

Table 5. Type I error (%) under heteroscedasticity.  $\sigma_i^2 = \sigma^2 + \mu_i \times \gamma$ . 'Proposed-W' and 'Proposed-T' are proposed test with or without Welch correction, respectively

Case	Test	$\gamma = 0$	$\gamma = 1$	$\gamma = 2$	$\gamma = 3$
Case 1	Proposed-W	5.4	5.9	5.6	5.7
	Proposed-T	4.9	6.3	6.2	6.1
	Regression	4.9	6.3	6.2	6.1
Case 2	Proposed-W	5.2	6.1	6.1	6.1
	Proposed-T	4.9	7.0	7.6	7.8
	Regression	5.0	8.0	8.2	8.5
Case 3	Proposed-W	4.9	6.4	6.2	6.4
	Proposed-T	5.1	7.4	7.4	7.3
	Regression	4.8	7.6	7.7	7.6

#### 6.4. Robustness against variance heterogeneity.

Variance heterogeneity will likely occur in real situations, and we therefore examine the robustness of the proposed test against variance heterogeneity by considering the case in which within-group variance  $\sigma_i^2$  is as follows:

$$\sigma_i^2 = \sigma^2 + \mu_i \gamma \quad (5)$$

The parameter  $\gamma$  takes values 1, 2, and 3. Simulation results are summarized in Table 5, where, even though all tests appear to be liberal, the proposed test is the most robust one.

## 7. CASE STUDY

As a case study, we selected an 'ovariectomized rodent uterotrophic assay' containing seven groups with six animals per group, examining the quantitative endpoint of uterine weight gain in response to the estrogenicity of administered test chemicals. The dose setting was  $(d_A, d_B) = (0.0, 0.0)$ ,  $(10.0, 0.0)$ ,  $(20.0, 0.0)$ ,  $(0.0, 10.0)$ ,  $(0.0, 20.0)$ ,  $(5.0, 5.0)$ , and  $(10.0, 10.0)$ , i.e. two simultaneous administration groups were included. The major interest was whether or not the combined effect was synergistic. The observed uterine weights were averaged over two simultaneous administration groups and compared with the response for  $(d_A, d_B) = (7.5, 7.5)$  estimated under the null hypothesis based on the data from groups with individual chemical administration.

The observed mean response was  $\bar{y} = 1606.4$  with standard error  $V(\bar{y}) = 59.4$ , and the estimated response was  $\hat{y} = 1450.0$  with standard error  $V(\hat{y}) = 39.7$ . The degrees of freedom using Welch correction were 19, and therefore the one-sided  $p$ -value corresponding to the observed value  $T = 2.190$  was  $p = 0.021$ . From these results we judged that the combined action was synergistic—a judgment accepted as reasonable by researchers conducting this experiment.

## 8. CONCLUSION AND DISCUSSIONS

One issue elicited from endocrine disruptor studies is how to judge the occurrence of synergism among chemicals. Here, we considered exchangeable cases in which two chemicals induce the same type of response on animals.

A linear model was assumed regarding the experiment data using a proper transformation of response and/or doses of chemicals, with synergism being defined as the case in which there occurs a higher response for simultaneous administration of chemicals than the corresponding response expected from the linear model without interaction. Based on this consideration, we proposed a triangular design for an animal experiment and a statistical test for judging synergism.

Results of a simulation study indicate that the proposed test is not superior in power to the analysis of variance test in the regression model with interaction, yet it is nevertheless robust against heteroscedasticity for type I error. By applying the proposed test to actual experimental data, a judgment was made that the combined effect of test chemicals was synergistic. Researchers who conducted the experiment in question agreed this was a reasonable finding.

When considering the molecular mechanism of the receptor-ligand system, it is obvious that the simplest *in vitro* system has only a slight possibility to produce a synergistic response because at the ligand binding site the best ligand is always interfered with by a less potent ligand. The occurrence of synergism is always speculated when the system is complex and has multiple signal pathways, most of which are in a 'black box'.

It is for this reason that a study aimed at detecting possible synergism will likely be an *in vivo* experiment. And yet, such *in vivo* studies always have limitations in their size, sometimes due to (i) the limited capacity of the animal facility, or (ii) manpower limitations. This affects the ability to complete each process within a certain timeframe in order to minimize the circadian variables. The proposed experimental design using a limited number of animals together with a robust statistical analysis method is therefore expected to be useful to many researchers for detecting possible synergistic effects in *in vivo* assays.

#### ACKNOWLEDGEMENT

This research was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research [(c)11680328] provided by Japan Society for the Promotion of Science.

#### REFERENCES

- Berenbaum MC. 1989. What is synergy? *Pharmacological Reviews* **41**: 93–141.
- Committee on hormonally active agents in the environment, board on environmental studies and toxicology, commission on life sciences, National Research Council. 1999. *Hormonally Active Agents in the Environment*. National Academy Press: Washington, DC.
- Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC). 2001. *Final Report*. <http://www.epa.gov/oscpmont/oscpendo/hisorty/finalrpt.htm>.
- Gennings C, Schwarz P, Carter WH, Simmons JE. 1997. Detection of departures from additivity in mixtures of many chemicals with a threshold model. *Jour. Agri. Biol. Environ. Stat.* **2**: 198–211.
- Hasegawa R, Yoshimura I, Imaida K, Ito N, Shirai T. 1996. Analysis of synergism in hepatocarcinogenesis based on preneoplastic foci induction by 10 heterocyclic amines in the rat. *Jpn Jour. Cancer Res.* **87**: 1125–1133.
- Hewlett PS, Plackett RL. 1959. A unified theory for quantal response to mixtures of drugs: noninteractive action. *Biometrics* **15**: 591–610.
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. 2001. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase I. *Environmental Health Perspectives* **109**: 785–794.
- Kodell RL, Pounds JG. 1990. Assessing the toxicity of mixtures of chemicals. In *Stat. in Tox.*, Krewski D, Franklin C (eds). Gordon and Breach Science Publishers, Chapter **26**: 559–591.
- Laska EM, Meisner M, Ang DI. 1997. Classification of the effectiveness of combination treatments. *Stat. in Med.* **16**: 2211–2228.
- Laurence DR, Bennett PN. 1980. *Clinical Pharmacology* (5th edn). Churchill Livingstone; 162–163.

- Machado SG, Robinson GA. 1994. A direct, general approach based on isobologram for assessing the joint action of drugs in pre-clinical experiment. *Stat. in Med.* **13**: 2289–2309.
- Piegorsch WW, Bailer AJ. 1997. *Statistics for Environmental Biology and Toxicology*. Chapman & Hall: London.
- Reif AE. 1984. Synergism in carcinogenesis. *Jour. National Cancer Inst.* **73**: 25–39.
- Rothman KJ, Greenland S, Walker AM. 1980. Concept of interaction. *Amer. Jour. Epidemiology* **112**: 467–470.
- Roy P, Esteve J. 1998. Using relative risk models for estimating synergy between two risk factors. *Stat. Med.* **17**: 1357–1373.
- Sakuma A. 1996. *The World of Sakuma Akira*. Scientist, Tokyo. 27–29 (in Japanese).
- Saracct R. 1980. Interaction and synergism. *Stat. Med.* **17**: 1357–1373.
- Satterthwaite FE. 1946. An approximate distribution of estimates of variance components. *Biometrics* **2**: 110–114.
- Solicitation of Comments on Proposed Peer Review of Low-dose Issues for Endocrine Disruptors. 2001. <http://ntpserver.hihs.nih.gov/htdocs/liason/LowDoseEndocrineFR.html>; <http://ntpserver.hihs.nih.gov/htdocs/liason/EndocrineMtgDelayFR.html>.
- Welch BL. 1938. The significance of the difference between two means when the population variances are unequal. *Biometrika* **29**: 350–362.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakabe Y, Sawaki M, Imatanaka N, Takatsuki M. 2002. Comparison of reporter gene assay and immature rat uterotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* **170**: 21–30.

[特集：学会シンポジウム—環境化学物質と脳・行動]

## Bisphenol-A の胎児期および授乳期曝露による脳内報酬系に及ぼす影響\*

鈴木 勉\*<sup>1</sup> 水尾 圭祐\*<sup>1</sup> 宮川 和也\*<sup>1</sup> 成田 年\*<sup>1</sup>\*<sup>1</sup> 星薬科大学薬品毒性学教室

(2005年4月19日受理)

要約：近年、内分泌攪乱化学物質の中枢神経系に及ぼす影響が懸念されている。本研究では bisphenol-A (BPA) を胎児期および授乳期に曝露したマウスにおける行動影響について検討した。BPA の曝露は薬物混入飼料法に従って行った。BPA を 0.002, 0.5, 2 mg/g of food の濃度で処置した親から生まれたマウスをそれぞれ B0.002 群, B0.5 群, B2 群とし, BPA を曝露しない control 群を B0 群とした。これらのマウスを用いて morphine (MRP) あるいは methamphetamine (METH) の報酬効果を検討した。その結果, MRP や METH によって誘発される報酬効果は BPA の胎児期および授乳期曝露により有意に増強された。また, このような B2 群の脳内における D<sub>1</sub> 受容体の mRNA は B0 群と比較して有意に増加していた。これらのことより, 本研究で得られた BPA 群における MRP あるいは METH 誘発報酬効果の増強に dopamine D<sub>1</sub> 受容体の up-regulation が一部関与していると考えられる。一方, これまでに当教室においては dopamine D<sub>3</sub> 受容体の欠損が側坐核のシナプス後膜における dopamine 受容体のシグナル伝達を増強させ, MRP の報酬効果を増強させることを報告している。そこで, BPA の胎児期および授乳期曝露による dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能に及ぼす影響を検討した。その結果, BPA の胎児期および授乳期曝露により, 側坐核における dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能低下が生じることを見いだした。以上の結果より, 本研究で得られた BPA 慢性曝露マウスにおける MRP や覚せい剤の精神依存形成の増強は, 側坐核における dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能低下ならびに dopamine D<sub>1</sub> 受容体の up-regulation に伴った中脳辺縁 dopamine 神経の機能亢進が一部関与している可能性が示唆される。このような BPA の妊娠期および授乳期曝露による脳神経系への影響は, 現代社会における薬物依存の増加に対する非常に重大な警鐘になりうると考えられる。

