

平成 16 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (S)) 研究状況報告書

| | | | | | | |
|--|-----------------------|--|--|--------|----------------------|--------|
| ふりがな | よしかわ やすひろ | | | | | |
| 研究代表者氏名 | 吉川 泰弘 | | 所属研究機関・部局・職 | | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 | |
| 研究課題名 | 和文 | 高等動物の神経発達に対する内分泌攪乱化学物質の影響に関する研究 | | | | |
| | 英文 | Effects of endocrine disrupters on the neuronal development in higher animal species | | | | |
| 研究経費 | 平成14年度 | 平成15年度 | 平成16年度 | 平成17年度 | 平成18年度 | 総合計 |
| 16年度以降は内約額 金額単位：千円 | 22,900 | 20,600 | 18,900 | 13,800 | 11,200 | 87,400 |
| 研究組織 (研究代表者及び研究分担者) | | | | | | |
| 氏名 | 所属研究機関・部局・職 | 現在の専門 | 役割分担 (研究実施計画に対する分担事項) | | | |
| 吉川 泰弘 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 | 実験動物学 | 研究総括、サル類の行動に及ぼす内分泌攪乱化学物質の影響評価 | | | |
| 久和 茂 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教授 | 実験動物学 | ラット、サル類胎児培養神経系、サル類ES細胞に及ぼす環境化学物質の影響評価 | | | |
| 土井 邦雄 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 | 獣医病理学 | ラット胎児神経系に及ぼす化学物質の毒性病理解析 | | | |
| 局 博一 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 | 獣医病態生理学 | 内分泌攪乱化学物質のラット交感神経系に及ぼす影響評価 | | | |
| 西原 眞杉 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授 | 獣医生理学 | ラット視床下部に対する環境化学物質の影響評価 | | | |
| 寺尾 恵治 | 国立感染研・筑波霊長類センター・センター長 | 霊長類学 | カニクイザルを用いた内分泌攪乱化学物質の妊娠ステージによる胎児移行、血液動態解析 | | | |
| 早坂 郁夫 | 三和化学・熊本霊長類パーク・所長 | 霊長類学 | チンパンジーを用いた内分泌攪乱化学物質の体内動態解析 | | | |
| 中山 裕之 | 東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教授 | 獣医病理学 | サル類胎盤、胎児での解毒系酵素、変性蛋白処理系の形態学的解析 | | | |
| 当初の研究目的 (交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。) | | | | | | |
| <p>本研究は中枢神経系発達に重要な時期である妊娠・周産期における内分泌攪乱化学物質暴露による影響をヒトに近縁な霊長類と実験背景情報の豊富なラットを用いて種差を考慮しながら評価し、最終的にそのリスクをヒトへ外挿することが目的である。解析方法は神経系発達のエンドポイントとしての神経行動解析を主軸とし、さらに神経系発達を胎児及び <i>in vitro</i> でモデル化し細胞生物学的にその影響を明らかにする戦略である。本研究ではエストロゲン様化学物質としてビスフェノール A およびノニルフェノールを、また甲状腺ホルモン攪乱化学物質としてダイオキシン、ビスフェノール A、PCB 類の中間代謝産物である水酸化 PCB などを評価する。</p> <p>以下に具体的目標を挙げる。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1)ビスフェノール A について吸収、代謝および排泄に関してラット、サルおよびチンパンジーの間にある種差を検討しヒトでの動態を外挿する。また中間代謝物について解析する。 2)ラット及びサル由来初代培養神経細胞を用いて内分泌攪乱化学物質の作用機序を明らかにするとともに種差を検討する。サル類 ES 細胞の分化誘導及び ES 細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の影響を評価する。 3)妊娠ラットに対し、ビスフェノール A、ノニルフェノールおよび水酸化 PCB を暴露し次世代個体の行動発達に与える影響を検討する。 4)妊娠サルに対し、ダイオキシン、ビスフェノール A および水酸化 PCB を暴露し次世代サルの行動発達に与える影響を検討する。本項目では同時に実験的サルに適用する行動試験および解析法の開発を目的としている。 | | | | | | |

