

妊娠期ビスフェノール A およびビスフェノール F
の次世代行動影響と胎盤通過性の検証

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

大谷 尚子

獣医生化学

指導教員 教授 岩野 英知

2016 年度

目次

諸言	1
第 I 章 妊娠前期・後期の BPA 曝露による次世代の不安行動に対する影響の差	
1. 序文	5
2. 材料と方法	6
1) 試薬	6
2) 共試動物	6
3) 高架式十字迷路	8
4) 統計処理	8
3. 結果	10
4. 考察	13
5. 小括	16
第 II 章 母親の葉酸摂取量は BPA 曝露による次世代の行動影響を左右する	
1. 序文	17
2. 材料と方法	19
1) 試薬	19
2) 共試動物	19
3) 高架式十字迷路	21
4) 統計処理	21
3. 結果	22
4. 考察	27
5. 小括	29

第Ⅲ章 ビスフェノール A の代替品であるビスフェノール F の次世代行動影響

1. 序文	30
2. 材料と方法	32
1) 試薬	32
2) 共試動物	32
3) オープンフィールド試験	33
4) 高架式十字迷路試験	34
5) 強制水泳試験	34
6) 統計処理	36
3. 結果	36
1) オープンフィールド試験の結果	37
2) 高架式十字迷路試験の結果	38
3) 強制水泳試験の結果	40
4. 考察	42
5. 小括	44

第Ⅳ章 妊娠後期ラットにおける BPF 代謝物の胎仔移行

1. 序文	45
2. 材料と方法	47
1) 試薬	47
2) 共試動物	47
3) 肝灌流	48
3) -a 灌流液の調整	48
3) -b 肝灌流外科手術	48
4) 子宮灌流	49
4) -a 灌流液の調整	49
4) -b 子宮灌流外科手術	49
4) -c 静脈側灌流液の処理	50
4) -d 採材した組織の処理	50
5) LC-MS/MS による分析	52

3. 結果	53
1) 子宮灌流実験における各種抱合体の回収率	53
2) 子宮灌流 90 分後における各種抱合体の胎仔組織内の検出	55
3) 子宮灌流 20 分後における各種抱合体及び BPF の胎仔組織内の検出	57
4. 考察	60
5. 小括	65
総括	66
謝辞	70
引用文献	71

略語表

本文中において、以下の略語を用いた。

16 α -OH-DHEA: 16 α -OH-dehydroepiandrosterone
16 α -OH-DHEA-S: 16 α -OH-dehydroepiandrosterone sulfate
3 β -HSD: 3 β -Hydroxysteroid dehydrogenase
BPA: 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane
BPAF: 4,4-(hexafluoroisopropylidene)diphenol
BPA-GA: BPA-glucuronide
BPB: 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)butane
BPF: bis(4-hydroxyphenyl)methane
BPF-GA/S: BPF-glucuronide/sulfate
BPF-GA: BPF-glucuronide
BPF-S: BPF-sulfate
BPS: bis(4-hydroxyphenyl)sulfone,
CA: closed arm
CE: center area
E2: 17-estradiol
ERR γ : estrogen related receptor γ
ERs: estrogen receptors
GD: gestation day
MRP2: multiple resistance protein 2
MTHFR: methylenetetrahydrofolate reductase
OA: open arm
OATP4A1: organic anion transporting peptide 4A1
PD: postnatal day
PW: postnatal week
S.E.: standard errors
SD: Sprague-Dawley
SOAT: sodium-dependent organic anion transporter
UGT: uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase

緒言

我々の体は恒常性を維持する機能の一つとして内分泌器系を有しており、特定の器官から血液中に分泌されたホルモンが標的部位に特定の調節作用を示す。ところが、環境中に放出された化学物質には、エストロジェンなどのホルモン活性を有するものがあり、本来生体内で営まれている正常なホルモン作用に影響を与え生体に有害な影響を及ぼすことがある。1996年に出版された『Our Stolen Future (奪われし未来)』により[16]、このような化学物質は“環境ホルモン”または“内分泌かく乱物質”として世間に広く知れ渡り、大きな社会問題のひとつとなっている。

ビスフェノール A (2,2-bis[4-hydroxyphenyl]propane, BPA) は 1930 年代に微弱ながらもエストロジェン活性を有すると報告されて以来[20]、内分泌かく乱物質のひとつとして注目されてきた。BPA は主にポリカーボネートやエポキシ樹脂などの合成樹脂の原料として世界中で多くの工業製品に使用されている。そのため BPA の曝露源は、飲料や食品の容器を含む身の回りの多くのプラスチック製品や、歯科治療用の歯の詰め物、缶詰の内側のコーティング等である。BPA は耐久性が低く、熱や pH の変化で容易に溶出するため[35, 47, 76]、我々は飲料や食品を介して BPA を日常的に経口摂取している。アメリカやカナダでは調査した 90%のヒトの尿から BPA が検出されており[8, 10]、BPA 曝露が多くの人に及んでいることがわかる。BPA は成人の血液や尿だけでなく、母乳や胎盤を含む胎児組織からも検出されているため[29, 67, 92]、胎児や乳児も頻繁に BPA に曝露されている。

肝臓は薬や環境化学物質を無毒化し体外へ排泄しやすくするための代謝酵素を数多く保有している。BPA においても、健康な成熟した個体では速やかな代謝と排泄の機構がはたらき、日常の曝露レベルでは悪影響をうける可能性が低いと考えられている。ラットを用いた実験では、経口曝露された BPA は腸管で吸収され肝臓に達すると、グルクロン酸転移酵素 (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, UGT)

により代謝をうけ、BPA グルクロン酸抱合体 (BPA-glucuronide, BPA-GA) となる [112]。BPA-GA はエストロゲン活性を失い [65]、またグルクロン酸抱合により水溶性が増し、胆汁や静脈血に排泄され糞や尿に混じって速やかに体外に出ていく [40]。また、サルやヒトへの経口曝露でも BPA-GA への速やかな代謝と体外への排泄が報告されている [51, 100]。このように、成熟した個体では、肝臓での代謝機構が BPA に充分にはたらき、生体内から速やかに排除されることが証明されている。

一方で、妊娠期や授乳期の BPA 曝露においては、曝露を受けた次世代の悪影響について懸念されている。研究報告間で BPA の影響の程度にばらつきや矛盾があるものの、げっ歯類を用いた実験では次世代の生殖器系や [80, 97]、脳や [46, 79, 90]、行動の異常など [109] が強く疑われている。ヒトへの影響は明確ではないが、2005 年に Vom Saal らが BPA はごく低用量の濃度で特に胎児や乳児においてヒトに悪影響を及ぼす危険性があると報告したことから [101]、EU やカナダ、アメリカの一部の州では予防的にポリカーボネート製の乳児用哺乳瓶の製造・輸入・販売の規制が行われ、2015 年にはフランスで BPA の食品接触用途の包装・容器への使用が禁止となった。しかし日本ではポリカーボネート製の容器からの BPA 溶出濃度規格 (2.5 µg/mL 以下) を設けるにとどまり、使用禁止措置はとられていない。毒性機序のメカニズムも未だ解明されておらず、影響を予防する策を講じることができない。このため多くの人は、特に問題視されている妊娠期でさえ BPA 曝露を避けるのが難しい状況にある。

BPA の影響を懸念し使用を制限する動きがある一方で、BPA 類似体が BPA の代替品として使用されてきている。例として、ビスフェノール B (2,2-bis[4-hydroxyphenyl]butane, BPB)、ビスフェノール F (bis[4-hydroxyphenyl]methane, BPF)、ビスフェノール S (bis[4-hydroxyphenyl]sulfone, BPS)、ビスフェノール AF (4,4-[hexafluoroisopropylidene]diphenol, BPAF) などである。これらの使用は年々増加し、ヒトの血清や尿から検出されているものもある [15, 55, 113]。しかし、これら BPA 代替品の安全性に関する研究は遅れており、ほとんど報告がないのが現状で

ある。BPA 代替品と BPA は構造が非常によく似ており、安全性について疑問視されている。

このように、BPA 曝露による次世代への影響や毒性機序のメカニズムの解明がはっきりとしないまま、また安全性を十分に検証しないまま BPA 類似体を使用することは、将来大きな問題につながる可能性がある。そこで本研究では、これまで報告されてきた BPA の影響や疑われる作用機序をもとに、妊娠期に BPA の影響を左右すると考えられる要因（第 I 章・第 II 章）を検証し、また BPA 代替品である BPF の胎仔影響（第 III 章）と妊娠期の代謝動態（第 IV 章）を検証した。

妊娠期の BPA 曝露による影響を左右する要因として我々が注目したのは曝露時期と母親が摂取する栄養である。まず、曝露時期についてだが、これまで妊娠期 BPA 曝露による次世代影響のひとつに行動異常として不安様行動の変化が報告されている [24, 26, 30, 49, 90]。これらの BPA 曝露の期間は研究報告によってそれぞれ異なっていたが、妊娠期のどの期間の曝露が行動異常に最も影響を及ぼすかを調査することは脳への影響を解明していくうえで重要となるため、第 I 章では妊娠の前期と後期に曝露期間を分け、次世代の不安様行動を評価した。

また、BPA の影響を左右するものとして、第 II 章では母親が摂取する葉酸の量に着目した。これは近年 BPA の次世代影響のメカニズムとしてエピジェネティックな影響が疑われているからである [21, 34, 95, 109]。エピジェネティクスとは DNA 塩基配列に変異を伴うことなく遺伝子機能を調節する機構である。たとえば DNA の CpG のメチル化やヒストンのメチル化、アセチル化修飾などであり、時と場合に応じて遺伝子の発現を調節している [107]。2007 年に Dolinoy らが、妊娠期に BPA 投与すると次世代のメチル化が低下し、葉酸やメチル基給与体を与えた BPA 投与群では次世代のメチル化レベルが回復したと報告して以来 [21]、BPA とエピジェネティクスの関連が注目されるようになった。我々は葉酸に着目し、マウスの実験に用いている餌の葉酸量を計算したところ、妊娠期のヒトで推奨されている葉酸摂取量の約 80 倍の葉

酸が含まれていることがわかった。このため妊娠期の BPA の影響を見る上で、餌の葉酸量が多すぎることで影響が見えにくい可能性があると考えた。第 II 章では、葉酸量をヒトの妊娠期に推奨される量に近づけた餌を用意し、妊娠期 BPA 曝露の次世代影響を不安様行動で評価した。

第 III 章・第 IV 章は BPA 代替品である BPF についての報告である。BPF のエストロゲン活性は BPA よりも少し弱く、また抗アンドロゲン作用も認められているが[45, 81, 86, 88]、他の BPA 代替品同様、次世代影響についてほとんど研究されていない。アメリカの一部の都市の調査で BPA に次いで食品内検出量が高いことが報告されており[54]、日常生活での BPF 曝露は無視できない。BPF は BPA からメチル基が 2 つ失われた構造をもち非常に類似しているため、次世代影響も類似する可能性が十分に考えられ、BPF などの BPA 代替品の安全性を評価することは急務の課題である。第 III 章では妊娠期 BPF 曝露による次世代影響を不安様行動・うつ様行動で評価し、第 IV 章では妊娠期の BPF の代謝動態を調査し、母体から胎仔への移行を評価した。

第 I 章 妊娠前期・後期の BPA 曝露による次世代の不安様行動に対する影響の差

1. 序文

内分泌攪乱物質として有名なビスフェノール A (Bisphenol A, BPA) は弱いエストロゲン活性をもち[20]、成熟した個体では BPA は肝臓で速やかに代謝され体外へ排泄されることがわかっている。成体では、BPA は吸収された後、肝臓でグルクロン酸転移酵素 (uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferase, UGT) によりグルクロン酸抱合体 (BPA-glucuronide, BPA-GA) となる[112]。BPA-GA となることで親水性が増し、一部は静脈血中に排泄され腎臓で尿に混じって体外に出ていくが、multiple resistance protein 2 (MRP2/Mrp2) という肝細胞から胆管側に向かって輸送するトランスポーターにより胆汁中に排泄され大部分は糞とともに体外へ出ていく (図 1) [40, 51]。BPA のグルクロン酸抱合に関わる UGT 分子種はラットでは UGT2B1 [112]が報告されており、ヒトではそのオルソログの UGT2B7 が関わりと考えられるが[59]、UGT1 の関わりも示唆されている[25]。しかし胎仔では UGT の発現が非常に弱いため[44, 63, 72]、成体と比べると非常に BPA の影響を受けやすいと考えられる。

これまで妊娠期曝露による次世代の影響として生殖器系[80, 97]、脳[46, 79, 90]、行動異常[109]などが報告されてきたが、行動影響は論文間で差はあるものの、数ある行動試験のうち不安様行動の変化が多く報告されている。不安様行動を調査した報告の BPA 曝露期間を比較すると、交配前から離乳まで[41]、妊娠から離乳まで[49, 91]、妊娠の途中から離乳まで[24, 30]、妊娠期のみ[17, 110]、生後数日のみ[26, 78]、と論文間で異なっていた。行動異常は脳の影響に起因していると考えられるが、脳の発達は妊娠期のステージで異なるため[62, 105, 106]、BPA の影響を受ける時期を特定することは今後の妊娠期 BPA 曝露による影響のメカニズムを解明していく上で重要な情報となる。この章では BPA 曝露する妊娠期のステージと次世代影響の関係を明ら

かにする目的で、妊娠の前期または後期に BPA 曝露し、それぞれの次世代の不安様行動を評価し比較を行った。

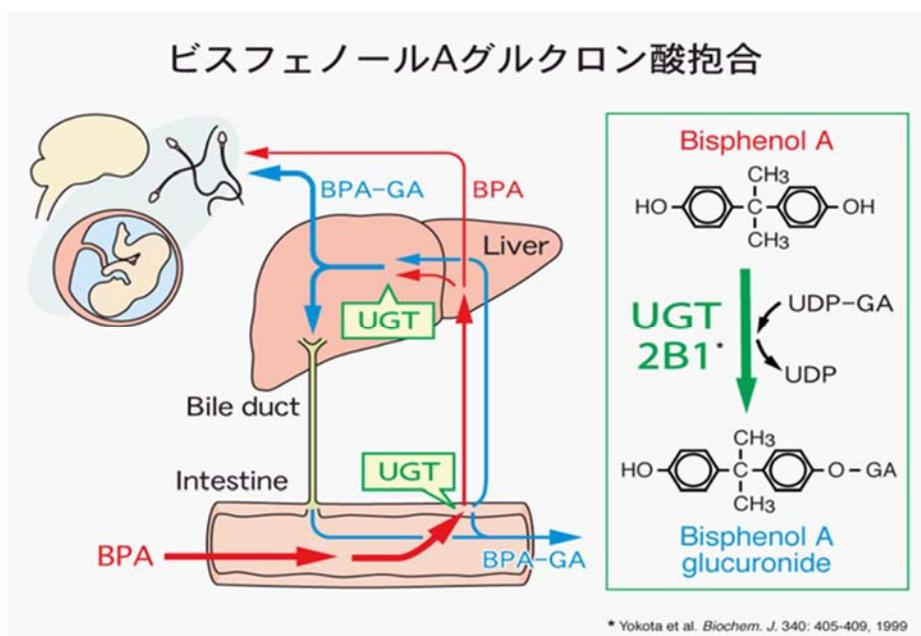


図 1：ラット成熟個体での BPA の体内動態

ラットにおける BPA の経口摂取時の体内動態の概略を示した。

体内の BPA は、腸管、肝臓に存在する UGT2B1 によってグルクロン酸抱合体 (BPA-GA) となり、速やかに、尿中や糞中に排泄される。

2. 材料と方法

1) 試薬

BPA は関東化学 (東京) より購入し、少量のエタノールに溶解した後、オリーブオイルで希釈して使用した。

2) 共試動物

7 週齢の雌マウス・雄マウス (C57BL/6NCrSlc) を三協ラボサービス (東京) から購入し、自由に採食 (CE-2、日本クレア、東京)、自由飲水ができ、温度 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)、

湿度 (50 ± 5%)、12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) サイクルの条件下で飼育した。2 週間の馴化後に交配させ、プラグを確認した日を妊娠 (gestation day, GD) 0.5 日とした。胃内強制投与によるストレスで着床が妨げられないよう GD4.5 までは投与期間に含めず、妊娠前期投与群 GD 5.5 から GD 12.5、妊娠後期投与群は GD 11.5 から GD 18.5 とした。Control 群にはオリーブオイル、BPA 投与群はオリーブオイルに溶解した BPA (10 mg/kg/day) を連日胃内強制投与し、GD 19.5 に自然分娩させた。このようにして①前期投与群 (control)、②前期投与群 (BPA) 、③後期投与群 (control)、④後期投与群 (BPA) の 4 群を用意した。母マウスは各群 4-6 匹となった。21 日齢 (postnatal day, PD) で離乳させ、同性の同腹子を同じゲージで育て、10 週齢 (postnatal week, PW) で高架式十字迷路を行い、不安様行動を評価した (図 2)。行動試験時にゲージから実験装置まで運ぶ際のストレス軽減を目的とし、行動試験を行う 3 日前から連日 1 分間マウスを手の上で遊ばせた。動物実験に関して酪農学園大学実験委員会から承認を受け (VH25A4)、最大限苦痛を排除できるよう原則に従い実験を行った。

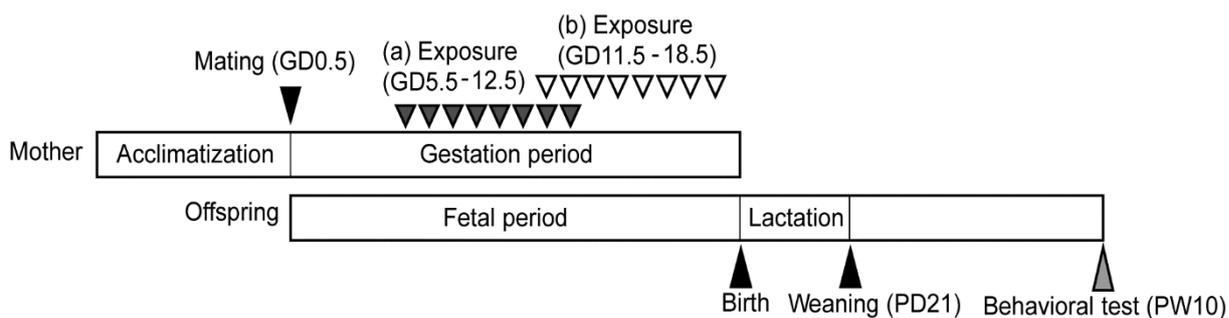


図 2 : 順化から行動実験を行うまでの過程

投与期間を (a) 妊娠前期 (GD5.5 - 12.5)、(b) 妊娠後期投与 (GD11.5 - 18.5) とし、オリーブオイル、BPA の連日胃内強制投与を行った。高架式十字迷路は PW10 に行った。

3) 高架式十字迷路試験

高架式十字迷路試験はげっ歯類の不安様行動を測定する試験であり、薬理試験などで頻繁に利用される、確率された方法である[3]。小原医科産業（東京）から購入した高架式十字迷路は（図 3）、十字型の迷路は床から 45 cm の高さに設置され、十字型の迷路のうち向かい合う二つのアームは壁があり（closed arm、25 cm × 5 cm × 15 cm）、他の二つのアームには壁がなく（open arm、25 cm × 5 cm × 15 cm）、中央には 4 つのアームをつなげる場所をもっており（center area、5 cm × 5 cm）、試験開始時にマウスを center area にそっと置き、5 分間の自由行動を評価対象とした。行動試験は全て迷路頭上に設置したビデオカメラにより自動録画し、小原医科産業から購入したソフトウェア（TimeEP1 for EPM）で解析を行った。照明は十字迷路の頭上に置き、center area が 110 lux の照度となるように調整した。1 匹の試験が終わるたびに迷路を掃除し、スプレーした水を拭いた後、エタノールで同様の作業をし、乾かした。

マウスは不安が増加すると、closed arm の滞在時間や進入回数が増加、または open arm の滞在時間や進入回数が減少する。また移動距離は自発運動の指標であるが、新規環境に対する不安が増加すると移動距離が減少することがある。今回の試験では、総移動距離、各アームの滞在時間及び進入回数を不安様行動の指標として解析を行った。ただし、試験時にマウスが寝る、またはほとんどの時間不動であった場合は、データとして不適とし、評価から除外した。不適切なデータを除外後、データとして扱った個体数を以下に記す。前期投与群（control）は雄 n=9、雌 n=9。前期投与群（BPA）は雄 n=12、雌 n=10。後期投与群（control）は雄 n=11、雌 n=11。後期投与群（BPA）は雄 n=9、雌 n=15。

4) 統計処理

全ての結果はスチューデントの t 検定で評価し、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとし

た。結果の表記は平均±標準誤差（mean ± standard errors [S.E.]）とした。



図 3 : 使用した高架式十字迷路

高架式十字迷路はクリーム色の板で四方を囲まれ、周りの景色が試験結果に影響しないように配慮された状態で使用した。十字の中心の真上にビデオカメラと照明を設置した。

3. 結果

妊娠期の投与期間と BPA 投与の有無で 4 群に分け、同腹子の数と性比(雄/雌)を表 1 に示した。出生数と性比には有意な差は認められなかった。これら子マウスが 10 週齢に達し、高架式十字迷路にて不安様行動の評価を行った。この試験では不安が高まると総移動距離の減少や、closed arm の滞在時間や進入回数が増加、もしくは open arm の滞在時間や進入回数の減少が認められる。

表 1 : 各群の同腹子数と性比 (雄/雌)

	Early pregnancy		Late pregnancy	
	Number	Sex ratio	Number	Sex ratio
Control	6.5 ± 0.9	1.1 ± 0.3	7.0 ± 0.3	1.4 ± 0.4
BPA	7.5 ± 0.5	1.3 ± 0.4	7.0 ± 1.0	1.0 ± 0.2

前期投与群 (control) は雄 n=13、雌 n=13。前期投与群 (BPA) は雄 n=16、雌 n=14。
後期投与群 (control) は雄 n=19、雌 n=16。後期投与群 (BPA) は雄 n=17、雌 n=25。
(mean ± S.E.)

まず初めに総移動距離を図 4 に示し、具体的な数値を表 2 に示した。総移動距離は自発運動量を表すが、不安が増加すると総移動距離は減少するため不安の指標にもなる。妊娠後期に BPA 曝露を受けた子マウス雌において、control と比べ有意に総移動距離が減少していた (図 4B)。次に、各アームの滞在時間及び進入回数をそれぞれ図 5 及び 6 に示した。これらの結果の具体的な数値は表 2 に示した。Control 群の雄は滞在時間及び進入回数において open arm より closed arm が多く、雌はその反対の結果を示していた。これらは高架式十字迷路では雄は雌よりも不安が強いというこれまで報告のある典型的な性的二形の結果と一致した[37]。妊娠前期の BPA 曝露群で

は雄雌どちらともこの典型的な性的二形がほとんど保たれており、大きな変化はなかった。しかし、妊娠後期の BPA 曝露群では雌において control 群に対し open arm 滞在時間の有意な減少と ($p<0.05$; 図 5B)、進入回数の有意な減少 ($p<0.05$; 図 6B) が認められた。

これらの結果から、妊娠後期に BPA に曝露されると、次世代の不安様行動は影響を受け、正常時にあるはずの典型的な性的二形の行動パターンが消失することが示唆された。

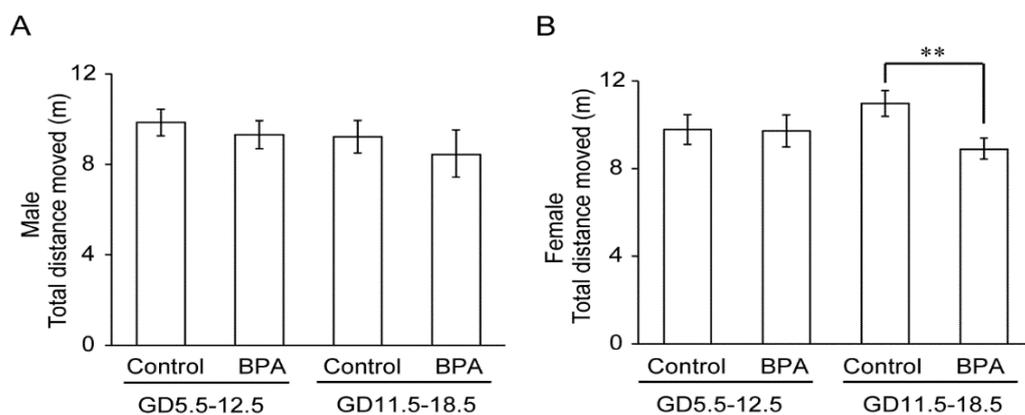


図 4：高架式十字迷路試験の総移動距離の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの移動距離の総和 (m)。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。前期投与群 (control) は雄 n=9、雌 n=9。前期投与群 (BPA) は雄 n=12、雌 n=10。後期投与群 (control) は雄 n=11、雌 n=11。後期投与群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=15。(mean ± S.E.)

