

201133020A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、

それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23 - 化学 - 一般 - 002)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究

- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、

それに基づく試験スキームの最適化 -

(H23 - 化学 - 一般 - 002)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二

平成 24 (2012) 年 3 月

別添 1

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -
(H23 - 化学 - 一般 - 002)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 長尾 哲二
平成 24 (2012) 年 3 月

目 次

I. 総括研究報告	
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究	
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、 それに基づく試験スキームの最適化 -	----- 1
長尾 哲二	
II. 分担研究報告	
1. 低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立	
1) 低用量ビスフェノール A の胎児期曝露が誘発する大脳皮質形成異常の解析	
2) 低濃度化学物質で曝露した培養細胞の機能に関する研究	----- 7
長尾 哲二	
2. Tau 融合エストロゲン受容体レポーター マウスを用いた化学物質の神経標 的解析	----- 63
渡邊 肇	
3. 周産期化学物質低用量曝露による免疫影響評価	----- 81
林 良夫	
4. マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構	----- 111
井口 泰泉	
5. 化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応	----- 135
菅野 純	
6. 化学物質の子どもへの影響評価に関する研究 - げっ歯類一生涯試験の検証 -	----- 167
太田 亮	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 183
IV. 研究成果の刊行物・別刷	----- 185

I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究報告書

化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -
(H23-化学-一般-002)

研究代表者 長尾 哲二
近畿大学理工学部生命科学科 教授

研究要旨

子どもを含む高感受性集団に対する有害性評価体制は、成人を対象にしたものに比べ不十分なことが指摘されてきた。これに対応すべく、平成16年度から、厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）「内分泌かく乱性確定試験法及び内分泌かく乱性試験評価包括ガイドラインの開発に関する総合研究（H16-化学-一般-001）」「高感受性集団に於ける化学物質の有害性発現メカニズムの解明及び評価手法開発にかかる総合研究（H19-化学-一般-003）」等により、Bisphenol-A（BPA）等の低用量暴露による遅発影響を示し、内分泌かく乱作用の検出の為の「確定試験」として「齧歯類生涯試験法」の開発と、それを理解する為の分子毒性メカニズムの解明を進めてきた。この成果は、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」（試験スキーム）の形成に貢献するとともに、OECDの内分泌かく乱化学物質対応、特に「確定試験」としての「延長一世代試験」の導入に反映されている。

現在までに確立した「試験スキーム」の各構成要素は、エストロゲン受容体（ER）とアンドロゲン受容体（AR）を対象としたものにほぼ限られている。これに対し、近年の「低用量影響」研究の進展により、BPAに代表される化学物質がERを介して作用しているか否かが問題となっている。即ち、確定試験法の確立と合わせて、「試験スキーム」の拡充の必要性が問題となっている。

本研究は、上記の先行研究成果を最大限に取り入れ、「試験スキーム」の網羅性拡充のために必要な基盤研究を進める。具体的には国内外で生体影響の分子メカニズム解明が急がれているBPA及びDiethylstilbesterol（DES）を掲げ、このために、①発生・発達期の脳及び免疫系に対する低用量曝露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発影響」、及び、②その分子標的としてのDNA修飾機構及びmRNA修飾機構を検討する。

これらの成果から、現在の「試験スキーム」に緊急性を持って追加する必要がある試験法や効率的な代替法への切り替えの提示が可能となる。また、先行研究で培った「齧歯類生涯試験法」の検証を並行し、OECDの「延長一世代試験」の完成を促す。

研究分担者

渡邊 肇 大阪大学大学院
工学研究科 教授

林 良夫 徳島大学副理事、客員教授

井口泰泉 自然科学研究機構・岡崎統合バイオサイエンスセンター 教授

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部 部長

太田 亮 財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所 毒性部 部長

A. 研究目的

本研究は、「厚生労働省内分泌かく乱化学物質試験スキーム」（試験スキーム）の網羅性の拡充と確定試験法の確立を目的とする。このために、①発生・発達期の脳及び免疫系に対する低用量曝露により成長後のこれらの臓器に誘発される「遅発影響」、及び、②その分子標的としての DNA 修飾機構及び mRNA 修飾機構を検討する。①からは臓器～細胞レベルの有害性発現メカニズム（標的ごとの感受性 window の再確認を含む）を、②からそれらに共通する分子基盤を明らかにする。また、先行研究で培った「齧歯類一生涯試験法」の検証研究を並行し、OECD の「延長一世代試験」の完成を促すとともに、厚労省「試験スキーム」の拡充を提案する。

B. 研究方法

1. 低用量曝露の標的臓器（神経系、免疫系への影響、とくに遅発影響）

● *In vivo* 実験にチミジン類似物質ラベル法を適用して、ラベルされた S 期の細胞数を比較して神経細胞の細胞周期異常を検出する。またラベルされたニューロンの大脳皮質成熟後の数や位置を解析してニューロン新生、

層構造の微小異常を検出する系の確立を目指す。

● 神経軸索内微小管結合蛋白の tau と β -ガラクトシダーゼを融合させて、ER α 発現神経細胞の樹状突起までを可視化した tau 融合エストロゲン受容体レポーター (Tau-ER) マウスを組み合わせ、複合的に解析することにより、解析精度向上を目指す。なお、既に BAC 由来コンストラクトは完成している。

● 周産期でのホルモン作動性物質の低用量曝露により、免疫システムの構築がどの段階でどのような分子機序によって異常となるかを解析する。

2. 「遅発影響」の標的分子とその分子基盤

● 女性生殖器に対する女性ホルモンの増殖作用について Wnt シグナルとのクロストークを、ER α ノックアウトマウス及びコンディショナル β -カテニンノックアウトマウスを用いた表現型解析から明らかにする。

