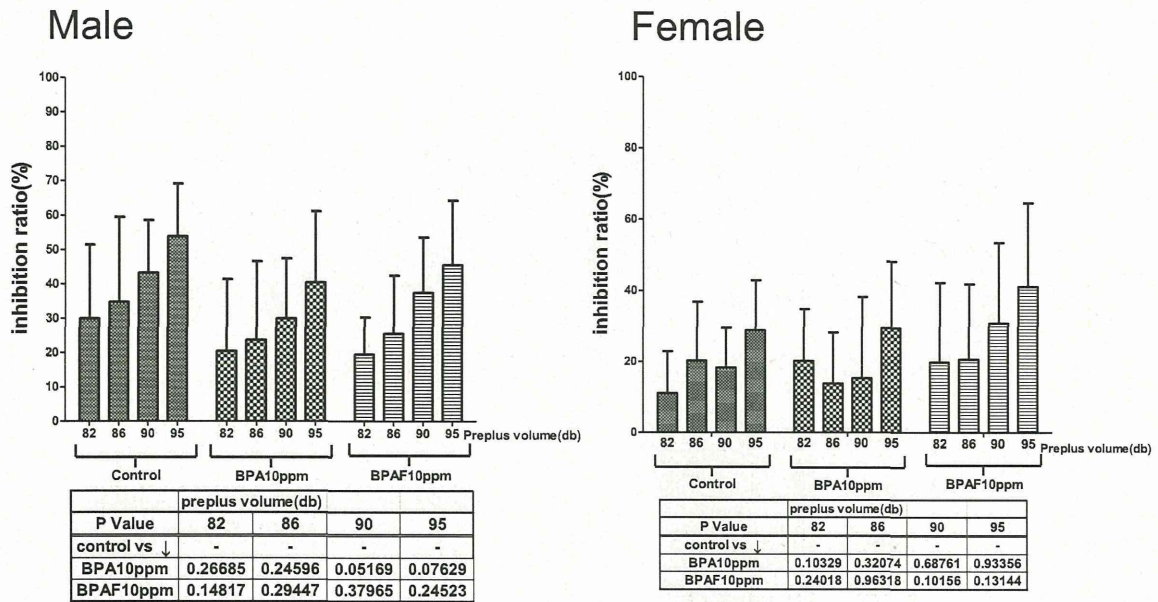


Prepulse inhibition test



29

BPA曝露によるDNAメチル化変化の解析

<実験条件>

BPA曝露: 0, 0.1, 1, 10ppm (飲水)

曝露期間: 交配前から離乳まで

サンプル採取時期: 雄成体

採取部位: 海馬

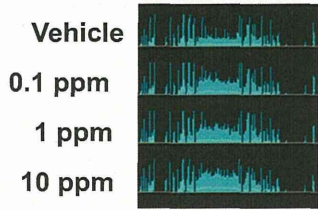
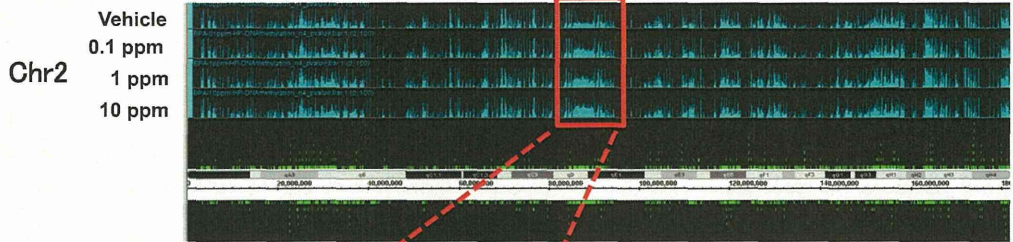
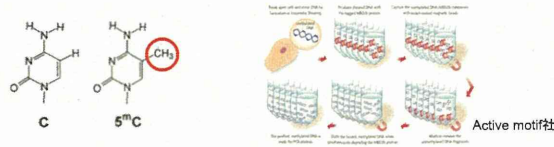
n数: 4

解析方法: **MeDIP-Chip法**
(MBD2-IP and promoter array)

データ解析: TAS (Tiling array analysis software), Bandwidth: 250, control: Genomeで計算し、各群のデータとする。
合わせて、controlを0ppmにした計算も行い、0.1, 1, 10ppmでの変化領域同定に用いる。

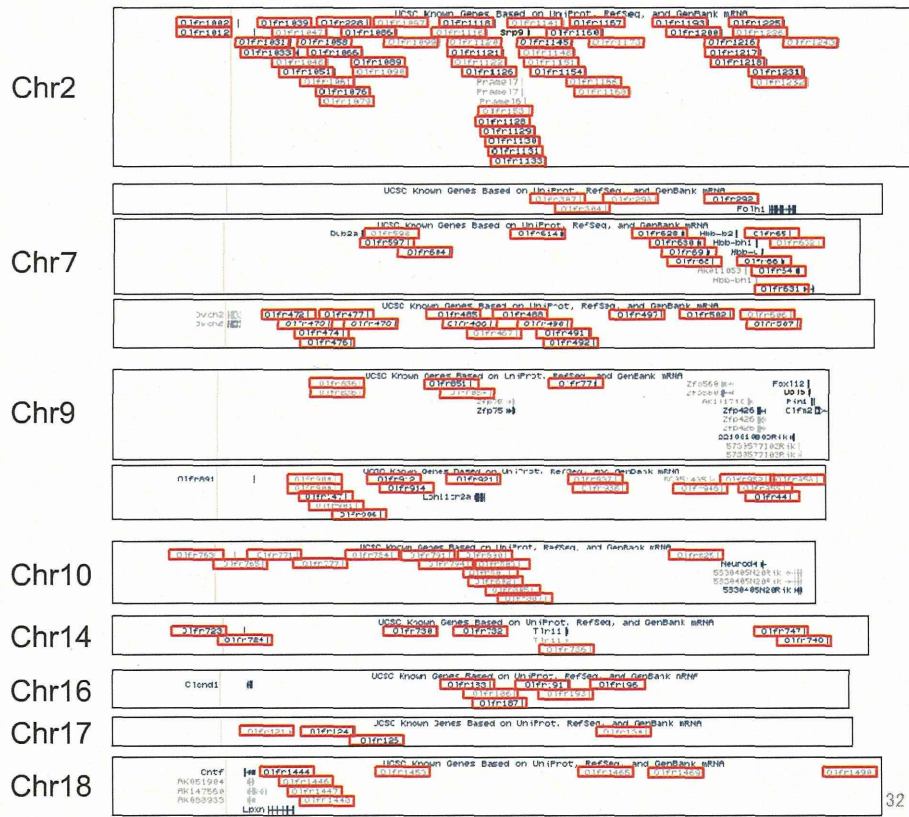
30

- MBD2蛋白を用いたメチル化DNA断片の濃縮 -



プロモータレイで4点比較を行った結果
Olfレセプター近傍のメチル化が上昇していた

Olfre



次世代シーケンサー：Miseq(イルミナ)



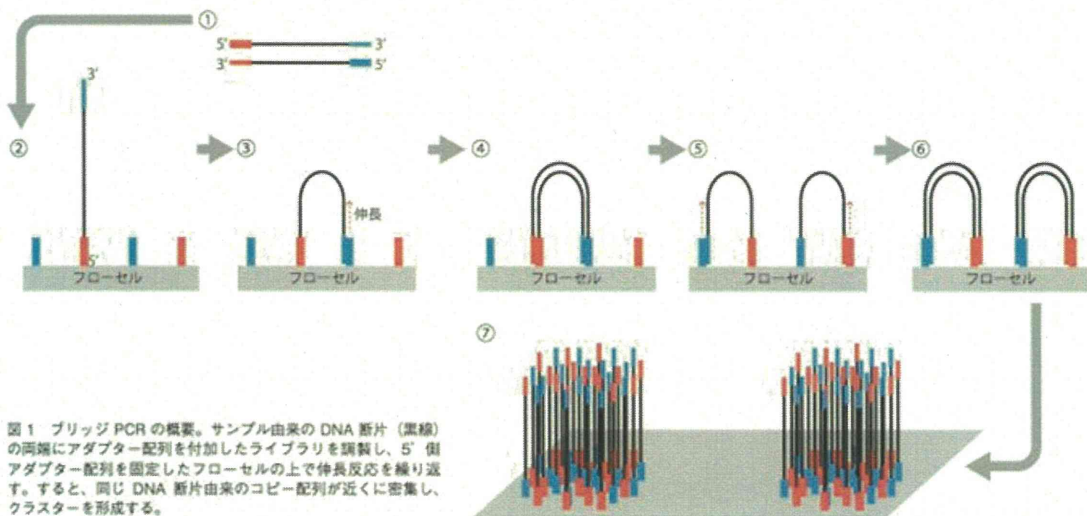
特長

- 最速のランタイム： サンプルからデータまで最短8時間
- 使いやすさを追求したデザイン： 圧倒的なスピードを誇るサンプル調製と、クラスター形成とデータ解析を一体化した自動化システム
- 高いスループット： **1ランあたり約8Gbのデータ量と、最高で2000万-2500万リードを産出**
- 実績のある次世代シーケンスケミストリー： 最も高精度な変異検出と高品質データ
- 幅広いアプリケーション： キャピラリーシーケンサーアプリケーションに加えて、強力で低コスト、スピーディな次世代シーケンサーアプリケーションもカバー

