

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 20日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510069

研究課題名（和文） エストロゲン活性を有する内分泌攪乱化学物質類の学習記憶能に及ぼす影響評価

研究課題名（英文）

研究代表者 山下 樹三裕 (YAMASHITA KIMIHIRO)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：50192399

研究成果の概要（和文）：一連の周産期曝露実験より、ノンルフェノールはゲニステインと同様にラットの空間学習記憶を特異的に向上させるが、ビスフェノール A は逆にこれを阻害する結果が得られた。この効果は、それぞれの物質のエストロゲン活性の強さに関連し、比較的強いエストロゲン活性を有するものは学習記憶を向上させ、逆に弱い活性しか持たないものは学習記憶を阻害することを示唆し、エストロゲン活性からその物質の学習記憶に及ぼす影響が推測できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of perinatal exposure to bisphenol A (BPA), nonylphenol (NP) and genistein (GNS) on learning and memory function, general activities and emotionality in male SD offspring rats, using a battery of behavioral tests. Perinatal exposure to NP and GNS specifically improved, but low-dose BPA specifically impaired spatial learning and memory in male offspring rats. These results suggest that the effects to estrogenic endocrine disruptors on learning and memory function correlate to their estrogenic activities.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：内分泌かく乱物質

## 1. 研究開始当初の背景

ビスフェノール A (BPA) やノンルフェノール (NP) などの内分泌攪乱化学物質は、エストロゲン受容体に対する結合能を有し、弱いながらもエストロゲン活性を持つことが知られている。魚類ではこれらの物質の曝露により、精巣卵を引き起こすことが知られており、生殖能への影響が懸念されている。一方

で、我々は従来より内分泌攪乱化学物質の中枢神経系に及ぼす影響を検討して来た。内分泌攪乱化学物質の中枢神経作用については、低レベルのダイオキシン類でも、胎児の甲状腺機能を変化させ、神経発達の阻害より多動症、学習障害、知的障害の可能性を指摘した例や、実際、周産期曝露による新生児への神経学的影響を報告した例、さらにはアカゲザ

ルにダイオキシンを周産期曝露した仔ザルの学習能の低下した例などが報告されている。我々も、ラットを用いて成熟後にダイオキシンを摂取しても運動量の増加が認められることを報告した。ダイオキシンの中枢神経機能への影響を調べたものでは、セロトニン代謝回転の増加や一部ヒスタミンおよびドパミン濃度の変化を報告した例がある。従って、内分泌攪乱作用が指摘されている他の化学物質についても、その内分泌系への影響のみならず中枢神経系への影響が十分に想定される。そこで我々はこれまでに、NPやフタル酸エステル類の中枢神経作用を行動薬理学的に検討し、これらを周産期に曝露した仔マウス及び仔ラットにおいて、周囲環境に対する「慣れ」の現象の抑制効果や、学習記憶への影響を観察し、報告した。この時に認められた学習記憶への影響はNP暴露だけでは認められず、ストレス負荷時の受動回避学習試験において雄性のみに観察されたものであり、空間認知能等詳細な学習記憶試験は行っていない。近年、BPAやNPなど内分泌攪乱化学物質の中枢神経系への影響を報告する例が始まって来ている。中には、生後5日のラット脳内に直接内分泌攪乱化学物質を投与することにより、多動を認めたとする報告もある。また、これらの行動変容とモノアミン神経系との関連性を指摘する報告もある。しかし、学習記憶に対する影響を報告した例は我々を含め、ごく少数にすぎない。これは学習記憶能を調べる装置に問題があるのではと考え、我々は空間認知学習能を効果的に測定する可変式迷路装置を考案し、先行研究として若年成獣雄性ラットにBPAを投与したところ、エストロゲンと同様の学習記憶改善効果が認められた。近年中枢神経系に存在するエストロゲン受容体が学習記憶に関与することが示唆されている。BPAやNPなどは前述の通りエストロゲン受容体に対する結合能を有する物質である。従って、エストロゲン活性を有する内分泌攪乱化学物質は学習記憶に対して影響を及ぼす可能性が示唆され、詳細な検討を行う必要がある。

