

内分泌攪乱化学物質の胎児・幼児への影響等に関する研究（神経系に及ぼす影響）に関する研究

－ビスフェノール A の脳内アミンに対する影響

分担研究者：船江良彦 大阪市立大学医学部教授

研究協力者：廣井豊子 大阪市立大学医学部助手

研究要旨：ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露マウスにおける脳内アミンの変動を調べた。親へのビスフェノール A 投与によって、胎児期・乳児期に間接的に暴露をうけた仔マウスの脳では、ドパミン等のモノアミンの量が減少していた。特に、雌仔マウスにおけるドパミンの減少が著しく、コントロールに比較して 50%程度にまで減少していた。離乳後、親とは離して飼育し、3週間ビスフェノール A の暴露を解除しても、仔マウスのドパミンの減少は継続しており、この減少が、なんらかの不可逆的な変異によって引き起こされている可能性が示唆された。

A. 研究目的：

ビスフェノール A は、ポリカーボネイトなどのプラスチック製品の可塑剤や歯科用樹脂として使用されているジフェニル化合物の一つで、エストロゲン活性を有している事が知られている。エストロゲンに比べ非常に弱いながらもエストロゲン活性を有していることから、内分泌かく乱化学物質として作用する可能性が考えられ、現在多くの研究者によって生体に対する影響について検討がなされつつある。本研究では、このビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による神経系への影響を明らかにする事を目的としている。特に、本年度は、ビスフェノール A の胎児期・乳児期暴露による脳内チトクローム P450 や生体アミンの変動を調べる事を計画した。

生体の脳内のアミンレベルは、運動、感情や情動発現、脳報酬系に関与していると考えられ、躁鬱病や感情障害といった多くの精神疾患、

近年問題となっている小児期の ADHD（注意欠如・多動症候群）の発症、更に近年「きれやすさ」などと表現されている「衝動性」「攻撃性」「抑制の欠如」といった行動障害などに関与している可能性が考えられている。

チトクローム P450 (CYP450)は、非常に多くの分子種が存在し、その機能は多岐にわたっており、ステロイドホルモン、脂肪酸およびプロスタグランジン類など多くの生理活性物質の生合成および代謝、薬物などの外来性物質の代謝など、多くの生理機能を有している。これに加え、近年、神経伝達物質であるカテコールアミンの合成活性を有する分子種も見いだされ、アミンレベルの制御に関わっている可能性も考えられている。CYP450 のいくつかの分子種の発現は、TCDD や DDT といった外来生物物質やホルモンによって誘導を受けることが明らかとなっている。このような機能を有する P450 の変動は、種々の生理活性

物質の量的・質的変動につながり、生体に種々の変化をもたらすと考えられる。

様々な内分泌かく乱化学物質の暴露を受けながら生活を行っている我々にとって、環境中のどのような物質によって、アミンやホルモンなどの生体内生理活性物質がどの程度変動するか、多くの生理機能を有するどの P450 分子種の発現が変動するか、を明らかにすることは、様々な内分泌かく乱化学物質が我々に与える影響を知る上で非常に重要であると考えられる。特に、内分泌かく乱化学物質は、その作用から、P450 の発現、機能に大きく影響を与える可能性が考えられ、さらにその結果、ステロイドホルモンやアミンなどの生理活性物質が変動し、行動、成長・発育、代謝などに異常・変動がみられる可能性が考えられる。

B 研究方法

ビスフェノール A を Sire および Dam ddy マウスに混餌で投与し、それら親マウスから生まれた offspring マウスを用いて検討を行った。

ビスフェノール A 投与群は、親のビスフェノール A の量により、2 μg / g of food, 0.5, 2, 8 mg / g of food の 4 種に分け、それら 4 種それぞれ、雄、雌各 7 匹の offspring を一群とした。コントロール群は、正常食を摂食させた。offspring マウスは、離乳直後の 3 週齢と 6 週齢を用い、それらから、全脳、肝臓、副腎を摘出し、脳に関しては直ちに正中二等分した。各組織は、液体窒素を用いて凍結し保存した。実験動物に対する動物愛護上の配慮として、マウスへのビスフェノール A の投与は苦痛を伴わない混餌で行い、組織摘出は断頭法による安楽死後速やかに行った。