**は control と比較し $p<0.01$ で有意差を示したものを表す。

表 2：各群の高架式受持迷路試験結果（数値）

	male				female			
	Early pregnancy		Late pregnancy		Early pregnancy		Late pregnancy	
	Control	BPA	Control	BPA	Control	BPA	Control	BPA
	(n=9)	(n=12)	(n=11)	(n=9)	(n=9)	(n=10)	(n=11)	(n=15)
Total distance (m)	9.9 ± 0.6	9.3 ± 0.6	9.3 ± 0.7	8.5 ± 1.0	9.8 ± 0.7	9.7 ± 0.7	11.0 ± 0.6	8.9 ± 0.5 **
Time spent in OA (%)	20.4 ± 4.1	23.6 ± 4.2	28.0 ± 5.0	28.8 ± 5.9	32.9 ± 4.3	36.3 ± 6.3	33.4 ± 5.4	22.0 ± 4.0 *
Time spent in CA (%)	34.9 ± 4.6	31.7 ± 3.5	30.0 ± 4.3	38.9 ± 6.5	26.0 ± 4.4	25.5 ± 4.3	28.9 ± 4.0	35.3 ± 3.8
Time spent in CE (%)	44.7 ± 3.9	44.8 ± 2.9	42.0 ± 3.5	32.3 ± 3.4 *	41.1 ± 3.5	38.2 ± 3.1	37.7 ± 2.9	42.7 ± 2.6
Entries in OA	5.9 ± 0.9	5.5 ± 0.7	5.9 ± 1.4	6.2 ± 1.1	8.7 ± 1.1	7.3 ± 1.1	8.1 ± 1.1	5.3 ± 0.7 *
Entries in CA	9.7 ± 1.2	9.4 ± 1.0	9.5 ± 1.3	7.7 ± 1.5	6.2 ± 1.0	8 ± 1.2	10.0 ± 1.1	8.7 ± 1.0

OA: open arm, CA: closed arm, CE: center area, 前期投与群 (control) は雄 n=9、雌 n=9。前期投与群 (BPA) は雄 n=12、雌 n=10。後期投与群 (control) は雄 n=11、雌 n=11。後期投与群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=15。(mean ± S.E.)

*は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

**は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

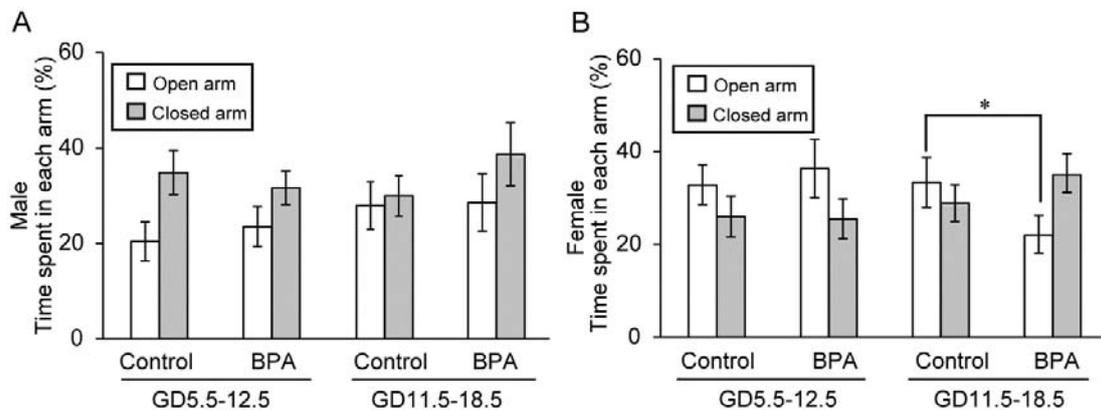


図 5：高架式十字迷路試験の各アームの滞在時間の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの、closed arm と open arm の滞在時間の全試験時間に対する割合 (%)。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。前期投与群 (control) は雄 n=9、雌 n=9。前期投与群 (BPA) は雄 n=12、雌 n=10。後期投与群 (control) は雄 n=11、雌 n=11。後期投与群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=15。

(mean ± S.E.) *は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

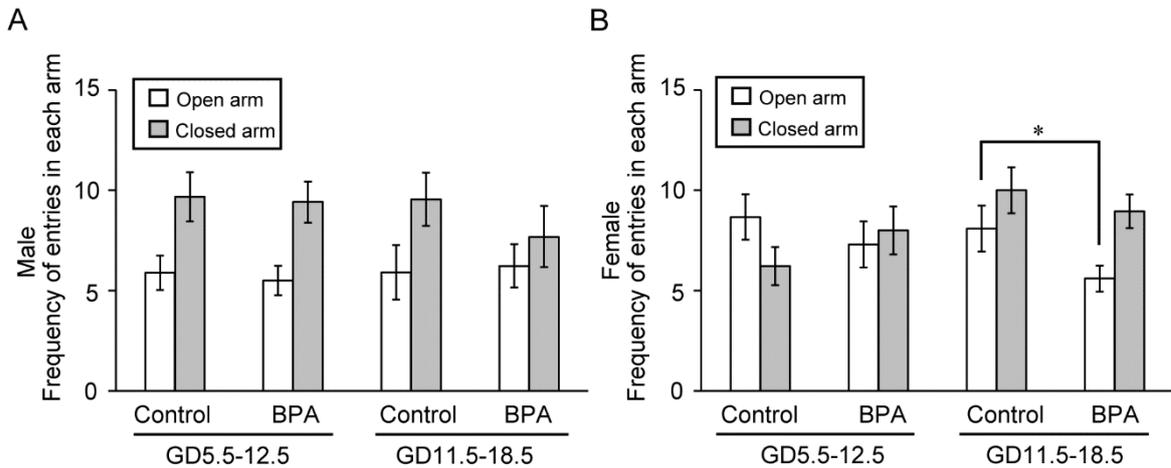


図 6：高架式十字迷路試験の各アームの進入回数の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの、closed arm と open arm の進入回数の総和。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。前期投与群 (control) は雄 n=9、雌 n=9。前期投与群 (BPA) は雄 n=12、雌 n=10。後期投与群 (control) は雄 n=11、雌 n=11。後期投与群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=15。(mean ±S.E.)

*は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

4. 考察

脳の発達は妊娠ステージで大きく異なるため、化学物質の影響は暴露時期により大きく異なる[62, 106]。これまで妊娠期 BPA 曝露による次世代の行動影響は報告されてきたが、そのメカニズムは不明な点が多かった。異なる妊娠期間に BPA を曝露することで、BPA の影響が出やすい期間を調べることは影響のメカニズムを調査するうえで重要な情報となる。そのため、第一章の調査では、BPA 曝露の期間を妊娠前期 (GD5.5 - 12.5, 図 2 [a]) と、妊娠後期 (GD11.5 - 18.5, 図 2 [b]) に分け、次世代の不安様行動を比較した。その結果、脳の発達が著しい妊娠後期が BPA 曝露の影響を受けやすいことがわかった。

重要なポイントとして、妊娠後期に BPA 曝露をうけた次世代の雌マウスにおいて、open arm での滞在時間と進入回数で有意な減少が認められていたことが挙げられる (図 5 及び 6)。雄マウスにおいては、closed arm 及び open arm のどの結果におい

ても有意な変化は認められなかったが、center area の滞在時間が有意に減少していた（表 2）。Center arm はどのアームに入るか躊躇する領域であるため、有意な減少は躊躇する時間が短くなったと考え、また、closed arm の 1 回の進入回数に対し滞在時間が control の結果よりも長くなっていることを考慮すると、妊娠後期 BPA 曝露の次世代雄マウスは、若干ではあるが closed arm をより好んだと考えた。

胎仔の成長は妊娠のステージで異なり、化学物質の影響はどのステージで影響を受けたかに依存することが知られている[62, 106]。妊娠前期は、胚発生に始まり器官形成の時期である。そのため、この時期に影響を受けると、胚致死や脳や目、心臓、骨格などの奇形が起りやすいが、口蓋や生殖器系の形成期は遅いため影響は妊娠後期に受けやすい。妊娠後期は、脳の発達や機能的な成熟が主体となる。これまでの報告によると、BPA は 500 mg/kg のような高容量の投与でないかぎり、生まれる子供の数に影響しないということがわかっている[98, 99]。一方で、低用量であっても、行動影響や生殖器系への影響が報告されていた[80, 109]。今回の調査でも、これまでの報告同様、同腹子の数や性比は影響を受けなかった（表 1）。重要なことは妊娠後期の BPA 曝露でのみ次世代に行動影響が出るのが明らかとなったことであり、これまで報告されてきた行動や生殖器系への影響においても妊娠後期に影響を受けたと考えて矛盾はなく、妊娠後期は BPA に最も影響を受けやすいと結論付けられた。また、今回の実験では妊娠前期と後期で GD11.5 と GD12.5 が重複していたことから、胎仔へ影響を及ぼす主要な期間は GD13.5 からであると考えられた。

今回、妊娠後期 BPA 曝露により高架式十字迷路における不安様行動の性的二形が失われることを報告したが、これまで、BPA の脳への影響としていくつかの脳の領域の性的二形が失われることが報告されている。例えば、青斑核の大きさ[48, 49]、分界条床核の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン含有ニューロンの細胞集団[28]、前腹側室周囲核の細胞数などの性差が失われるという報告がある[90]。性的二形をもつ領域の発達を含め脳の発達は妊娠後期が重要な時期（臨界期）であり[60]、例えば前腹側

室周囲核の神経発生は GD13 から GD18 にかけて起こる[74]。性腺ステロイドは、青斑核[31]、分界条床核[19, 32]、前腹側室周囲核[77]などの脳の領域の体積や細胞数に影響を及ぼすことが報告されており、性腺ステロイドには脳の性的二形の形成を制御する役割があることが知られている[2, 43, 83]。また、妊娠期に性腺ステロイドを曝露すると、げっ歯類の不安様行動のスクリーニング試験としてよく用いられるオープンフィールド試験において、行動の性差が失われることが報告されており[7]、これは妊娠期 BPA 曝露によるオープンフィールド試験でも同様に観察される[48, 49, 90]。脳のエストロゲン受容体 (estrogen receptors, ERs) の発現は部位特異的な分布を示し、性差をもつ[94]。ER β のノックアウトが不安を増加させることから ER β は不安様行動に関連することが知られているが[33]、妊娠期に BPA を曝露すると不安様行動に関連する扁桃体で ER β の発現が減少することが報告されている[11]。また、性腺ステロイドは ERs を介して神経細胞の移動や分化など脳の発達に関わるが[6, 104]、BPA が大脳皮質の層構造を乱すことも知られている[46]。行動異常につながる詳しいメカニズムは不明だが、BPA のエストロゲン活性による脳の性的二形や層構造の乱れと関係がある可能性がある。

しかしながら、BPA の ERs への親和性はエストロゲンと比較しておおよそ 10000 ~ 100000 分の 1 と極めて低く[1, 5]、BPA の非常に弱いエストロゲン作用だけが脳の発達を乱すとは考えにくい。実は近年 BPA が高い親和性をもつ受容体として、エストロゲン関連受容体 γ (estrogen related receptor γ , ERR γ) が報告されている[64, 75]。ERR γ は内因性リガンドが不明であるオーファン核内受容体である ERR ファミリー (ERR α , ERR β , ERR γ) の一つである。ERR は ER のアミノ酸配列と非常に高い相同性を示し、ER 応答配列に結合し転写調節に関わるが、ER のリガンドである 17-estradiol (E2) とは結合しないという特徴をもつ[4]。ERR γ がどのような働きを担うかは明らかでないが、この ERR γ の活性化により脳の機能の発達が影響を受けるという可能性も考えられる。また、近年、BPA の影響にはエピジェネティクスによる遺伝子

発現調節との関連が示唆されている[21, 95, 109]。脳の臨界期において、BPA はエストロゲン作用による影響だけでなく、他の作用による影響も複雑にからみあって影響が出るのではないかと考えられる。

胎児影響を考える上で、妊娠後期の BPA の胎児移行も興味深い事項である。Sprague-Dawley (SD) ラットを用い異なる妊娠日に ^{14}C -BPA を経口投与したところ、妊娠後期に投与したラットの胎児で BPA が高濃度で検出されている[22]。ヒトにおいても、妊娠が進むにつれ胎児側の BPA 及び BPA-GA が増加することが報告されている[70]。また、GD18 の妊娠 SD ラットに BPA-GA を子宮灌流すると、胎児側に BPA-GA のみでなく遊離型の BPA が検出されており[72]、母親側で BPA-GA に十分に代謝されていても胎盤を通過し胎児側で遊離型の BPA にもどる可能性が報告されている。このように、妊娠後期における BPA の胎盤通過もまた、胎児の影響を及ぼす大きな要因であると考えられる。

5. 小括

第一章では、BPA を異なる妊娠期間で投与し、次世代の不安様行動を比較することにより、影響を受けやすい時期は妊娠後期であることを証明した。ヒトの研究においても BPA 及び BPA-GA が胎児と羊水中で検出されていることや、ヒトの妊娠期が非常に長いことを考えると、妊娠後期に胎児が BPA の影響を十分に受けると考えられる。

第Ⅱ章 母親の葉酸摂取量は BPA 曝露による次世代の行動影響を左右する

1. 序文

BPA が妊娠期に次世代影響をおよぼす原因としてエストロゲン作用が中心に考えられてきたが、その他の可能性として、生体内のリガンドや具体的な機能が不明な ERR γ の活性化[64, 75]やエピジェネティクスの攪乱による影響が指摘されている[21, 95, 109]。

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化による遺伝子発現の変化とは独立した機構であり、DNA のメチル化やヒストン修飾などによって遺伝子の発現調節を行う調節機構である[107]。細胞の種類ごとに遺伝子に書き込まれているエピジェネティックな情報が異なるため、体を構成する細胞は全て同じ塩基配列の遺伝子を持つにもかかわらず各種細胞で異なる形質をもつ。個体発生において、受精直後の受精卵の遺伝子は親由来のエピジェネティックな情報をもつ。しかしこの情報は一度消去され、細胞の分化に応じて各種細胞に固有のエピジェネティックな情報が書き込まれていくリプログラミングと呼ばれる過程があり[53, 66, 85]、この時期にエピジェネティックな情報がかく乱され、誤った情報が書き込まれると、癌などをはじめ様々な病気が関わりと考えられている。また、エピジェネティックな調節は栄養やその他の環境因子によって容易に変化することが知られており、BPA も環境因子として胎仔期の DNA のメチル化を攪乱し生殖器系や脳に影響を及ぼすことを示唆する報告もある[21, 34, 95, 109]。

BPA の影響と DNA メチル化の関連を示唆する有名な報告に、アグーチマウスを用いた Dolinoy ら (2007) による研究報告がある[21]。アグーチマウスの毛色は、発生時における毛色を制御する遺伝子のメチル化の度合いによって異なることが知られているが、Dolinoy ら (2007) はこのアグーチマウスの妊娠期及び授乳期に BPA を曝露し、新生児の毛色の違いから BPA が低メチル化状態をもたらすことを示した。ま

た BPA と葉酸などのメチル基給与体を同時に投与した場合には、新生児の毛色は BPA 非投与群に近くなったことから、母親のメチル基給与体の摂取が BPA による低メチル化を抑えることも報告した。また、妊娠期 BPA 曝露により、次世代間脳においてメチル基転移酵素やその他葉酸代謝関連酵素の発現や葉酸代謝経路の代謝物が変動しており、BPA が葉酸代謝系をみだすことでメチル基給与体の供給が減少しエピジェネティックな影響につながっていく可能性も考えられている[73]。これらのことから、母親の葉酸の摂取量は、妊娠期の BPA 曝露による行動影響を左右するのではないかと考えた。

葉酸は親水性のビタミン B 群に属し、我々は普段食事から葉酸を得ている。葉酸は DNA や RNA 合成に重要であるプリンやチミジンの生合成に必須の補酵素である [102]。その他に、DNA のメチル化のメチル基給与体としての役割をもつ [14]。特に、胎児は細胞の増殖や分裂、分化などが著したため、妊娠期の葉酸摂取は重要である。妊娠期の葉酸摂取は神経管閉鎖障害の発症リスクの低減を目的とし [87]、1998 年には米国の食品と栄養に関する委員会が妊婦の食事摂取基準として葉酸の一日摂取量を 400 μg としている。そこで、我々が通常実験用マウスの飼育で使用している餌 (CE-2; 日本クレア) の葉酸量を調べたところ、葉酸は 250 μg /餌 100 g で含まれており、体重当たりで計算すると、妊婦の葉酸の推奨摂取量と比べると約 80 倍もの葉酸を与えていることがわかった。このため、妊娠期 BPA 曝露の影響を調査するうえで、妊婦が通常摂取すべき量と同等の葉酸摂取量を妊娠マウスに与え、BPA の影響を調べる必要があると考えた。

この章では、妊娠期 BPA 曝露による次世代の行動影響が母親の葉酸摂取量に左右されるかを調べることを目的とし、通常餌の他に葉酸を 4 μg /餌 100 g にした低葉酸餌を用意し、妊娠中に BPA 曝露をうけた次世代の行動の差を調べた。

2. 材料と方法

1) 試薬

BPA は関東化学より購入し、オリーブオイルに溶解して使用した。

2) 共試動物

7 週齢の雌マウス・雄マウス (C57BL/6NCrSlc) を三協ラボサービスから購入した。自由に採食、自由飲水ができ、温度 (22 ± 2 °C)、湿度 ($50 \pm 5\%$)、12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) サイクルの条件下で飼育した。使用する餌は通常餌として CE-2 (葉酸 250 μg /餌 100 g、日本クレア)、低葉酸餌 (葉酸 4 μg /餌 100 g、日本クレア)、を用意し、補足実験のために低葉酸餌に葉酸を添加した葉酸添加餌 (葉酸 250 μg /餌 100 g、日本クレア) を用意した。2 週間の馴化後に交配させ、プラグを確認した日を GD 0.5 とした。投与は GD 11.5 から GD 18.5 に行った。Control 群にはオリーブオイル、BPA 投与群はオリーブオイルに溶解した BPA (10 mg/kg/day) を連日胃内強制投与し、GD 19.5 に自然分娩させた。このようにして① 通常餌群 (control)、②通常餌群 (BPA)、③低葉酸餌群 (control)、④低葉酸餌群 (BPA) の 4 群を用意した。母マウスの数は通常餌群 (control) は n=12、通常餌群 (BPA) は n=13、低葉酸餌群 (control) は n=12、低葉酸餌群 (BPA) は n=11 となった。PD21 で離乳させ、同性の同腹子を同じゲージで育て、PW10 に高架式十字迷路試験で不安様行動を評価した。順化から行動試験までの過程は図 7 に記した。行動試験時にゲージから実験装置まで運ぶ際のストレス軽減を目的とし、行動試験を行う 3 日前から連日 1 分間マウスを手の上で遊ばせた。

通常餌と低葉酸餌では葉酸以外の成分にも差があることを考慮し (表 3)、補足実験として、低葉酸餌と葉酸量だけが異なる葉酸添加餌を用いた実験も行った。葉酸添加餌群 (control, 母マウス n=4) と葉酸添加餌群 (BPA, 母マウス n=3) をつくり、高架式十字迷路試験のみを行った。

動物実験に関して酪農学園大学実験委員会から承認を受け (VH25A4)、最大限苦痛を排除できるよう原則に従い実験を行った。

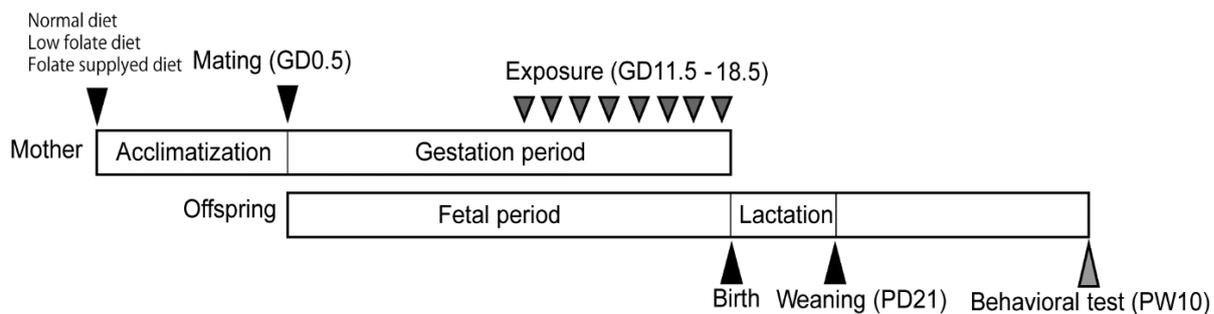


図 7. 順化から行動実験を行うまでの過程

各種餌で 2 週間順化させ、妊娠後期 (11.5 - 18.5 日) にオリーブオイル、BPA を連日胃内強制投与した。10 週齢で高架式十字迷路試験及び強制水泳試験を行った。

表 3：通常餌と低葉酸餌の成分表

Nutrient composition		Normal diet	Low folate diet
Water	(%)	8.7	8.8
Crude ash	(%)	6.7	4.9
Crude protein	(%)	25	24
Crude fat	(%)	4.3	6.3
Crude fiber	(%)	4.2	3.4
Ca	(g/100g)	1.06	0.63
Mg	(g/100g)	0.28	0.073
K	(g/100g)	1.03	0.64
Na	(g/100g)	0.33	0.24
Fe	(mg/100g)	27.1	0.8
Zn	(mg/100g)	5.2	3.87
P	(g/100g)	1.02	0.83
Mn	(mg/100g)	9.87	0.3
Cu	(mg/100g)	0.68	0.3
Retinol	(mg/100g)	0.69	0.35
vitaminB1	(mg/100g)	1.9	1.7
vitaminB2	(mg/100g)	1.2	0.99
vitaminB6	(mg/100g)	1.2	0.78
vitaminB12	(μ g/100g)	6.8	4.8
vitaminD3	(IU/100g)	230	170
vitaminE	(mg/100g)	6	11.4
Pantothenic acid	(mg/100g)	3.31	2.44
Niacin	(mg/100g)	18.6	11.6
Folate	(μ g/100g)	250	4
colin	(g/100g)	0.16	0.21

