

436 Dopaminergic enhancement by bisphenol A

pH 7.4) containing 150 mM of NaCl, 5 mM of KCL, 1.8 mM of CaCl₂, 1.2 mM of MgCl₂, 25 mM of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid and 10 mM of D-glucose.

Prenatal and neonatal exposure to BPA

All experiments were performed using male ddY mice (7 weeks old) (Tokyo Laboratory Animals Science) that had been indirectly exposed prenatally and neonatally to BPA, administered to their mothers.

Mice were orally administered either olive oil (control; 0.1 mg/kg), BPA (3 µg/kg/day or 200 mg/kg/day) dissolved in olive oil (Wako Pure Chemicals) or E₂ (3 µg/kg/day) through the stomach sonde. Female mice (10 weeks old) were orally treated with these chemicals three times a day (08.00, 14.00 and 20.00 h); from mating to weaning. Therefore, these chemicals were administered during pregnancy (20 days) and lactation (21 days, total 41 days).

Place conditioning

The place-conditioning procedure has been used to evaluate the motivation properties, such as rewarding or aversive effects, of drugs in adult rodents (17). Place conditioning was conducted as previously described (5, 6). The apparatus was a shuttle box (15 × 30 × 15 cm: w × l × h), which was made of acrylic resin board and divided into two equal-sized compartments. One compartment is white with a textured floor, and the other is black with a smooth floor to create equally preferred compartments. For conditioning, groups of mice (seven mice in a group) were confined to one compartment after morphine injections (morphine-paired side) and to the other compartment after saline injection (saline-paired side). The order of the injection (drug or vehicle) and compartment (white or black) was counterbalanced across subjects. Conditioning sessions (3 days for morphine, 3 days for saline) were conducted once daily for 6 days. Immediately after s.c. injection of morphine (1 mg/kg), animals were placed in one compartment for 1 h. On alternate days, animals receiving the vehicle were placed in the other compartment for 1 h. On day 7, tests of conditioning were performed. The partition separating the two compartments was raised to 7 cm above the floor, and a neutral platform was inserted along the seam separating the compartments. The mice were not treated with either morphine or saline, and then placed on the platform. The time spent in each compartment during a 900-s session was then recorded automatically using an infrared beam sensor (KN-80, Natsume Seisakusyo Co., Tokyo, Japan). All sessions were conducted under conditions of dim illumination (28 lux lamp) and white masking noise.

Statistical analysis

Data for GFAP-like immunoreactivity and confocal Ca²⁺ imaging are presented as the mean ± SEM. The statistical significance of differences between the groups were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Student's t-test.

Conditioning scores for each mouse were obtained by subtracting the cumulative time spent in the saline-paired side from that in the morphine-paired side, and are expressed as means ± SEM. Statistical analysis for the place conditioning study was conducted using one-way ANOVA followed by Bonferroni/Dunnnett's test.

Results

BPA, but not E₂, causes the activation of astrocytes

To ascertain the effect of BPA in mouse purified midbrain astrocytes, we performed immunohistochemical staining with a

polyclonal antibody for GFAP. The results showed a biphasic response. Mouse midbrain purified astrocytes were treated with either normal medium or BPA (BPA: 10 fM, 100 fM, 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 µM) for 24 h. Treatment with BPA (100 fM, 1 pM, 10 pM, 10 nM, 100 nM or 1 µM) for 24 h caused a robust activation of mouse purified midbrain astrocytes, as detected by a stellate morphology and an increase in the levels of GFAP-like immunoreactivity ($P < 0.001$ versus control cells) (Fig. 1A,B). On the other hand, treatment with the mid-range dosed of BPA (10 fM, 100 pM, 1 nM) for 24 h failed to produce morphological changes in mouse purified midbrain astrocytes (Fig. 1A,B).

Unlike BPA, treatment with E₂ (10 fM to 1 µM, 24 h) failed to produce morphological changes in midbrain astrocytes at all concentrations tested (Fig. 1C,D).

We next explored the effect of BPA on mouse midbrain neurone/glia cocultures. In this culture system, numerous glial cells, especially astrocytes, surround neurones. Mouse midbrain neurone/glia cocultures were treated with either normal medium or BPA (BPA: 10 fM to 1 µM) for 24 h. In neurone/glia cocultures, BPA caused biphasic activations of astrocytes. Treatment with BPA (100 fM, 1 pM, 10 pM, 100 nM or 1 µM, 24 h) caused a robust activation of astrocytes in midbrain neurone/glia cocultures (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ versus control cells) (Fig. 2A,B), whereas treatment with BPA (10 fM, 100 pM, 1 nM or 10 nM, 24 h) failed to produce an increase in GFAP-like immunoreactivity in mouse midbrain neurone/glia cocultures. E₂ (10 fM to 1 µM) failed to produce an increase in GFAP-like immunoreactivity in mouse midbrain neurone/glia cocultures at any doses tested (Fig. 2C,D).

Enhancement of dopamine-induced Ca²⁺ responses by BPA

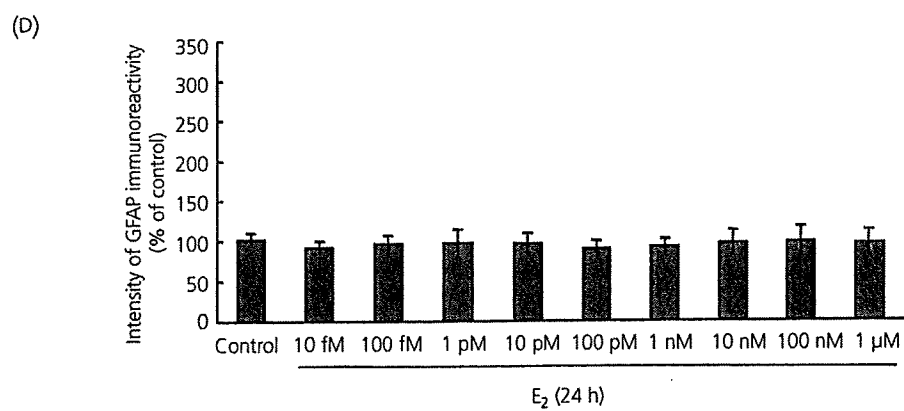
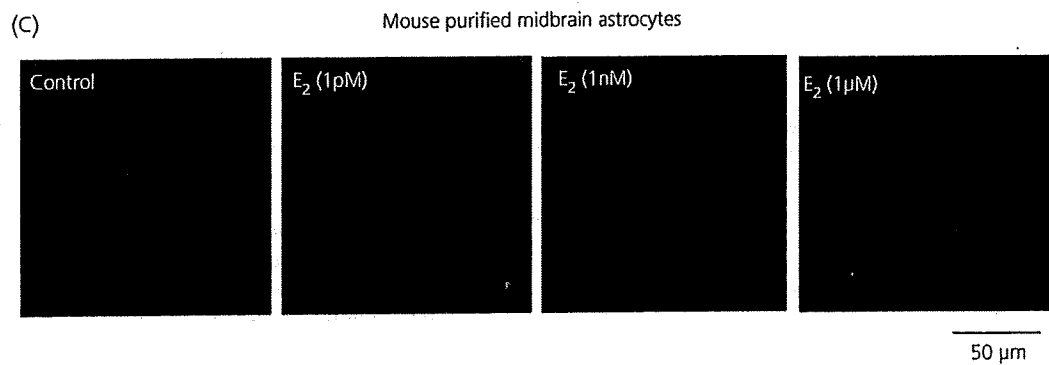
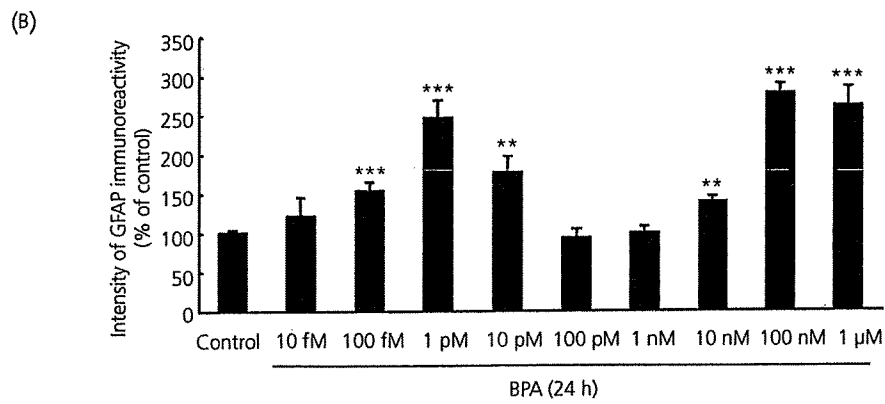
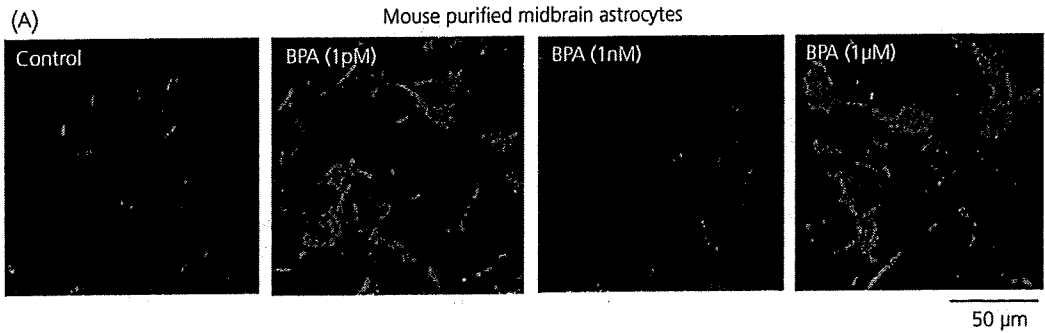
Dopamine (1–100 µM) produced a transient increase in the intracellular Ca²⁺ concentration in mouse purified midbrain astrocytes (Fig. 3). The Ca²⁺ responses to dopamine (100 µM) in astrocytes were significantly enhanced by pre-treatment with a low concentration of BPA (1 pM, 24 h, ** $P < 0.01$ versus control cells) (Fig. 3). By contrast, treatment with a high concentration of BPA (1 nM or 1 µM, 24 h) had no effect on the Ca²⁺ responses to dopamine in mouse purified midbrain astrocytes (Fig. 3).

