

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

日本大学歯学部小児歯科学講座

研究講座員 小林 慶一

(指導：白川 哲夫 教授)

緒 言

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¹⁻³⁾。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⁴⁾。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、のちに性周期、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⁵⁾。また、新生仔ラットへの BPA 投与によって、雄雌ともに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⁶⁾。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。脳では出生時においてすでにエストロゲン受容体が発現していると報告されており⁷⁾、実験動物に BPA を投与した場合、BPA は血液脳関門を通過して脳内に存在するエストロゲン受容体と結合することによりエストロゲン様作用を発揮することが考えられる。

現在のところ、出生直後の哺乳動物の脳におけるこのような 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。発達期の脳神経系への BPA の影響に関しては、ノルアドレナリン神経細胞が多数存在する青斑核の性分化パターンに変化を及ぼし、出生直後に BPA を投与された雄ラットの青斑核は、投与されていない雄の青斑核よりも小さく雌と差がなかった⁸⁾ との報告があるが、BPA の作用メカニズムとの関連は不明である。本研究では、新生雄ラットに BPA を投与し、それによって引き起こされる脳内 mRNA 発現の変化を GeneChip Probe Array

によって解析した。次に免疫組織化学的方法により，成熟ラットにおいて2種のエストロゲン受容体（ER α ならびに ER β ）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⁹⁾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に陽性反応を示す細胞の局在を調べた。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。

材料および方法

1. 実験動物および投与薬物

実験動物には生後 1 日目 (P1) の雄 Sprague-Dawley ラットを用いた。BPA (Sigma-Aldrich, 東京) をコーンオイルに溶解し、ラットの背側皮下に 50 μ l (BPA 100 μ g を含む) を投与して 2 時間および 6 時間後に低体温麻酔下で断頭し脳を摘出した。またコントロールとして同量のコーンオイルを皮下投与し、6 時間後に脳を摘出した。さらに脳内遺伝子発現に対する BPA の効果が、エストロゲン受容体を介するものかどうかを明らかにする目的で、エストロゲン受容体に対する拮抗薬である tamoxifen (Sigma-Aldrich), $ER\alpha$ に比較的高い親和性を示す拮抗薬である ICI182780 (Sigma-Aldrich) を BPA と同時に P1 雄ラットに皮下投与し、6 時間後に脳を摘出した。またエストロゲン (17 β -estradiol, Sigma-Aldrich) ならびに $ER\alpha$ の特異的アゴニストである 1,3,5-Tris(4-hydroxyphenyl)-4-propyl-1H-pyrazole (PPT) についても同様にそれぞれを皮下投与し、6 時間後に脳を摘出した。

本研究は日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (平成 18 年度 : K06-33, 平成 19 年度 : K07-10) を得て実施した。

2. GeneChip による遺伝子発現解析

摘出した脳から視床下部ならびに脳幹を切り出し、4 匹のラットから得た全 RNA を一群として以下の 8 群を準備した。

- 1) 脳幹コントロール群
- 2) 視床下部コントロール群

- 3) BPA 100 μg 投与群 (2 時間後に脳幹と視床下部を摘出)
- 4) BPA 100 μg 投与群 (6 時間後に脳幹と視床下部を摘出)
- 5) BPA 100 μg +tamoxifen 100 μg 投与群 (視床下部)
- 6) BPA 100 μg +ICI182780 100 μg 投与群 (視床下部)
- 7) 17 β -estradiol 10 μg 投与群 (視床下部)
- 8) PPT 100 μg 投与群 (視床下部)

得られた組織から total RNA を抽出したのち、GeneChip のプロトコールに従って double-stranded cDNA を合成した。そののち *in vitro* transcription によるビオチン化 cRNA の合成を行い、GeneChip 上のオリゴヌクレオチドプローブと反応させたのち GeneChip 専用スキャナを用いて約 1200 種の mRNA の発現を調べた。解析用マイクロアレイには GeneChip Rat Neurobiology U34 Array を使い、Affymetrix 社から提供されている GeneChip Expression Analysis Algorithm を用いて遺伝子発現パターンの解析を行った。

