

マウス生殖器形成期における  
ビスフェノール A 曝露の生殖毒性学的研究

山口大学大学院連合獣医学研究科

橘 徹

2016 年 3 月

目次	
緒論	1
第一章 マウス着床期および胎盤形成期における生殖毒性的影響	
第一節 緒論	7
第二節 材料と方法	7
第三節 結果	9
第四節 考察	12
第五節 小括	16
第二章 マウス生殖器形成期における次世代生殖器への影響	
第一節 緒論	17
第二節 材料と方法	17
第三節 結果	20
第四節 考察	25
第五節 小括	31
第三章 総合考察	32
総括	40
要約	41
謝辞	44
文献	45
付図	54

## 緒論

内分泌かく乱物質とは、「内分泌系の機能を変化させることにより、健全な生物個体やその子孫、あるいは集団（またはその一部）の健康に有害な影響を及ぼす外因性化学物質または混合物」と定義される物質である<sup>1)</sup>。ヒトを含めた生物は、広くこの内分泌かく乱物質にさらされており正常な発生過程をかく乱させる可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。

内分泌かく乱物質であるビスフェノール A (4,4'-isopropylidenediphenol; BPA) は、弱いエストロゲン活性(エストラジオールの 1/10000-1/15000)を示し<sup>3,4,5,6)</sup>、現在世界で最も製造量が多い化学物質の一つで有り、世界中では約 350 万トン/年、日本国内では約 50 万トン/年が生産されている<sup>7)</sup>。ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の原料、フェノール樹脂、酸化防止剤などの原料として使用されており、通常の使用条件で BPA が溶出する<sup>8)</sup>。BPA の主な曝露源は、食品由来と考えられており、感熱紙からの BPA の曝露は、食品に次ぐ大きな曝露源である<sup>9)</sup>。食品への BPA の移行は、缶詰のコーティングからの移動である可能性が高く<sup>10)</sup>、ヒトの血清からも BPA が、非妊娠では 2.0ng/ml、妊娠初期では 1.5ng/ml、妊娠後期では 1.4ng/ml、胎子血清で 2.2ng/ml の濃度で検出されている<sup>11)</sup>。羊膜ではさらに高く 8.3ng/ml, 36nM の濃度で検出されている<sup>12,13)</sup>。

ヒトへの曝露および曝露量における内分泌かく乱作用の有無に関して様々な取り組みがなされており、げっ歯類に対する BPA の生殖毒性的を調べる実験は、数多く行われて来ている。

エストロゲン作用を検出するための子宮増殖アッセイ試験としては、幼若雌ラットを用いた報告では、Ashby らは、Alpk:AP 系を用いて 400~800mg/kg/day を 3 日間経口あるいは皮下投与することにより<sup>14)</sup>、Yamasaki らは、SD 系を用いて 2~800mg/kg/day を 3 日間経口あるいは皮下投与することにより<sup>15,16)</sup>、Laws らは、Long Evan 系を用いて 100~400mg/kg/day を 3 日間経口投与することにより<sup>17)</sup>、それぞれ子宮重量の増加が認められたことを報告している。卵巣切除ラットを用いた報告では、Ashby らは、Alpk:APfSD 系を用いて 16.7mg/rat を 1 日二回、3 日間皮下投与することにより<sup>18)</sup>、Cook らは、系統不明だが、500mg/day を単回腹腔内投与することにより<sup>19)</sup>、Dodge らは、SD 系を用いて 30mg/kg/day を 4 日間経口投与することにより<sup>20)</sup>、それぞれ子宮重量の増加が認められたことを報告している。一方、Steinmetz らは、F344 系および SD 系を用いて 0.3 mg/kg/day 相当のカプセルを 3 日間皮下埋植することにより、F344 系では子宮重量の増加を、SD 系では増加が認められないことを報告している<sup>21)</sup>。

幼若雌マウスを用いた報告では、Markey らは、CD-1 系を用いて 0.1~100 mg/kg/day 相当のカプセルを 3 日間皮下埋植することにより<sup>22)</sup>、Tinwell らは、

AP 系を用いて 0.2~200mg/kg/day を 3 日間皮下投与することにより<sup>23)</sup>、Papaconstantinou らは、卵巣切除マウス(B6C3F1系)を用いて0.02~2mg/kg/day を 4 日間皮下投与することにより<sup>24)</sup>、それぞれ子宮重量の増加が認められたことを報告している。一方、Mehmood らは、CD-1 系を用いて 0.01~100mg/kg/day を 3 日間皮下投与した結果<sup>25)</sup>、Tinwell らは、AP 系を用いて 0.5~300mg/kg/day を 3 日間経口投与した結果<sup>23)</sup>、それぞれ子宮重量の増加が認められないことを報告している。

胎子期から新生子への曝露における生殖器への影響についても様々なものが報告されている。Rubin らは、SD 系ラットで妊娠 6 日から離乳期まで 0.1mg/kg/day または 10mg/kg/day 相当を飲水経口曝露することにより発情周期に異常をきたすことを<sup>26)</sup>、Spencer らは、SD 系ラットで 200mg/kg/day を妊娠 1 日から妊娠 4 日まで皮下投与することにより子宮重量の増加を、妊娠 5 日から妊娠 8 日まで皮下投与することにより子宮脱落膜化の欠損を<sup>27)</sup>、Xiao らは、C57BL/6 系マウスで 0.025~100mg/kg/day を妊娠 0.5 日から妊娠 3.5 日まで皮下投与することにより胚着床への悪影響を<sup>28)</sup>、Howdeshel らは、CF-1 系マウスで 2.4  $\mu$ g/kg/day を妊娠 11 日から妊娠 17 日まで経口投与することにより初回排卵の早期化を<sup>29,30)</sup>、Markey らは、CD-1 系マウスを用いて妊娠 9 日から離乳期まで 25ng/kg/day または 250ng/kg/day に相当するカプセルを皮下に埋植するこ

とにより子宮内膜重量の減少、エストロゲン受容体 $\alpha$ 、プロゲステロン受容体発現の増加を<sup>31)</sup>、Morrisseyらは、CD-1系マウスを用いて500~1250mg/kg/dayを妊娠6日から妊娠15日まで経口投与することにより妊娠子宮重量の減少や胎仔体重の減少を<sup>32)</sup>、Newboldらは、新生子CD-1マウスを用いて0.01~1mg/kg/dayを生後1日から5日まで皮下投与することにより卵巣や生殖器への異常が誘発されることを<sup>33)</sup>報告している。一方、Morrisseyらは、SD系ラットを用いて160~1280mg/kgを妊娠6日から妊娠15日まで経口投与しても<sup>32)</sup>、KwonらはSD系ラットを用いて3.2~320mg/kgを妊娠11日から離乳期まで経口投与しても<sup>34)</sup>、異常が認められないことを報告している。

生殖発生毒性としては、HowdeshellやRyanらは、Long Evansラットに2~200 $\mu$ g/kg/dayを妊娠7日から出生後18日まで経口投与し、次世代への生殖器発達と内分泌系への影響を調べた結果、BPAの影響は認められないことを報告している<sup>35,36)</sup>。Reelらは、CD-1マウスを用いた混餌による2世代繁殖試験（交配1週間前からF2の離乳まで）で設定した最低用量（437mg/kg/day相当）でF1に肝臓および腎臓重量の増加、精巣上体および精嚢重量の減少を報告している<sup>37)</sup>。OECDテストガイドライン416に準拠した2世代繁殖毒性試験では、Emaらは、CD(SD)IGSラットを用いて、0.2~200 $\mu$ g/kg/dayを経口曝露することにより、雌雄ともに生殖器に異常が認められないこと<sup>38)</sup>を、Ty1らは、CD-1マウスを用い

て 0.003~600mg/kg/day を混餌曝露することにより、600mg/kg/day において、母獣の一般毒性による二次的な影響が認められたが、その他に異常は認められず、マウスに対して BPA は特異的な発生生殖毒性物質ではなく、BPA の生殖毒性に係わる NOEL は 50mg/kg/day と報告している<sup>39)</sup>。また、Ty1 らは、3 世代生殖試験を行いラット 3 世代生殖試験での生殖発生毒性試験の NOAEL は、50mg/kg/day と報告している<sup>40)</sup>。

BPA が内分泌かく乱作用を及ぼす経路として、DNA メチル化パターンの変化が疑われている。DNA メチル化は、遺伝子発現を調節することで成長、分化を含む細胞生理学上の様々な性状を調節する<sup>41,42)</sup>。Ho らは、ヒト前立腺がん細胞株で、BPA がサイクリック AMP の機能停止に必要な酵素であるホスホジエステラーゼ 4 のプロモーター領域の低メチル化と発現の増加を引き起こすことを報告しており<sup>43)</sup>、Dolinoy らは、the viable yellow agouti (Avy) mouse を用いることにより BPA が agouti 遺伝子の低メチル化を引き起こし、毛色を黄色へとシフトさせることを明らかにしている<sup>44)</sup>。Taylor らは、CD-1 マウスを用いて妊娠 9 日から妊娠 16 日までの曝露で成体の子宮で HOXA10 発現の増加を示し、このことは HOXA10 遺伝子の低メチル化と関連していることを報告している<sup>45,46)</sup>。これらの報告は BPA が分子生物学的にも影響を及ぼし、次世代にも影響を及ぼしうることを示唆している。

げっ歯類を用いて BPA の生殖毒性的を調べる実験は、数多く行われて来ており、多世代生殖毒性試験も行われ NOAEL が算出されているが、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分に検討されていない。そこで、本研究は特に着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を解明することを目的として実施した。第一章では、着床期および胎盤形成期での BPA 曝露が生殖器形成に影響を調べた。これについては、既に報告している<sup>47)</sup>。第二章では、生殖器形成期に限定した BPA 曝露次世代雌性生殖器系へ影響を及ぼすかどうかを解明することを目的として、卵巣子宮の形態学的解析、BPA への感受性への影響、HOXA10 の遺伝子メチル化に及ぼす影響を解析した。



## 第一章 マウス着床期および胎盤形成期における生殖毒性的影響

### 第一節 緒論

内分泌かく乱物質である BPA は、弱いエストロゲン活性(エストラジオールの 1/10000-1/15000)を示し<sup>3,4,5,6)</sup>、現在世界で最も製造量が多い化学物質の一つで有り、ヒトを含めた生物への影響が懸念されている。

着床期および胎盤形成期の BPA 曝露の影響については、Spencer らの妊娠 1 日から妊娠 4 日まで皮下投与することにより子宮重量の増加した報告<sup>27)</sup>や Xiao らの妊娠 0.5 日から妊娠 3.5 日まで皮下投与することにより胚着床への悪影響の報告<sup>28)</sup>があるが、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分に検討されていない。本研究は、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を解明することを目的として行った。

### 第二節 材料と方法

#### 1) 実験動物

全ての実験は山口大学動物実験指針に基づき実施した。ICR マウス(日本クレア)の未経産の成熟個体(10~14 週齢)を使用した。室温 25~30°C、明時間 12 時間、暗時間 12 時間、飼料および水は自由摂取という条件で飼育した。雄との同

居後、膣栓が確認された日を妊娠 0 日とした。妊娠 10 日および妊娠 12 日に麻酔下で安楽死させ、開腹した後、妊娠子宮を採取した。着床数および子宮重量を測定し、形態学的解析を行った。妊娠日齢につき 5 個体以上用いた。

## 2) 投与方法および採取時期

ゴマ油 (SIGMA) に溶かした BPA (WAKO) 10mg/kg/day を妊娠 0 日から妊娠 7 日までの 8 日間、定刻に皮下投与したマウスを BPA 群とした。ゴマ油のみを妊娠 0 日から妊娠 7 日までの 8 日間、定刻に 0.15ml 皮下投与したマウスを対照群とした。

## 3) 形態学的解析

採取した妊娠子宮をブアン液で固定後、常法に従いパラフィン包埋した。その後、胎盤を横断する厚さ 4  $\mu$ m の切片を作製し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。胎盤、間膜腺、基底脱落膜および胎盤迷路部の厚さの測定については、臍帯付着部が見られる胎盤中央部の切片を用いた。また、計数には各妊娠日齢につき 5 個体、無作為に選出した胎盤の着床部を用いた。

#### 4) 新生子生存率の観察

対照群および BPA 群の産子数および新生子の生存率を観察した。また、BPA 群の新生子を Normal マウスの授乳中のメスに育てさせ、その後の新生子の発育経過について観察を行った。なお、子は出産 1 日目に 1 腹 10 匹に調節した。

#### 5) 統計処理

F 検定により等分散性を確認後、Welch の t 検定を用いて解析を行った。P<0.05 をもって有意とした。統計学的数値は平均値±標準偏差で示した。

### 第三節 結果

#### 1) 着床胎子数および子宮重量

着床胎子数、子宮重量および子宮相対重量において、妊娠 10 日および妊娠 12 日に、対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた(表 1、図. 1a, 1b)。左右の子宮角での違いは認められなかった(図. 2)。

表.1 着床胎子数および子宮重量の比較

		着床胎子数	子宮重量(g)	子宮重量 /母体重量(%)
Day 10	対照群	16.2±1.64	2.184±0.109	5.31±0.444
	BPA群	4.6±1.14*	0.542±0.063*	1.40±0.098*
Day 12	対照群	16.4±2.61	5.706±0.657	12.97±1.740
	BPA群	4.8±0.84*	1.144±0.038*	2.63±0.221*

\* 対照群と比較して間有意な差あり (P<0.05) 平均±標準偏差 n=5

## 2) 形態学的変化

妊娠 10 日および妊娠 12 日の対照群、BPA 群の子宮胎盤は、間膜腺、基底脱落膜および胎盤迷路部の 3 層構造を形成していた(図. 3 a, b)。胎盤および 3 組織の厚さをそれぞれ測定し、胎盤に対するそれぞれの割合を算出した(表. 2、図. 4)。妊娠 10 日および妊娠 12 日ともに、対照群と比較して胎盤子宮部である間膜腺の統計学的に有意な肥厚と胎子胎盤部である胎盤迷路部の統計学的に有意な菲薄が認められた(表. 2)。妊娠 12 日の胎盤では、対照群と比較して基底脱落膜の統計学的に有意な菲薄も認められた(表. 2、図. 4)。