3) 高架式十字迷路試験

第一章の材料・方法の高架式十字迷路試験の記述と同様に実施した。不適切なデータを除外後、データとしてとりあつかった個体数を以下に記した。通常餌群 (control) は雄 n=30、雌 n=28。通常餌群 (BPA) は雄 n=27、雌 n=34。低葉酸餌群 (control) は雄 n=31、雌 n=32。低葉酸餌群 (BPA) は雄 n=36、雌 n=21。葉酸添加餌群 (control) は雄 n=8、雌 n=13。葉酸添加餌群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=5。

4) 統計処理

全ての結果はスチューデントの t 検定で評価し、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとし

た。結果の表記は mean ± S.E.とした。

3. 結果

一腹あたりの子供の数と生まれた子供の性比（雄／雌）には有意な差は認められなかった（表 4）。

表 4：各群の同腹子数と性比（雄／雌）

	Normal diet		Low folate diet	
	Number	Sex ratio	Number	Sex ratio
Control	7.1 ± 0.5	1.6 ± 0.4	7.4 ± 0.6	1.6 ± 0.5
BPA	7.3 ± 0.5	1.0 ± 0.2	7.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4

通常餌群（control）は雄 n=46、雌 n=39。通常餌群（BPA）は雄 n=43、雌 n=52。低葉酸餌群（control）は雄 n=47、雌 n=42。低葉酸餌群（BPA）は雄 n=49、雌 n=33。（mean ± S.E.）

離乳後、生まれた子マウスを 10 週齢まで育て、まず高架式十字迷路試験を行った。この試験では、不安が高いマウスは総移動距離の減少や、closed arm の滞在時間や進入回数が増加、もしくは open arm の滞在時間や進入回数の減少を示す。実験の結果、総移動距離は通常餌雌において減少傾向がみられたが（ $p=0.07$ ）、全ての群で有意差は認められなかった（図 8 及び表 5）。各アームの滞在時間の結果では、まず control において雄は雌よりも不安様行動が強く出ており、典型的な性的二形の結果となった（図 9）。それに対し、通常餌（BPA）群では雌において、open arm 滞在時間が control と比較して有意に減少した（ $p<0.01$ ；図 9B 及び表 5）、低葉酸餌（BPA）群では open arm 滞在時間の有意な減少だけでなく（ $p<0.05$ ；図 9B 及び表 5）、closed arm 滞在時間においても有意な増加がみられた（ $p<0.05$ ；図 9B 及び表 5）。また、各アームの

進入回数では、雌において通常餌（BPA）群と低葉酸餌（BPA）群の両方で open arm の進入回数が control と比較して有意に減少した（各々 $p<0.05$, $p<0.05$; 図 10 及び表 5）。これらの結果から、母親の摂取する葉酸量が低くなると、BPA 曝露による次世代の不安様行動が強く現れるようになり、典型的な性的二形の不安様行動のパターンが消失することを示している。

表 5：各群の高架式受持迷路試験結果（数値）

	male				female			
	Normal diet		Low folate diet		Normal diet		Low folate diet	
	Control (n=46)	BPA (n=43)	Control (n=47)	BPA (n=49)	Control (n=39)	BPA (n=52)	Control (n=42)	BPA (n=33)
Total distance (m)	9.3 ± 0.4	9.4 ± 0.4	9.9 ± 0.4	9.8 ± 0.4	10.0 ± 0.4	9.2 ± 0.3	9.8 ± 0.5	9.5 ± 0.4
Time spent in OA (%)	26.8 ± 3.1	26.1 ± 3.2	30.7 ± 2.9	27.9 ± 3.0	36.0 ± 2.8	26.7 ± 2.6**	34.8 ± 2.8	26.8 ± 3.3*
Time spent in CA (%)	34.1 ± 2.6	40.5 ± 2.9	39.7 ± 2.9	39.1 ± 2.7	31.6 ± 2.8	36.3 ± 2.2	32.2 ± 2.8	40.6 ± 3.9*
Time spent in CE (%)	39.1 ± 2.5	33.5 ± 1.9*	29.6 ± 1.6	33.1 ± 1.6	32.3 ± 1.6	37.0 ± 1.8*	32.9 ± 1.8	32.6 ± 2.2
Entries in OA	5.8 ± 0.6	6.6 ± 0.8	7.0 ± 0.6	6.2 ± 0.6	8.4 ± 0.6	6.5 ± 0.5*	7.9 ± 0.7	6.2 ± 0.5*
Entries in CA	9.7 ± 0.7	9.7 ± 0.7	9.8 ± 0.7	10.0 ± 0.6	9.0 ± 0.6	9.0 ± 0.6	8.5 ± 0.6	9.9 ± 0.9

OA: open arm, CA: closed arm, CE: center arm, 通常餌群（control）は雄 n=30、雌 n=28。通常餌群（BPA）は雄 n=27、雌 n=34。低葉酸餌群（control）は雄 n=31、雌 n=32。低葉酸餌群（BPA）は雄 n=36、雌 n=21。（mean ± S.E.）

*は control と比較し $p<0.05$ で有意差を示したものを表す。

**は control と比較し $p<0.05$ で有意差を示したものを表す。

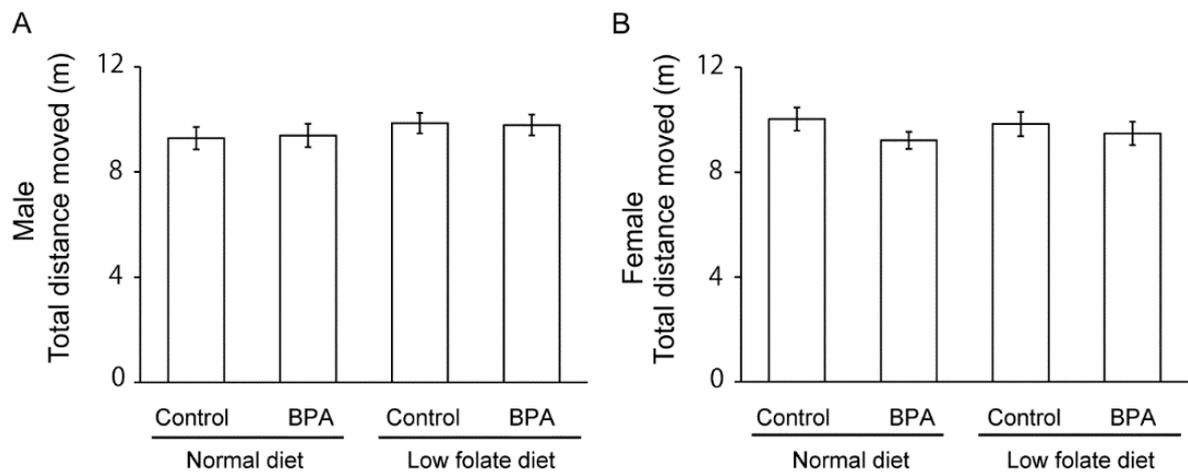


図 8 : 高架式十字迷路試験の総移動距離の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの移動距離の総和 (m)。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。通常餌群 (control) は雄 n=30、雌 n=28。通常餌群 (BPA) は雄 n=27、雌 n=34。低葉酸餌群 (control) は雄 n=31、雌 n=32。低葉酸餌群 (BPA) は雄 n=36、雌 n=21。(mean ± S.E.)

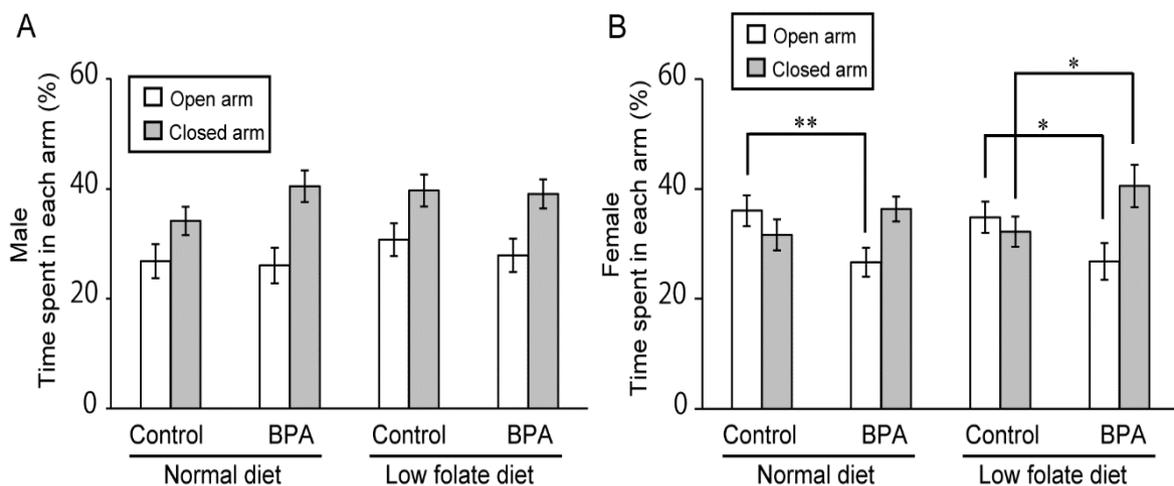


図 9 : 高架式十字迷路試験の各アームの滞在時間の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの、closed arm と open arm の滞在時間の全試験時間に対する割合 (%)。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。通常餌群 (control) は雄 n=30、雌 n=28。通常餌群 (BPA) は雄 n=27、雌 n=34。低葉酸餌群 (control) は雄 n=31、雌 n=32。低葉酸餌群 (BPA) は雄 n=36、雌 n=21。
(mean ± S.E.)

*は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

**は control と比較し $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

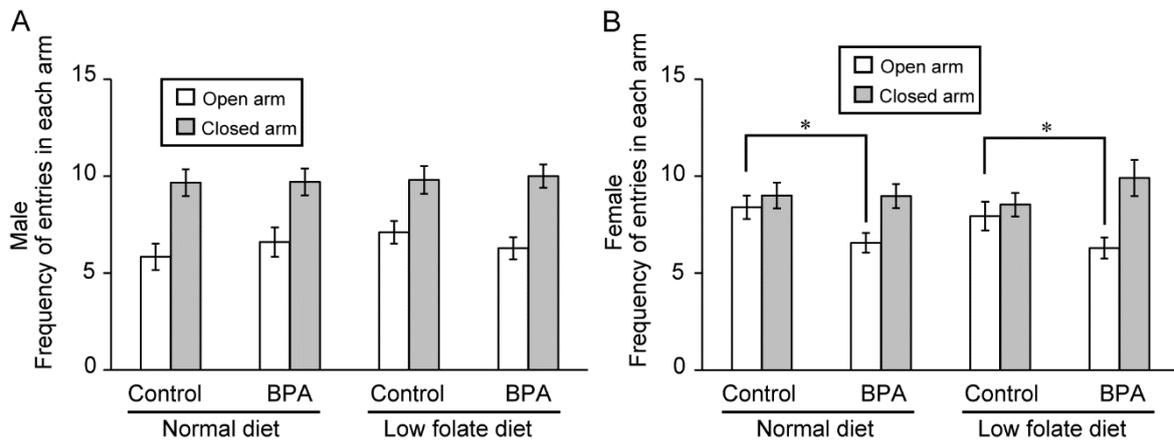


図 10 : 高架式十字迷路試験の各アームの進入回数の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの、closed arm と open arm の進入回数の総和。(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。通常餌群 (control) は雄 n=30、雌 n=28。通常餌群 (BPA) は雄 n=27、雌 n=34。低葉酸餌群 (control) は雄 n=31、雌 n=32。低葉酸餌群 (BPA) は雄 n=36、雌 n=21。(mean ± S.E.)

*は control と比較し $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

補足実験として、低葉酸餌に葉酸のみを添加した葉酸添加餌を用いて同様の実験を行ったが、性的二形のパターンが崩れたものの、雄雌ともに有意な差は認められず、BPAの影響が改善されていることがわかった（図 11）。

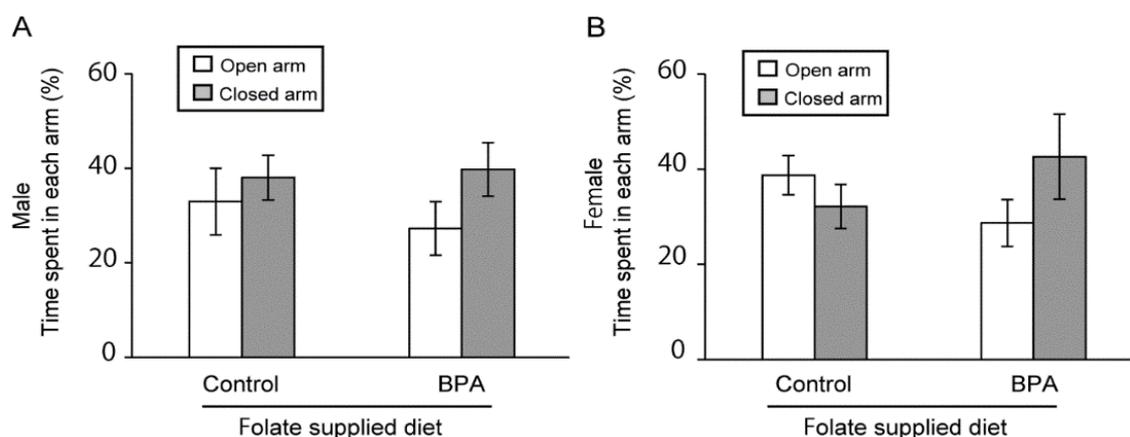


図 11：葉酸添加餌群の高架式十字迷路試験の各アームの滞在時間の結果

葉酸添加餌群を用いた補足実験で、高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの、closed arm と open arm の滞在時間の全試験時間に対する割合 (%)。

(A) 雄の結果。(B) 雌の結果。葉酸添加餌群 (control) は雄 n=8、雌 n=13。酸添加餌群 (BPA) は雄 n=9、雌 n=5。(mean ± S.E.)

4. 考察

2007 年に Dolinoy ら (2007) が妊娠期 BPA 曝露と次世代の DNA メチル化の関係を強く示し、更にメチル基給与体の補給で BPA の DNA メチル化の攪乱の改善を報告したことから [21]、我々は餌の葉酸量に着目した。その結果、通常使用している餌には充分量の葉酸が含まれていることがわかった。第 I 章で示したように、通常の餌を用いた実験においても BPA の不安様行動の増加が確認されたが、通常の餌に含まれる葉酸が充分であるため BPA の影響がある程度改善されている可能性を考えた。また、妊娠期間のヒトが摂取すべき葉酸量と同等の葉酸量を摂取するマウスで BPA の影響を評価することは、ヒトへの影響を考える重要な情報になると考え、この章で

は葉酸量を調整した低葉酸餌を使用し、BPA の次世代の行動影響を評価した。

高架式十字迷路試験の結果、低葉酸餌（BPA）群は次世代の不安様行動の増加が強く現れた（図 9）。この発見は、葉酸摂取が BPA の次世代影響を左右させる要因の 1 つであることを示唆しており、加えて、母親の葉酸摂取量を変化させることによって BPA の行動影響の観察が容易になったことを示した。しかし同時に、ヒトの妊娠中に推奨される葉酸摂取量では BPA の影響は強く現れることがわかった。通常餌群の結果をからも、極めて多い葉酸量を摂取しても行動影響は観察されているため、単純な葉酸の補給だけでは、BPA の影響を防止することが難しいことがわかった。これらのことを踏まえると、各研究所で使用される食餌の含有葉酸量の差は、BPA の次世代影響の結果を左右し、矛盾した結果を導く可能性が考えられる。これまで BPA はげっ歯類を用いて様々な研究が行われてきたが、異なる結果がしばしば報告されてきた。例えば、不安様行動の性的二形の消失が報告される一方で[24, 26, 30, 49, 90]、不安行動の有意な影響はないとの報告もあった[50, 108]。BPA の影響を左右する一因子として葉酸摂取量が考えられ、実験動物の葉酸摂取量をコントロールすることは、葉酸が関わる BPA の影響のメカニズムを解明するうえで役立つ実験条件であると考えられる。

今回は葉酸にのみ着目して実験を行ったが、他のメチル基給与体の摂取量によっても BPA の影響は左右されると考えられる。Dolinoy ら（2007）の研究では、葉酸だけでなく、ビタミン B12、ベタイン、コリンをメチル基給与体として大量に補給し、これらの補給が BPA によって誘導される低メチル化に抵抗することを示唆しているからである[21]。しかし実際にはこれらメチル基給与体を毎日大量に摂取するのは難しく、また、個人の栄養摂取量は食生活や国の文化に大きく関係し、葉酸やその他のメチル基給与体の摂取量は各々で異なると言え、BPA の影響の受けやすさは個人で異なると考えられる。加えて、摂取するメチル基給与体の量だけでなく、各々における葉酸代謝の能力も差も、BPA の影響を左右すると考えられる。例えば、メチレンテ

トラヒドロ葉酸還元酵素 (methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR) 遺伝子の 677 番目のシトシンからチミンへの変異や、1298 番のアデニンからシトシンへの変異などの遺伝子変異をもって生まれる人も少なくはなく、この変異をもつ場合 MTHFR は活性が低下し、葉酸代謝の能力が低いため[96]、たとえメチル基給与体を大量に摂取したとしても、BPA の影響を強く受ける可能性がある。このように、葉酸摂取量だけでなく、その他メチル基給与体の摂取、葉酸代謝能力など、母親の食事や体質で次世代の BPA の感受性は異なると言える。

今回は葉酸が BPA の次世代影響の感受性を左右する一因子であることを示したが、BPA の影響のメカニズムとしてエストロゲン作用や機能不明の ERR γ の活性化など、様々な作用機序が議論されており、総合的に解明していく必要がある。

5. 小括

この章では、母親の葉酸摂取量を調整することで、妊娠期 BPA 曝露による次世代の不安様行動が顕著に現れることを示した。しかし、葉酸の摂取量を増やすだけでは、BPA の影響を完全に防止することはできないことがわかった。BPA が次世代に及ぼす影響は、母親の嗜好や食生活の一部は依存すると考えられ、葉酸だけでなく他の栄養素も BPA の影響を部分的に左右する可能性がある。実験動物の葉酸状態を制御することは、妊娠期 BPA 曝露による次世代影響のメカニズム、例えばエピジェネティクスの攪乱などの調査に有用であると考えられる。また、実験動物を用いて人の毒性評価を考えるには、今後、餌による栄養の摂取量の違いを考慮に入れる必要があると考えている。

第Ⅲ章 ビスフェノール A の代替品であるビスフェノール F の次世代行動影響

1. 序文

これまで妊娠期 BPA 曝露による次世代影響は世界中で研究され、胎児や新生児などの脳[46, 79, 90]や生殖器[80, 97]に対する影響が懸念され、一部の国では使用を禁止する動きもみられる。このような動きから、現在、BPA の代替品として BPA の構造類似体の使用が増加している[54, 56]。BPA 代替品の具体的な例として、ビスフェノール B (BPB, 2,2-bis[4-hydroxyphenyl]butane)、ビスフェノール F (BPF, bis[4-hydroxyphenyl]methane)、ビスフェノール S (BPS, bis[4-hydroxyphenyl]sulfone)、ビスフェノール AF (BPAF, 4,4-[hexafluoroisopropylidene]diphenol) などがあり、図 13 に示すように、BPA と非常に似た構造をもつことがわかる。このため BPA と似た影響が危惧されており、近年注目されてきてはいるものの、次世代への影響はほとんど知られていないのが現状である。これら BPA 代替品は、ヒト血清や尿からも検出されており[15, 55]、アメリカでの食品内検出量の調査によると、BPA に次いで BPF が多く検出されている (図 14) [54]。

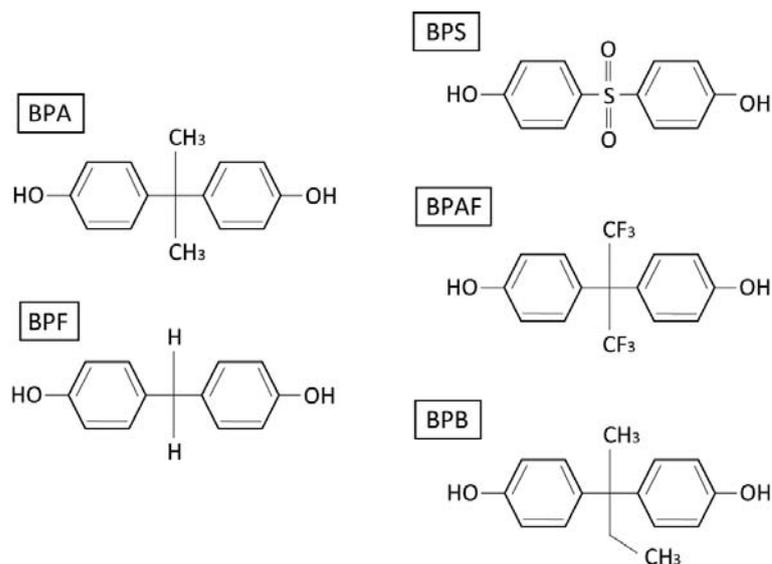


図 13 : BPA の構造類似体

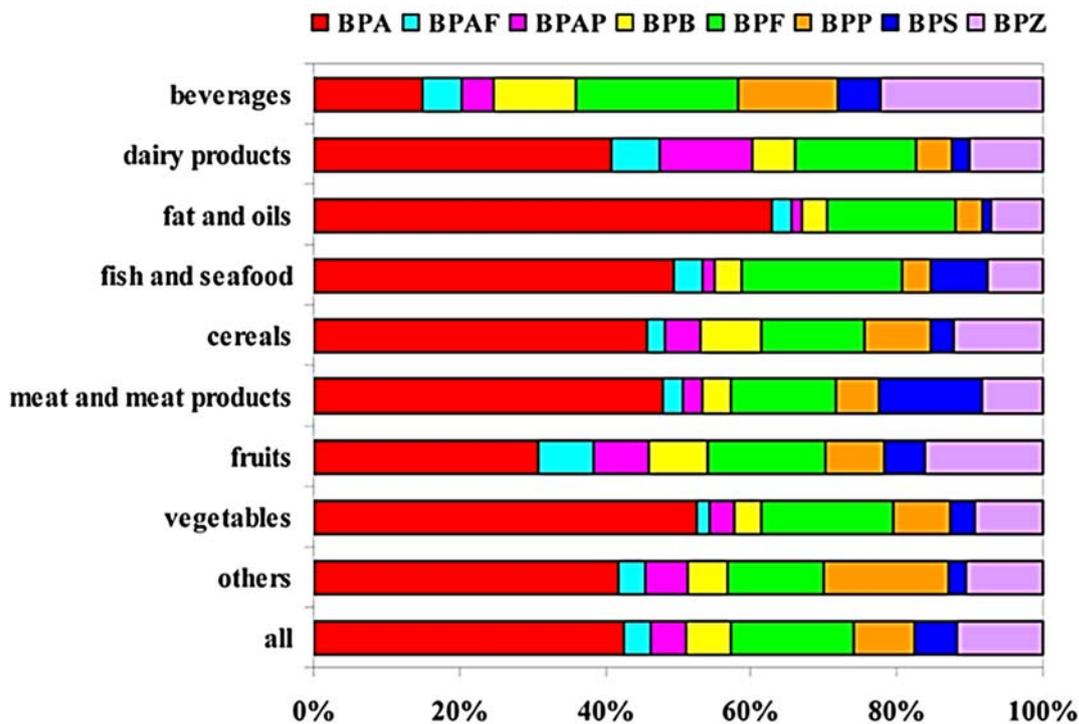


図 14：ビスフェノール類の食品内検出量 (New York, Albany)

267 食品を収集し、これらを 9 分類した。食品内から検出されたビスフェノール類の総量を 100%とした図は Liao ら (2013) より引用した [54]。