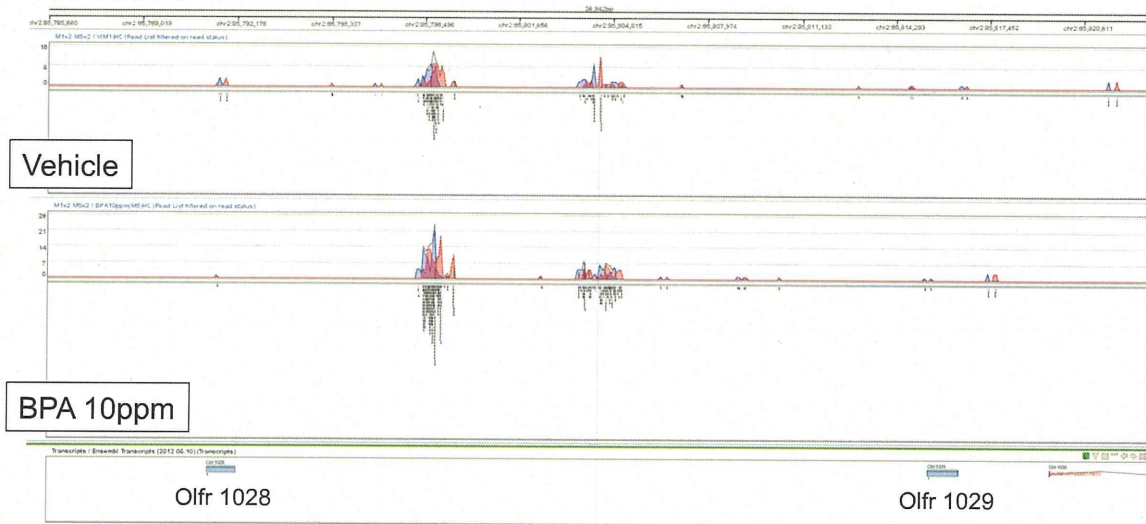
33

イルミナ社次世代シーケンサーの原理

クラスターごとに1塩基ずつ測定



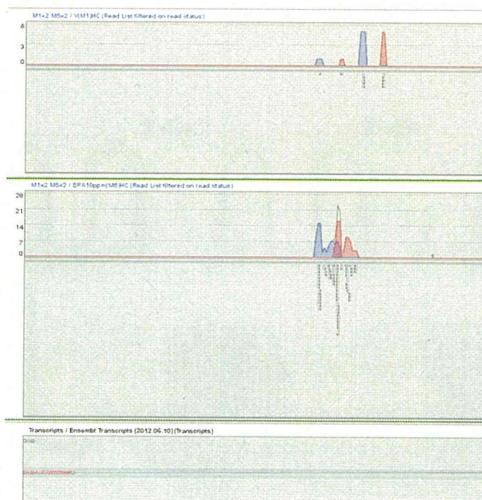
Olfre近傍におけるメチル化上昇



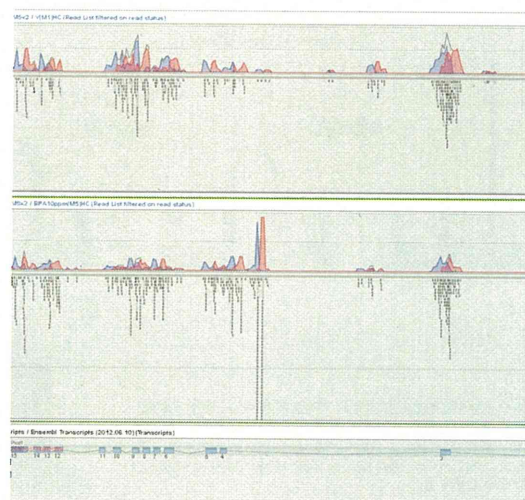
35

Olfre以外において見出されたメチル化上昇領域候補

Grind2

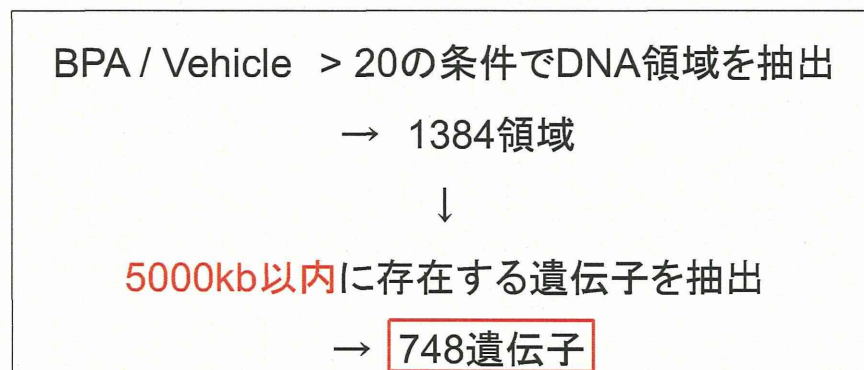


Plcd1



36

高メチル化DNA領域の近傍遺伝子リスト



Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

37

IPA解析

Top Networks

ID	Associated Network Functions	Score
1	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Cell Morphology	38
2	Embryonic Development, Organismal Development, Connective Tissue Development and Function	38
3	Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, Glomerular Injury	34
4	Drug Metabolism, Energy Production, Hereditary Disorder	28
5	Gene Expression, Cellular Development, Cancer	28

Top Canonical Pathways

Name	p-value	Ratio
Neuropathic Pain Signaling In Dorsal Horn Neurons	8.24E-05	12/108 (0.111)
tRNA Splicing	8.37E-05	7/45 (0.156)
Molecular Mechanisms of Cancer	9.3E-05	25/378 (0.066)
Axonal Guidance Signaling	1.06E-04	29/466 (0.062)
fMLP Signaling in Neutrophils	1.74E-04	12/129 (0.093)

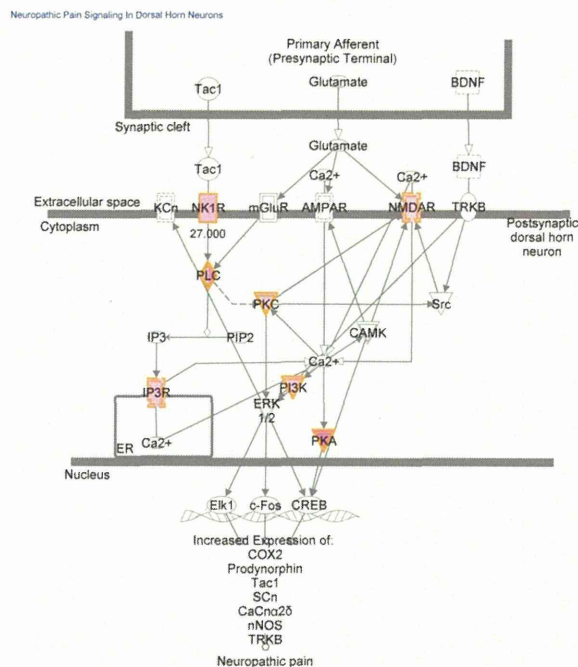
38

IPA解析

Top Bio Functions		
Diseases and Disorders		
Name	p-value	# Molecules
Hereditary Disorder	7.03E-06 - 3.20E-02	100
Auditory Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	16
Neurological Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	118
Ophthalmic Disease	7.26E-06 - 3.20E-02	22
Cardiovascular Disease	3.26E-05 - 3.20E-02	70
Molecular and Cellular Functions		
Name	p-value	# Molecules
Cellular Assembly and Organization	1.35E-05 - 3.20E-02	93
Cellular Function and Maintenance	1.35E-05 - 1.93E-02	75
Nucleic Acid Metabolism	2.16E-05 - 3.07E-02	30
Small Molecule Biochemistry	2.16E-05 - 3.20E-02	54
DNA Replication, Recombination, and Repair	3.36E-05 - 2.52E-02	11
Physiological System Development and Function		
Name	p-value	# Molecules
Behavior	2.18E-05 - 1.41E-02	22
Cardiovascular System Development and Function	1.27E-04 - 3.20E-02	60
Endocrine System Development and Function	1.27E-04 - 2.44E-02	6
Nervous System Development and Function	1.27E-04 - 3.17E-02	80
Tissue Development	1.27E-04 - 3.20E-02	96

