

FIG. 7. A high concentration of bisphenol-A (BPA), but not 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>), 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  $\mu$ M; A) or E<sub>2</sub> (1 pM, 1 nM or 1  $\mu$ M; B) for 24 h. All cells were stained with a polyclonal antibody to cleaved caspase-3.

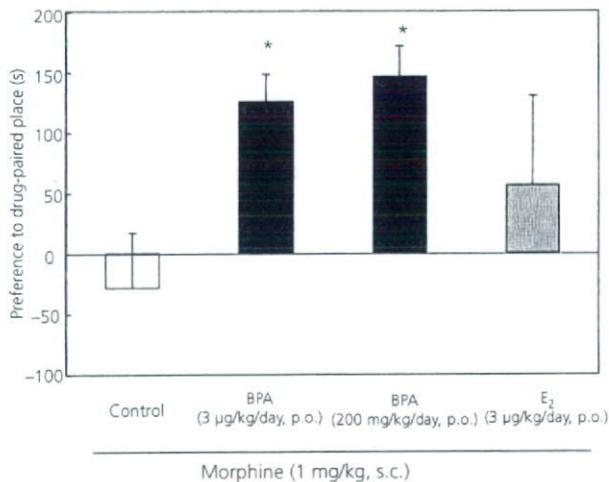


FIG. 8. Enhancement of the morphine-induced rewarding effect in mice that were prenatally and neonatally exposed to bisphenol-A (BPA). The control group did not show any place preference or place aversion with morphine (1 mg/kg s.c.). The BPA (3  $\mu$ g or 200 mg/kg/day) treated group showed a significant place preference induced by morphine (\* $P$  < 0.05 versus control group). The 17 $\beta$ -oestradiol (E<sub>2</sub>) (3  $\mu$ 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 D<sub>1</sub> 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 D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub> 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 [<sup>3</sup>H]phosphatidylinositol and [<sup>3</sup>H]phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in postmortem human brain membranes and characterization of stimulation by dopamine D<sub>1</sub> receptors. *J Neurochem* 1997; **69**: 639–644.
- 22 Jin LQ, Goswami S, Cai G, Zhen X, Friedman E. SKF83959 selectively regulates phosphatidylinositol-linked D<sub>1</sub> dopamine receptors in the rat brain. *J Neurochem* 2003; **85**: 378–386.
- 23 Zhu WH, Conforti L, Millhorn DE. Expression of dopamine D<sub>2</sub> 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 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II and brain-derived neurotrophic factor gene expression by stimulation of dopamine D<sub>2</sub> 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 D<sub>1</sub>/D<sub>3</sub> 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 D<sub>3</sub> 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  $\beta_2$ , a functional variant of estrogen receptor  $\beta$  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 17 $\beta$ -estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 2002; **16**: 1671–1673.
- 34 Mohri T, Yoshida S. Estrogen and bisphenol A disrupt spontaneous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 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<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樞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 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 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 (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樞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、



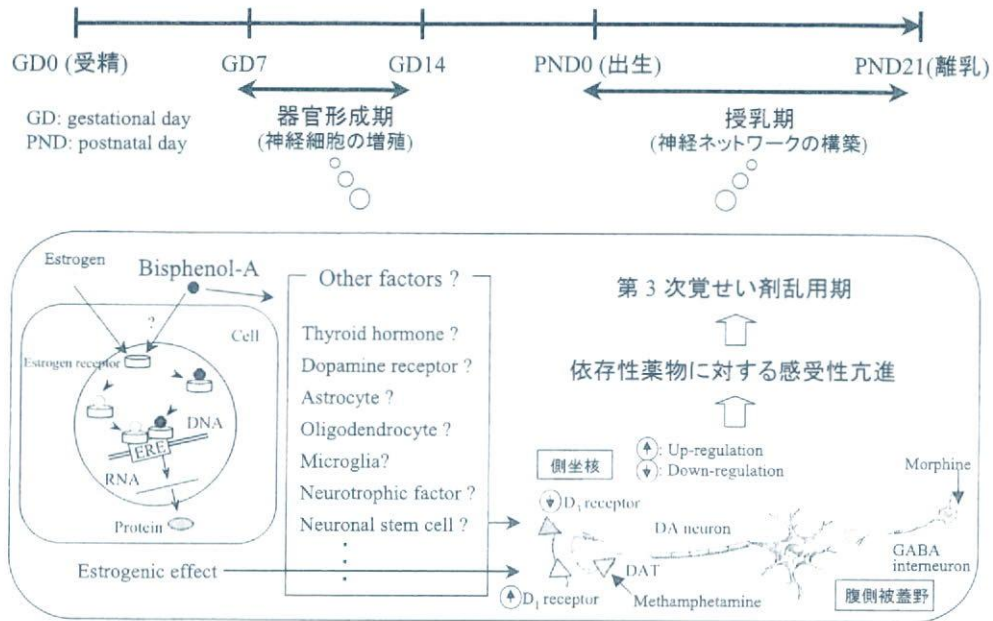


図1 Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により依存性薬物に対する感受性亢進のメカニズム。Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine  $D_3$  受容体の機能低下と dopamine  $D_1$  受容体の機能亢進が引き起こされ、依存性薬物に対する感受性の亢進が引き起こされる。さらに、神経細胞の増殖のピークとなる器官形成期や神経ネットワークの構築に非常に重要な時期である授乳期における bisphenol-A 曝露が特に大きな影響を及ぼす可能性が示唆される。Bisphenol-A は estrogen 受容体 (ER) に結合し、DNA 上の 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  $D_3$  受容体作動薬の放射ラベル体である  $[^3\text{H}]$ -7-hydroxy-N,N-di-n-propyl-2-aminotetralin ( $[^3\text{H}]$ -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  $D_3$  受容体数の低下が認められた。次に、 $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S 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  $D_3$  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-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  $D_3$  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  $D_3$  受容体の新規合成に影響を与えず、dopamine  $D_3$  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  $D_3$  受容体の機能低下に伴った dopamine  $D_1$  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.
- Parabollini, 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. & 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>[35S]</sup>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