BPF は BPA の中心にある炭素からメチル基が 2 つ失った構造をしており (図 13)、これまでの報告から、BPF のエストロゲン活性は BPA より 100 分の 1 程度であることがわかっている[45, 81, 86, 88]。構造やホルモン活性の点から、BPF は BPA と同じような悪影響を及ぼす可能性が考えられる。BPA はこれまで糖尿病や心臓疾患[52]、癌[57]、脳[46, 79, 90]、行動[109]、生殖器[80, 97]への影響など、数多く研究がなされてきているのに対し、BPF による次世代の影響はほとんど調べられていない。興味深いことに、妊娠後期にあたる GD17 に BPF を経口投与されたラットで、胎仔の脳などの組織で BPF が検出されたとの報告がある[9]。第一章で述べたように、我々は妊娠後期 BPA 曝露による次世代の不安様行動の変化を実証しており、BPF も妊娠後期に胎仔へ移行することで、胎仔に影響を及ぼし、行動異常をお

こす可能性があると考えた。第三章では BPF による次世代行動影響を調べることで、BPF が BPA の代替品として安全性の高い物質であるかを検証することにした。

2. 材料と方法

1) 試薬

BPA 及び BPF は関東化学より購入し、少量のエタノールに溶解後、オリーブオイルで希釈して使用した。

2) 共試動物

7 週齢の雌・雄マウス (C57BL/6NCrSlc) を三協ラボサービスから購入し、自由に採食 (CE-2、日本クレア)、自由飲水ができるよう飼育した。飼育環境は、温度 (22 ± 2 °C)、湿度 (50 ± 5%)、12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) サイクルを保った。2 週間の馴化後に交配させ、プラグを確認した日を GD 0.5 とし、投与は GD 11.5 から GD 18.5 に行った。Control 群にはオリーブオイル、BPA 投与群はオリーブオイルに溶解した BPA (10 mg/kg/day)、BPF 群はオリーブオイルに溶解した BPF (10 mg/kg/day) を連日胃内強制投与し、①control 群、②BPA 群、③BPF 群の 3 群を用意した。母マウスは各群 6 匹となった。GD19.5 で自然分娩後、PD21 で離乳し、同性の同腹子を同じゲージで育て、PW10 でオープンフィールド試験を行い、翌日に高架式十字迷路試験、その翌日に強制水泳試験を行った。順化から行動試験までの過程を図 15 に記した。行動試験時にゲージから実験装置まで運ぶ際のストレス軽減を目的とし、行動試験を行う 3 日前から連日 1 分間マウスを手の上で遊ばせた。なお動物実験は、酪農学園大学実験委員会から承認を受けている (VH25A4, VH15A2)。

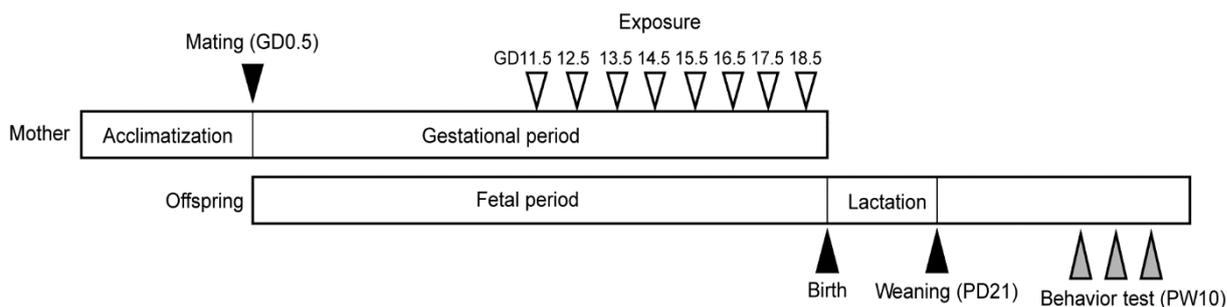


図 15 : 順化から行動試験までの過程

妊娠後期（GD11.5 - 18.5）にオリーブオイル、BPA、BPF を連日胃内強制投与した。10 週齢でオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、強制水泳試験を行った。

3) オープンフィールド試験

オープンフィールド試験は不安様行動のスクリーニング試験としてよく用いられる試験である[3]。オープンフィールドの装置は小原医科産業から購入し、図 16 のものを使用した（50 cm × 50 cm × 30 cm）。照度は 100 lux に設定した。試験時、マウスをオープンフィールドの右端にそっと置き、10 分間自由行動させ、行動は全て天井に設置したビデオカメラにより自動録画した。小原医科産業から購入したソフトウェア（TimeOFCR1 for open field test）を使用し、総移動距離は自発運動量及び不安様行動、フィールド中心領域の滞在時間を不安様行動の指標として解析し、評価した。また、立ち上がり行動（rearing）は自発運動の指標として、毛づくろい（self-grooming）及び体を伸ばして周囲をうかがう姿勢（stretching）不安様行動の指標として、肉眼で回数を数えた。不安が強くなると、総移動距離の減少や、中心領域滞在時間の減少、毛づくろい、体を伸ばす行為が増加する。試験時にマウスが寝る、またはほとんどの時間不動であった場合は、データとして不適とし、評価から除外した。不適切なデータを除外後、データとして取り扱った個体数は以下の通りである。Control 群（雄 n=23、雌 n=20）。BPA 群（雄 n=23、雌 n=21）。BPF 群（雄 n=26、雌 n=24）。

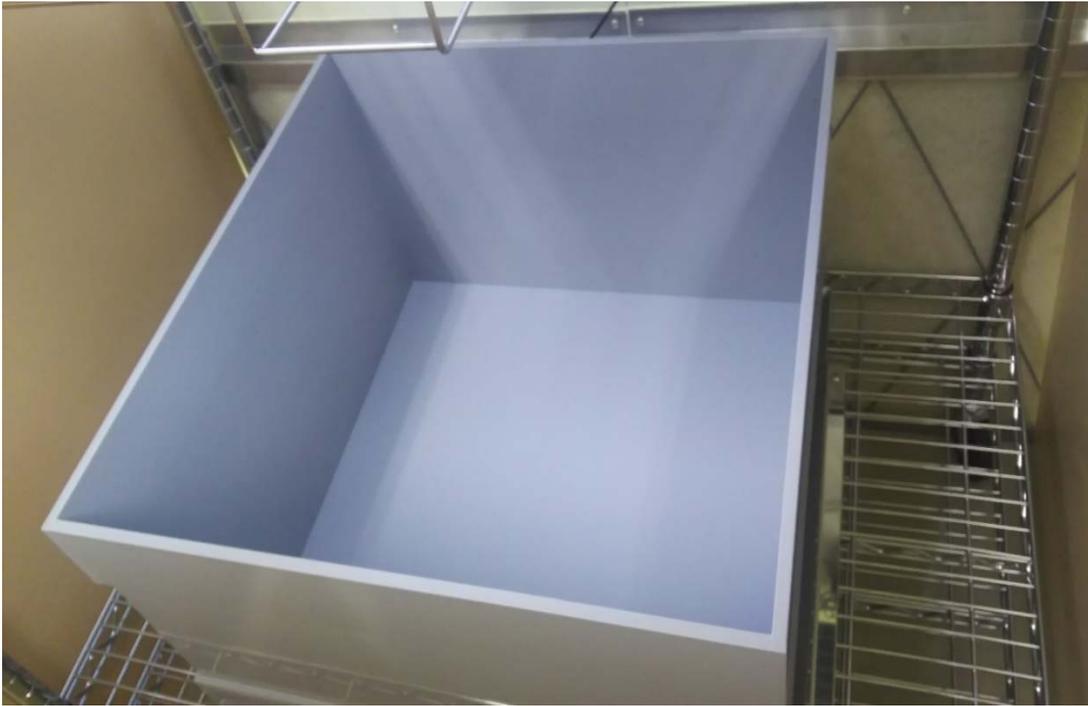


図 16 : 実際に使用したオープンフィールド試験の装置

オープンフィールドは四方をクリーム色の板で囲み、周りの景色が試験結果に影響しないように配慮した状態で使用した。ビデオカメラはフィールドの中心になるよう天井に設置した。

4) 高架式十字迷路試験

第一章の材料と方法の記述と同じ。不適切なデータを除外後、データとして取り扱った個体数は以下の通りである。Control 群 (雄 n=16、雌 n=17)。BPA 群 (雄 n=18、雌 n=18)。BPF 群 (雄 n=21、雌 n=22)。

5) 強制水泳試験

強制水泳試験は最初に Porsolt ら (1977) によって確立されたうつ状態を評価するためによく用いられる行動試験であり [84]、これまでの BPA の研究でもよく用いられている [26, 42]。今回、実験装置は小原医科産業から購入し、透明な円柱型の容器 (22 cm × 12 cm) に $22 \pm 2^\circ\text{C}$ の水を深さ 15 cm ほど入れ、これを強制水泳実験用の

白い箱の中心に設置し、箱内の照度を 200 lux に設定した (図 17)。各マウスを水の中にそっと入れ、6 分間の試験時間で浮いているだけの時間を不動時間とし、その総和を測定した。行動は箱の天井に設置したビデオカメラで自動録画し、小原医科産業から購入したソフトウェア (Time FZ1 for Tail suspension & Porsolt forced swim test) で解析を行った。不動状態は、頭を水面上に保つための上肢を最小限の動きだけでただ浮いている状態とした。全て結果をデータとして取り扱い、個体数は以下の通りである。Control 群 (雄 n=23、雌 n=20)。BPA 群 (雄 n=24、雌 n=21)。BPF 群 (雄 n=26、雌 n=25)。

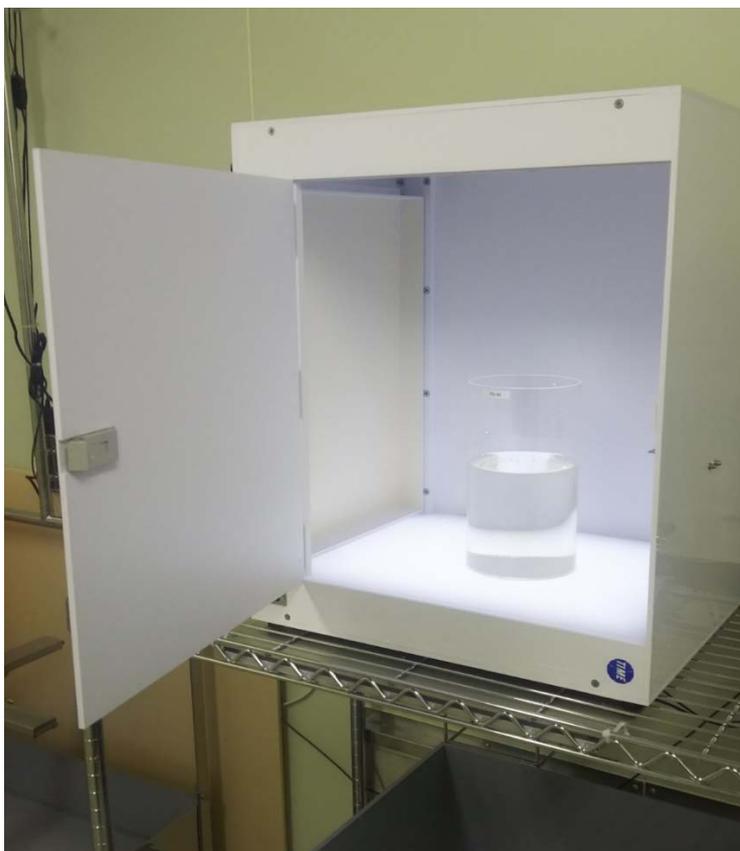


図 17：使用した強制水泳試験装置

試験は扉を閉じて行うことができ、周りの景色が試験結果に影響しないように配慮された装置となっている。

6) 統計処理

高架式十字迷路試験における open arm と closed arm 滞在時間に及ぼす影響に関する統計学的解析はスチューデントの t 検定を用いた。その他行動実験の結果は、Dunnett 検定を行い、control 群と BPA 群、control 群と BPF 群を比較した。全ての検定において、 $p < 0.05$ を有意差ありとし、全ての結果は mean \pm S.E. で記した。

3. 結果

妊娠後期 (GD11.5 - 18.5) にオリーブオイル、BPA、BPF をそれぞれ曝露された群の同腹子の数と性比を表 6 に記した。これらには有意差は認められず、BPF には今回の投与量では出生に関わる甚大な影響がないことがわかった。

表 6 : 各群の同腹子の数と性比 (雄/雌)

	Number	Sex ratio(male/female)
Control	7.17 \pm 0.79	1.38 \pm 0.54
BPA	7.50 \pm 0.34	1.37 \pm 0.37
BPF	8.50 \pm 0.67	1.09 \pm 0.19

Control 群 (雄 n=23、雌 n=20)。BPA 群 (雄 n=24、雌 n=21)。BPF 群 (雄 n=26、雌 n=25)。(mean \pm S.E.)

1) オープンフィールド試験の結果

総移動距離において有意差は認められなかった (図 18A)。また、立ち上がり回数や毛づくろいの回数においても雄雌ともに有意差は認められなかったが、雌では体を伸ばして周囲をうかがう stretching の回数が BPA 群及び BPF 群で認められた (BPA, $p < 0.05$; BPF, $p < 0.05$; 表 7)。中心滞在時間の結果において、control 群で雌は雄より長く滞在し、性的二形の行動パターンを示しているが、雌において BPA 投与で滞在

時間が有意に減少し ($p<0.05$)、BPF 投与では更に減少しており ($p<0.01$)、性的二形の行動パターンが消失することがわかった (図 18B)。

表 7 : オープンフィールド試験における各種行動の回数

	Control		BPA		BPF	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Rearing	64.39±4.89	52.2±5.87	71.65±4.55	51.24±4.07	65.07±3.94	58.12±2.85
Grooming	4.57±0.71	3.75±0.40	4.04±0.51	4.29±0.44	4.37±0.51	3.42±0.35
Stretching	3.00±0.55	1.70±0.46	2.26±0.38	3.29±0.48 ^{a)}	2.15±0.41	3.17±0.53 ^{b)}

Control 群 (雄 n=23、雌 n=20)。BPA 群 (雄 n=23、雌 n=21)。BPF 群 (雄 n=26、雌 n=24)。(mean ± S.E.)

a) control と BPA を比較して $p<0.05$ で有意差を示したものを表す。

b) control と BPF を比較して $p<0.05$ で有意差を示したものを表す。

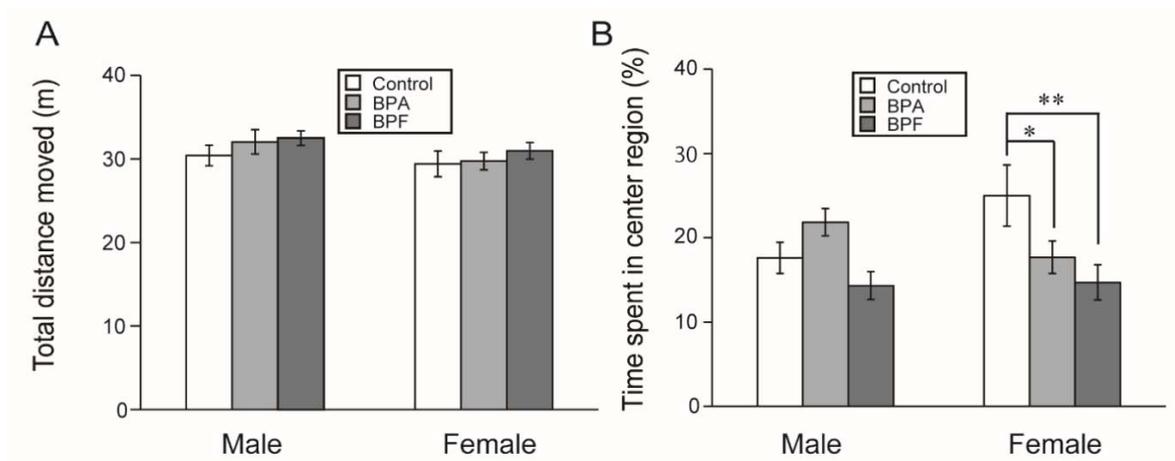


図 18 : オープンフィールド試験の総移動距離及び中心滞在時間の結果

10 分間の試験時間での (A) 移動距離の総和、(B) 中心滞在時間の割合。Control 群 (雄 n=23、雌 n=20)。BPA 群 (雄 n=23、雌 n=21)。BPF 群 (雄 n=26、雌 n=24)。(mean ± S.E.)

* control と比較して $p<0.05$ で有意差を示したものを表す。

**control と比較して $p<0.01$ で有意差を示したものを表す。

2) 高架式十字迷路試験の結果

総移動距離に有意な変化は認められなかった (図 19A)。各種アームでの滞在時間は control 群で典型的な性的二形を示していた (図 19A 及び B)。雄において、BPA 及び BPF 投与による滞在時間の有意な変化は認められなかったが、open arm 滞在時間と closed arm 滞在時間を群内で比較すると、BPA 群では有意に差が開き ($p<0.05$)、BPF 群では更に差が開いていた ($p<0.01$, 図 19B)。一方、雌では、BPF 投与により open arm 滞在時間が有意に減少し ($p<0.05$)、closed arm 滞在時間が有意に増加していた ($p<0.01$, 図 19C)。加えて、群内で各種アームの滞在時間を比較すると、BPA 群で有意な差が認められたが ($p<0.05$)、BPF 群では更に差が大きくなることがわかった ($p<0.01$, 図 19C)。また、雌では各種アームの進入回数の結果においても、BPF 投与で open arm への進入回数が有意に減少し ($p<0.01$)、closed arm 進入回数が有意に増加していた ($p<0.05$, 図 20B)。群内で各種アームの進入回数を比較すると、BPA 群で有意な差が認められるが ($p<0.05$)、BPF 群ではその差が更に広がっていた ($p<0.01$, 図 20B)。これらの結果は、BPA 群でも観察される不安様行動の増加と性的二形の行動パターンの消失が、BPF 群では更に強く現れることを示している。

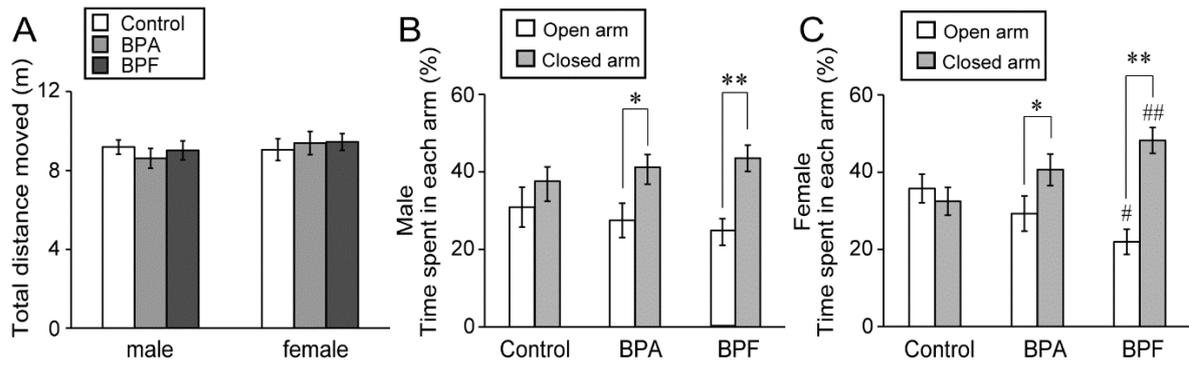


図 19：高架式十字迷路試験における総移動距離と各種アームでの滞在時間の結果
 高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの (A) 移動距離の総和 (m)、
 (B) 雄の各種アーム滞在時間の全試験時間に対する割合 (%)、(C) 雌の各種アーム
 滞在時間の全試験時間に対する割合 (%)。Control 群 (雄 n=16、雌 n=17)。BPA
 群 (雄 n=18、雌 n=18)。BPF 群 (雄 n=21、雌 n=22)。(mean ± S.E.)

#control と比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

##control と比較して $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

*open arm と closed arm を比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

**open arm と closed arm を比較して $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

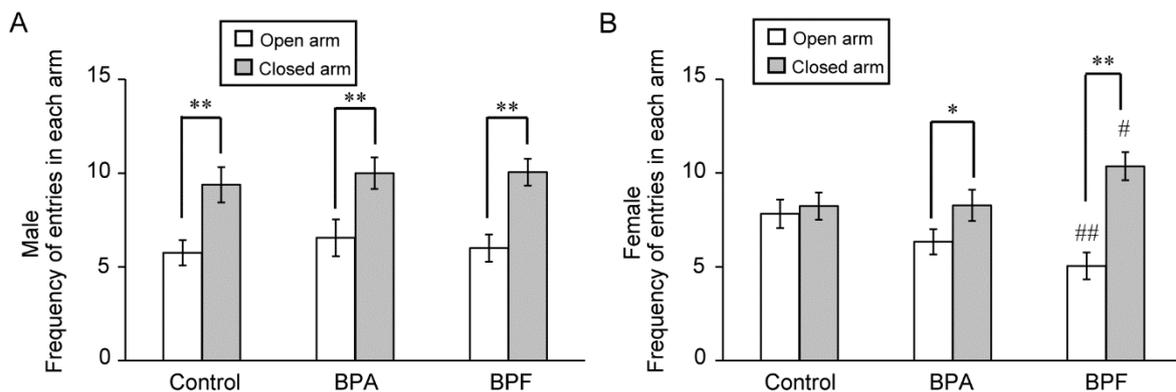


図 20：高架式十字迷路試験の各種アームへの進入回数の結果

高架式十字迷路でマウスに 5 分間自由行動させたときの各種アームへの進入回数。

(A) 雄の結果、(B) 雌の結果。Control 群 (雄 n=16、雌 n=17)。BPA 群 (雄 n=18、雌 n=18)。BPF 群 (雄 n=21、雌 n=22)。(mean ± S.E.)

#control と比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

##control と比較して $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

*open arm と closed arm を比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

**open arm と closed arm を比較して $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

3) 強制水泳試験の結果

6 分間で不動だった時間の総和を不動時間とし比較を行った結果、雌において BPF 群では control 群と比べ有意に不動時間が増加していることがわかった ($p < 0.05$, 図 21)。雄においても、有意差はでなかったものの、BPF 群では control 群と比較すると不動時間が増加していた (図 21)。BPA 群では雄雌ともに変化はなかった。また、0.5 分毎に不動時間を解析したところ、BPF 群の雄雌ともに、試験開始から早い時間で不動時間の有意な増加が認められた (図 22)。雄で 2.5~3 分に有意な増加が認められ ($p < 0.05$, 図 22A)、雌では 1~1.5 分 ($p < 0.05$)、1.5~2 分 ($p < 0.05$)、2~2.5 分 ($p < 0.01$) 及び 4.5~5 分 ($p < 0.05$) で有意な増加が認められた (図 22B)。これらの結果は、BPA 曝露ではうつ様行動は影響を受けないのに対し、BPF 曝露ではうつ様行動をもたらす作用があることを示している。

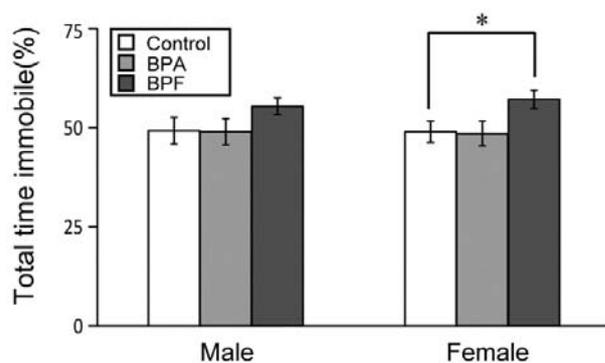


図 21：強制水泳試験の総不動時間の結果

強制水泳試験で全試験時間（6分）に対する総不動時間の割合(%)。Control 群（雄 n=23、雌 n=20）。BPA 群（雄 n=24、雌 n=21）。BPF 群（雄 n=26、雌 n=25）。

(mean ± S.E.)