Canonical Pathways

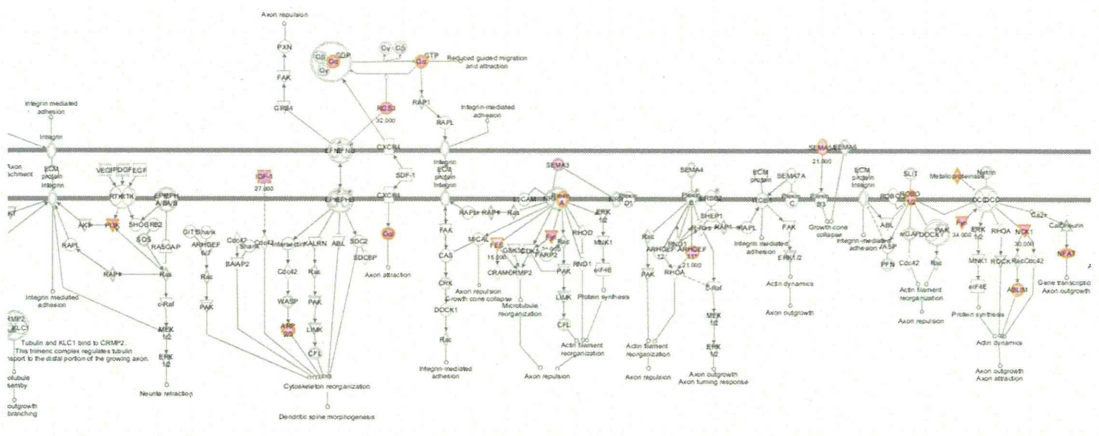
Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons



Canonical Pathways

Axonal Guidance Signaling

Axonal Guidance Signaling

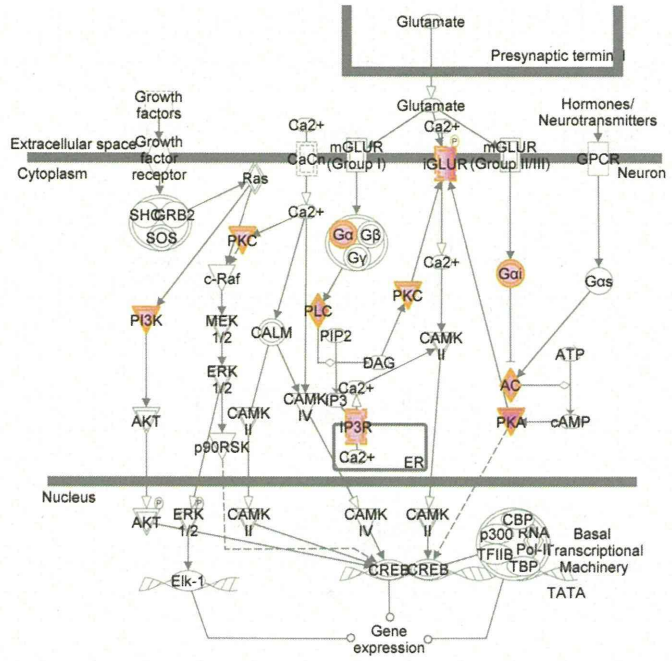


© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

Canonical Pathways

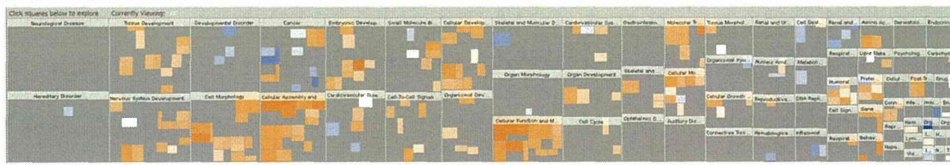
CREB Signaling in Neurons

CREB Signaling in Neurons

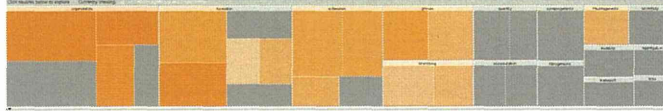


© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

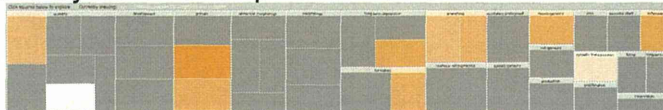
Bio Functions



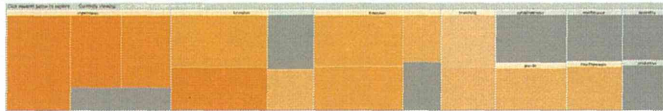
Cellular Assembly and Organization



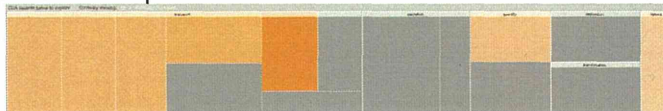
Nervous System Development and Function



Cellular Function and Maintenance



Molecular Transport



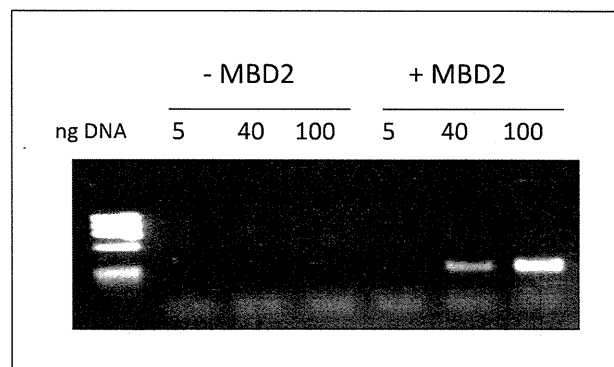
BPA解析まとめと考察

- 成長後に行動変化が認められた
- ヒト型SXRを*in vivo*で弱く活性化した
- 免疫組織解析においてSynapsin とMAP2の上昇が認められた
- DNAメチル化解析(MBD2-IP)の結果、Olf1rレセプター近傍のメチル化上昇に加え複数の領域のメチル化変化を検出した
- IPA解析から、神経機能に関連する機能カテゴリーが抽出された
- DNAメチル化影響の持続性を踏まえると、成長に伴い影響が重篤化する可能性が考えられる