Using immunocytochemical methods shown in Fig. 4(A) according to the study described previously (16), Neu-N-positive neurones are surrounded by GFAP-positive astrocytes in mixed neurone/glia cocultures. On the basis of morphological appearance, neurone-like cells were selected for the Ca²⁺ imaging studies. Under these criteria, dopamine (1–100 µM) produced a transient increase in the intracellular

Fig. 1. Treatment with bisphenol-A (BPA) for 24 h caused biphasic astrocytic activation in mouse purified midbrain astrocytes. (A) Mouse purified midbrain astrocytes were treated with normal medium or BPA (1 pM to 1 µM). The cells were stained with a polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP). (B) Mouse purified midbrain astrocytes were treated with normal medium or BPA (10 fM to 1 µM) for 24 h and stained with a polyclonal antibody to GFAP. The intensity of GFAP-immunoreactivity from ten areas in each image was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity is expressed as a percent increase (mean ± SEM) with respect to that in control cells. The experiments were repeatedly performed by at least three independent culture preparations. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ versus control cells. (C) Mouse purified midbrain astrocytes were treated with normal medium or 17β-oestradiol (E₂, 1 pM to 1 µM). The cells were stained with a polyclonal antibody to GFAP. (D) Mouse purified midbrain astrocytes were treated with normal medium or E₂ (10 fM to 1 µM) for 24 h and stained with a polyclonal antibody to GFAP. The intensity of GFAP-immunoreactivity from ten areas in each image was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity is expressed as a percent increase (mean ± SEM) with respect to that in control cells. The experiments were repeatedly performed by at least three independent culture preparations.

Ca²⁺ concentration in cultured midbrain neurone-like cells (Fig. 4B,C). These Ca²⁺ responses were significantly enhanced by treatment with a low concentration of BPA (1 pM, 24 h,

*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control cells) (Fig. 4B,C). Treatment with a high concentration of BPA (1 nM, 24 h) had no effect on the Ca²⁺ response to any



concentrations of dopamine, whereas the highest concentration of BPA (1 μM) suppressed the Ca^{2+} response to 100 μM dopamine (** $P < 0.001$ versus control cells) (Fig. 4B,C).

Effects of steroid hormone antagonists on the activation of astrocytes induced by BPA

To explore the involvement of steroid hormone receptor-dependent signalling in the activation of astrocytes, we next investigated whether steroid hormone antagonists could affect the BPA-induced increase in GFAP expression in midbrain astrocyte or neurone/glia cultures. The highly selective oestrogen receptor antagonist ICI182,780 (100 nM, 1 μM , 2 μM) was administered as pretreatment (24 h) and cotreatment (24 h) with BPA (1 pM, 1 μM) in both mouse purified midbrain astrocyte and neurone/glia cocultures. ICI182,780 failed to attenuate the activation of astrocytes induced by BPA (1 pM or 1 μM) (Fig. 5). Pretreatment (24 h) and cotreatment (24 h) with either the oestradiol receptor agonist/antagonist tamoxifen (100 nM, 1 μM or 10 μM), the progesterone receptor antagonist mifepristone (100 nM, 1 μM or 10 μM) or the androgen receptor antagonist flutamide (100 nM, 1 μM or 10 μM) failed to affect the activation of astrocytes induced by BPA (1 pM, 1 μM) in both mouse purified midbrain astrocytes (Fig. 6A–C) and neurone/glia cocultures (Fig. 6D–F). These results suggest that activation of astrocytes by BSA was not mediated via oestrogen receptors, progesterone receptors or androgen.

BPA-induced neuronal cell death

We next investigated whether *in vitro* treatment with either BPA or E_2 could induce neuronal cell death. Treatment with a high concentration of BPA (1 μM , 24 h) in mouse midbrain neurone/glia cocultures caused the robust activation of caspase-3, which is a marker of neuronal cell death (Fig. 7). Unlike BPA, a high concentration of E_2 failed to produce caspase-3 activation (Fig. 7).

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

Morphine modulates several physiological processes including a rewarding effect by stimulating opioid receptors. We previously reported that chronic treatment with morphine (3–5 mg/kg, s.c.) produced a robust place preference in mice (6, 8). However, chronic treatment with a low dose of morphine (1 mg/kg, s.c.) produced neither place preference nor place aversion in control mice (Fig. 8). On the other hand, treatment with 1 mg/kg of morphine produced a

significant place preference in mice whose mothers had been exposed to BPA at a dose of 200 mg/kg/day ($*P < 0.05$ versus control group) (Fig. 8). Treatment with morphine at 1 mg/kg also produced a significant place preference in offspring of mothers chronically treated with BPA at a dose of 3 $\mu\text{g/kg/day}$ ($*P < 0.05$ versus control group) (Fig. 8). By contrast, treatment with morphine at 1 mg/kg failed to produce a place preference in offspring of mothers that had been chronically treated with E_2 (3 $\mu\text{g/kg/day}$) (Fig. 8).

Discussion

A growing body of evidence suggests that astrocytes are important modulators of synaptic transmission. Astrocytes can respond to neurotransmitters released within the synapse by generating elevations in intracellular Ca^{2+} concentration and release glutamate and/or ATP that signal back to neurones (18, 19). Therefore, it is worthwhile to determine the effects of BPA on astrocytes. In the present study, we investigated the dopaminergic changes in neurones and astrocytes induced by BPA.

We show here for the first time that *in vitro* treatment with BPA caused morphological changes in GFAP-positive astrocytes. In addition, this effect of BPA was biphasic: treatment with 1 pM or 1 μM of BPA caused the robust activation of astrocytes, whereas treatment with 1 nM of BPA had no detectable effect on the morphology of astrocytes.

Inoue *et al.* (20) previously reported that the concentration of BPA was 0.32 ng/ml (approximately 1.4 pM) in normal human serum. Accordingly, it seems likely that 1 μM of BPA is higher than is commonly found in the environment. On the other hand, the amount of BPA that humans are exposed to results in the exposure of astrocytes to concentrations greater than 1 pM.