* control と比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

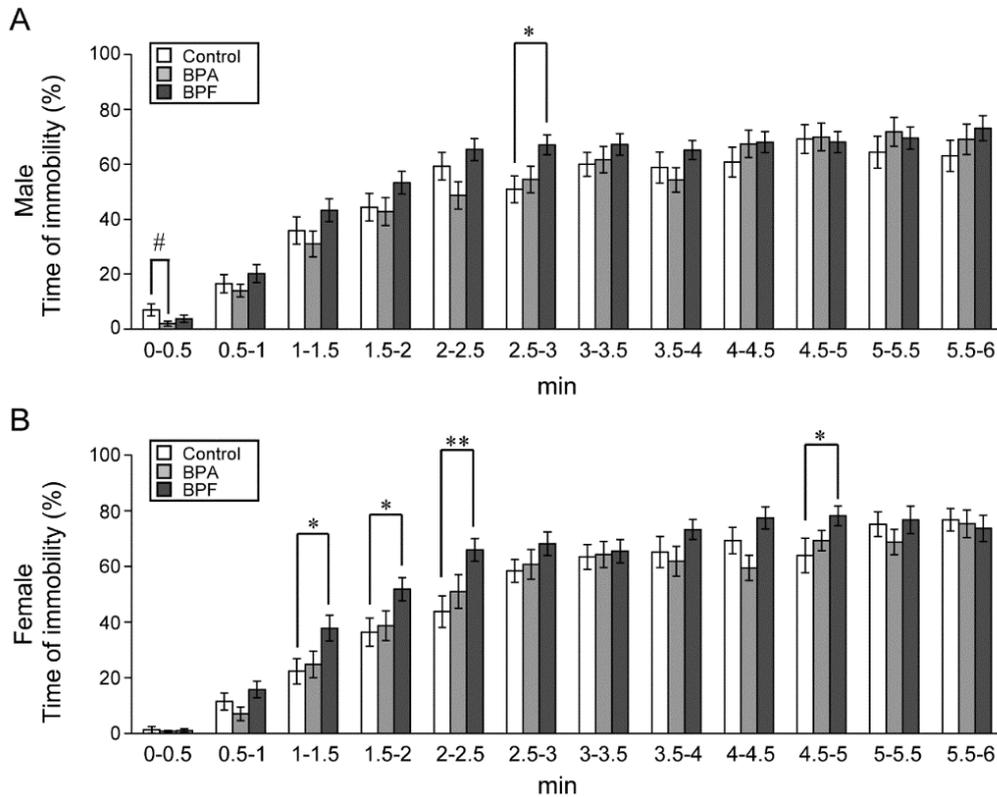


図 22：強制水泳試験の 0.5 分毎の不動時間

強制水泳試験 6 分間の結果を 0.5 分毎に再解析し、0.5 分間での不動時間の割合 (%) を求めた。Control 群 (雄 n=23、雌 n=20)。BPA 群 (雄 n=24、雌 n=21)。BPF 群 (雄 n=26、雌 n=25)。(mean ± S.E.)

* control と BPF を比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

**control と BPF を比較して $p < 0.01$ で有意差を示したものを表す。

#control と BPA を比較して $p < 0.05$ で有意差を示したものを表す。

4. 考察

本章ではこれまで知られていなかった妊娠期 BPF 曝露による次世代行動影響を評価し、BPF が BPA 同様の影響を及ぼす可能性がないかを調べた。GD11.5 から GD18.5 に経口投与して生まれた子供が PW10 になった時点でオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験で不安様行動を、強制水泳試験でうつ様行動を調べた。BPF による同腹子数や性比に顕著な変化はなかった (表 6)。

実施した全ての試験において、BPF 群は次世代の行動に顕著な変化が現れた。雄はもとより雌と比べて強い不安様行動を示すことが報告されているが、その典型的な性的二形の行動パターンは control 群で見られた (図 18、図 19 及び図 20)。BPF 群では不安様行動の増加により control 群で確認されていた性的二形の行動パターンが消失し、加えて、BPA 曝露による不安様行動の増加よりも影響が強くなることがわかった。更に、BPA 群ではみられなかったうつ様行動が BPF 群では認められた (図 21)。BPF は BPA の代替品として世界中でその使用が増加しているが、これらの発見は、BPF が BPA よりも強く胎仔に悪影響を及ぼす可能性があることを示している。

本章で BPA 及び BPF を投与した期間は妊娠後期であり、この妊娠後期から新生児期は脳の機能的発達が著しい重要な時期である [62, 105, 106]。第一章の考察で述べたように、性腺ステロイドは脳の性的二形を形成する際に重要な役割があり [2, 43, 83]、BPA はエストロゲン作用により脳の性的二形を示す領域 (前腹側室周囲核や青斑核など) へ影響を及ぼし、不安様行動の性的二形パターンの消失をもたらすのではないかと考えられる。興味深いことに、BPF は BPA よりも 100 分の 1 程度のエストロゲン作用しか持たないにも関わらず [45, 81, 86, 88]、BPF 曝露による行動影響は BPA 曝露よりも強く現れていた。この顕著な影響をエストロゲン作用だけで考えるならば、BPF が胎盤を通過し胎仔に移行する量が BPA よりも顕著に多い可能性がある。しかし、エストロゲン作用以外の要因として、BPF によるプロジェステロン生成の増加作用が挙げられる [88]。この作用は BPA には認められない作用である。プロジェステロンは、中枢神経系のプロジェステロン受容体によって媒介される神経内分泌機能を調節し、性的分化にも役割を果たすことがわかっている [61, 82, 103]。このことから、BPF のプロジェステロン増加作用が脳内の性ホルモンのバランスを崩し、性的二形の形成を崩す可能性があると考えられる。しかし、BPF やその他 BPA 代替品においても、*in vivo* でのホルモン作用についてほとんど報告がないため、更なる研究が必要である。

ホルモン作用以外で着目すると、BPFによる脳への影響の報告として、雌ラットの前頭前野においてBPFがドーパミンセロトニン系に関連する複数の遺伝子発現を変化させることが報告されている[13]。ドーパミンとセロトニンは精神障害に関連していることが知られており[71]、これらの遺伝子発現の変化が本研究で示した行動影響をもたらした可能性がある。また、近年、妊娠期BPA曝露は遺伝子発現の調節において重要な役割を果たすDNAメチル化などのエピジェネティックな調節を乱すのではないかとされているが[21, 34, 95, 109]、BPFはまだエピジェネティクスとの関連は調査されていない。このように、BPFの影響のメカニズムには、エストロゲン作用以外の要因が関わる可能性があり、BPFやその他BPA代替品の安全性をエストロゲン作用だけで判断することができないのは明らかである。

BPAの代謝は主に肝臓のUGTによって行われ[112]、BPFもまたUGTによって代謝されることが報告されている[23]。UGTは、げっ歯類およびヒトの胎児では弱く発現しており[44, 63, 72]、胎児の年齢とともに徐々に活性レベルが上昇するため、胎児は成人よりもBPAおよびBPFに対して感受性が高いと考えられる。妊娠期間が長いヒトでは、日々の曝露量が少なくてもBPFに曝される期間が長いと考えられるため、胎児が影響を受ける可能性は充分にあると考えられる。今後BPFがヒトに及ぼす影響を明らかにするために、今回示した行動影響以外の影響や曝露量による影響の差などを詳しく調査していく必要がある。

5. 小活

本章では妊娠中のBPF曝露が次世代の行動に悪影響を及ぼすことを初めて明らかにした。さらに、BPFの悪影響はBPAのものよりも強いことがわかった。本報告は、BPFの影響を理解するための重要な発見を示したものである。世界中でBPFの使用は増加しているが、BPAの代替としてBPFの安全性を決定するためには今後より多くの調査が必要である。

第IV章 妊娠後期ラットにおける BPF 代謝物の胎仔移行

1. 序文

妊娠期 BPA 曝露が胎仔に影響を及ぼすことはこれまで多く報告されてきており、その一つである行動影響について、第一章で妊娠後期の BPA 曝露がもっとも胎仔に行動影響を及ぼしやすいことを示した。興味深いのは、BPA は成熟した個体では速やかに代謝し排泄する機能が整っているにも関わらず[40, 51, 100, 112]、胎仔に影響を及ぼすという点である。

注目したいのは、ラットにおいて、BPA の代謝システムが雄と雌で異なっていること、また非妊娠雌と妊娠雌で代謝が異なることである (図 24) [39]。通常、ラットの BPA の代謝は主に肝臓の UGT2B1 によるグルクロン酸抱合である[112]。雄では一部は硫酸抱合も受けて BPA グルクロン酸/硫酸抱合体 (BPA-GA/S) となるが雌では BPA-GA のみであり、これら抱合体の排泄は主に胆汁中である[38]。しかし、雌は妊娠すると BPA-GA の胆汁排泄が減少し、静脈血中に排泄されるようになる[39]。BPA-GA はMRP2を介して胆汁中に排出されるが、妊娠時にはMRP2の発現が減少し[12]、代償として静脈中への排出が増加するからである。BPA-GA はエストロゲン作用が消失し不活性の物質となるが[65]、BPA-GA はわずかではあるが、胎盤を通過し胎仔へ移行し、移行した BPA-GA が胎仔側で脱抱合をうけて再び BPA となり、胎仔に悪影響を及ぼすのではないかと考えられている (図 23) [72]。このため BPA-GA の母親の静脈中濃度上昇は、BPA-GA の胎盤通過のリスクを高めていると考えられる。

ラットにおいて、BPF は、雌雄差はあるものの、グルクロン酸抱合体 (BPF-glucuronide, BPF-GA) と BPF グルクロン酸/硫酸抱合体 (BPF-glucuronide/sulfate, BPF-GA/S) の両方に代謝される (図 24) [111]。雌は非妊娠時では静脈中に BPF-GA/S は検出されないが、妊娠により BPF-GA と BPF-GA/S の胆汁排泄が少なくなり、静脈血中への排泄が増え、BPF-GA/S も静脈血中に検出されるようになる (図 24)。BPF

抱合体も BPA 抱合体と同様に MRP2 により胆汁排泄されているため[69]、妊娠期になり MRP2 の発現が減少することで、非妊娠期と妊娠期で代謝物の動態が異なると考えられる。これらのことを踏まえ、BPA-GA が胎盤を通過するのと同様に、BPF の代謝物も胎盤を通過して胎仔に移行する可能性があると考えた。

BPF の持つエストロゲン作用は BPA と比較して 100 分の 1 程度の弱さにも関わらず[45, 81, 86, 88]、第三章で示したように次世代の行動に BPA よりも強く影響を及ぼしている。この要因の一つとして、代謝物の違いにより胎盤の通過しやすさが異なる可能性があり、本章では BPF の代謝物を子宮に灌流し、胎盤の通過性の比較を行った。

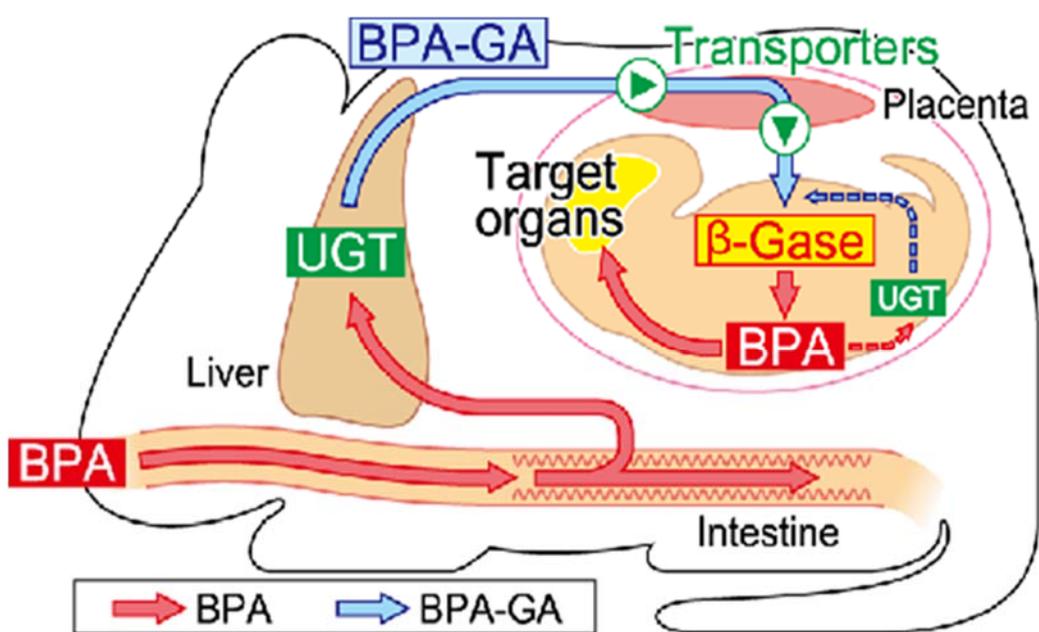


図 23 : BPA-GA の胎盤通過と胎仔内での再活性化

胎盤の何らかのトランスポーターを介して胎仔へ移動した BPA-GA は β -glucuronidase により BPA に再活性化されるが、胎仔には BPA をグルクロン酸抱合する UGT の発現が低く、BPA のまま胎仔に蓄積する可能性がある。図は Nishikawa ら (2010) から引用した[72]。

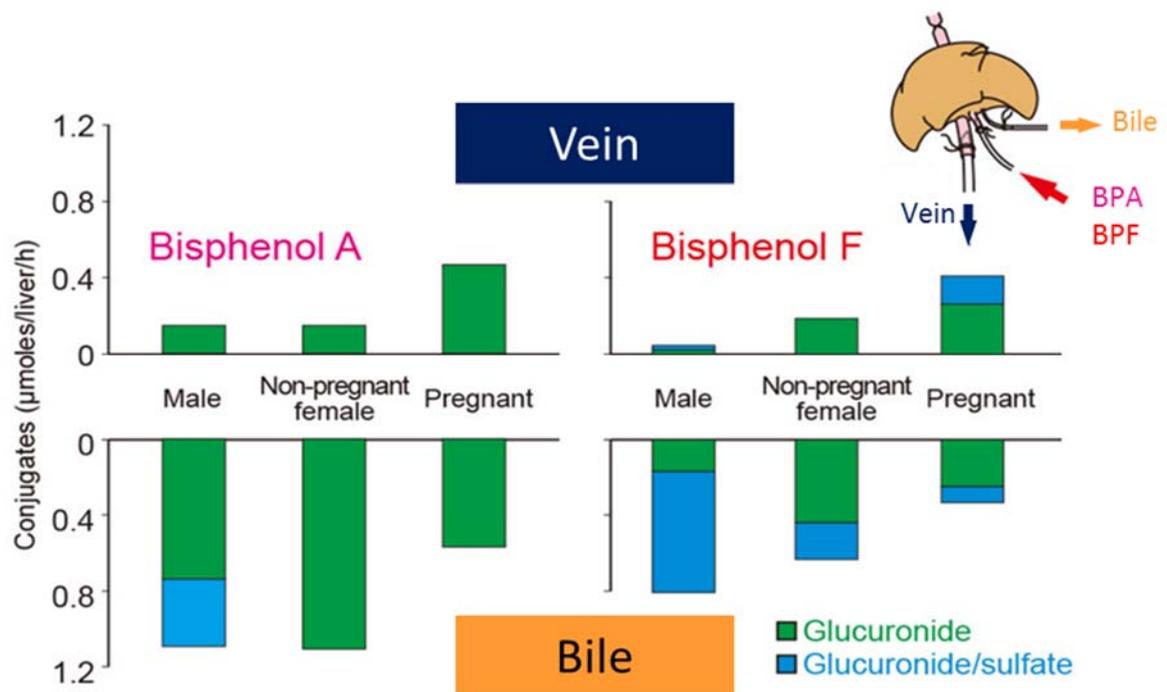


図 24 : BPA と BPF の雄、非妊娠雌、妊娠雌での代謝の違い

肝臓を通過した灌流液を静脈・胆汁から回収した結果、妊娠雌での BPF の代謝は、BPF-GA/S が静脈中に排泄されるようになるという、特徴的な動態を示している。図は Inoue ら (2005) [39], 藪崎梨沙 (2015) [111] を改変した。

2. 材料と方法

1) 試薬

BPF は関東化学より購入し、少量のエタノールに溶解して使用した。その他使用した試薬は全て生化学実験用、または純度の高いものを用いた。

2) 共試動物

各種 BPF 抱合体 (BPF-GA、BPF 硫酸抱合体[BPF-sulfate, BPF-S]、BPF-GA/S) を調製するために、肝灌流実験を行ったが、この実験には三協ラボサービスから購入した 15 週齢雄 SD ラット 30 匹を使用した。次に、調製した各種 BPF 抱合体を用い

た子宮灌流実験を行ったが、この実験には三協ラボサービスから購入した妊娠雌 SD ラット 20 匹を使用し、灌流実験は GD18 で行った。実験まで自由採食 (CE-2、日本クレア)、自由飲水で、温度 (22 ± 2 °C)、湿度 ($50 \pm 5\%$)、12 時間明 (7:00-19:00) -12 時間暗 (19:00-7:00) サイクルの条件下で飼育した。全ての動物実験はペントバルビタール (ソムノペンチル、共立製薬、東京) 及びイソフルラン (DS ファーマアニマルヘルス、大阪) による麻酔下で実施し、酪農学園大学動物実験委員会に承認された方法で (VH15A3) 行った。

3) 肝灌流

3) -a 灌流液の調整

灌流液は、Krebs-Ringer-Buffer (115 mM NaCl 、 5.9 mM KCl 、 1.2 mM MgCl_2 、 $1.2 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_2$ 、 $1.2 \text{ mM Na}_2\text{SO}_4$ 、 2.5 mM CaCl_2 、 25 mM NaHCO_3 、 10 mM Glucose) を使用した。直前に、 $95\% \text{ O}_2 + 5\% \text{ CO}_2$ で通気し、pH を 7.4 に合わせた。灌流液は 37°C に加温した。

3) -b 肝灌流外科手術

実験模式図を図 25 に記した[40]。ラットはソムノペンチルと 2.5~3.0% イソフルランで麻酔導入し、1.5% で維持しながら手術した。血液凝固阻止のため、大腿動脈を露出し、ヘパリン(持田製薬、東京)を静脈注射した。腹部を切開し、胆管、肝門脈、後大静脈を露出後、それぞれにカニューレを挿入した。10 μM BPF に調整した灌流液をポンプ (MP-32N、東京理化学器械、東京) を使用し 30 mL/分で肝門脈から流入させた。肝臓の灌流は 60 分間行い、その間に生成した胆汁を回収した。後大静脈に流出した灌流液は廃棄した。回収した胆汁はフロンティア研究所 (石狩市) に委託し、BPF-S、BPF-GA、BPF-GA/S を精製した。

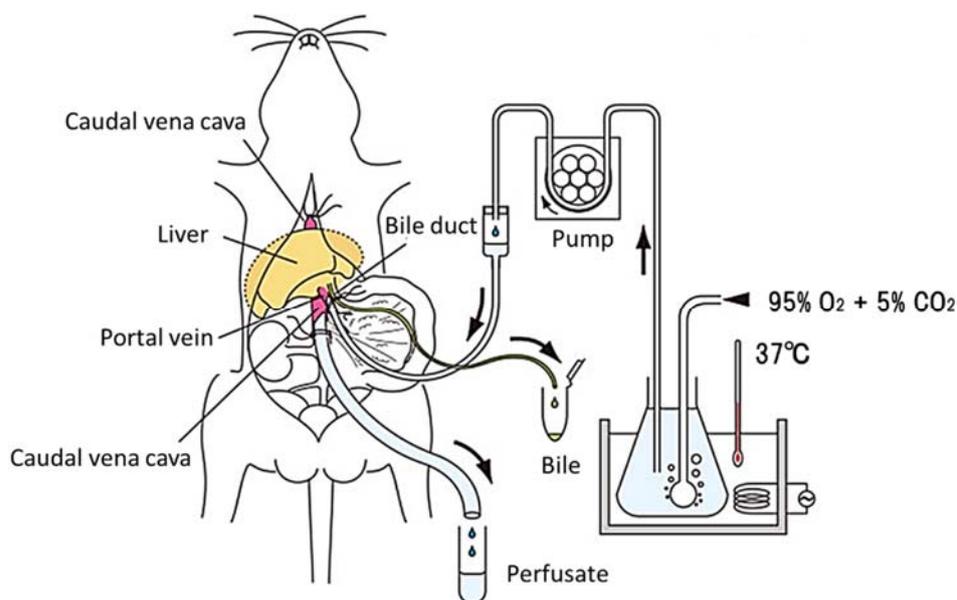


図 25：肝灌流実験模式図

灌流液の流れを矢印で示した。灌流液は門脈から流入し、肝臓を通過した後、静脈側へ流出した。得られた胆汁から BPF 抱合体を精製した。図は Inoue ら (2001) から引用した[40]。

4) 子宮灌流

4) -a 灌流液の調整

灌流液は、modified Krebs-Ringer's buffer (mKRB; 126 mM NaCl、3 mM KCl、1.2 mM KH_2PO_4 、1.3 mM MgSO_4 、2.4 mM CaCl_2 、10 mM glucose、26 mM NaHCO_3 、2.5% Dextran 10、3% Dextran 70) を使用した。灌流液は 95% O_2 + 5% CO_2 で通気し、pH を 7.4 に合わせた。抱合体入りの灌流液はそれぞれの BPF 抱合体を 10 μM になるように調整した。各灌流液は、37℃に加温した。

4) -b 子宮灌流外科手術

実験模式図を図 26 に示した[72]。ラットはソムノペンチルと 2.5~3.0%イソフルランで麻酔導入し、1.5%で維持しながら手術した。血液凝固の阻止のため、大腿動脈を露出し、ヘパリンを静脈注射した。腹部を切開し、子宮、腹大動脈、後大静脈を露

出し、腹大動脈から分枝し、右卵巣動脈に到達するまでの血管の分岐を全て結紮した。その後、腹大動脈の前腸間膜動脈分岐部直後を結紮し、直ちに腹大動脈にカニューレションを挿入した後、ポンプ（MP-32N、東京理化学器械）を使用して、灌流液を 3 mL/分の速度で流入させた。後大静脈に別のカニューレを挿入し、子宮を流れた灌流液を回収できるようにした。右子宮角の頭側より 1 仔目と 2 仔目の間を木綿糸にて強く結紮した。灌流液は、腹大動脈から、右卵巣動脈を介して、右子宮角の 1 仔目の胎盤を流れ、後大静脈から出てきたものを回収した。

抱合体を含まない灌流液を 5 分間流した後、10 μ M の各種 BPF 抱合体（BPF-S、BPF-GA、BPF-GA/S）を含む灌流液をそれぞれ 20 分間流し、再度、抱合体を含まない灌流液に戻して 70 分間流した。静脈から出てくる灌流液は、抱合体を流入させる 5 分前に回収を始め、その後、抱合体流入開始直後を 0 分として、90 分間、5 分間ごとに回収した。90 分間の灌流実験の後、胎仔・胎盤・羊水・羊膜を採材した（図 27A）。実験数は、BPF-S が n=3、BPF-GA が n=4、BPF-GA/S が n=3 となった。この結果をうけて、胎仔側に移行した抱合体の胎盤における BPF-S の動きをより明らかとする目的で、抱合体を加えた灌流液を 20 分間流した直後に胎仔・胎盤・羊水・羊膜の各組織を採材した（図 27B）。実験数は、BPF-S が n=4、BPF-GA/S が n=3 となった。