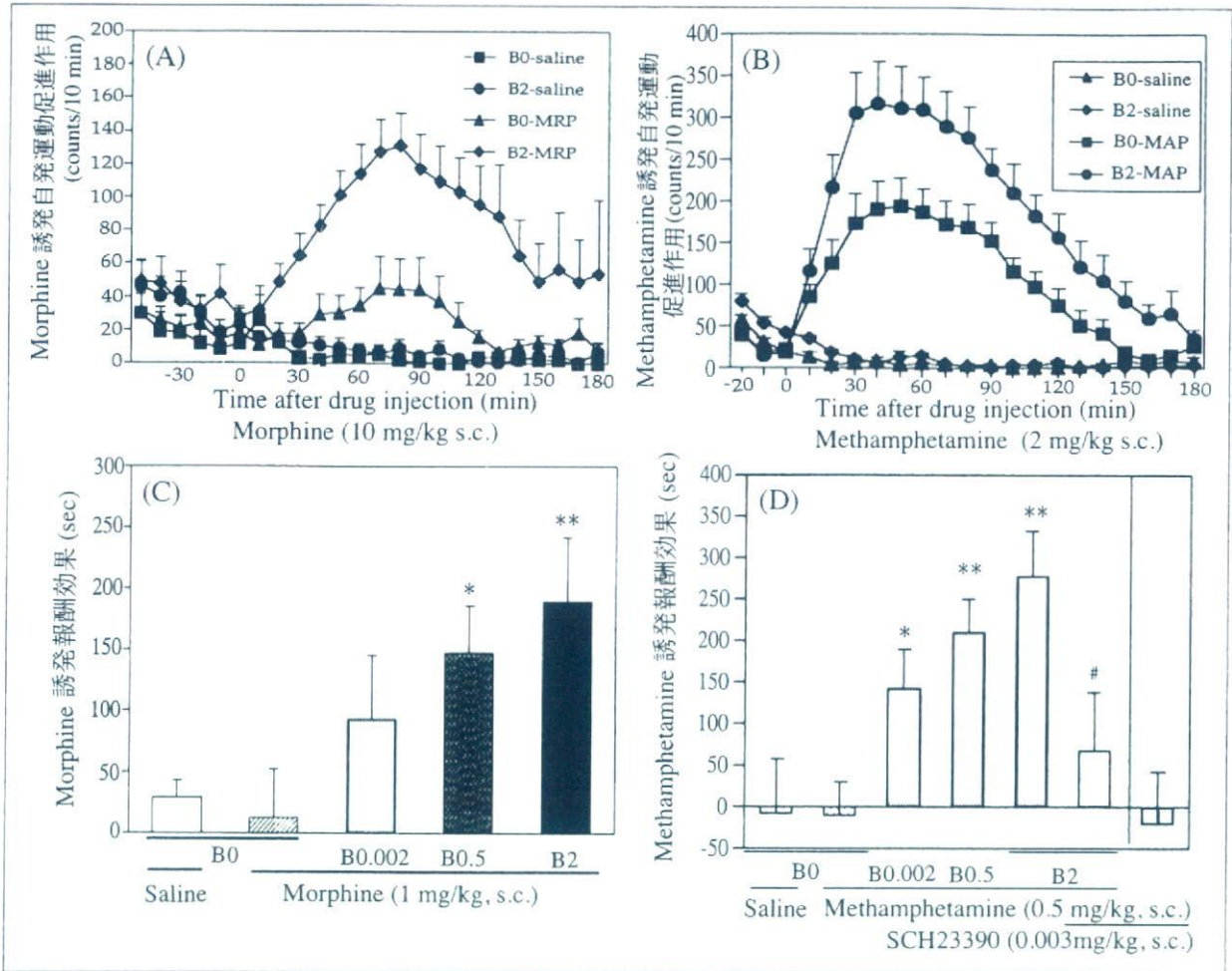


図1 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によるmorphine(A)およびmethamphetamine(B)誘発自発運動促進作用とmorphine(C)およびmethamphetamine(D)誘発報酬効果(精神依存)に対する影響

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<sub>1</sub>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<sub>3</sub>受容体数の低下が認められた(図4-A~C). 次に, [<sup>35</sup>S]-GTPγS binding assayに従いdopamine D<sub>3</sub>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<sub>2</sub>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<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-



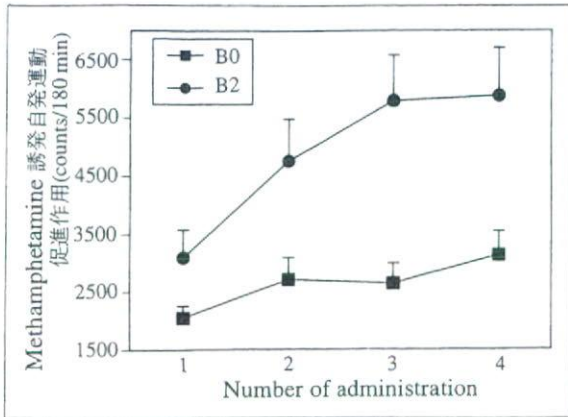


図2 Methamphetamine間欠投与による自発運動促進作用に対する逆耐性形成に及ぼすbisphenol-A胎児期および授乳期慢性曝露の影響

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

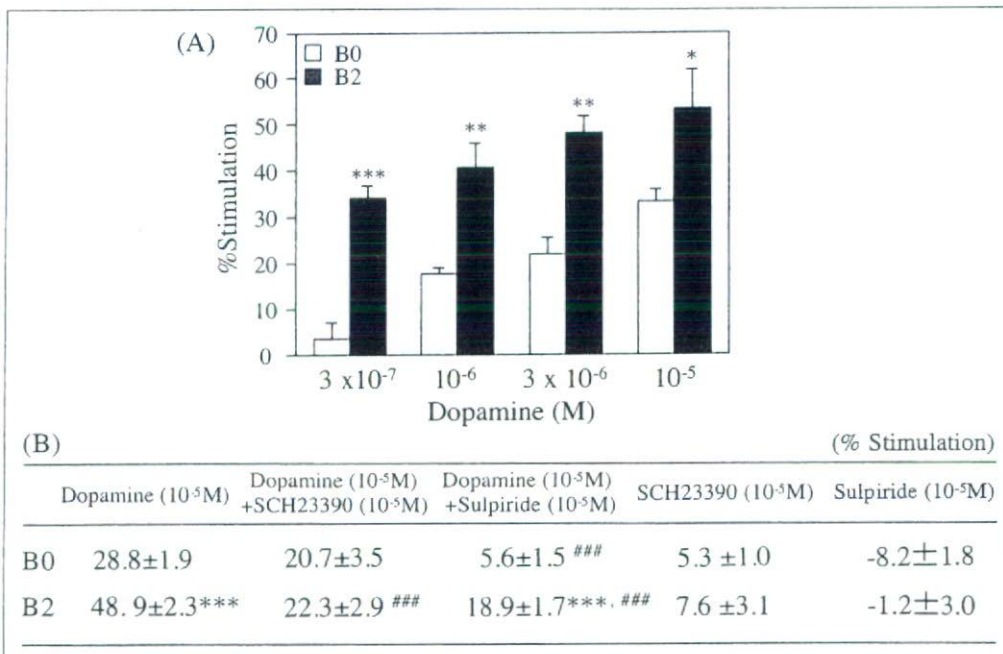


図3 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A)dopamine誘発Gタンパク質活性化作用に対する影響および(B)その効果におけるdopamine受容体サブタイプの関与

(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.