これまでの研究経過（研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。）

1) ビスフェノールAの吸収・代謝・排泄における種差

ビスフェノールA(BPA)について、ラット、サルおよびチンパンジーの間の薬物吸収代謝能力における種差を評価した。ラット、サルおよびチンパンジーに対し同一の手法により、BPAを10mg/kg/dayあるいは100mg/kg/dayの濃度でそれぞれ経口あるいは皮下へ投与し、血中BPAをELISA法により測定した。その結果、経口と皮下投与どちらの経路でもサル、チンパンジーはラットにくらべ吸収能力が高く、排泄能力は低かった。これらの結果は、従来ラットに対して用いられる毒性を示さないと考えられる濃度(NOEL)でも、霊長類に対して有害作用を発現する可能性を示唆する。現在LC/MSで中間代謝物も合わせて解析を進めている。

2) サル・ラット由来初代培養神経細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の作用機序の解明および種差検討

正常な中枢神経系の発達はプログラム細胞死によって厳密に制御されている。神経細胞死に対する内分泌攪乱化学物質の影響を検討する目的で、ラット由来初代培養神経細胞においてBPA、およびノニルフェノール(NP)の暴露がStaurosporine誘発神経細胞死に与える影響を評価した。その結果BPAおよびNPはStaurosporineによる神経細胞死に対しCaspase-3の活性上昇の阻害を伴う細胞死抑制効果を示した。このことは内分泌攪乱化学物質がプログラム細胞死を阻害する可能性を示唆するものである。また、内分泌攪乱化学物質の作用機序および感受性についてサルとラット間の種差の有無を検討するためにカニクイザル由来神経系細胞の選択的無血清初代培養系を確立し、毒性物質に対する感受性における種差を確認した。

3) ラットにおける周産期内分泌攪乱化学物質暴露が中枢神経系発達に与える影響の検討

ラットで内分泌攪乱化学物質による行動発達障害を評価するため、周産期BPA暴露(4mg/kg/day)による次世代オス個体のオープンフィールドにおける行動、能動的忌避学習能力の変化を報告した。次に、低濃度BPA(0.1mg/kg/day p.o.)、およびNP(0.1および10 mg/kg/day p.o.)の周産期暴露が次世代オスの行動発達におよぼす影響を検討した。受動的忌避学習能力試験ではBPAおよびNP暴露群は対照群に比べ電気刺激を忌避する傾向がみられた。シャトルボックス能動的忌避学習能力試験ではNP暴露群はわずかに条件刺激による忌避率の低下がみられた一方、BPA暴露群は顕著な条件刺激による忌避率の低下、および非条件刺激からの回避の失敗の増加がみられた。これら一連の行動学的試験からは活動性の低下は全く示唆されなかったため、周産期BPAおよびNP暴露による受動的忌避学習能力の増加および能動的忌避学習能力の低下は電気刺激という恐怖条件に対し過敏であることがその原因と推察された。さらにモノアミン系攪乱薬物(Tranylecypromine)負荷試験によりBPAおよびNP暴露によるモノアミン反応性の異常を明らかにした。甲状腺ホルモン攪乱の影響を評価するため、PTUを用いた実験的甲状腺機能低下症および周産期アミオダロン(甲状腺系攪乱)暴露による行動発達障害を検討した。

4) サルにおける周産期内分泌攪乱化学物質暴露が中枢神経系発達に与える影響の検討

サル類神経系発達に対する内分泌攪乱化学物質の影響を行動学的に評価するため、まず行動評価系の確立を試みた。この細目に関する研究は広島国際大学安田氏との共同で行った。アカゲザルにおいて周産期ダイオキシン暴露が次世代個体の行動発達に与える影響を評価した。妊娠アカゲザルに対し、ダイオキシンを0、30、300ng/kgで皮下投与をおこなった後、1ヶ月毎に5%の追加投与により体内ダイオキシン濃度を維持した。暴露による明らかな身体発育障害は見られなかった。行動学的評価の結果、周産期ダイオキシン暴露は指迷路における学習能力や目合わせ試験における観察者(ヒト)に対する意識には影響を与えなかったが、同世代個体との目合わせテストの結果に有意な影響を与えた。暴露個体は目合わせテスト用特別ケージという新規場面における恐怖心が薄く、他個体に対してより多く接触を試みた。今後はここで確立したサル類に対する実験的行動評価系を用いる予定である。