● ES 細胞分化系で低濃度 BPA が Malat-1 (RNA スプライシングに関与) の発現を増加させる。胎児で Stat1、Egfr、ER α 等がこれと同期発現することから、向神経因子としての解析意義が大きいと判断し、*in vitro* 系 (ES 及び神経幹細胞 (NS) 分化系) にてエストロゲン様物質による Malat-1 と細胞分化の関係を、*in vivo* 系 (マウス胎児海馬等) での Malat-1 の発現局在 (*in situ* hybridization 等) を明らかにする。さらに、ER α 陽性ニューロンに及ぼす影響を Tau-ER マウス等を用いて確認する。

3. 齧歯類一生涯試験法の検証

● 神経・内分泌・免疫ネットワークの発生・発達・成熟・老化を考慮した厚生労働省の「齧

菌類一生涯試験法」に低用量の内分泌かく乱化学物質を投与し、改良の必要な問題点を明らかにし、OECD の延長一世代試験に反映させる。

(倫理面への配慮)

各施設の倫理規定に従い、倫理委員会の承認を得た上で適切に動物実験を実施する。なお近畿大学では、組換え DNA 実験を行う場合は遺伝子組換え生物等規制法に準拠し、かつ近畿大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認を受ける。マウス、ラットを用いた動物実験は近畿大学の動物実験規程に準拠し、かつ動物実験委員会の承認を受ける。実験は必要欠くべからざる場合にのみ行い、動物数を最小限にとどめ、サンプリングの際にはすべて麻酔下に行い動物に苦痛を与えないように配慮する。

C. 研究結果・考察

平成 23 年度は当初計画に沿って 6 研究課題を行い、下記の成果を得た。

1. 低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立

胎児期の低用量 BPA 曝露による大脳皮質形成への影響を明らかにするために、C57BL/6J 妊娠マウスに、胎生 8.5 日から 13.5 日に連続して BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を強制的に経口投与し、胎児脳の組織学的な解析を行った。特に、神経幹・前駆細胞の数や分布、増殖能や細胞周期の異常に着目して、免疫組織学的手法とチミジン類似物質を用いた細胞のラベリング法を用いて解析を行った。その結果、皮質板の肥厚と神経幹/前駆細胞の減少が観察された。発生期の大脳皮質においては 3 種類の神経幹/前駆細胞 (Radial Glial

Cell: RGC, Intermediate Progenitor Cell: IPC, outer Radial Glial Cell: oRGC) が同定されており、今年度の研究から、低用量 BPA をマウス胎児期に投与すると、RGC や IPC の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することを明らかにした。

また、脳・神経系の発生・発達への影響を *in vitro* (培養細胞系) で検討する目的で、低濃度 (100 pM~100 nM) の BPA を副腎髄質クロム親和性細胞に 1 週間または 1 ヶ月間、あらかじめ曝露しておく、神経成長因子による神経分化が抑制された。この作用は 1 日間の曝露では見られなかった。3T3 線維芽細胞を同様に長期間曝露した場合も、酸化ストレスによる細胞死の抑制が認められたが、細胞増殖には影響しなかった。マウス大脳皮質神経上皮細胞の細胞増殖にも影響を及ぼさなかった。これらのことは BPA の長期間曝露が特定の細胞機能に変化を与えていることを示唆している。

2. Tau 融合エストロゲン受容体レポーター マウスを用いた化学物質の神経標的解析

BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子を組込むために、Red/ET 相同組換え法を用いた。BAC 側の挿入予定部位の配列を合成し、tau-lacZ レポーター遺伝子の両末端に PCR 法によって融合させたのちに、この DNA 断片をリコンビナーゼと共に RP23-7 D5BAC クローンを有する大腸菌に導入した。薬剤耐性を指標として、最終的に RP23-7 D5BAC クローンに tau-lacZ レポーター遺伝子が挿入されたクローンを得た。

得られたクローンを大量精製し、塩基配列

を確認したところ、予定通りの組換えが生じており、エストロゲン受容体 α 遺伝子の翻訳開始ATG以下がtau-lacZに置換されていることを確認した。一方、6塩基切断型の制限酵素数種類を用いて、詳細な制限酵素地図を作製し全体の構造を確認したところ、tau-lacZ遺伝子由来のDNA断片が確認されただけでなく、本来相同組換えによって除去されたはずのDNA断片の存在も確認されたことから、BACクローンが二量体となって存在していることが明らかになった。この二量体とRP23-7D5BACクローンをパルスフィールドゲル電気泳動で解析したところ、ほぼ同等の大きさを示していたことから、もともと配布しているRP23-7D5BACクローンがすでに二量体となっていることが推察された。これらは制限酵素PI-SceIで切断すると単量体となり、tau-lacZ組換えクローンとオリジナルのRP23-7D5クローンに分けることができ、現在この組換え単量体を大腸菌に再導入しクローン化を進めると同時に、一方で環状のままインジェクションを行いトランスジェニックマウスの作製を進めている。このように、入手したBACクローンが想定外の形状であったために、当初の計画よりも遅れをみているものの、予定通りのコンストラクトを構築し、マウスの作製を進めているところであり、来年度にかけて解析を開始する。

3. 周産期化学物質低用量暴露による免疫影響評価

本研究では、周産期における母体に及ぼす化学物質の免疫システムへの影響について検討を加えた。妊娠期における胸腺組織でのダイオキシンの細胞内受容体であるaryl hydrocarbon receptor (AhR)のmRNAが非妊娠期において上昇していた。さらに、妊娠期

の胸腺組織では Autoimmune regulator (AIRE)のmRNA発現およびタンパク発現も上昇することが判明した。また、アロマトラーゼノックアウトマウスの胸腺組織では AhR の mRNA 発現が対照に比較して亢進していた。一方で、AhRを介したT細胞分化に関するエピジェネティクス解析を行うと、AhRノックアウトマウスの胸腺組織におけるTh1およびTh2関連遺伝子でのDNAメチル化が対照マウスと比較して変化していたことから、AhRを介したT細胞分化にエピジェネティクスな影響が大きく関与する可能性が示された。