3. ER α , ER β , COMT に対する免疫染色法ならびに蛍光二重染色法

P1 雄ラットを 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定したのち脳を摘出し、30%シヨ糖溶液に浸漬したのちクリオスタットを用いて 50 μm の連続切片を作製した。10%ヤギ血清を含む PBS 溶液にてブロッキングを行い、anti-COMT ($\times 2000$, mouse monoclonal, BD Biosciences, 東京), anti-ER α ($\times 10000$, rabbit polyclonal, Upstate biotechnology, USA), anti-ER β ($\times 1000$, rabbit polyclonal, Zymed Laboratories, Inc., 東京) のいずれか一種, ならびに anti-COMT+anti-ER α , あるいは anti-COMT+anti-ER β

の組み合わせで切片をそれぞれの一次抗体を含む反応液と混和し、4℃で24時間反応させた。つづいて切片をPBSにて洗浄し、Alexa488 ヤギ anti-mouse 二次抗体または Alexa594 ヤギ anti-rabbit 二次抗体、あるいは両二次抗体を混合した反応液と混和し、室温で1時間反応させた。PBSにて洗浄後、蛍光シグナルを共焦点レーザー顕微鏡にて画像化し、ER α 、ER β 、COMT の視索前野における局在を調べた。画像の二次処理には浜松ホトニクス社製イメージプロセッサならびに AQUACOSMOS 画像解析ソフトウェアを用いた。

結 果

BPA 投与によって mRNA 発現量が 1/5 以下に減少した遺伝子 (probe set) は、投与 6 時間後の脳幹で 7, 視床下部で 6 であった (第 1 表)。設計箇所が異なる 2 種の COMT mRNA プローブについて (probe set: M60753, M93257), いずれも投与 6 時間で脳幹, 視床下部とも著明な発現低下を示した。また BPA 投与によって投与 6 時間後に mRNA 発現量が 5 倍以上に増加した遺伝子 (probe set) は、脳幹で 1, 視床下部で 3 であった (第 2 表)。BPA 投与 6 時間後に mRNA 発現量が 5 倍以上に増加した遺伝子については両部位間で共通のものは無かった。また、BPA 投与によって発現量が著しく減少あるいは増加した遺伝子のうち、カテコールアミン代謝・合成に関与しているのは COMT だけであった。

カテコールアミンの代謝・合成に関与している酵素の遺伝子発現への BPA 投与の影響について、第 3 表および第 4 表で比較した。mRNA 発現量が 1/5 以下に減少した遺伝子のうち、COMT mRNA は両部位においてコントロールで発現を認め、BPA 投与 2 時間後には軽度の増加を示したが、6 時間後に GeneChip Expression Analysis Algorithm による判定で両部位において陰性となった (第 3 表および第 4 表)。前述の通り、COMT については設計箇所が異なる 2 種の GeneChip プローブについて、いずれも投与 6 時間で脳幹, 視床下部とも著明な発現低下を示した。一方、同じ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 とともに発現量に関して BPA 投与による明らかな影響は認められなかった。またカテコールアミンの合成に関与しているチロシン水酸化酵素についても、BPA 投与による明らかな影響は認められなかった。同じくカテコールアミンの一種であるノルアドレナリン

の合成に関与しているドパミンβ水酸化酵素については、すべての試料で発現が陰性であった。

続いて BPA とエストロゲン受容体の拮抗薬である tamoxifen あるいは ICI182780 の同時投与が、視床下部でのカテコールアミン代謝・合成関連遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した（第5表および第6表）。BPA 投与によって6時間後に発現が陰性と判定されていた2種の probe set のうち、*Rattus norvegicus* catechol-O-methyltransferase mRNA, 3' flank について、tamoxifen あるいは ICI182780 との同時投与6時間後に発現が陽性となった。このことは、いずれのエストロゲン拮抗薬についても、BPA による COMT mRNA 発現の抑制作用を減弱させたと解釈される。しかしながら、もう一つの probe である *R.norvegicus* catechol-O-methyltransferase mRNA, complete cds については、発現量は増加したものの、Expression Analysis Algorithm による判定は陰性であった。

次にエストロゲン受容体のアゴニストである 17β-estradiol あるいは PPT を投与した際の、視床下部でのカテコールアミン代謝・合成関連遺伝子の発現について検討した（第7表）。17β-estradiol ならびに PPT とも、COMT mRNA 発現について BPA と同様に著明な抑制作用を示した。また、MAO-A, MAO-B, チロシン水酸化酵素については mRNA 発現の軽度抑制が認められたが、Expression Analysis Algorithm による判定は BPA と同様に陽性であった。