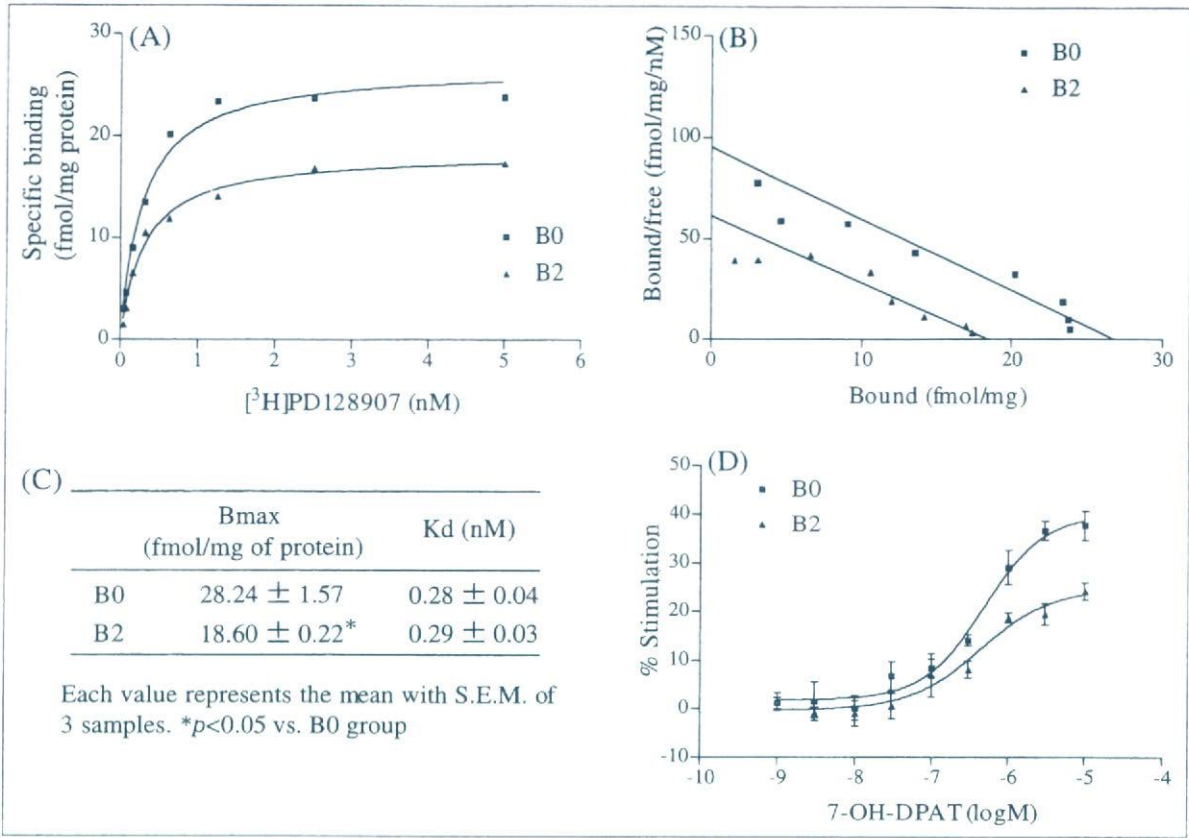


図4 Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露による(A~C)dopamine D<sub>3</sub>受容体に対するligandの結合能の変化と(D)dopamine D<sub>3</sub>受容体誘発 G タンパク質活性化作用に対する影響

(A~C) Bisphenol-Aの胎児期および授乳期慢性曝露によりdopamine D<sub>3</sub>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.

慢性曝露により引き起こされたdopamine D<sub>1</sub>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17β-estrodinolの1/1,500であり、そのestrogen活性は1/100,000程度に過ぎない<sup>11)18)</sup>。このような背景から、著者らはbisphenol-Aのみならず、17β-estradiolの胎児期および授乳期慢性曝露マウス (Low-BPA: bisphenol-A 3 μg/kg/day p.o., High-BPA: bisphenol-A 200mg/kg/day p.o., 17β-estradiol: 17β-estradiol 3 μg/kg/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、17β-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j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<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>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17β-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.



# Effects of Perinatal Exposure to Bisphenol A on Brain Neurotransmitters in Female Rat Offspring

Takeshi HONMA\*, Muneyuki MIYAGAWA, Megumi SUDA, Rui-Sheng WANG,  
Kenichi KOBAYASHI and Soichiro SEKIGUCHI

Department of Health Effects Research, National Institute of Industrial Health, Nagao 6-21-1, Tama-ku, Kawasaki 214-8585, Japan

Received January 19, 2005 and accepted April 28, 2006

**Abstract:** Pregnant Sprague-Dawley (CD IGS) rats were orally administered doses of bisphenol A (BPA) at 4, 40, and 400 mg/kg, from gestation days 6 to postnatal day 20. Neurotransmitters such as dopamine (DA) and serotonin (5HT) were extracted from the brains of dams and female offspring, and measured using liquid chromatography. BPA at 400 mg/kg was toxic and dosed rats died. At 3 wk after birth, brain levels of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, a DA metabolite), homovanillic acid (HVA, a DA metabolite), 5HT, 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA, a 5HT metabolite) in female offspring were increased and the HVA/DA ratio was high in some brain areas of BPA-treated groups as compared with controls. At the age of 6 wk, levels of choline (Ch) in BPA-treated groups at 4 and 40 mg/kg were higher than control in all of eight brain areas. No changes were observed in acetylcholine (ACh) contents. In 9-wk-old offspring, changes in monoamines and metabolites were scattered and not great. At 3 wk after delivery, levels of 5HIAA in some brain areas of dams treated with BPA were higher than in control dams. Dose dependent increases in HVA and the HVA/DA ratio of the occipital cortex, and in the HVA/DA ratio of the frontal cortex were observed. The turnover of DA and 5HT was accelerated in 3-wk-old offspring and dams. BPA possesses very weak estrogenic activity. Changes in cerebral neurotransmitters observed in offspring and dams in this study may have been related to the estrogenic activity of BPA. However, further investigation is needed to examine the contribution of hormonal activity to such neurotransmitter changes.