妊娠 10 日および妊娠 12 日の BPA 群の妊娠子宮は、対照群と比較して、母体血が流れる絨毛間腔の狭窄が認められた(図. 3 c, d)。BPA 群では、基底脱落膜と胎盤迷路部の境に存在する栄養膜巨細胞層は不連続となり、空胞化細胞もわずかし確認することができず、栄養膜海綿層の菲薄化が認められた(図. 3 e, f)。

表.2 子宮胎盤の形態学的変化

		胎盤 ( $\mu\text{m}$ )	間膜腺 /胎盤 (%)	基底脱落膜 /胎盤 (%)	胎盤迷路部 /胎盤 (%)
Day 10	対照群	1798 $\pm$ 81.31	25.2 $\pm$ 2.28	36.8 $\pm$ 1.83	38.0 $\pm$ 0.88
	BPA群	1903 $\pm$ 34.69	39.7 $\pm$ 1.29*	38.4 $\pm$ 1.83	22.7 $\pm$ 1.11*
Day 12	対照群	2401 $\pm$ 51.60	22.9 $\pm$ 1.36	33.0 $\pm$ 2.16	44.0 $\pm$ 1.90
	BPA群	1814 $\pm$ 39.98*	42.0 $\pm$ 0.99*	27.1 $\pm$ 1.80*	30.9 $\pm$ 1.50*

\*対照群と比較して間有な意差あり (P<0.05) 平均 $\pm$ 標準偏差 n=5

### 3) 産子数および新生子の生存率

対照群の新生子は、生後 56 日 (8 週齢) までほとんど死亡することなく生存した。BPA 群の産子数は、対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められ、新生子は、生後 3 日ではほとんど生存しておらず、生後 56 日 (8 週齢) では、全例の死亡が確認された (図. 5)。

BPA 群新生子を Normal マウスの授乳中のメスに育てさせ、その後の新生子の発育経過について観察を行ったところ、生存率は 100%であり、出生時では差が認められなかった新生子重量が離乳時期である出生後 21 日では、対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた (表. 3、 図. 6)。

表.3 Normal マウスの授乳中のメスに育てさせた時の新生子の発育経過

	出生後0日 (g)	出生後21日 (g)
対照群	1.8438 ± 0.1863	14.7861 ± 1.3297
BPA群	1.8791 ± 0.1292	21.1620 ± 1.3097*

\*対照群と比較して間有な意差あり (P<0.05) 平均±標準偏差 n=30

#### 第四節 考察

本研究では、BPAのマウス着床および胎盤形成に与える影響について検討した。BPA10mg/kg/dayを妊娠0日から妊娠7日までの8日間皮下投与することにより、着床胎子数、子宮重量および産子数が減少すること、胎盤形成および子育てに影響を及ぼすことが示された。

マウスにおける着床や胎盤形成のホルモン支配機構の研究からエストロジェンは、胚盤胞と子宮内膜における成長因子やサイトカインの生成や分泌の制御を介して着床や胎盤形成の機能支配をしていることが示されている<sup>48)</sup>。妊娠には、受精後、胚は卵管から子宮へと下降し、子宮内では胚細胞の分化が進むとともに、胚は透明帯から脱出し、やがて子宮の一定の部位に着床するという過程がある<sup>49)</sup>。この過程のうち、エストロジェンは、胚の卵管内移動と胚の子宮内分布を制御している。エストロジェン受容体(ER)の局在については、妊娠1日から妊娠8日では管腔上皮、腺上皮、間膜側の管腔上皮下間質細胞にERが局在し、

妊娠 8 日から妊娠 12 日では、基底脱落膜の間質細胞、子宮腺上皮細胞、間膜腺の間質細胞に ER が局在することが知られている<sup>48)</sup>。BPA は、弱いながらもエストロゲン活性を有しており、不可逆的に ER に結合し、DNA に働きかけて蛋白質を生産させる<sup>50)</sup>。本研究では、BPA の恒常的な ER 刺激により正常な機能に影響を与えたと考えられた。つまり、BPA が ER に結合することにより DNA の活性化、mRNA の転写、タンパクへの翻訳機構がかく乱され、エストロゲンによりタンパク合成される GM-CSF、M-CSF や LIF などのかく乱により着床機構が阻害されることにより、着床胎子数の減少および胎盤形成の異常が引き起こされたと考えられる。

着床胎子数および産子数の減少については、Xiao らによる C57BL/6 系マウスに高濃度の BPA を妊娠 0.5 日から妊娠 3.5 日まで皮下投与した報告<sup>28)</sup>と Reel らによる雌雄の CD-1 マウスに高濃度の BPA を経口投与した報告と一致する<sup>37)</sup>。また、内分泌かく乱化学物質として知られるポリ塩化ビフェニル(PCB)、フタル酸ジエチルヘキシル(DEHP)、ジクロロジフェニルトリクロロエタン(DDT)などでも、着床胎子数および産子数の減少が報告されており<sup>20,50)</sup>、これらが BPA と同様に ER への結合活性を持つことを考えると本結果を支持している。胚の卵管内移動と子宮内分布に異常を引き起こし、胚死滅を起こしたと考えられた。

胎盤には、胎子側の絨毛膜絨毛から形成される胎子胎盤部と母体側の子宮内

膜から形成される胎盤子宮部が認められる<sup>48)</sup>。妊娠 10 日および妊娠 12 日の胎盤は、臍帯側より胎盤迷路部、基底脱落膜および間膜腺の順に三層に区別される<sup>48, 49)</sup>。さらに、基底脱落膜と胎盤迷路部との境には栄養膜巨細胞層が存在し、胎盤迷路部にはグリコゲン含有細胞を含む栄養膜海綿層が存在する。本研究では、BPA 群の胎盤子宮部である間膜腺の肥厚および胎子胎盤部である胎盤迷路部の菲薄が認められ、このことより、BPA 曝露は胎盤の分化・増殖機構に対して、胎盤子宮部には増殖の方向に働き、胎子胎盤部には抑制の方向に働いたと考えられ、母体側と胎子側の胎盤の分化・増殖機構は BPA の影響に違いがあることが強く示唆された。間膜腺の肥厚は、BPA の間膜腺間質細胞 ER への不可逆的な結合による恒常的な刺激によって起こったと考えられた。

BPA 群の胎盤では栄養膜巨細胞層が確認できず、グリコゲン含有細胞もわずかに確認することができず、栄養膜海綿層の菲薄が認められた。この栄養膜巨細胞や栄養膜海綿層の退行性変化のメカニズムの可能性としては、着床数の減少のメカニズムと同様に、BPA により栄養膜細胞の増殖・分化を調節するサイトカインの産生が攪乱されたのではないかと推測される。

本研究の子宮重量の減少については、先のラットの報告<sup>14-21)</sup>や Markey らによる幼若雌マウス (CD-1 系) に対する 0.1~100 mg/kg/day 相当のカプセルを 3 日間皮下埋植実験<sup>22)</sup>や Tinwell らによる幼若雌マウス (AP 系) に対する 0.2~



200mg/kg/day を 3 日間皮下投与する実験<sup>23)</sup>による子宮重量の増加の報告と矛盾するが、本研究では着床胎子数の減少に伴う子宮重量の減少と考えられる。しかしながら、Mehmoodらによる幼若雌マウス(CD-1系)に対する0.01~100mg/kg/dayを3日間皮下投与実験<sup>25)</sup>では、子宮重量の増加が認められないことから、実験条件の相違(種と系統、餌、曝露経路、曝露時期)によることも否定できない。

本研究では、BPA群の新生子をNormalマウス雌に育てさせた場合は、離乳期まで生存したが、BPA群の新生子の多くは、母親に食いちぎられていた。母親の行動観察では顕著な変化が認められなかったが、BPAを妊娠中のマウスに与える実験で、Coxらは親と子供に<sup>51)</sup>、Ryanらは子供に<sup>52)</sup>不安行動の増大が認められることを、Vom Saalらは生まれた子が子育てに熱心でなくなるなどの行動変化が生じると報告<sup>53,54)</sup>している。これらのことから、母親の新生子への攻撃は、新生子への影響でなく、母体への影響と考えられた。

BPA群の新生子をNormalマウスの授乳中の雌に育てさせ、発育経過を観察した結果、出生時では差が認められなかった新生子の体重が、離乳期である出生21日では有意な増加が認められた。これは、Takaiらによる2細胞胚を用いたBPA曝露実験による離乳期マウスの体重が増加したという報告<sup>55)</sup>と類似性が見られるが、詳細なメカニズムは不明である。

## 第五節 小括

BPA10mg/kg を妊娠 0 日から妊娠 7 日までの 8 日間皮下投与することにより、着床胎子数、子宮重量および産子数が減少すること、胎盤形成に形態学的な異常を引き起こすことおよび子育てに影響を及ぼすことが示された。

## 第二章 マウス生殖器形成期における次世代生殖器への影響

### 第一節 緒論

内分泌かく乱物質である BPA は、弱いエストロゲン活性(エストラジオールの 1/10000-1/15000)を示し<sup>3,4,5,6)</sup>、現在世界で最も製造量が多い化学物質の一つで有り、ヒトを含めた生物への影響が懸念されている。

生殖器形成期に限定した BPA 曝露の影響については、Rubin らの妊娠 6 日目から離乳期まで飲水経口曝露することにより発情周期に異常をきたす報告<sup>26)</sup>、Howdeshel らの妊娠 11 日から妊娠 17 日まで経口投与することにより初回排卵の早期化の報告<sup>29,30)</sup>、Morrissey らの妊娠 6 日から妊娠 15 日まで経口投与することにより妊娠子宮重量や胎仔体重が減少する報告<sup>32)</sup>があるが、次世代への影響は十分に検討されていない。本研究は、胎子期、特に生殖器形成期に限定した BPA 曝露の次世代雌性生殖器系へ影響を解明することを目的として行った。

### 第二節 材料と方法

#### 1) 実験動物

全ての実験は山口大学動物実験指針に基づき実施した。ICR マウス(九動)の未経産の成熟個体(8~12 週齢)を使用した。室温 22±2°C、明時間 12 時間、暗時間

12 時間、飼料および水は自由摂取という条件で飼育した。雄との同居後、膣栓が確認された日を妊娠 0 日とした。

## 2) BPA 投与方法

ゴマ油 (Sigma Aldrich) に溶かした BPA (WAKO) 100、200、500 および 1000mg/kg bw をそれぞれ妊娠 12 日から妊娠 16 日までの 5 日間 12 時に 0.4ml 皮下投与したマウスを BPA 群とした。ゴマ油のみを妊娠 12 日から妊娠 16 日までの 5 日間 12 時に 0.4ml 皮下投与したマウスを対照群とした。

## 3) 実験方法

BPA を投与したマウスを F0 世代とし、生まれた子を F1 世代とした。F1 世代新生子には、BPA に曝露されている F0 世代の乳汁に含まれる BPA の影響をなくすため、BPA に曝露されていない里親を用意して授乳を行った。生後 21 日で離乳させ、妊娠適齢期である生後 56 日 (8 週齢) に正常な雄と交配させ、一部は生後 56 日に子宮および卵巣を採材した。F1 世代から生まれた子を F2 世代とした。F2 世代の生後 56 日に F1 世代と同様に子宮および卵巣を採材した (図 7)。

#### 4) 感受性試験

F1 および F2 世代における BPA への感受性の変化を明らかにするために行った。生後 119 日から 121 日にかけて 3 日間 BPA を F0 世代と同等の濃度を皮下投与し、その次の日に前述と同様に安楽死させ、子宮および卵巣を採材した。生後 119 日の正常な雌に同様に BPA を各濃度投与したものを対照群とした。

#### 5) 形態学的解析

採材した子宮および卵巣を 10%緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン包埋した。その後、厚さ  $4\mu\text{m}$  の切片を作製し、常法に従いヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し、光学顕微鏡にて観察を行った。

#### 6) 統計処理

F 検定を用いて等分散性を確認後、t 検定を用いて解析を行った。P<0.05 をもって有意とした。統計学的数値は平均値±標準偏差で示した。

#### 7) HOXA10 遺伝子メチル化解析

F2 世代の 56 日齢マウスを用いて HOXA10 メチル化解析を行った。採材した右子宮角から DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、そ

の後 Epiect Bisulfite kit(QIAGEN)により Sodium Bisulfite 処理を施した。

各グループ 6 個体を使用した。Bisulfite 特異的プライマーを用いて PCR 法を行い、電気泳動でゲル上にバンドが認められたものを陽性とした (図 9b)。

#### 8) メチル化特異的 PCR 法

プライマーは Bisulfite 処理した HOXA10 遺伝子配列の 5' プロモーター領域とイントロン-1 領域を標的として作製した(図 8)。これらの領域には多数の CpG アイランドが存在し、この領域のメチレーションパターンの変化は HOXA10 の調節に関与している<sup>56,57)</sup>。メチル化および非メチル化それぞれのプライマーを作製した (図 9a)。HotstarTaq DNA polymerase(QIAGEN)を使用した。PCR サイクルは、95°C5 分、95°C30 秒、53°C30 秒、72°C30 秒を 35 サイクルとした。PCR 産物は、1%アガロースゲル上にエチジウムブロマイド染色で確認した (図 9b)。

### 第三節 結果

#### 1) 体重、卵巣、子宮重量

F1 世代では、500mg/kg/day の体重、卵巣および子宮重量、卵巣および子宮の相対重量に、1000mg/kg/day の右卵巣重量に、対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた(表 4)。

