doi:10.1016/S0306-4522(02)00935-1

lished by Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Key words: psychostimulant, rewarding effect, hyperlocomotion, G-protein activation, up-regulation.

Recently, the general public has received alarming reports regarding the reproductive and health hazards of endocrine-disrupting chemicals in the environment. Bisphenol-A (BPA), which was initially synthesized as a chemical estrogen, is now used as the monomer for the production of polycarbonate plastics. It may reach from the polycarbonate plastics due to the incomplete polymerization and to breakdown of the polymer upon heating, as during sterilization by autoclaving (Krishnan et al., 1993). It has been reported that administration of BPA to pregnant female mice on gestation days at a dose that is within the range typical of the environmental exposure of humans produces significant changes in the postnatal growth rate and brings on early puberty in these mice (Howdeshell et al., 1999). These results imply that BPA may cause the unpleasant toxicity in the developmental process. By contrast, little is known about the neuronal toxicity induced by BPA in the CNS.

Methamphetamine and related psychomotor stimulants produce a broad spectrum of behavioral effects. The psychomotor activating and rewarding/euphorogenic effects of these agents have been identified in all mammals and have led to extensive abuse with sociological and psychiatric problems. A growing body of evidence suggests that psychostimulants produce rewarding effects and hyperlocomotion through an increase in dopamine release at the terminal of dopaminergic neurons (Seiden et al., 1993; Kuczenski et al., 1995). In terms of dopamine receptor involvement at the terminal site of the mesolimbic dopamine system, dopamine D1 receptor is considered to play a substantial role in the rewarding effect of abused drugs (Suzuki et al., 1993; Shippenberg et al., 1993; Narita et al., 2001). The aim of the present study was to investigate whether prenatal and neonatal exposure to BPA in mice could affect the rewarding effect and hyperlocomotion induced by methamphetamine and change the dopamine D1 receptor function in the mouse limbic forebrain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

The present study was conducted in accordance with the Guiding Principles for the Care and Use of Laboratory Animals, Hoshi

University, as adopted by the Committee on Animal Research of Hoshi University, which is accredited by the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering. All experiments were performed using male ddY mice that had been prenatally and neonatally exposed to BPA. Adult female mice were chronically treated with BPA-admixed powder food containing 0 (B0), 0.002 (B0.002), 0.5 (B0.5) and 2 mg (B2) BPA/g of food from mating to weaning. Their pups were prenatally and neonatally exposed to the respective concentration of BPA from their mothers. During the treatment with BPA, animals did not show weight loss and disrupted maternal behaviors.

Conditioned place preference procedure

In the place conditioning procedure, test apparatus consisted of a shuttle box (15×30×15 cm: w×l×h) which was divided into two differently colored compartments (black and white) of equal size. One compartment is white with a textured floor, and the other is black with a smooth floor. In the process of pre-conditioning sessions, we selected the animals that failed to exhibit a significant preference for either white or black compartment. In a pre-test, mice spent 455.7 ± 23.8 s (mean \pm S.E.M.) in the white compartment and 448.2 ± 32.4 s in the black compartment. Groups of mice were divided randomly into each separated group of 7–10 mice. Using these animals, conditioning sessions (three for drug; three for saline) were conducted once daily for 6 days. Immediately after the injection of drug, these animals were placed in the white or black compartment for 50 min. On alternate days, these animals received saline and were placed in the other compartment for 50 min. On day 7, tests of conditioning were performed as follows: the partition separating the two compartments was raised to 7 cm above the floor, a neutral platform was inserted along the seam separating the compartment, and mice that had not been treated with either drugs or saline were then placed on the platform. The time spent in each compartment during a 900-s session was then recorded (Suzuki et al., 1990)

Locomotor activity

The locomotor activity of mice was measured by an ambulator as described previously (Narita et al., 1993). Briefly, a mouse was placed in a tilting-type round activity cage 20 cm in diameter and 19 cm high. Any slight tilt of the activity cage, which was caused by horizontal movement of the mouse, was detected by three microswitches. Total activity counts were automatically recorded for 3 h following the injection of saline (10 ml/kg, s.c.) or methamphetamine (2 mg/kg, s.c.). Total activity was counted for 3 h every time after the treatment.

