

内分泌かく乱物質の行動影響に関する調査研究

分担研究者 鈴木 勉 星薬科大学薬品毒性学教室教授

研究要旨

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの単回経口投与では一般行動、運動協調性、学習・記憶および葛藤には有意な影響を及ぼさなかった。しかし、ベンゾ(a)ピレンは投与初期における自発運動量を有意に増加した。また、混餌による 28 日間の投与後、ビスフェノールA投与群において有意な自発運動の増加が認められた。

A. 研究目的

内分泌かく乱物質の行動影響に関する研究はこれまでほとんど行われていない。そこで、本研究では一般行動、自発運動、葛藤、学習・記憶および運動協調性に及ぼすベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの影響を検討した。自発運動は生体の異変や異常を敏感に反映することから、種々の薬物や化学物質の生体、特に中枢に及ぼす影響を検討する際の一次評価法として広く用いられている。そこで、本研究では数種内分泌かく乱物質の 28 日間投与による自発運動に及ぼす影響も合わせて検討した。

B. 研究方法

実験には実験開始時 20~22 g の ddY 系雄性マウス（東京実験動物）を用いた。また、ベンゾ(a)ピレン（和光純薬工業）、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル（関東化学）を使用し、これらの溶媒としてコーン油（和光純薬工業）を使用した。これをマウスに 0.01 ml/g の容量で経口投与した。慢性投与は混餌法に従い、各被験物質を 0.03 および 0.1 mg/g of food に調製し、28 日間摂取させて慢性的な暴露を行った。

1. 一般行動に及ぼす影響

各被験物質（3 および 10 mg/kg, p. o.）投与後 30, 60 および 90 分後に行動観察を行った。

2. 自発運動に及ぼす影響

各被験物質（3 および 10 mg/kg, p. o.）を投与し、3 時間に亘り自発運動量を測定した。自発運動量は tilting cage 法に従って測定した。被験物質を投与したマウスをバケツ型ケージに 1 匹ずつ入れ、マウスの移所行動に伴うケージの傾きをマイクロスイッチで感知し、このカウントを運動量とした。各被験物質の単回経口投与、28 日間処置および 28 日間処置後に経口投与した群をそれぞれ設け、自発運動量を 10 分間隔で 3 時間にわたり連続的に測定した。

3. 葛藤に及ぼす影響

抗コンフリクト作用の測定には 18×12×10 cm の vogel 型コンフリクト装置（小原医科産業）を使用した。電気刺激はマウスが drinking tube を 20 回なめるごとに 1 回与えるように設定した。電流は 0.35 mA, 通電時間は 200 msec とした。マウスを 3 日間飼育した後 24 時間絶水し、装置内にマウスを入れて電気刺激を与えずに 10 分間自由に水を飲ませた。その後 3 日間自由摂餌条件で飼育し、再度 24 時間絶水させたマウスを装置内に入れ、電気刺激を与える条件で 10 分

間テストを行い、マウスが受けた電気刺激の回数を測定した。

4. 学習・記憶に及ぼす影響

学習・記憶実験には step down 法を用いた。前面が透明なボックス (9×15×35 cm) の床面をステンレス製グリッドにして通電 (0.4 mA) させ、ゴム栓 (4.5×4.5 cm) を置きその上にマウスを乗せる。床に降りると感電するのでゴム栓上に留まることを試験前日に 10 分間学習させ、被験物質投与後 0, 30, 60 および 120 分に 3 分間マウスをゴム栓上に乗せ、床に降りたそれぞれのマウスを記録し、失敗したマウスの匹数と時間の関係を調べた。

5. 運動協調性に及ぼす影響

運動協調性は rota-rod 法により評価した。回転棒上にマウスが 5 分間乗れるように訓練した後、被験物質を投与し、再び回転棒上に乗せ、被験物質に運動協調障害作用があると、マウスは回転棒の速さについていけずに回転棒から落ちるので、これを運動協調性障害と判断し、被験物質投与後 30, 60 および 90 分に何秒間回転棒に乗っていられるかを 5 分間測定した。