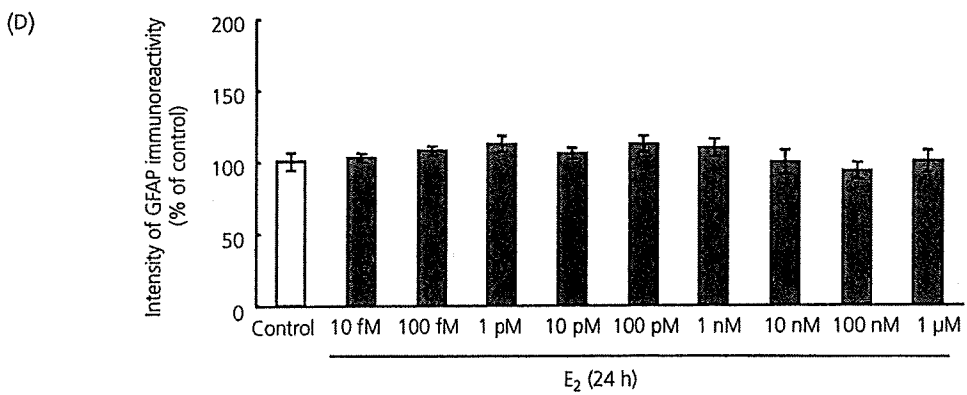
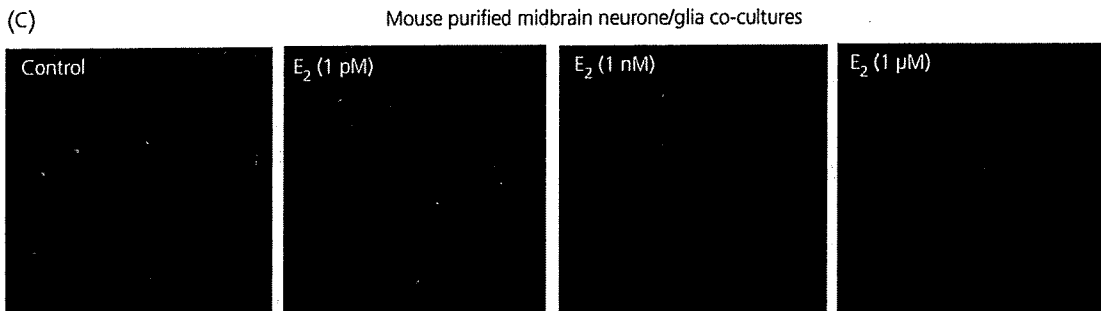
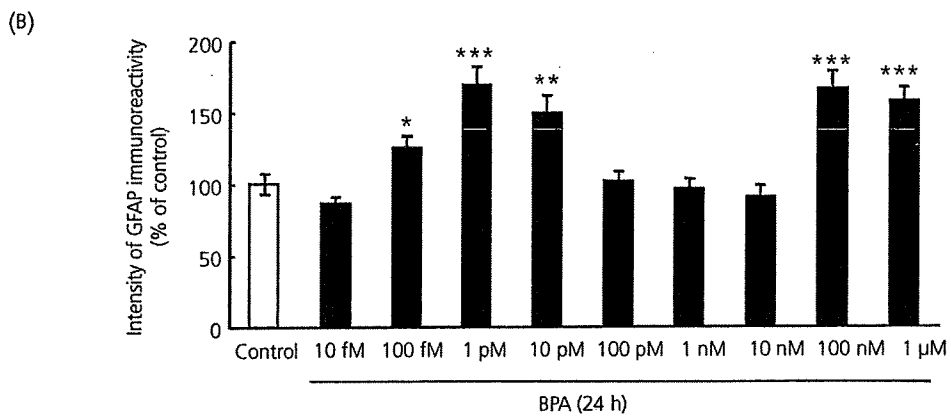
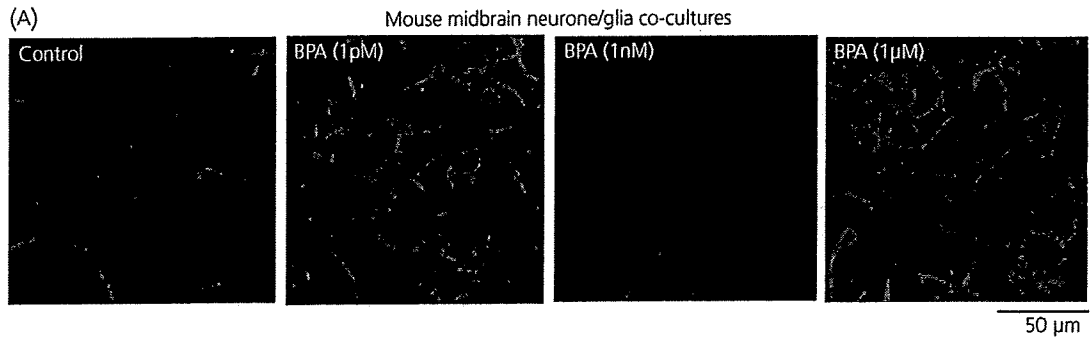
Neurones and astrocytes respond to various and chemical stimuli, including neurotransmitters, neuromodulators and hormones, with an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration. These Ca^{2+} responses result from the co-ordinated activity of several molecular cascades responsible for Ca^{2+} movement into or out of the cytoplasm by way of either the extracellular space or intracellular stores. We have demonstrated that the dopamine-induced Ca^{2+} responses in mixed cultures of neurones and astrocytes were significantly enhanced by treatment with BPA (1 pM, 24 h). These findings strongly support the idea that the enhancement of Ca^{2+} responses to dopamine induced by BPA could lead to an increase in the excitability of central dopaminergic neurotransmission.

It has been reported that the stimulation of dopamine D_1 receptor increased the intracellular Ca^{2+} concentration via

Fig. 2. Treatment with bisphenol-A (BPA) for 24 h caused biphasic astrocytic activation in mouse midbrain neurone/glia cocultures. (A) Mouse midbrain neurone/glia cocultures were treated with normal medium or BPA (1 pM to 1 μM). The cells were stained with a polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP). (B) Mouse midbrain neurone/glia cocultures were treated with normal medium or BPA (10 fM to 1 μM) for 24 h and stained with a polyclonal antibody to GFAP. The intensity of GFAP-immunoreactivity was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity from ten areas in each image is expressed as a percent increase (mean \pm SEM) with respect to that in control cells. ** $P < 0.001$, *** $P < 0.001$ versus control cells. The experiments were repeatedly performed by at least three independent culture preparations. (C) Mouse midbrain neurone/glia cocultures were treated with normal medium or 17 β -oestradiol (E_2 , 1 pM to 1 μM). The cells were stained with a polyclonal antibody to GFAP. (D) Mouse midbrain neurone/glia cocultures were treated with normal medium or E_2 (10 fM to 1 μM) for 24 h and stained with a polyclonal antibody to GFAP. The intensity of GFAP-immunoreactivity was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity is expressed as a percent increase (mean \pm SEM) with respect to that in control cells.

activation of the phospholipase C-inositol-1,4,5-triphosphate signalling pathway (21, 22). Dopamine-induced Ca^{2+} responses are also modulated by dopamine D_2 receptor (23,

24). On the other hand, dopamine D_3 receptor normally coexists with dopamine D_1 and D_2 receptors (25, 26), which contributes to the inhibitory modulation of dopamine D_1



and/or D₂ receptor-mediated signalling (7). We previously reported that prenatal and postnatal exposure to BPA (2 mg/g of mother's food) enhanced central dopamine D₁ receptor function (5) and attenuated dopamine D₃ receptor function in mice (27). Thus, the present data suggest that treatment with 1 pM of BPA may enhance dopamine D₁ receptor function and/or attenuate dopamine D₃ receptor function, resulting in enhancement of the dopamine-induced Ca²⁺ response in neurones and astrocytes.

In the present study, we observed morphological changes in astrocytes by treatment with either 1 pM or 1 μM of BPA. We also found a difference between 1 pM and 1 μM of BPA: treatment with BPA (1 pM) in midbrain neurone/glia cocultures clearly enhanced dopamine-induced Ca²⁺ responses in neurones, whereas treatment with BPA (1 μM) decreased dopamine-induced Ca²⁺ responses in neurones. Treatment with a high concentration of BPA markedly induced neuronal cell death in midbrain neurone/glia cocultures. Thus, these data suggest that a high concentration of BPA may lead to a dynamic change in the neurone-glia network, resulting in neurotoxicity.