End

45

メチル化DNA断片濃縮の検証 - GFAP Ex1 -



用いたゲノムDNA量依存的にPCR増幅

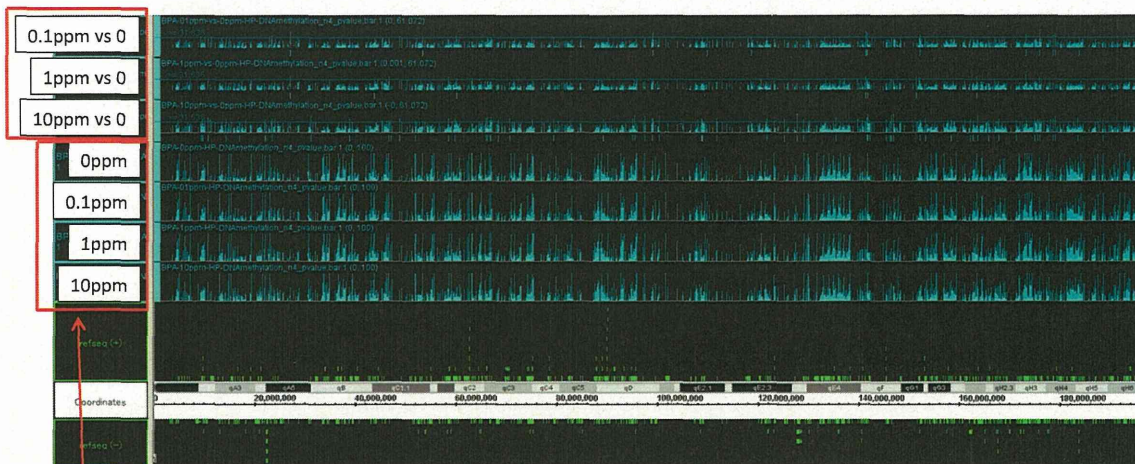


本手法によりメチル化DNA断片が濃縮されることを確認

46

Chr1

変化領域の同定用: 違いを程度を示すグラフの下に、一定の閾値以上の領域を示すバーがある

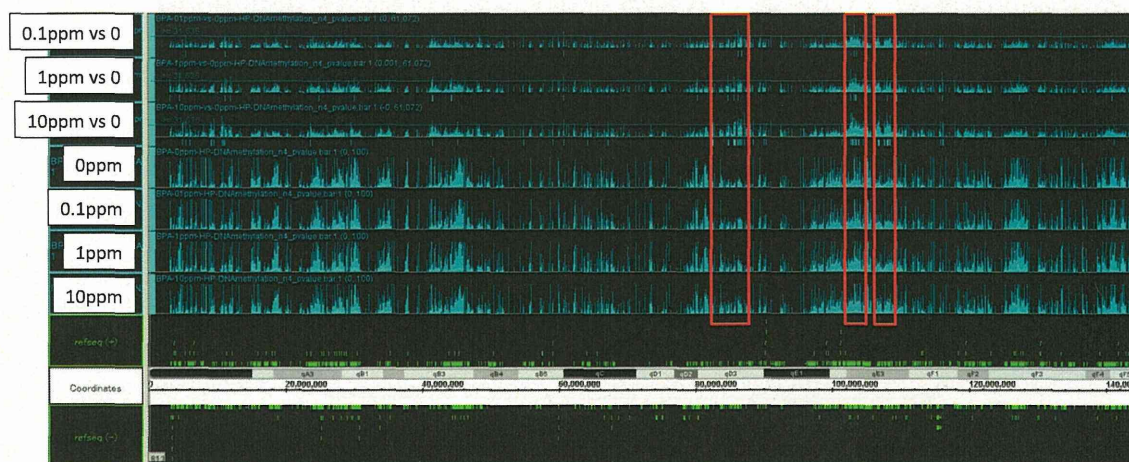


各群のデータ

BPA投与群でDNAメチル化変化を示唆する領域は認められなかった

Genome version:
mm8 47

Chr7

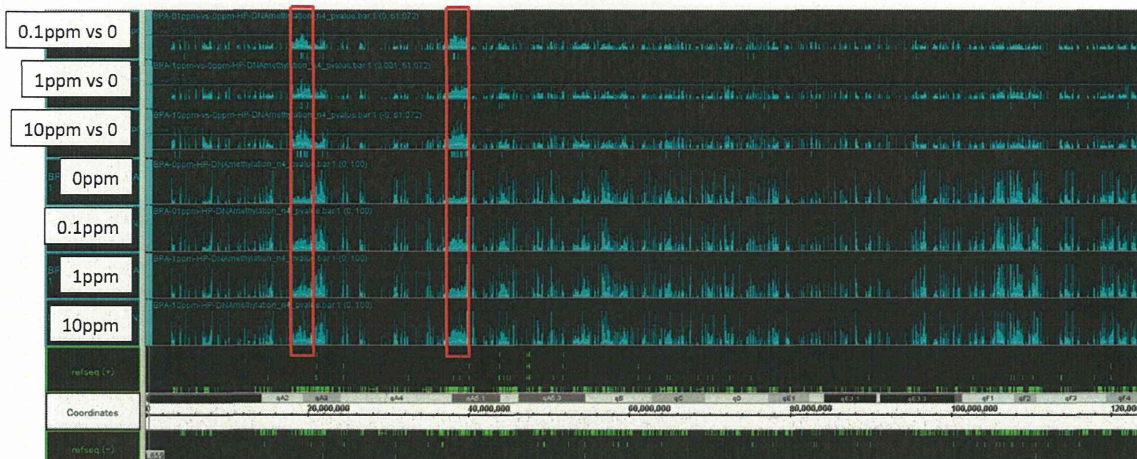


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA	
01fr397 01fr290 01fr584	01fr292 F01h1
UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA	
Dub2a 01fr592 01fr597 01fr584	01fr485 01fr486 01fr487 01fr488 01fr489 01fr490 01fr491 01fr492 01fr493 01fr494 01fr495 01fr496 01fr497 01fr498 01fr499 01fr500 01fr501 01fr502 01fr503 01fr504 01fr505 01fr506 01fr507 01fr508 01fr509 01fr510 01fr511 01fr512 01fr513 01fr514 01fr515 01fr516 01fr517 01fr518 01fr519 01fr520 01fr521 01fr522 01fr523 01fr524 01fr525 01fr526 01fr527 01fr528 01fr529 01fr530 01fr531 01fr532 01fr533 01fr534 01fr535 01fr536 01fr537 01fr538 01fr539 01fr540 01fr541 01fr542 01fr543 01fr544 01fr545 01fr546 01fr547 01fr548 01fr549 01fr550 01fr551 01fr552 01fr553 01fr554 01fr555 01fr556 01fr557 01fr558 01fr559 01fr560 01fr561 01fr562 01fr563 01fr564 01fr565 01fr566 01fr567 01fr568 01fr569 01fr570 01fr571 01fr572 01fr573 01fr574 01fr575 01fr576 01fr577 01fr578 01fr579 01fr580 01fr581 01fr582 01fr583 01fr584 01fr585 01fr586 01fr587 01fr588 01fr589 01fr590 01fr591 01fr592 01fr593 01fr594 01fr595 01fr596 01fr597 01fr598 01fr599 01fr600 01fr601 01fr602 01fr603 01fr604 01fr605 01fr606 01fr607 01fr608 01fr609 01fr610 01fr611 01fr612 01fr613 01fr614 01fr615 01fr616 01fr617 01fr618 01fr619 01fr620 01fr621 01fr622 01fr623 01fr624 01fr625 01fr626 01fr627 01fr628 01fr629 01fr630 01fr631 01fr632 01fr633 01fr634 01fr635 01fr636 01fr637 01fr638 01fr639 01fr640 01fr641 01fr642 01fr643 01fr644 01fr645 01fr646 01fr647 01fr648 01fr649 01fr650 01fr651 01fr652 01fr653 01fr654 01fr655 01fr656 01fr657 01fr658 01fr659 01fr660 01fr661 01fr662 01fr663 01fr664 01fr665 01fr666 01fr667 01fr668 01fr669 01fr670 01fr671 01fr672 01fr673 01fr674 01fr675 01fr676 01fr677 01fr678 01fr679 01fr680 01fr681 01fr682 01fr683 01fr684 01fr685 01fr686 01fr687 01fr688 01fr689 01fr690 01fr691 01fr692 01fr693 01fr694 01fr695 01fr696 01fr697 01fr698 01fr699 01fr700 01fr701 01fr702 01fr703 01fr704 01fr705 01fr706 01fr707 01fr708 01fr709 01fr710 01fr711 01fr712 01fr713 01fr714 01fr715 01fr716 01fr717 01fr718 01fr719 01fr720 01fr721 01fr722 01fr723 01fr724 01fr725 01fr726 01fr727 01fr728 01fr729 01fr730 01fr731 01fr732 01fr733 01fr734 01fr735 01fr736 01fr737 01fr738 01fr739 01fr740 01fr741 01fr742 01fr743 01fr744 01fr745 01fr746 01fr747 01fr748 01fr749 01fr750 01fr751 01fr752 01fr753 01fr754 01fr755 01fr756 01fr757 01fr758 01fr759 01fr760 01fr761 01fr762 01fr763 01fr764 01fr765 01fr766 01fr767 01fr768 01fr769 01fr770 01fr771 01fr772 01fr773 01fr774 01fr775 01fr776 01fr777 01fr778 01fr779 01fr780 01fr781 01fr782 01fr783 01fr784 01fr785 01fr786 01fr787 01fr788 01fr789 01fr790 01fr791 01fr792 01fr793 01fr794 01fr795 01fr796 01fr797 01fr798 01fr799 01fr800 01fr801 01fr802 01fr803 01fr804 01fr805 01fr806 01fr807 01fr808 01fr809 01fr810 01fr811 01fr812 01fr813 01fr814 01fr815 01fr816 01fr817 01fr818 01fr819 01fr820 01fr821 01fr822 01fr823 01fr824 01fr825 01fr826 01fr827 01fr828 01fr829 01fr830 01fr831 01fr832 01fr833 01fr834 01fr835 01fr836 01fr837 01fr838 01fr839 01fr840 01fr841 01fr842 01fr843 01fr844 01fr845 01fr846 01fr847 01fr848 01fr849 01fr850 01fr851 01fr852 01fr853 01fr854 01fr855 01fr856 01fr857 01fr858 01fr859 01fr860 01fr861 01fr862 01fr863 01fr864 01fr865 01fr866 01fr867 01fr868 01fr869 01fr870 01fr871 01fr872 01fr873 01fr874 01fr875 01fr876 01fr877 01fr878 01fr879 01fr880 01fr881 01fr882 01fr883 01fr884 01fr885 01fr886 01fr887 01fr888 01fr889 01fr890 01fr891 01fr892 01fr893 01fr894 01fr895 01fr896 01fr897 01fr898 01fr899 01fr900 01fr901 01fr902 01fr903 01fr904 01fr905 01fr906 01fr907 01fr908 01fr909 01fr910 01fr911 01fr912 01fr913 01fr914 01fr915 01fr916 01fr917 01fr918 01fr919 01fr920 01fr921 01fr922 01fr923 01fr924 01fr925 01fr926 01fr927 01fr928 01fr929 01fr930 01fr931 01fr932 01fr933 01fr934 01fr935 01fr936 01fr937 01fr938 01fr939 01fr940 01fr941 01fr942 01fr943 01fr944 01fr945 01fr946 01fr947 01fr948 01fr949 01fr950 01fr951 01fr952 01fr953 01fr954 01fr955 01fr956 01fr957 01fr958 01fr959 01fr960 01fr961 01fr962 01fr963 01fr964 01fr965 01fr966 01fr967 01fr968 01fr969 01fr970 01fr971 01fr972 01fr973 01fr974 01fr975 01fr976 01fr977 01fr978 01fr979 01fr980 01fr981 01fr982 01fr983 01fr984 01fr985 01fr986 01fr987 01fr988 01fr989 01fr990 01fr991 01fr992 01fr993 01fr994 01fr995 01fr996 01fr997 01fr998 01fr999 01fr1000