各試験結果を平均値および標準誤差で示し、統計解析は Student's-t test あるいは Mann-Whitney の U 検定で評価した。なお、有意水準は $p < 0.05$ および $p < 0.01$ とした。

C. 実験結果

1. 一般行動に及ぼす影響

各被験物質投与後 30, 60 および 90 分に行動観察を行ったが、被験物質投与前後の比較において、何ら有意な変化は認められなかった。

2. 自発運動に及ぼす影響

ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルの 3 および 10 mg/kg の経口投与により、自発運動量は対照群と比較し有意な変化は認められなかった。しかし、ベンゾ(a)ピレンは対照群と

比較し、投与後 60 分間の自発運動量が用量依存的に増加し、10 mg/kg では有意な増加を示した。次に、各被験物質を混餌により 28 日間処置して自発運動を測定したが、対照群と比較して有意な変化は認められなかった。そこで、これらの慢性処置マウスに各被験物質の 3 および 10 mg/kg を経口投与して自発運動を測定したところ、ベンゾ(a)ピレン およびフタル酸ジ-n-ブチルでは有意な変化は認められなかったが、ビスフェノールA 10 mg/kg では投与後 30 分間の自発運動量が有意に増加した。

3. 葛藤に及ぼす影響

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル 3 および 10 mg/kg の抗コンフリクト作用を検討したが、対照群と比べ有意な影響は見られなかった。

4. 学習・記憶に及ぼす影響

Step down 法による学習課題試験を行い、ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル 3 および 10 mg/kg 投与後 120 分の失敗率について経時的な検討を行ったが、対照群に比べ何ら有意な変化は認められなかった。

5. 運動協調性に及ぼす影響

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチル 3 および 10 mg/kg は運動協調性に何ら影響を及ぼさなかった。

D. 考察

ベンゾ(a)ピレン、ビスフェノールAおよびフタル酸ジ-n-ブチルは単回投与で一般行動、葛藤、学習・記憶、運動協調性に何ら影響を及ぼさなかった。したがって、少なくとも本研究で用いた用量では行動的に影響は受けないと考えられる。一方、ベンゾ(a)ピレンは投与後 60 分間の自発運動量を対照群に対して用量依存的に増加させた。対照群のマウスは約 30 分で新規環境に順応するが、ベンゾ(a)ピレン投与群では新規環

境に順応するまでの時間が約 60 分であった。一般的に、マウスを新規環境に入れると探索行動を示し、自発運動量は増加するため、30 分間ケージに順応させた後、被験物質を投与して自発運動量を評価する。しかし、本研究では動物の新規環境に対する順応に及ぼす内分泌かく乱物質の影響も合わせて検討する目的で、内分泌かく乱物質投与後直ちに測定を開始した。したがって、ベンゾ(a)ピレンは単回投与により、新規環境への順応を低下させ、投与初期の運動量を増加させたと考えられる。しかしながら、28 日間処置後では、対照群との間に有意差は見られなかった。これはベンゾ(a)ピレンの長期投与により、耐性が形成されたためと考えられる。また、興味深いことにビスフェノールAを 28 日間処置し、その後の経口投与による初期の自発運動量は有意に増加した。この原因として、ビスフェノールAの単回投与では変化が見られなかったことを考慮すると、蓄積効果や慢性暴露によって感受性亢進が引き起こされた可能性が考えられる。また、この結果からベンゾ(a)ピレン単回投与の場合と同様に、ビスフェノールAが新規環境への馴化を抑制する可能性が示唆された。

の機序を検討していく必要があると考えられる。

E. 結論

本研究により、ベンゾ(a)ピレンは単回投与によって、またビスフェノールAは慢性暴露後に初期の自発運動量をそれぞれ亢進することを明らかにした。これらの結果から、高用量のベンゾ(a)ピレンやビスフェノールAの暴露は新規環境への馴化を抑制する作用があると考えられる。

F. 今後の展望

妊娠期および授乳期にベンゾ(a)ピレンやビスフェノールAを暴露し、発達過程におけるこれらの効果およびそ