4. マウス雌性生殖器官の女性ホルモンシステムとその破綻の分子機構

内分泌かく乱物質の発生期における影響として、晩発性あるいは継世代性の影響が示唆されてきている。未成熟な発生途上の動物に対する長期的かつ不可逆的な応答について、女性生殖管をモデルとして、女性ホルモンと、その作用をメディエイトするシグナル因子の候補としてのWntシグナルとのクロストークの解析を行った。 β -cateninを構成的に活性化させた遺伝子改変マウスの膈上皮細胞において、女性ホルモン作用非依存の細胞増殖が誘導されることが明らかとなった。さらに周産期DES投与マウスの膈上皮の基底細胞の一部や腺様疾患部でも β -カテニンは高発現し、蓄積していることが分かった。以上の結果から、発生期女性ホルモン曝露によるホルモン応答システムの破綻時において、Wnt/ β -カテニン経路の関与が明らかとなった。

5. 化学物質による遅発影響標的分子としての mRNA 修飾機構の解析、及び OECD/WHO 対応

これまでの研究でES/EB(胚様体)培養系

において non-coding RNA の Malat-1 が BPA の低濃度 (1nM) で増加することをマイクロアレイ解析の実験で観察した。この BPA により増加する Malat-1 遺伝子の発現機構を調べるため、BAC クローンから Malat-1 遺伝子上流 9k を含む Malat-1 遺伝子のプロモーター解析用ベクターの構築を行った。また、Malat-1 を含む EB で増加した遺伝子発現の用量反応性を調べるため、ES 細胞を LIF を除いた ES 培地で、天井培養法で培養し、BPA を 0.1、1、10、100 nM の濃度で添加し、24 時間後に形成された EB を対象に定量 PCR を行った。その結果、100 nM で ESR1 及び ERRG の有意な増加が認められた。

6. 化学物質の子どもへの影響評価に関する研究 - げっ歯類一生涯試験の検証 -

げっ歯類を用いる一生涯試験の検証を目的として、BPA または DES を用いて、C57BL/6J マウスの新生児期に強制経口投与を実施し、現在、低用量影響を検索中である。哺育 1 日から哺育 21 日までの体重推移に、BPA 投与または DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。また、離乳後の生後 28 日から生後 56 日までの体重推移についても、BPA 投与または DES 投与の影響を示唆する変化は認められなかった。雌の膈開口の時期には、対照群と BPA 投与群あるいは DES 投与群との間で有意差は認められなかった。さらに、雄の陰茎包皮分離の時期についても、対照群と BPA 投与群あるいは DES 投与群との間で有意差は認められなかった。

D. 結論

本研究による最先端の分子生命科学の成果と新評価法開発の成果から、周産期低用量曝露が引き起こす神経-内分泌-免疫系に代

表される高次生命維持系の組織構築かく乱による不可逆的遅発影響を、個別の化学物質の毒性の検証に留まらず受容体原性毒性或いはシグナル毒性として、体系的、総合的、かつ GLP ガイドライン化が可能な評価系の構築が見込まれる。これは従来行なわれてきた各種試験法による検査の及んでいない影響指標を明示し、この分野の研究に新しい視点を提供するものであり、国内はもとより、OECD 等の国際的なテストガイドライン策定の際の具体的且つ科学的な基盤情報としての大きな意義を有する。

少子高齢化社会が進む中、次世代の担い手の確保、社会保障上の負担軽減の一助として、子ども（小児）を含む高感受性集団を保護する必要性、重要性は高い。更に、高度先進工業化社会における新規高性能化学物質の弛まぬ開発と実用化による、多様性を持った毒性未知の化学物質の曝露による事故の未然防止への貢献が見込まれる。これは、今後の産業経済活動の健全な成長を担保するものでもある。本年度は 3 年計画の 1 年目となる研究事業であるが、各分担研究者による成果は着実に得られつつあることを確認した。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Komada M, Asai M, Morii M, Matsuki M, Sato M, Nagao T.

Maternal bisphenol A oral dosing relates to the acceleration of neurogenesis in the developing neocortex of mouse fetuses. Toxicology, in press

Kawakami E, Kinouchi N, Adachi T, Ohsawa Y, Ishimaru N, Ohuchi H, Sunada Y, Hayashi Y, Tanaka E and Noji S.

Atelocollagen-mediated systemic administration of myostatin-targeting siRNA improves muscular atrophy in caveolin-3-deficient mice. *Dev Growth Differ.* 53:48-54 (2011)

Chakraborty T, Katsu Y, Zhou L.Y, Miyagawa S, Nagahama Y and Iguchi T.

Estrogen receptors in medaka (*Oryzias latipes*) and estrogenic environmental contaminants: an *in vitro-in vivo* correlation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 123:115-121 (2011)

Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M, Kato S.