P1 雄ラットの視索前野における COMT ならびに ERα と ERβ の発現を免疫染色法によって検討した結果を第1図および第2図に示す。COMT 蛋白については、視索前野内において比較的少数のミクログリアに強い免疫陽性シグナルを認めた。また脳室

上衣細胞と視神経交叉を囲む領域にも強い免疫陽性シグナルが認められた。前部視床下部において神経細胞が密に存在する視索前野をみた場合、弱い COMT 免疫陽性シグナルが、この領域全体にわたって細胞の核周囲部に認められたが、個々の免疫陽性細胞の輪郭は明瞭ではなかった。ER α については、視索前野に多数の免疫陽性細胞を認め、免疫陽性シグナルは細胞核に認められた。また ER β については、視索前野の内側（脳室側）に少数の免疫陽性細胞を認めたが、発現数は ER α に比べ明らかに少なかった。蛍光二重染色法により COMT と ER α あるいは ER β との共存を調べたところ、ER α 、ER β とともにミクログリアあるいは脳室上衣細胞については COMT との共存は認められなかった。視索前野での神経細胞の高密度領域にみられた弱い COMT 免疫陽性シグナルについては、ER α 、ER β との細胞内共存の可能性が考えられるが、微細な細胞内局在については本実験では明確にできなかった。

□

考 察

本研究により，新生ラットへの BPA 投与が脳内の COMT 遺伝子発現に影響を与えることが明らかになった。その作用は皮下投与後 2 時間では明瞭ではなく，投与後 6 時間で著明であった。BPA が生体に及ぼす影響について，体重や生殖腺に変化をもたらすことが報告されているほか⁵⁾，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いる^{1,6)}。そのうち，生殖腺への作用については，生殖腺に多数存在するエストロゲン受容体を介して細胞機能に影響を及ぼしていることが考えられるが，研究の対象が脳であってもまた生殖腺であっても，BPA が ER α ，ER β のいずれの受容体に作用しているのか，あるいはこれらエストロゲン受容体との結合とは別のメカニズムが関与しているのかを明らかにすることは重要である。

第 1 図および第 2 図に示したとおり，P1 においてラットの視索前野では ER α ，ER β の両受容体の発現が認められた。またその分布は成熟ラットで報告されているこれらの受容体の分布⁹⁾と基本的に違いはなかった。Cao らによれば¹⁰⁾，生後 0 日から 2 日までラットの皮下に BPA を投与したのち生後 4 日から 10 日の間で *in situ hybridization* 法によって前部視床下部でのエストロゲン受容体の遺伝子発現を調べたところ，ER α の発現は増強され，ER β の発現は変化しなかったとのことである。この結果は 17 β -estradiol を皮下投与した場合とは異なっており，彼らは BPA の作用が単純に 17 β -estradiol の効果を再現したものではない，と述べている。

本研究では GeneChip を用い，BPA による脳内遺伝子発現への影響を，主としてカテコールアミン代謝関連遺伝子について調べた。17 β -estradiol の COMT 発現に対する

影響については、ヒト乳癌由来細胞である MCF-7 を用いた Jiang らの研究で、 17β -estradiol が COMT 発現を抑制することが報告されている¹¹⁾。彼らは、今回の実験で用いたエストロゲン受容体の拮抗薬である ICI182780 を MCF-7 細胞に投与し、 17β -estradiol による COMT 発現の抑制効果が、ICI182780 の同時投与によってブロックされたことを報告した。COMT 遺伝子のプロモーター領域には、複数の estrogen response elements が存在することから¹²⁾、本研究においても、ICI182780 は BPA と競合することで estrogen response elements におけるエストロゲン受容体ダイマーの結合を阻止し、結果として BPA 投与による COMT 遺伝子発現抑制を減弱させたと考えられる。