O1fr cluster

Genome version:
mm8 48

Chr9



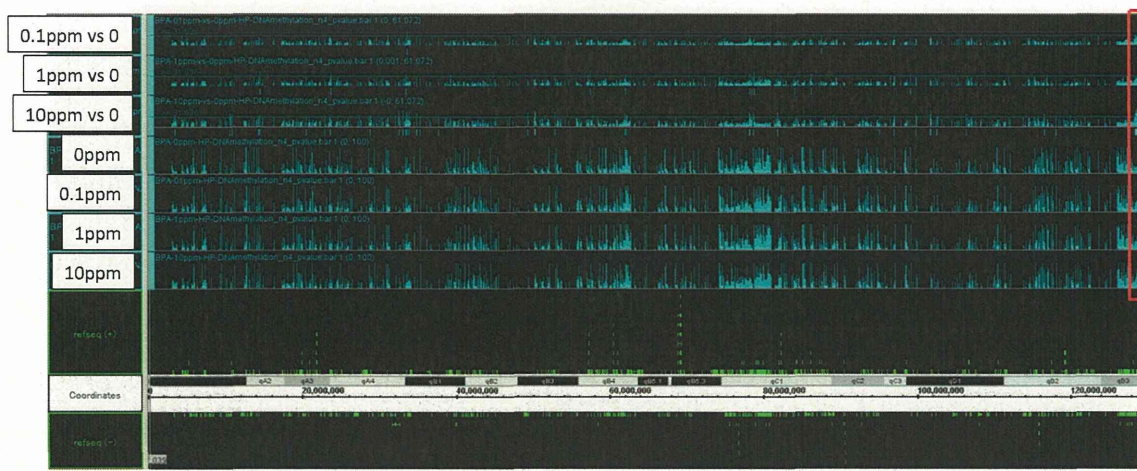
UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA	
01fr036	Zfp009 [H]
01fr035	Zfp008 [H]
	UC18 [L]
	01fr054
	01fr77 [L]
	RP-141749 [H]
	Zfp426 [H]
	Zfp425 [H]
	Zfp428 [H]
	Zfp429 [H]
	Zfp430 [H]
	Zfp431 [H]
	Zfp432 [H]
	Zfp433 [H]
	Zfp434 [H]
	Zfp435 [H]
	Zfp436 [H]
	Zfp437 [H]
	Zfp438 [H]
	Zfp439 [H]
	Zfp440 [H]
	Zfp441 [H]
	Zfp442 [H]
	Zfp443 [H]
	Zfp444 [H]
	Zfp445 [H]
	Zfp446 [H]
	Zfp447 [H]
	Zfp448 [H]
	Zfp449 [H]
	Zfp450 [H]
	Zfp451 [H]
	Zfp452 [H]
	Zfp453 [H]
	Zfp454 [H]
	Zfp455 [H]
	Zfp456 [H]
	Zfp457 [H]
	Zfp458 [H]
	Zfp459 [H]
	Zfp460 [H]
	Zfp461 [H]
	Zfp462 [H]
	Zfp463 [H]
	Zfp464 [H]
	Zfp465 [H]
	Zfp466 [H]
	Zfp467 [H]
	Zfp468 [H]
	Zfp469 [H]
	Zfp470 [H]
	Zfp471 [H]
	Zfp472 [H]
	Zfp473 [H]
	Zfp474 [H]
	Zfp475 [H]
	Zfp476 [H]
	Zfp477 [H]
	Zfp478 [H]
	Zfp479 [H]
	Zfp480 [H]
	Zfp481 [H]
	Zfp482 [H]
	Zfp483 [H]
	Zfp484 [H]
	Zfp485 [H]
	Zfp486 [H]
	Zfp487 [H]
	Zfp488 [H]
	Zfp489 [H]
	Zfp490 [H]
	Zfp491 [H]
	Zfp492 [H]
	Zfp493 [H]
	Zfp494 [H]
	Zfp495 [H]
	Zfp496 [H]
	Zfp497 [H]
	Zfp498 [H]
	Zfp499 [H]
	Zfp500 [H]

Olfcr cluster

UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA	
01fr001	01fr998
	01fr999
	01fr147
	01fr981
	01fr982
	01fr983
	01fr984
	01fr985
	01fr986
	01fr987
	01fr988
	01fr989
	01fr990
	01fr991
	01fr992
	01fr993
	01fr994
	01fr995
	01fr996
	01fr997
	01fr998
	01fr999
	01fr1000
	01fr1001
	01fr1002
	01fr1003
	01fr1004
	01fr1005
	01fr1006
	01fr1007
	01fr1008
	01fr1009
	01fr1010
	01fr1011
	01fr1012
	01fr1013
	01fr1014
	01fr1015
	01fr1016
	01fr1017
	01fr1018
	01fr1019
	01fr1020
	01fr1021
	01fr1022
	01fr1023
	01fr1024
	01fr1025
	01fr1026
	01fr1027
	01fr1028
	01fr1029
	01fr1030
	01fr1031
	01fr1032
	01fr1033
	01fr1034
	01fr1035
	01fr1036
	01fr1037
	01fr1038
	01fr1039
	01fr1040
	01fr1041
	01fr1042
	01fr1043
	01fr1044
	01fr1045
	01fr1046
	01fr1047
	01fr1048
	01fr1049
	01fr1050
	01fr1051
	01fr1052
	01fr1053
	01fr1054
	01fr1055
	01fr1056
	01fr1057
	01fr1058
	01fr1059
	01fr1060
	01fr1061
	01fr1062
	01fr1063
	01fr1064
	01fr1065
	01fr1066
	01fr1067
	01fr1068
	01fr1069
	01fr1070
	01fr1071
	01fr1072
	01fr1073
	01fr1074
	01fr1075
	01fr1076
	01fr1077
	01fr1078
	01fr1079
	01fr1080
	01fr1081
	01fr1082
	01fr1083
	01fr1084
	01fr1085
	01fr1086
	01fr1087
	01fr1088
	01fr1089
	01fr1090
	01fr1091
	01fr1092
	01fr1093
	01fr1094
	01fr1095
	01fr1096
	01fr1097
	01fr1098
	01fr1099
	01fr1100