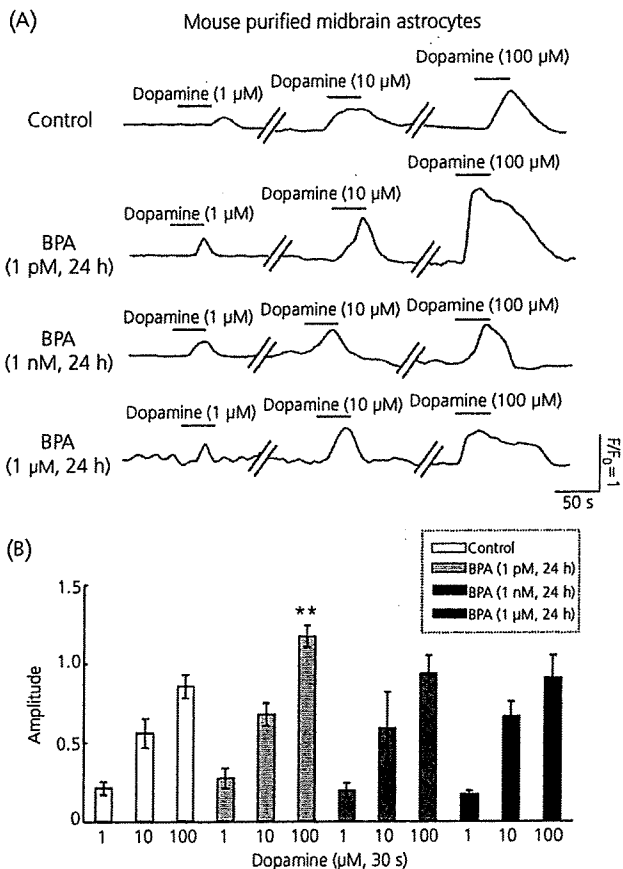


Fig. 3. The Ca²⁺ response to dopamine in astrocytes was significantly enhanced by treatment with a low concentration of bisphenol-A (BPA). (A) Traces show a typical increase in the intracellular Ca²⁺ concentration evoked by dopamine (1–100 μM) in control or BPA (1 pM, 1 nM or 1 μM) treated astrocytes. (B) The Ca²⁺ responses to dopamine (1–100 μM) in control and BPA (1 pM, 1 nM or 1 μM) treated astrocytes are summarised. Data represent the mean ± SEM of 27–63 cells. **P < 0.01 versus control cells.

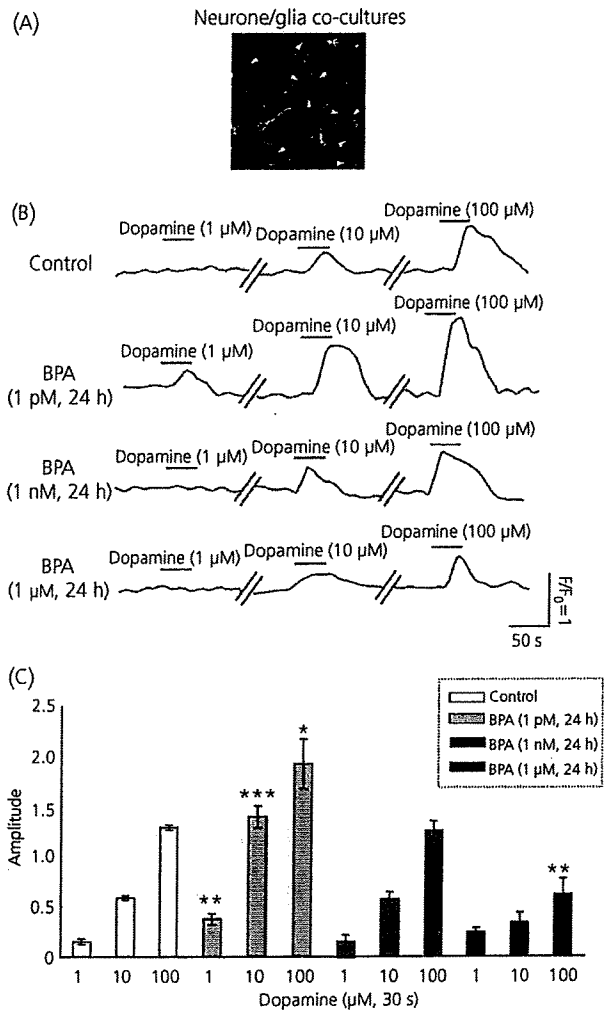


Fig. 4. The Ca²⁺ response to dopamine in neurones was significantly enhanced by treatment with a low concentration of bisphenol-A (BPA). (A) Mouse neurone/glia cocultures were stained with a mouse antibody to anti-neuronal nuclei (Neu-N) (red) and a rabbit antibody to glial fibrillary acidic protein (green). Arrow heads show Neu-N-positive neurones, which we used as cultures neurones for the Ca²⁺ imaging studies. (B) Traces show a typical increase in the intracellular Ca²⁺ concentration in control evoked by dopamine (1–100 μM) or BPA (1 pM, 1 nM or 1 μM) treated neurones. (C) The Ca²⁺ responses to dopamine (1, 10, 100 μM) in control and BPA (1 pM, 1 nM or 1 μM) treated neurones are summarised. Data represent the mean ± SEM of 27–63 cells. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001 versus control cells.

Similar to other drugs of abuse, the μ-opioid receptor agonist morphine acts as a rewarding stimulus when administered to animals (28). For example, rodents have been shown to intravenously self-administer morphine rather than saline when given a choice (29). Furthermore, μ-opioid receptor agonists can lower the electric current threshold for intracranial electrical self-stimulation, which indicates that opioids can facilitate the central reward mechanism itself. These positive motivational actions of opioids are indicative of their rewarding properties, and are considered to be fundamental for their ability to produce psychological dependence in humans (28).

As mentioned above, humans might be orally exposed to BPA in daily life. In a previous study, we chronically treated pregnant and lactating female mice with BPA-admixed powder food containing 2 mg of BPA/g of food, and this enhanced the development of rewarding effects induced by drugs of abuse in their adult offspring (5, 6). Under these conditions, mother mice received approximately 200 mg/kg/day of BPA. In addition, the blood level of BPA in their pups was approximately 10 ng/ml, which is considered to be more than 30-fold higher than the level for healthy human exposure (5). On the other hand, vom Saal *et al.* (30) estimated that humans are exposed to BPA at a dose of 2–20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. Based on these reports, we ascertained the effects of oral exposure to BPA. A group of mother mice were orally administered BPA at a dose of 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, which is considered to be a suitable dose to reflect environmental exposure to BPA. Another group of mother mice were orally administered BPA at a dose of 200 mg/kg/day, which is considered to be higher than the environmental exposure to BPA. We also investigated the effect of prenatal

and neonatal exposure to E_2 (3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) to compare its effects with those of BPA. Their pups, which were prenatally and postnatally exposed to BPA, were used in the place preference studies.

One of the most important aspects of the present study was that *in vivo* prenatal and neonatal exposure to BPA (3 μg or 200 mg/kg/day administered to pregnant and lactating dams) clearly enhanced the rewarding effect of morphine in mice. Although BPA at 200 mg/kg/day may be higher than the environmental exposure, BPA may be found in the environment at a level equivalent to 3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$. As mentioned above, *in vitro* experiments indicate that the enhancement of Ca^{2+} responses to dopamine induced by BPA could lead to an increase in the excitability of central dopaminergic neurotransmission in both neurones and astrocytes. These findings suggest that the enhancement of dopaminergic transmission in neurones and astrocytes induced by BPA may, at least in part, lead to enhancement of the development of psychological dependence on morphine.

BPA can modulate gene transcription and numerous biological changes via oestrogenic receptors (1, 31, 32). It has been reported that equal doses of BPA and E_2 could activate the transcription factor cAMP-responsive element binding protein (CREB) via nonclassical oestrogen receptor, resulting in the transcriptional activation of CREB-responsive genes (33). On the other hand, obvious differences between BPA and E_2 have also been reported. For example, E_2 at 10 nM reduced the duration of Ca^{2+} oscillations in mouse oocytes, whereas concentrations of BPA as high as 100 μM were necessary for similar inhibition (34). It has been reported that E_2 inhibits the astrocytic uptake of glutamate, which is the most important excitatory neurotransmitter in the CNS, whereas BPA has no such effect (35). Taken together, these observations suggest that BPA and E_2 may be coupled to different signalling cascades in the CNS.