[³⁵S]GTPS binding assay

Mice were killed by decapitation and the limbic forebrain was then dissected as described previously (Narita et al., 1992). The limbic forebrain was rapidly excised at 4 °C, and the tissue was homogenized using a Potter-Elvehjem tissue grinder with a Teflon pestle in 20 volumes (w/v) of ice-cold Tris-Mg²⁺ buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), MgCl₂ and 1 mM EGTA for the [³⁵S]GTPS binding assay. The homogenate was centrifuged at 4 °C for 10 min at 48,000×g. The pellet was resuspended in ice-cold Tris buffer of [³⁵S]GTPS binding assay buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA and 100 mM NaCl, and centrifuged at 4 °C for 10 min at 48,000×g. The resultant pellet was resuspended in ice-cold Tris buffer or [³⁵S]GTPS binding assay buffer and stored at –70 °C until used.

The membrane homogenate (3–8 µg protein/assay) was incubated at 25 °C for 2 h in 1 ml of assay buffer with 10 µM dopamine, 30 µM guanosine-5'-diphosphate (GDP) and 50 pM

[³⁵S]GTPS (specific activity, 1000 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL, USA). The reaction was terminated by filtration using a Brandle cell harvester and Whatman GF/B glass filters pre-soaked in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 5 mM MgCl₂ at 4 °C for 2 h. Filters were then washed three times with 5 ml of an ice-cold Tris-HCl buffer (pH 7.4), transferred to scintillation counting vials containing 0.5 ml of Soluene-350 and 4 ml of Hionic Fluor, equilibrated for 12 h and then the radioactivity in the samples was determined with a liquid scintillation analyser. Non-specific binding was measured in the presence of 10 µM unlabeled GTPS. Comparable results were obtained from at least three independent sets of experiments.

Western blotting

Whole brain was quickly removed after decapitation and homogenized in ice-cold buffer A containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid, 0.5 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 µg of leupeptin per ml, 0.1 mg of aprotinin per ml and 0.32 M sucrose. The homogenate was centrifuged at 1000×g for 10 min and the supernatant was ultracentrifuged at 20,000×g for 30 min at 4 °C. The resulting supernatant was retained as the cytosolic fraction. The pellets were washed with buffer B (buffer A without sucrose) and homogenated in buffer B with 1% TritonX-100. After incubating for 45 min, soluble fractions were obtained by ultracentrifugation at 20,000×g for 30 min and were then retained as membranous fractions for Western blotting. An aliquot of tissue sample was diluted with an equal volume of 2× electrophoresis sample buffer (Protein Gel Loading Dye 2×; Amresco, Solon, OH, USA) containing 2% sodium dodecyl sulfate and 10% glycerol with 0.2 M dithiothreitol. Proteins (5–20 µg/lane) were separated by size on 4–20% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gradient gel using the buffer system of Laemmli, and transferred to nitrocellulose membranes in Tris-glycine buffer containing 25 mM Tris and 192 mM glycine. For immunoblot detection of DAT and VMAT2, membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 5% nonfat dried milk (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA) for 1 h at room temperature with agitation. The membrane was incubated with primary antibody diluted in TBS (DAT and VMAT2, 1:500, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) containing 5% nonfat dried milk overnight at 4 °C. The membrane was washed twice for 5 min and twice for 10 min in Tween-20-TBS containing TBS and 0.05% Tween-20-100, followed by 2 h of incubation at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Southern Biotechnology Associates, Inc., Birmingham, AL, USA) diluted 1:10,000 in TBS containing 5% nonfat dried milk. Thereafter, the membranes were washed twice for 5 min and then three times for 10 min in Triton Tween-20. The antigen-antibody peroxidase complex was then detected by enhanced chemiluminescence (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions and visualized by exposure to Amersham Hyperfilm (Amersham, IL, USA).