本実験で tamoxifen および ICI182780 がともに BPA による脳での COMT 発現の抑制作用を減弱させたことは、BPA が脳、特に視床下部において、エストロゲン受容体と結合したのち COMT 遺伝子のプロモーター領域に作用して抑制効果を発揮していることを示唆する。ICI182780 は $ER\alpha$ に対して強い拮抗作用を有すること¹¹⁾、ならびに本実験で P1 雄ラットの視索前野では $ER\beta$ を発現する細胞が比較的少ないことが明らかになったことから、BPA は主として $ER\alpha$ と結合することで COMT 遺伝子発現を抑制しているものと推測される。この仮説は、 $ER\alpha$ に対する選択的アゴニストである PPT を BPA と同様の方法で P1 雄ラットに投与した本実験の結果（第 7 表）によってさらに裏付けられる。 17β -estradiol は $ER\alpha$ に対する最も強力なリガンドであるが、本研究において PPT はカテコールアミン代謝酵素遺伝子発現について 17β -estradiol とほぼ同様の効果を示した。BPA による COMT 遺伝子発現の抑制作用が、 17β -estradiol や PPT と同程度かそれらを上回っていたことと合わせて考察すると、BPA による

COMT 遺伝子発現の抑制には ER α が中心的な働きをしている可能性が高い²⁾。

一方で、Cao らが述べているように¹⁰⁾、BPA の内分泌攪乱物質としての作用を全て ER α および ER β との結合で説明することは必ずしも妥当ではない。第7表に示すように、BPA を投与した場合の MAO-A、MAO-B ならびにチロシン水酸化酵素 mRNA 発現は、17 β -estradiol や PPT を投与した場合とは異なっていた。GeneChip の実験のみではそれらの違いを定量的あるいは定性的に評価することが難しいが、少なくとも今回の結果は、BPA がエストロゲン受容体との結合を介する経路に加え、未知のメカニズムを通じて複数の遺伝子の発現に影響を与える可能性を示している。

免疫染色の結果から、COMT 蛋白は脳室上衣細胞とミクログリアに強く発現していることが確認された。この結果は、第三脳室周囲の上衣細胞ならびに視交叉上核あるいは視索上核の周囲に存在するミクログリアが COMT 陽性であったとする以前の報告と一致する¹³⁾。また海馬においてもミクログリアが COMT を発現することが報告されている¹⁴⁾。一方、ER α および ER β と COMT との共存については、少なくとも脳室上衣細胞とミクログリアに関して共存は確認できなかった。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したとする報告⁶⁾、ならびに出生直後に BPA を投与された雄ラットの青斑核が、投与されていない雄の青斑核よりも小さかったとする報告⁸⁾から、BPA は神経細胞に発現しているエストロゲン受容体あるいは神経細胞の機能調節に関わっている何らかのリガンドを介して作用を及ぼしている可能性が高い。

大脳皮質をはじめとするいくつかの脳領域について COMT の発現を調べた研究から、COMT mRNA が主として神経細胞に強く発現していることが明らかにされてい

る^{13,15)}。COMT 遺伝子欠損マウスでは前頭皮質でのドパミンレベルが雄において上昇していたほか、雌では不安に関連する探索行動に異常がみられた¹⁶⁾。興味深いことに、COMT 遺伝子の一塩基多型変化に基づく、158 番のアミノ酸のバリンとメチオニンの違いにより、同じ注意欠陥多動性障害 (ADHD) の小児であっても、前頭前野の認知能力に差がみられたことが報告されている¹⁷⁾。また、発達期の動物に BPA を投与すると ADHD に類似した行動を示すことが知られており、5 日齢で BPA を投与されたラットでは、4 週齢において行動量の増加や新規環境への適応能力の低下が認められた¹⁸⁾。これらのことから、BPA がヒトを含めた哺乳類の脳における COMT 発現に長期的な影響を及ぼすこと、また BPA によって引き起こされた COMT 発現の変化が動物の行動に影響を及ぼす可能性が強く示唆されることから、今後、脳への BPA の影響について、長期的な作用機序も含めた説明が必要と考えられる。

結 論

本研究で、発達期ラットに内分泌攪乱物質の一つである BPA を皮下投与したのち、脳でのカテコールアミン代謝酵素遺伝子の発現を網羅的に調べたところ、脳幹ならびに視床下部での遺伝子発現について、以下の知見が得られた。

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 β -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 α 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に影響を受け、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。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり，懇切なるご指導ならびにご校閲を賜りました日本大学歯学部小児歯科学講座 白川哲夫 教授に深甚なる謝意を表します。また，ご指導とご助言をいただきました小児歯科学講座の先生方に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Farabollini F, Porrini S, Dessì-Fulgherit F (1999) Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *Pharmacol Biochem Behav* 64, 687-694.
- 2) Klotz DM, Hewitt SC, Korach KS, Diaugustine RP (2000) Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* 141, 3430-3439.
- 3) Khurana S, Ranmal S, Ben-Jonathan N (2000) Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression. *Endocrinology* 141, 4512-4517.
- 4) Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ (2010) Bisphenol A and related compounds in dental materials. *Pediatrics* 126, 760-768.
- 5) Rubin BS, Murray MK, Damassa DA, King JC, Soto AM (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109, 675-680.
- 6) Farabollini F, Porrini S, Della Seta D, Bianchi F, Dessì-Fulgheri F (2002) Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 3, 409-414.