Astrocytes are among of the most important target cells for E_2 . Astrocytes express all types of oestrogen receptors during development and in the adult brain (35–37). However, in the present study, neither the oestrogen receptor antagonist ICI182,780 nor the oestrogen receptor agonist/antagonist tamoxifen failed to block the activation of astrocytes induced by BPA. The progesterone receptor antagonist mifepristone and the androgen receptor antagonist flutamide also had no effect on the activation of astrocytes induced by BPA. Furthermore, E_2 had no effect on the activation of astrocytes in both purified astrocytes and neurone/glia cocultures. It appears likely that oestrogen receptors and other steroid hormone receptors may not be critical for the activation of astrocytes induced by BPA. We also found that prenatal and postnatal *in vivo* exposure to E_2 failed to enhance the rewarding effect of morphine in mice. These data suggest that oestrogenic neurotransmission is not essential for the enhancement of dopaminergic neurotransmission and hypersensitivity to the morphine-induced rewarding effect induced by exposure to BPA.

In conclusion, the results of the present study suggest that BPA induces dopaminergic amplification in neurones and astrocytes, and may contribute to potentiate the development

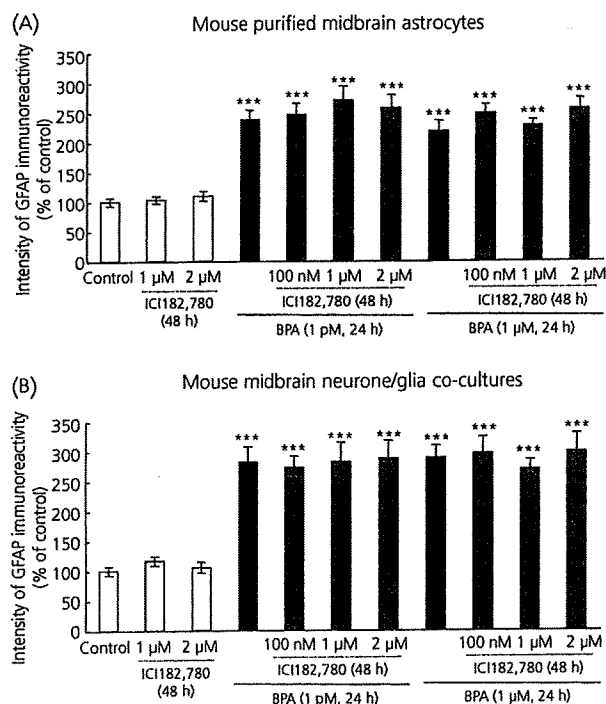


FIG. 5. The effect of ICI182,780 on astrocytic activation induced by bisphenol-A (BPA). Mouse purified midbrain astrocytes (A) or neurone/glia cocultures (B) were treated with normal medium (control) or ICI182,780 (100 nM, 1 μM or 2 μM) for 24 h. Cells were then treated with normal medium, BPA (1 pM or 1 μM) with or without ICI182,780 (100 nM, 1 μM or 2 μM) for an additional 24 h. The cells were stained with a polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP). The intensity of GFAP-immunoreactivity was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity is expressed as a percent increase (mean \pm SEM) with respect to that in control cells. *** $P < 0.001$ versus control cells. The white bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in the cells treated without BPA. The black bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in the cells treated with BPA. The grey bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in cells treated with BPA and ICI182,780.

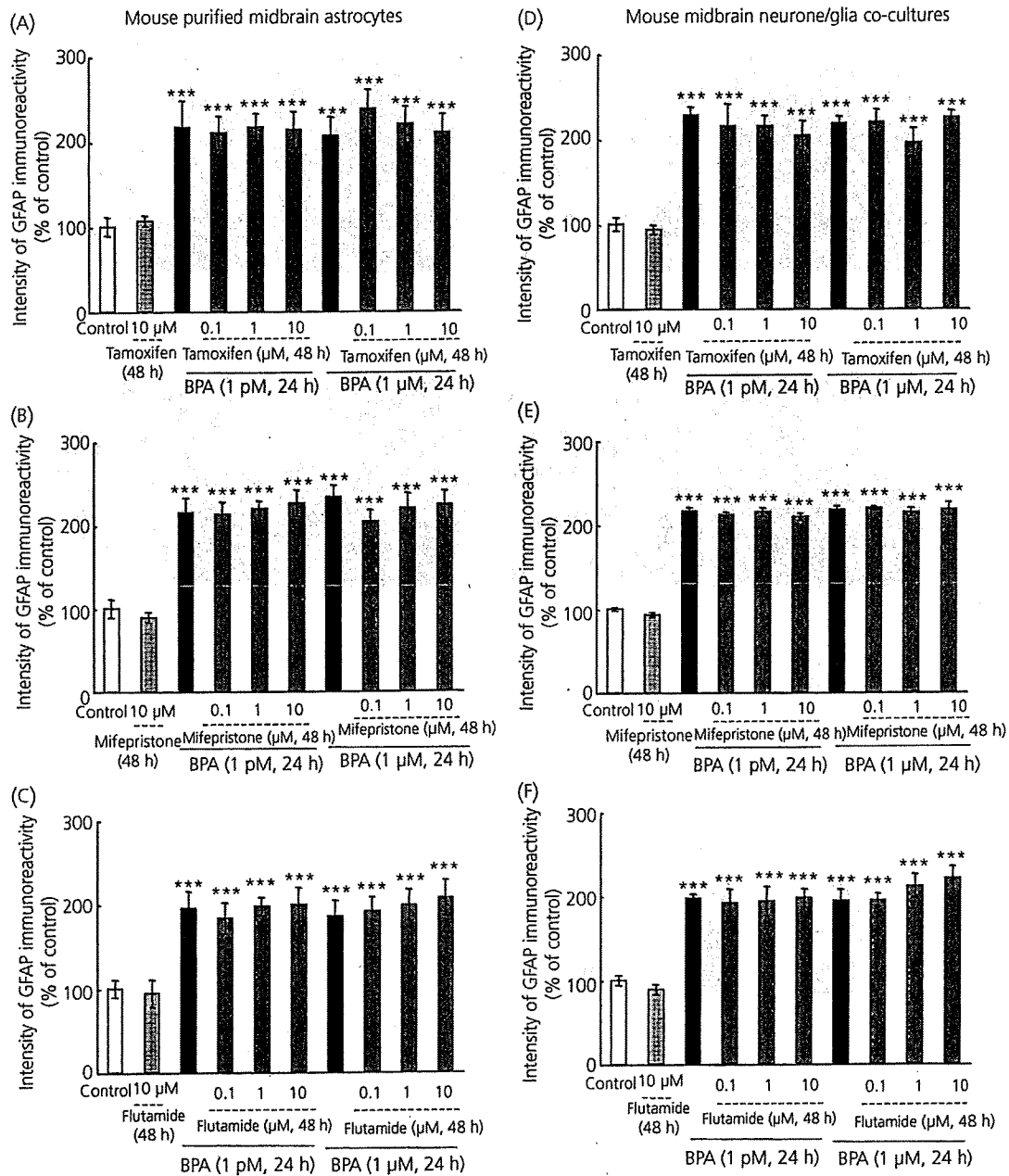


FIG. 6. Effects of steroid hormone ligands on astrocytic activation induced by bisphenol-A (BPA). Mouse purified midbrain astrocytes (A–C) or mouse midbrain neurone/glia cocultures (D–F) were treated with normal medium or tamoxifen (100 nM, 1 μM or 10 μM; A,D), mifepristone (100 nM, 1 μM or 10 μM; B,E) or flutamide (100 nM, 1 μM or 10 μM; C,F) for 24 h. Cells were then treated with normal medium, or medium that had been supplemented with BPA (1 pM, 1 μM) with or without tamoxifen (100 nM, 1 μM or 10 μM; A,D), mifepristone (100 nM, 1 μM or 10 μM; B,E) or flutamide (100 nM, 1 μM or 10 μM; C,F) for an additional 24 h. The cells were stained with a polyclonal antibody to glial fibrillary acidic protein (GFAP). The intensity of GFAP-immunoreactivity was measured using NIH Image. The level of GFAP-like immunoreactivity is expressed as a percent increase (mean ± SEM) with respect to that in control cells. *** $P < 0.001$ versus control cells (without BPA or any antagonists). The white bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in cells treated without BPA. The black bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in cells treated with bisphenol-A. The grey bars indicate the levels of GFAP-like immunoreactivity in cells treated with BPA and steroid hormone ligands.

of the rewarding effect of morphine. Drug abuse among the young is increasing worldwide. On the other hand, emotional fragility often plays a major role in leading people to drug abuse. Our findings warn that prenatal and postnatal

exposure to BPA may be linked to severe health problems in humans, including abnormalities in the CNS, resulting in an emotional sensitivity toward the development of dependence on drugs of abuse.