RT-PCR assay

Total RNA in the brain was extracted using SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). To prepare single-strand cDNA, 1 µg of RNA was incubated in 100 µl of buffer containing 10 mM dithiothreitol, 2.5 mM MgCl₂, dNTP mix, 200 U of reverse transcriptase II (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) and 0.1 mM oligo (dT)₁₂₋₁₈ (Life Technologies). The dopamine D1 receptor was amplified in a 50-µl PCR solution containing 0.8 mM MgCl₂, dNTP mix and DNA polymerase with synthesized primers: a sense primer of D1 receptor (5'-CTC ATA AGC TTT TAC CAT CCC CG-3'), an antisense primer (5'-CCC TCT CCA AAG CTG AGA TG-3'). Samples

were heated to 94 °C for 2 min, 55 °C for 2 min and 72 °C for 3 min, and cycled 35 times through 94 °C for 1 min, 55 °C for 2 min and 72 °C for 3 min. The final incubation was 72 °C for 7 min. The resulting 103-bp PCR product amplified with above primers for D1 receptor was subcloned into pGEM-T vector (Invitrogen, San Diego, CA, USA) by T-A cloning method. The mixture was run on 1% agarose gel electrophoresis with the indicated markers and PCR products of the internal standard GAPDH. Three independent experiments were performed in this study. Semi-quantitation of the intensity of the bands for D1 receptor/GAPDH was conducted by using a NIH image (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Statistical analysis

Data represent the mean counts with S.E.M. Statistical analyses were performed using one-way and two-way analysis of variance with Bonferroni/Dunnnett's test. The relative shifting potency was calculated by the distance between parallel linear regression lines by use of a computer program PRISM (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Enhancement of methamphetamine-induced rewarding effect in mice prenatally and neonatally exposed to BPA

In the present study, methamphetamine produced a dose-dependent place preference in control B0 mice. This effect was completely reversed by a selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 (Fig. 1A), as reported previously (Suzuki et al., 1993, Narita et al., 2001). At the dose of 0.5 mg/kg, methamphetamine produced neither place preference nor place aversion in control B0 (Fig. 1B). However, treatment with 0.5 mg/kg of methamphetamine produced a significant place preference in mice treated chronically with any doses of BPA (Fig. 1B). Furthermore, chronic treatment with BPA (B2) produced a significant leftward displacement of the dose-response line of the methamphetamine-induced rewarding effect ($P < 0.05$, 6.97-fold, Fig. 1C).

Enhancement of methamphetamine-induced hyperlocomotion in mice prenatally and neonatally exposed to BPA

Treatment with 2 mg/kg (s.c.) of methamphetamine produced a locomotor-enhancing effect in both of the groups (Fig. 2A). In B2 mice, the hyperlocomotion by methamphetamine was dramatically potentiated as compared with that in B0 mice ($F_{1,340} = 6.617$, $P < 0.05$ vs. B0 group, Fig. 2A).

In order to induce sensitization to methamphetamine-induced hyperlocomotion, methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) was repeatedly given to mice every 7 days. In the present study, control B0 mice that had been treated with methamphetamine (2 mg/kg, s.c.) four times at an interval of 7 days showed sensitization to the locomotor-enhancing effect of methamphetamine (Fig. 2B). In B2 mice, sensitization to methamphetamine-induced hyperlocomotion was significantly enhanced as compared with that in B0 mice ($F_{1,54} = 9.459$, $P < 0.01$ vs. B0 group, Fig. 2B).