表.4 F1 世代体重、子宮、卵巣重量の比較

グループ	対照群	BPA100	BPA200	BPA500	BPA1000
濃度 (mg/kg/day)	0	100	200	500	1000
個体数	7	3	5	5	7
体重(g)	33.09±3.215	29.06±1.037	33.96±2.498	28.50±2.34*	31.90±1.820
右側卵巣(mg)	7.43±2.440	5.00±1.000	7.00±0.707	4.20±0.837*	5.29±1.800*
左側卵巣(mg)	7.57±3.207	5.00±1.000	7.20±1.643	3.60±1.673*	4.00±1.633
子宮(mg)	107.9±22.77	122.7±60.25	100.4±17.81	63.4±16.80*	87.6±31.62
右側卵巣(%)	0.022±0.007	0.017±0.003	0.021±0.002	0.015±0.003*	0.017±0.006
左側卵巣(%)	0.023±0.008	0.017±0.003	0.021±0.005	0.013±0.006*	0.013±0.005
子宮(%)	0.326±0.063	0.422±0.203	0.296±0.034	0.222±0.060*	0.275±0.090

\*対照群と比較して有意な差あり (P<0.05)。平均±標準偏差

F2 世代では、200、500m および 1000mg/kg/day の体重で、対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。卵巣および子宮については、100mg/kg/day で左側卵巣重量および相対重量、右側卵巣の相対重量、子宮の重量および相対重量に、200mg/kg/day で左右卵巣の相対重量に、500mg/kg/day で左卵巣の重量および左右卵巣の相対重量に、1000mg/kg/day で左側卵巣の相対重量に、対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた(表 5)。

表.5 F2 世代体重、子宮、卵巣重量の比較

グループ	対照群	BPA100	BPA200	BPA500	BPA1000
濃度 (mg/kg/day)	0	100	200	500	1000
個体数	12	7	7	7	7
体重(g)	28.73±2.713	29.27±2.916	31.03±0.820*	31.66±1.207*	32.87±2.520*
右側卵巣(mg)	4.42±0.996	3.43±1.272	3.71±0.756	3.29±1.496	4.86±2.035
左側卵巣(mg)	4.75±0.622	3.71±1.113*	4.14±1.464	3.00±1.732*	4.14±0.900
子宮(mg)	99.8±37.17	66.1±9.05*	99.9±23.55	121.7±69.70	115.3±35.57
右側卵巣(%)	0.015±0.003	0.012±0.004*	0.012±0.002*	0.010±0.005*	0.015±0.006
左側卵巣(%)	0.017±0.003	0.013±0.004*	0.013±0.004*	0.009±0.006*	0.013±0.002*
子宮(%)	0.347±0.133	0.226±0.042*	0.322±0.075	0.384±0.218	0.351±0.119

\*対照群と比較して有意な差あり (P<0.05) 平均±標準偏差

感受性試験では、F1世代の1000mg/kg/dayの体重で、F2世代では100mg/kg/dayの左側卵巢重量および1000mg/kg/dayの体重で、対照群と比較して統計学的に有意な減少が認められた(表6)。

表.6 感受性試験における体重、子宮、卵巢重量の比較

対照群	BPA100	BPA200	BPA500	BPA1000
濃度 (mg/kg/day)	100	200	500	1000
個体数	3	3	3	3
体重(g)	37.76±4.884	42.42±2.002	39.95±5.834	42.45±2.316
右側卵巢(mg)	7.67±0.577	8.00±1.000	7.00±1.000	8.00±4.359
左側卵巢(mg)	7.33±1.528	7.00±2.000	5.67±1.526	8.00±1.732
子宮(mg)	164.7±47.29	166.3±47.44	101.3±44.64	131.0±20.08
相対重量 右側卵巢(%)	0.020±0.004	0.019±0.003	0.018±0.004	0.019±0.010
左側卵巢(%)	0.019±0.007	0.017±0.006	0.014±0.004	0.019±0.004
子宮(%)	0.436±0.135	0.392±0.124	0.254±0.103	0.309±0.046
F1世代	BPA100	BPA200	BPA500	BPA1000
濃度 (mg/kg/day)	100	200	500	1000
個体数	3	4	6	3
体重(g)	39.23±2.750	43.27±4.326	38.24±3.244	31.16±2.821*
右側卵巢(mg)	8.00±1.000	9.50±2.082	7.67±2.066	5.67±1.528
左側卵巢(mg)	8.33±0.577	8.25±2.062	7.83±2.041	5.67±2.082
子宮(mg)	157.7±21.50	151.3±14.29	161.3±45.35	98.0±29.51
相対重量 右側卵巢(%)	0.020±0.004	0.022±0.004	0.020±0.007	0.018±0.004
左側卵巢(%)	0.021±0.003	0.019±0.003	0.020±0.006	0.018±0.005
子宮(%)	0.402±0.062	0.350±0.062	0.422±0.135	0.315±0.059
F2世代	BPA100	BPA200	BPA500	BPA1000
濃度 (mg/kg/day)	100	200	500	1000
個体数	3	3	3	3
体重(g)	36.47±2.409	35.97±4.11	36.47±1.767	36.50±1.709*
右側卵巢(mg)	5.67±2.082	6.67±1.528	6.00±1.000	6.00±1.732
左側卵巢(mg)	5.00±1.000*	7.67±1.155	6.00±1.732	5.00±0.000
子宮(mg)	138.7±64.66	147.7±80.79	96.3±29.02	102.7±5.69
相対重量 右側卵巢(%)	0.016±0.005	0.019±0.002	0.016±0.002	0.016±0.005
左側卵巢(%)	0.014±0.002	0.021±0.002	0.016±0.004	0.014±0.001
子宮(%)	0.380±0.160	0.411±0.224	0.264±0.082	0.281±0.003

\*対照群と比較して有意な差あり (P<0.05)

平均±標準偏差



## 2) 形態学的変化

子宮については、F1 世代では管腔の拡大、上皮の欠損、管腔の閉塞化、内膜の一部欠損、横断面の径の縮小化が、F2 世代では管腔の拡大、上皮の欠損、管腔の閉塞化が認められた(図 10)。F1 世代のみで認められた径が縮小化した子宮は 500 および 1000mg/kg/day の高濃度のグループで、複数の個体で認められた。内膜の一部欠損は 1000mg/kg/day で認められた。内膜の欠損した部位には、上皮は存在した。

F1 世代および F2 世代の両方で認められた管腔の拡大が、子宮内膜の減少によるものか子宮径の増加によるものかを明らかにするため、切片上で子宮内膜面積を計測したところ子宮内膜面積に変化はなかった。上皮の欠損は高濃度群だけでなく、200mg/kg/day でも認められた。図 10i では間膜側に欠損が起こっている。上皮の欠損が認められた他の個体では壁側でも欠損が認められており、欠損部位に統一性はなかった。これらの形態学的な変化が見られた子宮でも異なる部位では正常であったため、これらの異常は子宮全体で起こっているものではない。

卵巣については、F1 世代では卵巣間質細胞の増殖と見られる変化が認められ、F1 世代および F2 世代両方において対照群と比較して、卵胞の成熟度合いに違いが見られた(図 11b, c)。

感受性試験では、F1 世代および F2 世代ともに対照群と比較して、子宮腺の数の増加が認められた(図 12)。対照群、F1 世代および F2 世代の子宮腺数を計測し、各グループの中で子宮腺数が最小の切片、最大の切片をそれぞれ比較した結果、最小の切片においては対照群が 26 であったのに対し、F1 世代が 37、F2 世代が 29 であり、最大の切片においては対照群が 123 であったのに対し、F1 世代が 168、F2 世代が 196 であった。卵巣においては、特に注目すべき変化は認められなかった。

### 3) F2 世代 HOXA10 メチル化解析

対照群のプロモーター領域およびイントロン領域それぞれにおいてメチル化および非メチル化の混合パターンが認められた。BPA 群では、100 および 200mg/kg/day でイントロン領域での非メチル化が認められた(表 7)。

表. 7 F2 世代における子宮での HOXA10 遺伝子メチレーションパターン

グループ		対照群	BPA100	BPA200
濃度 (mg/kg/day)		0	100	200
プロモーター 領域	非メチル化	6/6	3/6	6/6
	メチル化	6/6	5/6	4/6
イントロン 領域	非メチル化	6/6	6/6	6/6
	メチル化	6/6	0/6	2/6

#### 第四節 考察

本研究では、BPA の生殖器形成期に与える影響について検討した。BPA100～1000mg/kg/day を妊娠 12 日から妊娠 16 日までの 5 日間皮下投与することにより、生殖器系に形態学的な変化を引き起こし、直接曝露されていない F2 世代へも形態学的・分子生物学的な変化を引き起こすことを明らかにした。

本研究により、胎子期に限定した曝露で F1 世代では体重の減少が、F2 世代では体重の増加が引き起こされることが示された。胎子期から新生子への曝露における実験において、SD 系ラットの妊娠 6 日から離乳期まで BPA を飲水経口曝露した Rubin らの報告<sup>26)</sup>では F1 世代の雌雄に、CF-1 系マウスの妊娠 11 日から妊娠 17 日まで BPA を経口投与した Howdeshell らの報告<sup>30)</sup>では F1 世代の雌に、体重の増加が認められたが、新生子 CD-1 マウスの生後 1 日から生後 5 日まで BPA を皮下投与した Newbold らの報告<sup>33)</sup>、SD ラットの妊娠 11 日から離乳期まで BPA を経口投与した Kwon らの報告<sup>34)</sup>、Long Evans ラットの妊娠 7 日から離乳期まで BPA を経口投与した Howdeshell らと Ryan らの報告<sup>35,36)</sup>では、F1 世代に体重の変化は認められていない。

F0 の交配 1 週間前から F2 世代の離乳まで BPA を曝露する 2 世代生殖毒性試験において、SD ラットを用いた Ema らの報告<sup>38)</sup>では、F1 世代では体重に変化がなかったが F2 世代の投与初日に体重が減少したことが、CD-1 マウスを用いた

Reel らの報告<sup>37)</sup>では、F1 世代に体重影響がないことが、同様に CD-1 マウスを用いた Ty1 らの報告<sup>39)</sup>では、F1 世代の雄に体重減少が、SD ラットを用いた 3 世代繁殖毒性試験の Ty1 らの報告<sup>40)</sup>では、50mg/kg/day で雄の F1 世代および F2 世代、雌の F1 世代で体重の減少が、500mg/kg/day で雌雄ともに F1 世代および F2 世代の体重減少が認められている。

F1 世代に関しては、体重の増加、減少、変化なしの報告があり、F2 世代に関しては、体重の減少と変化無しの報告があり性差も認められた。これらの実験は、動物種、曝露時期や期間、曝露形態も異なる。経口投与でも、飲水曝露は動物が頻繁に飲水するため一定の曝露状態が継続すると考えられるが、混餌曝露は動物が餌を消灯直後と点灯直前に食べることから一定とは言いがたい曝露状態となる。F1 世代および F2 世代への BPA の曝露量（血中濃度）が不明であり、曝露量で比較した考察はできないが、トータルに考えると、BPA の F1 世代および F2 世代への体重への影響は、曝露時期や曝露状態により感受性が異なると考えられる。減少に動く感受性の高い時期と曝露量、増加に動く感受性の高い時期と曝露量が存在するのかもしれない。F2 世代への体重の影響に関しては、欧州食品安全機関（European Food Safety Authority : EFSA）などが NOAEL を算出するのに採用している試験である Ty1 らの報告<sup>39)</sup>では減少を示し、本実験では増加を示した。妊娠 12 日から妊娠 16 日までの 5 日間皮下投与が、F1 世代に影響を与

えない用量においても F2 世代に影響を及ぼしたことは、マウスにおいては、妊娠 12 日から妊娠 16 日にかけて感受性が高い時期が存在するのかもしれない。

子宮や卵巣重量に関しては、F1 世代および F2 世代ともに、実重量および相対重量で低下が認められた。これらの結果は、Marky らが報告<sup>31)</sup>した子宮内膜重量の減少と相関する。F2 世代においては、用量相関性は認められず、設定した最低用量でも臓器重量に変化が認められた。BPA により生殖器系の形成がかく乱され、その影響は F2 世代にも残っていることが考えられる。

感受性試験においては、体重、子宮および卵巣重量に特筆すべき変化は見られなかった。これは BPA 曝露後すぐに採材したためと考えられる。形態学的な観察においては、卵巣では特に目立った差異は認められなかったが、子宮では子宮腺の明らかな増加を示した。BPA は、エストロゲン受容体  $\alpha$  と  $\beta$  に結合する<sup>54, 55)</sup>。BPA のエストロゲン様作用によって引き起こされたものと考えられる。Marky らの報告<sup>29)</sup>によれば BPA 曝露はエストロゲン受容体  $\alpha$  を増加させる。エストロゲン受容体  $\alpha$  の増加が BPA のエストロゲン様作用を強めた可能性が示唆された。F1 世代だけでなく F2 世代でも、子宮腺の増加が認められたことから、BPA に対する感受性は増加し、それは、BPA の影響が次世代へと引き継がれたと考えられる。

F1 世代および F2 世代の両方で認められた異常である管腔の拡大も 500 およ

び 1000mg/kg/day といった高濃度で認められた。管腔の拡大が子宮内膜の減少によるものか子宮径の増加によるものかを明らかにするため切片上で子宮内膜面積を計測したところ、子宮内膜面積に変化はなかった。子宮腺および子宮上皮ともに確認できた。子宮の円周が大きくなったために管腔の拡大が生じたものと考えられる。

管腔の閉塞化は、F1 世代および F2 世代両方における 1000mg/kg/day で認められた。上皮付近の子宮内膜細胞が過形成を起こし、子宮内膜面積が増加したことで管腔が閉塞しているように見える。上皮の欠損は高濃度群だけでなく、200mg/kg/day でも認められた。上皮の欠損が見られた他の個体では壁側での欠損が認められており、欠損部位に統一性はなかった。これらの形態学的な変化が見られた子宮でも異なる部位では正常であったため、これらの異常は子宮全体で起こっているものではないと考えられた。