GlcNAcylation of histone H2B facilitates its monoubiquitination. *Nature.* 480:557-561 (2011)

太田亮、大沢基保

周産期のアレルギー *Developmental Immunotoxicology (DIT)*、*周産期医学*、41:5:609-613 (2011)

2. 学会発表

石丸直澄、山田安希子、新垣理恵子、林良夫
自己免疫疾患の病態におけるメモリーCD8陽性T細胞の役割、第100回日本病理学会総会、2011年4月、横浜

勝義直、松原和純、松田洋一、鳥羽通久、岡香織、太田康彦、井口泰泉

爬虫類のエストロゲン受容体の単離と種・リガンド特異性の解析、日本動物学会第82回大会、2011年9月、旭川

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡

パーセローム (Percellome) 法を用いた定量的トランスクリプトミクスによる遺伝子発現ネットワーク描出による毒性解析の試み、第34回日本高血圧学会総会 SHR学会合同シンポジウム、2011年10月、宇都宮

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -
（H23-化学-一般-002）
分担研究報告書

低用量曝露の標的臓器としての神経系への影響評価系の確立

1. 低用量ビスフェノール A の胎児期曝露が誘発する大脳皮質形成異常の解析

研究分担者 長尾 哲二 近畿大学工学部生命科学科教授

研究協力者 駒田 致和 福井大学医学部医学科助教

研究要旨：本研究課題では、低用量化学物質の胎児期および新生児期曝露により誘発される大脳皮質形成異常の、特にニューロン新生の異常に着目した組織学的検出法の確立を目指す。これまでに実験動物を用いた研究により、胎児期の低用量 BPA 曝露が神経分化の促進や神経細胞移動の異常を引き起こし、大脳皮質の発生に重篤な異常を引き起こすことが報告されている。しかし、神経幹・前駆細胞の増殖や分化に関する詳細な解析は実施されておらず、表現型や発症メカニズムの解明が必要である。そこで本研究では、胎児期の低用量BPA曝露による大脳皮質形成への影響を明らかにするために、C57BL/6J妊娠マウスに、胎生 8.5 日から 13.5 日に連続して BPA 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ を強制的に経口投与し、胎児脳の組織学的な解析を行った。特に、神経幹・前駆細胞の数や分布、増殖能や細胞周期の異常に着目して、免疫組織学的手法とチミジン類似物質を用いた細胞のラベリング法を用いて解析を行った。その結果、皮質板（Cortical Plate: CP）の肥厚と神経幹/前駆細胞の減少が観察された。発生期の脳皮質においては 3 種類の神経幹/前駆細胞（Radial Glial Cell: RGC, Intermediate Progenitor Cell: IPC, outer Radial Glial Cell: oRGC）が同定されており、今年度の研究から、低用量 BPA をマウス胎児期に投与すると、RGC や IPC の分化するタイミングを早めることで神経新生を促進すると同時に細胞周期の長さが短くなり、結果として増殖能が低下することが明らかになった。これらのことから、免疫組織学的手法やチミジン類似物質のラベリング法を用いた評価法により、大脳皮質の発生における神経分化や細胞増殖に対する低用量化学物質の曝露の毒性影響を検出することが可能であることが明らかになった。

A. 研究目的

ヒトは生活環境下において様々な化学物質に接する機会があり、特に胎児期、発達期における曝露が中枢神経系の形態異常、さらには脳機能障害を引き起こすことが報告されている。さらに近年、これまでは毒性学的影響がないとされていた低用量の化学物質の母体曝露による出生児の脳機能発達への影響が注目されている。食品などに含まれる化学物質の低用量曝露により誘発される脳の形態学的変化は微細であると考えられるため、その毒性影響を評価することは難しい。そのため、実験動物を用いた中枢神経系の発生における化学物質のリスク評価には、わずかな毒性学的変化を検出することが可能な形態学的指標により明確に定量する試験系や器質的变化を評価する手法の構築が必要である。そこで本研究では、中枢神経系の発生において重要な細胞増殖と神経新生を高感度に定量できる免疫組織学的評価手法の構築を目的とした。正常な中枢神経系の発生には、適切な時期に適切な数の細胞が増殖し、神経細胞に分化することが必須である。特に脳の器官形成期には膨大な細胞が増殖・分化・移動するため、わずかな発生学的歪みが形態学的・脳機能学的な異常に関連する。そこで本研究では、免疫組織化学的に細胞の増殖と神経新生の変化を、細胞数の増減により評価するという新たな手法の確立を試みた。

内分泌攪乱化学物質であるビスフェノール A (BPA) は広く樹脂原料として用いられており、ポリカーボネート性のプラスチックを製造する際のモノマーや、エポキシ樹脂の原料、さらにはポリ塩化ビニルの可塑剤として用いられている。ポリカーボネートは耐久性に優れており、哺乳瓶を含む食品の容器等に用いられており、またエポキシ樹脂は歯科治療用の歯の詰め物や缶詰の内側の被服にも用いられている。ヒトに対しても、エストロゲン、アンドロゲン、副腎皮質ホルモン様の作用を示すことが唆されている。実験動物を用いた研究においては、胎児期の低用量 BPA 曝露が神経分化の促進や神経細胞移動の異常を引き起こし、大脳皮質の発生に異常を引き起

こすことが知られていることから、本研究課題では、低用量 BPA の胎児期曝露マウスをモデルとし、細胞数という明確な数値で器官形成期における変化を評価できるこの評価手法が、リスク評価手法としては極めて有用であることを明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

1. 動物と飼育条件

8 週齢の C57BL/6J マウス (日本 SLC、吹田市) を、SPF 環境下 (明暗周期: 12 時間 (午前 7 時—午後 7 時), 温度: $24 \pm 1^\circ\text{C}$, 湿度: $55 \pm 5\%$) にて飼育した (近畿大学の実験動物飼育規定に準拠)。給水瓶はテフロン被膜を施したものを使用した。2 週間の馴化の後、雌雄 1:1 で交配を行い、12 時間後に臍栓が確認できたものを実験に使用した。臍栓が確認できた日を胎生 0.5 日 (E0.5) とした。