4) -c 静脈側灌流液の処理

静脈側灌流液に 4 倍量のアセトニトリルを加え、13420 \times g で 3 分間遠心分離した後、上清を等量の超純水で希釈した。希釈液は分析まで-20 $^{\circ}$ C で保管した。

4) -d 採材した組織の処理

各組織に 4 mL のアセトニトリルを加え、ヒスコトロン（日音医理工器器械製作所、東京）によってホモジナイズし、さらに BIORUPTOR（コスモ・バイオ、東京）によって 10 分間ソニケーションを行った。これを 11500 \times g で 5 分間遠心分離し、上清を回収した。アセトニトリル濃度が 5%以下になるように水を加えて希釈後、OASIS HLB（Waters Co.、米国）に通水し、カラム内に捕集させた。1 mL のアセトニトリ

ルを用いて、固相抽出カラムから溶出された溶液をガラスバイアルに集めた。これを N₂ ガス下でドライアップした後、20%アセトニトリル溶液 200 μl を加え、完全に溶解した。この液を被検液として分析まで-20 °Cで保管した。

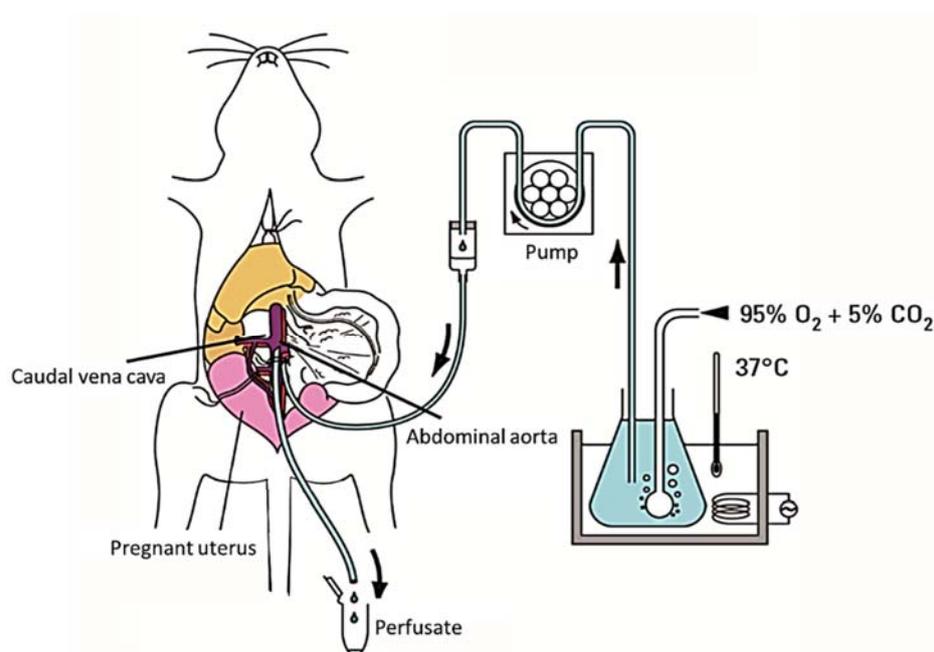


図 26 : 子宮灌流実験模式図

灌流液の流れを矢印で示した。灌流液は腹大動脈から流入し、右側頭側の胎盤を通過して後大静脈から出てきたものを回収し、また胎仔、胎盤、羊水、羊膜を採材した。図は Nishikawa ら (2010) から引用した[72]。

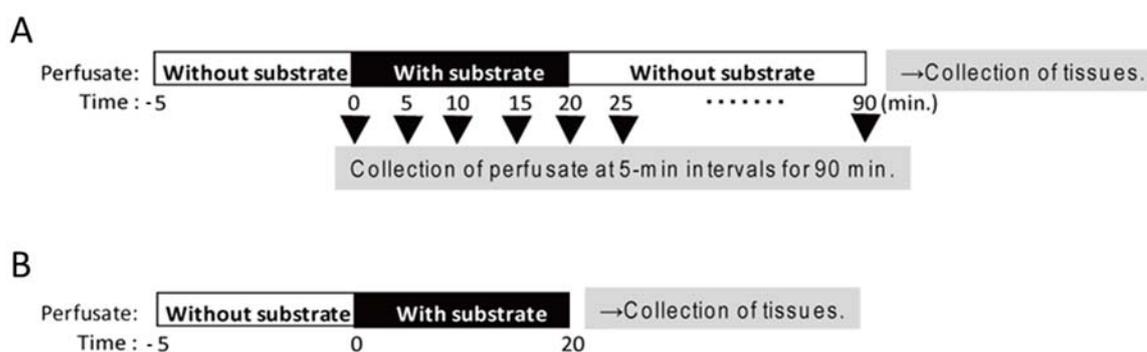


図 27：子宮灌流試験のプロトコル

(A) 90 分灌流のプロトコル。(B) 20 分灌流のプロトコル。図は Nishikawa ら (2010) を改変した[72]。

5) LC-MS/MS による分析

高速液体クロマトグラフィシステム (Prominence、株式会社島津製作所、京都) と、タンデム型質量分析装置 (LC-8030、株式会社島津製作所) を用いて分析した。移動相は A 液：メタノール/水/酢酸アンモニウム (5/95/0.06、v/v/w) と B 液：100%メタノール溶液を用いた。A 液/B 液 (90/10) で 3 分間流した後、2.5 分で B 液 100%に置きかわるリニアグラジエントを行い、さらに B 液 100%で 3 分間維持する分離条件とした。移動相は 0.3 mL/min で送液した。40°Cに加熱した逆相カラム (Unison UK-C18, 内径 2 mm x 長さ 100 mm、株式会社インタクト、京都) を用いてサンプルを分離した。質量分析はエレクトロスプレーイオン化 (ESI)-ネガティブモードで行い、表 8 に記載の条件にて目的イオンを検出した。なお、印加電圧は-3.0 kV、霧化ガス流量 3.0 L/min、乾燥ガス流量 10.0 L/min、インターフェース温度 250 °C、ヒートブロック温度 400 °Cとした。

各代謝物のピークをインテグレーションソフトウェア (LC-8020、東ソー株式会社、東京) で定量し、BPF ならびに BPF 抱合体濃度を算出した。

表 8 BPF および BPF 抱合体の分析条件

化合物名	プレカーサー m/z	プロダクト m/z	CE (V)
BPF	199	77	28
BPF-GA	375	199	33
BPF-S	280	200	35
BPF-GA/S	455	199	45

3. 結果

1) 子宮灌流実験における各種抱合体の回収率

肝臓での代謝反応の違いが、胎盤通過率を左右すると考え、BPF-S、BPF-GA/S および BPF-GA の各種抱合体をそれぞれ子宮灌流実験において腹大動脈から灌流した。まず、抱合体の入った灌流液を子宮に 20 分灌流し、その後抱合体が入っていない灌流液を 70 分間灌流する実験を行った (図 27A)。子宮を流れ終わり腹大静脈から出てきた灌流液を経時的に採取し、回収灌流液中の抱合体の量を分析した結果を図 28 に示した。20 分間に流した各種抱合体の総量は 600 nmol であり、経時的に得た各サンプルの灌流液中濃度×5 分で積分して得られた結果を回収した総量とし、100 分率で回収率を計算した。その結果、BPF-S を子宮灌流した場合の回収率は 86.2% (図 28A)、BPF-GA/S の場合 83.6% (図 28B)、BPF-GA の場合 87.6% (図 28C) であり、ほぼ同等であった。

全ての灌流結果において、0 分から 20 分の間は 87~128 nmol/5min の範囲で回収した灌流液中に抱合体が検出されたが、20 分以降は急激に減少した。しかし、BPF-GA/S と BPF-GA で 50 分以降ほとんど検出されなくなるのに対し、BPF-S においては BPF-GA/S と BPF-GA の約 2~5 倍の検出量が続いており、子宮に長く留まっていたことが示唆された。

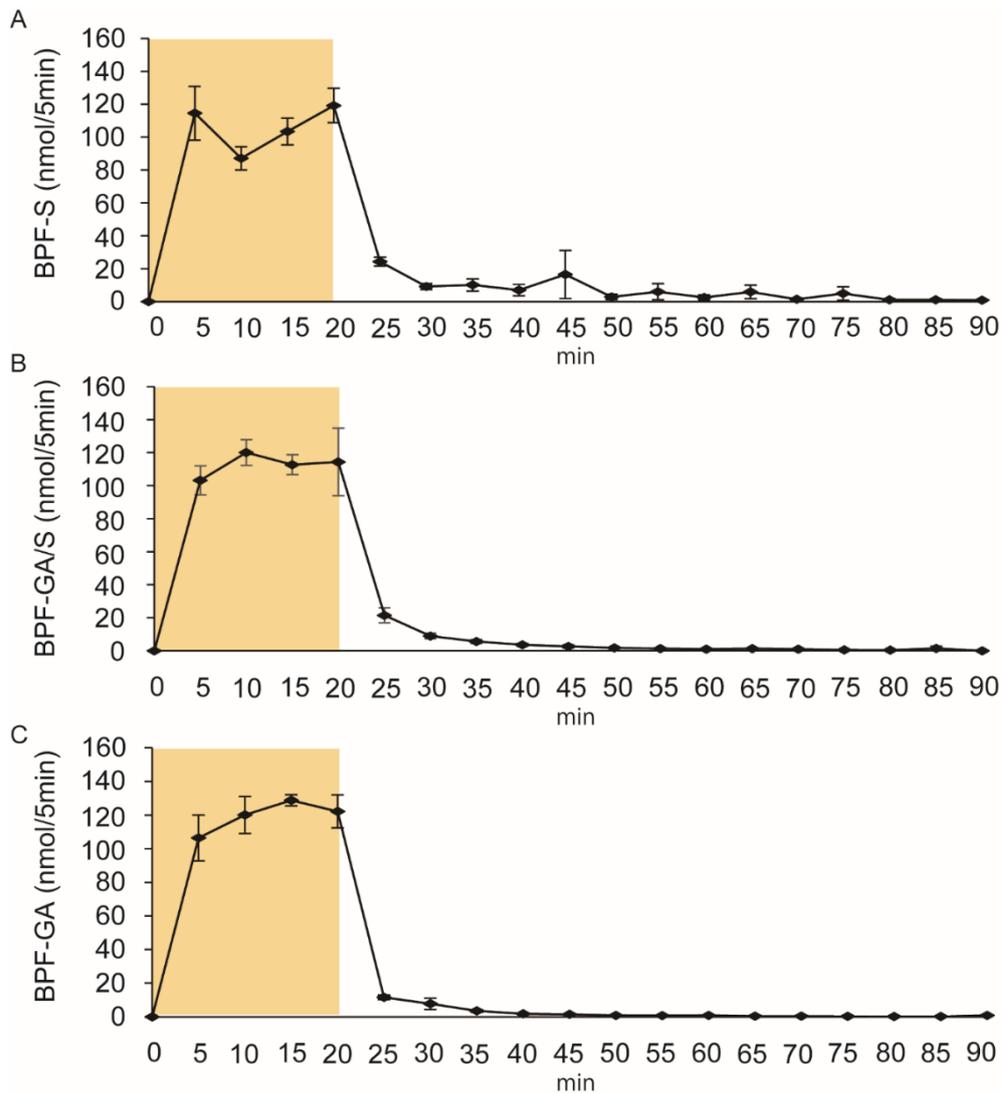


図 28 : 各種 BPF 抱合体子宮灌流における回収灌流液中の抱合体検出量の経時的変化

各種 BPF 抱合体を灌流し、後大静脈から経時的に回収した灌流液の抱合体の検出量。橙色の時間帯（0 分～20 分）は、各種抱合体を含む灌流液を送液した時間帯を示している。縦軸は回収灌流液中の各種抱合体の濃度を示し、横軸は灌流開始後の時間を示す。(A) BPF-S の子宮灌流の結果。回収率は 86.2%。(B) BPF-GA/S の子宮灌流の結果。回収率は 83.6%。(C) BPF-GA の子宮灌流の結果。回収率は 87.6%。BPF-S が n=3、BPF-GA が n=4、BPF-GA/S が n=3。(mean ± S.E.)

2) 子宮灌流 90 分後における各種抱合体の胎仔組織内の検出

抱合体が胎盤を通過し、胎仔側へ移行しているかどうかを検討するため、90 分の子宮灌流後、羊水・胎盤・羊膜・胎仔を採材し、組織内に含まれる抱合体を分析した。また、脱抱合をうけ BPF となっている可能性を考え BPF も分析した。BPF-S を灌流した結果、検出された抱合体は BPF-S のみであり、羊水から 0.0076 pmol、胎盤から 24 pmol、羊膜から 4.5 pmol、胎仔から 1,940 pmol の BPF-S が検出された (図 29A)。BPF-GA/S を灌流した結果、検出された抱合体は BPF-S のみであり BPF-GA/S は検出されなかった。BPF-S は羊水から 0.06 pmol、胎盤から 32 pmol、羊膜から 0.6 pmol、胎仔から 0.46 pmol 検出した (図 29B)。BPF-GA を灌流した結果、検出された抱合体は BPF-S 及び BPF-GA であり、胎仔から 0.09 pmol の BPF-S 及び 16 pmol の BPF-GA が検出された (図 29C)。全ての組織において BPF は検出されなかった。以上の結果より、BPF-S は最も胎仔に移行しやすいことがわかった。また、BPF-GA/S はグルクロン酸抱合がとれた形で胎盤に多く検出されており、胎盤での脱グルクロン酸抱合反応が疑われた。

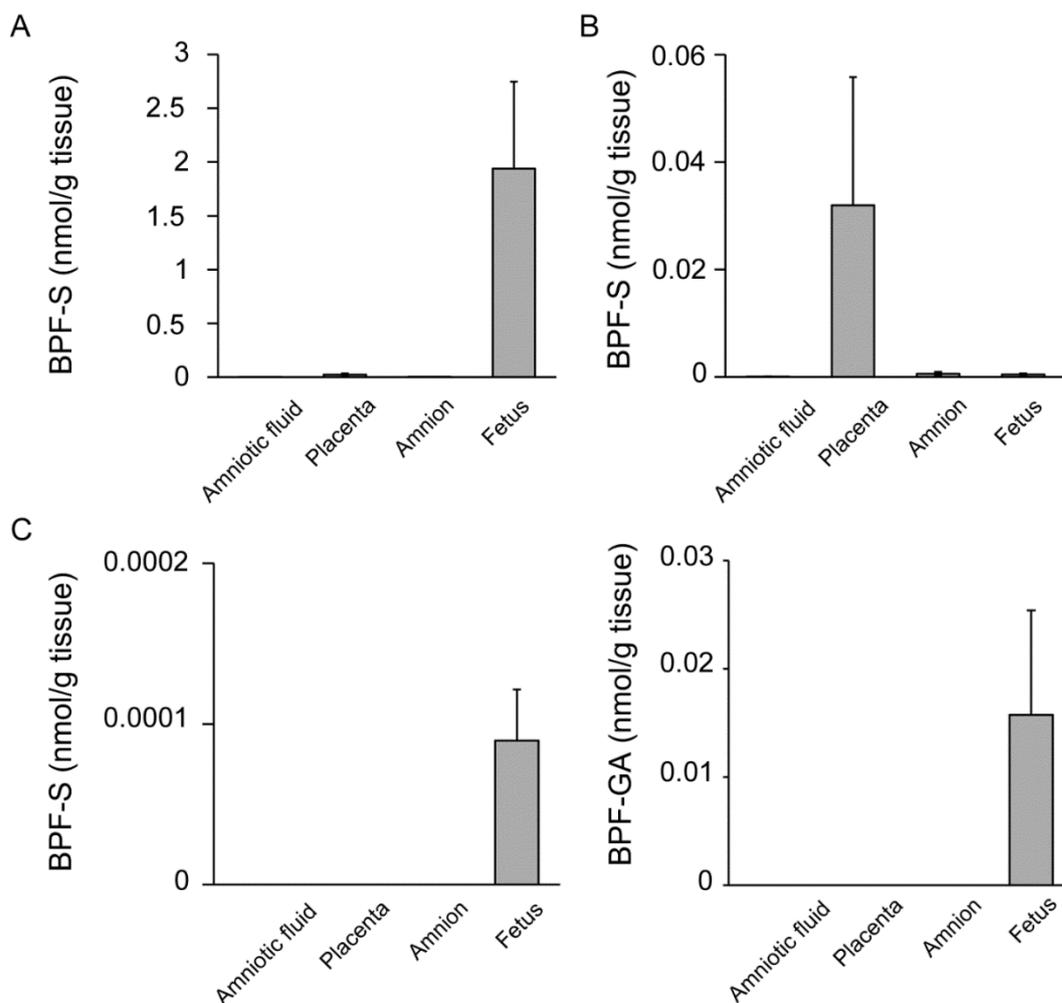


図 29 : 各種 BPF 抱合体の子宮灌流 90 分後の胎仔組織における抱合体の検出量

各種 BPF 抱合体を 20 分灌流し、その後抱合体を含まない灌流液を 70 分間子宮灌流した後に採取した羊水・胎盤・羊膜・胎仔中からの抱合体検出量。(A) BPF-S を子宮灌流した結果。BPF-S のみ検出された。(B) BPF-GA/S を子宮灌流した結果。BPF-GA/S のみ検出された。(C) BPF-GA を子宮灌流した結果。BPF-S 及び BPF-GA が検出された。BPF-S が n=3、BPF-GA が n=4、BPF-GA/S が n=3。(mean ± S.E.)

3) 子宮灌流 20 分後における各種抱合体及び BPF の胎仔組織内の検出

90 分の子宮灌流後に得た胎仔組織の分析結果から、胎仔に移行する過程において、抱合体が胎盤で脱抱合また抱合代謝を受けている可能性が考えられた。抱合体を 20 分間灌流した後、抱合体を含まない灌流液を 70 分間流している間にこのような反応が進んだと考え、次に、20 分間灌流した直後の胎仔組織を分析することで、胎盤通過時の動態を探ることにした。今回は BPF-S および BPF-GA/S のみ実験を行った。

BPF-S 及び BPF-GA/S 灌流結果を図 30 に示し、具体的な検出数値は BPF-S 灌流結果を表 9 に、BPF-GA/S 灌流結果を表 10 に記した。BPF-S の灌流の結果、BPF-GA/S が羊水で 3 pmol (図 30A)、BPF-GA が羊膜で 0.9 pmol (図 30B) とごくわずかに検出された。BPF-S が胎盤で 2,970 pmol 検出され、高い値を示した (図 30C)。興味深いことに、脱抱合された BPF が、羊水で 30 pmol、胎盤で 64 pmol、羊膜で 3 pmol、胎仔で 63 pmol 検出され (図 30D)、胎盤での脱抱合と BPF の胎仔移行が示唆された。BPF-GA/S の灌流の結果、BPF-GA/S が羊水で 15 pmol、胎盤で 3,040 pmol 検出され、胎盤に多く存在することがわかった (図 30E)。また、BPF-GA が胎盤で 0.6 pmol とごくわずかに検出され (図 30F)、BPF-S が胎盤で 79 pmol 検出された (図 30G)。これらは BPF-GA/S のグルクロン酸抱合または硫酸抱合が脱抱合した可能性がある。加えて、BPF においても、羊水で 21 pmol、胎盤で 8 pmol、羊膜で 42 pmol、胎仔で 4 pmol 検出されたが (図 30H)、BPF-S の灌流時と比べ低い値だった。

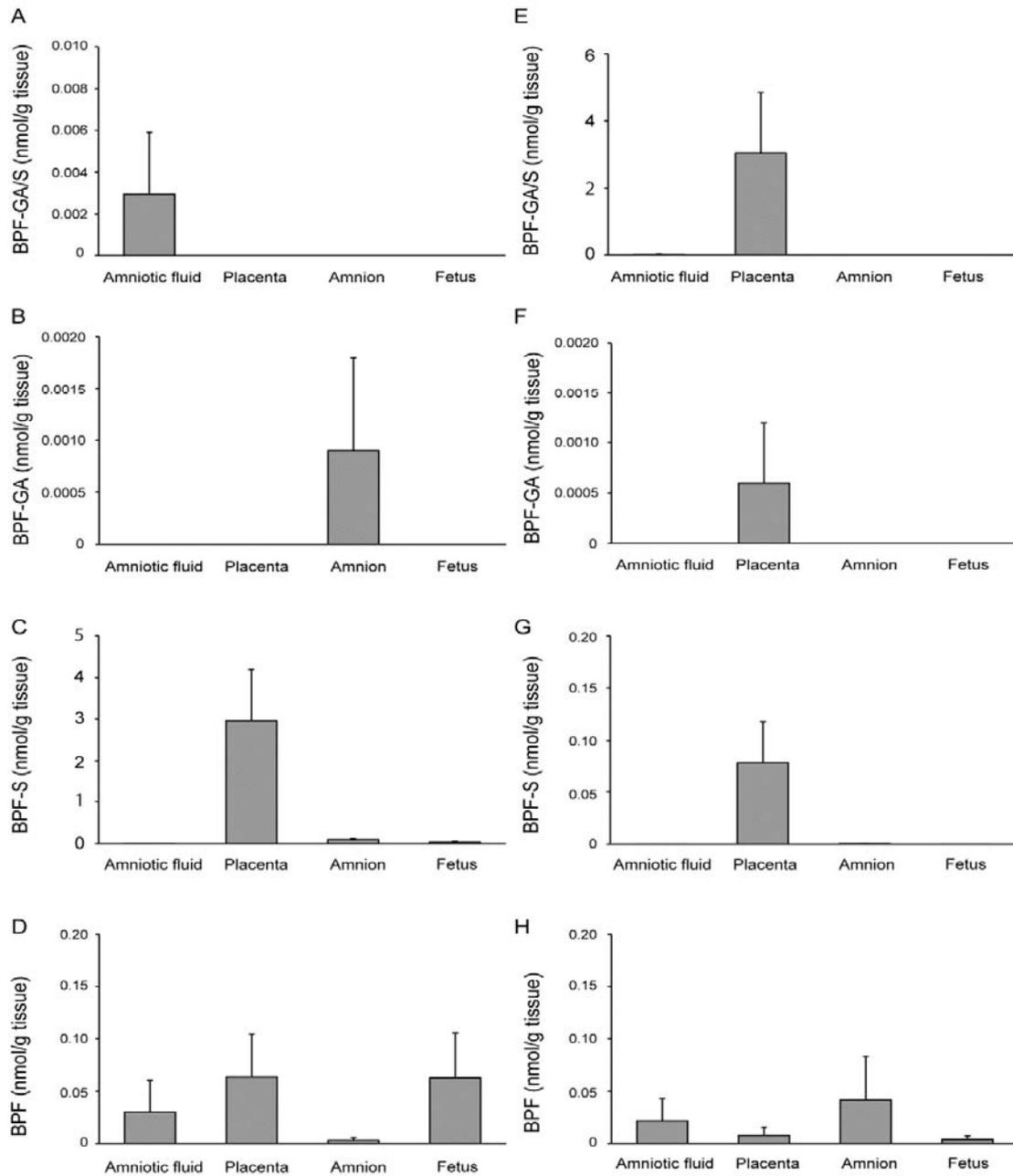


図 30 : BPF-S 及び BPF-GA/S 子宮灌流 20 分後の胎仔組織における各種 BPF 抱合体及び BPF の検出量

BPF-S と BPF-GA/S を 20 分灌流し採材した羊水・胎盤・羊膜・胎仔中からの各種 BPF 抱合体及び BPF 検出量。(A~D) BPF-S を子宮灌流した結果。(E~H) BPF-GA/S を子宮灌流した結果。(A, E) BPF-GA/S 検出量。(B, F) BPF-GA 検出量。(C, G) BPF-S 検出量。(D, H) BPF 検出量。BPF-S が n=4、BPF-GA/S が n=3。(mean ± S.E.)

