

## 論文の内容の要旨

氏名：小 林 慶 一

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：ビスフェノールAが発達期ラットの脳内カテコールアミン代謝酵素遺伝子発現に及ぼす影響

ビスフェノールA（BPA）は樹脂系歯科材料に含まれる成分であるが、エストロゲン様ホルモン作用を示す内分泌攪乱物質の一つとしても知られている。小児に用いられているコンポジットレジンやレジン系シーラント等の充填（填塞）材にもBPAが含まれており、微量ながら口腔内へのBPAの溶出の可能性が示唆されている。これまでの報告から、胎生期あるいは新生仔ラットにBPAを投与した場合、性周期、黄体形成ホルモンレベル等に影響が現れることが明らかになった。また、新生仔ラットへのBPA投与によって、成熟後の行動パターンが変化することが報告されており、その変化は主として不安レベルのパラメーターである探索行動の減少として現れている。これらの結果は、BPAが生殖腺などの末梢組織のみならず、中枢神経系にも影響を及ぼしていることを示している。

現在のところ、出生直後の哺乳動物の脳におけるBPAのエストロゲン様作用について、遺伝子発現への影響を包括的に調べた報告はない。そこで本研究では新生ラットにBPAを投与し、それによって引き起こされるmRNA発現の変化を視床下部と脳幹（橋および延髄）についてGeneChip Probe Arrayを用いて解析した。また、成熟ラットについて2種のエストロゲン受容体（ER $\alpha$ ならびにER $\beta$ ）が多く発現していることが明らかになっている視索前野を対象に、新生雄ラットについて、これらの受容体に対する抗体への免疫陽性細胞の局在を調べるとともに、BPA投与によりmRNAの明瞭な変動が認められたカテコールアミン代謝酵素とエストロゲン受容体との共存の有無を検討した。

実験には生後1日齢のSprague-Dawley系雄性ラットを用いた。ラットはコントロール群とBPA 100  $\mu$ g皮下投与群に分け、コントロール群には50  $\mu$ lのコーンオイルを皮下投与した。またBPA投与群は、BPAをコーンオイルに溶解させたのち50  $\mu$ lを皮下投与した。BPA投与2時間あるいは6時間後、低体温麻酔下で脳を摘出し、氷冷したシャーレ上で視床下部と脳幹を滅菌メスにて切り出し、-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。

マイクロアレイ解析用に、脳組織をTRIzol試薬中でホモジナイザーにて処理し、全RNAを抽出した。全RNAからdouble-stranded cDNAを合成したのち、*in vitro* transcription reactionによりbiotin-labeled antisense cRNAを作製し、続いて35 base から200 base 程度のサイズにbiotin-labeled antisense cRNAの断片化を行った。Eukaryotic Hybridization Controlsと断片化したcRNAを混合したのち、約1200種の遺伝子に対応するGeneChip<sup>®</sup> Rat Neurobiology U34 Arrayを用いてハイブリダイゼーションを行った。

さらに2種のエストロゲン受容体（ER $\alpha$ ならびにER $\beta$ ）に対する抗体を用いて、それぞれが発現している細胞の同定を、生後1日齢の雄ラットについて免疫組織化学的方法により行いそれらの局在を調べた。またBPA投与によりmRNAの変動が認められたcatechol-O-methyltransferase (COMT)との共存の有無を、蛍光二重染色法により検討した。

BPA投与によってmRNA発現量が1/5以下に減少した遺伝子は、投与6時間後の脳幹で7、視床下部で6であった。カテコールアミンの代謝に関連する遺伝子のうち、生後1日齢の雄ラットへのBPA投与によってmRNA発現量が1/5以下に減少した遺伝子はCOMTのみであった。COMTと同じくカテコールアミンの代謝酵素であるmonoamine oxidase (MAO)については、MAO-A、MAO-BともにBPA投与の影響は認められなかった。COMT mRNAは視床下部と脳幹の両部位においてコントロールの脳組織で発現を認め、BPA投与2時間後には軽度の増加を示したが6時間後に両部位で検出限界以下となった。一方、BPA投与によって6時間後にmRNA発現量が5倍以上に増加した遺伝子は、脳幹で1、視床下部で3であったが、これらは両部位間で異なっていた。

生後1日齢の雄ラットについて、視索前野でのER $\alpha$ ならびにER $\beta$ 陽性細胞の局在を検討したところ、いずれの免疫陽性細胞についても、視索前野を中心として前部視床下部に発現していたが、ER $\alpha$ 陽性細胞が明らかに多かった。ER $\alpha$ 、ER $\beta$ とも細胞核が明瞭に染色されていた。COMTについては前部視床下部全体に弱い免疫陽性反応がみられ、主に細胞の核周囲部に反応が認められたが、個々の免疫陽性細胞の輪郭は明瞭ではなかった。一方、第3脳室を囲む上皮細胞には強い免疫陽性反応がみられ、脳室側が濃く染

色されていた。また視床下部に存在するミクログリア細胞にも免疫陽性反応がみられた。エストロゲン受容体と COMT が共存する細胞について、蛍光二重染色による観察では細胞の特徴は明確ではなかった。

新生仔ラットへの BPA 投与後の脳内遺伝子発現に関する以上の知見から、下記の結論を得た。

1. P1 の雄仔ラットへの BPA の投与は、6 時間後において脳幹ならびに視床下部での遺伝子発現に影響を及ぼし、特に COMT mRNA の発現を著しく抑制した。

2. MAO-A, MAO-B およびチロシン水酸化酵素の脳内 mRNA 発現に関しては、BPA は  $17\beta$ -estradiol とは異なる作用を示した。

3. BPA による COMT mRNA の発現抑制には、主として  $ER\alpha$  との結合を介した遺伝子発現調節メカニズムが関与していることが明らかになった。

以上の知見から、BPA による COMT mRNA の発現抑制によって脳内カテコールアミン代謝系が影響を受け、持続的に COMT 活性が低下した場合には、ドパミンあるいはノルエピネフリンを介する神経伝達に影響を与える可能性が示された。