本研究では、形態学的観察において、子宮腺の増加以外にも、子宮において変化が引き起こされることを明らかにした。BPA 曝露による子宮の形態学的な異常は、子宮上皮細胞の肥厚、子宮筋層の肥厚、子宮間質細胞の肥厚が報告されているが<sup>25)</sup>、これらは曝露後すぐに採材した子宮を用いており、胎子期に曝露し、成熟してから認められた形態異常は報告がない。高濃度を投与したにもかかわらず、投与群すべての個体で見られたわけではないが、本研究で認められた形態

変化から、過去の報告よりもより子宮へ悪影響を与えていることが示唆された。また、F2 世代では、F1 世代の異常がすべて見られたわけではないが、子宮管腔の拡大、子宮管腔の閉塞化および上皮の欠損が確認された。F2 世代でもこのような異常が認められたメカニズムは不明だが、BPA の影響が何らかの形で残存していたと考えられる。

卵巣の形態学的異常については、F1 世代で卵巣間質細胞の増殖、F1 世代および F2 世代両方において対照群と比較しての卵胞の成熟度合いの違いを明らかにした。Marky らは、胎子期曝露で胞状卵胞が増加し黄体が減少する傾向にあると報告している<sup>60)</sup>。本研究では黄体が大部分を占めているもの(図 11b)、卵胞が大部分を占めているものなどが観察され(図 11c)、卵巣の変化に傾向は見られない。高用量の BPA 曝露では低用量曝露よりも大きく、エストロジェン、プロゲステロンのバランスがかく乱されているのかもしれない。

F2 世代で行った HOXA10 遺伝子メチル化解析によって、子宮においてイントロン領域でコントロールと比較して脱メチル化が引き起こされていることが示された。この結果は、Bromer らの妊娠 9 日から妊娠 16 日に 5mg/kg/day の BPA を皮下投与した CD-1 マウス胎子の子宮から抽出した DNA の HOXA10 遺伝子はプロモーター領域およびイントロン領域の両方において低メチル化を示した報告<sup>46)</sup>と Smith らの BPA 投与により HOXA10 発現が増加しているという報告<sup>45)</sup>と相関す

るが、Varatoud-J らの生後 1、3、5 および 7 日に 20mg/kg/day の BPA を皮下投与した生後 80 日の Wistar ラットの子宮から抽出した DNA の HOXA10 遺伝子発現レベルの有意な低下を示した報告<sup>61)</sup>とは反する。曝露時期や種など実験プロトコールが大きく異なり、単純に比較はできないが、形態学的な変化だけではなく、分子生物学的にも BPA が影響していることが示唆される。DNA メチレーションは発生の初期段階でリセットされ、その後再構築される<sup>62)</sup>。遺伝子上の変化によってこの再構成がうまくいかず、F1 世代が子宮内で受けた修飾が完全には修復されずに、F2 世代に引き継がれたことが考えられる。

本研究では、生殖器形成期という限定された短い期間だけの曝露において、曝露を受けていない第 F2 世代に形態学的な変化だけではなく、分子生物学的にも影響が認められた。曝露を受けていない次世代影響世代については、Salian らが F2 世代および F3 世代の雄に生殖能の低下が認められたことを<sup>63)</sup>、Wolstenholme らが F2 世代および F4 世代に脳の遺伝子発現や行動異常を引き起こすことを<sup>64)</sup>報告している。本研究で認められた生殖器形成期のみに限定した次世代への影響は、メカニズムは不明だが、BPA による影響であることが強く示唆された。



## 第五節 小括

BPA100～1000mg/kg/day を妊娠 12 日から妊娠 16 日までの 5 日間皮下投与することにより、生殖器系に形態学的な変化を引き起こし、直接曝露されていない F2 世代へも、F1 世代が子宮内で受けた修飾が完全には修復されずに、形態学的・分子生物学的な変化を引き起こすことが示された。

### 第三章 総合考察

#### BPA の低用量問題について

内分泌かく乱化学物質が大きく取り上げられたのは、1996 年に出版された Our Stolen Future (奪われし未来) であるが、Vom Saal らのグループの雌のマウスの妊娠 11 日から 17 日の間に BPA を 0.002~0.02mg/kg を強制経口投与した実験において、Nsgel らは、0.02mg/kg および 0.002mg/kg/day において F1 世代で前立腺重量の増加を<sup>3)</sup>、Vom Saal らは、0.02mg/kg/day において F1 世代で精子生産率の低下、0.002mg/kg/day において F1 世代で包皮腺重量の増加と精巣上体重量の減少を<sup>53)</sup>報告した。この用量は、許容濃度の 1/2000~1/20000 にあたる。Vom Saal らは、これまで影響を表すと考えられていたよりもはるかに少ない量で影響が認められ、用量反応パターンは逆 U 字型を示すと報告し、ホルモン様作用を持つ物質の場合には、従来考えられていたよりも低い用量で生殖や発育に悪影響を引き起こすという低用量仮説を主張した。これらの実験は、一般的なプロトコールに従っていない小規模の研究であり、GLP 施設で実施されていないこと、使用動物数が少ないことなどを理由に試験の信頼性が疑問視された。再現性の確認のため多くの確認実験が行われた。例えば、Ashby らは、Nsgel や Vom Saal と同じ系統のマウス、同じ投与経路、同じ投与

用量の実験で<sup>65)</sup>、Cagenらは、同様に、NsgelやVom Saalと同じ系統のマウス、同じ投与経路、投与用量については、0.0002mg/kg~0.2mg/kgと濃度範囲を広げた実験で<sup>66)</sup>、異常が認められなかったことを報告した。また、Cagenらは、雌のWistarラットで交配2週間前、同居中2週間、妊娠中(21-22日間)、さらに哺乳中22日間の計約10週間飲水曝露した実験(BPA量は、0.001mg/kg/day~1mg/kg/dayに相当)で、F1世代に異常が認められなかったことを報告した<sup>67)</sup>。

低用量仮説について、ハーバード大学・リスク分析センターが招集したパネルは、BPAの低用量作用に関する研究報告書について、再現性の立証、研究の実施と分析の適正性、動物の異常の相違を検出できるプロトコールであるかなど証拠の重み付けを行い、その結果、メカニズムとしてエストロゲン様活性に関しては、既知のエストロゲン化合物と比較した場合、BPAの反応パターンに相違があるなど懐疑的であり、BPAの低用量作用の一貫した肯定的証拠は見いだせないと結論つけた<sup>68)</sup>。また、多くの専門家が関与したTy1らの2世代繁殖毒性試験で2世代繁殖毒性試験には低用量作用がないことが報告<sup>39)</sup>されたことなどから、生殖毒性に関しては、低用量作用はないと結論つけられたと考えられる。

しかしながら、2010年の日本の食品安全委員会の「ビスフェノール A (BPA) に関する健康影響について中間取りまとめ」<sup>69)</sup>、FAO/WHO の「ビスフェノール A の毒性学的及び健康的側面」<sup>70)</sup>では、様々な BPA に関する低用量での影響に関しては、得られた結果の毒性学的意義が明らかになれば懸念となる可能性はあるが、毒性学的な意義などの結果解釈が困難なことや観察結果の妥当性や関連性にかかなりの不確実性があることから TDI (耐容一日摂取量) の設定には至っていない。

2012年には、EUの食品安全システムの中で、科学的リスク評価を行う EFSA は、脆弱集団への曝露に焦点を絞り、曝露と低用量の影響にフォーカスした再評価を開始することを決定し、その結果を2015年1月に発表した。その報告書<sup>71)</sup>では、懸念されている低用量による生殖系への影響の根拠はありそうにない(not likely)と判断し、EFSA news<sup>72)</sup>では、「No consumer health risk from bisphenol A exposure」と発表した。低用量問題の結果の不一致は、BPAは極めて低用量で影響を示すため、実験条件の相違(用いた動物の種と系統、動物の餌、パラメーターの性質、ケージ・飲料水容器の材質、陽性対照の欠如)が、異なる結果を導いたと推定している。

毒性学の基本的考え方は、生体に与える影響には毒性発現の閾値があり、用量を増加させることにより毒性発現が増大しシグモイド型で表されるような関

係を示すと考えられている。毒性試験では、毒性が明らかに出現する用量を最高用量として、毒性が認められない用量をカバーし、どの用量でどのような有害性が生じ、どの用量でその有害性が消失するのか、すなわち、NOAEL を求める。BPA の低用量問題から、毒性が認められない用量以下の低用量でも毒性が認められる逆U字効果を内分泌かく乱化学物質は有することが懸念された。今までの国際的な評価を総合して考えると、長い年月を経たが、低用量問題は、毒性学の根幹を揺るがすことなく収束すると思われる。

#### ヒトにおける有害影響

最近の疫学的な調査では、Li らは、BPA の職業曝露が予想される労働者の疫学的調査を行い男性の性機能不全に高いリスクを示すと結論<sup>73)</sup>つけ、Braum らやPerera らは、出生前の母体の尿中 BPA と女兒の児童行動とに関連性が認められたと報告している<sup>74, 75)</sup>。一方、Yolton らやMiodovnic らは、妊婦尿中 BPA レベルと幼児の神経行動との間に<sup>76)</sup>、妊婦尿中 BPA レベルと社会的応答性尺度による社会問題との間に<sup>77)</sup>、有意な関連性は認められないことを報告している。疫学的にも、相反する報告が散見されている。疫学的な調査の問題点として、BPA の体内半減期は短く、BPA の曝露タイミングなどの曝露状況を明確して比較することが難しいことや尿中の BPA 濃度には個人差があることなどが指

摘されている。BPA が約 50 年に渡り使用されてきて化学物質であることや今までにおいて、ヒトにおいて顕在化した有害性（生殖障害などを含め）が報告されていないことを考えると、BPA の疫学的調査から、BPA の有害性を立証することは難しいと考えられる。

ヒトにおける BPA の有害影響評価において EFSA は、2006 年に、過去に EU の食品に関する科学委員会（SCF）が 2002 年に暫定した耐容 1 日摂取量（Tolerable Daily Intake:TDI）0.01mg/kg/day を再評価して、TDI を 0.05mg/kg/day とした<sup>78)</sup>。Ty1 らの 3 世代生殖毒性試験<sup>40)</sup>に加え、新たに、Ty1 らの 2 世代生殖毒性試験<sup>39)</sup>の結果（ともに NOAEL は、5mg/kg/day）を考慮して、不確実係数 500 でなく不確実係数 100 を適用した結果である。2008 年には、不確実係数を妥当と判断し、TDI を変更する必要はないとした<sup>79)</sup>。2010 年には、新たな論文を加えレビューし、子宮内曝露の出生児の生殖器系への影響に関して、5mg/kg/day より低い用量で悪影響を報告している研究は動物数の不足、用量相関性が認められないなど重要な欠点があり、欠点がない有効な試験では BPA の生殖および発生に対する毒性に関して、5mg/kg/day より低い用量では懸念は生じておらず、TDI を見直すためのいかなる新しい証拠も特定できないと結論つけた<sup>80)</sup>。2015 年には、新たなデータと精巧な方法論により、BPA の安全係数を 100 から 150 に、TDI を 0.05mg/kg/day から 4  $\mu$  g/kg/day に変更し

た<sup>71)</sup>。この値は、あらゆる曝露源の組み合わせ（食事、ダスト、化粧品、感熱紙など）からの推定される曝露量の1/3~1/5であり、EFSAは、BPAは消費者（胎児・乳幼児を含む全年齢）に健康リスクはない（生態系への影響の根拠はありそうにない：not likely）と結論つけた。

米国においては、2008年に、米国環境健康科学研究所は、国家毒性プログラム（National Toxicology Program：NTP）がビスフェノールA最終報告書を公開した<sup>81)</sup>。ここでは、動物実験で認められた変化が、ヒトに適用できるか、それらが明らかな健康被害をもたらすかについてはかなりの不確実性があるが、BPAがヒトの発達に与える影響の可能性は排除できないとし、胎児、乳児、子供の前立腺、脳、行動に対する影響に関して、「いくらかの懸念がある（some concern）」としている。2014年には、米国食品医薬品局（U. S. Food and Drug Administration：FDA）は、新しい文献や独自に行った実験から、BPAは食品に関わる現在の曝露レベルでは安全であるとの見解を示した<sup>82)</sup>。

BPAは、50年来身近な所で使用されてきた物質であり、疫学的に顕在化した有害性の報告はない。にもかかわらず、エストロゲン活性を持つが故に、正常なホルモン性機能をかく乱しヒト健康へ悪影響を与える可能性が指摘された。BPAよりも多く有害性評価に関する実験が行われた物質はないと考えられる。莫大なコストと時間を費やした結果、国によってはポリカーボネイト製の

ほ乳瓶の使用禁止など様々な曝露防止を目的とした規制もなされてきたが、20世紀末より懸念されていたBPAのヒトにおける有害影響に関しては、事実上、安全宣言が公表されたと考えられる。しかしながら、今後も、曝露防止に留意した利用が必要であろう。

実験は、目的を明確にし、目的が達成できる手段・方法で行わなければならない。国際的なガイドラインに準拠した試験の結果が、信頼性が高いとしてリスク評価に用いられた。ガイドラインは、特定の有害性を検出するための試験法であり、手段・方法が的確であるかの検証のため、既知の有害性物質を用いて複数機関が参加するバリデーションを経て制定される。これらのことは、再現性などを含めた試験の信頼性を高める。このことから、これらの試験から得られたNOAELは信頼でき、重きを置かれることは妥当である。しかしながら、ガイドラインは、あくまでも、既知の有害性を検出する試験手段である。BPAは、どの様な有害性が引き起こされるのか不明なため、ガイドライン以外の手段・方法で実験を行う必要があった。多くの実験で様々な影響が報告されたが、中には毒性学的な意義が不明で、認められた影響がヒト健康への懸念となり得るのか、結果の解釈が難しいと専門家に判断された報告も散見されている。