キーワード：bisphenol-A, 内分泌攪乱化学物質, dopamine, 報酬効果, 自発運動促進作用

Bisphenol-A は, phenol と acetone との縮合反応により合成され, 主にポリカーボネート樹脂, エポキシ樹脂の原料としてプラスチック製の食品容器や歯科用材料などに広く使用されている。この bisphenol-A は加熱により容易に溶出することが知られていることから, その安全性の確認が必要とされている。Bisphenol-A の中枢神経系に対する影響については, bisphenol-A の胎児期曝露ラットにおいて, 青斑核の大きさなどの脳における性差が消失することや, 雄性ラットにおける性行動の減少が報告されている (Farabollini et al, 2002; Kubo et al, 2001)。著者らも bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露が中枢神経系に及ぼす影響を薬物依存の観点から検討し, 報告してきた (Suzuki et al, 2003; Mizuo et al, 2004a, 2004b)。本稿では, bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスにおける dopamine 神経系に及ぼす影響について詳細に検討した結果を報告する。

## Bisphenol-A の胎児期および授乳期曝露が dopamine 神経系に及ぼす影響

Bisphenol-A の曝露は薬物混入飼料法に従った。Bisphenol-A を ddY 系雌性マウスの餌 (粉末飼料) に混入し (B0 : コントロール, B0.002-B2 : bisphenol-A 0.002~2 mg/g of food), 妊娠から離乳に至るまで母親マウスに曝露した。また, 離乳後 4 週間以上にわたり普通飼料で通常飼育を行った後, 雄性マウスを実験に使用した。まず, 条件づけ場所嗜好性試験に従い, 依存性薬物である morphine 誘発報酬効果について検討した。その結果, bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスにおいて, コントロールでは報酬効果を示さない低用量の morphine (1 mg/kg, sc) 処置により, bisphenol-A の用量依存的な morphine 誘発報酬効果の増強が認められた。次に, tilting cage 法に従い, morphine (10 mg/kg, sc) 誘発自発運動促進作用について検討した。その結果, bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスにおいて, morphine 誘発自発運動促進作用の増強が認められた。以上のことから, bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により, morphine の報酬効果発現に深く関与し, 腹側被蓋野から側坐核に投射している中脳辺縁 dopamine 神経系の機能変化が引き起こされている可能性が示唆される。Morphine は, 腹側被蓋野

\* 本内容は第 34 回日本神経精神薬理学会, シンポジウム「環境化学物質と脳・行動」(2004年7月23日, 東京) における講演の記録である。

\*<sup>1</sup> 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

E-mail: suzuki@hoshi.ac.jp

(別刷請求先：鈴木 勉)

の dopamine 神経に投射している  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) 神経上に存在する  $\mu$ -opioid 受容体に作用することで、側坐核における dopamine の遊離を促進することが知られている (Narita et al, 2001). そこで、著者らは次に、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、腹側被蓋野における  $\mu$ -opioid 受容体の機能変化が引き起こされているか否かを [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding assay に従い検討した。その結果、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、腹側被蓋野を含む中脳辺縁部領域において、morphine 誘発 G-protein 活性化作用に有意な変化は認められなかった。以上の結果から、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、腹側被蓋野における  $\mu$ -opioid 受容体の機能変化は引き起こされないことが明らかとなった。著者らはさらに、覚せい剤である methamphetamine 誘発報酬効果ならびに自発運動促進作用についても同様の検討を行った。Methamphetamine は、中脳辺縁 dopamine 神経系の神経終末に取り込まれ、直接作用し、dopamine の遊離を促進することが知られている。その結果、コントロールでは報酬効果を示さない低用量の methamphetamine (0.5 mg/kg, sc) 処置により、bisphenol-A の用量依存的な methamphetamine 誘発報酬効果の増強が認められ、さらに methamphetamine (2 mg/kg, sc) 誘発自発運動促進作用の著明な増強が認められた。また、この報酬効果の発現は、dopamine D<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である R(+)-7-chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride (SCH23390) の前処置により完全に抑制されたことから、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、側坐核における dopamine D<sub>1</sub> 受容体の機能変化が引き起こされている可能性が示唆された。これを裏付けるために、[ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binding assay に従い、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用を検討した。その結果、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスより得られた側坐核を含む前脳辺縁部領域において、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の著明な増強が認められ、この G-protein 活性化作用は dopamine D<sub>2</sub> 受容体拮抗薬である sulpiride の併用では抑制されず、dopamine D<sub>1</sub> 受容体拮抗薬である SCH23390 の併用により、コントロールレベルにまで完全に抑制された。以上のことから、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、側坐核における dopamine D<sub>1</sub> 受容体の機能亢進が誘発され、その結果として依存性薬物に対する感受性の亢進が引き起こされることが初めて明らかとなった。

#### Bisphenol-A が dopamine 神経系に及ぼす影響の 曝露時期に関する検討

脳の機能的な発達過程において、最も外界から影響を受けやすいのは胎児期から授乳期にかけてである。成体の脳は血液-脳関門が発達しており、血液から薬物など異物の

脳への侵入を防いでいる。この血液-脳関門は、授乳期以降に発達することが報告されているため (Saunders and Mollgard, 1984)、胎児期から授乳期にかけては血液-脳関門がほとんど形成されておらず、未発達であると考えられる。したがって、このような時期に bisphenol-A の曝露を受けると、成体と比較して容易に bisphenol-A が脳内へ移行することが推察される。事実、すでに述べたように、著者らは bisphenol-A を胎児期から授乳期にかけて慢性的に曝露することにより、脳内 dopamine 神経系の機能に影響を及ぼすことを明らかにした。さらに、bisphenol-A は成体に対してはほとんど影響を及ぼさないことから (Cagen et al, 1999)、胎児期から授乳期における bisphenol-A の容易な脳移行性が中枢神経系に影響を及ぼす一因となっている可能性が考えられる。

一般に、脳の発達において神経細胞の増殖は胎児期、特に器官形成期に最も盛んに行われることが明らかにされている。そのため、生後の脳重量はほとんど変化しない。一方、脳の機能的な発達、すなわちシナプスの形成およびシナプス密度の増加に伴う神経ネットワークの構築は、出生後の授乳期において最も盛んに行われていることが報告されている。著者らは、このような曝露時期の重要性を考え、bisphenol-A の曝露時期を妊娠初期、器官形成期、妊娠後期および授乳期まで4期に分割し、それぞれのマウスから生まれた仔を用いて、morphine 誘発自発運動促進作用および報酬効果について検討した。その結果、コントロール群と比較して、bisphenol-A の器官形成期曝露群および授乳期曝露群では morphine 誘発自発運動促進作用および報酬効果の有意な増強が認められた。さらに、前脳辺縁部領域における dopamine 誘発 G-protein 活性化作用も同様の期間において、有意な増強が認められた。これらのことから、血液-脳関門が未発達な時期であり、神経細胞の増殖および神経ネットワークの構築過程に非常に重要である器官形成期および授乳期における bisphenol-A の慢性曝露は中枢神経系に対して多大な影響を及ぼすものと考えられる。

#### Bisphenol-A の胎児期および授乳期曝露が dopamine D<sub>3</sub> 受容体に及ぼす影響

Dopamine D<sub>3</sub> 受容体は、側坐核、calleja 島および嗅結節などの辺縁系に高密度に分布することから、薬物依存との関連性が注目されている。事実、当教室において、dopamine D<sub>3</sub> 受容体遺伝子欠損マウス (D<sub>3</sub>KO マウス) が morphine の報酬効果を増強させることを報告している (Narita et al, 2003)。そこで、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露群における dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能変化について検討した。まず、受容体結合実験に従い、前脳辺縁部領域における dopamine D<sub>3</sub> 受容体の変化について検討した。その結果、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露群において、

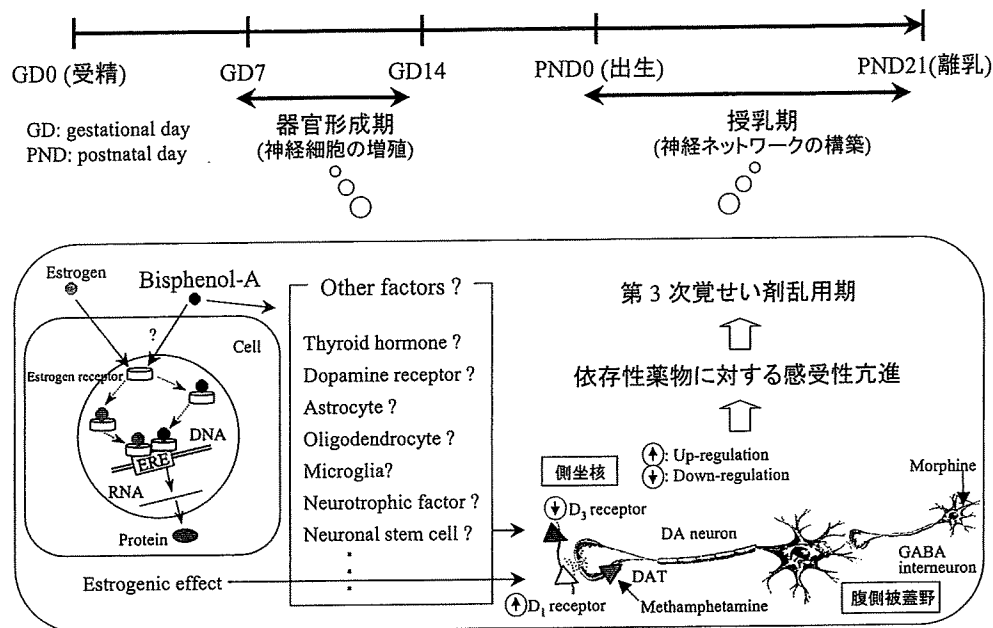


図1 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により依存性薬物に対する感受性亢進のメカニズム。Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能低下と dopamine D<sub>1</sub> 受容体の機能亢進が引き起こされ、依存性薬物に対する感受性の亢進が引き起こされる。さらに、神経細胞の増殖のピークとなる器官形成期や神経ネットワークの構築に非常に重要な時期である授乳期における bisphenol-A 曝露が特に大きな影響を及ぼす可能性が示唆される。Bisphenol-A は estrogen 受容体 (ER) に結合し、DNA 上の estrogen response element (ERE) に結合することで estrogen 様作用を有することが知られている。しかしながら、bisphenol-A の estrogen 活性は非常に弱いこと、bisphenol-A が estrogen 様作用以外の機序によりさまざまな生理作用を示すことが報告されており、著者らも estrogen 様作用以外の機序を示唆する知見を得ている。したがって、bisphenol-A の胎児期および授乳期曝露による dopamine 神経系に及ぼす影響は、bisphenol-A の有する estrogen 様作用とは異なる機序も考慮する必要がある。

dopamine D<sub>3</sub> 受容体作動薬の放射ラベル体である [<sup>3</sup>H]-7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin ([<sup>3</sup>H]-7-OH-DPAT) を用いて結合実験を行ったところ、Kd 値には変化が認められず、Bmax 値の有意な低下、すなわち dopamine D<sub>3</sub> 受容体数の低下が認められた。次に、[<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay に従い、7-OH-DPAT による G-protein 活性化作用を検討した。その結果、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露群の前脳辺縁部領域における 7-OH-DPAT 誘発 G-protein 活性化作用は、コントロール群と比較して有意な減少を示した。これらのことから、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能が特異的に減弱することが明らかとなった。一方、RT-PCR 法に従い前脳辺縁部領域および中脳辺縁部領域における dopamine D<sub>3</sub> 受容体 mRNA の発現量を検討したところ、bisphenol-A の慢性曝露によっても有意な変化は示さなかった。これらの結果より、胎児期および授乳期の bisphenol-A 慢性曝露は dopamine D<sub>3</sub> 受容体の新規合成に影響を与えず、dopamine D<sub>3</sub> 受容体の代謝回転を亢進させる可能性が示唆された。