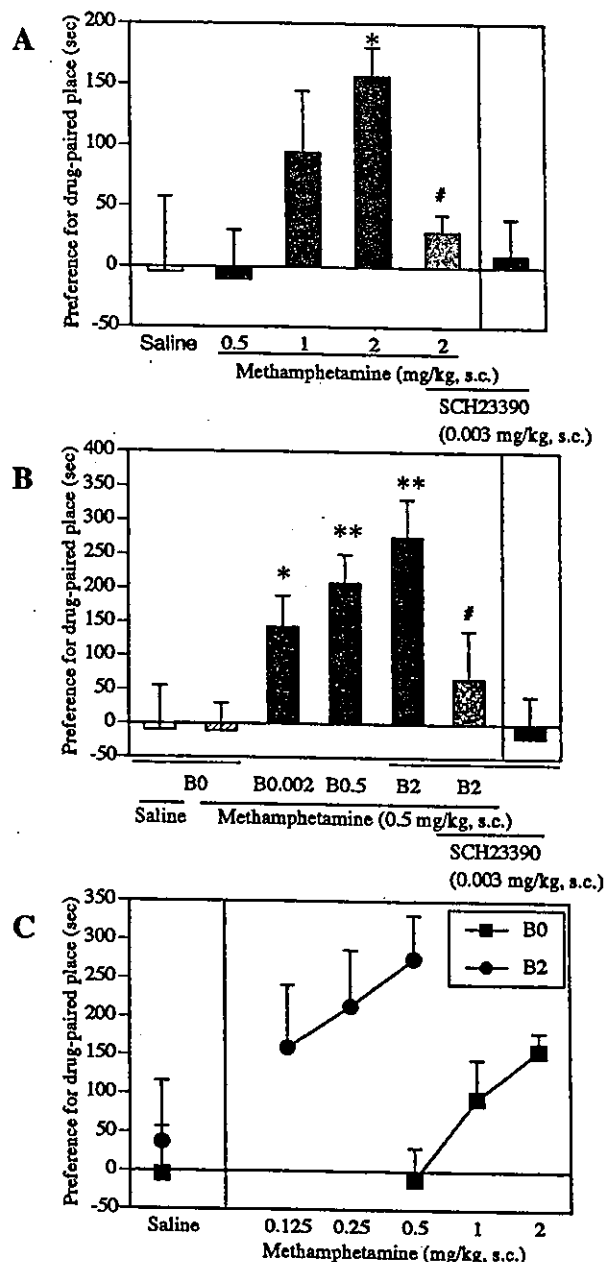


Fig. 1. Effect of prenatal and neonatal exposure to BPA on the rewarding effect of methamphetamine in mice. (A) Dose response for the methamphetamine-induced place preference in control B0 mice ($*P < 0.05$ vs. saline-treated mice). Pretreatment with a selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 blocked the effect of methamphetamine ($\#P < 0.05$ vs. methamphetamine alone). (B) Effect of BPA (0.002, 2 mg/g of food; B0.002, B2) on the methamphetamine (0.5 mg/kg, s.c.)-induced place preference. The BPA-non-treated group (hatched bar; B0 mice) did not show any place preference or place aversion with methamphetamine at 0.5 mg/kg. The BPA-treated group (filled bar) showed a significant place preference for the methamphetamine at this dosage ($*P < 0.05$, $**P < 0.01$ vs. BPA-non treated group; B0 mice). Each column represents the mean place-preference score with S.E.M. of 6–10 mice. (C) Comparison of the dose-response line for the methamphetamine-induced place preference between B0 (square) and B2 (circle) mice. The dose-response line of B2 mice was significantly shifted to the left by 6.97-fold ($P < 0.05$). Each point represents the mean conditioning score with S.E.M. of 6–10 mice.