ガイドライン準拠と同等に重視されたのが、Good Laboratory Practice (GLP)



であるか否かであった。GLP は、医薬品の等の開発のために行われる非臨床試験（安全性試験）のデータの信頼性を確保するために実施基準である。GLP 機関には、試験間の手技によるバラツキなどが最小限になるように標準作業手順書が整備されるなど、信頼性確保のために様々な要求事項がある。つまり、GLP は実験の精度の担保となる。再現性が得られない実験が散見されてことは、信頼性確保の姿勢が不十分だったことが考えられる。GLP は、認証が必要で、コストがかかり、アカデミアでは現実的ではない。しかしながら、アカデミアにおいても、標準作業手順書を整備するなど、信頼性確保のため取り組みは必要である。

## 総括

本研究は、ヒトへの健康影響評価の一助になることを大目標として行われ、F2 世代においても生殖器の形態的变化および分子生物学的な異常を引き起こし、BPA の影響が、曝露されていない次世代にも残存する可能性を示し、毒性的意義やメカニズムが明らかになれば、米国食品医薬品局や欧州食品安全機関が「ヒトに健康リスクはない」と発表していることへの懸念となることを示した。

内分泌かく乱化学物質の影響は、低用量でも、感受性の高い時期と曝露時期が一致した場合、影響が顕在化する。しかしながら、感受性の高い時期は、必ずしも既知ではない。このため、常時低用量であるが曝露されているヒトにおいても、今回認められた分子生物学的な影響が起こることは否定できず、常に曝露され続けている我々人間への BPA の影響は懸念が残るが、形態学的に様々な異常が見られたにもかかわらず、F1 世代は正常に子孫を残しており、F2 世代でも正常に発情周期が回っていることが確認されている。今回認められた次世代への BPA の影響は、クリティカルなものではないのかもしれない。内分泌かく乱物質としての BPA の危険性も考慮しながら、しかしあまり過敏に反応することなく、利用していくことが重要であると考えます。

## 要約

内分泌かく乱物質であるビスフェノール A (4,4'-isopropylidenediphenol; BPA) は弱いエストロゲン活性 (エストラジオールの 1/10000-1/15000) を示し、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の原料、フェノール樹脂、酸化防止剤などの原料として使用されており、ヒトの健康影響が懸念されている。ヒトへの曝露および曝露量における内分泌かく乱作用の有無に関して様々な取り組みがなされており、げっ歯類を用いて BAP の生殖毒性的を調べる実験は、数多く行われて来ており、多世代生殖毒性試験も行われ NOAEL が算出されているが、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分に検討されていない。そこで、本研究は、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を解明すること、また、胎子期、特に生殖器形成期に限定した BPA 曝露次世代雌性生殖器系へ影響を及ぼすかどうかを解明することを目的として実施した。

着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響に関しては、ICR マウスに BPA10mg/kg を妊娠 0 日から妊娠 7 日まで皮下投与した。妊娠 10 および妊娠 12 日に開腹し、妊娠子宮を採取した後、着床胎子数および子宮重量を測定した。その後、光学顕微鏡を用いて胎盤の形態学的観察を行った。

生殖器形成期のみ限定した BPA の曝露が次世代の生殖機能への影響に関しては、ICR マウスに BPA を 100、200、500 および 1000mg/kg/day を妊娠 12 日か

ら妊娠 16 日まで皮下投与した。産子 (F1) は、BPA に曝露させることなく、性成熟期である生後 56 日に正常の雄と交配させ分娩させ授乳させた。F1 世代および F2 世代の雌は生後 56 日に体重を計測した後安楽死させ、子宮および卵巣を採材し、子宮および卵巣重量を計測し、形態学的解析を行った。また、BPA に対する感受性を調べるため、雌の F1 世代および F2 世代に、BPA を F0 と同等の濃度を 3 日間投与し、最終投与翌日に前述と同様に処理した。エピジェネティクスな影響を調べるため、F2 世代の子宮より抽出した DNA を用いて HOXA10 遺伝子のプロモーター領域およびイントロン領域におけるメチル化解析を行った。

着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響に関しては、着床胎子数、子宮重量および産子数が減少すること、胎盤形成および子育てに影響を及ぼすことが示された。

生殖器形成期のみ限定した BPA の曝露が次世代の生殖機能への影響に関しては、F2 世代に、体重の増加が認められ、子宮においては、子宮重量の減少、子宮腺の増加など形態学的変化が認められ、卵巣においては、卵巣重量の減少、および卵胞の成熟度合いに違いが認められた。感受性試験では、F2 世代で感受性の増加し、HOXA10 メチル化解析ではイントロン領域での非メチル化が認められた。これらの結果から、F2 世代においても生殖器のさまざまな形態的および

分子生物学的な異常を引き起こし、BPA の影響が次世代にも残存する可能性を示した。

本研究は、着床期から胎盤形成期の BPA 曝露による影響と生殖器形成期に限定した BPA 曝露により、着床期から胎盤形成期の BPA 曝露は、胎盤構造や子育てに影響を及ぼすことを、生殖器形成期に限定した BPA 曝露は、F2 世代においても生殖器に形態学および分子生物学的な影響を及ぼすことを明らかにした。

## 謝辞

本研究を終了するにあたり、本論文の御校閲を賜りました獣医解剖学研究室の木曾康郎先生に深く感謝いたします。また、終始研究の御指導を頂きました日下部健先生、加納聖先生、松元光春先生、佐藤晃一先生に深く感謝いたします。

また様々な御助言を頂いた国分啓司、脇本雄樹、檜山雅人の後輩をはじめとし、研究室の皆様にも厚く感謝いたします。

## 文献

1. 国際化学物質安全計画 (International Program on Chemical Safety) 世界保健機構(1980).
2. Colborn, T., Vom Saal F.S. and Soto A.M. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans., *Environ. Health Perspect.*, 101, 378-384.
3. Nagel S.C., Vom Saal F.S., Thayer K.A., Dhar M.G., Boehler M. and Welshons W.V. (1997) Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol., *Environ. Health Perspect.*, 105, 70-76.
4. Sheeler C.Q., Dudley M.W. and Khan S.A. (2000) Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast: Activity potentiated by the coactivator RIP140., *Environ. Health Perspect.*, 108, 97-103.
5. Blair R.M., Fang H., Branham W.S., Hass B.S., Dial S.L., Moland C.L., Tong W., Shi L., Perkins R. and Sheehan D.M.. (2000) The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands., *Toxicol. Sci.*, 54, 138-153.
6. Witorsch R.J. (2002). Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature., *Food Chem. Toxicol.*, 40, 905-912
7. 経済産業省 平成24年 化学工業統計年報  
[http://www.meti.go.jp/statistics/tyo/seidou/result/gaiyo/resourceData/02\\_kagaku/nenpo/h2dbb2012k.pdf#search='%E5%8C%96%E5%AD%A6%E5%B7%A5%E6%A5%AD%E7%B5%B1%E8%A8%88%E5%B9%B4%E5%A0%B1'](http://www.meti.go.jp/statistics/tyo/seidou/result/gaiyo/resourceData/02_kagaku/nenpo/h2dbb2012k.pdf#search='%E5%8C%96%E5%AD%A6%E5%B7%A5%E6%A5%AD%E7%B5%B1%E8%A8%88%E5%B9%B4%E5%A0%B1')
8. Biles J.E., McNeal T.P. Begley T.H. and Hollifield H.C. (1997). Determination of bisphenol-A in reusable polycarbonate food-contact plastics and migration to food simulating liquids., *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3541-3544.
9. European Food Safety Authority  
<http://www.efsa.europa.eu/en/faqs/faqbisphenol>

10. Cao X.L., Perez-Locas C., Dufresne G., Clement G., Popovic S., Beraldin F., Dabeka R.W. and Feeley M. (2011) Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study., *Food Additives and Contaminants*, 28, 791-798.
11. Ikezuki Y., Tsutsumi O., Takai Y., Kamei Y. and Taketani Y. (2002) Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure., *Hum. Reprod.*, 17, 2839-2841.
12. Tsutsumi O. (2005) Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 93, 325-330.
13. Yamada H., Furuta I., Kato E.H., Kataoka S., Usuki Y., Kobashi G., Sata F., Kishi R. and Fujimoto S. (2002) Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester., *Reprod. Toxicol.*, 16, 735-739.
14. Ashby J. and Tinwell H. (1998). Uterotrophic activity of bisphenol A in the immature rat., *Environ. Health Perspect.*, 106, 719-720
15. Yamasaki K., Sawaki M. and Takatsuki M. (2000) Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. *Environ., Health Perspect.*, 108, 1147-1150.
16. Yamasaki K., Takeyoshi M., Yakabe Y., Sawaki M., Imatanaka N. and Takatsuki M. (2002) Comparison of Reporter Gene Assay and Immature Rat Uterotrophic Assay of Twenty-three Chemicals., *Toxicology*, 170, 21-30.
17. Laws S.C., Carey S.A., Ferrell J.M., Bodman G.J. and Cooper R.L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats., *Toxicol. Sci.*, 54, 154-167
18. Ashby J., Odum J., Paton D., Lefevre P.A., Beresford N. and Sumpter J.P. (2000). Re-evaluation of the first synthetic estrogen, 1-keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthrene, and bisphenol A, using both the ovariectomised rat model used in 1933 and additional assays., *Toxicol. Lett.*, 115, 231-238
19. Cook J.C., Kaplan A.M., Davis L.G. and O'Connor J.C. (1997). Development of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs)., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 26, 60-68



20. Dodge J.A., Glasebrook A.L., Magee D.E., Phillips D.L., Sato M., Short L.L. and Bryant H.U. (1996). Environmental estrogens: Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat., *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 59, 155-161
21. Steinmetz R., Mitchner N.A., Grant A., Allen D.L., Bigsby R.M. and Ben-Jonathan N. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract., *Endocrinology*, 139, 2741-2747
22. Markey C.M., Michaelson C.L., Veson E.C., Sonnenschein E. and Sato A.M. (2001). The mouse uterotrophis assay: A reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A., *Environ. Health Perspect.*, 109, 55-60
23. Tinwell H., Joiner R., Pate I., Soames A., Foster J. and Ashby J. (2000). Uterotrophic Activity of Bisphenol A in the Immature Mouse., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 32, 118-126
24. Papaconstantinou A.D., Umbreit T.H., Fisher B.R., Goering P.L., Lappas N.T. and Brown K.M. (2000). Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alterations in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor., *Toxicol. Sci.*, 56, 332-339
25. Mehmood Z., Smith A.G., Tucker M.J., Chuzel F. and Carmichael N.G. (2000) The development of methods for assessing the *in vivo* oestrogen-like effects of xenobiotics in CD-1 mice., *Food Chem. Toxicol.*, 38, 493-501
26. Rubin B.S., Murray M.K., Damassa D.A., King J.C. and Soto A.M. (2001) Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels., *Environ. Health Perspect.*, 109, 675-680.
27. Spencer F., Chi L., Zhu M., Nixon E. and Lemelle C. (2002) Uterine molecular responses to bisphenol A treatment before and after decidual induction in pseudopregnant rats., *Int J Hyg Environ Health.*, 204, 353-357.
28. Xiao S., Diao H., Smith M.A., Song X. and Ye X. (2011) Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice., *Reprod. Toxicol.*, 32, 434-441.

29. Howdeshell K.L., Hotchkiss A.K., Thayer K.A., Vandenberg J.G. and Vom Saal F.S. (1999) Exposure to bisphenol A advances puberty., *Nature*, 401, 763-764.
30. Howdeshell K.L. and Vom Saal F.S. (2000) Developmental exposure to Bisphenol A: interaction with endogenous estradiol during pregnancy in mice., *Am. Zool.*, 40, 429-437.
31. Markey C.M., Wadia P.R., Rubin B.S., Sonnenschein C. and Soto A.M. (2005) Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract., *Biol. Reprod.*, 72, 1344-1351.
32. Morrissey R.E., George J.D., Price C.J., Tyl R.W., Marr M.C. and Kimmel C.A. (1987) The developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice., *Fundam Appl Toxicol*, 8, 571-582.
33. Newbold R.R., Jefferson W.N. and Padilla-Banks E. (2007) Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract., *Reprod. Toxicol.*, 24, 253-258
34. Kwon S., Stedman D.B., Elswick B.A., Cattley R.C. and Welsch F. (2000) Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development., *Toxicol. Sci.*, 55, 399-406
35. Howdeshell K.L., Furr J., Lambright C.R., Wilson V.S., Ryan B.C. and Gray L.E.Jr. (2008) Gestational and lactational exposure to ethinyl estradiol, but not bisphenol A, decreases androgen-dependent reproductive organ weights and epididymal sperm abundance in the male long evans hooded rat., *Toxicol. Sci.*, 102, 371-382
36. Ryan B.C., Hotchkiss A.K., Crofton K.M. and Gray, L.E.Jr. (2010) *In utero* and lactational exposure to bisphenol A, in contrast to ethinyl estradiol, does not alter sexually dimorphic behavior, puberth, fertility, and anatomy of female LE rats., *Toxicol. Sci.*, 114, 133-148
37. Reel J., George M., Lawton A. and Meyers C. (1997) Bisphenol A., *Environ. Health Perspect.*, 105, 273-274
38. Ema M., Fujii S., Furukawa M., Kiguchi M., Ikka T. and Harazono A. (2001) Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A., *Reprod. Toxicol.*, 15, 505-523