- 7) Cao J, Patisaul HB (2011) Sexually dimorphic expression of hypothalamic estrogen receptors α and β and Kiss1 in neonatal male and female rats. *J Comp Neurol* 519, 2954-2977.
- 8) Kubo K, Arai O, Ogata R, Omura M, Hori T, Aou S (2001) Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neurosci Lett* 304(1-2), 73-76.
- 9) Shughrue PJ, Lane MV, Merchenthaler I (1997) Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 388, 507-525.
- 10) Cao J, Mickens JA, McCaffrey KA, Leyrer SM, Patisaul HB (2012) Neonatal Bisphenol A exposure alters sexually dimorphic gene expression in the postnatal rat hypothalamus. *Neurotoxicology* 33, 23-36.
- 11) Jiang H, Xie T, Ramsden DB, Ho SL (2003) Human catechol-*O*-methyltransferase down-regulation by estradiol. *Neuropharmacology* 45, 1011-1018.
- 12) Xie T, Ho SL, Ramsden D. (1999) Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-*O*-methyltransferase gene transcription. *Mol Pharmacol* 56, 31-38.
- 13) Shirakawa T, Abe M, Oshima S, Mitome M, Oguchi H (2004) Neuronal expression

of catechol *O*-methyltransferase mRNA in neonatal rat suprachiasmatic nucleus. *Neuroreport* 15, 1239-1243.

- 14) Redell JB, Dash PK (2007) Traumatic brain injury stimulates hippocampal catechol-*O*-methyl transferase expression in microglia. *Neurosci Lett* 413, 36-41.
- 15) Matsumoto M, Weickert CS, Akil M, Lipska BK, Hyde TM, Herman MM, Kleinman JE, Weinberger DR (2003) Catechol *O*-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116, 127-137.
- 16) Gogos JA, Morgan M, Luine V, Santha M, Ogawa S, Pfaff D, Karayiorgou M (1998) Catechol-*O*-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9991-9996.
- 17) Bellgrove MA, Domschke K, Hawi Z, Kirley A, Mullins C, Robertson IH, Gill M (2005) The methionine allele of the COMT polymorphism impairs prefrontal cognition in children and adolescents with ADHD. *Exp Brain Res* 163, 352-360.
- 18) Kiguchi M, Fujita S, Oki H, Shimizu N, Cools AR, Koshikawa N. (2008) Behavioural characterisation of rats exposed neonatally to bisphenol-A: responses to a novel environment and to methylphenidate challenge in a putative model of attention-deficit hyperactivity disorder. *J Neural Transm* 115, 1079-1085.

表および図

第1表

mRNA 発現量が 1/5 以下に減少した遺伝子 (脳幹)

<i>probe set</i>	<i>ratio</i>	<i>gene</i>
M60753	0.120879121	R.norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds
M55417	0.182982617	Rat protein kinase C-gamma (PRKC-gamma) gene, exon 1
M93257	0.021861337	Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank
J05189	0.181467181	Rat neuromedin K receptor mRNA, complete cds
M31725	0.183673469	Rat axonal glycoprotein (TAG-1), mRNA, complete cds
U21954	0.1	Rattus norvegicus tyrosine kinase receptor Ehk-3, mRNA, complete cds
D83697	0.115	Rat brain mRNA for neuronal death protein, complete cds

mRNA 発現量が 1/5 以下に減少した遺伝子 (視床下部)

<i>probe set</i>	<i>ratio</i>	<i>gene</i>
M60753	0.054176072	R. norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds
M93257	0.182666667	Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank
X63143	0.057454545	Rattus rattus mRNA for neuroglycan, partial
D38492	0.189427313	Rat mRNA for neural adhesion molecule F3, complete cds
U50412	0.122507123	Rattus norvegicus phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit p85alpha mRNA, alternatively spliced, complete cds
AJ001029	0.157142857	Rattus norvegicus mRNA for Sox10 protein