#### まとめ

本研究で得られた bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスにおける morphine や覚せい剤の精神依存形

成の増強は、dopamine D<sub>3</sub> 受容体の機能低下に伴った dopamine D<sub>1</sub> 受容体の機能亢進が一部関与していることを明らかにした。さらに、これらの現象は bisphenol-A 曝露を中止してから少なくとも 4 週間後に認められていることから、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、不可逆的な dopamine 神経系の機能亢進が引き起こされる可能性が示唆される。近年、依存性薬物の乱用が若年層にまで広がっていること、注意欠陥多動症患者が増加していることなど、dopamine 神経系の機能異常が原因となりうる現象が大きな社会問題となっている。生命発生以来 30 億年の間に存在しなかった何万種類もの化学物質が、この 100 年間に環境中に放出されては、いくら生命体が適応能力に富んでいるとしても、それらに対応する自然界の処理能力や時間的余裕はなく、次世代のみならず、次々世代、さらに次の世代へと被害の拡大が予想される。環境化学物質がもたらす有害影響に終止符を打つのは、化学物質を環境中に放出した現代人へ課せられた義務ではないだろうか。本稿が環境化学物質問題への警鐘となり得ることを期待する。

#### 文献

Cagen, S. Z., Waechter, J. M. Jr., Dimond, S. S., Breslin, W. J., Butala, J. H., Jekat, F. W., Joiner, R. L., Shiotsuka, R. N., Veenstra, G. E. and Harris, L. R. (1999) Normal reproductive organ development

- in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci*, 50: 36-44.
- Farabolini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi F. and Dessi-Fulgheri, F. (2002) Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect*, 110: 409-414.
- Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T. and Aou, S. (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett*, 304: 73-76.
- Mizuo, K., Narita, M., Miyagawa, K., Narita, M., Okuno, E. and Suzuki, T. (2004a) Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett*, 356: 95-98.
- Mizuo, K., Narita, M., Yoshida, T., Narita, M. and Suzuki, T. (2004b) Functional changes in dopamine D<sub>3</sub> receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addict Biol*, 9: 19-25.
- Narita, M., Funada, M. and Suzuki, T. (2001) Regulations of opioid dependence by receptor types. *Pharmacol Ther*, 89: 1-15.
- Narita, M., Mizuo, K., Mizoguchi, H., Sakata, M., Narita, M., Tseng, L. F. and Suzuki, T. (2003) Molecular evidence for the functional role of dopamine D<sub>3</sub> receptor in the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion. *J Neurosci*, 23: 1006-1012.
- Saunders, N. R. and Møllgaard, K. (1984) Development of the blood-brain barrier. *J Dev Physiol*, 6: 45-57.
- Suzuki, T., Mizuo, K., Nakazawa, H., Funae, Y., Fushiki, S., Fukushima, S., Shirai, T. and Narita, M. (2003) Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D<sub>1</sub> receptor-mediated action in mice: Enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience*, 117: 639-644.

**Abstract:** Tsutomu SUZUKI, Keisuke MIZUO, Kazuya MIYAGAWA and Minoru NARITA (Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8501 Japan) *Exposure to bisphenol-A affects the rewarding system in mice.* *Jpn. J. Neuropsychopharmacol.*, 25: 125-128 (2005).

Bisphenol-A has been extensively evaluated for toxicity in a variety of tests as the most common environmental endocrine disruptor. In the present study, we found that prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the development of the central dopaminergic system in the mouse limbic area. Additionally, this treatment with bisphenol-A produced a down-regulation of dopamine D<sub>3</sub> receptor and an up-regulation of dopamine D<sub>1</sub> receptor function to activate G-protein in the mouse limbic forebrain, which is thought to play a critical role for rewarding effects by drugs of abuse. We next investigated the relationship between the neurobehavioral toxicity and its exposure period. The exposure to bisphenol-A during either organogenesis or lactation, but not implantation and parturition, significantly enhanced the morphine-induced hyperlocomotion and rewarding effect. Furthermore, the exposure to bisphenol-A during either organogenesis or lactation also produced an up-regulation of dopamine D<sub>1</sub> receptor function to activate G-protein in the mouse limbic forebrain. These results indicate that either organogenesis or lactation is more sensitive to the bisphenol-A-induced neuronal toxicity than any other periods. In conclusion, we found here that prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A can potentiate the central dopaminergic systems, resulting in the supersensitivity of the drugs of abuse-induced rewarding effects and hyperlocomotion in the mouse. Furthermore, the organogenesis and lactation are the most important period to cause the alteration of dopaminergic system by bisphenol-A exposure in the mouse.

**Key words:** Bisphenol-A, Endocrine disruptor, Dopamine, Rewarding effect, Hyperlocomotion

(Reprint requests should be sent to T. Suzuki)

## 特集

## 物質的環境が精神機能へどう影響するか

Bisphenol-Aの胎児期および授乳期  
慢性曝露によるdopamine神経行動毒性発現\*

● 成田 年\*\*/宮川和也\*\*/富田真理子\*\*/水尾圭祐\*\*/鈴木 勉\*\*

Key Words : bisphenol-A, dopamine, rewarding effect, hyperlocomotion, morphine

## はじめに

近年、環境中に存在するいくつかの化学物質がホルモンに類似した作用を示し、このような物質は内分泌かく乱化学物質（環境ホルモン）と呼ばれ、マスメディアを通じて広く知られることとなった。内分泌かく乱化学物質の問題が急浮上したのは、1996年にシーア・コルボーンらが著書『奪われし未来』を出版して以来のことである。しかし、この出版以前にも、生体の内分泌現象をかく乱する天然や合成化学物質の存在は知られており、世界各地で野生動物の生体異常との因果関係が疑われてきた。1970年代初頭、米国の五大湖を中心として1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis-(monochlorophenyl)ethane (DDT)やその代謝物である1, 1-dichloro-2, 2-bis-(p-chlorophenyl)ethylene (DDE)に曝露された鳥類やワニの生殖器異常が報告された<sup>1)~3)</sup>。さらに、イギリスの河川では1980年代からnonylphenolが原因と考えられるローチの精巣重量減少および精子減少などの生殖異常が問題となっている<sup>4)</sup>。わが国においても、船底防汚塗料として用いられているtributyltinの曝露によりイボニシの雄性化が引き起こされ、その生態系に大きな影響を与えていることが報告されている<sup>5)</sup>。また、ヒトにおいて

も流産防止などの目的で使用された合成estrogenであるdiethylstilbestrol (DES)が、女性の生殖器に遅発性がんをひき起こさせることも報告されている<sup>6)</sup>。このような野生動物における生体異常の発見がきっかけとなって、1995年から欧米では幾多の内分泌かく乱化学物質に関する会議が開催されており、わが国においても1998年に環境庁が内分泌かく乱化学物質の対応方針を発表した。最近、内分泌かく乱化学物質は、初期に報告された“生殖器異常”といった生殖器系への影響だけではなく、中枢神経系にも影響を与える可能性が示唆されている。事実、polychlorinated biphenyl (PCB)を含んだ魚を多量に食べた母親から生まれた子供は、IQの低下や記憶力・注意力の欠陥を生じることが報告されている<sup>7)</sup>。一方、ヒトのみならず実験動物を用いた基礎的研究においてもPCBの曝露によって成長後に行動異常を生じることや、脳内におけるdopamineをはじめとする神経伝達物質の減少が認められることが明らかにされている<sup>8)9)</sup>。また、サルを用いた実験においても、PCBは次世代サルの学習行動に障害を与えることが示唆されている<sup>10)</sup>。

内分泌かく乱化学物質の一つである bisphenol-Aは、phenolとacetoneとの縮合反応により合成され、主にポリカーボネート樹脂、エポキシ樹脂の原料としてプラスチック製の食品容器や歯科用材料などに広く使用されている。この

\* Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the central dopaminergic systems in mice.