また、植物由来のダイゼインやゲニステインは大豆食品等に、レスベラトロールは赤ワイン等に多量に含まれ、日常的に摂取する食品であるが、そのエストロゲン活性はBPAやNPなどよりはるかに高い。これらエストロゲン活性の異なる物質を同一手法により総合的に評価することにより、内分泌攪乱化学物質の学習記憶能に対する影響の位置づけが評価できるばかりでなく、脳エストロゲンシステムの機序解明に繋がる。

## 2. 研究の目的

エストロゲン活性を有する種々の内分泌攪乱化学物質類を用いて、エストロゲン受容

体に対する活性強度の差より、学習記憶能と脳エストロゲンシステムとの関連性について評価し、さらにこれに関連する中枢神経系について総合的に評価することを目的とする。これらより、外因性エストロゲン活性物質の活性強度と学習記憶能への影響の度合いを評価できるばかりでなく、内分泌攪乱化学物質や植物性エストロゲン含有食品の中枢神経系への作用機序の解明にも繋がる。さらに、学習記憶と脳エストロゲン受容体との関連性ならびに脳エストロゲン機能についても解明が進展する。

まず、種々異なるエストロゲン活性を有する内分泌攪乱化学物質および植物性エストロゲンの学習記憶能への影響評価を行うことより、エストロゲン活性強度と学習記憶能への影響の相関関係を明らかにする。ここでは異なる手法を用いて、空間認知学習や体験学習記憶のどちらが影響を受けやすいかについても検討を行う。また、学習記憶に密接に関連する探索行動や不安情動行動への影響についても総合的に評価する。

さらに、エストロゲン活性物質の学習記憶能への影響にどの脳部位が関与するのかを脳実質内微量注入法により、被験薬物を脳各部位に直接注入試験を行うとともにエストロゲン受容体アンタゴニストとの併用試験により明らかにする。

また、各種受容体の変動と行動変容との関連からエストロゲン活性物質の学習記憶能への影響に、どの神経機能が関与するのかについて明らかにする。

本研究はエストロゲン活性の異なる諸種化学物質を母体経由で曝露した仔に表出してくる学習記憶の変容を、エストロゲン受容体ならびに各神経機能との関連から解析を行うものである。正常脳にエストロゲンを投与してエストロゲンおよびエストロゲン受容体の機能を調べるよりも、脳発達期にエストロゲン様化学物質に曝露した「エストロゲンの異常状態」脳による行動変容を対比して検討する方が、その機能はより判明しやすい。また、遺伝子疾患モデルであれば、ノックアウト動物も有用であるが、内分泌攪乱化学物質等による中枢神経疾患を捉えるには、過去の曝露体験が生体にどのような影響を及ぼすのかを同時に評価できるこの方法も効果的であると考えられる。さらには、BPAやNPのエストロゲン活性はエストロゲンと比較した場合にかなり弱いため、表出する行動変容が逆となることも想定される。従って、エストロゲン活性の異なる植物性エストロゲンのダイゼインやゲニステインなどを用いることにより行動変容とエストロゲン活性との関係も明らかとなる。脳エストロゲンシステムの学習記憶への関与について、エストロゲン活性の面から解析することが本研究の特

色・独創的な点であり、付随して内分泌攪乱化学物質等の中樞神経機能への影響評価も可能である。

また、学習記憶能を測定する装置には空間認知能、体験型記憶能や弁別学習能を測定する種々のものが考案され、記憶にも作業記憶や参照記憶を判別する操作法が広く活用されている。これらの装置および手法には、それぞれ一長一短があり、一つの装置、一つの手法で判断するのは危険性が高い。したがって、本研究では既存の数種の装置および手法を用いて解析すると共に、主として独自に新規開発した可変式迷路装置を用いた解析を行う。従来との測定方法に比較してデータの安定性、信頼性に優れる。さらには、学習記憶に付随する好奇心や不安・恐怖心などの情動性についても考慮する必要がある。これらを総合的に評価することも本研究の特色である。

本研究により、学習記憶能における脳エストロゲンシステムの解明が進展し、学習記憶に関与する脳部位、関連する神経系が判明するとともに、BPA および NP など内分泌攪乱化学物質の中樞神経系への影響評価やダイゼイン、ゲニステインなど植物エストロゲン含有食品の中樞神経作用への影響評価が可能となる。