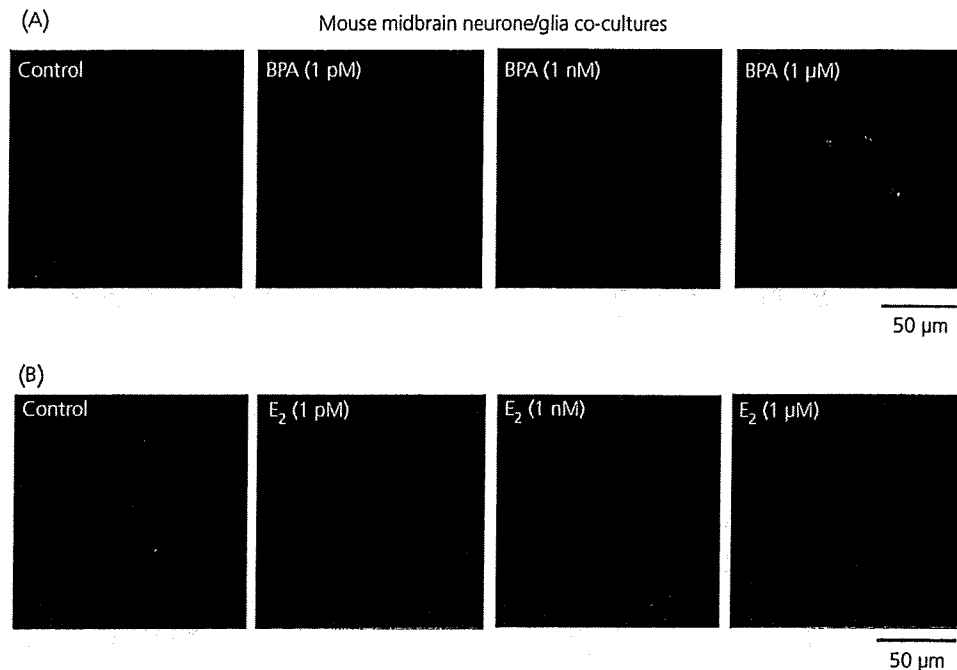


FIG. 7. A high concentration of bisphenol-A (BPA), but not 17 β -oestradiol (E₂), causes a neuronal cell death in mouse midbrain neurone/glia cocultures. Mouse midbrain neurone/glia cocultures were incubated with normal medium, BPA (1 pM, 1 nM or 1 μ M; A) or E₂ (1 pM, 1 nM or 1 μ M; B) for 24 h. All cells were stained with a polyclonal antibody to cleaved caspase-3.

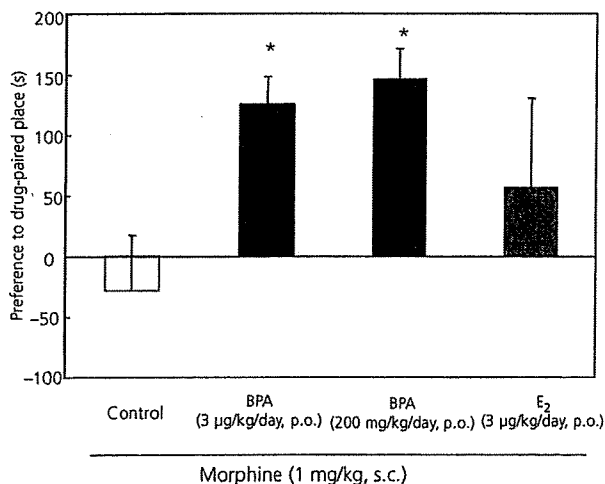


FIG. 8. Enhancement of the morphine-induced rewarding effect in mice that were prenatally and neonatally exposed to bisphenol-A (BPA). The control group did not show any place preference or place aversion with morphine (1 mg/kg s.c.). The BPA (3 μ g or 200 mg/kg/day) treated group showed a significant place preference induced by morphine (* P < 0.05 versus control group). The 17 β -oestradiol (E₂) (3 μ g/kg/day) treated group did not show any place preference or place aversion with morphine. Each column represents the mean \pm SEM place preference score of seven mice.

Acknowledgements

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

Accepted 6 March 2006

References

- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 1993; **132**: 2279–2286.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect* 1995; **103**: 608–612.
- Self DW. Regulation of drug-taking and -seeking behaviors by neuroadaptations in the mesolimbic dopamine system. *Neuropharmacology* 2004; **47** (Suppl. 1): 242–255.
- Ikemoto S, Wise RA. Mapping of chemical trigger zones for reward. *Neuropharmacology* 2004; **47**: 190–201.
- Suzuki T, Mizuo 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* 2003; **117**: 639–644.
- Mizuo K, Narita M, Miyagawa K, Narita M, Okuno E, Suzuki T. Prenatal and neonatal exposure to bisphenol-A affects the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion in mice. *Neurosci Lett* 2004; **356**: 95–98.
- Mizuo K, Narita M, Miyatake M, Suzuki T. Enhancement of dopamine-induced signaling responses in the forebrain of mice lacking dopamine D₃ receptor. *Neurosci Lett* 2004; **358**: 13–16.
- Narita M, Mizuo K, Mizoguchi H, Sakata M, Narita M, Tseng LF, Suzuki T. Molecular evidence for the functional role of dopamine D₃ receptor in the morphine-induced rewarding effect and hyperlocomotion. *J Neurosci* 2003; **23**: 1006–1012.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Rev* 1999; **30**: 77–105.