**Key words:** Bisphenol A, Perinatal exposure, Offspring, Brain, Neurotransmitters, Dopamine, Serotonin, Acetylcholine, IGS rat

## Introduction

Among many stabilizers of plastics, bisphenol A (BPA) is a popular stabilizer that mimics the actions of estrogen and affects the endocrine glands *in vivo* and *in vitro*<sup>1, 2</sup>. Although BPA binds to estrogen receptors to a lesser extent than 17 $\beta$ -estradiol, BPA affects sperm production and the prostate in male offspring, as well as body weight in male and female offspring<sup>3–5</sup>. Low dose effects of BPA and inverted U-shaped dose response relationships have also been

reported at 2 to 20  $\mu$ g/kg and at 0.1 to 50 mg/kg, respectively<sup>6, 7</sup>. The nervous systems of fetuses and newborns are susceptible to chemical effects<sup>8, 9</sup>, and the maternal administration of BPA affects the reproductive system and behavior of experimental animal's offspring<sup>10, 11</sup>. These reports strongly suggest that maternal administration of BPA affects the nervous system of offspring. We previously examined how the maternal administration of BPA affects the reproductive organs, sex hormones, learning and memory functions of offspring<sup>12, 13</sup>. We found that the plasma testosterone concentrations of rats at 9 wk of age were significantly elevated in BPA groups compared with

\*To whom correspondence should be addressed.



controls<sup>13</sup>). The content of testosterone in the testes increased in a similar manner to that in plasma. We also studied neurochemical changes in the neonatal brain. Neurotransmitters play key roles in the regulation of brain function. Many mental and nervous diseases are related to disordered function of neurotransmitters, and neuroactive drugs act by altering neurotransmitter levels<sup>14</sup>. Neurochemical changes are also involved in chemical neurotoxicity<sup>15,16</sup>.

The present study used a neurochemical approach to investigate how BPA alters brain function in second generation rats. Following the maternal administration of BPA during pregnancy and lactation, we assayed the brain for contents of norepinephrine (NE), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC, a dopamine metabolite), homovanillic acid (HVA, a dopamine metabolite), serotonin (5HT), 5-hydroxyindoleacetic acid (5HIAA, a 5HT metabolite), acetylcholine (ACh), and choline (Ch, an ACh precursor and metabolite) in female rat offspring.

## Materials and Methods

### *Animals and chemicals*

The CD (SD) IGS strain of rats was used, and 24 pregnant 9-wk-old rats were purchased from Charles River Japan Inc. at gestation day (GD) 3. GD 0 was confirmed by the presence of a copulatory plug. They were individually housed under a 12/12 h light/dark cycle with lights on at 08:00, with free access to feed (CE-2, Japan Clea, Inc.) and tap water. Room temperature and humidity were maintained at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 5\%$ , respectively. Four rat groups, of 6 pregnant rats each, were given standard BPA (>99.8% pure; Cat#: 280-08561, Lot#: HCE9312, Wako Pure Chemicals, Japan), at 0 (control), 4, 40, or 400 mg/kg body weight (BW), respectively. BPA was dissolved in corn oil (10 ml/kg BW).

### *Administration of BPA to pregnant rats*

BPA was administered to rats by oral gavage between 08:30 and 09:30 from GD 6 through postnatal day (PND) 20. The day of birth by 10:00 was considered PND 0. One dam in the control group was not pregnant. Therefore, 5 dams were available for the analysis in the control group. In the 4 and 40 mg/kg BPA groups, 6 dams were available for the analysis, but in the rat group administered with daily doses of BPA at 400 mg/kg, 4 rats died before and after delivery. Therefore, the rat group given 400 mg/kg BPA was not used in the analysis. Pups were sacrificed at 1, 3, 6, and 9 wk of age between 13:00 and 16:00. The litter size

was standardized to 10 pups (male:female = 5:5, if possible) for each dam on PND 7. Subsequently, at 3, 6 and 9 wk of age, 4 to 6 pups of each sex were sacrificed from each BPA dose group. Pups chosen for sacrifice in each of the BPA dose groups were culled from different dams. Because of the imbalance of male and female numbers and different pup numbers among dams, some pups remained after the litter size standardization on PND 7. These pups were used for the analysis at 1 wk of age. Therefore, the numbers of male and female pups sacrificed in each dose group at 1 wk of age ranged from 1 to 10.

Offspring were weaned on PND 21, and males and females were separately housed. The highest dose, 400 mg/kg BPA was selected after Kwon *et al.*<sup>17</sup>, who observed no effects of BPA at doses of 320 mg/kg/day from GD 11 through PND 20 on maternal body weight. The brain contents of neurotransmitters of offspring were assayed at 1, 3, 6, and 9 wk after birth. The brain neurotransmitters of dams given BPA were assayed at 3 wk after delivery (15 wk old).

### *Extraction and measurement of brain substances*

Pups were sacrificed by decapitation under ice-cold hypothermia at 1 wk after birth to obtain organs in addition to the brain. At 3 and 9 wk after birth, pups were sacrificed by exsanguination from the abdominal vein under ether anesthesia to obtain organs including the brain. No effects of ether anesthesia on the brain monoamines were confirmed. At 6 wk after birth, the pups were sacrificed by microwave exposure (1.5 KW, 0.8 s) focused on the head (Microwave applicator, Muromachi Kikai Co., Tokyo)<sup>18</sup>. Exposure to microwaves rapidly increases the brain temperature and prevents rapid postmortem changes of brain substances. At 1, 3 and 9 wk after birth, microwaves were not used for sacrifice to obtain the other organs. Therefore, the ACh and Ch contents could not be measured in offspring at these ages. At 1 wk after birth, brain substances were analyzed in the whole brain because the brain was too small to divide exactly into individual regions. Three wk after birth, the brains (half brain) were dissected on ice into the forebrain, hindbrain, medulla oblongata, and cerebellum. The forebrain and hindbrain were obtained by cutting the brain vertically at the level of the optic chiasm after removing the cerebellum and medulla oblongata. At 6 wk after birth, the brains were dissected into the frontal cortex, occipital cortex, hippocampus, midbrain, striatum, hypothalamus, medulla oblongata, and cerebellum as described by Glowinski and Iversen<sup>19</sup>. Nine wk after birth, half the brain was used for the measurement of enzyme activity and the other half of the brain was dissected into the four brain regions like the