Genome version: mm8 49

Chr10

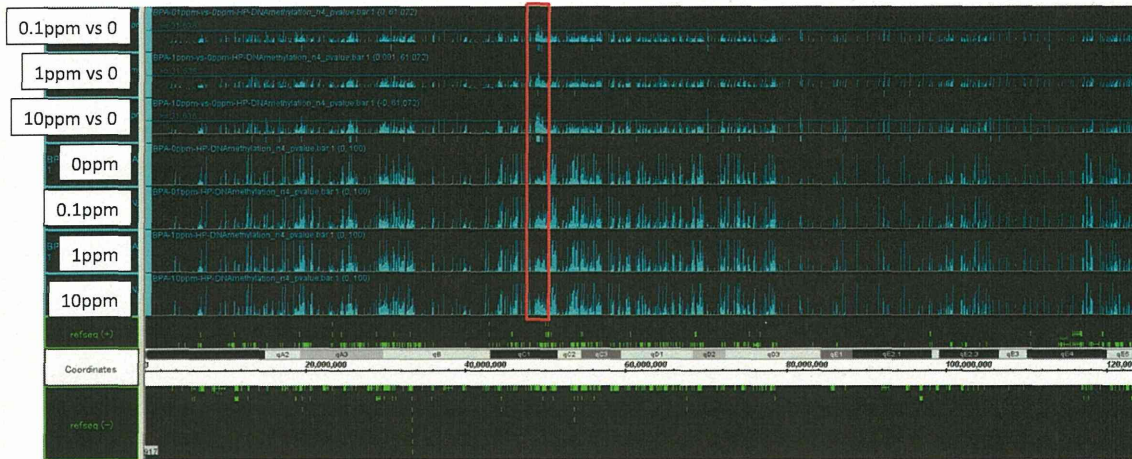


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA	
01fr780	01fr771
	01fr769
	01fr770
	01fr772
	01fr773
	01fr774
	01fr775
	01fr776
	01fr777
	01fr778
	01fr779
	01fr780
	01fr781
	01fr782
	01fr783
	01fr784
	01fr785
	01fr786
	01fr787
	01fr788
	01fr789
	01fr790
	01fr791
	01fr792
	01fr793
	01fr794
	01fr795
	01fr796
	01fr797
	01fr798
	01fr799
	01fr800
	01fr801
	01fr802
	01fr803
	01fr804
	01fr805
	01fr806
	01fr807
	01fr808
	01fr809
	01fr810
	01fr811
	01fr812
	01fr813
	01fr814
	01fr815
	01fr816
	01fr817
	01fr818
	01fr819
	01fr820
	01fr821
	01fr822
	01fr823
	01fr824
	01fr825
	01fr826
	01fr827
	01fr828
	01fr829
	01fr830
	01fr831
	01fr832
	01fr833
	01fr834
	01fr835
	01fr836
	01fr837
	01fr838
	01fr839
	01fr840
	01fr841
	01fr842
	01fr843
	01fr844
	01fr845
	01fr846
	01fr847
	01fr848
	01fr849
	01fr850
	01fr851
	01fr852
	01fr853
	01fr854
	01fr855
	01fr856
	01fr857
	01fr858
	01fr859
	01fr860
	01fr861
	01fr862
	01fr863
	01fr864
	01fr865
	01fr866
	01fr867
	01fr868
	01fr869
	01fr870
	01fr871
	01fr872
	01fr873
	01fr874
	01fr875
	01fr876
	01fr877
	01fr878
	01fr879
	01fr880
	01fr881
	01fr882
	01fr883
	01fr884
	01fr885
	01fr886
	01fr887
	01fr888
	01fr889
	01fr890
	01fr891
	01fr892
	01fr893
	01fr894
	01fr895
	01fr896
	01fr897
	01fr898
	01fr899
	01fr900

Olfcr cluster

Genome version: mm8 50

Chr14

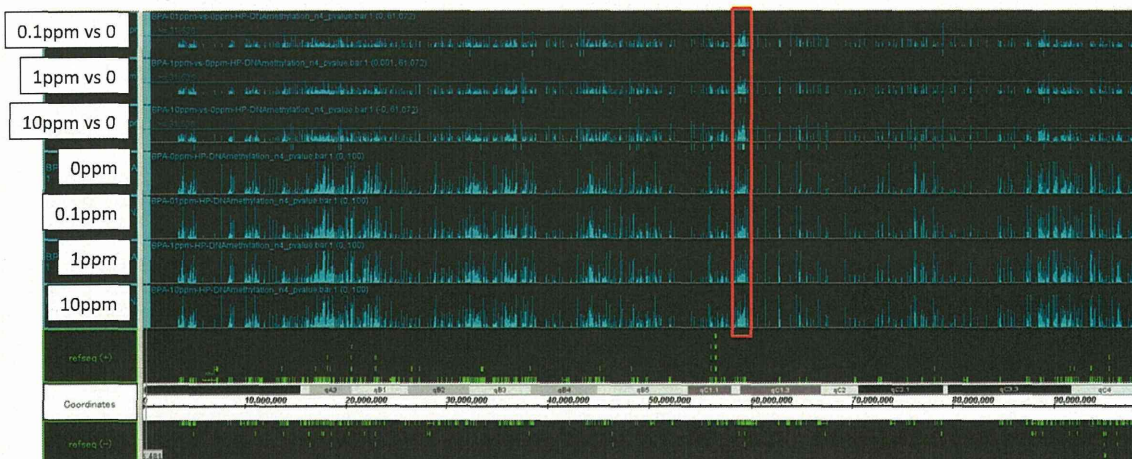


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 01fr723 | 01fr724 | 01fr736 | 01fr732 | Tlr11 | 01fr747 |
 01fr735 | Tlr11 | 01fr746 |

Olfcr cluster

Genome version:
mm8 51

Chr16

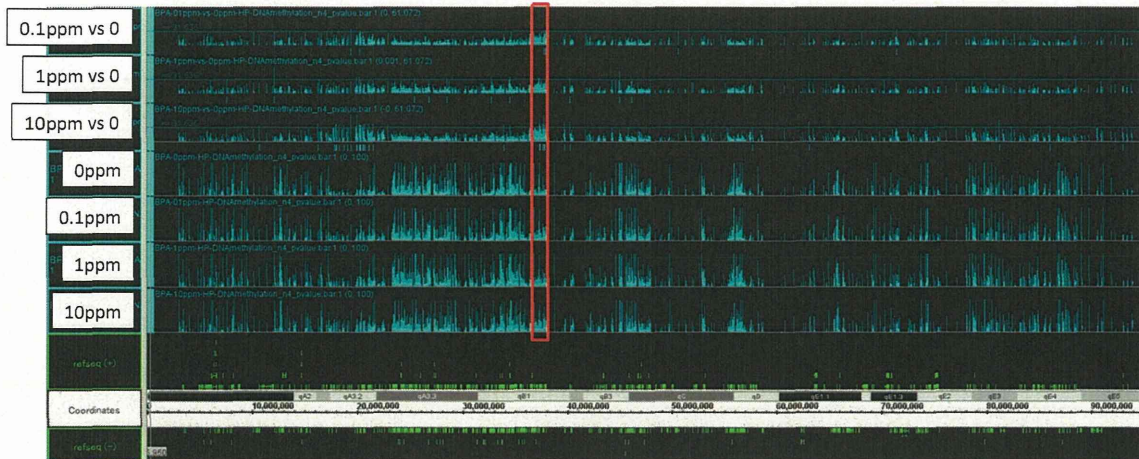


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 Clnd1 | 01fr183 | 01fr191 | 01fr196 |
 01fr186 | 01fr190 |
 01fr187 |

Olfcr cluster

Genome version:
mm8 52

Chr17

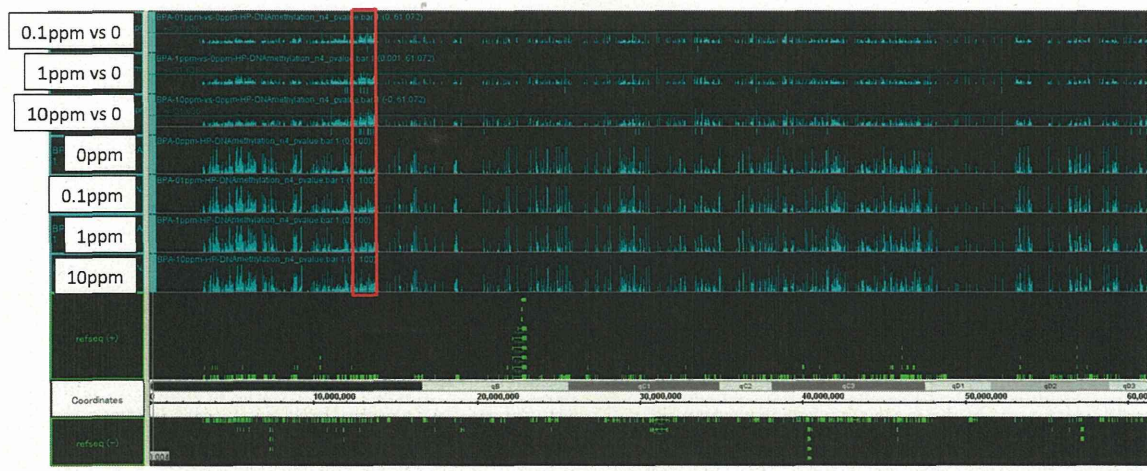


UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 Olfrl121 | Olfrl2+ | Olfrl26 | Olfrl30