\*\* Minoru NARITA, Ph.D., Kazuya MIYAGAWA, Mariko TOMITA, Keisuke MIZUO, Ph.D. &amp; Tsutomu SUZUKI, Ph.D.: 星薬科大学薬品毒性学教室(〒142-8501 東京都品川区荏原2-4-41); Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Science, Tokyo 142-8501, Japan.



bisphenol-Aは加熱により容易に溶出することが知られていることから、その安全性の確認が必要とされている。Bisphenol-Aの中樞神経系に対する影響については、bisphenol-Aの胎児期曝露ラットにおいて、青斑核の大きさなどの脳における性差が消失することや、雄性ラットにおける性行動の減少が報告されている<sup>11)12)</sup>。しかしながら、bisphenol-Aの性行動以外の中樞神経系に及ぼす影響についてはほとんど検討されていないのが現状である。

本稿では、最近著者らの得た知見をもとに、内分泌かく乱化学物質であるbisphenol-Aの中樞神経系、とくにdopamine神経系に及ぼす影響について概説する。

### Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による依存性薬物誘発数種薬理作用に対する影響

現在、わが国では第3次薬物乱用期を迎え、依存性薬物の乱用が若年層へ浸透していることが深刻な社会問題となっている。このような依存性薬物の精神依存発現には遺伝的素因のみならず、種々の環境的素因が影響を及ぼすことが広く知られている。そこで著者らは、このような環境的素因の一つとして内分泌かく乱化学物質の影響を考え、マウスの餌にbisphenol-Aを混入し、妊娠から離乳に至るまで母親マウスに与えることで作成したbisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露マウス(B0:コントロール, B0.002-B2: bisphenol-A 0.002-2 mg/g of food)を用い、代表的な依存性薬物であるmorphineおよびmethamphetamine誘発数種薬理作用に対する影響について検討した。その結果、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群においてはコントロール群と比較してmorphineおよびmethamphetamine誘発自発運動促進作用および報酬効果(精神依存)の有意な増強(図1)、さらには、methamphetamine間欠投与誘発逆耐性形成の増強がひき起こされることが初めて明らかになった(図2)。

この依存性薬物の精神依存形成や発現には腹側被蓋野から側坐核に投射している中脳辺縁dopamine神経系が深く関与していることが広く知られている。そこで、bisphenol-Aのdopamine

神経系に及ぼす影響について詳細に検討した。まず、dopamine受容体の機能変化を検討する目的で、<sup>35</sup>S]GTPγS binding assayを用い、側坐核を含む領域である前脳辺縁部におけるdopamine誘発Gタンパク質活性化作用について検討を行ったところ、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群においてはコントロール群と比較して有意なdopamine誘発Gタンパク質活性化作用が認められた(図3-A)。また著者らは、このbisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によるdopamine誘発Gタンパク質活性化作用の増強とdopamine受容体サブタイプとの関連を検討する目的で、選択的dopamine D<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるR(+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2,3,4,5-tetrahydro-1H-3-benzazepine (SCH23390)ならびに選択的dopamine D<sub>2</sub>受容体拮抗薬sulpirideを用いて拮抗試験を行った(図3-B)。その結果、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群で認められたdopamine誘発Gタンパク質活性化作用の増強は、SCH23390の併用によりコントロール群と同程度まで抑制された。しかしながら、sulpirideの併用ではbisphenol-Aの慢性曝露によってひき起こされるGタンパク質活性化作用の増強が維持されていた。これらのことから、bisphenol-A慢性曝露によるdopamine受容体の機能亢進は、主にdopamine D<sub>1</sub>受容体の機能亢進に由来する可能性が考えられる。そこで、RT-PCR法に従い、全脳におけるdopamine D<sub>1</sub>受容体mRNAの発現量を検討したところ、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群において、コントロール群と比較してdopamine D<sub>1</sub>受容体mRNA量の有意な増加が認められた。

一方、dopamine D<sub>3</sub>受容体は、側坐核、calleja島および嗅結節などの辺縁系に高密度に分布することから、薬物依存との関連性が注目されている。事実、当教室において、dopamine D<sub>3</sub>受容体遺伝子欠損マウス(D<sub>3</sub>KOマウス)がmorphineの報酬効果を増強させることを報告している<sup>13)</sup>。そこで、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群におけるdopamine D<sub>3</sub>受容体の機能変化について検討した。まず、受容体結合実験に従い、前脳辺縁部領域におけるdopamine D<sub>3</sub>受容体の変化について検討した。その結果、bisphenol-Aの

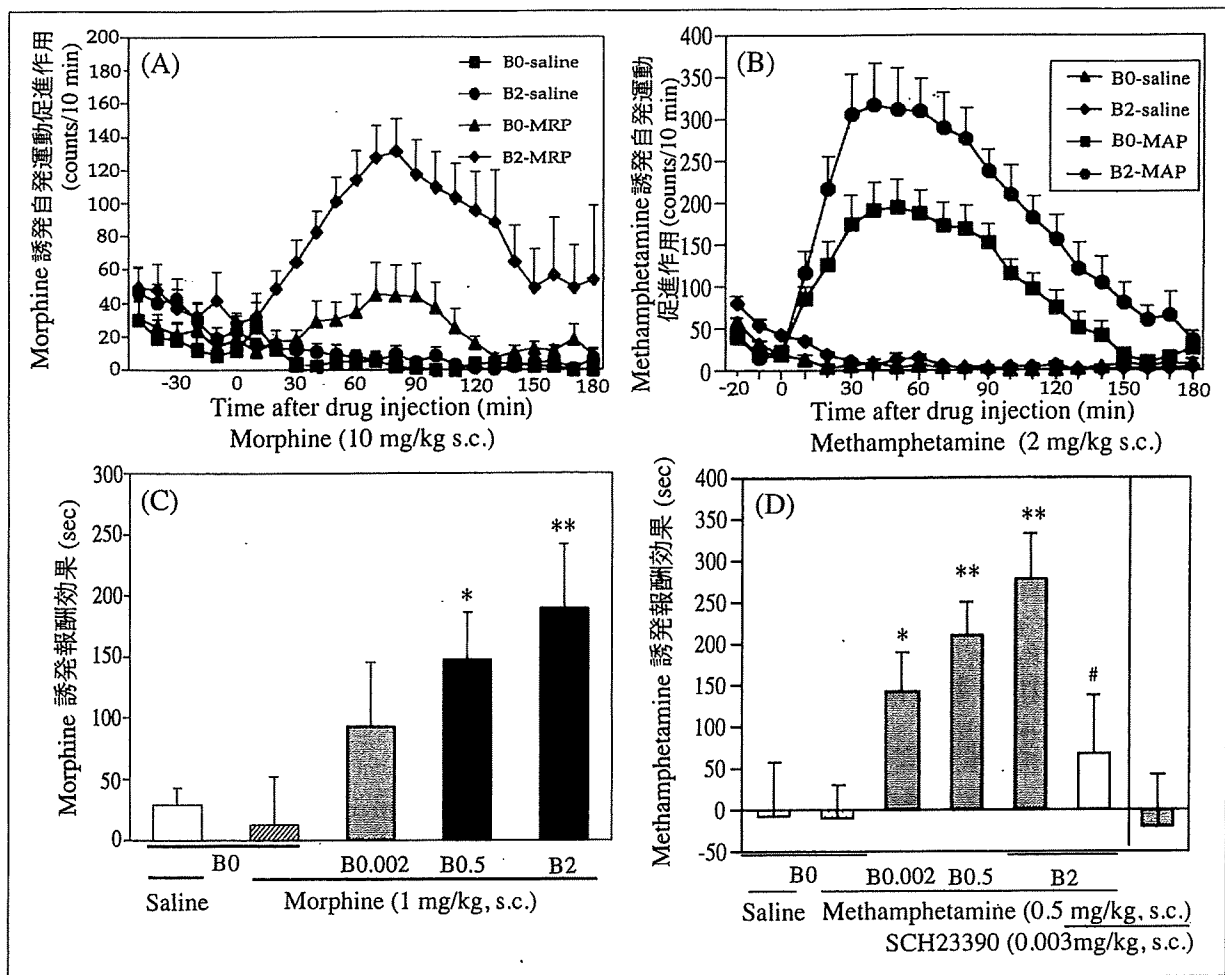


図1 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によるmorphine(A)およびmethamphetamine(B)誘発自発運動促進作用とmorphine(C)およびmethamphetamine(D)誘発報酬効果(精神依存)に対する影響

Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により, morphine(10mg/kg, s.c.)誘発自発運動促進作用(A)およびmethamphetamine(2 mg/kg, s.c.)誘発自発運動促進作用(B)の有意な増強が認められた。Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群により, コントロール群で報酬効果が認められない用量のmorphine(C; 1 mg/kg, s.c.)およびmethamphetamine(D; 0.5mg/kg, s.c.)において, bisphenol-Aの用量依存的な報酬効果増強が認められた。このmethamphetamine誘発報酬効果は, dopamine  $D_1$ 受容体拮抗薬であるSCH23390(0.003mg/kg, s.c.)の前処置により抑制された。(A) Each point represents the mean activity counts for 10min with S.E.M. of 9~10mice.  $F_{1,340} = 6.617, p < 0.05$  vs. B0 group; triangle. (B) Each point represents the mean activity counts for 10 min with S.E.M. of 9~10mice.  $F_{1,340} = 6.617, p < 0.05$  vs. B0 group; square. (C) Each column represents the mean place preference score with S.E.M. of 6~10mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. B0 group. (D) Each column represents the mean place preference score with S.E.M. of 4~10mice. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. B0 group, # $p < 0.05$  vs. B2-methamphetamine group.

胎児期および授乳期慢性曝露群において, Bmax値の有意な低下, すなわちdopamine  $D_3$ 受容体数の低下が認められた(図4-A~C)。次に, [ $^3S$ ]-GTP $\gamma$ S binding assayに従いdopamine  $D_3$ 受容体作動薬である7-hydroxy-N, N-di-n-propyl-2-aminotetralin(7-OH-DPAT)によるGタンパク質活性化作用を検討した。その結果, bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群の前脳辺縁部領域における7-OH-DPAT誘発Gタンパク質活性

化作用は, コントロール群と比較して有意な減少を示した(図4-D)。これらの条件下, 前脳辺縁部領域におけるdopamine  $D_2$ 受容体作動薬N-propylnorapomorphine(NPA)誘発Gタンパク質活性化作用は, bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により影響を受けなかった。これらのことから, bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によりdopamine  $D_3$ 受容体の機能が特異的に減弱することが明らかとなった。一方, RT-

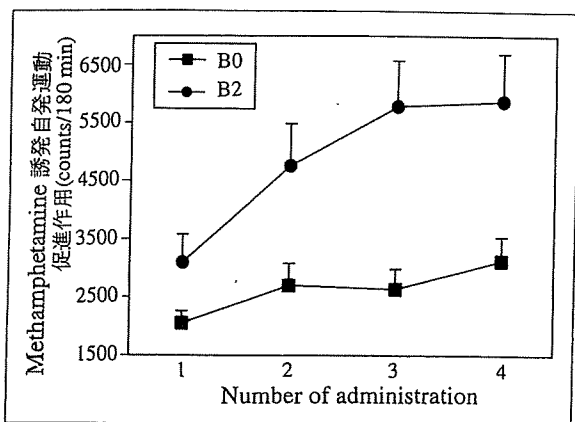


図2 Methamphetamine間欠投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成に及ぼすbisphenol-A胎児期および授乳期慢性曝露の影響

Bisphenol-A胎児期および授乳期慢性曝露により, methamphetamine間欠投与による逆耐性形成の有意な増強が認められた. Each point represents the mean total activity counts for 180min with S.E.M. of 9~10mice.  $F_{1,54}=9.459, p<0.01$  vs B0 group.