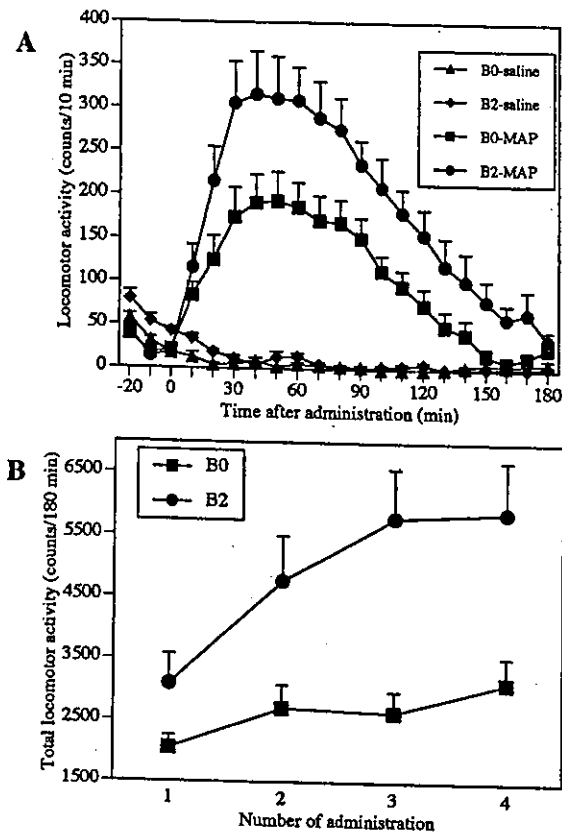


Fig. 2. (A) Effect of BPA on methamphetamine (2 mg/kg, s.c.)-induced locomotor activity. The BPA (2 mg/g of food)-treated group (circle: B2 mice) revealed a significant potentiation of the methamphetamine-induced locomotor enhancing effect ($F_{1,340}=6.617$, $P<0.05$ vs. B0 group: square). Each point represents the mean activity counts for 10 min with S.E.M. of 9–10 mice. (B) Effect of BPA on the sensitization to methamphetamine-induced locomotor-enhancing effect. The B2 mice (circle) showed greater development of sensitization to hyperlocomotion by methamphetamine compared with that in B0 mice (square). Each point represents the mean total activity counts for 180 min with S.E.M. of 9–10 mice.

The dopamine-induced G-protein activation in mice prenatally and neonatally exposed to BPA

Dopamine (0.001–10 μM) produced a concentration-dependent increase in [^{35}S]GTP γS binding to membranes from the limbic forebrain, including the nucleus accumbens of B0 mice. It should be noted that the stimulation of [^{35}S]GTP γS binding induced by dopamine was markedly potentiated in B2 mice (Fig. 3A). This enhancement was reversed by the presence of a selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 at the concentration that had no effect on the dopamine-stimulated [^{35}S]GTP γS binding in B0 mice (Fig. 3B). By contrast, the increase of bindings by dopamine in B0 mice was abolished by a selective dopamine D2 receptor antagonist sulpiride (Fig. 3B). Under these conditions, the stimulation of [^{35}S]GTP γS binding by dopamine in the presence of sulpiride in B2 mice showed the same degree as that by dopamine itself in B0 mice (Fig. 3B).