39. 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
40. 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
41. Cedar H. (1988) DNA methylation and gene activity., *Cell*, 53, 3-4
42. Newell-Price J., Clark A.J.L., and King P. (2000) DNA methylation and silencing of gene expression., *Trends Endocrinol. Metab.*, 11, 142-148.
43. Ho S.M., Tang W.Y., de Frausto B.J. 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
44. 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.
45. Smith C.C. and Taylor H.S. (2007) Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development., *FASEB J.*, 21, 239-246
46. Bromer J.G., Zhou Y., Taylor M.B., Doherty L. and Taylor H.S. (2010) Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response., *FASEB J.*, 24, 2273-2280
47. Tachibana T., Wakimoto Y., Nakamuta N., Phichitraslip T., Wakitani S., Kusakabe K., Hondo E., Kiso Y. (2007) Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice., *J. Reprod. Dev.*, 53, 509-514
48. 中山徹也, 牧野恒久, 高橋迪雄 (2001) 妊娠の生物学 永井書店
49. 森純一, 金川弘司, 浜名克己 (2002) 獣医繁殖学〈第2版〉文永堂出版株式会社
50. 日経BP社医療局 環境ホルモン取材班 (1998) 環境ホルモンに挑む 日経BP

51. 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
52. Ryan B.C. and Vandenberg G., (2006) Developmental exposure to environmental estrogens alters anxiety and spatial memory in female mice., *Horm Behav* 50, 85-93
53. Vom Saal F.C., Cooke P.S., Buchanan D.L. Palanza P., Thayer K.A., Nagel S.C., Parmigiani S. and Welshons W.V. (1998) A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior., *Toxicol Ind Health*, 14, 239-260
54. Palanza P., Howdeshell K.L., Parmigiani S. and Vom Saal F.S. (2002) Exposure to a low dose of bisphenol a during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice., *Environ. Health Perspect.*, 110, 415-422.
55. Takai Y., Tsutsumi O., Ikezuki Y., Kamei Y., Osuga Y., Yano T. and Taketan Y. (2001) Preimplantation exposure to bisphenol A advances postnatal development., *Reprod. Toxicol.*, 15, 71-74
56. Wu Y., Strawn E., Basir Z., Halverson G. and Guo S. (2007) Aberrant expression of deoxyribonucleic acid methyltransferases DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B in women with endometriosis., *Fertil. Steril.* 87, 24-32.
57. Wu Y., Halverson G., Basir Z., Strawn E., Yan P. and Guo S. (2005) Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis., *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 193, 371-380.
58. 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
59. Kuiper G.G.J.M., Lemmen J.G., Carlsson B., Corton J.C., Safe S.H., Van Der Sssg P.T., Van der Burg B. and Gustafsson J. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . *Endocrinology* 139, 4252-4263

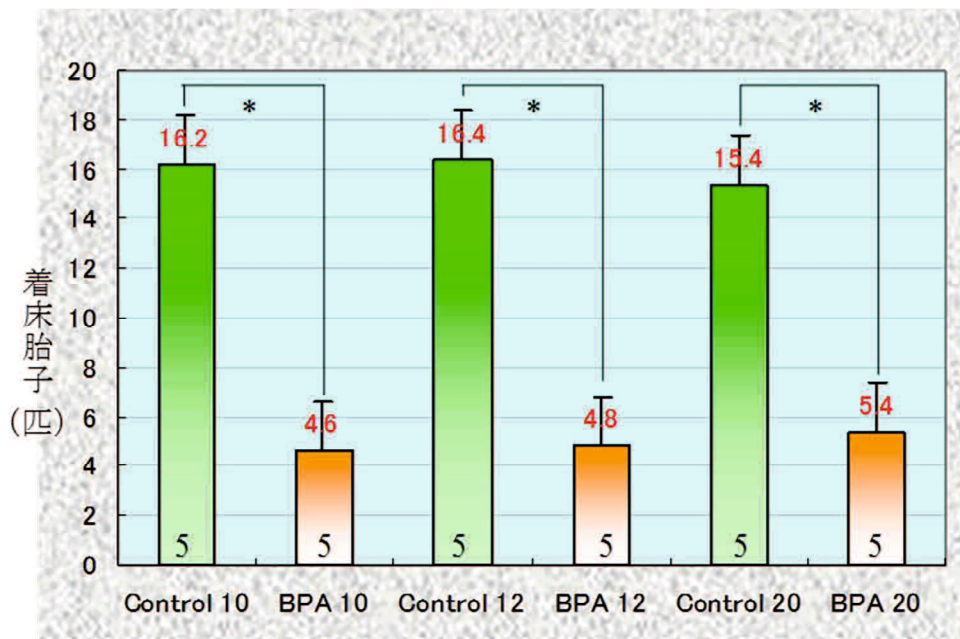
60. Markey C.M., Coombs M.A., Sonnenschein C. and Soto A.M. (2003) Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid-hormone target organs. *Evol. Dev.*, 5, 67-75
61. Varayoud J., Ramos J.G., Bosquiazzo V.L., Lower M., Muoz-de-Toro M. and Luque E.H. (2011) Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduce the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152, 1011-1111
62. Reik W. (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*, 447, 425-432.
63. Salian S., Doshi T. and Vanage G., (2009) Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects the fertility of male offspring. *Life Sciences*, 85, 742-752
64. Wolstenholme J.T., Edwards M., Shetty S.R.J., 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, 3828-3838
65. Ashby J., Tinwell H. and Haseman J. (1999) Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 156-166
66. Cagen S.Z., Waechter J.M.Jr., Diamond S.S., Breslin W.J., Butala J.H., Jekat F.W., Jointer R.L., Shiotsuka R.N., Veenstra G.E. and Harris L.R. (1999a) Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A., *Toxicol. Sci.*, 50, 36-44
67. Cagen S.Z., Waechter J.M., Diamond S.S., Breslin W.J., Butala J.H., Jetat F.W., Jointer R.L., Shiotsuka R.N., Veenstra G.E. and Harris L.R. (1999b) Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water., *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 30, 130-139
68. Gray G.M, Cohen J.T, Cunha G., Hughes C., McConnell E.E., Rhomberg L., Sipes I.G. and Mattison D. (2004) Weight of the evidence evaluation of low-dose reproductive and developmental effects of bisphenol A., *Hum Ecol Risk Assess*, 10, 875-921
69. ビスフェノールA (BPA) に関する健康影響について 中間とりまとめ (2010) 食品安全委員会 (器具・容器包装専門調査会)

70. Joint FAO/WHO Expert Meeting to Review Toxicological and Health Aspects of Bisphenol A (2010)
71. European Food Safety Authority (EFSA) (2015) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs., The EFSA Journal,   
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3978>
72. European Food Safety Authority (EFSA) (2015) EFSA news.,   
<http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150121?wtr=01>
73. Li D.K., Zhou Z., Miao M., He Y., Wang J., Ferber J., Herrinton L.J., Gao E. and Yuan W. (2011) Urine bisphenol-A(BPA) level in relation to semen quality., *Fertil. Steril.*, 95, 625-630
74. Braun J.M., Yolton K., Dietrich K.N., Hornung R., Ye X., Calafat A.M. and Lanphear B.P. (2009) Prenatal bisphenol A exposure and early childhood behavior., *Environ. Health Perspect.*, 117, 1945-1952
75. Perera F., Vishnevetsky J., Herbstman J.B., Calafat A.M., Xiong W., Rauh V. and Wang S. (2012) Prenatal bisphenol A exposure and child behavior in an inner-city cohort., *Environ. Health Perspect.*, 120, 1190-1194
76. Yolton K., Xu Y., Strauss D., Altaye M., Calafat A.M. and Khoury J. (2011) Prenatal exposure to bisphenol A and phthalates and infant neurobehavior., *Neurotoxicol Teratol*, 33, 558-566
77. Miodovnik A., Engel S.M., Zhu C., Ye X., Soorya L.V., Silva M.J., Calafat A.M. and Wolff M.S. (2011) Endocrine disruptors and childhood social impairment., *Neuro Toxicology*, 32, 261-267
78. European Food Safety Authority (EFSA) (2006) Opinion of the Scientific Panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (AFC) related to 2,2-BIS(4-HYDROXYPHENYL)PROPANE., *EFSA Journal* 428   
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/428>
79. European Food Safety Authority (EFSA) (2008) Toxicokinetics of Bisphenol A - Scientific Opinion of the Panel on Food additives, Flavourings, Processing aids and Materials in Contact with Food (AFC)., *EFSA Journal* 759   
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/759>

80. European Food Safety Authority (EFSA) (2010) Scientific Opinion on Bisphenol A: evaluation of a study investigating its neurodevelopmental toxicity, review of recent scientific literature on its toxicity and advice on the Danish risk assessment of Bisphenol A., EFSA journal 1829  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1829>
81. National Toxicology Program :NTP (2008) Questions and Answers about the National Toxicology Program's Evaluation of Bisphenol A.
82. U.S. Food and Drug Administration (2014) Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application, Food Additives & Ingredients,  
<http://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/foodadditivesingredients/ucm064437.htm>

付図

図. 1a BPA 曝露による着床胎子数の変化



Control 10 : 妊娠 10 日の対照群

BPA 10 : 妊娠 10 日の BPA 群

Control 12 : 妊娠 12 日の対照群

BPA 12 : 妊娠 12 日の BPA 群

Control 20 : 妊娠 20 日の対照群 (産子数より計測)

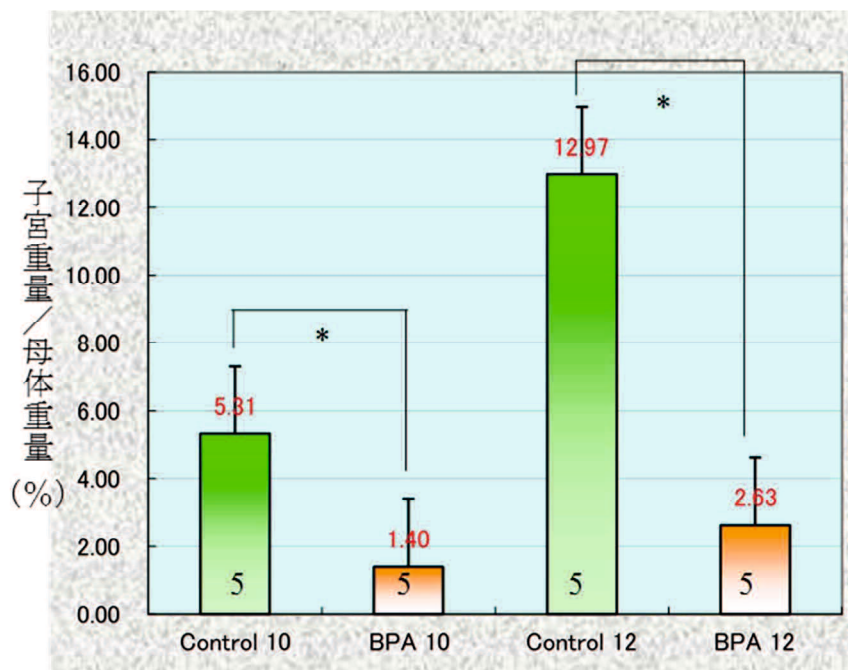
BPA 20 : 妊娠 20 日の BPA 群 (産子数より計測)

BPA 曝露による着床胎子数の有意な減少が認められた。

(\*に有意差あり。P<0.05) 全ての群に対して n=5 とした。



図. 1b BPA 曝露による子宮重量（母体体重に対する子宮重量割合）の変化



Control 10 : 妊娠 10 日の対照群

BPA 10 : 妊娠 10 日の BPA 群

Control 12 : 妊娠 12 日の対照群

BPA 12 : 妊娠 12 日の BPA 群

BPA 曝露による子宮重量の有意な減少が認められた。

(\*に有意差あり。P<0.05) 全ての群に対して n=5 とした。

図.2 妊娠子宮の変化 妊娠 12 日

(a) 対照群の妊娠子宮

(b) BPA 群の妊娠子宮

妊娠 12 日の妊娠子宮を比較すると BPA 群は対照群に比べ着床胎子数の有意な減少が認められる。左右の子宮角での違いは認められない。

(a)



(b)



図.3 妊娠 12 日の胎盤の組織切片 (H.E 染色)

- |                    |        |
|--------------------|--------|
| (a) 対照群の子宮胎盤       | (×20)  |
| (b) BPA 群の子宮胎盤     | (×20)  |
| (c) 対照群の胎盤迷路部      | (×100) |
| (d) BPA 群の胎盤迷路部    | (×100) |
| (e) 対照群の栄養膜巨細胞層    | (×100) |
| (f) BPA 群の栄養膜巨細胞帯部 | (×100) |

胎子血の流れる血管網(矢頭)および母体血の流れる絨毛間腔(矢印)の形成が確認できる(c)。 絨毛間腔(矢印)の狭窄が見られるが、胎子血の流れる血管網(矢頭)については、変化は見られない(d)。 DB と LZ との境に栄養膜巨細胞(矢印)の帯が確認され、空胞化細胞(矢頭)を含む栄養膜海綿層も確認される(e)。 栄養膜巨細胞の消失および空胞化細胞(矢頭)を含む栄養膜海綿層の退行性変化が見られる(f)。

MG: 間膜腺、 DB: 基底脱落膜、 PL: 胎盤、 Sp: 栄養膜海綿層、 TGC: 栄養膜巨細胞、 LZ: 胎盤迷路部

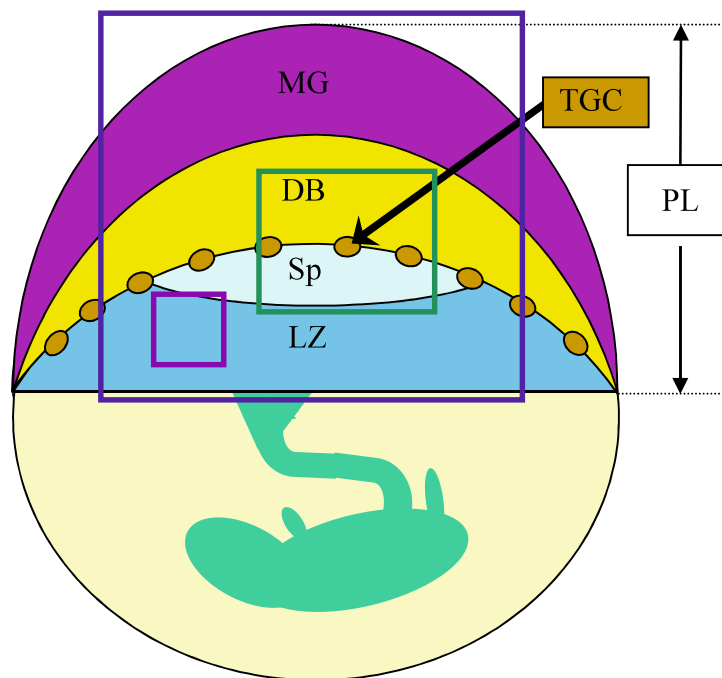


図.3 妊娠 12 日の胎盤の組織切片 (H.E 染色)