brain of 3-wk-old rats, to measure monoamine contents. Brains of dams were dissected into eight brain regions as described above according to Glowinski and Iversen. Dams were sacrificed on the day of the weaning of pups between 13:00 and 16:00. They were exsanguinated from the abdominal vein under ether anesthesia to obtain organs in addition to the brain. All brain samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  and dissolved in 0.2 N  $\text{HClO}_4$  containing 1 mM EDTA and 5 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  before disruption using a Potter-Elvehjem homogenizer. The homogenate was centrifuged at 12,000 g for 25 min at  $4^{\circ}\text{C}$ , and the supernatant was analyzed by HPLC<sup>20, 21</sup>. Supernatants were divided into two portions (Portion A & B). Portion A was neutralized with potassium acetate and the supernatant was obtained after centrifugation. This supernatant was analyzed by HPLC to determine ACh and Ch contents. Portion B was applied to activated alumina to adsorb NE, DA, and DOPAC (Portion B1). HVA, 5HT, and 5HIAA remained in the eluate after centrifugation (Portion B2). Each portion was passed through a filter of 0.45  $\mu\text{m}$  pore size before application to HPLC.

#### HPLC analysis

ACh and Ch in portion A and ethylhomocholine (internal standard), were separated by reverse phase ion pair chromatography (Eicompak AC-GEL, Eicom Co., Japan) using a mobile phase comprising 0.1 M phosphate buffer, pH 8.2<sup>22</sup>. One liter of this buffer contained sodium 1-decanesulfonate, tetramethylammonium chloride, and EDTA- $\text{Na}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$ . Eluates were passed through a column that fixed ACh esterase and Ch oxidase (AC Enzymepak, Eicom). The column temperature was maintained at  $30^{\circ}\text{C}$  in an oven. The flow rate of the HPLC pump (L-4000, Hitachi Co., Tokyo) was 0.6 ml/min. ACh, Ch, and ethylhomocholine were assayed using an electrochemical detector (ECD-100, Eicom) equipped with a platinum electrode to measure the amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  produced by the enzyme reaction of the three compounds. The voltage for electrochemical detection was 450 mV.

Monoamines and metabolites were assayed in extracts from the brain homogenates by HPLC equipped with an electrochemical detector (ECD-300, Eicom) and a carbon electrode. Reverse phase ion pair chromatography separated NE, DA, and DOPAC in portion B1 (Eicompak MA-5ODS, Eicom). The mobile phase was citrate-acetate buffer, pH 3.5. The retention time for each component was adjusted by adding sodium 1-octanesulfonate and methanol. An Eicompak MA-5ODS separated HVA, 5HT, and 5HIAA in portion B2 using a mobile phase comprising citrate-acetate buffer, pH 3.9. The separation parameters were as follows:

temperature,  $25^{\circ}\text{C}$ ; flow rate, between 0.5 and 0.9 ml/min; voltage, between 700 and 800 mV.

#### Statistics

Means  $\pm$  SEM of each group were calculated for each of the monoamine or metabolite contents of the brain (nmoles/g tissue). Amine ratios (DOPAC/DA, HVA/DA, 5HIAA/5HT, and ACh/Ch) were calculated for each rat and the mean values of these ratios were obtained for each group. Metabolite/monoamine ratios (DOPAC/DA, HVA/DA, and 5HIAA/5HT) are widely used as markers of turnover of DA and 5HT in cerebral neurons. The statistical significance of differences between the control and dosed groups was examined by Dunnett's multiple *t*-test using statistics software (SPSS Japan Inc.). Differences between groups at  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results

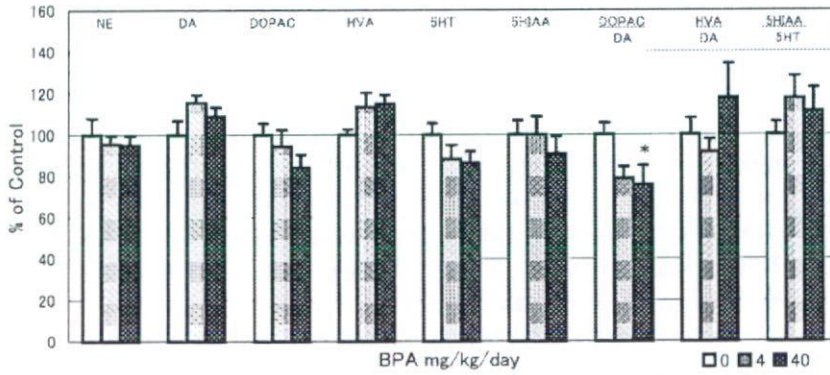
#### Effects of BPA on 1-wk-old offspring

Figure 1 shows how the maternal administration of BPA affected the brain content of neurotransmitters and metabolites in female offspring at 1 wk after birth. In BPA-treated groups, levels of DOPAC and 5HT were low and those of DA and HVA were high, although these changes were less than 20% of each control value and no differences were statistically significant. Metabolite/monoamine ratios (DOPAC/DA, HVA/DA, and 5HIAA/5HT) were calculated for each rat. A significant difference was observed between the DOPAC/DA ratios of the control (0.264, 100%) and 40 mg/kg (0.200, 75.8%) groups. No significant differences were found between the control and BPA-treated groups in other metabolite/monoamine ratios.

#### Effects of BPA on the offspring at 3 wk of age

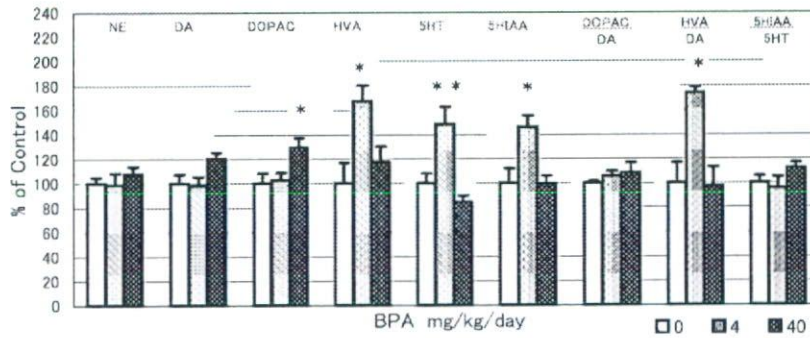
Figures 2-1 to 2-3 show levels of neurotransmitters, metabolites, and ratios of DOPAC/DA, HVA/DA, and 5HIAA/5HT in the brains of 3-wk-old rats. Levels of neurotransmitters in the cerebellum were low and the data varied too much to perform statistical analyses. Therefore, data obtained for the cerebellum are not presented. No effects of BPA were observed on the contents of NE and DA in the forebrain, hindbrain, and medulla oblongata. Levels of DOPAC of the 40 mg/kg group and HVA of the 4 mg/kg group were significantly increased in the forebrain compared with controls. A statistical significance was found in the difference of the mean values of the HVA/DA ratio in the forebrain between the control (0.161, 100%) and 4 mg/kg (0.280, 174%) groups. Levels of 5HT and 5HIAA in the





**Fig. 1.** Effects of perinatal administration of BPA on the neurotransmitter contents of whole brain in 1-wk-old female offspring.