第2表

mRNA 発現量が 5 倍以上に増加した遺伝子 (脳幹)

<i>probe set</i>	<i>ratio</i>	<i>gene</i>
M36420	7.58	Rat glutamate receptor (GluR-C) mRNA, complete cds

mRNA 発現量が 5 倍以上に増加した遺伝子 (視床下部)

<i>probe set</i>	<i>ratio</i>	<i>gene</i>
S56481	46.7777778	beta 3-adrenergic receptor {spliced version} [rats, colonic tissue, mRNA, 1968 nt]
J00739	5.738738739	Rat growth hormone gene, complete cds
U77777	29.16666667	Rattus norvegicus interferon-gamma inducing factor isoform alpha precursor (IGIF) mRNA, complete cds

第3表 カテコールアミン代謝・合成酵素遺伝子発現へのBPA投与の影響（脳幹）

Gene name	mRNA発現量 (Ave. Diff.)		
	control	2h	6h
R.norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds	<u>54.6</u>	<u>83.2</u>	6.6
Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank	<u>160.1</u>	<u>178.9</u>	-3.5
Rat monoamine oxidase A gene, complete cds	<u>341.3</u>	<u>204.4</u>	<u>261</u>
Rat monoamine oxidase B (Maobf3) mRNA, complete cds	32.1	<u>39.9</u>	34.8
Rat tyrosine hydroxylase mRNA, complete cds	<u>52.4</u>	11.9	37.1
Rattus norvegicus dopamine beta-hydroxylase mRNA, complete cds	2.2	3.5	1.0

* アンダーラインの数値は、GeneChip Expression Analysis Algorithmにて発現が陽性と判断されたもの

第4表 カテコールアミン代謝・合成酵素遺伝子発現へのBPA投与の影響（視床下部）

Gene name	mRNA発現量 (Ave. Diff.)		
	control	2h	6h
R.norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds	<u>88.6</u>	<u>101.0</u>	-4.8
Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank	<u>75.0</u>	<u>142.0</u>	-13.7
Rat monoamine oxidase A gene, complete cds	<u>348.2</u>	<u>220.0</u>	<u>528.6</u>
Rat monoamine oxidase B (Maobf3) mRNA, complete cds	<u>106.4</u>	<u>91.6</u>	<u>168.9</u>
Rat tyrosine hydroxylase mRNA, complete cds	<u>262.0</u>	<u>300.0</u>	<u>239.9</u>
Rattus norvegicus dopamine beta-hydroxylase mRNA, complete cds	-1.5	-5	-11.6

* アンダーラインの数値は、GeneChip Expression Analysis Algorithmにて発現が陽性と判断されたもの

第5表 BPAと tamoxifen の同時投与が遺伝子発現に及ぼす影響
(視床下部)

Gene name	mRNA発現量 (Ave. Diff.)		
	control	BPA	BPA + tamox.
R.norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds	<u>88.6</u>	-4.8	27.0
Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank	<u>75.0</u>	-13.7	<u>29.1</u>
Rat monoamine oxidase A gene, complete cds	<u>348.2</u>	<u>528.6</u>	<u>28.8</u>
Rat monoamine oxidase B (Maobf3) mRNA, complete cds	<u>106.4</u>	<u>168.9</u>	<u>40.1</u>
Rat tyrosine hydroxylase mRNA, complete cds	<u>262.0</u>	<u>239.9</u>	<u>35.4</u>
Rattus norvegicus dopamine beta-hydroxylase mRNA, complete cds	-1.5	-11.6	-6.5

* アンダーラインの数値は, GeneChip Expression Analysis Algorithmにて発現が陽性と判断されたもの

第6表 BPAと ICI182780 の同時投与が遺伝子発現に及ぼす影響
(視床下部)