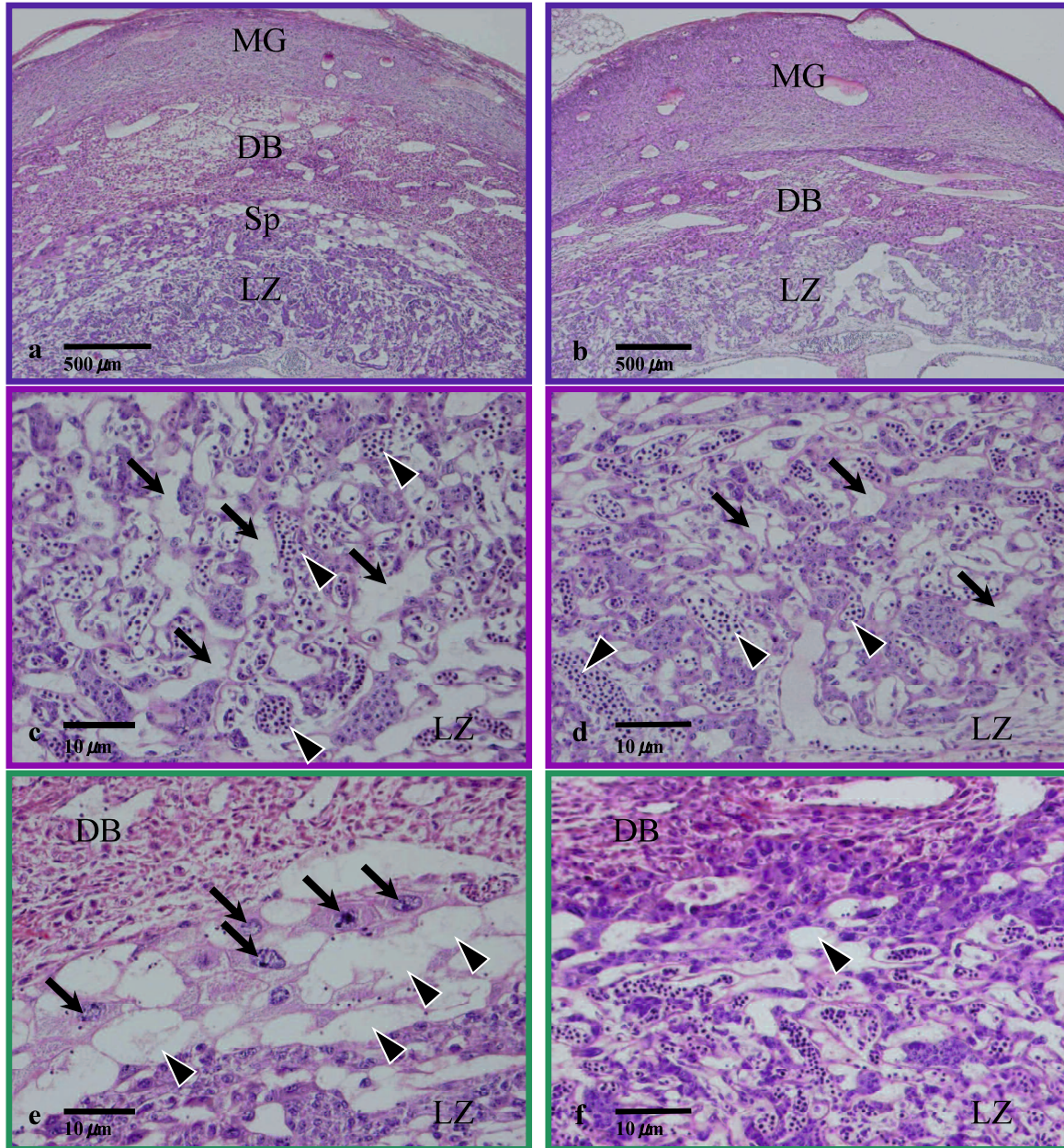
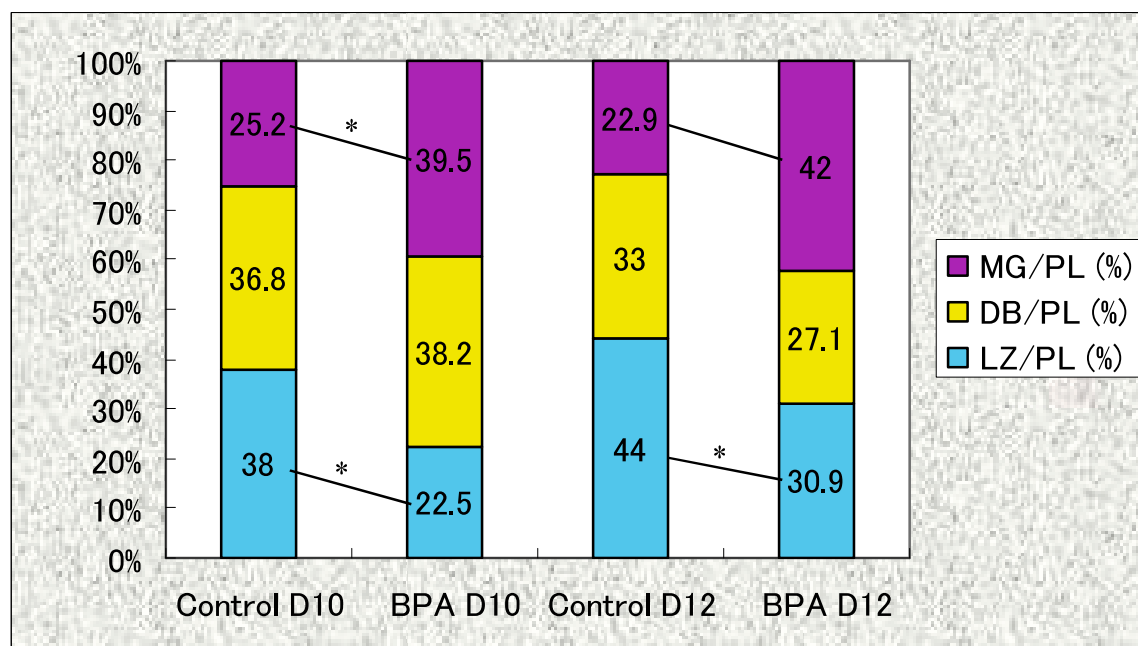


図.4 間膜腺、基底脱落膜、胎盤迷路部の胎盤に対する割合の比較



Control D10 : 妊娠 10 日の対照群

BPA D10 : 妊娠 10 日の BPA 群

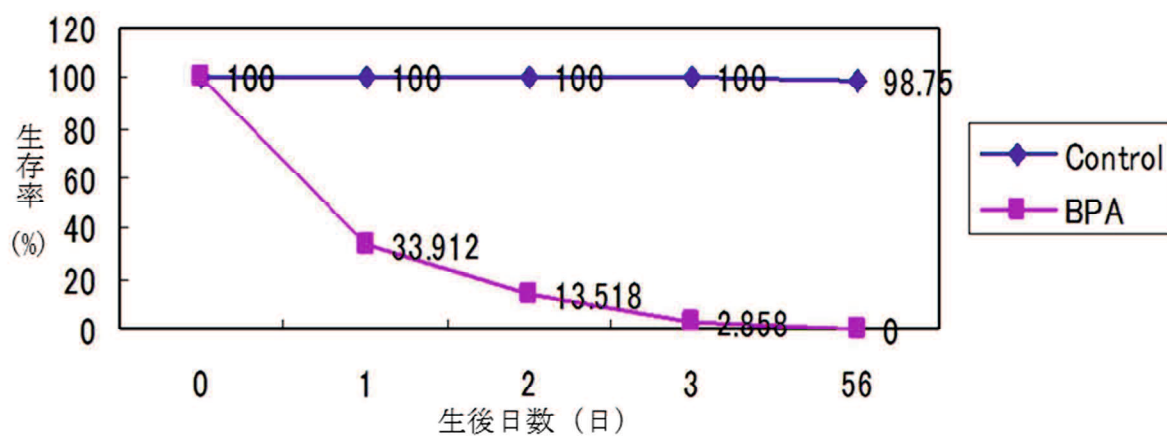
Control D12 : 妊娠 12 日の対照群

BPA D12 : 妊娠 12 日の BPA 群

妊娠 10 日および妊娠 12 日ともに BPA 群では胎盤迷路部の有意な菲薄化および間膜腺の有意な肥厚が認められた。

(\*に有意差あり。P<0.05) 全ての群に対して n=5 とした。

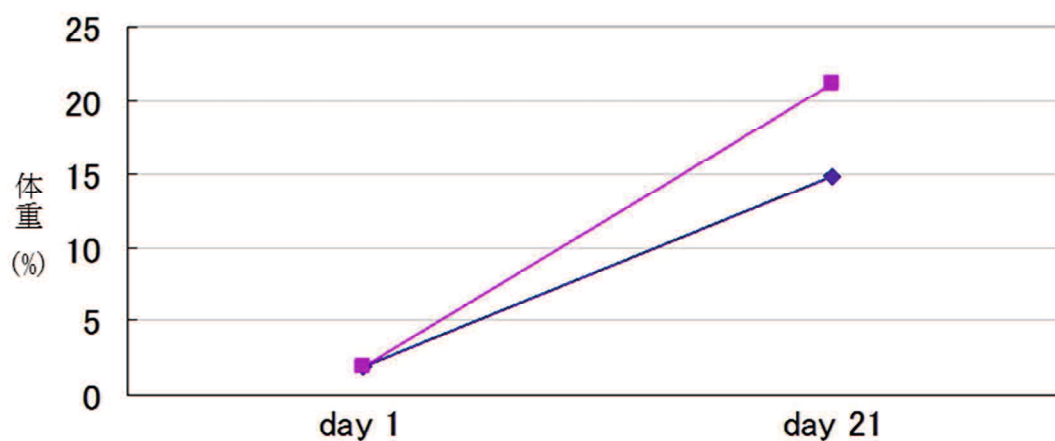
図.5 新生子の生存率の比較



BPA 群では生後 1～3 日で多くが死に至り、成熟期である生後 56 日での生存は確認できなかった。

(\*に有意差あり。P<0.05) 全ての群に対して n=30 とした。

図.6 BPA 群新生子を Normal マウスの授乳中のメスに育てさせた場合の新生子の発育経過



BPA 群新生子是对照群新生子と比べ有意な重量増加が認められた。

(\*に有意差あり。P<0.05) 全ての群に対して n=30 とした。

図.7 実験方法の概略図

授乳期間を桃色、妊娠期間を薄緑色、BPA 曝露期間を赤色で示している。F0 世代の妊娠 12~16 日に各濃度を投与した。F1 世代のみ里親を用いて授乳を行った。生後 56 日 (8 週齢) を妊娠適齢期とし、交配させた。感受性試験については生後 119 日から 121 日にかけて F0 世代が曝露された濃度と同等の濃度を投与した。

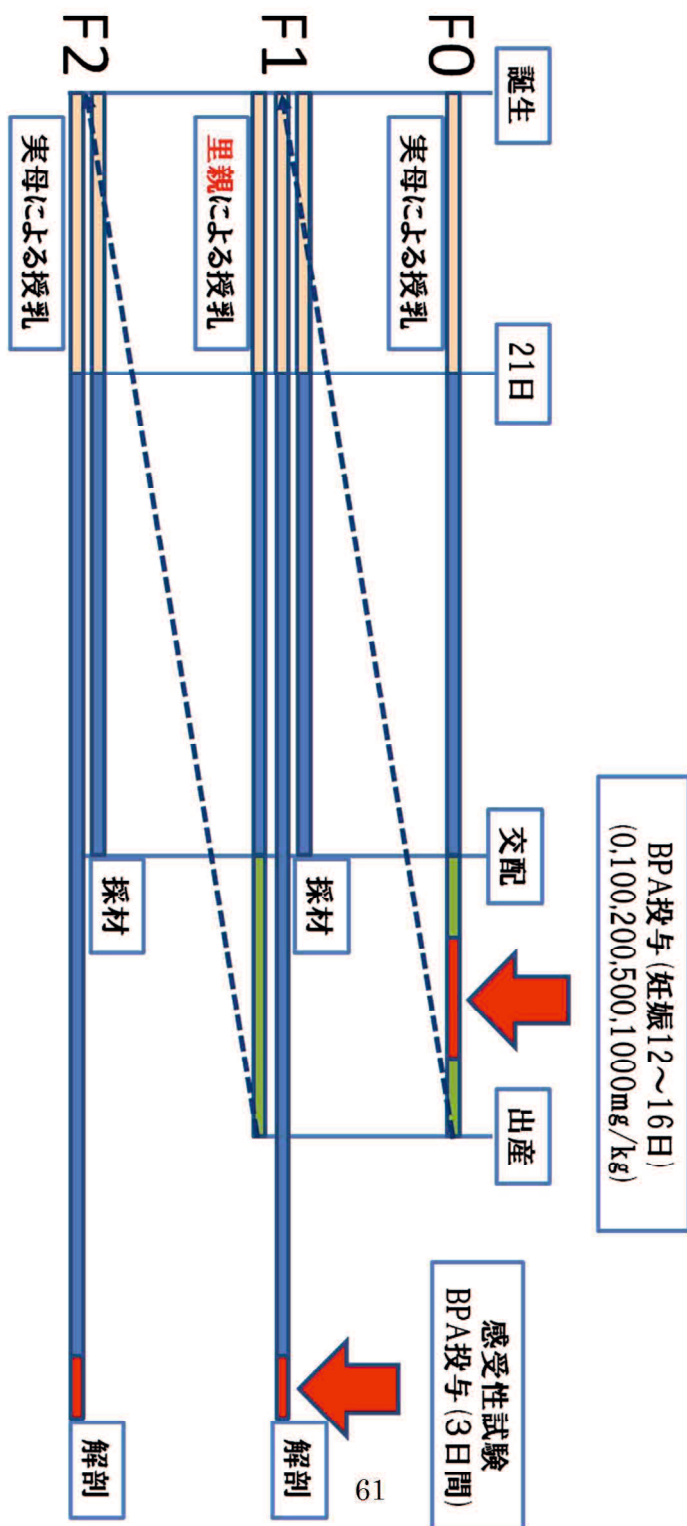


図.8 HOXA10 遺伝子配列

A) HOXA10 promoter region

tgaggcagccccacagttccggcctttgagccataggtgtcaggcgtgcgtcttctggcccatcaatacagattacatatttatat  
caatcgcggggtccgagggcgccctcagagagcggccccgcgcctacgaaaccaaactgggagtggtcgcgtggaaactctggctcg  
ggattggctgcaagcgcccgccggtgcggggggattgctaatacgtattcagcatgttttgacacaagaaatgtcagccagaaagg  
gctat