表 9 : BPF-S 子宮灌流 20 分後の胎仔組織での検出量

	BPF-GA/S (nmol/g tissue)	BPF-GA (nmol/g tissue)	BPF-S (nmol/g tissue)	BPF (nmol/g tissue)
Amniotic fluid	0.003±0.003	N.D.	N.D.	0.03±0.03
Placenta	N.D.	N.D.	2.967±1.227	0.064±0.041
Amnion	N.D.	0.0009±0.0009	0.096±0.027	0.003±0.03
Fetus	N.D.	N.D.	0.036±0.021	0.063±0.043

BPF-S が n=4、BPF-GA/S が n=3。 (mean ± S.E.)

表 10 : BPF-GA/S 子宮灌流 20 分後の胎仔組織での検出量

	BPF-GA/S (nmol/g tissue)	BPF-GA (nmol/g tissue)	BPF-S (nmol/g tissue)	BPF (nmol/g tissue)
Amniotic fluid	0.015±0.015	N.D.	N.D.	0.021±0.021
Placenta	3.038±1.813	0.0006±0.0006	0.079±0.039	0.008±0.008
Amnion	N.D.	N.D.	0.0002±0.0002	0.042±0.042
Fetus	N.D.	N.D.	N.D.	0.004±0.004

BPF-S が n=4、BPF-GA/S が n=3。 (mean ± S.E.)

4. 考察

本章では、BPF の肝臓で生成される代謝物が非妊娠期と妊娠期で異なることに着目し、代謝物の違いにより胎盤の通過のしやすさが異なるのではないかと考え、精製した BPF-S、BPF-GA/S、BPF-GA を用いて子宮灌流にて胎仔への移行しやすさを検証した。

まず、抱合体を 20 分間灌流しその後何も入っていない灌流液を 70 分間灌流した後採材した胎仔組織を調べると、BPF-GA/S や BPF-GA を子宮灌流した場合と比べて、BPF-S を子宮灌流した場合の方が胎仔への移行が多いことがわかった (図 29)。BPF-GA/S の子宮灌流では BPF-S が胎盤で多く検出されており (図 29B)、胎盤でグルクロン酸抱合が外れ、硫酸抱合のみが残った可能性が考えられた。グルクロン酸抱合体の胎盤移行は Nishikawa ら (2010) の BPA-GA の子宮灌流でも確認されており [72]、今回の結果においても、BPF-GA が胎盤を通過していることが明らかとなった (図 29C)。

次に、胎盤での脱抱合やより詳しい動態を探るため、抱合体を 20 分間灌流した直後に採材した胎仔組織からの検出を行った。BPF-S 子宮灌流において、BPF-S は胎盤で多く検出され (図 30C)、また脱抱合された BPF が胎盤及び胎仔で比較的多く検出された (図 30D)。これは、BPF-S が胎盤で脱硫酸抱合を受け、胎仔に移行していることを示唆している。また、BPF-GA/S の子宮灌流では、胎仔からの検出は少なかったが、胎盤において BPF-GA/S だけでなく BPF-S と BPF-GA 及び BPF が検出され (図 30E-H)、BPF-GA/S は胎盤で脱グルクロン酸抱合が起きて BPF-S になりやすいことや、一部は BPF まで脱抱合されることが示唆された。各抱合体の回収率が 83 ~87%であることを考慮すると (図 28)、回収できなかった抱合体の量に対して胎仔組織での検出量はごくわずかであったが、これは、手術で確保した腹大動脈→子宮→腹大静脈の経路以外に、結紮しきれなかった微細な血管経路によって他組織に流れた可能性がある。しかし、それぞれの回収率に大きな差はなく、全ての手術において同

等の条件で実験が行えたと言え、胎仔への移行量の比較をする上で問題にならないと判断した。以上のことから、各種 BPF 抱合体の中で、硫酸抱合体が最も胎盤を通過しやすかったこと、胎盤で抱合体が脱抱合され、脱抱合された BPF が胎仔にごくわずかであるが移行することがわかった。しかし、本実験では n 数が少なくデータの誤差も非常に大きいため、更に n 数を増やす必要がある。また、LC/MS による BPF の検出感度は非常に悪いため、組織中の BPF を検出しきれなかった可能性があり、BPF については検出感度を改善して再度測定する必要がある。

硫酸抱合体が胎盤を通過しやすい理由として、妊娠期のステロイド合成経路が関わると考えられる。胎児の発育にはエストロジェンが必須であるが、胎児単独では完全なステロイド合成系の酵素をもたず、合成を完結するためには胎盤の酵素を必要とする[27]。ステロイド合成経路を図 31 に記す。胎児はエストロジェン類の合成において、副腎皮質でコレステロールから 16α -OH-dehydroepiandrosterone (16α -OH-DHEA) まで合成できるが、その次の段階への反応を媒介する酵素の 3β -Hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) 活性が低い。このため 16α -OH-DHEA は胎児肝臓で硫酸抱合され 16α -OH-dehydroepiandrosterone sulfate (16α -OH-DHEA-S) となり、胎盤に発現するトランスポーターである sodium-dependent organic anion transporter (SOAT) などにより、胎盤に取り込まれる[93]。胎盤で 16α -OH-DHEA-S は sulfatase により脱抱合され、胎盤の栄養膜細胞に存在する 3β -HSD などの酵素の働きによりエストロジェン合成を完結し、母体および胎児に供給される。胎盤自体も、胎盤だけでコレステロールからのエストロジェン合成は行えず、母体血液中から 16α -OH-DHEA-S などのステロイド中間代謝物を胎盤内に取り込み、胎盤内で脱抱合と代謝を行い、エストロジェン合成を完結させる。事実、胎盤における sulfatase の発現は他組織と比較して約 100 倍もあり、脱硫酸抱合の機能が高い[68]。また、胎盤が他の抱合体ではなく硫酸抱合体を好んで取り込む理由として、胎児に充分量の硫酸イオンを供給することも重要であるからと考えられる。妊娠期の血中硫酸イオンは

非妊娠時に比べて約2倍にもなり、硫酸イオンは胎児の生殖器、骨格形成、脳や腎などの発育に非常に重要であることがわかっている[18]。以上のことから、硫酸抱合体は胎盤へ取り込まれる重要な形態であり、そのため BPF-S は胎盤に取り込まれやすく、また胎盤の sulfatase の発現が高いことから、胎盤で脱硫酸抱合反応をうけたと考えた。

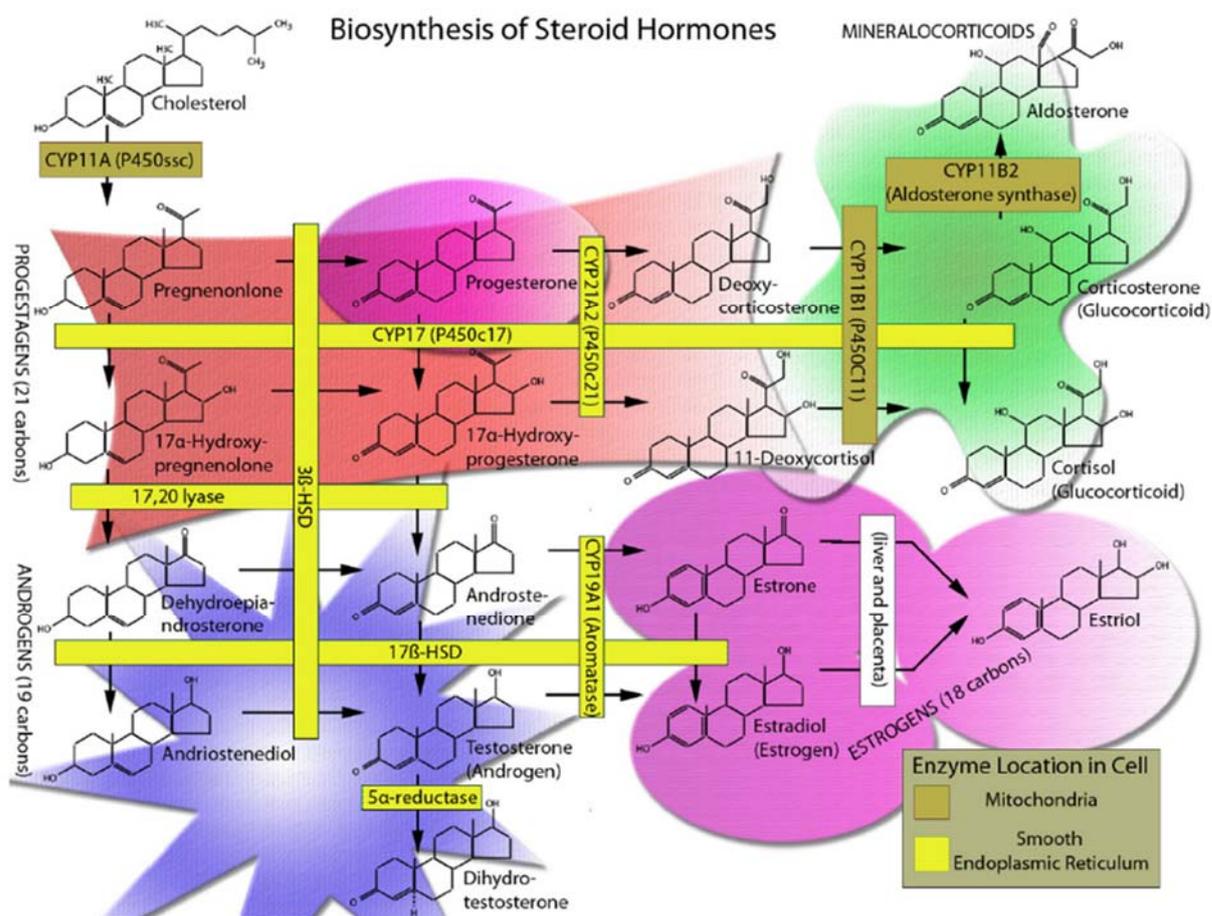


図 31 : ステロイド合成経路と合成に必要な酵素

妊娠期におけるエストロジェンの主な生成源は胎盤である。このうち 3β-hydroxy-Δ5-steroid dehydrogenase (3β-HSD)、Aromatase は胎盤中で活性化、17c-hydroxylase、17,20 lyase、21-hydroxylase は胎仔中で活性化する酵素である[27]。図は Hu ら (2010) から引用した[36]。

一方で、BPF-GA/S の子宮灌流の結果では、BPF-S と比較して胎仔に移行しにくくなることがわかった。この理由として、硫酸抱合体を認識し移送するとされている胎盤のトランスポーターの SOAT や organic anion transporting peptide 4A1 (OATP4A1) などは、硫酸抱合のみであれば容易に認識し取り込めるが、グルクロン酸抱合を同時に受けた代謝物は認識しづらくなるのではないかと考えた。また、BPF-GA/S の子宮灌流において、胎盤内に BPF-S が多く検出された。この理由として、胎盤では sulfatase だけでなく β -glucuronidase の活性も他の組織より高いが[58]、BPF-GA/S は胎盤内で、まず β -glucuronidase による脱グルクロン酸抱合反応を受け BPF-S になり、次いで sulfatase が反応し脱硫酸抱合反応をうけるのではないかと考えた。BPF-S の子宮灌流において胎盤中で検出された BPF-S と比較して BPF の検出量が低いことから sulfatase の脱硫酸抱合反応は緩やかに進行していくものと予想された。BPF-GA/S はトランスポーターの取り込みが BPF-S より厳しく、かつ速やかな脱グルクロン酸抱合反応の後に徐々に脱硫酸抱合反応を受けるため、胎仔に移行するには時間がかかると考えられる。今回のような短時間の曝露ではなく、日常的で長期的な曝露であれば、主な代謝物が BPF-GA/S であっても胎仔に移行する量は多くなると考えられる。また、90 分灌流後に胎仔で BPF-S の検出が高かった理由として、胎盤通過時に活性型の BPF となり胎仔へ移行した後、胎仔肝臓の硫酸転移酵素によって硫酸抱合を受けた可能性がある。

これまで一般的に、妊娠期における化学物質の曝露において、母体で十分に抱合体に代謝されていれば、母体から速やかに排泄され、胎児への移行は問題ないと考えられていた。しかし、本研究の結果から、特に硫酸抱合体は胎盤通過が容易であることや、胎盤内に取り込まれた BPF-S が胎盤で BPF へと脱抱合され、胎仔側に移行している可能性を示した。これらの動態は、妊娠中のステロイド合成経路における 16α -OH-DHEA-S の胎盤内への取り込みと脱抱合のシステムが関わると考えられ、BPF 抱合体は図 32 に示すような経路をたどったと考えた。BPF 抱合体が胎盤で脱抱合を

うけ再び活性型の BPF となり、胎仔の脳に運ばれ直性影響を及ぼした可能性や、胎盤内でのエストロゲン合成を攪乱することで間接的に胎仔に影響を及ぼした可能性が考えられる。

これまで抱合体は生体異物の排泄のために存在すると考えられてきたが、エストロゲン合成経路のように、硫酸抱合体に関しては、「反応中間体を組織が必要に応じて取り込み細胞内で脱抱合して利用するための形態」と考えられる。このため、BPF 以外の生体外異物も BPF-S と同様の経路をたどり、胎児へ移行する危険性が考えられる。妊娠時の禁忌薬のなかには肝臓で硫酸抱合を受けやすいものもあるため、今後このような薬物の代謝物の胎盤通過と代謝動態を研究する必要がある。

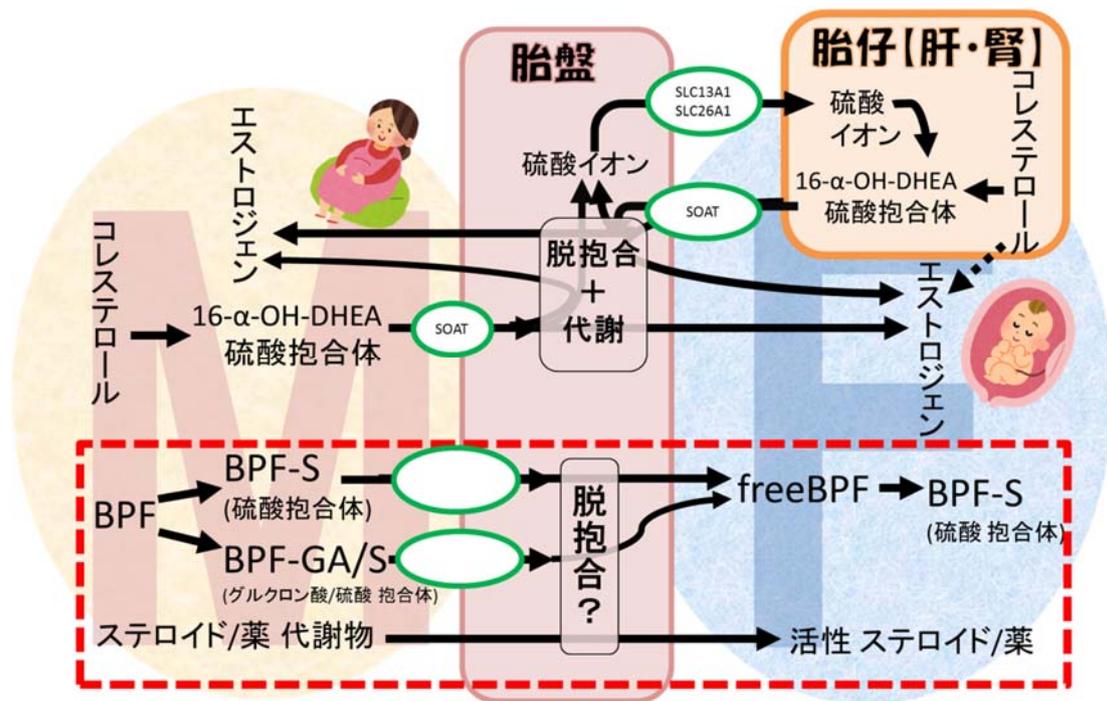


図 32 : BPF 抱合体が胎児へ移行する経路の仮説

胎盤内に取り込まれた BPF-S は胎盤中の sulfatase によって脱硫酸抱合され活性型の BPF となり胎仔側に移行する。移行後は、胎仔中の硫酸基転移酵素によって BPF-S に代謝される可能性もある。また薬物など他の化学物質も同様の動態をとると考えられる。

5. 小括

本章では、BPF の各種抱合体の中で、硫酸抱合体が最も胎盤を通過しやすく、また胎盤通過に伴い脱抱合され、BPF が胎仔内で検出されることを明らかにした。このメカニズムとして、妊娠期のエストロジェン合成経路での胎盤の役割が関与すると考えた。また、硫酸抱合体が単に生体異物を排泄するための形ではなく、物質の組織分配に関わる重要な形であると考えた。他の化学物質においても、硫酸抱合体は胎盤を通過しやすい可能性が考えられるため、今後は硫酸抱合を受けやすいとされる妊娠時禁忌薬においても同様の子宮灌流実験を行い、胎盤通過及び代謝動態の解明を進める必要があると考えている。

総括

本研究では、内分泌かく乱物質 BPA の次世代影響を左右する要因として、1) BPA 曝露の影響を受ける妊娠期間、2) 母親の葉酸摂取量と次世代影響の関連を検証し、BPA の次世代影響メカニズムを推察する上で有益な情報を得た。また BPA 代替品として使用が増加している BPF に着目し、3) 妊娠期 BPF 曝露による次世代影響、4) 各種 BPF 抱合体の胎盤通過性を検証し、BPF が BPA 代替品として安全性に疑問があることを示した。

BPA について本研究で明らかにしたことは、①胎盤の発達する妊娠後期が次世代行動影響を及ぼしやすい曝露期間であること、②妊娠後期に BPA 曝露をうけた次世代は不安様行動が増加し、雄雌の典型的な不安様行動の性差が消失すること、③母親の葉酸摂取量を下げると、妊娠期 BPA 曝露による次世代の不安様行動が強く現れること、④ヒトが妊娠中に推奨されている葉酸量では妊娠期 BPA 曝露による不安様行動は現れること、である。

BPA は成体では肝臓で速やかにグルクロン酸抱合をうけ BPA-GA となるが[112]、BPA-GA が胎盤を通過し脱抱合された BPA が胎仔から検出されるとの報告がある[72]。妊娠期は静脈血中の BPA-GA が増加し BPA-GA の胎盤通過のリスクが高い時期であることから[39]、妊娠後期 BPA 曝露による次世代影響は BPA-GA の胎盤通過が関わりと考えられる。妊娠後期から生後数日は脳の機能的発達の重要な時期であるが[62, 105, 106]、今回妊娠後期の BPA 曝露のみで行動に異常をきたしており、この間に十分に脳に影響が及んだと考えられる。妊娠期 BPA 曝露で脳の性的二形の消失や[28, 48, 49, 90]、脳の層構造の乱れ[46]などが報告されており、脳の性的二形や層構造の構築には性腺ステロイドが影響することがわかっていることから[2, 6, 43, 83, 104]、BPA のエストロゲン活性との関連が疑われる。しかし、BPA はエピジェネティクスの攪乱を招くことが疑われている[21, 34, 95, 109]。本研究においても、メチ

ル基給与体となる葉酸の摂取量が行動影響の程度を変化させたことから、BPA のエストロゲン活性による影響だけではない可能性が示唆された。また、母親の葉酸摂取量は妊娠期 BPA 曝露における次世代の行動影響をある程度左右する要因であることが分かったが、個人が摂取する栄養は食生活や国の文化に大きく関係しており、また、葉酸代謝における遺伝的な個人差を考慮すると[96]、母親の食事や体質の違いが次世代の BPA の感受性に影響すると言え、ヒトでの影響を調査する場合は考慮されるべき項目になるだろう。また、動物実験で BPA の次世代影響を調査する場合、母親の葉酸状態を制御することで安定した実験結果が得られる可能性がある。

BPF について本研究では、①妊娠期 BPF 曝露による次世代の不安様行動は BPA の場合と比べて強い影響をうけること、②妊娠期 BPF 曝露は次世代にうつ様行動も引き起こすこと、③BPF の硫酸抱合体は胎盤を通過しやすいこと、④BPF の抱合体は胎盤で脱抱合をうけ BPF として胎仔へ移行する可能性があること、を明らかにした。

BPA 代替品として現在その安全性をほとんど明らかにされることなく、使用が増加してきている BPF であるが、本研究結果は BPF が BPA よりも安全と判断できない結果であった。また、代謝と胎盤通過に着目し各種 BPF 抱合体の胎盤通過性を比較したところ、BPF-S が胎盤を通過しやすかった。この経路としてはステロイド合成過程におけるステロイド硫酸抱合体の運搬経路に巻き込まれたと推察した。BPF-S がトランスポーターを介し胎盤に取り込まれ、胎盤で脱抱合を受け、再び活性型の BPF となり胎仔へ移行して影響を及ぼした可能性の他に、胎盤でのステロイド合成を攪乱して間接的に胎仔に影響を及ぼした可能性も考えられる。ヒトの肝細胞において BPF は硫酸抱合体となることが報告されているが、同時に BPF の硫酸抱合能の個人差も報告されており[23]、BPF の硫酸抱合能が高い母体の場合、胎児に BPF がより多く移行する危険性がある。

今回はげっ歯類の実験による結果であったが、ヒトの影響を考え、BPF の使用は見

直される必要がある。また、げっ歯類とヒトの胎盤構造の違いに着目すると、どちらも血絨毛胎盤であるが、げっ歯類の胎盤では母体側血液と胎仔側血液間に2層の栄養芽細胞層と1層の内皮細胞が存在しているが、ヒトの胎盤構造は母体血液中に胎仔血管が入り込む構造をとるため[89]、化学物質の胎仔への移行はより容易になると考えられる。また、胎盤の発達する妊娠後期は、げっ歯類と比較するとヒトは非常に長く、BPA や BPF のように1日の曝露量は非常に低く問題視されなくとも妊娠期の日常的に曝露により胎児に蓄積し、影響を及ぼす危険性があると言える。BPA は一部の国では使用が禁止され、我が国では溶出規格 (2.5 µg/mL 以下) が設定されているが、BPF は設定されておらず、早急な基準設定が設けられるべきである。

グルクロン酸抱合体は BPA-GA の子宮灌流実験においても[72]、本研究における BPF-GA の子宮灌流においても胎仔移行はごくわずかである。それに対し本研究における BPF-S の胎盤通過性は他の抱合体と比較して多かった。硫酸抱合体はステロイド合成過程の胎盤通過において重要であることが知られている[27]。これらのことから、硫酸抱合体は「物質の組織分配 (胎盤通過を含む)」の役割を担っているという新たな見解を見出した。硫酸抱合を受ける他の化学物質においても、ステロイド合成過程に紛れて胎児へ移行し次世代に重大な影響を及ぼす危険性がある。数多くある妊娠時禁忌薬をはじめ、胎仔への影響が懸念される化学物質のなかにも、硫酸抱合体を受けやすく胎盤を通過して影響を及ぼしているものがある可能性があり、今後詳しく研究を行う必要がある。

近年、ヒトは日頃から様々な化学物質の曝露をうけている状態である。工業製品が身の回りにあふれる現代では BPA や BPF 以外にも未だ知られていない多くの内分泌かく乱物質が潜み、知らないうちに私たちは曝露されている可能性がある。特に妊娠時の曝露においては、奇形等といった顕著なものだけでなく、成熟後の発がん率や肥満、行動異常につながる危険性をはらんでいる。しかし、恐ろしいことにその危険性と妊娠期に受けた化学物質の曝露との関連は大部分が見落とされている。本研究で