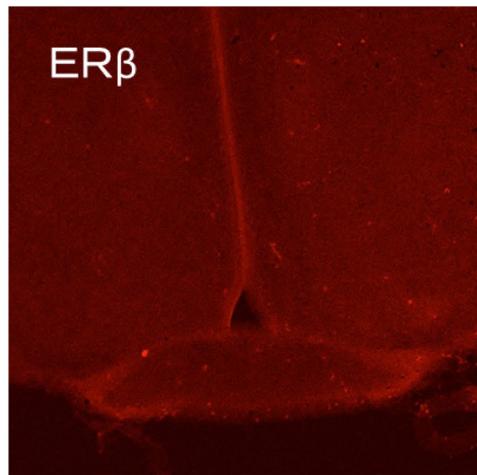
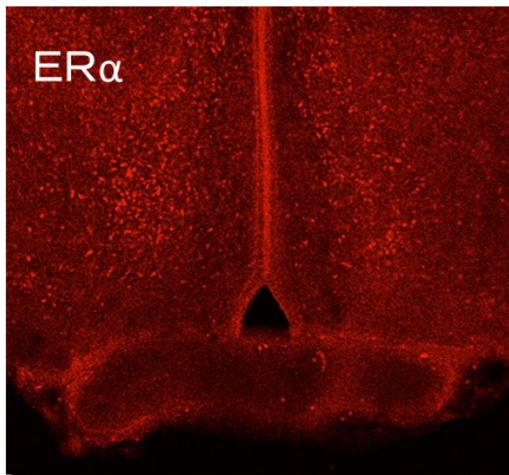
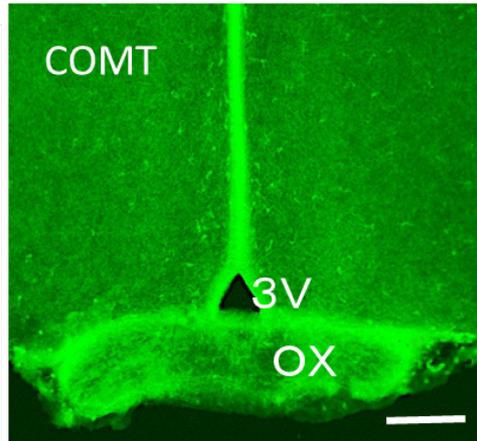
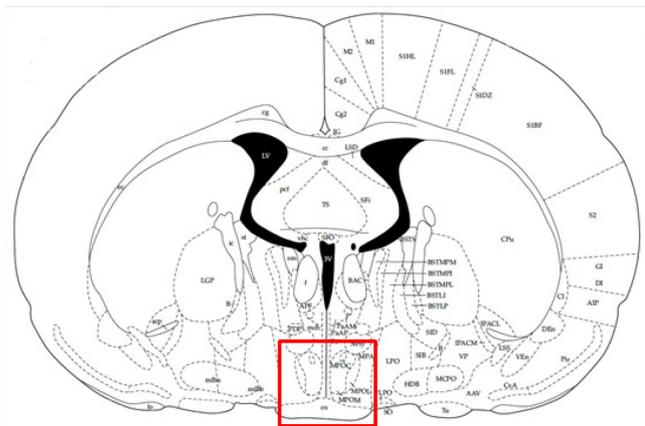
Gene name	mRNA発現量 (Ave. Diff.)		
	control	BPA	BPA + ICI
R.norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, complete cds	<u>88.6</u>	-4.8	13.5
Rattus norvegicus catechol- <i>O</i> -methyltransferase mRNA, 3' flank	<u>75.0</u>	-13.7	<u>20.7</u>
Rat monoamine oxidase A gene, complete cds	<u>348.2</u>	<u>528.6</u>	<u>90.3</u>
Rat monoamine oxidase B (Maobf3) mRNA, complete cds	<u>106.4</u>	<u>168.9</u>	<u>37.8</u>
Rat tyrosine hydroxylase mRNA, complete cds	<u>262.0</u>	<u>239.9</u>	<u>205.7</u>
Rattus norvegicus dopamine beta-hydroxylase mRNA, complete cds	-1.5	-11.6	4.2