2. 投与液と投与計画

BPA (2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane 4,4'-isopropylidenediphenol, CAS no. 80-05-7, Sigma Aldrich) をコーンオイルで溶解し、E8.5~13.5 に連続して強制経口投与した (投与液は、濃度を $\pm 10\%$ で調整し、調整後 5 日以内に使用した。また毎日ほぼ一定の時間の PM12:00 に投与した)。予備検討として、20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の BPA を E8.5~13.5 に連続強制経口投与した。E14.5 に帝王切開により得られた雌胎児の組織学的解析を行ったところ、20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では皮質板 (Cortical plate: CP) の過形成などの組織学的異常は検出されなかった。これに対して、200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ 投与群では大脳皮質の形成異常が確認された。これらの結果に基づき、本年度の本研究では 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の BPA を用いて、胎児期曝露による大脳皮質形成異常の発症メカニズムの解明を目指した。先行研究では妊娠ラットに 6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の BPA を強制経口投与した場合、胎児血清中に 4-5 $\mu\text{g}/\text{L}$ の BPA が検出された (Yoshida et al. 2004)。さらに、200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の投与では胎児重量や産児数の減少が報告されてい

る (Cagen et al. 1999)。これらの成績は、200 µg/kg/day の BPA を妊娠マウスに投与する今回の実験系において胎児に胎盤を経由して BPA が到達し、発生に何らかの影響を及ぼすことを示唆する。

3. 胎児重量の測定と組織サンプルの作製

妊娠マウスの E14.5 に帝王切開により胎児を摘出した。組織学的解析には子宮口から近いものを優先して使用したが、その根拠は、生殖器系、内分泌系、生殖機能の成熟、性周期や行動学的解析により子宮内位置の違いによるこれら指標における変化が検出されないため、胎児の子宮内位置は胎児発生および生後の発達に影響を及ぼさないことが報告されているからである (Nagao et al. 2004)。E14.5 に胎児重量と頭部の大きさを測定した後、胎児は PLP (periodate lysin paraformaldehyde) 固定液を用いて 4°C で固定して PBS で洗浄した。パラフィン切片は 5 µm、凍結切片は 10 µm の厚さで作成し、免疫組織化学染色に用いた。なお組織学的解析には、3 匹の母親から 3 匹ずつ 9 匹の雌胎児を用いた。

4. 免疫組織化学染色

1 次抗体は以下のものを用いた。Mouse monoclonal anti-neural class III β -tubulin (Tuj1: Covance) : 神経細胞のマーカー、rabbit monoclonal anti-Ki67 (Lab vision) : 増殖中の細胞のマーカー、rat monoclonal anti-BrdU (CldU) (Oxford Biotechnology)、mouse monoclonal anti-BrdU (IdU) (Becton Dickinson)、rabbit polyclonal anti-Tbr2 (Abcam) : IPC に発現する転写因子、rabbit polyclonal anti-Pax6 (Covance) : RGC に発現する転写因子、mouse monoclonal anti-Nestin (BD pharminogen) : RGC の放射状突起のマーカー、2 次抗体には Alexa 568、488 を共役させた抗体を用いて、蛍光免疫組織染色を行った。対比染色として、DAPI による核染色を行った。

5. CldU と IdU の取り込み実験

胎児生体内で S 期の細胞をラベリングするために、CldU (MP biomedical Inc.) と IdU (Sigma) を腹腔内投与し、CldU の場合は投与後 24 時間、IdU は投与後 1 時間が E14.5 になるように胎児を摘出した。CldU と IdU 陽性細胞を免疫組織化学染色によって検出し、先行研究 (Komada et al. 2008) に倣って、大脳皮質原基における陽性細胞の数や分布を定量した。切片は組織学的に同じ位置にあるものを 1 胎児から 2 切片選び定量した。

6. 細胞周期解析 (cell cycle length & cell cycle exit)

IPC の cell cycle length を定量するために、IdU を投与し 1 時間後に摘出した胎児を用いて、IPC のマーカーである Tbr2 と IdU の二重染色を行った。すべての Tbr2 陽性細胞の内、IdU と共発現している細胞の割合を求め、その比を BPA 曝露群と対照群との間で比較することにより cell cycle length を比較することができる。その比が小さいほど、Tbr2 陽性の IPC の細胞周期は長いことを示している。

Cell cycle exit を定量するために、CldU を投与し 24 時間後に摘出した胎児を用いて、増殖中の細胞のマーカーである Ki67、RGC のマーカーである Pax6、IPC のマーカーである Tbr2 との二重染色を行った。すべての CldU 陽性細胞のうち、Ki67 との二重染色では終脳背側全体の、Pax6 と Tbr2 では SVZ (subventricular zone) の上部において CldU 陽性かつ Ki67、Pax6、Tbr2 陰性の細胞の割合を比較した。なお、これらの細胞は、それぞれの細胞において細胞周期を出て分化した細胞を示している。

7. Cell cycle exit、cell cycle length、増殖の解析における細胞数の定量

免疫組織化学染色による陽性細胞を定量するために、Figure 2~6 に示したように 2 枚の組織学的に一致する切片に対して 2 か所の測定部位 (100 µm の幅、White Box) を決定し、すべての細胞数 (DAPI 陽性細胞) と、それぞれの陽性細胞数を数えて Student

t-test を行った。

C. 研究結果

1. BPA の胎児期曝露は皮質板の過形成を誘導する

低用量 BPA の胎児期曝露による大脳皮質発生への影響を解析するために、妊娠マウスに対して E8.5～13.5 (マウスにおける大脳皮質の器官形成期) に 200 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の用量で連続して強制経口投与を行った。E14.5 に帝王切開により胎児を摘出して生死と性別を確認後、生存胎児については重量と頭部長 (前後長と左右幅) を測定した。その結果、対照群との間に胎児生存率、重量、頭部長に差はみられず、さらに性差も確認されなかった。

胎児切片に HE 染色を行い病理組織学的に観察したところ、BPA 曝露群において皮質板の過形成が観察された (Fig. 1A, B)。BPA 曝露による神経新生への影響を解析するために、Tuj1 (neuron-specific class III β -tubulin) の発現領域を調べたところ、Tuj1 を発現している皮質板の厚さが増していることが示された (BPA 群: $57.6 \pm 2.11\%$ 対照群: $47.5 \pm 2.09\%$, $P < 0.05$, Fig. 1C, D, E)。中村らは低用量の BPA の胎児期曝露により、神経新生や神経移動が亢進するために大脳皮質の発生に異常が引き起こされたことを報告した (Nakamura et al. 2006)。我々の結果はこの先行研究の結果と一致し、BPA の胎生期曝露は神経新生の亢進による皮質板の過形成を誘導することを示した。

