

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 氏名（本籍） | 宮川 和也 | （新潟県） |
| 学位の種類 | 博士(薬学) | |
| 学位記番号 | 甲第117号 | |
| 学位授与年月日 | 平成19年3月15日 | |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当者 | |
| 学位論文の題名 | Prenatal and neonatal exposures to an endocrine disruptor, bisphenol-A, affect central dopaminergic and cholinergic neuron development | |
| 論文審査委員 | 主査 | 教授 鈴木 勉 |
| | 副査 | 教授 中澤 裕之 |
| | 副査 | 教授 中 陳 静 男 |

論文内容の要旨

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すことが数多く報告され、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は、初期に報告された生殖器系への影響のみならず、中枢神経系にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。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ものの、加熱により容易に溶出することから、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。また、興味深いことに、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、dopamine 神経系の機能亢進に起因した依存性薬物に対する感受性の亢進が惹起されることが明らかにされており、現在、注意欠陥多動性障害患者の増加や依存性薬物乱用の若年齢化に、こうした環境因子の関与も懸念されている。一方、中枢神経系は神経細胞とグリア細胞で構成されており、近年、グリア細胞の一つであるアストロサイトが dopamine 神経伝達を積極的に制御していることが明らかにされている。これらの背景から、本研究では bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経の発達に及ぼす影響およびアストロサイトの関与について、分子生物学的ならびに免疫組織学的に検討した。

さらに、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露が、dopamine 神経のみならず、他の神経機能変化をも惹起する可能性を考慮し、不安感受性、運動学習機能および記憶保持能力に対する bisphenol-A の影響も併せて検討した。

Bisphenol-A 処置によるアストロサイトの活性化

低用量 bisphenol-A (10 fM – 1 pM, 24 hr) を、1 日齢 ICR 系マウス由来神経/グリア共培養細胞および初代培養アストロサイトに処置し、アストロサイト特有の中間径フィラメントである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の特異的抗体を用いてアストロサイトの形態変化を免疫染色法に従い検討した。その結果、bisphenol-A の用量に依存したアストロサイトの形態変化が引き起こされた。Bisphenol-A はエストロゲン様作用を有することが知られていることから、内因性エストロゲンリガンドである 17 β -estradiol においても同様の検討を行ったところ、bisphenol-A の処置で認められるようなアストロサイトの形態変化は認められなかった。また、bisphenol-A と各種性ホルモン受容体拮抗薬を共処置した結果、bisphenol-A の処置により誘導されるアストロサイトの形態変化は影響を受けなかった。以上のことから、低用量の bisphenol-A 処置により、アストロサイトの形態変化が引き起こされ、これは、bisphenol-A の有する性ホルモンかく乱作用とは異なった機序による可能性が示唆された。次に、このアストロサイトの形態変化が、機能的な変化を伴うか否かを検討する目的で、dopamine 誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度の変化を測定したところ、bisphenol-A の処置により、dopamine 誘発細胞内 Ca²⁺ 濃度の上昇を増強することが明らかとなった。

以上の結果から、低用量 bisphenol-A は性ホルモンかく乱作用とは異なった機序により、アストロサイトの活性化を誘導することを見出した。

Bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経機能亢進と曝露時期の関連性

近年、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反応性の亢進が引き起こされることが明らかにされている。本研究では、bisphenol-A の慢性曝露により引き起こされる morphine 誘発報酬効果の増強と bisphenol-A の曝露時期の関連性について検討を行った。Bisphenol-A の慢性曝露は薬物混入飼料法に従い、bisphenol-A を 2 x 10³ μ g/g of food の用量で、曝露期間を妊娠初期、器官形成期、妊娠後期、授乳期の 4 期に分けた。まず、morphine 誘発自発運動量促進作用における bisphenol-A の影響について検討を行ったところ、器官形成期および授乳期に bisphenol-A を曝露された動物において、control

群と比較して morphine 誘発自発運動量促進作用の増強が認められた。次に、morphine 誘発報酬効果について検討したところ、control 群では報酬効果を示さない morphine 用量 1 mg/kg, s.c. での条件づけにより、器官形成期および授乳期 bisphenol-A 曝露群で有意な報酬効果が発現した。さらに、側坐核を含む領域である limbic forebrain における dopamine 誘発 G-protein 活性化作用について検討したところ、器官形成期および授乳期 bisphenol-A 曝露群において dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の増強が認められた。一般的に、脳における神経細胞の増殖は胎児期に最も盛んであるため、生後脳の重量はほとんど変化しないことが知られている。しかしながら、シナプス密度の増加に伴う神経ネットワークの構築は、授乳期において最も盛んに行われることから、脳の機能的な発達には胎児期のみならず授乳期も重要な期間であると考えられている。本研究の結果とこれらの背景より、器官形成期および授乳期に bisphenol-A の曝露を受けることにより、精神依存形成に重要な役割を担う中脳辺縁 dopamine 神経系が著明な影響を受ける可能性が示唆された。

Bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経系発達異常

Bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経系の発達異常を詳細に検討する目的で、bisphenol-A を慢性曝露した胎生 14 日のマウス全脳より RNA を採取し、RT-PCR 法に従い、dopamine 神経発達関連因子の発現量を検討した。その結果、bisphenol-A を曝露された胎児脳において、dopamine 神経の発達に重要な役割を担う、sonic hedgehog (Shh) および glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA 発現量が著明に減少することを発見した。一般的に、脳における dopamine 神経細胞の増殖は胎生 10.5-14 日に最も盛んであるため、dopamine 神経の発達には器官形成期が重要な期間である。したがって、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により dopamine 神経発達のかく乱が惹起される可能性が示唆される。一方、bisphenol-A を胎児期および授乳期に慢性曝露された成獣マウスの側坐核において、dopamine 合成酵素である tyrosine hydroxylase (TH) および dopamine 神経終末のマーカである dopamine transporter (DAT) 免疫活性の著明な増強が認められた。また、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露マウスでは、側坐核に隣接し、dopamine 神経伝達に積極的に関与する腹側淡蒼球において、GFAP 陽性アストロサイトの活性化が引き起こされることが明らかとなった。以上の結果から、bisphenol-A の慢性曝露により、dopamine 神経発達関連因子の発現異常に伴い、dopamine 神経の発達異常が引き起こされる可能

性が示唆された。

Dopamine 神経機能に及ぼす低用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露の影響

内分泌かく乱化学物質問題において、低用量問題が最も重要視されている。本研究では次に、環境から曝露されうる用量の bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露が dopamine 神経系の機能変化を引き起こすか否かについて検討を行った。vom Saal らは、ヒトの bisphenol-A 曝露量が 2-20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ であると報告している。この報告を基に、薬物混入試料法に従い、 $3 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{g}$ of food の用量の bisphenol-A を胎児期および授乳期に慢性曝露した。まず、morphine 誘発自発運動量促進作用における低用量 bisphenol-A の影響を検討したところ、有意な morphine 誘発自発運動量促進作用の増強が認められた。また、morphine 誘発報酬効果について検討したところ、control 群では報酬効果を示さない morphine 用量の 1 mg/kg, s.c. により有意な報酬効果を発現した。さらに、側坐核を含む領域である limbic forebrain における dopamine 誘発 G-protein 活性化作用について検討したところ、低用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の増強が認められた。以上の結果から、環境中に存在するような低用量の bisphenol-A によっても dopamine 神経系の機能亢進が引き起こされることが明らかとなった。

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による記憶保持能力に及ぼす影響

Bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露が dopamine 神経のみならず、他の神経機能にも影響を及ぼすか否かを検討する目的で、低用量 ($3 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{g}$ of food) および高用量 ($2 \times 10^3 \mu\text{g}/\text{g}$ of food) bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による、不安感受性、運動学習機能および記憶保持能力に及ぼす影響をそれぞれ明暗試験、高架式十字迷路試験、rota-rod 試験および step-through 試験に従い検討した。その結果、不安感受性、運動学習機能に変化は認められなかったものの、記憶保持能力の低下が認められた。海馬における acetylcholine 神経は記憶保持に重要な役割を担っていることが知られていることから、本研究では次に、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬 acetylcholine 神経に及ぼす影響について、acetylcholine 神経のマーカーである choline acetyltransferase (ChAT) の特異的抗体を用いて免疫染色法に従い検討した。その結果、低用量および高用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、海馬全域において

ChAT 免疫活性の減弱が認められた。以上の結果から、高用量のみならず、低用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、acetylcholine 神経の異常に伴う、記憶保持能力の低下が引き起こされる可能性が示唆された。

結語

本研究の結果から、morphine 誘発報酬効果の増強には、dopamine 神経発達関連因子の発現異常を伴う dopamine 神経発達の異常が一部関与していることが示唆された。また、この dopamine 神経の機能亢進には、アストロサイトの活性化が一役を担っている可能性が示唆された。一方、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露は、acetylcholine 神経系の機能低下に起因した記憶保持能力の低下をも惹起することが明らかとなった。さらに、環境中から曝露され得る低用量 bisphenol-A の曝露によっても、このような神経機能の異常が引き起こされることも明らかにした。本研究の結果から、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胎児期から授乳期に bisphenol-A に曝露されることは神経機能の多様かつ不可逆的な変化を引き起こす可能性が懸念される。