PCR法に従い 前脳辺縁部領域および中脳辺縁部領域におけるdopamine D<sub>3</sub>受容体mRNAの発現量

を検討したところ, bisphenol-Aの慢性曝露によっても有意な変化は示さなかった. これらの結果より, 胎児期および授乳期のbisphenol-A慢性曝露は受容体の新規合成に影響を与えず, dopamine D<sub>3</sub>受容体の代謝回転を亢進させる可能性が示唆された. このように著者らの研究により, 内分泌かく乱化学物質であるbisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露が, 中枢神経系, とくにdopamine神経系に直接的な影響を及ぼすという非常に興味深い事実が明らかとなった.

### Bisphenol-Aの作用機序

Bisphenol-Aはestrogen様作用を有することが示唆されている<sup>14)~16)</sup>. 近年, dopamine D<sub>1</sub>受容体の遺伝子上にはestrogen responsive element (ERE)が存在することが明らかとなり, estrogen処置によりdopamine D<sub>1</sub>受容体mRNAのup-regulationが引き起こされることが報告されている<sup>17)</sup>. このことから, bisphenol-Aの胎児期および授乳

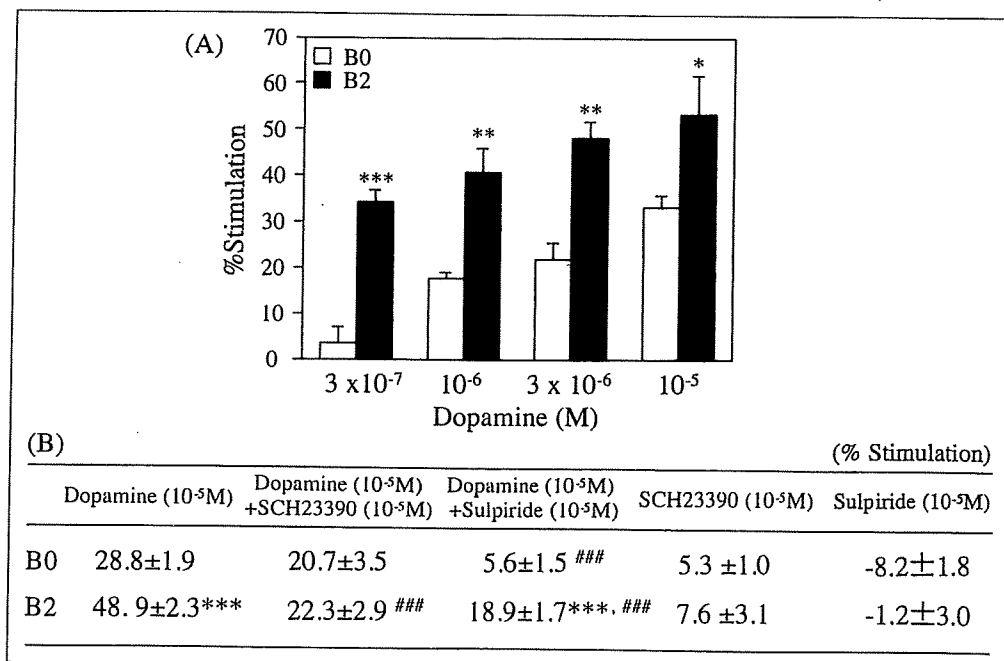


図3 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A)dopamine誘発 G タンパク質活性化作用に対する影響および(B)その効果におけるdopamine受容体サブタイプの関与 (A)Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により, 前脳辺縁部領域におけるdopamine誘発 G タンパク質活性化作用の有意な増強が認められた. (B)Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により引き起こされた前脳辺縁部におけるdopamine誘発 G タンパク質活性化作用の増強はdopamine D<sub>1</sub>受容体拮抗薬であるSCH23390の併用により抑制されたが, dopamine D<sub>2</sub>受容体拮抗薬であるsulpirideの併用によっては抑制されなかった. (A)Each column represents the mean with S.E.M. of 3 independent samples. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs. B0 group. (B)Each value represents the mean with S.E.M. of 3 independent samples. \*\*\* $p<0.001$  vs. B0 group, ### $p<0.001$  vs. dopamine alone.

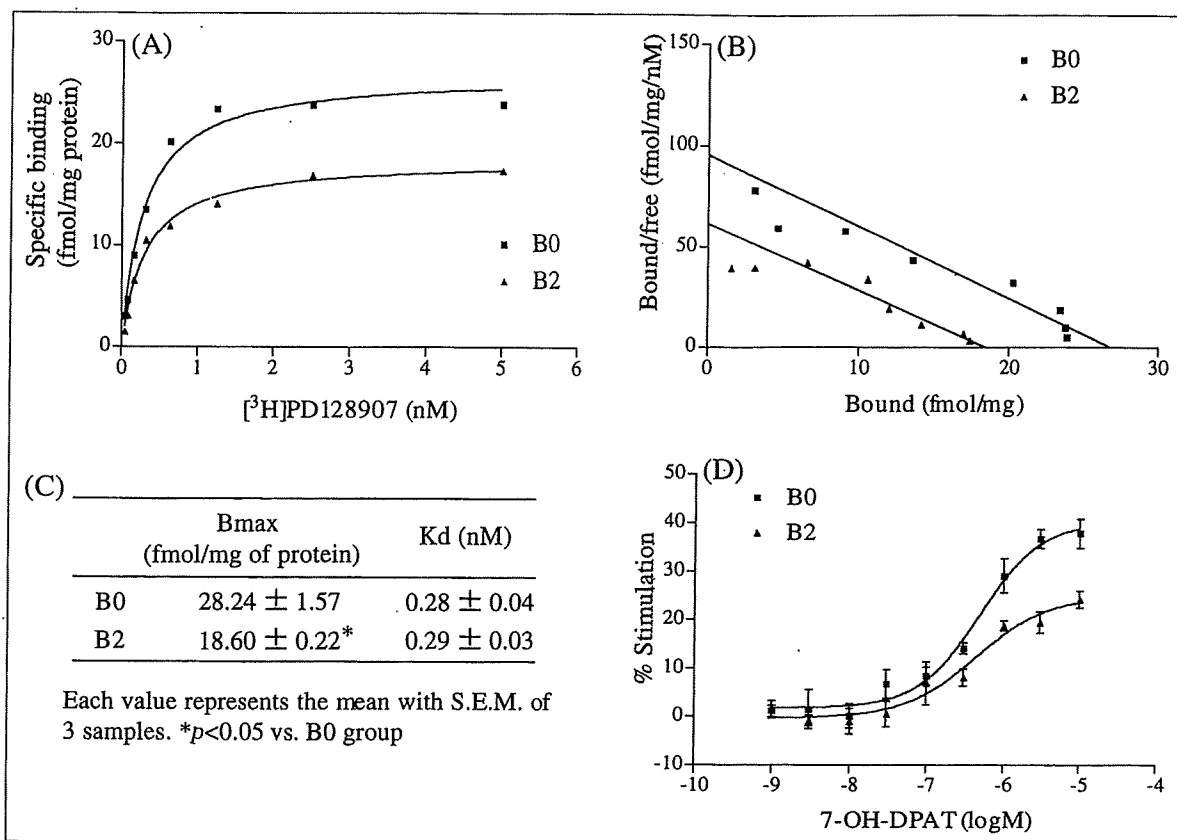


図4 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A~C)dopamine  $D_3$ 受容体に対するligandの結合能の変化と(D)dopamine  $D_3$ 受容体誘発 G タンパク質活性化作用に対する影響

(A~C) Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine  $D_3$ 受容体数の有意な低下が認められた。(D) Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により、前脳辺縁部領域における7-OH-DPAT誘発 G タンパク質活性化作用の有意な増強が認められた。(A~C) Each value represents the mean with S.E.M. of 3 samples. \* $p < 0.05$  vs. B0 group. (D)  $F_{1,174} = 30.45$ ,  $p < 0.001$  vs. B0 group. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. of 3 independent samples.

慢性曝露により引き起こされたdopamine  $D_1$ 受容体のup-regulationは、bisphenol-Aのestrogen様作用に起因している可能性が考えられる。しかしながら、bisphenol-Aのestrogen受容体に対する親和性は内因性estrogenである17 $\beta$ -estradiolの1/1,500であり、そのestrogen活性は1/100,000程度に過ぎない<sup>1)18)</sup>。このような背景から、著者らはbisphenol-Aのみならず、17 $\beta$ -estradiolの胎児期および授乳期慢性曝露マウス(Low-BPA: bisphenol-A 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  p.o., High-BPA: bisphenol-A 200mg/kg/day p.o., 17 $\beta$ -estradiol: 17 $\beta$ -estradiol 3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$  p.o.)を作成し、依存性薬物に対する感受性の変化について検討を行った。その結果、17 $\beta$ -estradiolの胎児期および授乳期慢性曝露群においては、bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露群で認められたようなmorphine誘発報酬効果の増強は認められなかつ

た。また、著者らはグリア細胞にも着目し、その変化を形態学的に解析することで、神経-グリア細胞間の相互作用に及ぼすbisphenol-A曝露の影響について、マウス中脳由来初代培養アストロサイトをを用いて検討した。その結果、低用量のbisphenol-Aを処置した細胞において、アストロサイトの肥大化、樹状突起の伸展といった形態変化が引き起こされた。さらに、この形態変化がアストロサイトの機能変化を伴うか否かについて検討する目的で、dopamine誘発細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の変化を測定したところ、無処置群と比較し、bisphenol-A処置群において有意な細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇が引き起こされた。このようなアストロサイトの形態変化や機能変化は、初代培養アストロサイトに覚せい剤であるmethamphetamineを処置した際と類似した反応である。なお、低用量17 $\beta$ -estradiolの処置では、このよう

な変化が認められなかった。これらのことから、bisphenol-Aはestrogen様作用とは異なった機構により依存性薬物に対する感受性を亢進させ、その機構の一つに、アストロサイトの活性化が関与している可能性が示唆された。