* アンダーラインの数値は, GeneChip Expression Analysis Algorithmにて発現が陽性と判断されたもの

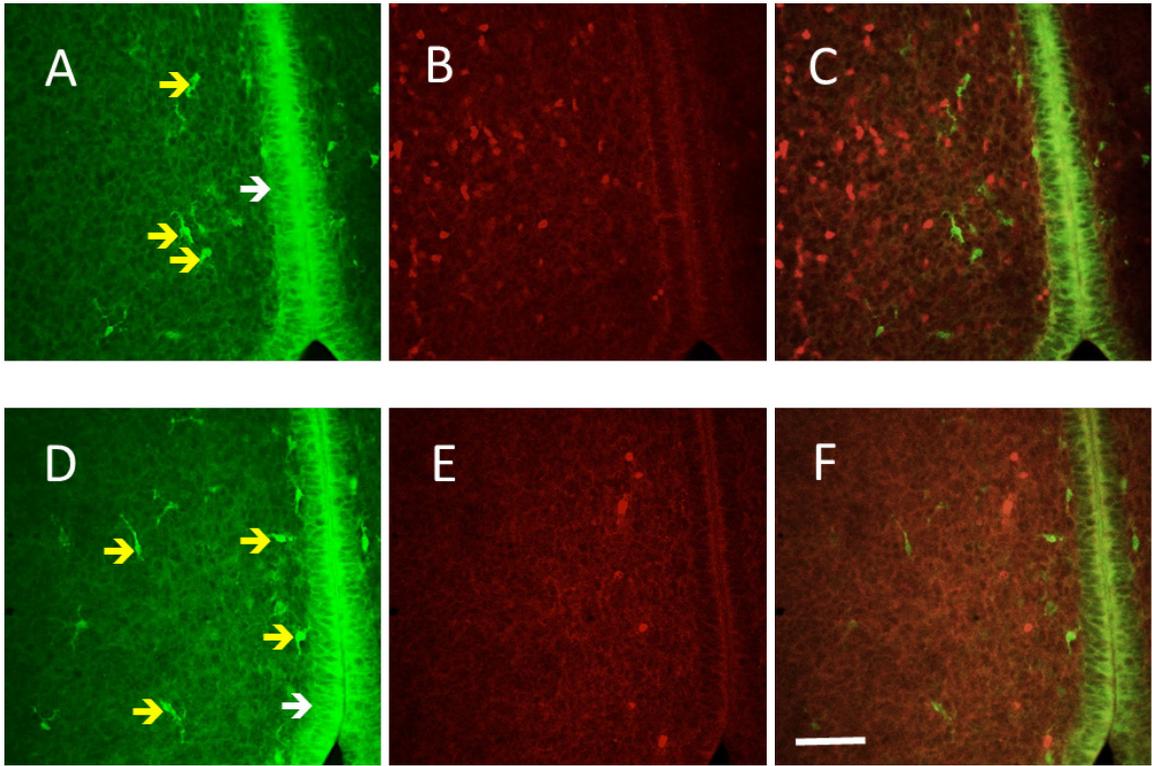
第7表 17β-estradiol あるいはPPTが遺伝子発現に及ぼす影響
(視床下部)

Gene name	mRNA発現量 (Ave. Diff.)			
	control	BPA	17β-E	PPT
R.norvegicus catechol-O-methyltransferase mRNA, complete cds	<u>88.6</u>	-4.8	8.1	2.2
Rattus norvegicus catechol-O-methyltransferase mRNA, 3' flank	<u>75.0</u>	-13.7	-2.4	4.5
Rat monoamine oxidase A gene, complete cds	<u>348.2</u>	<u>528.6</u>	<u>63.4</u>	<u>72.7</u>
Rat monoamine oxidase B (Maobf3) mRNA, complete cds	<u>106.4</u>	<u>168.9</u>	<u>37.2</u>	<u>29.9</u>
Rat tyrosine hydroxylase mRNA, complete cds	<u>262.0</u>	<u>239.9</u>	<u>73.3</u>	<u>44.7</u>
Rattus norvegicus dopamine beta-hydroxylase mRNA, complete cds	-1.5	-11.6	-7.4	-1.2

* アンダーラインの数値は, GeneChip Expression Analysis Algorithmにて発現が陽性と判断されたもの



第1図 P1雄ラット視索前野でのCOMT, ER α , ER β 免疫陽性細胞の局在
 左上アトラス赤枠は, 前頭断での視索前野を含む領域(免疫染色
 画像に相当)を示す。
 3V: 第三脳室, OX: 視神経交叉, スケールバー: 200 μ m



第2図 P1雄ラット視索前野でのCOMT, ER α , ER β 免疫陽性細胞の局在 (強拡大像)

A, D: 脳室上衣細胞(白矢印)及びミクログリア(黄矢印, 文献13)に明瞭なCOMT陽性シグナルが認められるほか, 領域全体が弱く染色されている。

B: 核がER α 陽性 E: 核がER β 陽性 C, F: 重ね合わせ画像

スケールバー: 50 μ m