論文審査の結果の要旨

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すことが数多く報告され、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ている。内分泌かく乱化学物質は、初期に報告された生殖器系への影響のみならず、中枢神経系にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。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ものの、加熱により容易に溶出することから、その安全性の確認が必要とされている。本論文では、bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経および choline 作動性神経の発達に及ぼす影響およびアストロサイトの関与について多角的に検討している。

まず、低用量 bisphenol-A (10 fM - 1 pM, 24 hr) を、1 日齢 ICR 系マウス由来神経/グリア共培養細胞および初代培養アストロサイトに処置し、アストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の特異的抗体を用いてアストロサイトの形態変化を免疫染色法に従い検討した結果、bisphenol-A の処置濃度に依存したアストロサイトの形態変化が引き起こされることを明らかにしている。また、bisphenol-A と各種性ホルモン受容体拮抗薬を共処置した結果、bisphenol-A の処置により誘導されるアストロサイトの形態変化は影響を受けなかったことから、低用量の bisphenol-A 処置によって、アストロサイトの形態変化が引き起こされ、この機序として bisphenol-A の有する性ホルモンかく乱作用とは異なった機序の可能性を示唆している。また、dopamine 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度の変化を測定したところ、bisphenol-A の処置により、dopamine 誘発細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を増強することが明らかとなったことから、低用量 bisphenol-A は性ホルモンかく乱作用とは異なった機序により、アストロサイトの活性化を誘導することを見出している。

次に、bisphenol-A の慢性曝露による dopamine 神経発達に及ぼす影響について検討し、神経細胞の増殖が最も盛んに行われている器官形成期および神経ネットワークの構築に重要な授乳期に bisphenol-A を慢性曝露されたマウスにおいて、側坐核 dopamine 受容体の機能亢進に起因した morphine に対する感受性の亢進が引き起こされることを明らかにしている。また、dopamine 神経発達関連因子の発現について RT-PCR 法に従い検討したところ、bisphenol-A を曝露された胎

児脳において、dopamine 神経の発達に重要な役割を担う、sonic hedgehog および glial cell-line derived neurotrophic factor mRNA 発現量が著明に減少することを見出している。一方、bisphenol-A を胎児期および授乳期に慢性曝露された成体マウスの側坐核において、dopamine 神経のマーカーである tyrosine hydroxylase および dopamine 神経終末のマーカーである dopamine transporter 免疫活性の著明な増強が認められ、さらには、側坐核に隣接し、dopamine 神経伝達に積極的に関与する腹側淡蒼球において、GFAP 陽性アストロサイトの活性化が引き起こされることも明らかにしている。これらの知見は、bisphenol-A の慢性曝露により、dopamine 神経発達関連因子の発現異常に伴い、dopamine 神経の発達異常が引き起こされている可能性を示唆する十分な結果を得ている。

内分泌かく乱化学物質問題において、低用量問題が最も重要視されている。本論文では次に、環境から曝露されうる用量の bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露が dopamine 神経系の機能変化を引き起こすか否かについて検討を行っている。まず、morphine 誘発自発運動量促進作用における低用量 bisphenol-A の影響を検討し、有意な morphine 誘発自発運動量促進作用の増強を確認し、さらに morphine 誘発報酬効果についても検討し、control 群では報酬効果を示さない morphine の用量 1 mg/kg 皮下投与により有意な報酬効果を発現することを見出している。さらに、側坐核を含む領域である limbic forebrain における dopamine 誘発 G-protein 活性化作用について検討し、低用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、dopamine 誘発 G-protein 活性化作用の増強が引き起こされることを明らかにしている。以上の結果から、環境中に存在するような低用量の bisphenol-A によっても dopamine 神経系の機能亢進が引き起こされることを見出している。

一方、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による、不安感受性、運動学習機能および記憶保持能力に及ぼす影響を検討し、不安感受性、運動学習機能に変化は認められなかったものの、記憶保持能力の低下が認められることを明らかにしている。さらに、bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露による海馬 choline 作動性神経に及ぼす影響について、choline 作動性神経のマーカーである choline acetyltransferase (ChAT) の特異的抗体を用いて免疫染色法に従い検討した結果、低用量および高用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、海馬全域において ChAT 免疫活性の減弱が認められたことから、高用量のみならず、低用量 bisphenol-A の胎児期および授乳期慢性曝露により、choline 作動性神経の異常に伴う、記憶保持能力の低下が引き起こされると考察してい

る。

本論文では、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胎児期から授乳期に bisphenol-A に曝露されることにより、神経機能の多様かつ不可逆的な変化を引き起こす可能性を提唱し、本分野に多大な貢献をしている。また、本論文は正確に記載されており、その内容は博士論文に値し、博士(薬学)の学位を授与するに相応しいと判断する。