Results are shown as means  $\pm$  SEM (%). Absolute values (nmoles/g tissue) for 100% were as follows: 0.736 for NE, 1.18 for DA, 0.305 for DOPAC, 0.575 for HVA, 11.8 for 5HT, and 2.69 for 5HIAA; absolute values of ratios for 100% were as follows: 0.264 for DOPAC/DA, 0.522 for HVA/DA, and 0.228 for 5HIAA/5HT.  $N = 6-8$ . \*:  $p < 0.05$  by Dunnett's multiple  $t$ -test.



**Fig. 2-1.** Effects of perinatal administration of BPA on the neurotransmitter contents of forebrain in 3-wk-old female offspring.

Results are shown as means  $\pm$  SEM (%). Absolute values (nmoles/g tissue) for 100% were as follows: 0.944 for NE, 6.59 for DA, 1.30 for DOPAC, 1.08 for HVA, 1.64 for 5HT, and 1.12 for 5HIAA; absolute values of ratios for 100% were as follows: 0.197 for DOPAC/DA, 0.161 for HVA/DA, and 0.717 for 5HIAA/5HT.  $N = 4-5$ . \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$  by Dunnett's multiple  $t$ -test.

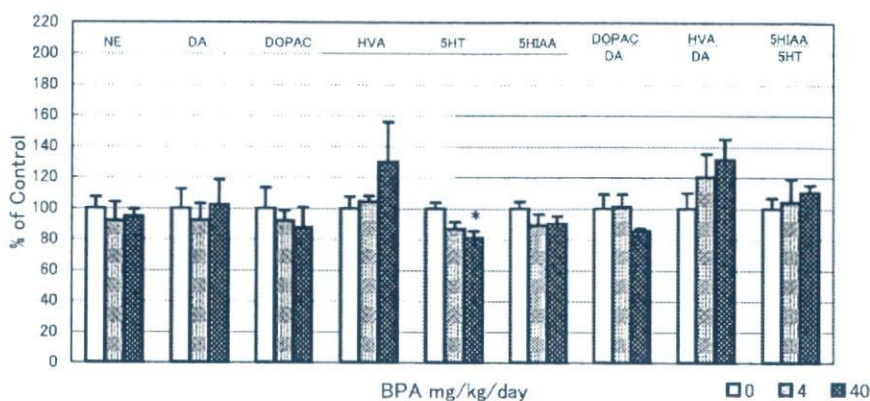
forebrain of the 4 mg/kg group were significantly increased compared with controls. There was no difference in the 5HIAA/5HT ratio in the forebrain between the control and 4 mg/kg groups. The level of HVA in the hindbrain of the 40mg/kg group was higher than that of the control (130% of the control). The HVA/DA ratios in the hindbrain of BPA-treated groups were higher than that of the control (120 and 132% of the control at 4 and 40 mg/kg, respectively), although statistical significance was not found in these differences. The decrease in 5HT in the hindbrain of BPA-treated groups was within 20% of the control, and was statistically significant for the 40 mg/kg group. There were no significant changes

in the 5HIAA/5HT ratios in the hindbrains of the 4 and 40 mg/kg groups. In the medulla oblongata, levels of HVA of the 40 mg/kg group, and 5HT and 5HIAA of the 4 and 40 mg/kg groups, were higher than those of the control. Among them 5HT of the 4 mg/kg group was significantly increased compared with the control. The HVA/DA ratio of the 40 mg/kg group was higher than that of the control, however, the difference was not statistically significant.

#### *Effects of BPA on the offspring at 6 wk of age*

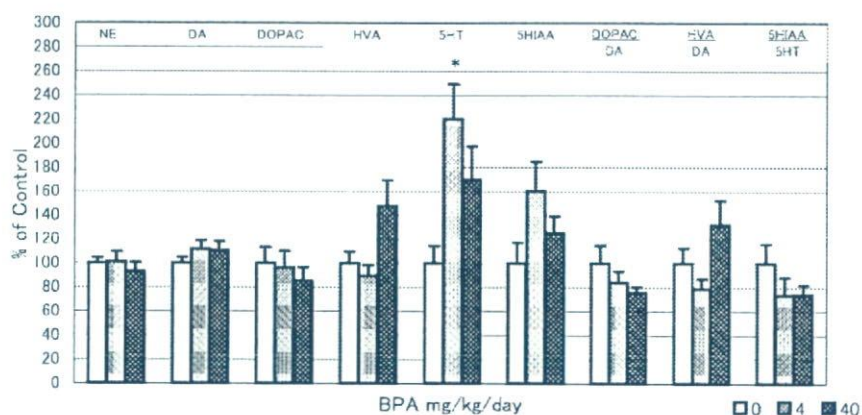
Tables 1-1 to 3-2 summarize the results of neurotransmitter analysis of offspring at 6 wk after birth.





**Fig. 2-2. Effects of perinatal administration of BPA on the neurotransmitter contents of hindbrain in 3-wk-old female offspring.**

Results are shown as means  $\pm$  SEM (%). Absolute values (nmoles/g tissue) for 100% were as follows: 1.32 for NE, 1.08 for DA, 0.272 for DOPAC, 0.206 for HVA, 11.9 for 5HT, and 3.32 for 5HIAA; absolute values of ratios for 100% were as follows: 0.254 for DOPAC/DA, 0.188 for HVA/DA, and 0.281 for 5HIAA/5HT.  $N = 4-5$ . \*:  $p < 0.05$  by Dunnett's multiple *t*-test.