2. BPA の胎児期曝露は神経幹・前駆細胞の cell cycle exit を促進する

大脳皮質の発生において適切に制御された細胞周期は重要である。そこで、BPA 曝露による神経新生の促進の原因を明らかにするために、神経幹・前駆細胞の cell cycle exit について増殖中の細胞に発現する核タンパクである Ki67 とチミジン類似物質である CldU を 24 時間前に投与することで増殖中の細胞をラベリングし、蛍光免疫二重染色による解析を行った。Ki67 と CldU が共発現している細胞は 24 時間

前 (E13.5) も胎児摘出時 (E14.5) も増殖中の細胞であることを示しており、Ki67 陰性かつ CldU 陽性の細胞はラベリングした 24 時間前は増殖中であるが、胎児摘出時は細胞周期を出ている (cell cycle exit) ことを示す (Fig. 2A, B)。Cell cycle exit はこの細胞の割合を比較することにより解析を行う。その結果、BPA 曝露群で cell cycle exit の割合が対照群と比較して増加していることが明らかになった (BPA 曝露群: $44.1 \pm 3.8\%$ 対照群: $34.3 \pm 4.7\%$ $P < 0.01$ Fig. 2E)。すなわち、皮質板の過形成は神経幹・前駆細胞の分化が促進されて誘導されたことを示す。また、Ki67 と CldU が共発現している細胞は SVZ/VZ の深層に留まっており、分布に異常がみられた (Fig. 2A, B)。これは、細胞周期に相関して細胞の核が脳室面から脳表面に向かって上下運動をする RGC のエレベーター運動に影響しているためではないかと考え、放射状突起の状態について Nestin 抗体を用いた免疫染色によって解析した。その結果、BPA 曝露群では対照群と比較して放射状突起が短くなっており (Fig. 2C, D)、これが原因で Ki67 陽性細胞や Ki67 と CldU の共発現している細胞の分布に異常が引き起こされていることが示唆された。

3. BPA の胎児期曝露は増殖中の神経幹・前駆細胞の減少を誘導する

神経新生の促進は、神経幹・前駆細胞の増殖に影響を及ぼしている可能性があるため、増殖中の細胞のマーカーである Ki67 の抗体を用いて免疫組織染色を行った (Fig. 3A, B)。E14.5 において Ki67 陽性細胞の割合が有意に BPA 投与群において減少し (BPA 曝露群: $41.6 \pm 1.0\%$ 対照群: $47.2 \pm 1.0\%$ $P < 0.01$ Fig. 3C)、神経新生のタイミングが早くなることによって神経新生が促進されており、結果として増殖中の神経幹・前駆細胞が減少していることが示された。

4. BPA の胎児期曝露は特に中間前駆細胞 (IPC) に作用する

マウスにおいても大脳皮質の発生においては、SVZ/VZに大きく分けて自己複製能、神経新生能、遺伝子発現の異なる3種類の神経幹・前駆細胞(RGC、IPC、oRGC)が存在する(Molnar et al. 2011)。BPAの胎児期曝露がこれらの細胞の数や比率に影響を及ぼすか否かを、それぞれの細胞のマーカーの発現[RGC-Pax6 (RGCに発現する転写因子)、IPC-Tbr2 (IPCに発現する転写因子)]を用いて解析した(Fig. 4A-D)。その結果、主にVZに局在するRGCはBPA曝露群と対照群の間で有意な差はみられないが(BPA曝露群:54.1±3.1% 対照群:55.1±3.8% Fig. 4E)、SVZに分布するIPCはBPA曝露によりその数が有意に減少した(BPA曝露群:5.46±0.32% 対照群:6.12±0.24% P<0.05 Fig. 4E)。これらの結果は、BPA曝露は特にIPCの維持に影響を及ぼしている可能性を示している。

5. BPAの胎児期曝露はRGCとIPCの分化を促進する
大脳皮質の発生において、RGCからIPCあるいは神経細胞へ分化、またIPCから神経細胞へ分化する。IPCは主にヒトの進化の過程において高度に発達させてきた大脳皮質の2,3層の投射神経を産生することから、大脳皮質の進化に重要な役割を果たしていると考えられる。そこで、RGCやIPCの分化にBPAの胎児期曝露が影響を及ぼすかどうかを、チミジン類似物質を用いたcell cycle exitにより解析した。CldUを投与して24時間後の皮質板とSVZの上層において、CldUを発現しPax6あるいはTbr2を発現していない細胞は、それぞれ細胞周期を出て分化したRGCあるいはIPCであると定義した(Fig. 5A-D)。解析の結果、RGCとIPCのいずれもBPAの胎児期曝露により、分化した細胞の割合が増加していることが明らかになった(RGC BPA曝露群:37.4±2.4% 対照群:32.8±2.8% P<0.01, IPC BPA曝露群:35.7±1.2% 対照群:30.7±3.7% P<0.01 Fig. 5E)。すなわち、BPAの胎児期曝露によりIPCとRGCはともにcell cycle exitが促進されていることが明らかになった。

6. BPAの胎児期曝露はIPCの細胞周期を延長させる

IPCが減少した原因が、細胞周期が長くなることで増殖が抑えられたことに起因していると仮定し、細胞周期の長さを解析した。IdUをサンプリング(E14.5)の1時間前に投与し、IdU抗体とTbr2抗体を用いて蛍光免疫組織染色を行った。細胞周期の長さはすべてのTbr2陽性細胞とS期にあるTbr2陽性細胞(IdUとTbr2の共発現している細胞)の割合で算出することが可能であり、その割合が少ないほど細胞周期は長くなっている(Fig. 6A, B)。BPA曝露群では明らかに細胞周期が延長しており(BPA曝露群:8.4±0.6% 対照群:16.5±4.3% P<0.01 Fig. 6C)、細胞周期が長くなることによってIPCの自己複製が減少し、IPCの数が減少したことが示された。