### 3. 研究の方法

(1)ビスフェノール A(BPA)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

SD 妊娠ラットに妊娠(プラーク確認)10日目より出産14日後までの周産期間中に、ヒトでのTDIとされている $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ とその10倍量の $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ のBPAを経口投与した。これらとは別に溶媒投与群を加えた計3群について、出生した雄性仔ラットにおける空間学習記憶能・一般活動性・情動性・体験型学習記憶能について評価した。

①オープンフィールド装置を用いた一般活動性・情動性に及ぼす影響評価:

雄性仔ラット7週齢時にHallのオープンフィールド装置を用いて、ambulation, inner, rearing, defecation, urinationの各項目について、0時間値、2時間値および4時間値を調べた。

②情動性への影響評価:

高架式十字迷路装置を用いて、open armの滞在時間および回数を指標として5分間における不安・警戒行動など情動への影響を調べた。

③学習記憶能に及ぼす影響評価:

出生5週齢より学習記憶能を調べる以下の3つの試験法により行動解析を行った。2つは空間認知学習能を調べる装置で、異なる

手法による解析で、データの確度を高める。もう1つは体験学習の記憶を調べるもので、異なる学習能について評価する。

a)可変式迷路試験;本装置は餌取り迷路を改良したもので、装置内走路を自由に組み替えることができる。1つの装置で幾つもの走路を設定することができ、同一動物について走路を変え、何試行でも行える。今回は3パターンの走路について試行する。ゴールまでの試行時間とエラー回数により評価する。1トライアルの測定時間は5分間である。トレーニングを行った後、本試験として1パターンの迷路に付き、1日3トライアルを3日間連続して行った。従来品と比べ成績精度が高い。

b)水迷路試験;本装置は識別できる空間情報をもとに、水面下に隠されたゴールポイントに辿り着くまでの軌跡および時間を測定する。1トライアルの測定時間は1分間である。慣らし、プレテストを行った後、本試験として、1日3トライアルを3日間連続して行った。

c)受動回避学習試験;ステップスルー装置は明室と暗室が隣接し、明室に入れられたラットは暗い所を好む習性を持つため、暗室に入る。暗室に入るやいなや直ちに通路の扉を閉め、床面よりフットショックを10秒間加えた後、ホームケージに戻す。24時間後にもう一度明室に動物を入れ、5分以内に暗室に入るかどうかを観察し、短期体験記憶を調べる装置である。本装置を用いて、一度フットショックを経験させた24時間後の記憶を観察した。

(2)ノニルフェノール(NP)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

SD 妊娠ラットに妊娠(プラーク確認)10日目より出産14日後までの周産期間中に、vehicle, 1mg/kgNP, 10mg/kgNPを1ml/kgの割合で経口投与した。出生した雄性仔ラットにおける空間学習記憶能・一般活動性・情動性・体験型学習記憶能について評価した。

各行動試験法は(1)と同様である。

(3)ゲニステイン(GNS)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

SD 妊娠ラットに妊娠(プラーク確認)10日目より出産14日後までの周産期間中に、vehicle, 1mg/kgGNS, 10mg/kgGNSを1ml/kgの割合で経口投与した。出生した仔ラットについて、雌雄別に空間学習記憶能・一般活動性・情動性・体験型学習記憶能について評価した。

各行動試験法は(1)と同様である。

(4) ビスフェノール A(BPA)成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

8~12週齢時のSD雄性ラットに行動実験前日の実験終了後30分以内にBPA 0.05mg/kg, 1mg/kg, 10mg/kg または溶媒を1ml/kgの割合で経口投与した。

各行動試験法は(1)と同様である。

(5) ノニルフェノール(NP)成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

8~12週齢時のSD雄性ラットに行動実験前日の実験終了後30分以内にNP 0.5mg/kg, 5mg/kg または溶媒を1ml/kgの割合で経口投与した。

各行動試験法は(1)と同様である。

(6) ゲニステイン(GNS)成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

8~12週齢時のSD雄性ラットに行動実験前日の実験終了後30分以内にGNS 10mg/kg または溶媒を1ml/kgの割合で経口投与した。また陽性対照として、β-エストラジオール(E2) 0.2mg/kgを同様に腹腔内投与した。

各行動試験法は(1)と同様である。

(7) ビスフェノール A(BPA)海馬内微量注入による学習記憶能への影響

海馬内微量注入を行うため背側海馬の1mm上方にガイドカニューレ植え込み手術を施したSD雄性ラットを用いた。BPAは、行動実験前日の実験終了後30分以内に量側背側海馬内に片側20μg/2μlを微量注入し、空間学習記憶能について評価した。