### Bisphenol-Aの慢性曝露による神経行動毒性発現と曝露時期の関連性

脳の機能的な発達過程において、もっとも外界から影響を受けやすいのは胎児期から授乳期にかけてである。成体の脳は血液-脳関門が発達しており、血液から薬物などの脳への侵入を防いでいる。この血液-脳関門は、授乳期以降に発達することが報告されているため<sup>19)</sup>、胎児期から授乳期にかけては血液-脳関門がほとんど形成されておらず、未発達であると考えられる。したがって、このような時期にbisphenol-Aの曝露を受けると、成体と比較して容易にbisphenol-Aが脳内へ移行することが推察される。事実、すでに述べたように、bisphenol-Aを胎児期から授乳期にかけて慢性的に曝露することにより脳内dopamine神経系の機能に影響を及ぼすことを明らかにした。さらにbisphenol-Aは、成体に対してはほとんど影響を及ぼさないことがすでに報告されている<sup>20)</sup>ことから、胎児期から授乳期におけるbisphenol-Aの容易な脳移行性が中枢神経系に影響を及ぼす一因となっている可能性が考えられる。

一般に、脳の発達において神経細胞の増殖は胎児期、とくに器官形成期にもっとも盛んに行われることが明らかにされている。そのため、生後の脳重量はほとんど変化しない。一方、脳の機能的な発達、すなわちシナプスの形成およびシナプス密度の増加に伴う神経ネットワークの構築は、出生後の授乳期においてもっとも盛んに行われていることが報告されている。著者らは、このような曝露時期の重要性を考え、bisphenol-Aの曝露時期を妊娠初期から授乳期まで4分割したマウスから生まれた仔を用いて、morphine誘発自発運動促進作用および報酬効果について検討した。その結果、コントロール群と比較して、器官形成期曝露群および授乳期曝露群ではmorphine誘発自発運動促進作用および

報酬効果の有意な増強が認められた。さらに、前脳辺縁部領域におけるdopamine誘発Gタンパク質活性化作用も同様の期間において有意な増強が認められた。これらのことから、血液-脳関門が未発達な時期であり、神経細胞の増殖および神経ネットワークの構築過程に非常に重要である器官形成期および授乳期におけるbisphenol-Aの慢性曝露は中枢神経系に対して多大な影響を及ぼすものと考えられる。

### まとめ

レイチェル・カールソンの『沈黙の春』が出版されて以来、環境中の化学物質は野生生物の個体群に対して、複雑で有害な影響を及ぼすことがあり、ヒトの健康は健全な環境と複雑に関連していることについての認識が深まってきている。とくに過去20年間には、内分泌システムを阻害する可能性のある化学物質への曝露から生じるヒトおよび野生生物における有害影響について、科学的関心、公開討論、メディアの注目などで増大している。一方、内分泌かく乱化学物質の中枢神経系に対する影響についての報告がされるようになったのはごく最近のことである。

生命発生以来30億年の間に存在しなかった何万種類もの化学物質が、近々100年間に環境中に放出されては、いくら生命体が適応能力に富んでいるとしても、それらに対応する時間的余裕はないであろう。このような状況では、内分泌かく乱化学物質が個体発生のプログラムに影響して、正常な発生を妨害する可能性が高い。成熟個体に対しては可逆的に影響する外因性の情報伝達物質も胎児期および授乳期の未熟な個体では不可逆的に作用しうることはサリドマイドの例をみるまでもなく、種の存続に打撃を与えることを意味する。内分泌かく乱化学物質の作用を評価する際、成熟生体と胎児期および授乳期の生体とを分けて、別個の視点から評価する必要があると考えられる。現在までに著者らが明らかにしている結果は、胎児期および授乳期にbisphenol-Aを含め内分泌かく乱化学物質を飲食物とともに摂取した母親から生まれた現代人が、依存性薬物による精神依存の形成に対する脆弱性が引き起こされている可能性を提示する

ものであり、第3次覚せい剤乱用期は、食生活などを背景とした環境因子もかかわっている可能性も否定できないことを示している。

### 文 献

- 1) Fry DM. Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals. *Environ Health Perspect* 1995 ; 7 : 165.
- 2) Kubiak TJ, Harris HJ, Smith LM, et al. Microcontaminants and reproductive impairment of the Forster's tern on Green Bay, Lake Michigan-1983. *Arch Environ Contam Toxicol* 1989 ; 18 : 706.
- 3) Woodward A, Percival H, Jennings M, et al. Low clutch viability of American alligators on lake Apopka. *Florida Science* 1993 ; 56 : 52.
- 4) Jobling S, Beresford N, Nolan M, et al. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod* 2002 ; 66 : 272.
- 5) Cochrane BJ, Irby RB, Snell TW. Effects of copper and tributyltin on stress protein abundance in the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Comp Biochem Physiol C* 1991 ; 98 : 385.
- 6) Harbst AL, Ulfelder H, Poskanzer DC. Adenocarcinoma of vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* 1971 ; 284 : 878.
- 7) Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *N Engl J Med* 1996 ; 335 : 783.
- 8) Schantz SL, Seo BW, Wong PW, et al. Long-term effects of developmental exposure to 2, 2', 3, 5', 6-pentachlorobiphenyl (PCB95) on locomotor activity, spatial learning and memory and brain ryanodine binding. *Neurotoxicology* 1997 ; 18 : 457.
- 9) Seegal RF, Bush B, Brosch KO. Decreases in dopamine concentrations in adult, non-human primate brain persist following removal from polychlorinated biphenyls. *Toxicology* 1994 ; 86 : 71.
- 10) Schantz SL, Bowman RE. Learning in monkeys exposed perinatally to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol Teratol* 1989 ; 11 : 13.
- 11) Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, et al. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 2002 ; 110 : 409.
- 12) Kubo K, Arai O, Ogata R, et al. Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett* 2001 ; 304 : 73.
- 13) arita M, Mizuo K, Mizoguchi H, et al. Molecular evidence for the functional role of dopamine D3 receptor in the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion. *J Neurosci* 2003 ; 23 : 1006.
- 14) Gaido KW, Leonard LS, Lovell S, et al. Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl Pharmacol* 1997 ; 143 : 205.
- 15) Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, et al. Bisphenol-A : an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993 ; 132 : 2279.
- 16) Olea N, Pulgar R, Perez P, et al. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect* 1996 ; 104 : 298.
- 17) Lee SH, Mouradian MM. Up-regulation of D1A dopamine receptor gene transcription by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 1999 ; 156 : 151.
- 18) Lutz I, Kloas W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors : Environmental pollution and estrogen receptor binding. *Sci Total Environ* 1999 ; 12 : 57.
- 19) Saunders NR, Mollgard K. Development of the blood-brain barrier. *J Dev Physiol* 1984 ; 6 : 45.
- 20) Cagen SZ, Waechter JM Jr, Dimond SS, et al. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 1999 ; 50 : 36.

\* \* \*

## RESEARCH ARTICLE

# Functional changes in dopamine D3 receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice

KEISUKE MIZUO, MINORU NARITA, TAKUYA YOSHIDA,  
MICHIKO NARITA & TSUTOMU SUZUKI

*Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,  
Tokyo, Japan*

### Abstract

*Bisphenol-A (BPA), one of the most common environmental endocrine disruptors, has been evaluated extensively for toxicity and carcinogenicity. However, little is still known about its action on the central nervous system (CNS). In the previous study, we found that prenatal and neonatal exposure to BPA markedly enhanced the rewarding effect induced by morphine. Here we found that prenatal and neonatal exposure to BPA resulted in the attenuation of dopamine D3 receptor-mediated G-protein activation by 7-OH-DPAT in the mouse limbic forebrain. This treatment also caused a significant decrease in the  $B_{max}$  value of [ $^3$ H]PD128907, a dopamine D3 receptor ligand, in this area. Under these conditions, no change in dopamine D3 receptor mRNA expression in the limbic forebrain and lower midbrain was observed by prenatal and neonatal exposure to BPA. The present data provide further evidence that prenatal and neonatal exposure to BPA leads to the reduction of functional dopamine D3 receptors without affecting the new synthesis of dopamine D3 receptors in the mouse limbic forebrain.*

### Introduction

Recently, the general public has received alarming reports regarding the reproductive and health hazards of endocrine-disrupting chemicals in the environment. It has been reported that administration of bisphenol-A (BPA) to pregnant mice on gestation days at a dose that is within the range typical of the environmental exposure of human produces significant changes in the postnatal growth rate and brings on early puberty in these mice.<sup>1</sup> These results imply that BPA may cause the unpleasant toxicity in the developmental

process. In contrast, little is known about the neuronal toxicity induced by BPA in the central nervous system (CNS). More recently, we have reported that prenatal and neonatal exposure to BPA enhances the methamphetamine-induced rewarding effect and central dopamine D1 receptor function in mice.<sup>2</sup>

The dopamine D3 receptor cloned by Sokoloff and colleagues has been characterized extensively.<sup>3</sup> The dopamine D3 receptor shows a distinct distribution in limbic areas of the brain, including the nucleus accumbens and olfactory

---

Correspondence to: Minoru Narita PhD, or Tsutomu Suzuki, PhD, Department of Toxicology, Hoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan. Tel/Fax: +81 3 5498 5831; E-mail: narita@hoshi.ac.jp or suzuki@hoshi.ac.jp

Received for publication 11th November 2003. Accepted 27th December 2003.

tubercle.<sup>3</sup> Several pharmacological studies with dopamine D<sub>3</sub> receptor-preferring agonists such as 7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin (7-OH-DPAT) suggest that the dopamine D<sub>3</sub> receptor regulates the inhibitory effect to produce hyperlocomotion in rodents.<sup>4,5</sup> In addition, we found that the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion were markedly enhanced in mice lacking dopamine D<sub>3</sub> receptor gene.<sup>6</sup> These findings suggest that the dopamine D<sub>3</sub> receptor plays a critical role in the psychoeffactive functions of dopamine neurotransmission.

The present study was then designed to investigate the changes in the function of dopamine D<sub>3</sub> receptors by prenatal and neonatal exposure to BPA in mice.

### Materials and method

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, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

### Animals

All experiments were performed using male ddY mice (8–12 weeks old) that had been exposed prenatally and neonatally to BPA. Prenatal and neonatal BPA exposure was conducted as described previously.<sup>2</sup> Adult female mice were chronically treated with BPA-admixed powder food containing 0 (B0) and 2 (B2) mg BPA/g of food from mating to weaning. Their pups were prenatally (about 3 weeks) and neonatally (about 2 weeks) exposed to the respective concentration of BPA from their mothers. During the treatment with BPA, animals did not show either weight loss or disrupted maternal behaviours.