Olfrl cluster

Genome version:
mm8 53

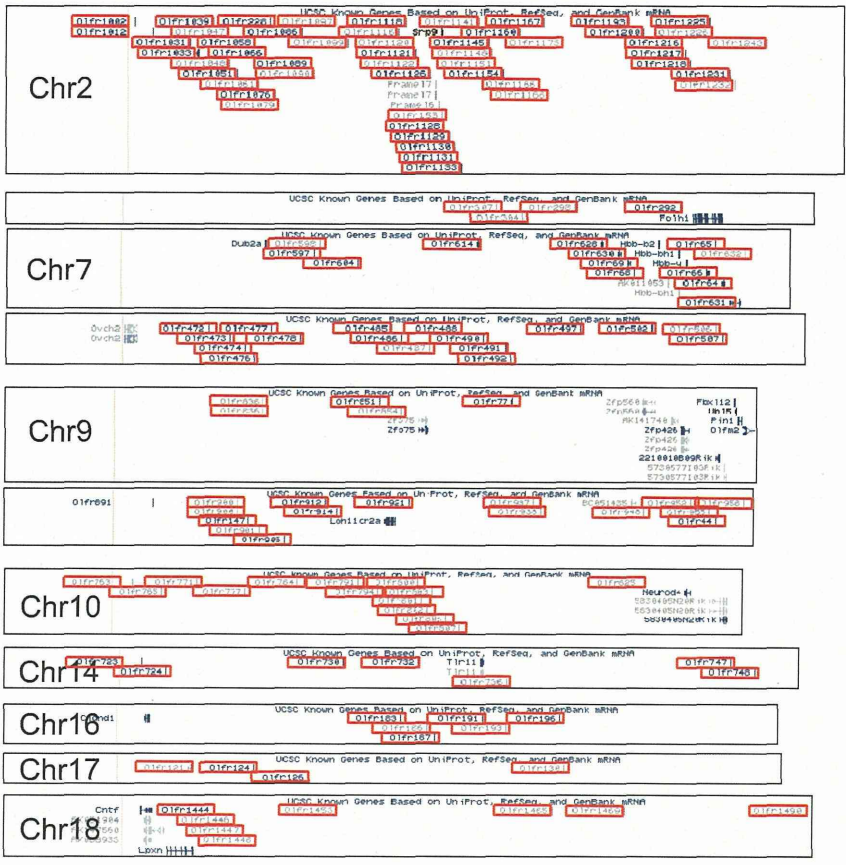
Chr19



UCSC Known Genes Based on UniProt, RefSeq, and GenBank mRNA
 Cntf | Olfrl444 | Olfrl453 | Olfrl465 | Olfrl469 | Olfrl498
 Pknox1 | Olfrl448 | Olfrl447
 Pknox3 | Olfrl448
 Lbx1

Olfrl cluster

Genome version:
mm8 54



発生-発達期におけるビスフェノール類の代謝動態と遅発性行動影響に関する研究

研究分担者 氏名岩野 英知 酪農学園大学 獣医学類 准教授

研究要旨

これまでの研究成果から、BPA に対する胎仔期の代謝活性が脆弱であることが分かっており、特に胎盤移行の関連から妊娠後期のリスクが高いと考えている。本プロジェクトにおいては、2011 年度に胎仔から新生仔期の UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT2B1) の発現、ならびに BPA、BPF、BPAF に対する代謝活性を調べ比較した。また、2012 年度には、妊娠時期の母親の葉酸摂取量の違いにより、BPA の出生成熟後の行動影響に違いを与えるのか比較した。本年度は、それらのデータを再検証し、報告する。特に遅発性行動影響に関しては、妊娠前期と後期の感受性の違いを比較検討する。

以下すべて 10.5 ポイント

A. 研究目的

BPA および BPA 類似体の次世代リスクを①代謝動態と②遅発性行動影響という点から評価する。

① 代謝動態

BPA の代謝を担う UGT2B1 は、胎仔期の発現が低く、それに伴い BPA 代謝活性も低いため胎仔期のリスクが高い事が知られている。妊娠前から出生前後において、BPA 類似物質 (BPF、BPAF) の母親、胎仔における代謝動態を明らかにして BPA と比較し、これら物質のリスクを推測する。今年度はデータを取り直し精査してまとめた。

② 遅発性行動影響

前年度までに母親の栄養状態 (低葉酸の状態) により BPA の影響が出やすくなり、子供の成熟後の不安行動を増強することを示してきた。今年度は特に BPA による不安行動の感受性が高い時期が妊娠後期のみであるのかを調べるために、妊娠前期のみの BPA 投与群を作り、比較検討した。

B. 研究方法

① 代謝動態

胎齢 18 日マウス胎仔、新生仔 (日齢 0 日)、3 日齢、7 日齢、14 日齢、21 日齢の各仔マウス、また各々の母胎の肝臓における UGT の遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により測定した。また、仔マウスの肝臓マイクロゾーム画分における BPA、BPF、BPAF に対する UGT 酵素活性を測定した。

② 遅発性行動影響

交配 2 週間前から低葉酸餌 (11ug / kg) と高葉酸餌 (260ug / kg)、通常餌 (260ug / kg) を給餌し、1) 前期投与群 (妊娠 5 日~12 日齢投与) 2) 後期投与群 (妊娠 11~18 日齢投与) に BPA を胃内強制投与した (高 BPA : 10mg / kg / day、低 BPA : 50ug / kg / day、BPA 無し : オリーブオイルのみ)。出生後、3 週齢までは、それぞれの群で同様の餌を給餌し、その後全ての群で通常餌にて 10 週齢まで飼育し、行動試験 (高架式十字迷路試験) を行った。

本実験は、酪農学園大学動物実験委員会にて審査、受理され、適切な実験計画のもとに行われた。

(倫理面への配慮)

C. 研究結果

① 代謝動態

● UGT2B1 の遺伝子発現

BPA の代謝を担う UGT2B1 の肝臓における遺伝子発現量は、胎仔期、新生仔期のオス、メスともに母親のおよそ 1/20 程度まで低い事が分かった (図 1)。その後 3 日齢からは、遺伝子発現が上昇してくることが分かった。母親に関しては、大きな変動は見られなかった。

● UGT 酵素活性

BPA、BPF に対する UGT 酵素活性は、同様な挙動を示し、胎仔期、新生仔期 7 日齢までが低く、その後日齢とともに上昇した (図 2)。一方、BPAF に対する UGT 酵素活性は、どの日齢においても BPA や BPF のおよそ 1/50 程度まで低かった (図 2)。

母親に関しては、出生前後で活性が少し低い

傾向があった (図 3)。

② 遅発性行動影響

妊娠母親への低葉酸餌給仕において、BPA 投与によりメスで不安行動が増強されやすく、低容量の BPA 投与によっても不安行動が高くなる傾向があった (図 5)。また、BPA の感受性が高い時期は、妊娠後期であることが明らかになった (図 4、5)。

D. 考察

① 代謝動態

BPF に対する UGT 酵素活性の結果から、その代謝を担うのは BPA と同様に、UGT2B1 である事が推察された。また両基質の代謝は、胎仔期から 7 日齢までが低く、この時期に影響を受けやすい可能性が示唆された。また、BPAF に関しては、どの日齢でも UGT 酵素活性が低く、代謝を受けにくい基質であることが示唆された。出生後 7 日まで UGT 酵素活性が低い事から、この時期の子の直接暴露もリスクが高い可能性がある。特に BPAF は、母、子ともに代謝を受けにくい可能性があるため、今後、UGT 以外の代謝活性も調べて行く必要がある。

② 遅発性行動影響

通常餌より、低葉酸餌においてメスにのみ BPA による行動に影響が見られた。この行動影響は、妊娠前期では有意な影響は無く、妊娠後期のみ BPA 暴露で有意な影響が見られた。これまで我々が報告してきた胎盤通過による胎仔への抱合体移行が関与している事が示唆される。また妊娠後期は、神経発生が盛んな時期でもあり、神経発達の何らかのシステムに影響を与えている可能性もある。今回の低葉酸餌の状態は、人の食事に含まれる葉酸量とほぼ同程度であり (体重換算)、興味深いデータである。今後、栄養状態と BPA の影響については、さらに検討を重ねて行く必要がある。