(8) ゲニステイン(GNS)海馬内微量注入による学習記憶能への影響

海馬内微量注入を行うため背側海馬の1mm上方にガイドカニューレ植え込み手術を施したSD雄性ラットを用いた。GNSは、行動実験前日の実験終了後30分以内に量側背側海馬内に片側20μg/2μlを微量注入し、空間学習記憶能について評価した。また陽性対照として、β-エストラジオール(E2) 0.4μg/2μlを同様に海馬内に微量注入した。なお、GNSと抗エストロゲン薬タモキシフェンの併用投与による効果についても評価した。

#### 4. 研究成果

(1)ビスフェノール A(BPA)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路(MAZE)を用いて行った空間学習記憶能に及ぼすBPA周産期曝露の影響を調べた結果、BPA 50μg/kgの周産期曝露は空間学習記憶能を有意に低下させ、学習曲線を阻害することが示唆された。しかし、BPA 500μg/kgでは学習曲線をやや阻害したが、有意差は認められなかった。一方、water maze testでは、いずれの用量においても有意な影響は認められなかった。これは、報酬自発運動と強迫的運動との差および測定試験期間の長さの差によることが推察される。

また、体験型学習記憶能について影響は認められず、一般活動性および情動性についても、有意な変化は認められなかった。

以上より、低用量BPA周産期曝露は空間学習記憶能を特異的に阻害することが示唆され、BPAのTDIについて、再検討を考慮する必要があるものと考えられる。

(2)ノニルフェノール(NP)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路(MAZE)を用いて行った空間学習記憶能に及ぼすNP周産期曝露の影響を調べた結果、NP 1mg/kgおよびNP 10mg/kgの周産期曝露は両群ともにゴールにたどり着くまでの時間であるTimeを溶媒投与群に比べ有意に減少させ、空間学習記憶能を向上させることが示唆された。

また、体験型学習記憶能について影響は認められず、一般活動性および情動性についても、有意な変化は認められなかった。

以上より、NP周産期曝露は空間学習記憶能を特異的に向上させることが示唆された。

(3)ゲニステイン(GNS)周産期曝露の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路(MAZE)を用いて行った空間学習記憶能に及ぼすGNS周産期曝露の影響を雌雄別に調べた結果、雄性および雌性仔ラットともに、GNS 1mg/kg(Low群)およびGNS 10mg/kg(High群)の周産期曝露はいずれもゴールにたどり着くまでの時間であるTimeを溶媒投与群に比べ有意に減少させ、空間学習記憶能を有意に向上させることが示唆された。雌性仔ラットではLow群の方がこの効果は強く現れた。

また、体験型学習記憶能について影響は認められず、一般活動性および情動性についても、有意な変化は認められなかった。

以上より、GNS周産期曝露は空間学習記憶能を特異的に向上させることが示唆された。

(4)ビスフェノール A(BPA)成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路 (MAZE) を用いて成獣期ラットの空間学習記憶能に及ぼす BPA 短期経口投与の影響を調べた結果、BPA 50 $\mu$ g/kg、1mg/kg および 10mg/kg 投与群いずれもゴールにたどり着くまでの時間である Time は溶媒投与群に比べ有意差は認められなかったが、10mg/kg 投与群では MAZE (D) テストにおいてエラー回数の有意な減少が認められた。これらより、1mg/kg までの低用量 BPA 短期経口投与は空間学習記憶能に影響を及ぼさず、BPA 10mg/kg 短期経口投与は空間学習記憶能を弱いながらもやや向上させることが示唆された。また、一般活動性は一番低い用量である BPA 50 $\mu$ g/kg 投与群で有意に減少したが、その他の用量では溶媒投与群との間に有意差は認められなかった。高架式十字迷路試験では、BPA 10mg/kg 短期経口投与群において closed arm での滞在時間は有意に減少し、若干ながら不安を抑制することが示唆された。体験型学習記憶には有意な影響は認められなかった。

以上より、成獣期ラットへの BPA 短期経口投与は、高用量で空間学習記憶をやや向上させるが、体験型学習記憶に影響は及ぼさず、一般活動性・情動性は用量により影響は異なることが示唆された。