**Fig. 2-3. Effects of perinatal administration of BPA on the neurotransmitter contents of medulla oblongata in 3-wk-old female offspring.**

Results are shown as means  $\pm$  SEM (%). Absolute values (nmoles/g tissue) for 100% were as follows: 2.56 for NE, 0.193 for DA, 0.106 for DOPAC, 0.214 for HVA, 3.14 for 5HT, and 3.63 for 5HIAA; absolute values of ratios for 100% were as follows: 0.556 for DOPAC/DA, 1.14 for HVA/DA, and 1.20 for 5HIAA/5HT.  $N = 4-5$ . \*:  $p < 0.05$  by Dunnett's multiple *t*-test.

Amine ratios (DOPAC/DA, HVA/DA, 5HIAA/5HT, and ACh/Ch) were calculated for each rat. There were no significant changes in monoamine contents and amine ratios in the frontal and occipital cortices of the BPA-treated groups. In the hippocampus, DA and DOPAC increased by 40 to 50% in the 40 mg/kg group compared to the control. These changes were not significant; however, the increase in Ch of the 4 mg/kg group was significant. Striatal Ch of the 4 mg/kg group was increased significantly compared to the control. Levels of Ch in the midbrain were high in BPA-treated groups and the ACh/Ch ratios of the 4 and 40

mg/kg groups were significantly smaller than those of the control. In the medulla oblongata, compared to the control the 5HT level of the 40 mg/kg group was low and Ch levels in the 4 and 40 mg/kg groups were high, however, none of these changes were statistically significant. The 5HIAA/5HT ratio was high in the 40 mg/kg group and the ACh/Ch ratio was low in the 4 mg/kg group, and these ratios significantly differed from the control. In the cerebellum, the DA content was high in the 40 mg/kg group (143% of the control), and DOPAC levels and DOPAC/DA ratios were low in the 4 and 40 mg/kg groups. Ch contents were



**Table 1-1. Effects of maternal administration of BPA on neurotransmitter contents of 6-wk-old female offspring (frontal cortex, occipital cortex, and hippocampus)**

		NE	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
Frontal cortex	Control	100 ± 13.5	100 ± 15.6	100 ± 14.1	100 ± 5.0	100 ± 2.9	100 ± 16.4
	4 mg/kg	99.3 ± 4.0	90.3 ± 8.7	89.0 ± 4.8	89.3 ± 10.2	98.8 ± 6.0	90.0 ± 9.9
	40 mg/kg	90.7 ± 9.6	95.0 ± 10.0	90.2 ± 8.7	103.1 ± 5.0	94.5 ± 3.0	104.3 ± 15.5
	A100	1.75	6.31	1.39	0.779	0.222	0.137
Occipital cortex	Control	100 ± 9.5	100 ± 10.5	100 ± 8.9	100 ± 6.5	100 ± 3.1	100 ± 10.2
	4 mg/kg	94.1 ± 5.8	87.0 ± 4.8	78.0 ± 8.3	97.1 ± 7.1	88.2 ± 4.8	108.9 ± 9.1
	40 mg/kg	95.6 ± 4.6	83.4 ± 13.3	86.7 ± 10.4	99.6 ± 8.2	107.9 ± 11.4	123.6 ± 15.3
	A100	1.39	0.899	0.101	0.321	0.113	0.369
Hippocampus	Control	100 ± 5.2	100 ± 13.0	100 ± 4.8	100 ± 8.5	100 ± 9.5	100 ± 22.6
	4 mg/kg	122.1 ± 11.5	101.8 ± 10.9	88.0 ± 4.5	110.1 ± 5.9	84.5 ± 8.5	99.8 ± 13.5
	40 mg/kg	111.9 ± 8.6	141.5 ± 20.4	149.2 ± 28.9	109.0 ± 4.9	101.1 ± 7.8	73.6 ± 9.6
	A100	1.34	0.364	0.0291	0.389	0.0752	1.21

Results are shown as means ± SEM (%). A100, Absolute values for 100% (N = 4–5 for frontal and occipital cortex and N = 3–5 for hippocampus, nmoles/g tissue).

**Table 1-2. Effects of maternal administration of BPA on neurotransmitter contents of 6-wk-old female offspring (frontal cortex, occipital cortex, and hippocampus)**

		5HT	5HIAA	5HIAA/5HT	ACh	Ch	ACh/Ch
Frontal cortex	Control	100 ± 7.4	100 ± 12.0	100 ± 7.2	100 ± 12.9	100 ± 8.4	100 ± 10.1
	4 mg/kg	94.6 ± 2.9	93.8 ± 5.7	100.6 ± 6.3	106.8 ± 6.5	129.2 ± 8.6	84.5 ± 9.3
	40 mg/kg	107.3 ± 3.1	109.0 ± 5.5	102.7 ± 3.0	103.9 ± 16.1	126.4 ± 22.6	85.7 ± 10.2
	A100	7.76	0.918	0.117	10.1	11.9	0.848
Occipital cortex	Control	100 ± 5.5	100 ± 3.2	100 ± 8.2	100 ± 9.6	100 ± 17.4	100 ± 19.3
	4 mg/kg	103.9 ± 1.68	113.2 ± 7.2	107.4 ± 8.3	99.2 ± 4.4	129.1 ± 25.2	73.7 ± 11.3
	40 mg/kg	95.5 ± 10.5	103.4 ± 6.4	109.2 ± 7.4	90.3 ± 10.9	102.3 ± 18.9	85.3 ± 15.2
	A100	15.2	2.74	0.183	12.7	29.2	0.493
Hippocampus	Control	100 ± 5.3	100 ± 8.0	100 ± 5.1	100 ± 5.8	100 ± 16.4	100 ± 22.4
	4 mg/kg	109.1 ± 5.8	113.1 ± 13.4	102.8 ± 7.7	103.2 ± 13.4	155.5* ± 9.8	59.5 ± 10.3
	40 mg/kg	99.4 ± 11.7	88.6 ± 13.7	88.2 ± 7.0	108.2 ± 3.8	113.5 ± 10.4	86.4 ± 9.3
	A100	7.47	2.91	0.389	18.3	26.3	0.797

Results are shown as means ± SEM (%). A100, Absolute values for 100% (N = 4–5, nmoles/g tissue). \*: p < 0.05 by Dunnett's multiple *t*-test.

high in the 4 and 40 mg/kg groups, however, none of these changes were statistically significant.