- 10 Little AR, O'Callaghan JP. Astroglialosis in the adult and developing CNS. is there a role for proinflammatory cytokines? *Neurotoxicology* 2001; **22**: 607–618.
- 11 Nestler EJ. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 119–128.
- 12 Hyman SE, Malenka RC. Addiction and the brain. the neurobiology of compulsion and its persistence. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 695–703.
- 13 Narita M, Miyatake M, Shibasaki M, Tsuda M, Koizumi S, Narita M, Yajima Y, Inoue K, Suzuki T. Long-lasting change in brain dynamics induced by methamphetamine. Enhancement of protein kinase C-dependent astrocytic response and behavioral sensitization. *J Neurochem* 2005; **93**: 1383–1392.
- 14 Cyr M, Calon F, Morissette M, Di Paolo T. Estrogenic modulation of brain activity. implications for schizophrenia and Parkinson's disease. *J Psychiatry Neurosci* 2002; **27**: 12–27.
- 15 McEwen BS, Alves SE. Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev* 1999; **20**: 279–307.
- 16 Miyatake M, Narita M, Shibasaki M, Namakura A, Suzuki T. *Eur J Neurosci* 2005; **22**: 1476–1488.
- 17 Suzuki T. Conditioned place preference in mice. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1996; **18** (Suppl. A): 75–83.
- 18 Fellin T, Carmignoto G. Neurone-to-astrocyte signalling in the brain represents a distinct multifunctional unit. *J Physiol* 2004; **559**: 3–15.
- 19 Haydon PG. Glia: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2001; **2**: 185–193.
- 20 Inoue K, Kato K, Yoshimura Y, Makino T, Nakazawa H. Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2000; **749**: 17–23.
- 21 Pacheco MA, Jope RS. Comparison of [³H]phosphatidylinositol and [³H]phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in postmortem human brain membranes and characterization of stimulation by dopamine D₁ receptors. *J Neurochem* 1997; **69**: 639–644.
- 22 Jin LQ, Goswami S, Cai G, Zhen X, Friedman E. SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D₁ dopamine receptors in the rat brain. *J Neurochem* 2003; **85**: 378–386.
- 23 Zhu WH, Conforti L, Millhorn DE. Expression of dopamine D₂ receptor in PC-12 cells and regulation of membrane conductances by dopamine. *Am J Physiol* 1997; **273**: C1143–C1150.
- 24 Takeuchi Y, Fukunaga K, Miyamoto E. Activation of nuclear Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and brain-derived neurotrophic factor gene expression by stimulation of dopamine D₂ receptor in transfected NG108-15 cells. *J Neurochem* 2002; **82**: 316–328.
- 25 Schwartz JC, Diaz J, Bordet R, Griffon N, Perachon S, Pilon C, Ridray S, Sokoloff P. Functional implications of multiple dopamine receptor subtypes: the D₁/D₃ receptor coexistence. *Brain Res Rev* 1998; **26**: 236–242.
- 26 Surmeier DJ, Eberwine J, Wilson CJ, Cao Y, Stefani A, Kitai ST. Dopamine receptor subtypes colocalize in rat striatonigral neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 10178–10182.
- 27 Mizuo K, Narita M, Yoshida T, Narita M, Suzuki T. Functional changes in dopamine D₃ receptors by prenatal and neonatal exposure to an endocrine disruptor bisphenol-A in mice. *Addict Biol* 2004; **9**: 19–25.
- 28 Narita M, Funada M, Suzuki T. Regulations of opioid dependence by opioid receptor types. *Pharmacol Ther* 2001; **89**: 1–15.
- 29 McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S. Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behav Brain Res* 1999; **101**: 129–152.
- 30 vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 1998; **14**: 239–260.
- 31 Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 1997; **105**: 70–76.
- 32 Petersen DN, Tkalcovic GT, Koza-Taylor PH, Turi TG, Brown TA. Identification of estrogen receptor β₂, a functional variant of estrogen receptor β expressed in normal rat tissues. *Endocrinology* 1998; **139**: 1082–1092.
- 33 Quesada I, Fuentes E, Viso-Leon MC, Soria B, Ripoll C, Nadal A. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17β-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 2002; **16**: 1671–1673.
- 34 Mohri T, Yoshida S. Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous [Ca²⁺]_i oscillations in mouse oocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **326**: 166–173.
- 35 Sato K, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K. Estrogens inhibit 1-glutamate uptake activity of astrocytes via membrane estrogen receptor alpha. *J Neurochem* 2003; **86**: 1498–1505.
- 36 Chaban VV, Lakhter AJ, Micevych P. A membrane estrogen receptor mediates intracellular calcium release in astrocytes. *Endocrinology* 2004; **145**: 3788–3795.
- 37 Hosli E, Jurasin K, Ruhl W, Luthy R, Hosli L. Colocalization of androgen, estrogen and cholinergic receptors on cultured astrocytes of rat central nervous system. *Int J Dev Neurosci* 2001; **19**: 11–19.

[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*¹ 水尾 圭祐*¹ 宮川 和也*¹ 成田 年*¹*¹ 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 D₁ 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 D₁ 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 D₃ 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 D₃ 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 D₃ 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 D₃ 受容体の機能低下ならびに dopamine D₁ 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.

*¹ 〒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 γ -aminobutyric acid (GABA) 神経上に存在する μ -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 μ -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 γ 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 μ -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 D₁ 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 D₁ 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 γ 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 D₂ 受容体拮抗薬である sulpiride の併用では抑制されず、dopamine D₁ 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 D₁ 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 D₃ 受容体に及ぼす影響

Dopamine D₃ 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 D₃ 受容体遺伝子欠損マウス (D₃KO 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 D₃ 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 D₃ 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、

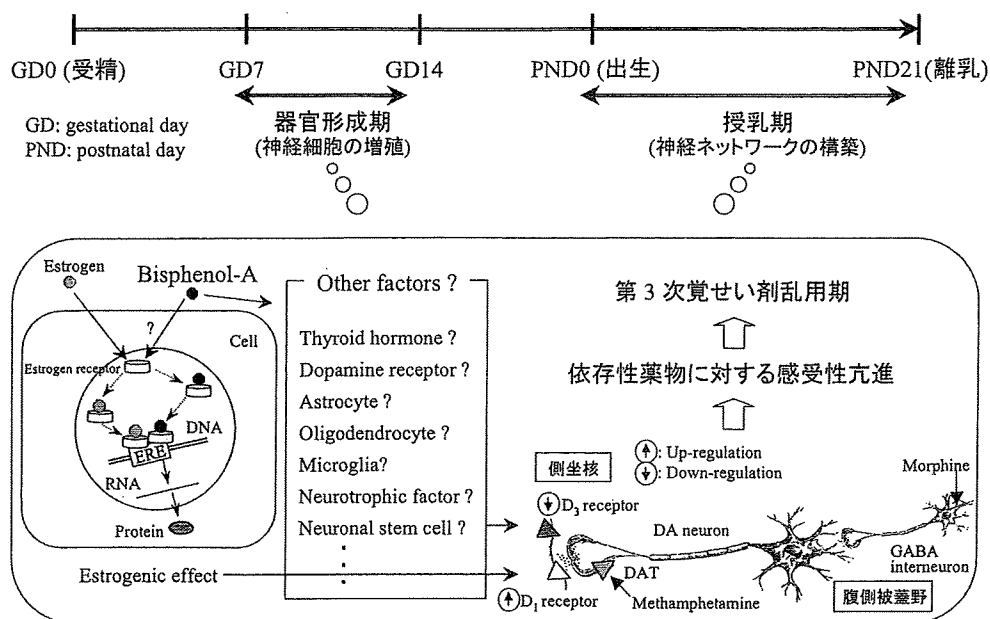


図1 Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により依存性薬物に対する感受性亢進のメカニズム。Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine D₃ 受容体の機能低下と dopamine D₁ 受容体の機能亢進が引き起こされ、依存性薬物に対する感受性の亢進が引き起こされる。さらに、神経細胞の増殖のピークとなる器官形成期や神経ネットワークの構築に非常に重要な時期である授乳期における bisphenol-A 曝露が特に大きな影響を及ぼす可能性が示唆される。Bisphenol-A は estrogen 受容体 (ER) に結合し、DNA 上の estrogen 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 D₃ 受容体作動薬の放射ラベル体である [³H]7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin ([³H]7-OH-DPAT) を用いて結合実験を行ったところ、K_d 値には変化が認められず、B_{max} 値の有意な低下、すなわち dopamine D₃ 受容体数の低下が認められた。次に、[³⁵S]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 D₃ 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 D₃ 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 D₃ 受容体の新規合成に影響を与えず、dopamine D₃ 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 D₃ 受容体の機能低下に伴った dopamine D₁ 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.
- Farabollini, 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 D₃ 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 D₃ 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 D₁ 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 D₃ receptor and an up-regulation of dopamine D₁ 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 D₁ 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¹⁾⁻³⁾。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⁴⁾。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⁵⁾。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⁶⁾。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⁷⁾。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⁸⁾⁹⁾。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¹⁰⁾。

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. & 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¹¹⁾¹²⁾。しかしながら、bisphenol-Aの性行動以外の中枢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の中枢神経系、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、³⁵S]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 D₁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 D₂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 D₁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 D₁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 D₁受容体mRNA量の有意な増加が認められた。

一方、dopamine D₃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 D₃受容体遺伝子欠損マウス(D₃KO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¹³⁾。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 D₃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 D₃受容体の変化について検討した。その結果、bisphenol-Aの