#### (5) ノニルフェノール (NP) 成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路 (MAZE) を用いて成獣期ラットの空間学習記憶能に及ぼす NP 短期経口投与の影響を調べた結果、NP 500 $\mu$ g/kg 投与群では、ゴールにたどり着くまでの時間である Time は MAZE (B) テストにおいて溶媒投与群に比べ有意に長くなり、空間学習記憶を阻害することが示唆された。しかし、NP 5mg/kg 投与群では有意差は認められなかった。

また、体験型学習記憶能について影響は認められず、一般活動性および情動性についても、有意な変化は認められなかった。

以上より、成獣期ラットへの NP 短期経口投与は、低用量 (500 $\mu$ g/kg) では空間学習記憶能を特異的に阻害することが示唆された。

#### (6) ゲニステイン (GNS) 成獣期ラット経口投与の一般活動性ならびに学習記憶に及ぼす影響

可変式迷路 (MAZE) を用いて成獣期ラットの空間学習記憶能に及ぼす GNS 短期経口投与の影響を調べた結果、GNS 10mg/kg 投与群では、ゴールにたどり着くまでの時間である Time は溶媒投与群に比べ有意に長くなり、空間学習記憶を阻害することが示唆された。これに対し、E2 投与群は有意に空間学習記憶を向上させた。

また、体験型学習記憶能について影響は認められず、一般活動性および情動性についても、有意な変化は認められなかった。

以上より、成獣期ラットへの GNS 短期経口投与は、空間学習記憶能を特異的に阻害することが示唆された。

#### (7) ビスフェノール A (BPA) 海馬内微量注入による学習記憶能への影響

可変式迷路 (MAZE) を用いて行った空間学習記憶能に及ぼす BPA 海馬内微量注入の影響を調べた結果、BPA 投与群のゴールにたどり着くまでの時間である Time は溶媒投与群および生理食塩水投与群の Time と比較して有意差は認められず、空間学習記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された。また、water maze test においても有意な影響は認められなかった。

#### (8) ゲニステイン (GNS) 海馬内微量注入による学習記憶能への影響

可変式迷路 (MAZE) を用いて行った空間学習記憶能に及ぼす GNS 海馬内微量注入の影響を調べた結果、GNS 投与群のゴールにたどり着くまでの時間である Time は E2 投与群と同様に溶媒投与群と比較して有意に減少させ、空間学習記憶を向上させることが示唆された。また、タモキシフェンの併用投与により、E2 の効果は消失したが、GNS の効果は消失しなかった。このことは GNS による学習記憶改善効果は、核内エストロゲン受容体を介さない効果であることが示唆された。

なお、この試験の例数はやや少なく、再試験を実施中である。

また、これに関与するエストロゲン受容体サブタイプの解析を進めて行く。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 6 件)

1. Kimihito Yamashita, Effects of perinatal exposure to nonphenol on the function of central nervous system in male rat offsprings. 第 86 回 日本薬理学会年会、2013 年 3 月 21 日～23 日、福岡 福岡国際会議場。
2. 山下樹三裕、トリブチルスズのラット学習記憶に及ぼす影響評価、2012 年 12 月 18 日～19 日、東京 東京大学山上会館。
3. Kimihito Yamashita, Effects of perinatal exposure to bisphenol A on the function of central nervous system in male rat offsprings. 第 85 回 日本薬理学会年会、2012 年 3 月 14 日～16 日、京都 国立京都国際会館。

4. 山下樹三裕、ビスフェノール A 周産期曝露が雄性ラットの学習記憶に及ぼす影響、2011年12月1日～2日、東京 東京大学 山上会館。
5. 山下樹三裕、含エストロゲン活性環境ホルモンの海馬内微量注入が雄性ラットの学習記憶に及ぼす影響、2011年3月22日～24日、横浜 パシフィコ横浜。
6. 山下樹三裕、ビスフェノール A の海馬内微量注入が雄性ラットの学習記憶に及ぼす影響についての研究、2010年12月16日～17日、東京 東京大学山上会館。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山下 樹三裕 (YAMASHITA KIMIHIRO)  
長崎大学・水産・環境科学総合研究科・教授  
研究者番号：50192399

### (2) 研究分担者

山下 康子 (YAMASHITA YASUKO)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：80291532  
(H23年12月まで)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：