D. 考察

これまでの研究では、ICR妊娠マウスにBPA(20 µg/kg/day)を皮下注射すると、胎児において神経新生と移動の促進を誘導することが報告されていたが(Nakamura et al. 2006)、今回の我々の報告では、C57BL/6Jマウスを用いたBPA(20 µg/kg/day)の強制経口投与ではE14.5において、神経幹細胞の神経新生や増殖に影響はみられなかった。この結果の違いは、マウスの系統差によるBPAへの感受性の違いや、投与経路による違いであると考えられる。また、別の研究では、BPA 200 µg/kg/dayを子宮内曝露すると胎児重量あるいは産児数が減少するものの、20 µg/kg/dayではこれらの異常はみられなかった(Cagen et al. 1999)。今回の我々の報告でも、組織学的な異常(細胞周期、増殖、分化の異常)は200 µg/kg/dayでは誘導されたものの、20 µg/kg/dayでは確認できなかった。

内分泌攪乱物質であるBPAは神経幹細胞の神経新生を促進し、増殖を抑制する作用がある。BPAはヒトのエストロゲン受容体(ER)に結合し、エストロゲン様の作用を示すことや(Krishnan et al. 1993)、ヒトのアンドロゲン受容体(AR)のアゴニスト(Xu et

al. 2005) であり、またヒトのエストロゲン関連受容体 γ (ERR γ) に結合すること (Takayanagi et al. 2006) が知られている。ER や AR は齧歯類において発生中の脳の広い領域で発現しており (Matsuda et al. 2008, Zsarnovszky and Belcher 2001)、特にエストロゲンは発生の過程において、神経栄養因子として分化促進作用を持つことが知られており、ER α や ER β は大脳皮質の発生の過程において重要な役割を果たしていることが報告されている (Beyer 1999)。ER β ノックアウトマウスを用いた解析では、ER β が神経細胞の移動や分化、生存に重要な役割をもつことを示している (Wang et al. 2003)。また、BPA が ER α の発現量を増加させることも報告されており (Bromer et al. 2010)、BPA はエストロゲン活性を増強することにより、ER の発現を促進し、標的遺伝子の発現を異常に制御している可能性が考えられる。現在、我々は今回報告した異常とエストロゲンや ER との関連を調べており、我々の作製した BPA 曝露モデルにおけるエストロゲンの下流の因子の発現の変化についても解析を行っている。

さらに、BPA は甲状腺ホルモン (T3) と同様にジスルフィドイソメラーゼ (PDI) に結合するが (Horii et al. 2006)、甲状腺ホルモンは正常な大脳皮質の形成、なかでも細胞構築や神経ネットワークの形成に重要である (Cuevas et al. 2005)。甲状腺ホルモン受容体 α と β は大脳皮質や海馬に発現しており (Di Liegro 2008)、BPA はこれらの酵素や受容体に作用し、そのシグナルを増強させることにより大脳皮質の発生に影響している可能性がある。

我々の報告では、BPA は RGC と IPC の増殖を抑制し、分化を促進しているが、ER β は E16.5 においては終脳背側の深層に発現している (Fan et al. 2006) ことから、RGC や IPC において発現している可能性が考えられる。さらに、エストロゲンシグナルは RGC や IPC の stem cell niche の維持に重要であることが報告されており (Wang et al. 2003)、BPA は ER のアゴニストとして働き、エストロゲンシグナルを異常に促進することによって神経新生を促進している可能

性がある。

近年の細胞動態、形態、遺伝子の発現パターンの解析により、発生期の大脳皮質において RGC、IPC および oRGC の 3 種類の似た特徴を持つ神経幹・前駆細胞が同定されている。RGC は脳室面に主に分布し、対称分裂により自己複製を、非対称分裂によって神経細胞を産生している (Molnar et al. 2011)。IPC は RGC の非対称分裂によって産生され、転写因子である Tbr2 を発現し、主に SVZ に分布する (Noctor et al. 2004)。IPC は主に発生後期に大脳皮質の 2, 3 層の投射ニューロンを産生し、また大脳皮質の進化における増大においても重要である。今回の報告において BPA の曝露は IPC の神経新生に影響し、大脳皮質の発生に影響を与えていることから、特にヒトの脳発生におけるリスク評価においては、IPC の異常を評価することは非常に重要であると考えられる。

BPA 曝露は神経新生に関与する遺伝子の発現に影響することが考えられる。basic helix-loop-helix (bHLH) を持つ転写因子は、活性型と抑制型の両方があり、抑制型には Hes1 や Hes5 があり、主に神経幹細胞の維持やグリア新生に関与している。活性型は Mash1、Mash2、Ngn2 が存在し、神経新生の活性化に関与している。Nakamura らによると、BPA 曝露により E14.5 において Mash1 と Ngn2 の発現が促進されており (Nakamura et al. 2006)、我々も未発表であるが今回報告したモデルマウスにおいて Mash1 の発現が E14.5 において増加していることを確認している。BPA は bHLH の活性型の転写因子によって Mash1 や Ngn2 の発現を活性化し、神経新生を促進している可能性がある。

E. 結論

今回の研究では、BPA の胎児期曝露は皮質板の過形成 (Fig. 1) および RGC の放射状突起の短縮 (Fig. 2) を引き起こしていることを認めた。この表現型は神経幹細胞の神経新生の促進により起こっており (Fig. 2)、それに伴う神経幹細胞の減少 (Fig. 3) が観察されたが、これらの異常は特に IPC において顕著であ