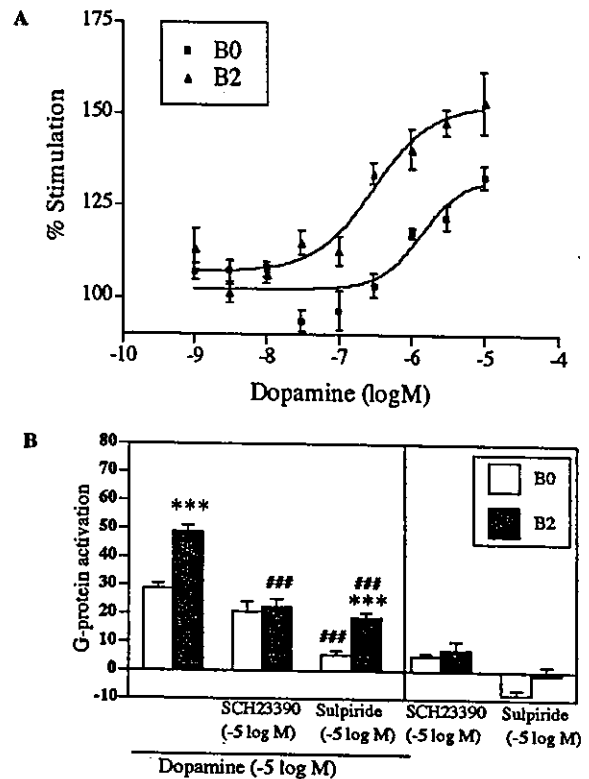


Fig. 3. (A) Comparison of the stimulation of [^{35}S]GTP γS binding by dopamine to membranes of the limbic forebrain obtained from control (B0: square) and BPA-treated (B2: triangle) mice. Membranes were incubated with [^{35}S]GTP γS (50 pM) and GDP (30 μM) with dopamine (10^{-9} – 10^{-5} M). (B) Blockade of the dopamine-induced stimulation of [^{35}S]GTP γS binding to membranes of the limbic forebrain by the selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390 or dopamine D2 receptor antagonist sulpiride in B0 (open bar) or B2 mice (filled bar). Membranes were incubated with [^{35}S]GTP γS (50 pM) and GDP (30 μM) with dopamine in the presence or absence of SCH23390 or sulpiride. The data are shown as the percentage of basal [^{35}S]GTP γS binding measured in the presence of GDP and absence of dopamine. Each column represents the mean with S.E.M. of three independent samples. *** $P<0.001$ vs. control (B0) group. **** $P<0.001$ vs. dopamine (10^{-5} M) alone.

No change in protein levels of dopamine transporter (DAT) and the type 2 of vesicle monoamine transporter (VMAT2) in the whole brain obtained from mice prenatally exposed to bisphenol A

In Western blotting assay, no changes in protein levels of both DAT and VMAT2 were noted in the whole brain obtained from B2 mice as compared with that in B0 mice (Fig. 4).

Up-regulation of the expression of dopamine D1 receptor mRNAs in the whole brain obtained from mice prenatally and neonatally exposed to BPA

In the RT-PCR assay, chronic BPA treatment produced a significant increase in the dopamine D1 receptor production in the whole brain obtained from B2 mice ($P<0.05$ vs. B0 mice, Fig. 5).

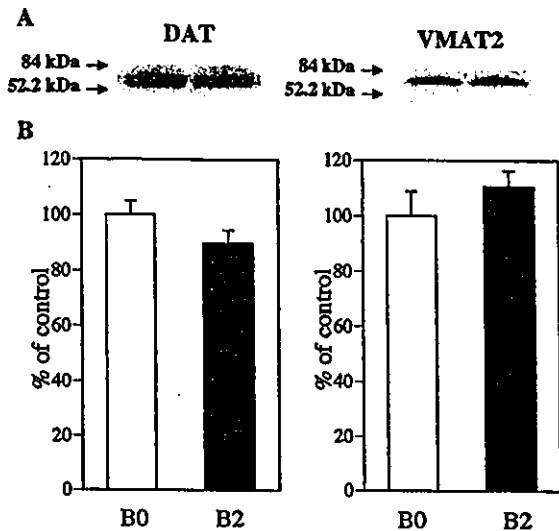


Fig. 4. Protein levels of DAT and VMAT2 in the whole brain obtained from mice prenatally and neonatally exposed to BPA. (A) Representative Western blots of DAT and VMAT2 proteins. (B) No change in protein levels of DAT and VMAT2 in the whole brain obtained from B2 mice (filled bar) as compared with that from B0 mice (open bar). Each column represents the mean \pm S.E.M. of six samples.

DISCUSSION

Drug addiction is a pathological behavior characterized by compulsive drug seeking and drug ingestion despite se-