### Membrane preparations

In the membrane preparation, mice were killed by decapitation and the limbic forebrain was then dissected as described previously.<sup>7</sup> The limbic forebrain was rapidly excised at 4°C, and the tissues were homogenized using a Potter-Elvehjem tissue grinder with a Teflon pestle in 20

volumes (w/v) of ice-cold Tris-Mg<sup>2+</sup> buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 mM EGTA for the [<sup>35</sup>S]GTPγS 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 or [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay buffer containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay buffer and stored at -70°C until used.

### [<sup>35</sup>S]GTPγS binding assay

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 7-OH-DPAT or a dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist N-propylnorapomorphine (NPA), 30 μM guanosine-5'-diphosphate (GDP) and 50 pM [<sup>35</sup>S]GTPγS (specific activity, 1000 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL). The reaction was terminated by filtration using a Brandle cell harvester and Whatman GF/B glass filters presoaked in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) and 5 mM MgCl<sub>2</sub> 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 the radioactivity in the samples was determined with a liquid scintillation analyser. Non-specific binding was measured in the presence of 10 μM unlabeled GTPγS. Comparable results were obtained from at least three independent sets of experiments.

### Dopamine D<sub>3</sub> receptor binding assay

The dopamine D<sub>3</sub> receptor binding assays were carried out in duplicate with [<sup>3</sup>H] PD128907 (specific activity, 111 Ci/mmol; Amersham, Arlington Heights, IL) at 0.039 to 5 nM in a final volume of 1.0 ml which contained 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 100 μM guanosine-5'-[β,γ-imido]triphosphate (Gpp(NH)p) and 0.1 ml of the homogenated membrane fraction. The amount of membrane proteins used in each assay was in the range of 90 to 140 μg, as determined by the method of Bradford.<sup>8</sup> The test tubes were incubated for 2 h at 25°C. The specific binding was defined as the difference in bindings observed in the absence and



presence of 10  $\mu$ M unlabeled PD128907. The incubation was terminated by collecting the membranes on Whatman GF/B filters using a Brandel cell harvester. The filters were then washed three times with 5 ml Tris-HCl buffer (pH 7.4) at 4°C and transferred to scintillation vials. Then, 0.5 ml of Soluene-350 (Packard Instrument Company, Inc, Meriden, CT) and 4 ml of Hionic Fluor Cocktail (Packard Instrument Company) were added to the vials. After a 12 h equilibration period, the radioactivity in the samples was determined in liquid scintillation analyzer.

#### RT-PCR assay

Total RNA in the limbic forebrain and lower midbrain were extracted using SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI). To prepare first strand cDNA, 1  $\mu$ g of RNA was incubated in 100  $\mu$ l of buffer containing 10 mM DTT, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix, 200 U of reverse transcriptase II (Gibco-BRL, Grand Island, NY) and 0.1 mM oligo (dt)<sub>12-18</sub> (Gibco-BRL). The dopamine D<sub>3</sub> receptor was amplified in a 50  $\mu$ l PCR solution containing 0.8 mM MgCl<sub>2</sub>, dNTP mix and DNA polymerase with synthesized primers: a sense primer of dopamine D<sub>3</sub> receptor, which is at position 391-407 (5'-

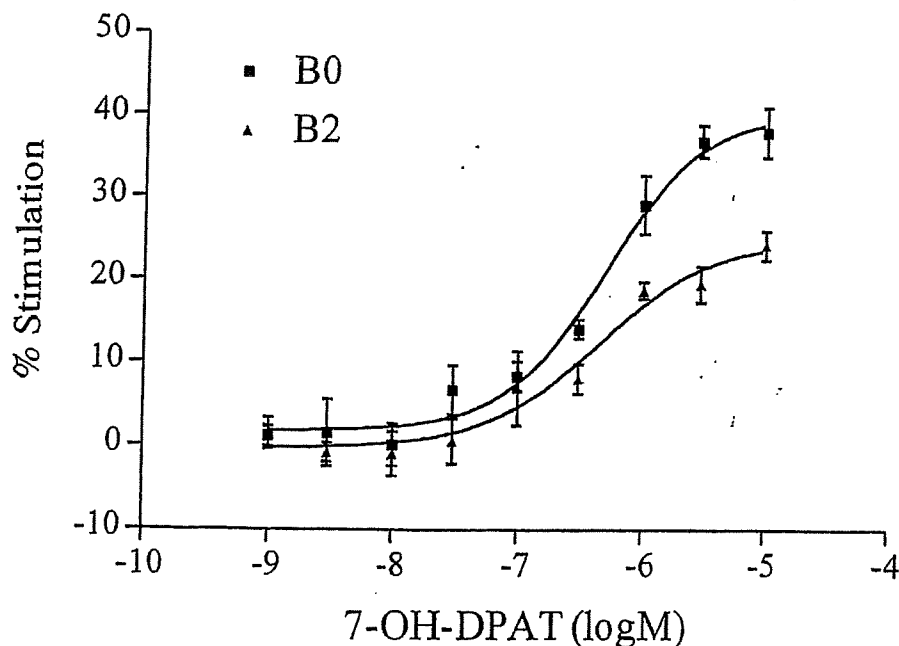
GCA GTG GTC ATG CCA GTT CAC TAT CAG-3') of the receptor, and an antisense primer at position 498 to 526 (5'-CCT GTT GTG TTG AAA CCA AAG AGG AGA GG-3'), which were designed according to sequence Accession nos U26915 in GenBank™.

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 mixture was run on 1% agarose gel electrophoresis with the indicated markers and primers of the internal standard GADPH. Three independent experiments were performed in this study. Semi-quantitation of the intensity of the bands for dopamine D<sub>3</sub> receptor/GADPH was conducted by using a NIH image.

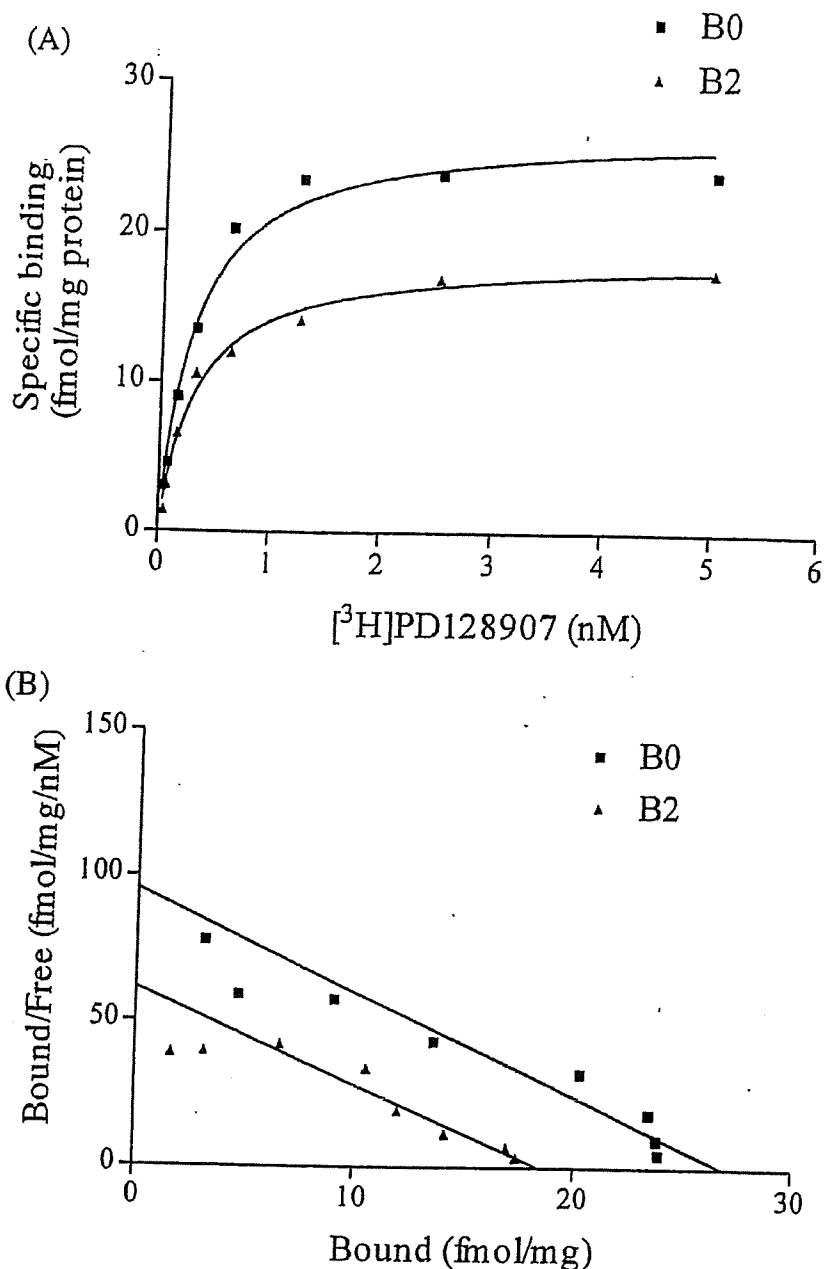
#### Results

##### *The attenuation of dopamine D<sub>3</sub> receptor-mediated G-protein activation in mice prenatally and neonatally exposed to BPA*

The dopamine D<sub>3</sub> receptor agonist 7-OH-DPAT (0.001-10  $\mu$ m) produced a concentration-dependent increase in [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding to membranes obtained from the limbic forebrain including the nucleus accumbens of B0 mice.



**Figure 1.** Comparison of the stimulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding by dopamine D<sub>3</sub> receptor agonist 7-OH-DPAT to membranes of the limbic forebrain obtained from control (B0: square) and BPA-treated (B2: triangle) mice. Membranes were incubated with [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (50 pM) and GDP (30  $\mu$ M) with 7-OH-DPAT (10<sup>-9</sup>-10<sup>-5</sup> M). The values are expressed as percentage increase of the value in B0 mice. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of three independent samples.