次にカニクイザルにおけるBPA周産期暴露が次世代動物の行動発達に与える影響を検索する目的で、1)で得られた結果を踏まえ妊娠20日目から皮下埋没式ポンプによりBPAを10μg/kg/dayという低濃度で暴露した。次世代個体において身体的異常は観察されず、現在上述の行動試験を行いながら順次解析中である。さらに妊娠カニクイザルを用いて水酸化PCB暴露実験をスタートさせている。

5) カニクイザルにおける胎児、胎盤の発達と内分泌攪乱化学物質の胎児移行

霊長類における胎児および胎盤の発達を明らかにする目的で、妊娠50、80、120日のカニクイザルを用いて、胎盤の発達と変性蛋白処理酵素の分布の推移を明らかにした。また放射性同位元素でラベルしたBPAを用いて、各妊娠ステージの体内分布及び胎児への移行と分布、代謝を検索した。

特記事項（これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。）

番号は「当初の研究目的（S 中間-1）」に対応する。

1) ビスフェノール A の吸収・代謝・排泄における種差

内分泌攪乱化学物質の影響に関する研究において「種差」というのは非常に重要であるが、通常は解剖学的、組織学的レベルから標的臓器細胞の機能における種差、または遺伝子、タンパク発現などに注目した種差について検討されることが多い。我々は内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A の吸収、代謝および排泄(ADME)における種差を明らかにした。このことは外因性である内分泌攪乱化学物質を暴露したとき、実験用齧歯類であるラットに比べ、ヒトを含む霊長類の標的臓器における濃度はより高い可能性がある。また、厳密にはカニクイザルとチンパンジーでは体内動態が異なる。これらの結果は許容 1 日摂取量等の安全性指標について、対象物質ごとに種差の検討を行わなければならないことを示唆している。

2) サル・ラット由来初代培養神経細胞を用いた内分泌攪乱化学物質の作用機序の解明および種差検討

内分泌攪乱化学物質の中には急性毒性が著しく弱いものが多い。ビスフェノール A やノニルフェノールも培養神経細胞に対する一般毒性（細胞死の誘導等）はほとんど認められない。ヒトでの暴露濃度を考えると、神経系に与える影響は神経細胞死による機能障害とは考えられない。我々はこれらの化学物質のエストロゲン様作用に注目し、これらの化学物質が毒性を示さない比較的低濃度で中枢神経系発達に必須の不要な細胞の刈り込み（プログラム細胞死）を阻害する可能性を示した。ビスフェノール A 周産期暴露による行動発達障害は明らかにされていたが、その機序については明らかな毒性がみられなかったためアプローチが難しかった。この実験の結果より発達期特有のプログラム細胞死の阻害が脳機能に非可逆的变化をもたらす可能性が考えられる。またビスフェノール A だけでなくノニルフェノールも同様に行動に影響を与える可能性が示された。

3) ラットにおける周産期内分泌攪乱化学物質暴露が中枢神経系発達に与える影響の検討

ラットにおける低濃度ビスフェノール A およびノニルフェノールでの恐怖条件に対する反応性の亢進を初めて明らかにした。また、これまでは様々な形で行動異常があると報告されていてもその原因を論じるための情報が無かったが、一候補としてモノアミン（恐怖に対する反応を司る）系の異常を示唆したことは今後の研究の方向性を考える上で重要である。

4) サルにおける周産期内分泌攪乱化学物質暴露が中枢神経系発達に与える影響の検討

ヒトにおける内分泌攪乱化学物質の影響を考えるにあたって実験用サル類を用いて評価することはその進化上の類似点からも有用である。しかし、サル類について実験行動学を指標として内分泌攪乱化学物質の影響を明らかにする試みは世界でも非常に少ない。

我々は、この短期間で 4 段指迷路試験（記憶学習能力）、目合わせ試験（ヒトに対する注意度）、2 個体間出会わせ試験（社会性）という新規実験的サル類行動発達総合評価系を確立しただけでなく、安田氏との共同研究という形でダイオキシンという最も注目度の高い化学物質暴露がサル類の行動発達に与える影響を明らかにしたこともこの分野における貢献度が高いと考えられる。現在進行中ではあるが、サル行動発達に対するビスフェノール A または水酸化 PCB 暴露の影響に関する研究は世界でも初めての試みである。