(1) 脳内のアミンの定量

半脳を用いて、モノアミン系の脳内神経伝達物質の定量を行った。凍結組織に内部標準物質としてイソプロテレノールと、脳組織重量に合わせて過塩素酸を加えてヒスコトロンで懸濁し蛋白を変性させた後、遠心分離を行い変性蛋白を除去した。遠心上清に酢酸ナトリウムを添加して pH を 3.0 付近に調整後、HPLC 分析に供した。検出は、多電極型電気化学検出器を用いた。測定項目は、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンの脳内の主要なモノアミン系神経伝達物質とした。

(2) モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量

半脳を用いて、モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量を行った。凍結組織から組織総 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて相補的な DNA を合成した。この RNA-DNA 鎖を鋳型として、各タンパク質特異的なプライマー組およびプローブを用いて PCR で増幅し、増幅した特異的 DNA フラグメント量から元の mRNA の定量を行った。通常の PCR では定量性に欠けることから、本試験では、増幅過程をリアルタイムでモニターするリアルタイム PCR を行った。定量の標準には、濃度のわかった各蛋白の全長 cDNA を用いて PCR の鋳型として用いた。これら各蛋白の全長 cDNA は、あらかじめ、PCR を用いて作成した。モノアミンに関わるタンパク質として、カテコールアミンの生成律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ、ドパミンの各タイプ受容体、モノアミンの代謝酵素であるモノアミンオキシダーゼ、チラミンからドパミンを生成する

CYP2D、ドパミントランスポーターなどのタンパク質を考え、脳内アミンの結果からこの中のいくつかの項目を選択し測定した。また、各サンプルの補正に用いる蛋白としては、GAPDH を測定した。

C 研究結果

(1) 脳内のアミンの定量

3週齢、6週齢の雌雄 offspring マウスの半脳を用いて、ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニンの定量を行った。

A) ドパミン

3週齢の雄：

最高用量の 8 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少した。

6週齢の雄：

2 μ g / g of food および 0.5 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少したが、更に高容量の 2 および 8 mg / g of food 群では、有意な差は見られなかった。

3週齢の雌：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。最低用量の 2 μ g / g of food 群で既に有意水準 0.01 で有意差が見られた。ビスフェノール A の投与量が、2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加するに従って、ドパミン量が減少していく傾向にあった。

6週齢の雌：

3週齢の雌と同様に、ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。最低用量の 2 μ g / g of food 群で既に有意水準 0.01 で有意差が見られ、コントロール群の約 70% 程度に、最高用量の 8 mg / g of food 群ではコ

ントロール群の約 50%程度まで減少した。

B) ノルエピネフリン

3週齢の雄：

最高用量の 8 mg / g of food 群で、コントロール群に比して有意に減少した。

6週齢の雄：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、ノルエピネフリンの減少量は変化せず、いずれもコントロール群の約 80% 程度であった。

3週齢の雌：

ビスフェノール A の投与量が 2 μ g / g of food から 2 mg / g of food へ増加するに従って、ノルエピネフリン量も増加する傾向にあった。しかし、統計的に有意に増加したのは、2 mg / g of food 群だけであった。また、最高用量の 8 mg / g of food 群では増加傾向も見られなかった。

6週齢の雌：

ビスフェノール A の投与量 2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加するに従って、ノルエピネフリン量は減少する傾向にあった。しかし、統計的に有意に減少したのは、8 mg / g of food 群だけであった。

C) セロトニン

3週齢の雄：

2 μ g / g of food と 0.5 mg / g of food の群で、コントロール群に比して有意に増加したが、高容量の 2 および 8 mg / g of food 群では、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

6週齢の雄：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

3週齢の雌：

0.5 mg / g of food の群のみで、コントロール群に比して有意に減少した。統計的に有意ではあるものの、その減少量は 10%程度で少なかった。他の投与群では、変化はなかった。

6週齢の雌：

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に減少した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、ノルエピネフリンの減少量は大きく変化せず、いずれもコントロール群の約 85%程度であった。

これらをまとめると、

ドパミンは、雌のビスフェノール A 投与群すべてにおいて、コントロール群に比して、有意に減少していた。その減少は、ビスフェノール A 投与量に応じて変化していく傾向にあり、最大投与量群ではコントロール群の 50%程度にまで減少していた。また、この変化は、3週齢および6週齢いずれの週齢においても見られた。しかし、雄では、雌のような顕著な減少は見られなかった。