は BPA や BPF の次世代影響をみたが、BPF とは BPA の代替品として使用されているものである。我々は代替品であるはずの BPF が BPA より強く高次機能に悪影響（行動異常）を及ぼすことを世界で初めて明らかにした。このことは BPF のように妊娠期曝露での危険性が見落とされたものが他にも存在することを示しており、本研究の報告は妊娠期化学物質曝露での次世代影響の重要性を強く印象づけるだろう。また、抱合体の胎盤通過性に着目し、抱合体の種類によって胎盤通過のしやすさが変わることを見出した点は、世界で行われている次世代への毒性研究において、本研究の結果は大きく貢献できるであろう。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なご指導、ご鞭撻を賜りました獣医生化学ユニット岩野英知教授に心からの感謝の意を表しますとともに、厚くお礼申しあげます。また、獣医生化学教室の横田 博教授をはじめ、また、実験及び論文作成に当たり惜しみないご協力、ご助言をいただきました獣医薬理学ユニット寺岡 宏樹教授、獣医衛生学ユニット永幡 肇教授、日本動物特殊診断の井上博紀先生、酪農学園大学農食環境学群水質化学研究室の中谷暢丈准教授、化合物安全性研究所の前田尚之先生、並びに獣医生化学教室員各位に心から感謝いたします。

引用文献

1. Andersen, H. R., Andersson, A.M., Arnold, S. F., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N. A., Bjerregaard, P., Christiansen, L. B., Gissel, B., Hummel, R., Bonefeld Jorgensen, E., Korsgaard, B., Le Guevel, R., Leffers, H., McLachlan, J., Moller, A., Bo Nielsen, J., Olea, N., Oles-Karasko, A., Pakdel, F., Pedersen, K. L., Perez, P., Skakkeboek, N. E., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Sumpter, J. P., Thorpe, S. M. and Grandjean, P. 1999. Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ. Health Perspect.* **107**: 89-108.
2. Arnold, A. P. and Gorski, R. A. 1984. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* **7**: 413-442.
3. Bailey, K. R. and Crawley, J. N. 2009. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience. pp. 77-101 *In: Anxiety-Related Behaviors in Mice*, 2th ed. (Buccafusco, J. J. ed.), CRC Press, Boca Raton.
4. Baker, M. E. and Chandsawangbhuwana, C. 2007. Analysis of 3D models of octopus estrogen receptor with estradiol: Evidence for steric clashes that prevent estrogen binding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **361**: 782-788.
5. Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J.A. and Nilsson, S. 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol. Pharmacol.* **54**: 105-112.
6. Beyer, C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat. Embryol.* **199**: 379-390.
7. Blizard, D. A., Lippman, H. R. and Chen, J. J. 1975. Sex differences in open-field behavior in the rat: The inductive and activational role of gonadal hormones. *Physiol. Behav.* **14**: 601-608.
8. Bushnik, T., Haines, D., Levallois, P., Levesque, J., Van Oostdam, J. and Viau, C. 2010. Lead and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Rep.* **21**: 7-18.
9. Cabaton, N., Chagnon, M.C., Lhuguenot, J.C., Cravedi, J.P. and Zalko, D. 2006. Disposition and metabolic profiling of bisphenol F in pregnant and nonpregnant rats. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 10307-10314.
10. Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J. A. and Needham, L. L. 2008. Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ. Health Perspect.* **116**: 39-44.
11. Cao, J., Rebuli, M. E., Rogers, J., Todd, K. L., Leyrer, S. M., Ferguson, S. A. and Patisaul, H. B. 2013. Prenatal Bisphenol A Exposure Alters Sex-Specific Estrogen Receptor Expression in the Neonatal Rat Hypothalamus and Amygdala. *Toxicol. Sci.* **133**: 157-173.

12. Cao, J., Stieger, B., Meier, P. J. and Vore, M. 2002. Expression of rat hepatic multidrug resistance-associated proteins and organic anion transporters in pregnancy. *Am. J. Physiol.* **283**: G757-G766.
13. Castro, B., Sanchez, P., Torres, J. M. and Ortega, E. 2015. Bisphenol A, bisphenol F and bisphenol S affect differently 5 alpha-reductase expression and dopamine-serotonin systems in the prefrontal cortex of juvenile female rats. *Environ. Res.* **142**: 281-287.
14. Chango, A. and Pogribny, I. P. 2015. Considering Maternal Dietary Modulators for Epigenetic Regulation and Programming of the Fetal Epigenome. *Nutrients* **7**: 2748-2770.
15. Cobellis, L., Colacurci, N., Trabucco, E., Carpentiero, C. and Grumetto, L. 2009. Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from endometriotic women. *Biomed. Chromatogr.* **23**: 1186-1190.
16. Colborn, T., Dumanoski, D. and Myers, D., 1996. Our stolen future : are we threatening our fertility, intelligence, and survival? : a scientific detective story., Dutton, New York.
17. Cox, K. H., Gatewood, J. D., Howeth, C. and Rissman, E. F. 2010. Gestational exposure to bisphenol A and cross-fostering affect behaviors in juvenile mice. *Horm. Behav.* **58**: 754-761.
18. Dawson, P. A. 2013. Role of sulphate in development. *Reproduction* **146**: R81-9.
19. Del Abril, A., Segovia, S. and Guillamon, A. 1987. The bed nucleus of the stria terminalis in the rat: regional sex differences controlled by gonadal steroids early after birth. *Dev. Brain Res.* **32**: 295-300.
20. Dodds, E. C. and Lawson, W. 1936. Synthetic estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* **137**: 996.
21. Dolinoy, D. C., Huang, D. and Jirtle, R. L. 2007. Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 13056-13061.
22. Domoradzki, J. Y., Pottenger, L. H., Thornton, C. M., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., Dryzga, M. D., Shiotsuka, R. N. and Waechter, J. M. Jr. 2003. Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-monoglucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol. Sci.* **76**: 21-34.
23. Dumont, C., Perdu, E., de Sousa, G., Debrauwer, L., Rahmani, R., Cravedi, J.P. and Chagnon, M.C. 2011. Bis(hydroxyphenyl)methane-bisphenol F-metabolism by the HepG2 human hepatoma cell line and cryopreserved human hepatocytes. *Drug Chem. Toxicol.* **34**: 445-453.
24. Farabollini, F., Porrini, S. and Dessi-Fulgheri, F. 1999. Perinatal exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects behavior in male and female rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**: 687-694.
25. Fay, M. J., My Trang, N., Snouwaert, J. N., Dye, R., Grant, D. J., Bodnar, W. M. and Koller,

- B. H. 2015. Xenobiotic Metabolism in Mice Lacking the UDP-Glucuronosyltransferase 2 Family. *Drug Metab. Disposition*. **43**: 1838-1846.
26. Fujimoto, T., Kubo, K., Nishikawa, Y. and Aou, S. 2013. Postnatal exposure to low-dose bisphenol A influences various emotional conditions. *J. Toxicol. Sci.* **38**: 539-546.
27. 福田眞三, 松本圭史. 1979. 人胎児期におけるステロイド代謝. *臨床化学*. **8**: 22-31.
28. Funabashi, T., Kawaguchi, M., Furuta, M., Fukushima, A. and Kimura, F. 2004. Exposure to bisphenol A during gestation and lactation causes loss of sex difference in corticotropin-releasing hormone-immunoreactive neurons in the bed nucleus of the stria terminalis of rats. *Psychoneuroendocrinology* **29**: 475-485.
29. Ginsberg, G. and Rice, D. C. 2009. Does Rapid Metabolism Ensure Negligible Risk from Bisphenol A? *Environ. Health Perspect.* **117**: 1639-1643.
30. Gioiosa, L., Fissore, E., Ghirardelli, G., Parmigiani, S. and Palanza, P. 2007. Developmental exposure to low-dose estrogenic endocrine disruptors alters sex differences in exploration and emotional responses in mice. *Horm. Behav.* **52**: 307-316.
31. Guillamon, A., De Blas, M. R. and Segovia, S. 1988. Effects of sex steroids on the development of the locus coeruleus in the rat. *Dev. Brain Res.* **40**: 306-310.
32. Guillamon, A., Segovia, S. and Del Abril, A. 1988. Early effects of gonadal steroids on the neuron number in the medial posterior region and the lateral division of the bed nucleus of the stria terminalis in the rat. *Dev. Brain Res.* **44**: 281-290.
33. Handa, R. J., Ogawa, S., Wang, J. M. and Herbison, A. E. 2012. Roles for oestrogen receptor beta in adult brain function. *J Neuroendocrinol.* **24**: 160-73.
34. Ho, S.M., Tang, W.Y., de Frausto, J. B. and Prins, G. S. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* **66**: 5624-5632.
35. Howdeshell, K. L., Peterman, P. H., Judy, B. M., Taylor, J. A., Orazio, C. E., Ruhlen, R. L., vom Saal, F. S. and Welshons, W. V. 2003. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ. Health Perspect.* **111**: 1180-1187.
36. Hu, J., Zhang, Z., Shen, W. J. and Azhar, S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr. Metab.* **7**: 47.
37. Imhof, J. T., Coelho, Z. M. I., Schmitt, M. L., Morato, G. S. and Carobrez, A. P. 1993. Influence of gender and age on performance of rats in the elevated plus maze apparatus. *Behav. Brain Res.* **56**: 177-180.
38. Inoue, H., Kemanai, S., Sano, C., Kato, S., Yokota, H. and Iwano, H. 2016. Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 733-737.
39. Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H. and Kato, S. 2005. Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metab. Disposition.* **33**: 55-59.

40. Inoue, H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A. and Kato, S. 2001. Bisphenol a glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metab. Disposition*. **29**: 1084-1087.
41. Jasarevic, E., Sieli, P. T., Twellman, E. E., Welsh, T. H., Jr., Schachtman, T. R., Roberts, R. M., Geary, D. C. and Rosenfeld, C. S. 2011. Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 11715-11720.
42. Jones, B. A. and Watson, N. V. 2012. Perinatal BPA exposure demasculinizes males in measures of affect but has no effect on water maze learning in adulthood. *Horm. Behav.* **61**: 605-610.
43. Kelly, S. J., Ostrowski, N. L. and Wilson, M. A. 1999. Gender differences in brain and behavior: Hormonal and neural bases. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **64**: 655-664.
44. King, C. D., Rios, G. R., Assouline, J. A. and Tephly, T. R. 1999. Expression of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 2B7 and 1A6 in the human brain and identification of 5-hydroxytryptamine as a substrate. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**: 156-162.
45. Kitamura, S., Suzuki, T., Sanoh, S., Kohta, R., Jinno, N., Sugihara, K., Yoshihara, S. i., Fujimoto, N., Watanabe, H. and Ohta, S. 2005. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds. *Toxicol. Sci.* **84**: 249-259.
46. Komada, M., Asai, Y., Morii, M., Matsuki, M., Sato, M. and Nagao, T. 2012. Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. *Toxicology* **295**: 31-38.
47. Krishnan, A. V., Stathis, P., Permuth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. 1993. Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**: 2279-2286.
48. Kubo, K., Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T. and 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**: 73-76.
49. Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R. and Aou, S. 2003. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci. Res.* **45**: 345-356.
50. Kundakovic, M., Gudsnuik, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R. L., Perera, F. P. and Champagne, F. A. 2013. Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 9956-9961.
51. Kurebayashi, H., Harada, R., Stewart, R. K., Numata, H. and Ohno, Y. 2002. Disposition of a low dose of bisphenol A in male and female cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci.* **68**: 32-42.
52. Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B. and Melzer, D. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *J. Amer. Med. Assoc.* **300**: 1303-1310.

53. Li, E. 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat. Rev. Genet.* **3**: 662-673.
54. Liao, C. and Kannan, K. 2013. Concentrations and Profiles of Bisphenol A and Other Bisphenol Analogues in Foodstuffs from the United States and Their Implications for Human Exposure. *J. Agric. Food Chem.* **61**: 4655-4662.
55. Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Vu Duc, L., Mohd, M. A., Moon, H.-B., Nakata, H. and Kannan, K. 2012. Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 6860-6866.
56. Liao, C., Liu, F., Guo, Y., Moon, H.-B., Nakata, H., Wu, Q. and Kannan, K. 2012. Occurrence of Eight Bisphenol Analogues in Indoor Dust from the United States and Several Asian Countries: Implications for Human Exposure. *Environ. Sci. Technol.* **46**: 9138-9145.
57. Lozada, K. W. and Keri, R. A. 2011. Bisphenol A Increases Mammary Cancer Risk in Two Distinct Mouse Models of Breast Cancer. *Biol. Reprod.* **85**: 490-497.
58. Lucier, G. W., Sonawane, B. R. and McDaniel, O. S. 1977. Glucuronidation and deglucuronidation reactions in hepatic and extrahepatic tissues during perinatal development. *Drug Metab. Disposition.* **5**: 279-287.
59. MacKenzie, P. I., Owens, I. S., Burchell, B., Bock, K. W., Bairoch, A., Belanger, A., Fournel-Gigleux, S., Green, M., Hum, D. W., Iyanagi, T., Lancet, D., Louisot, P., Magdalou, J., Chowdhury, J. R., Ritter, J. K., Schachter, H., Tephly, T. R., Tipton, K. E. and Nebert, D. W. 1997. The UDP glycosyltransferase gene superfamily: Recommended nomenclature update based on evolutionary divergence. *Pharmacogenetics* **7**: 255-269.
60. Maclusky, N. J. and Naftolin, F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* **211**: 1294-1303.
61. Mani, S. K. and Oyola, M. G. 2012. Progesterone signaling mechanisms in brain and behavior. *Front. Endocrinol.* **3**: 7.
62. Manson, J. M. and Wise, L. D., 1993. Teratogens. pp. 226-254 *In*: Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons, 4th ed. (Amdur, M.O., Doull, J., and Klaassen, C.D. eds.), McGraw-Hill, New York.
63. Matsumoto, J., Yokota, H. and Yuasa, A. 2002. Developmental increases in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decreases during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* **110**: 193-6.
64. Matsushima, A., Kakuta, Y., Teramoto, T., Koshiba, T., Liu, X., Okada, H., Tokunaga, T., Kawabata, S., Kimura, M. and Shimohigashi, Y. 2007. Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol a binding to human nuclear receptor ERR gamma. *J. Biochem.* **142**: 517-524.
65. Matthews, J. B., Twomey, K. and Zacharewski, T. R. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha

- and beta. *Chem. Res. Toxicol.* **14**: 149-157.
66. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R. and Haaf, T. 2000. Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* **403**: 501-502.
67. Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A. M., Arbuckle, T. E. and Duty, S. M. 2014. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **87**: 13-20.
68. Miki, Y., Nakata, T., Suzuki, T., Darnel, A. D., Moriya, T., Kaneko, C., Hidaka, K., Shiotsu, Y., Kusaka, H. and Sasano, H. 2002. Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **87**: 5760-5768.
69. 村上由里子. 2012. ラット肝臓においてビスフェノール F 抱合体は Multidrug Resistance Associated Protein 2 を介して胆汁中へと排泄される. 酪農学園大学環境システム学部生命環境学科 2012 年度卒業論文.
70. Nahar, M. S., Liao, C., Kannan, K. and Dolinoy, D. C. 2013. Fetal Liver Bisphenol A Concentrations and Biotransformation Gene Expression Reveal Variable Exposure and Altered Capacity for Metabolism in Humans. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **27**: 116-123.
71. Niederkofler, V., Asher, T. E. and Dymecki, S. M. 2015. Functional Interplay between Dopaminergic and Serotonergic Neuronal Systems during Development and Adulthood. *ACS Chem. Neurosci.* **6**: 1055-1070.
72. Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H. and Yokota, H. 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ. Health Perspect.* **118**: 1196-203.
73. 西川美宇. 2010. 妊娠後期におけるビスフェノール A 曝露による胎仔影響メカニズムの解明. 酪農学園大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程 2010 年度博士論文.
74. Nishizuka, M., Sumida, H., Kano, Y. and Arai, Y. 1993. Formation of neurons in the sexually dimorphic anteroventral periventricular nucleus of the preoptic area of the rat: Effects of prenatal treatment with testosterone propionate. *J. Neuroendocrinol.* **5**: 569-573.
75. Okada, H., Tokunaga, T., Liu, X., Takayanagi, S., Matsushima, A. and Shimohigashi, Y. 2008. Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ. Health Perspect.* **116**: 32-38.
76. Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. and Sonnenschein, C. 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ. Health Perspect.* **104**: 298-305.
77. Patchev, A. V., Goetz, F. and Rohde, W. 2004. Differential role of estrogen receptor isoforms in sex-specific brain organization. *FASEB J.* **18**.
78. Patisaul, H. B. and Bateman, H. L. 2008. Neonatal exposure to endocrine active compounds

- or an ER agonist increases adult anxiety and aggression in gonadally intact male rats. *Horm. Behav.* **53**: 580-588.
79. Patisaul, H. B. and Polston, E. K. 2008. Influence of endocrine active compounds on the developing rodent brain. *Brain Res. Rev.* **57**: 352-362.
 80. Peretz, J., Vrooman, L., Ricke, W. A., Hunt, P. A., Ehrlich, S., Hauser, R., Padmanabhan, V., Taylor, H. S., Swan, S. H., VandeVoort, C. A. and Flaws, J. A. 2014. Bisphenol A and Reproductive Health: Update of Experimental and Human Evidence, 2007-2013. *Environ. Health Perspect.* **122**: 775-786.
 81. Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V. and Olea, N. 1998. The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy groups. *Environ. Health Perspect.* **106**: 167-174.
 82. Petersen, S. L., Intlekofer, K. A., Moura-Conlon, P. J., Brewer, D. N., Del Pino Sans, J. and Lopez, J. A. 2013. Novel progesterone receptors: neural localization and possible functions. *Front. Neurosci.* **7**: 164.
 83. Pilgrim, C. and Hutchison, J. B. 1994. Developmental regulation of sex differences in the brain: Can the role of gonadal steroids be redefined? *Neuroscience* **60**: 843-855.
 84. Porsolt, R. D., Bertin, A. and Jalfre, M. 1977. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **229**: 327-336.
 85. Reik, W., Dean, W. and Walter, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* **293**: 1089-1093.
 86. Rochester, J. R. and Bolden, A. L. 2015. Bisphenol S and F: A Systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes. *Environ. Health Perspect.* **123**: 643-650.
 87. Roper, W. L. 1992. Recommendations for the use of folic acid to reduce the number of cases of spina bifida and other neural tube defects. *Morb. Mortal. Weekly Rep.* **41**: 1-7.
 88. Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., van Vugt-Lussenburg, B. M. A., Wedeby, E. B., Taxvig, C. and Vinggaard, A. M. 2014. Are Structural Analogues to Bisphenol A Safe Alternatives? *Toxicol. Sci.* **139**: 35-47.
 89. Rossant, J. and Cross, J. C. 2001. Placental development: Lessons from mouse mutants. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 538-548.
 90. Rubin, B. S., Lenkowski, J. R., Schaeberle, C. M., Vandenberg, L. N., Ronsheim, P. M. and Soto, A. M. 2006. Evidence of altered brain sexual differentiation in mice exposed perinatally to low, environmentally relevant levels of bisphenol A. *Endocrinology* **147**: 3681-3691.
 91. Ryan, B. C. and Vandenberg, J. G. 2006. Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice. *Horm. Behav.* **50**: 85-93.

92. Schoenfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C. E., Paul, M. and Chahoud, I. 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ. Health Perspect.* **110**: A703-A707.
93. Schweigmann, H., Sanchez-Guijo, A., Ugele, B., Hartmann, K., Hartmann, M. F., Bergmann, M., Pfarrer, C., Doering, B., Wudy, S. A., Petzinger, E., Geyer, J. and Grosser, G. 2014. Transport of the placental estriol precursor 16 alpha-hydroxy-dehydroepiandrosterone sulfate (16 alpha-OH-DHEAS) by stably transfected OAT4⁻, SOAT⁻, and NTCP-HEK293 cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **143**: 259-265.
94. Shughrue, P. J., Lane, M. V. and Merchenthaler, I. 1997. Comparative distribution of estrogen receptor-alpha and -beta mRNA in the rat central nervous system. *J. Comp. Neurol.* **388**: 507-525.
95. Susiarjo, M., Sasson, I., Mesaros, C. and Bartolomei, M. S. 2013. Bisphenol A Exposure Disrupts Genomic Imprinting in the Mouse. *PLoS Genet.* **9**: e1003401.
96. Tamura, T. and Picciano, M. F. 2006. Folate and human reproduction. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**: 993-1016.
97. Timms, B. G., Howdeshell, K. L., Barton, L., Bradley, S., Richter, C. A. and Vom Saal, F. S. 2005. Estrogenic chemicals in plastic and oral contraceptives disrupt development of the fetal mouse prostate and urethra. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 7014-7019.
98. Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Sloan, C. S., Castillo, N. P., Veselica, M. M., Seely, J. C., Dimond, S. S., Van Miller, J. P., Shiotsuka, R. N., Beyer, D., Hentges, S. G. and Waechter, J. M., Jr. 2008. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol a in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol. Sci.* **104**: 362-384.
99. Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., Keimowitz, A. R., Brine, D. R., Veselica, M. M., Fail, P. A., Chang, T. Y., Seely, J. C., Joiner, R. L., Butala, J. H., Dimond, S. S., Cagen, S. Z., Shiotsuka, R. N., Stropp, G. D. and Waechter, J. M. 2002. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **68**: 121-146.
100. Voelkel, W., Colnot, T., Csanady, G. A., Filser, J. G. and Dekant, W. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 1281-1287.
101. vom Saal, F. S. and Hughes, C. 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **113**: 926-933.
102. Wagner, C. 2001. Biochemical role of folate in cellular metabolism (Reprinted from Folate and Health Disease, pgs 23-42, 1995). *Clin. Res. Regul. Aff.* **18**: 161-180.
103. Wagner, C. K., Nakayama, A. Y. and De Vries, G. J. 1998. Potential role of maternal progesterone in the sexual differentiation of the brain. *Endocrinology* **139**: 3658-61.

104. Wang, L., Andersson, S., Warner, M. and Gustafsson, J.A. 2003. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 703-708.
105. Weinstock, M. 2008. The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **32**: 1073-1086.
106. Wilson, J. G., 1973. Environment and birth defects. Academic Press, New York.
107. Wolffe, A. P. and Matzke, M. A. 1999. Epigenetics: Regulation through repression. *Science* **286**: 481-486.
108. Wolstenholme, J. T., Edwards, M., Shetty, S. R., Gatewood, J. D., Taylor, J. A., Rissman, E. F. and Connelly, J. J. 2012. Gestational exposure to bisphenol A produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology* **153**: 3828-38.
109. Wolstenholme, J. T., Rissman, E. F. and Connelly, J. J. 2011. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Horm. Behav.* **59**: 296-305.
110. Wolstenholme, J. T., Taylor, J. A., Shetty, S. R. J., Edwards, M., Connelly, J. J. and Rissman, E. F. 2011. Gestational Exposure to Low Dose Bisphenol A Alters Social Behavior in Juvenile Mice. *PLoS One.* **6**: e25448.
111. 藪崎梨沙. 2015. ビスフェノール A とその類似物質の代謝動態について. 酪農学園大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程 2015 年度博士論文.
112. Yokota, H., Iwano, H., Endo, M., Kobayashi, T., Inoue, H., Ikushiro, S.-i. and Yuasa, A. 1999. Glucuronidation of the environmental oestrogen bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* **340**: 405-409.
113. Zhou, X., Kramer, J. P., Calafat, A. M. and Ye, X. 2014. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine. *J. Chromatogr. B.* **944**: 152-156.