B) HOXA10 intron region

cagcccgagtggcctcgacttaaccttcccctctgtattctcttaaactccaggcagttccaaaggcgaaaatgcagccaactggct  
cacagcaaagagcggccggaagaaacgctgcccttacacgaagcaccagacgctggagctggagaaggagtttc

図.9a Bisulfite シークエンス PCR に用いたプライマー配列

プロモーター領域とイントロン領域それぞれを標的としたプライマー配列を示す。A はプロモーター領域を標的としたプライマー配列であり、B はイントロン領域を標的としたプライマー配列。U は非メチル化(Unmethylated) 特異的プライマー、M はメチル化(Methylated) 特異的プライマー。

A) Promoter region

Sense primer (5' → 3')

U: TTTGAGGTAGTTTTTATAGTTTTGG

M: TTTGAGGTAGTTTTTATAGTTTCGG

Antisense primer (5' → 3')

U: TCTTATACAAAACATACTAAATACAA

M: TCTTATACAAAACATACTAAATACGA

B) Intron region

Sense primer (5' → 3')

U: TTGGGGGATGAGAATATTAGTG

M: TTGGGGGATGAGAATATTAGCG

Antisense primer (5' → 3')

U: ACACATAAAAAATCATAAACTCAA

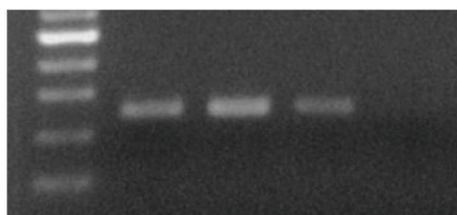
M: ACGCATAAAAAATCGTAACTCG

図.9b Bisulfite 特異的プライマーを用いた PCR 法の感受性と特異性 (BPA200mg/kg 群)

Lanes1-3 : メチル化 PCR 産物 (陽性)    Lanes4 : 陰性

MW : 分子量マーカー

MW 1 2 3 4



-266 bp



図. 10 子宮の組織切片 (HE 染色)

- a) 対照群の子宮。バー：300  $\mu$  m
- b) F1 1000mg/kg/day 群の子宮。子宮径が縮小している。バー：300  $\mu$  m
- c) F1 1000mg/kg/day 群の子宮。子宮内膜が一部欠損している。バー：300  $\mu$  m
- d) c の子宮内膜が欠損している部位の拡大像。バー：300  $\mu$  m
- e) F2 500mg/kg/day 群の子宮。管腔が拡大している。バー：300  $\mu$  m
- f) e の拡大像。管腔上皮、子宮腺ともに認められる。バー：100  $\mu$  m
- g) F2 1000mg/kg/day 群の子宮。子宮内膜細胞の過形成による管腔の閉塞化が起こっている。バー：300  $\mu$  m
- h) g の拡大像。バー：300  $\mu$  m
- i) F2 200mg/kg/day 群の子宮。管腔上皮が一部欠損している。バー：300  $\mu$  m
- j) i の管腔上皮の欠損部位の拡大像。バー：300  $\mu$  m

図. 10 子宮の組織切片

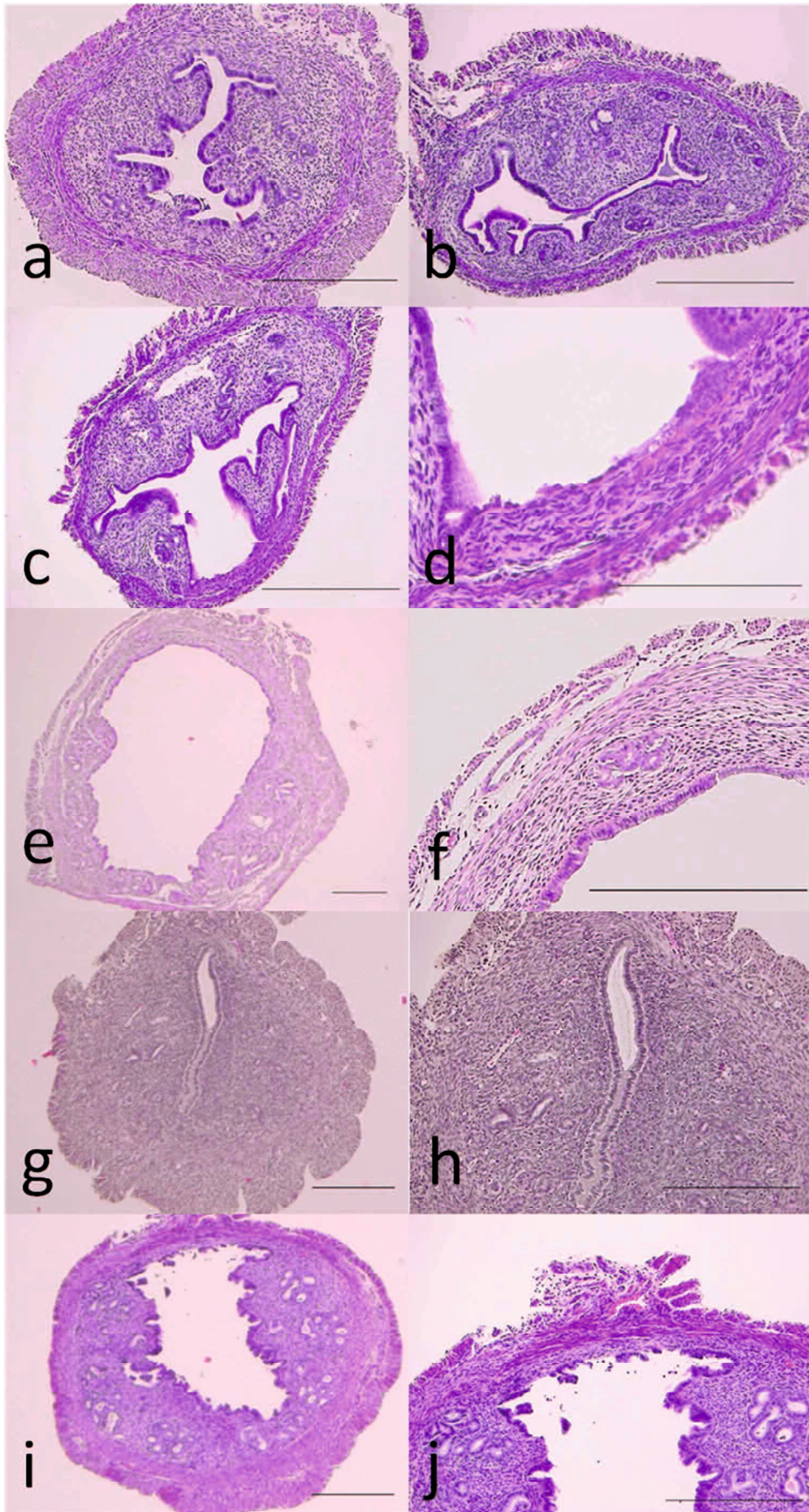


図. 11 卵巣の組織切片 (HE 染色)

- a) 対照群の卵巣。バー：300  $\mu$  m  
b) F2 200mg/kg/day 群の卵巣。黄体が卵巣の大部分を占めている。バー：300  $\mu$  m  
c) F1 200mg/kg/day 群の卵巣。多数の卵胞が黄体中に存在している。バー：300  $\mu$  m  
d) F1 1000mg/kg/day 群の卵巣。卵巣間質細胞が増殖している。バー：300  $\mu$  m  
e) d の拡大像。バー：300  $\mu$  m

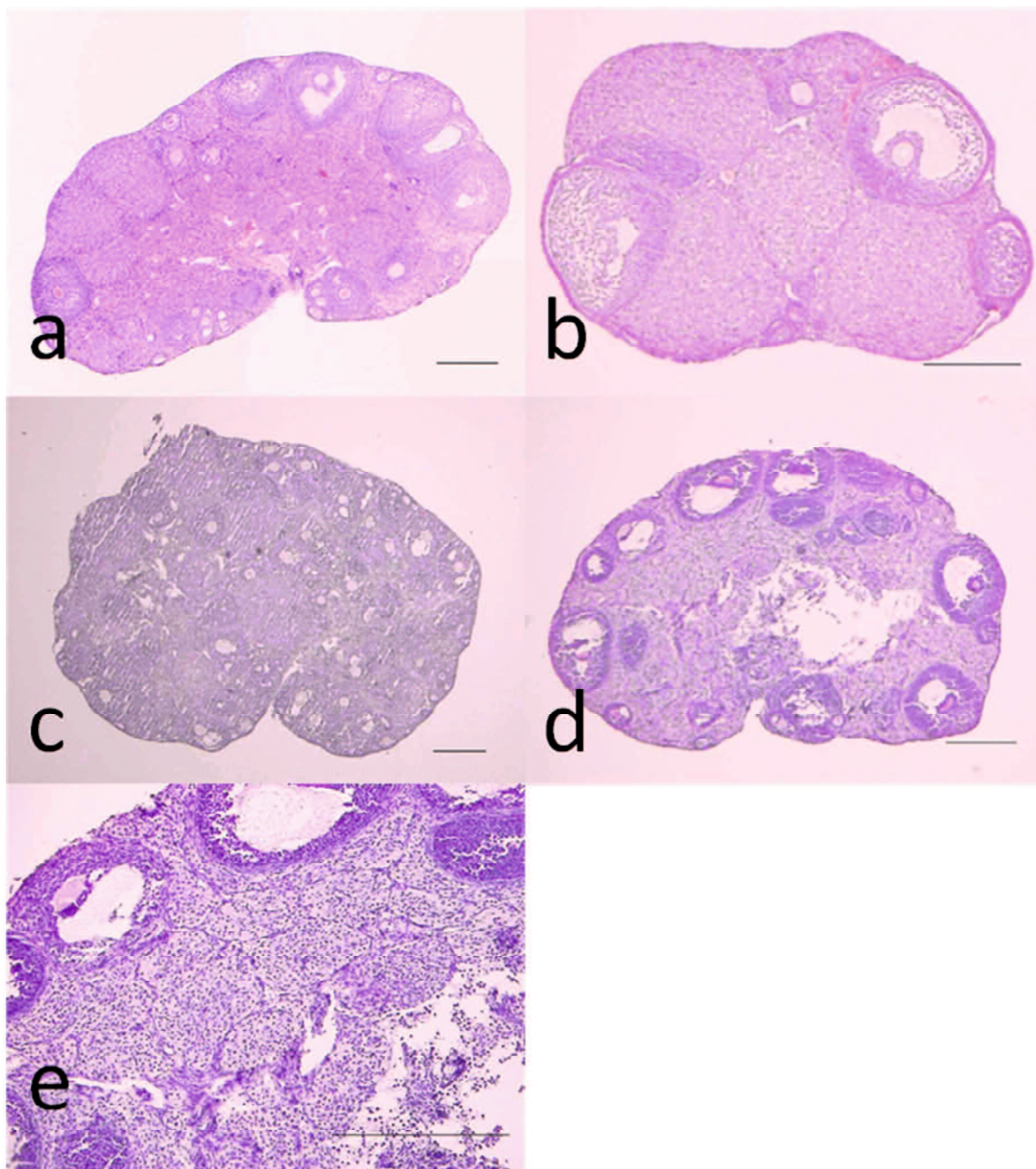


図. 12 感受性試験における組織切片 (HE 染色)

- |                        |                             |
|------------------------|-----------------------------|
| a) 対照群の子宮で最も子宮腺の少ない切片  | (子宮腺数 26) バー : 300 $\mu$ m  |
| b) 対照群の子宮で最も子宮腺の多い切片   | (子宮腺数 123) バー : 300 $\mu$ m |
| c) F1 群の子宮で最も子宮腺の少ない切片 | (子宮腺数 37) バー : 300 $\mu$ m  |
| d) F1 群の子宮で最も子宮腺の多い切片  | (子宮腺数 168) バー : 300 $\mu$ m |
| e) F2 群の子宮で最も子宮腺の少ない切片 | (子宮腺数 29) バー : 300 $\mu$ m  |
| f) F2 群の子宮で最も子宮腺の多い切片  | (子宮腺数 196) バー : 300 $\mu$ m |