ノルエピネフリンは、6週齢の雄で、ビスフェノール A 投与群でコントロール群に比して、有意に減少していたが、ビスフェノール A 投与群間では差はなかった。

セロトニンは、6週齢の雌で、ビスフェノール投与群でコントロール群に比して、有意に減少していたが、ビスフェノール A 投与群間では差はなかった。

(2) モノアミンに関わるタンパク質 mRNA の発現量の定量

(1) の検討で、雌の6週齢でドパミンの減少量が大きかったことから、この雌の6週齢の脳組織を用いて、ドパミンに関わる種々のタンパク質 mRNA の測定を行った。各サンプルの補正には GAPDH の mRNA を用い、標的タンパク質の mRNA 量は、すべて、GAPDH の mRNA との比で示した。本年度は、標的タンパク質としては、チロシンヒドロキシラーゼ (TH)、モノアミンの代謝酵素であるモノアミンオキシダーゼタイプ A (MAO-A)、ドパミンの D4 受容体を選び、その mRNA を測定した。

A)チロシンヒドロキシラーゼ (TH)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意に増加した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、チロシンヒドロキシラーゼ mRNA の増加量大きく変化しなかった。

B)モノアミンオキシダーゼ A (MAO-A)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群に比して有意な変化は見られなかった。

C)ドパミンの D4 受容体 (D4R)

ビスフェノール A 投与群全てで、コントロール群の約 300%程度まで有意に増加した。しかし、ビスフェノール A の投与量が 2 μ g / g of food から 8 mg / g of food へ増加しても、チロシンヒドロキシラーゼ mRNA の増加量大きく変化しなかった。

これらをまとめると、

チロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびドパミ

ンの D4 受容体は、ビスフェノール A 投与群全て有意に増加したが、ビスフェノール A 投与群間にその差は見られなかった。

D 考察

今回測定した主要なモノアミン系神経伝達物質（ドパミン、ノルエピネフリン、セロトニン）のうち、雌においてドパミンが顕著に減少した。ドパミンの脳内の機能から考えると、これらの動物は、運動、感情や情動発現、脳報酬系に異常をきたしている可能性が考えられた。また、このドパミンの減少は、3 週齢および 6 週齢の両週齢で見られた事から、この異常が、母親を介してビスフェノール A の間接暴露を受けている間から生じ、さらにその後ビスフェノール A 暴露から解除されても持続していることが明らかとなった。このことは、ビスフェノール A の胎児期・幼児期暴露によるドパミン量の減少が、不可逆的変異を伴っている可能性を示している。このドパミンが減少している時の脳内のタンパク質 mRNA を調べると、チロシンヒドロキシラーゼ (TH) およびドパミンの D4 受容体が、ビスフェノール A 投与群であればその量に関係なく増加していた。このドパミン生成酵素の律速酵素であるチロシンヒドロキシラーゼ (TH) および受容体の増加は、減少したドパミン量に対する生体応答 (up-regulation) である可能性が考えられる。チロシンヒドロキシラーゼ (TH) が増加しているにも関わらず、ドパミン量が減少したままであることから、このドパミン量の減少がチロシンヒドロキシラーゼの減少によるものではないことが明らかとなった。そして、分解酵素であるモノアミンオキシダーゼ A が変化していないことから、分解系の酵素の過剰

発現でもないと考えられた。これらのことから、ビスフェノール A の胎児期・幼児期暴露によるドパミン量の減少は、暴露を受けていた時期の脳内におけるなんらかのドパミン神経系傷害によるものである可能性が強く示唆された。分解系の酵素には、今回測定したモノアミンオキシダーゼ A 以外にも、モノアミンオキシダーゼ B や COMT が存在しているので、それらを含めてさらにドパミントランスポーターや他のドパミン受容体など標的タンパク質を広げて mRNA の測定を継続してしなければ全体的な論議が出来ないが、ビスフェノール A が胎児期や乳児期の脳でどのような作用を有しているのか、そのような機能分子（蛋白等）に結合しているのかを検討する必要があると考えられた。また、ノルエピネフリン、セロトニンの変動に関しても、さらに検討を行わなければ今回の検討だけでは評価が出来ないと考えられた。

E 結論

親へのビスフェノール A 投与によって、胎児期・乳児期に間接的に暴露をうけた仔マウスの脳では、ドパミン等のモノアミン神経伝達物質の量が減少していた。その減少は、ビスフェノール A の暴露から解除されても継続する事が明らかとなり、なんらかの不可逆的な変異によって引き起こされている可能性が示唆された。

F 研究発表

1. 論文発表

Komatsu K, Ito K, Nakajima Y, Kanamitsu Si, Imaoka S, Funae Y, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Sugiyama Y., Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide

- and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments., *Drug Metab Dispos* Apr;28(4) : 475-81, 2000
- Ishiguro N, Senda C, Kishimoto W, Sakai K, Funae Y, Igarashi T., Identification of CYP3A4 as the predominant isoform responsible for the metabolism of ambroxol in human liver microsomes., *Xenobiotica*. Jan; 30 (1):71-80, 2000
- Hase, I., Imaoka, S., Oda, Y., Hiroi, T., Nakamoto, T., Asada, A. and Funae, Y., Area under the plasma concentration-time curve of inorganic fluoride following sevoflurane anesthesia correlates with CYP2E1 mRNA level in mononuclear cells, *Anaesthesiology*, in press
- Nakamoto, T., Hase, I., Imaoka, S., Hiroi, T., Oda, Y., Asada, A. and Funae, Y., Quantative competitive RT-PCR for CYP3A4 mRNA in human peripheral lymphocytes., *Pharmacogenetics*, in press
- Fukuda, T., Nishida, Y., Imaoka, S., Hiroi, T., Funae, Y. and Azuma, J., The decreased disposition of venlafaxine in vivo possibly caused by instability of CYP2D6: 2D6*10 expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* in press
- Hagiwara A, Miyata E, Tamano S, Sano M, Masuda C, Funae Y, Ito N, Fukushima S, Shirai T., Non-carcinogenicity, but dose-related increase in preneoplastic hepatocellular lesions, in a two-year feeding study of phenobarbital sodium in male F344 rats., *Food Chem Toxicol*, Aug;37(8):869-79, 1999
- Chow, T., Imaoka, S., Hiroi, T. and Funae, Y., Developmental changes in the catalytic activity and expression of CYP2D isoforms in the rats., *Drug Metab. Dispos.*, 27, 188-192, 1999.
- Nakamura, A., Hirota, T., Morino, A., Imaoka, S., Funae, Y., Yamamoto, Y., Tasaki, T., Masuda, M., Kazusaka, A. and Fujita, S., Cytochrome P450 isoforms responsible for the N-deethylation and cyclohexane-hydroxylation of NS-21., *Xenobiotica*, 29, 243-252, 1999.
- Takemura, S., Minamiyama, Y., Imaoka, S., Funae, Y., Hirohashi, K., Inoue, M. and Kinoshita, H., Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia., *J. Hepatol.*, 30, 1035-1044, 1999.
- Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y. and Okada, S., Isoforms of cytochrome P450 on organic

nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels., FEBS Lett., 452, 165-169, 1999.

Ichihara, T., Wanibuchi, H., Taniyama, T., Okai, Y., Yano, Y., Otani, S., Imaoka, S., Funae, Y. and Fukushima, S., Inhibition of liver glutathione S-transferase placental form-positive foci development in the rat hepatocarcinogenesis by *Porphyra tenera* (Asakusa-nori)., Cancer Lett., 141, 211-218, 1999.

Ayajiki, K., Okamura, T., Fujioka, H., Imaoka, S., Funae, Y. and Toda, N. Possible involvement of CYP 3A-derived arachidonic acid metabolite in responses to endothelium-derived K⁺ channel opening substance., Br. J. Pharmacol., 128, 802-808, 1999.

Chow, T., Hiroi, T., Imaoka, S., Chiba, K. and Funae, Y., Isoform-selective metabolism of mianserin by cytochrome P-450 2D., Drug. Metab. Dispos., 27, 1200-1204, 1999.

今岡進, CYP4 ファミリーを中心としたチトクローム P450 分子種の機能解明, 薬物動態, 14, 139-147, 1999.

2.学会発表

船江良彦, チトクローム P-450 の分子多様性と
その生理機能, 第 19 回 アルコール医学生物学
研究会学術集会 (大阪 1999)

成松鎮雄、丸尾剛、山本重雄、廣井豊子、船江良彦, 酵母発現 CYP2D 酵素による光学活性薬物酸化反応の速度論的解析, 第 119 回 日本薬学会年会 (徳島 1999)

南山幸子、竹村茂一、今岡進、亀川美佳、船江良彦、井上正康、岡田茂, 有機ニトロ化合物からの NO 遊離とチトクローム P450 分子種の関与およびヒト心臓血管におけるその局在, 第 21 回磁気共鳴医学会 (札幌 1999)

長田真優子, 血管系および神経系培養細胞における酸素濃度変化とストレス蛋白の発現, 第 6 回 大阪市立大学薬理学教室研究会 (大阪 1999)

北野光昭、榊田周佳、鱈淵英機、菊崎泰枝、今岡進、日高隆義、船江良彦、中谷延二、福島昭治, 植物由来化合物クマペリンのラット肝発癌に対する抑制作用の検討, 第 58 回 日本癌学会総会 (広島 1999)