#### *Effects of BPA on 9-wk-old offspring*

Figures 3-1 to 3-4 show levels of neurotransmitters, metabolite, and metabolite/monoamine ratios at 9 wk after birth. The level of NE in the forebrain of the 40 mg/kg group was increased significantly compared with the control, although the increase was not great (123% of control). Compared to the control, the level of DA was unchanged, whereas that of DOPAC was significantly decreased (81% of control) in the forebrain of the 4 mg/kg group. The ratio

of HVA/DA in the forebrain of the 40 mg/kg group was significantly low (73% of control). There were no significant changes in monoamine levels and metabolite/monoamine ratios in the hindbrain. Levels of DOPAC and 5HIAA were significantly decreased in the medulla oblongata of the 40 mg/kg group compared to the control. Ratios of DOPAC/DA and 5HIAA/5HT were lower than those of the control group, though differences were not significant. The concentration of DOPAC in the cerebellum was too low to detect consistently. Therefore, the DOPAC and DOPAC/DA data in the cerebellum were omitted from Fig. 3-4. Compared to the control, the 5HT and 5HIAA levels of the



**Table 2-1. Effects of maternal administration of BPA on neurotransmitter contents of 6-wk-old female offspring (striatum, midbrain, and hypothalamus)**

		NE	DA	DOPAC	HVA	DOPAC/DA	HVA/DA
Striatum	Control	100 ± 4.3	100 ± 8.4	100 ± 15.2	100 ± 12.4	100 ± 6.3	100 ± 6.1
	4 mg/kg	97.1 ± 15.5	95.9 ± 3.7	90.4 ± 5.7	93.4 ± 5.1	96.1 ± 5.4	98.1 ± 3.8
	40 mg/kg	96.4 ± 7.4	92.4 ± 4.2	87.0 ± 2.7	88.9 ± 4.4	96.5 ± 3.3	97.2 ± 4.5
	A100	1.01	32.0	2.94	3.57	0.090	0.111
Midbrain	Control	100 ± 15.8	100 ± 15.0	100 ± 14.4	100 ± 29.4	100 ± 2.9	100 ± 32.1
	4 mg/kg	102.5 ± 1.8	92.1 ± 10.6	91.0 ± 11.0	87.4 ± 15.0	99.2 ± 5.9	96.4 ± 22.8
	40 mg/kg	98.8 ± 6.5	101.9 ± 11.8	99.6 ± 12.0	74.2 ± 17.0	97.6 ± 2.7	76.4 ± 23.5
	A100	2.50	1.15	0.214	0.862	0.187	0.800
Hypothalamus	Control	100 ± 6.2	100 ± 6.7	100 ± 8.1	100 ± 26.2	100 ± 4.0	100 ± 27.0
	4 mg/kg	107.6 ± 6.7	105.0 ± 8.0	93.3 ± 8.0	120.0 ± 2.8	89.8 ± 7.7	111.5 ± 6.1
	40 mg/kg	97.1 ± 10.5	99.1 ± 7.9	93.1 ± 10.5	122.3 ± 10.6	93.6 ± 5.0	121.0 ± 13.1
	A100	6.50	2.68	0.440	1.43	0.164	0.555

Results are shown as means ± SEM (%). A100, Absolute values for 100% (N = 4–5, nmoles/g tissue).

**Table 2-2. Effects of maternal administration of BPA on neurotransmitter contents of 6-wk-old female offspring (striatum, midbrain, and hypothalamus)**

		5HT	5HIAA	5HIAA/5HT	ACh	Ch	ACh/Ch
Striatum	Control	100 ± 3.6	100 ± 7.9	100 ± 6.3	100 ± 6.4	100 ± 8.2	100 ± 7.9
	4 mg/kg	108.8 ± 8.7	98.9 ± 7.3	92.0 ± 6.0	110.9 ± 8.8	167.1* ± 18.6	68.7 ± 11.0
	40 mg/kg	104.4 ± 5.2	99.0 ± 4.2	96.2 ± 7.2	94.9 ± 5.2	121.7 ± 22.6	83.8 ± 11.6
	A100	3.25	3.33	1.02	36.2	20.3	1.82
Midbrain	Control	100 ± 9.7	100 ± 4.3	100 ± 10.4	100 ± 8.7	100 ± 18.5	100 ± 12.9
	4 mg/kg	85.8 ± 2.9	108.6 ± 9.8	122.4 ± 12.7	102.9 ± 6.8	178.8 ± 31.3	56.8* ± 10.0
	40 mg/kg	78.0 ± 5.3	110.6 ± 21.0	138.3 ± 27.9	91.3 ± 11.9	143.8 ± 31.1	62.7* ± 8.1
	A100	29.0	10.6	0.380	21.7	16.8	1.42
Hypothalamus	Control	100 ± 32.2	100 ± 37.4	100 ± 31.2	100 ± 18.9	100 ± 8.2	100 ± 11.5
	4 mg/kg	93.9 ± 6.9	80.3 ± 26.4	72.5 ± 21.8	100.1 ± 2.4	108.6 ± 8.4	95.4 ± 7.3
	40 mg/kg	115.8 ± 26.4	111.4 ± 38.4	79.1 ± 14.1	106.3 ± 13.0	128.1 ± 24.3	94.2 ± 17.2
	A100	18.2	10.2	0.648	16.5	11.0	1.47

Results are shown as means ± SEM (%). A100, Absolute values for 100% (N = 4–5, nmoles/g tissue). \*: p < 0.05 by Dunnett's multiple *t*-test.

cerebellum showed no changes in the BPA-treated groups, however, a significant difference was observed between the mean values of the 5HIAA/5HT ratio in the cerebellum of the control (1.356, 100%) and 40 mg/kg (1.083, 80%) groups.

#### Effects of BPA on the dams

Effects of BPA administration on the brain substances of dams are presented in Figs. 4-1 to 4-8. Variances in HVA and HVA/DA in the hippocampus, midbrain, and medulla oblongata were too large, therefore these data were not statistically analyzed. 5HT and 5HIAA were increased with statistical significance in the frontal cortex of the 4 mg/kg group, however, 5HIAA/5HT ratios in BPA-treated groups

did not differ from those of the control. A tendency of increase in HVA and HVA/DA (229% of the control at 40 mg/kg) in the occipital cortex was observed in the BPA-treated groups, but these increases were not statistically significant when compared with the control. The level of DA was significantly increased in the hippocampus of the 4 mg/kg group. In the striatum, the level of 5HIAA was significantly increased in the 40 mg/kg group. No changes in monoamine contents and metabolite/moanoamine ratios were observed in the midbrain, hypothalamus, medulla oblongata, and cerebellum of the BPA-treated groups.