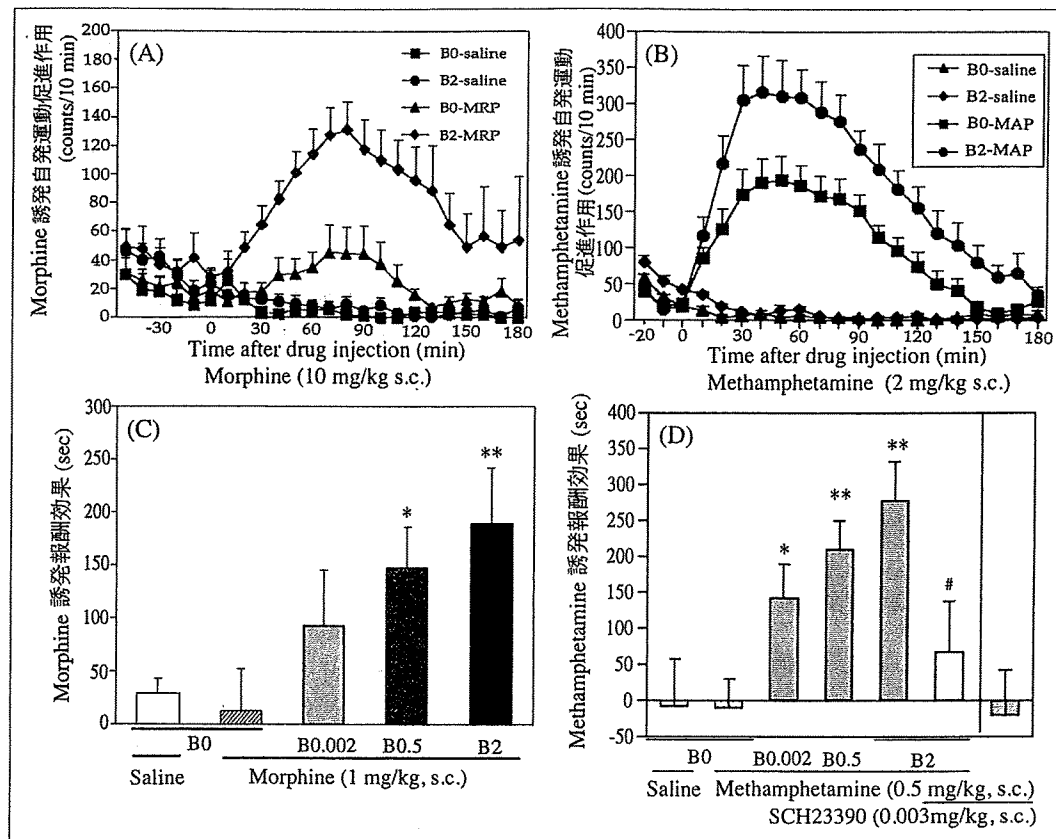


図1 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によるmorphine(A)およびmethamphetamine(B)誘発自発運動促進作用とmorphine(C)およびmethamphetamine(D)誘発報酬効果(精神依存)に対する影響

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 D₁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 D₃受容体数の低下が認められた(図4-A~C)。次に, [³⁵S]-GTPγS binding assayに従いdopamine D₃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 D₂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 D₃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-

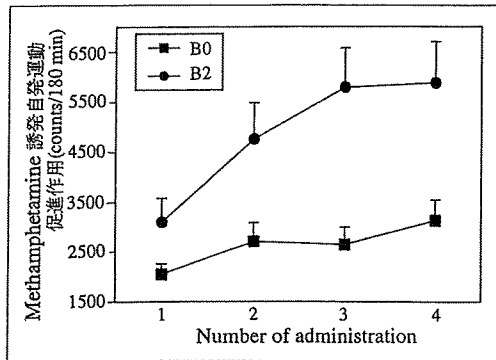


図2 Methamphetamine間欠投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成に及ぼすbisphenol-A胎児期および授乳期慢性曝露の影響

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 D₃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 D₃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^{14)~16)}。近年, dopamine D₁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 D₁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¹⁷⁾。このことから, bisphenol-Aの胎児期および授乳

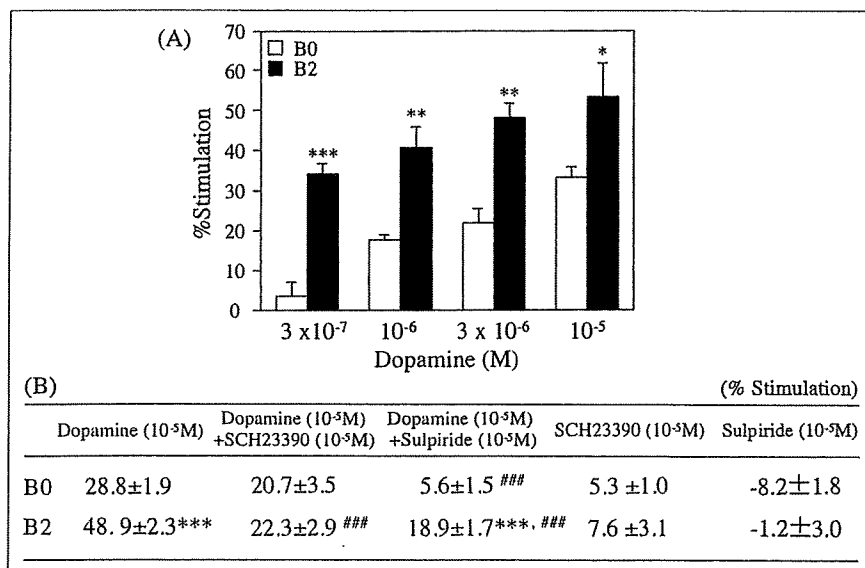


図3 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A)dopamine誘発Gタンパク質活性化作用に対する影響および(B)その効果におけるdopamine受容体サブタイプの関与 (A)Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により, 前脳辺縁部領域におけるdopamine誘発Gタンパク質活性化作用の有意な増強が認められた。(B)Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露により引き起こされた前脳辺縁部におけるdopamine誘発Gタンパク質活性化作用の増強はdopamine D₁受容体拮抗薬であるSCH23390の併用により抑制されたが, dopamine D₂受容体拮抗薬である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.

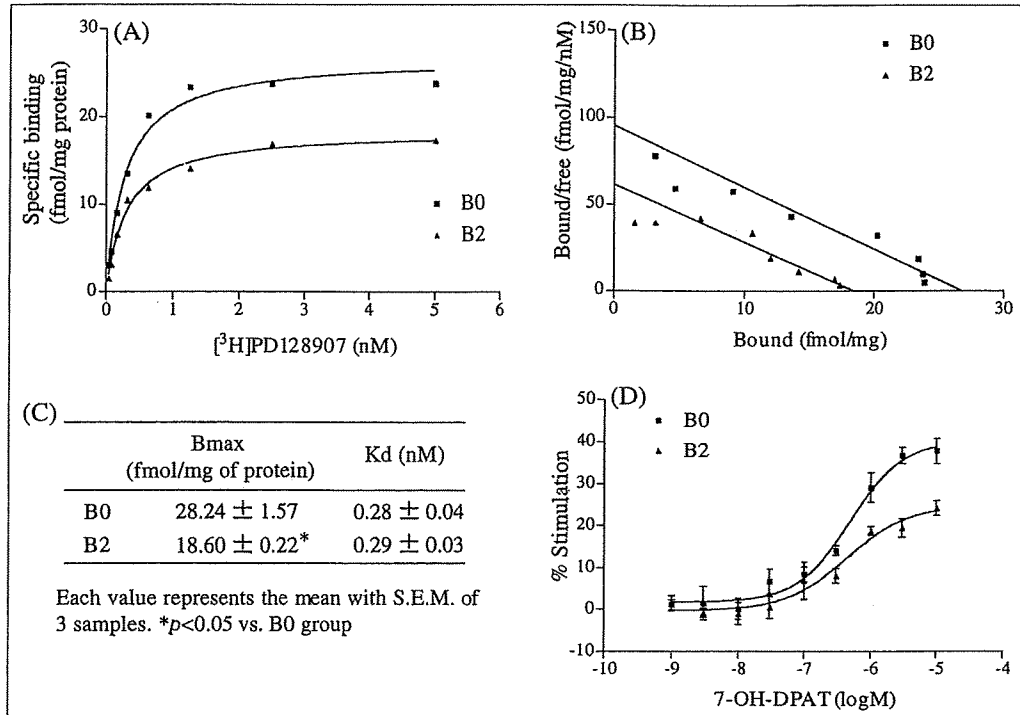


図4 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A~C)dopamine D_3 受容体に対するligandの結合能の変化と(D)dopamine D_3 受容体誘発Gタンパク質活性化作用に対する影響

(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 ± S.E.M. of 3 independent samples.

期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 β -estradiolの1/1,500であり、そのestrogen活性は1/100,000程度に過ぎない^{11,18)}。このような背景から、著者らはbisphenol-Aのみならず、17 β -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 β -estradiol: 17 β -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 β -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、マウス中脳部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 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 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 β -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¹⁹⁾、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²⁰⁾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が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ひ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.

* * *