った (Fig. 4, 5)。これらの異常の原因は細胞周期の延長 (Fig. 6) にあり、我々はこれらの異常が生後も維持され、神経機能の発達などに影響しているか否かを現在解析している。BPA の胎児期曝露は細胞周期の異常を引き起こすことにより、大脳皮質の分化に影響していることが明らかになった。

F. 引用文献

Baala, L., Briault, S., Etchevers, H.C., Laumonier, F., Natiq, A., Amiel, J., Boddaert, N., Picard, C., Sbiti, A., Asermouh, A., Attie-Bitach, T., Encha-Razavi, F., Munnich, A., Sefiani, A., Lyonnet, S., 2007. Homozygous silencing of T-box transcription factor EOMES leads to microcephaly with polymicrogyria and corpus callosum agenesis. *Nat Genet* 39, 454-456.

Beyer, C., 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. *Anat Embryol (Berl)* 199, 379-390.

Bromer, J.G., Zhou, Y., Taylor, M.B., Doherty, L., 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.

Cagen, S.Z., Waechter, J.M., Jr., Dimond, S.S., Breslin, W.J., Butala, J.H., Jekat, F.W., Joiner, R.L., Shiotsuka, R.N., Veenstra, G.E., Harris, L.R., 1999. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci* 50, 36-44.

Chenn, A., Walsh, C.A., 2002. Regulation of cerebral cortical size by control of cell cycle exit in neural precursors. *Science* 297, 365-369.

Cuevas, E., Auso, E., Telefont, M., Morreale de Escobar, G., Sotelo, C., Berbel, P., 2005. Transient maternal hypothyroxinemia at onset

of corticogenesis alters tangential migration of medial ganglionic eminence-derived neurons. *Eur J Neurosci* 22, 541-551.

Di Liegro, I., 2008. Thyroid hormones and the central nervous system of mammals (Review). *Mol Med Report* 1, 279-295.

Englund, C., Fink, A., Lau, C., Pham, D., Daza, R.A., Bulfone, A., Kowalczyk, T., Hevner, R.F., 2005. Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci* 25, 247-251.

Fan, X., Warner, M., Gustafsson, J.A., 2006. Estrogen receptor beta expression in the embryonic brain regulates development of calretinin-immunoreactive GABAergic interneurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 19338-19343.

Golub, M.S., Wu, K.L., Kaufman, F.L., Li, L.H., Moran-Messen, F., Zeise, L., Alexeeff, G.V., Donald, J.M., 2010. Bisphenol A: developmental toxicity from early prenatal exposure. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 89, 441-466.

Gotz, M., Huttner, W.B., 2005. The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 777-788.

Haubensak, W., Attardo, A., Denk, W., Huttner, W.B., 2004. Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3196-3201.

Hiroi, T., Okada, K., Imaoka, S., Osada, M., Funae, Y., 2006. Bisphenol A binds to protein disulfide isomerase and inhibits its enzymatic and hormone-binding activities. *Endocrinology* 147, 2773-2780.

Howe, S.R., Borodinsky, L., 1998. Potential

- exposure to bisphenol A from food-contact use of polycarbonate resins. *Food Addit Contam* 15, 370-375.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y., Taketani, Y., 2002. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 17, 2839-2841.
- Komada, M., Saitsu, H., Kinboshi, M., Miura, T., Shiota, K., Ishibashi, M., 2008. Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development* 135, 2717-2727.
- Kowalczyk, T., Pontious, A., Englund, C., Daza, R.A., Bedogni, F., Hodge, R., Attardo, A., Bell, C., Huttner, W.B., Hevner, R.F., 2009. Intermediate neuronal progenitors (basal progenitors) produce pyramidal-projection neurons for all layers of cerebral cortex. *Cereb Cortex* 19, 2439-2450.
- Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L., Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
- Kundakovic, M., Champagne, F.A., 2011. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun* 25, 1084-1093.
- Matsuda, K., Sakamoto, H., Kawata, M., 2008. Androgen action in the brain and spinal cord for the regulation of male sexual behaviors. *Curr Opin Pharmacol* 8, 747-751.
- Molnar, Z., Vasistha, N.A., Garcia-Moreno, F., 2011. Hanging by the tail: progenitor populations proliferate. *Nat Neurosci* 14, 538-540.
- Nagao, T., Wada, K., Kuwagata, M., Nakagomi, M., Watanabe, C., Yoshimura, S., Saito, Y., Usumi, K., Kanno, J., 2004. Intrauterine position and postnatal growth in Sprague-Dawley rats and ICR mice. *Reprod Toxicol* 18, 109-120.
- Nakamura, K., Itoh, K., Sugimoto, T., Fushiki, S., 2007. Prenatal exposure to bisphenol A affects adult murine neocortical structure. *Neurosci Lett* 420, 100-105.
- Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., Fushiki, S., 2006. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of Bisphenol A. *J Neurosci Res* 84, 1197-1205.
- Noctor, S.C., Martinez-Cerdeno, V., Ivic, L., Kriegstein, A.R., 2004. Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci* 7, 136-144.
- Pulgar, R., Olea-Serrano, M.F., Novillo-Fertrell, A., Rivas, A., Pazos, P., Pedraza, V., Navajas, J.M., Olea, N., 2000. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environ Health Perspect* 108, 21-27.
- Sasaki, N., Okuda, K., Kato, T., Kakishima, H., Okuma, H., Abe, K., Tachino, H., Tachida, K., Kubono, K., 2005. Salivary bisphenol-A levels detected by ELISA after restoration with composite resin. *J Mater Sci Mater Med* 16, 297-300.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C.E., Paul, M., Chahoud, I., 2002. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 110, A703-707.
- Takayanagi, S., Tokunaga, T., Liu, X., Okada,