

ビスフェノール A が脳・神経系の形成・成熟に及ぼす影響の分子病理学的解析

分担研究者 伏木信次 京都府立医科大学教授 (附属脳・血管系老化研究センター病態病理学部門)

研究要旨 ビスフェノール A の胎生期曝露は神経突起伸長に関与する GAP43 の発現変化、ドーパミン系や GABA 系の神経細胞数の変動をもたらすことが示唆された。結果の重要性に鑑み、今後さらに精緻な解析が必要である。

A. 研究目的

本研究は、胎児期から出生後早期にかけてマウスがビスフェノール A に曝露された際に、脳神経系の器官形成や組織形成にどのような影響が及ぶかを、遺伝子レベルから組織レベルに至るまで多面的かつ詳細に解析することを目的とする。また同様の時期にビスフェノール A に曝露された場合、行動や学習に及ぼす影響が危惧されるので、生後の脳を対象として組織構築や神経伝達物質に注目して何らかの変化が出現するか否かを明らかにすることを第二の目的とする。

ビスフェノール A の幼児・胎児への曝露が脳形成や発達段階にある脳に悪い影響を及ぼすのではないかという不安が国民の間に広がっている中、実験動物を対象としてその生物影響、とりわけ脳への影響を正確に把握することは緊急性が高くかつ社会的意義も大きいと考える。

B. 研究方法

ddY 系雄性マウスに 2 日間ビスフェノール A を種々の濃度に混じた食餌(2 μ g, 0.5mg, 2mg, 8mg/g of food)を与えたのち、この雄性マウスと雌性マウスを交配して、その妊娠期ならびに授乳期にそれぞれの濃度のビスフェノール A 混入飼料を投与した。

妊娠 18 日の時点で帝王切開により胎児を取り出し、パラフォルムアルデヒドによる浸漬固定ないしは液体窒素による凍結を行い試料とした。また出生後 3 週、4 週の時点で全身麻酔下にパラフォルムアルデヒドによる経口

的灌流固定を施行ないしは脳を取り出し凍結標本とした。大脳新皮質ならびに海馬中央部を通る面、また視交叉ならびに medial preoptic area を通る面で切片を作成し、ニッスル染色、HE 染色、さらに神経伝達物質関連酵素やカルシウム結合蛋白などに対する各種抗体を用いた免疫組織染色を実施した。また胎児期の脳についてはアポトーシス検出のため TUNEL 染色も施した。一部の動物については妊娠 10 日目以降にビスフェノール A を混じた飼料を与え出生前に胎児を採取した。

(倫理面への配慮) 動物の取り扱いおよび処置については動物愛護に十分配慮した。

C. 研究結果

受精前からビスフェノール A を摂取せしめた場合、出生した児に抗不安効果の増強や運動協調性障害など行動学的異常を生じることが鈴木らにより見出された。

そこで、そのような行動異常に関わることが予想されるドーパミンや GABA、セロトニンなどに注目して脳での分布を調べた。ドーパミン産生細胞に特異的に検出されるチロシン水酸化酵素(TH)や GABA の合成に関わるグルタミン酸脱炭酸酵素(GAD)、アセチルコリン合成に関わるコリンアセチル転移酵素(ChAT)、セロトニンの免疫組織化学を施行したところ、ビスフェノール A (8mg/g of food)投与群において、TH 陽性神経細胞数ならびに神経突起の減少、大脳皮質における GAD 陽性神経細胞数の増加、calbindin 陽性神経細胞数の減少がみられた。

また胎児期大脳皮質における変化としては成長円錐部に発現する GAP43 の分布に投与群と対照群との間で差をみとめた。すなわちビスフェノール A 摂取群では GAP43 陽性領域の縮小を示した。

なお、妊娠前からビスフェノール A に曝露された母体から採取した胎児において、肉眼的に明らかな脳の形成障害は認めなかった。

D. 考察

大脳皮質においてみられた GAD 陽性神経細胞の増加、calbindin 陽性神経細胞の減少、大脳基底核における TH 陽性神経細胞の減少は、胎生期に摂取されたビスフェノール A がドーパミン系や GABA 系に影響を及ぼしたことを示唆している。

また、神経突起の伸長やシナプス形成に関わると想定される GAP43 の胎児大脳皮質における分布がビスフェノール A 摂取群で抑制される傾向を示したことは神経細胞分化や神経回路形成にビスフェノール A が好ましからざる影響を残す可能性を示唆する。しかしながら、胎生後期に採取した胎児において脳神経系に肉眼的異常を認めなかったことから、少なくとも脳に関する限り、胎児の器官形成そのものには影響を及ぼさないと考えられた。

E. 結論

ビスフェノール A の胎生期曝露は形成途上の脳における神経突起伸長に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。またその影響は成熟脳におけるドーパミン系や GABA 系の神経細胞数の増減やシナプス形成に反映する可能性が示唆された。

ビスフェノール A 投与量の異なる動物すべてについては未だ検討し得ていないので、今後検索匹数を増やすとともに、定量的解析を組み合わせることにより、ビスフェノール A 胎生期曝露の脳形成への影響をさらに詳細に解明したい。

F. 研究発表

1. 論文発表

伏木信次、田口泰子、木下周子、石川裕二、広部知久. 胎

生期放射線照射による大脳皮質形成障害.放射線の生体影響とその修飾—実験発がんを中心として—(荻生俊昭、小木曾洋一編)、放射線科学 臨時増刊号 42(6): 162-168,1999 実業公報社

Shiga, K., Fukuyama, R., Kimura, S., Nakajima, K., Fushiki, S. Mutation of the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27) results in truncation of mRNA expressed in leucocytes in a Japanese family with cerebrotendinous xanthomatosis., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 67: 675-677, 1999.

Yuh, I., Yaoi, T., Watanabe, S., Okajima, S., Hirasawa, Y., Fushiki, S. Up-regulated uridine kinase gene identified by RLCS in the ventral horn after crush injury to rat sciatic nerves., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:104-109, 1999.

Hirai, K., Yoshioka, H., Kihara, M., Hasegawa, K., Sakamoto, T., Sawada, T., Fushiki, S. Inhibiting neuronal migration by blocking NMDA receptors in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study., *Dev. Brain Res.* 114: 63-67, 1999.

Hirai K, Yoshioka H, Kihara M, Hasegawa K, Sakamoto T, Sawada T, Fushiki S. Effects of ethanol on neuronal migration and neural cell adhesion molecules in the embryonic rat cerebral cortex: a tissue culture study., *Dev. Brain Res.* 118: 205-210, 1999.

Kanemura, Y., Hiraga, S., Arita, N., Ohnishi, T., Izumoto, S., Mori, K., Matsumura, H., Yamasaki, M., Fushiki, S., Yoshimine, T. Isolation and expression analysis of a novel human homologue of the *Drosophila glial cells missing (gcm)* gene., *FEBS Lett.* 442: 151-156, 1999.

Matsushita, H., Takeuchi, Y., Kosaka, K., Fushiki, S., Kawata, M., Sawada, T. Changes in serotonergic neurons in the brain of pyriethamine-induced acute thiamine-deficient mice., *Acta Neuropathol.* 98: 614-621, 1999.

2. 学会発表 該当なし

G. 知的所有権の取得状況 該当事項なし