5) カニクイザルにおける胎児、胎盤の発達と内分泌攪乱化学物質の胎児移行

妊娠期の違いにより、母体と胎児の関係は必ずしも同一ではない。妊娠初期は胎児も小さく、母体及び胎盤の果たす役割は大きい。妊娠中期及び後期では胎児は母体と独立して、化学物質の吸収、分布、代謝、排出(ADME)を行う可能性が高い。我々は、霊長類における胎児および胎盤の発達を明らかにする目的で、妊娠 50、80、120 日のカニクイザルを用いて、胎盤の発達と変性蛋白処理酵素の分布の推移を明らかにした。また放射性同位元素でラベルした BPA を用いて、各妊娠ステージの体内分布及び胎児への移行と分布、代謝を検索した。妊娠 80 日以後は、BPA 濃度は母体よりも胎児の方が高濃度で、24 時間後の濃度も母体より高く、また腸管、奨尿液への排出も認められた。現在再現性について実験を進めている。

研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(発表予定のものを記入することも可能。)
の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会
等における発表状況について記入してください。)

吉川泰弘

- Negishi T, Ishii Y, Kawamura S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Cryopreservation and primary culture of cerebral neurons from cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Neuroscience Letters*, 328: 21-24, 2002.
- Negishi T, Kawasaki K, Takatori A, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the behavior of offspring in F344 rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14: 99-108, 2003.
- Yasumoto F, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Endogenous dopamine maintains synchronous oscillation of intracellular calcium in primary cultured-mouse midbrain neurons. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 24: 51-61, 2004.
- Negishi T, Katsuyoshi K, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Attention-deficit and hyperactive neurobehavioural characteristics induced by perinatal hypothyroidism in rats. *Behavioural Brain Research, revised*.
- Negishi T, Katsuyoshi K, Suzaki S, Maeda H, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranlycpromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental Health Perspectives, revised*.
- Negishi T, Shimomura H, Koyama T, Kawasaki K, Ishii Y, Kyuwa S, Yasuda M, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Gestational and Lactational Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Affects Social Behaviors between Two Infants in Developing Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*). *Environmental Health Perspectives, submitting*.
- Suzaki S, Negishi T, Takahashi M, Imamura M, Katsuyoshi K, Ishii Y, Kyuwa S, Tashiro T, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Amiodarone induced a novel perinatal thyroid hormone-disrupting model in rats. *Brain Research, submitting*.

久和 茂

- Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Inhibition of staurosporine-induced neuronal cell death by bisphenol A and nonylphenol in primary cultured rat hippocampal and cortical neurons. *Neuroscience Letters*, 353: 99-102, 2003.
- Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Primary culture of cortical neurons, type-1 astrocytes, and microglial cells from cynomolgus monkey (*macaca fascicularis*) fetuses. *Journal of Neuroscience Methods*, 131: 133-140, 2003.
- Kimura, N, Negishi T, Ishii Y, Kyuwa S, and Yoshikawa Y. Amyloid β induces astroglial responses rather than neuronal damages in primary cortical cultures from rats and cynomolgus monkeys. *Neuroscience Research, in press*, 2004.

土井邦雄

- Sehata, S., Teranishi, M., Atsumi, F., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. T-2 toxin-induced morphological changes in pregnant rats. *J. Toxicol. Pathol.* 16: 59-65 (2003)
- Takai, H., Katayama, K., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. Distribution of N-methyl-D-aspartate receptors (NMDARs) in the developing rat brain. *Exp. Mole. Pathol.* 75: 89-94 (2003)
- Takai, H., Katayama, K., Yasoshima, A., Uetsuka, K., Nakayama, H., and Doi, K. NMDA-induced apoptosis in the developing rat brain. *Exp. Toxic Pathol.* 55: 33-37 (2003)