南山幸子、竹村茂一、今岡進、豊國伸哉、船江良彦、井上正康, エンドトキシン肝障害におけるチトクローム P450 の役割と活性酸素・フリーラジカルの意義, 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜 1999)

今岡進、浅井哲、杉本俊門、廣井豊子、船江良彦
ヒト CYP4B1 の発現と膀胱癌について, 第 72 回 日本生化学会大会 (横浜 1999)

長田真優子、今岡進、金勝慶、廣井豊子、岩尾洋、

船江良彦, 血管系および神経系培養細胞における
酸素濃度変化とストレス蛋白の発現, 第72回 日
本生化学会大会 (横浜 1999)

都築大輔、山本重雄、片岡洋行、成松鎮雄、今岡
進、船江良彦, 部位特異的変異導入法による
CYP2D6 バリエントの作成と酵母における発現,
薬学会中国四国支部例会 (高知 1999)

都築大輔、竹味千恵、山本重雄、片岡洋行、成松
鎮雄、今岡進、船江良彦, 酵母発現 CYP2D6 バ
リエントの酵素活性, 薬学会中国四国支部例会
(高知 1999)

成松鎮雄、丸尾剛、都築大輔、片岡洋行、山本重
雄、佐藤哲男、廣井豊子、今岡進、船江良彦, 酵
母発現ラットおよびヒト CYP2D 酵素による光
学活性基質酸化反応の特性: 肝ミクロゾーム画
分との比較, 第14回 日本薬物動態学会年会 (浜
松 1999)

今岡進、中本達夫、長谷一郎、杉本俊門、小田裕、
廣井豊子、船江良彦, ヒトにおける薬物代謝酵素
誘導の検出: リンパ球の P450 mRNA の定量的
PCR を用いた検出法の開発, 第14回 日本薬物
動態学会年会 (浜松 1999)

福田剛史、西田裕子、今岡進、廣井豊子、山本勇、
船江良彦、東純一, CYP2D6*10 の特性および
in vitro 代謝パラメーターによるヒト薬物動態予
測の可能性, 第14回 日本薬物動態学会年会 (浜
松 1999)

中島由起子、伊藤清美、船江良彦、今岡進、島田
典招、Green, C.E., Tyson, C.A., 杉山雄一, In
vitro 代謝試験に基づいたヒト in vivo 薬物肝代
謝能の定量的予測: ヒト肝ミクロソームおよびヒ
ト CYP 発現系の有用性, 第14回 日本薬物動
態学会年会 (浜松 1999)

水野大、廣井豊子、今岡進、船江良彦, Toluene に
よるラット CYP 各分子種酵素誘導, 第14回 日
本薬物動態学会年会 (浜松 1999)

廣井豊子、長敏夫、今岡進、船江良彦, ヒトおよ
びラット CYP2D 分子種の基質特異性, 第14回
日本薬物動態学会年会 (浜松 1999)

田口美緒、吉井一良、小林カオル、田井中均、今
岡進、船江良彦、島田典招、細川正清、千葉寛,
CYP と cytochrome P450 reductase の含量比
による Km 値の変化, 第14回 日本薬物動態学
会年会 (浜松 1999)

Hiroi, T., Yoshura, K., Kishimoto, W., Chow,
T., Imaoka, S., and Funae, Y., Steroids
metabolism by CYP2D., International
Symposium on Molecular Steroidogenesis
(Nara, 1999)

Imaoka, S., Asai, S., Sugimoto, T., Hiroi, T.,
and Funae, Y., Comparison of human
CYP4B1 with that of other species., 11th
International Conference on Cytochrome
P450 (Sendai, 1999)

Narimatsu, S., Maruo, G., Kataoka, H., Yamamoto, S., Hiroi, T., Imaoka, S. and Funae, Y. , Characterization of optically active drug oxidation by rat CYP2D enzymes (CYP2D1, 2D2, 2D3 and 2D4) expressed in yeast cells

11th International Conference on Cytochrome P450 Sendai 1999

Minamiyama, Y., Takemura, S., Akiyama, T., Imaoka, S., Inoue, M., Funae, Y., and Okada, S. , Cytochrome P450 isoform, CYP3A4, plays a major role in organic nitrate-derived nitric oxide release in human heart vessels.

3.

G 知的所有権の取得状況

- 1.特許取得：なし
- 2.実用新案登録：なし
- 3.その他：なし