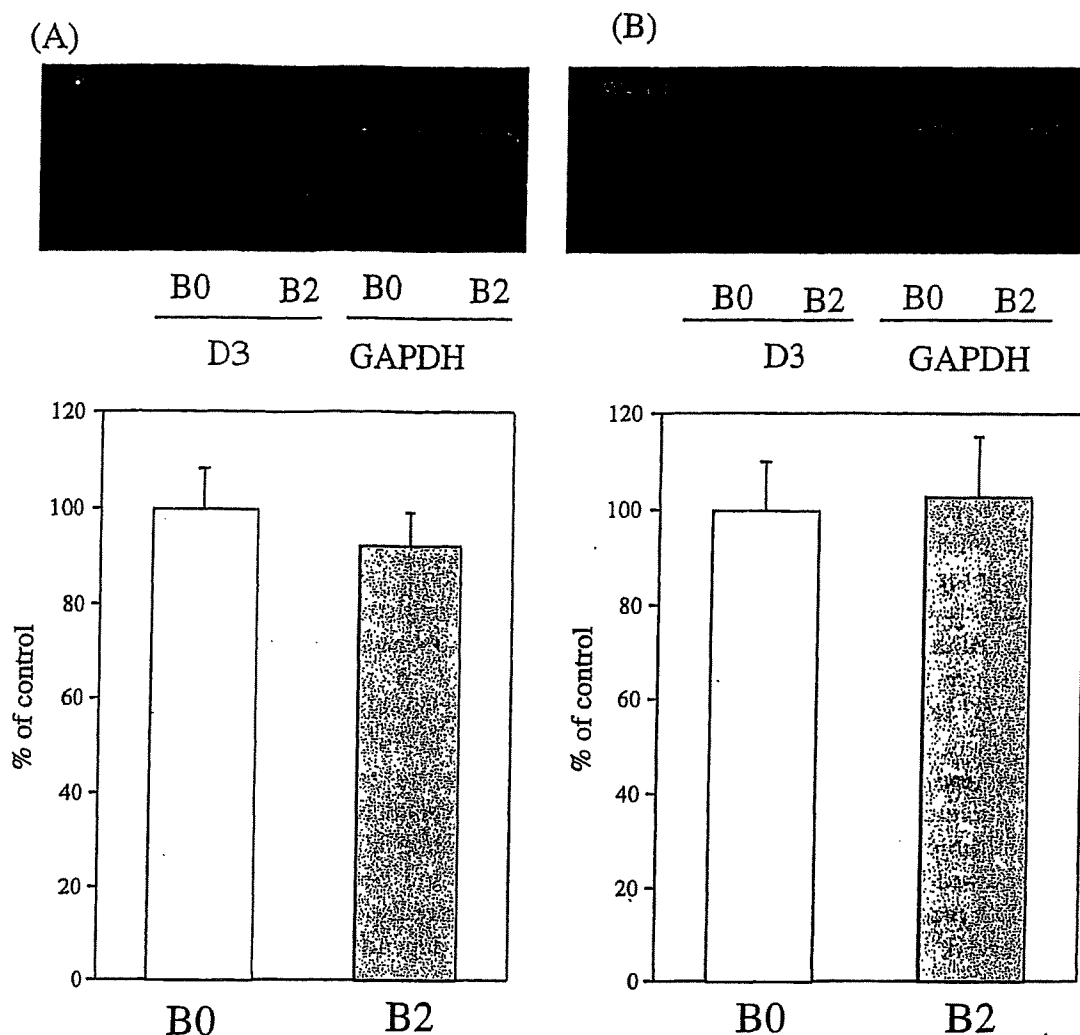


**Figure 2.** Decrease of dopamine D3 receptor density in the limbic forebrain obtained from mice prenatally and neonatally exposed to BPA. Saturation binding (A) and Scatchard analysis (B) were performed by receptor binding assay using  $[^3\text{H}]\text{PD128907}$ . Membranes were incubated with  $[^3\text{H}]\text{PD128907}$  (0.039–5.0 nM) and  $\text{Gpp}(\text{NH})\text{p}$  (100  $\mu\text{M}$ ).

The key finding of the present study was that the stimulation of  $[^3\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$  binding induced by 7-OH-DPAT was attenuated markedly in B2 mice ( $F_{1, 174} = 30.45$ ,  $p < 0.001$ ; Fig. 1). Under these conditions, the G-protein activation induced by the selective dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist N-propylnorapomorphine in the limbic forebrain was not affected by prenatal and neonatal exposure to BPA (only 3% increase; figure not shown).

*Decrease of dopamine D3 receptor density in the limbic forebrain obtained from mice prenatally and neonatally exposed to BPA*

To evaluate the population of dopamine D<sub>3</sub> receptors in the mouse brain, we performed the saturation-binding analysis using  $[^3\text{H}]\text{PD128907}$ . The saturation-binding curve and Scatchard analysis of  $[^3\text{H}]\text{PD128907}$  are shown in Fig. 2. The  $B_{\text{max}}$  and apparent  $K_d$  value are shown in Table 1. We found that prenatal and



**Figure 3.** No changes in the expression of dopamine D3 receptor mRNAs in the (A) limbic forebrain and (B) lower midbrain obtained from B0 and B2 mice. Upper panel: representative reverse transcription-polymerase chain reaction for dopamine D3 receptor mRNAs in the limbic forebrain and lower midbrain obtained from B0 and B2 mice. Lower panel: no changes in the expression of dopamine D3 receptor mRNAs in the limbic forebrain and lower midbrain obtained from B2 mice (hatched bar) compared to that from B0 mice (open bar). The values are expressed as a percentage of the value in B0 mice. Each column represents the mean  $\pm$  SEM of three independent samples.

**Table 1.** Dopamine D<sub>3</sub> receptor density and affinity performed by [<sup>3</sup>H]DPD128907 binding to the mouse brain membrane preparation from control (B0) and bisphenol A treated (B2) mice

	Bmax (fmol/mg of protein)	Kd (nM)
B0	28.24 $\pm$ 1.57	0.28 $\pm$ 0.04
B2	18.60 $\pm$ 0.22*	0.29 $\pm$ 0.03

Each value represents the mean with SEM of three samples. \* $p$  < 0.05 vs. B0 group

neonatal exposure to BPA caused the decrease of dopamine D3 receptor density in the mouse limbic forebrain.

No change in the expression of dopamine D3 receptor mRNAs in the limbic forebrain and lower midbrain obtained from mice prenatally and neonatally exposed to BPA

We also found that the expression of dopamine D3 receptor mRNA in the limbic forebrain and lower midbrain was not affected by prenatal and neonatal exposure to BPA (Fig. 3).

### Discussion

In the previous study, we demonstrated that prenatal and neonatal exposure to BPA enhanced the methamphetamine-induced rewarding effect associated with the moderate upregulation of

central dopamine D1 receptor function in mice.<sup>2</sup> In the present study, we found that the stimulation of [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S binding induced by 7-OH-DPAT was markedly attenuated in B2 mice. Under these conditions, the G-protein activation induced by the selective dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist N-propylnorapomorphine in the limbic forebrain was not affected by prenatal exposure to BPA.

To evaluate the population of dopamine D3 receptors in the membrane surface of the mouse brain, we performed a saturation-binding analysis using [<sup>3</sup>H]PD128907. In the present study, the density of dopamine D3 receptor was significantly decreased by chronic exposure to BPA. In addition, we found that the expression of dopamine D3 receptor mRNA in the limbic forebrain was not affected by prenatal and neonatal exposure to BPA. These findings suggest that chronic exposure to BPA caused the increase in dopamine D3 receptor turnover without any changes in newly synthesized receptors.

The dopamine D3 receptor is highly distributed in the nucleus accumbens, the terminal sites of the mesolimbic dopaminergic system.<sup>3,9</sup> This can be supported by the present finding that the dopamine D3 receptor expression was predominantly observed in the limbic forebrain. The limbic system-selective expression of the dopamine D3 receptor has led to particular interest in this receptor as a potential mediator of some of the psychoeffective functions of dopamine neurotransmission.<sup>10-13</sup> In the previous study, we demonstrated that the dopamine D3 receptor knockout mice exhibit the enhancement of morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion.<sup>5</sup> Furthermore, prenatal and neonatal exposure to BPA enhances the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion without direct changes in the  $\mu$ -opioid receptor function.<sup>14</sup> Thus, these findings provide the possibility that the dramatic suppression of postsynaptic dopamine D<sub>3</sub> receptor function in the nucleus accumbens may be, at least in part, involved in the enhancement of morphine-induced rewarding effect followed by chronic exposure to BPA.

The desensitization of G-protein-coupled receptors is mediated by the phosphorylation of serine and threonine residues within the intracellular domains of receptors.<sup>15</sup> Both second messenger-dependent kinases, such as protein kinase A and protein kinase C, and G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) have been shown to

contribute to the desensitization and internalization of activated dopamine receptors.<sup>16-18</sup> It has been reported recently that dopamine D3 receptor desensitization can be regulated by GRK3.<sup>19</sup> In the present study, we clearly observed the increase in dopamine D3 receptor turnover without any changes in newly synthesized receptors after chronic treatment with BPA. Taken together, a hypothesis would be advanced that, although further study is required, prenatal and neonatal exposure to BPA may lead to the changes in activities of these kinases associated with the turnover of dopamine D3 receptors.

In conclusion, the present study suggests that chronic exposure to BPA causes the inhibition of dopamine D3 receptor-mediated G-protein activation associated with the decrease in its receptor density in the limbic forebrain of mice. This phenomenon may, at least in part, contribute to the enhancement of morphine-induced rewarding effect by chronic exposure to BPA in mice. Public attention and research efforts are being driven by an understanding of the ever-increasing problems and magnitude of substance abuse. Our findings warn that prenatal and neonatal exposure to BPA in females may predispose their children to the psychological dependence of morphine.

#### Acknowledgements

This work was supported in part by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare and the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan.

#### References

1. Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS. Exposure to bisphenol-A advances puberty. *Nature* 1999;401:763-4.
2. Suzuki T, Mizuo K, Nakazawa H, *et al.* Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A enhances the central dopamine D1 receptor-mediated action in mice: enhancement of the methamphetamine-induced abuse state. *Neuroscience* 2003;117:639-44.
3. Sokoloff P, Giros B, Martres M-P, Bouthenet M-L, Schwartz J-C. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D3) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990;347:146-51.
4. Suzuki T, Maeda J, Funada M, Misawa M. The D3-receptor agonist (+/-)-7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin (7-OH-DPAT) attenuates morphine-induced hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 1995;187:45-8.