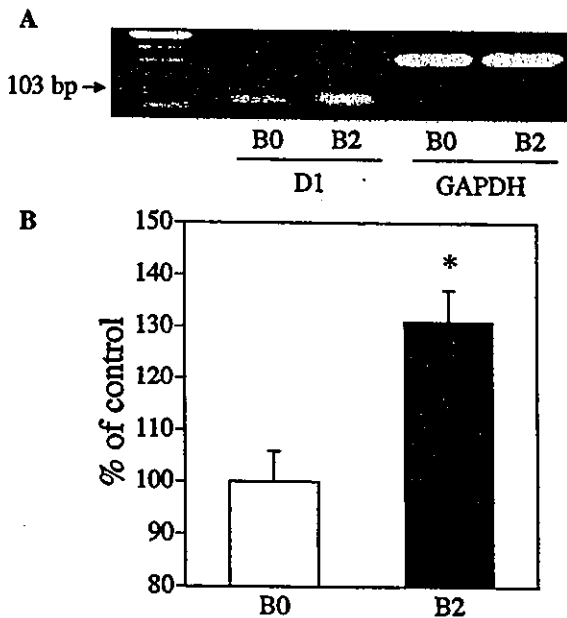


Fig. 5. Effect of prenatal and neonatal exposure to BPA on the expression of dopamine D1 receptor mRNA in the mouse brain. (A) Representative RT-PCR for the dopamine D1 receptor (D1) mRNAs in the whole brain minus cerebellum obtained from B0 and B2 mice. (B) A significant increase in the expression of dopamine D1 receptor mRNAs in the whole brain obtained from B2 mice (filled bar) as compared with that from B0 mice (open bar). The values are expressed as a percentage of the value in B0 mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of three independent samples. * $P < 0.05$ vs. B0 mice.

vere adverse consequences. The place-conditioning paradigm has become the most frequently method to evaluate the motivational properties and its use has been reported more frequently than the self-administration paradigm (Suzuki, 1996; Narita et al., 2001). In the present study, we confirmed that methamphetamine produced a dose-dependent place preference in control mice, and this effect was abolished by a selective dopamine D1 receptor antagonist SCH23390, indicating the involvement of dopamine D1 receptors in this event. As well as the rewarding effect, treatment with methamphetamine produced a significant increase in locomotor response in control mice.

Recently, several investigations provide evidence that the treatment of adult animals with BPA could not affect the reproductive function and social behaviors (Cagen et al., 1999; Farabollini et al., 2002). In the present study, we demonstrated that prenatal and neonatal exposure to BPA produced a significant enhancement of either the rewarding effect or of hyperlocomotion by methamphetamine. These results indicate that prenatal and neonatal exposure to BPA may cause the neuronal toxicity in the developmental process.

It should be mentioned that the blood level of BPA in the present study (approximately 10 ng/ml, data not shown) is considered to be more than 30 times higher than the healthy human-exposure level (Inoue et al., 2000). However, our additional experiments clearly indicate that much lower concentrations of BPA exposure can even produce the enhancement of the methamphetamine-induced behaviors (unpublished observation). These findings suggest the possibility that prenatal and neonatal exposure to BPA may intensify the liability of psychological dependence on psychostimulants in mice.

Pre-exposure of animals to repeated exposure to psychostimulants can result in a greatly enhanced behavioral response. This progressive neuroadaptive response has been regarded as an animal model for the toxic psychosis that can develop in humans with repeated psychostimulants (Vanderschuren and Kalivas, 2000). In the present study, we demonstrated that sensitization to methamphetamine-induced hyperlocomotion was also enhanced by chronic treatment with BPA. A considerable number of studies clearly indicate that activation of the mesolimbic dopamine pathway projecting from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens is implicated in the methamphetamine-induced place preference, hyperlocomotion and its sensitization (Vanderschuren and Kalivas, 2000). We therefore proposed the hypothesis that prenatal and neonatal exposure to BPA can produce a long-lasting enhancement of the mesolimbic dopamine transmission, leading to synaptic plasticity.

Considering a substantial role of dopamine D1 receptor in the rewarding effect of abuse drugs (Hiroi and White, 1991; Narita et al., 2001), we next investigated whether prenatal and neonatal exposure to BPA could affect the expression and function of dopamine D1 receptor. Using the RT-PCR assay, we found that chronic BPA exposure produced a significant increase in the dopamine D1 receptor production in the whole brain. It should be pointed out that G-protein activation induced by dopamine was markedly potentiated by