局 博一

- Shuichi Towa, Masayoshi Kuwahara, and Hirokazu Tsubone. Characteristics of autonomic nervous function in Zucker-fatty rats: Investigation by power spectral analysis of heart rate variability. *Exp. Anim.* 53(2): 137-144, 2004.
- Megumi Akita, Masayoshi Kuwahara, Ryoji Nishibata, Hiroki Mikami, and Hirokazu Tsubone. The daily pattern of heart rate, body temperature, locomotor activity, and autonomic nervous activity in congenitally bronchial-hypersensitive (BHS) and bronchial-hyposensitive (BHR) guinea pigs. *Exp. Anim.* 53(2): 121-127, 2004.
- Tomohiro Kato, Hajime Ohmura, Atusshi Hiraga, Shinya Wada, Masayoshi Kuwahara, Hirokazu Tsubone. Changes in heart rate variability in horses during immersion in warm springwater. *Am. J. Vet. Res.* 64 (12): 1482-1485, 2003.
- Takashi Takeuchi, Ken-ichiro Hayashida, Hideaki Inagaki, Masayoshi Kuwahara, Hirokazu Tsubone and Etsumori Harada. Opioid mediated suppressive effect of milk-derived lactoferrin on distress induced by maternal separation in rat pups, *Brain Res.* 979: 216-224, 2003

西原真杉

- Suzuki M, Lee HC, Chiba S, Yonezawa T, Nishihara M. Effects of methoxychlor exposure during perinatal period on reproductive function after maturation in rats. *J Reprod Dev*, in press.
- Takagi H, Shibutani M, Lee KY, Lee HC, Nishihara M, Uneyama C, Takigami S, Mitsumori K, Hirose M (2004) Lack of modifying effects of genistein on disruption of the reproductive system by perinatal dietary exposure to ethinylestradiol in rats. *Reprod Toxicol*, in press.
- Matsuwaki T, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2004) Glucocorticoid counteracts the suppressive effect of tumor necrosis factor- α on the surge of luteinizing hormone secretion in rats. *J Endocrinol*, in press.
- Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2003) Expression analysis of estrogen and androgen target genes in neonatal rat hypothalamus. *J Reprod Dev* 49, 547-552.
- Fujioka H, Suzuki M, Yamanouchi K, Ohta A, Nagashima H, Kato M, Nishihara M (2003) Generation of transgenic rats expressing enhanced green fluorescent protein in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Reprod Dev* 49, 523-529.
- Matsuwaki T, Watanabe E, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2003) Glucocorticoid maintains pulsatile secretion of LH under infectious stress condition. *Endocrinology* 144, 3477-3482.
- Ishida M, Hirabayashi K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2003) Cloning and chromosomal localization of mouse 20 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene. *J Reprod Dev* 49, 79-85.
- Yonehara K, Suzuki M, Yamanouchi K, Nishihara M (2002) Androgen induces p130 mRNA expression in the neonatal rat hypothalamus. *Neurosci Lett*, 334, 107-110.
- Yonehara K, Suzuki M, Nishihara M (2002) Sex-related differences in gene expression in neonatal rat hypothalamus assessed by cDNA microarray analysis. *Endocrine J* 49, 131-137.

早坂郁夫

- Negishi T, Tominaga T, Ishii Y, Kyuwa S, Hayasaka I, Kuroda Y, and Yoshikawa Y. Comparative study on toxicokinetics of bisphenol A in F344 rats, monkeys (*Macaca fascicularis*), and chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Experimental Animals, in press*, 2004.

中山裕之

- Uchida, K., Kihara, N., Hashimoto, K., Nakayama, H., Yamaguchi, R., and Tateyama, S. Age-related histological changes in the canine substantia nigra. *J. Vet. Med. Sci.* 65: 179-85 (2003)
- Sehata, S., Kiyosawa, N., Sakuma, K., Ito, K., Yamoto, T., Teranishi, M., Uetsuka, K., Nakayama, H. and Doi, K. Gene expression profiles in pregnant rats treated with T-2 toxin. *Exp. Toxic. Pathol.* 55: 357-366 (2004)
- Nakayama, H., Uchida, K. and Doi, K. A comparative study of age-related brain pathology -A neurodegenerative diseases present in nonhuman animals?- *Med. Hypotheses* (in press)