E. 結論

妊娠後期胎仔から新生仔 7 日齢までは、BPA、BPAF の代謝能力は低く、どちらも UGT 2B1 の低発現によるものと推察された。一方、BPAF に対する酵素活性はかなり低く、特に妊娠後期から出生前後において、リスクが高い可能性がある。BPAF の毒性

と代謝排泄に関してさらに詳細な検討が必要である。また、遅発性行動影響に関しては、通常餌では大きな影響は見られず、低葉酸餌においてメスにのみ行動影響が見られた。栄養状態と化学物質の影響については、人の食生活を考える上で興味深いデータであり、さらなる検討が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(発表雑誌名巻号・頁・発行年なども記入)

1. 論文発表 (本研究に関わる主なもの 3 編に ◎を付けてください)

1) 書籍
なし

2) 雑誌

- ① Iwano H, Ujita W, Nishikawa M, Ishii S, Inoue H, Yokota H. Effect of dietary eugenol on xenobiotic metabolism and mediation of UDP-glucuronosyltransferase and cytochrome P450 1A1 expression in rat liver. *Int J Food Sci Nutr.* (2013) in press
- ② L-type amino acid transporter 1 (LAT1) expression in canine mammary gland tumors. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Iwano, H., Kadosawa, T. and Uchide, T. J. *Vet. Med. Sci.* 75:431-437. (2013.)
- ③ L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a new therapeutic target for canine mammary gland tumour. Fukumoto, S., Hanazono, K., Komatsu, T., Ueno, H., Kadosawa, T. Iwano, H. and Uchide, T. *Vet. J.* 198: 164-169. 2013
- ④ A new treatment for human malignant melanoma targeting L-type amino acid transporter 1 (LAT1): a pilot study in a canine model. Fukumoto, S., Hanazono, K., Dah-Renn, FU., Endo, Y., Kadosawa, T., Iwano, H. and Uchide, T *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 439: 103-108. (2013)
- ⑤ *Mycoplasma* species isolated from intramammary infection of Japanese dairy cows. Higuchi, H., Gondaira, S., Iwano, H., Hirose, K., Nakajima, K., Kawai, K., Hagiwara, K., Tamura, Y., Nagahata, H. *Vet. Rec.* 172:557. (2013)

- ⑥ Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves. Higuchi H, Ito E, Iwano H, Oikawa S, Nagahata H. *Can J Vet Res.* 77:120-125. (2013)
- ⑦ Relationship between concentration of lingual antimicrobial peptide and somatic cell count in milk of dairy cows. Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15:298-301. (2013)

2. 学会発表

1) 環境ホルモン学会第16回研究発表会(2013年12月)

- ① 小池菜々子、岩野英知、大谷尚子、柳沢梨沙、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合体の動態
- ② 大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノールA暴露による次世代個体の行動影響
- ③ 井上博紀、大谷尚子、柳沢梨沙、小池奈々子、細川佳純、岩野英知 ラット子宮灌流モデルを用いたビスフェノールFグルクロン酸/硫酸抱合体動態の解明

2) 第156回日本獣医学会学術集会(2013年9月)

- ④ 藪崎梨沙、岩野英知、大谷尚子、須田光紫、井上博紀、横田博 胎仔腸におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合体の動態
- ⑤ 大谷尚子、岩野英知、須田光紫、井上博紀、横田博 妊娠期ビスフェノールA暴露による次世代の行動影響

H. 知的所有権の取得状況(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

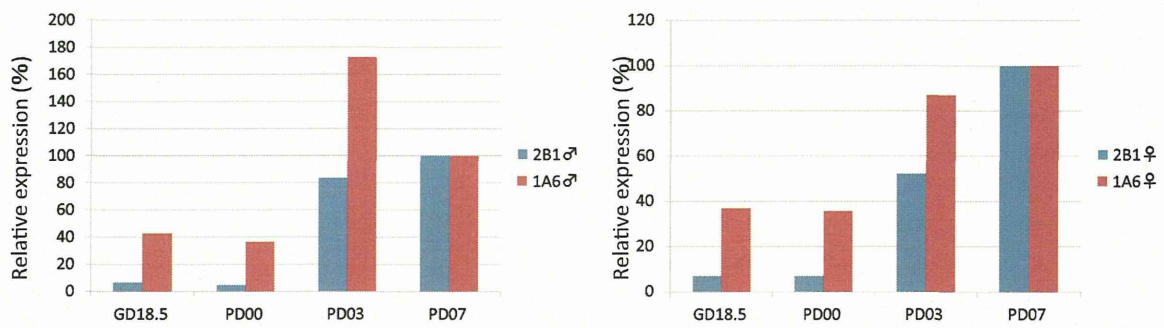


図1 新生仔におけるUGT発現の変動比較
 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日でのUGT2B1の発現量は、7日と比較すると約5%前後である。
 一方、UGT1A6では、40%前後の発現がみられた。

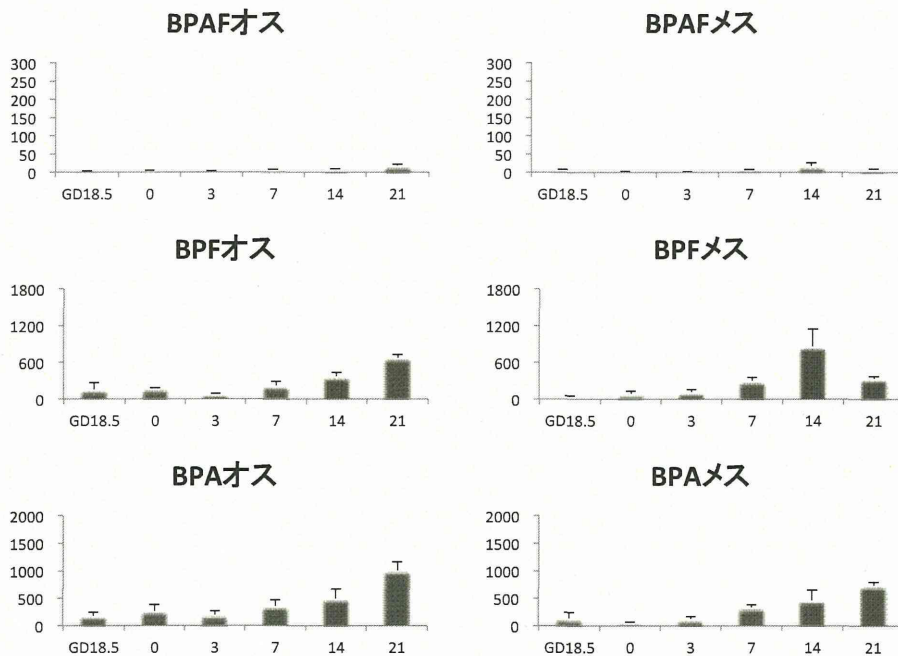


図2 発生一発達期における代謝動態
 • 妊娠18.5日、出生0日、3日、7日、14日、21日の肝臓におけるBPAF、BPA、BPFに対するグルクロン酸抱合活性を調べた。
 • BPAFの活性が特に低い。BPF、BPAの1/30~1/50くらい
 • 雌雄差はあまりない
 • 7日目くらいまで活性が低い

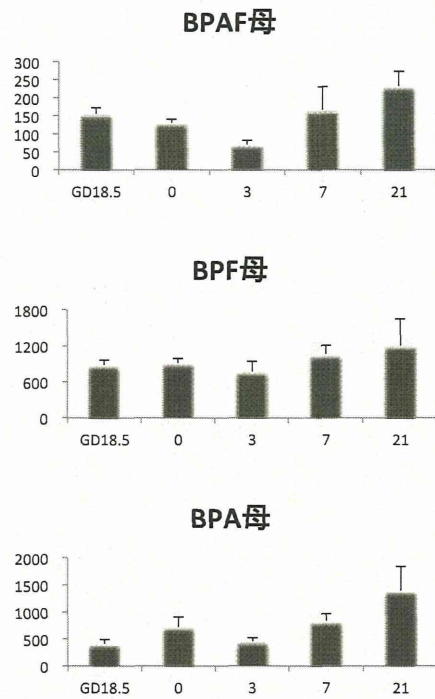


図3 母親の肝臓におけるグルクロン酸抱合活性

- BPAFの活性が低い(1/5くらい)
- BPAは妊娠、出産前後で若干活性が低くなるが、大きな活性の変動はない。

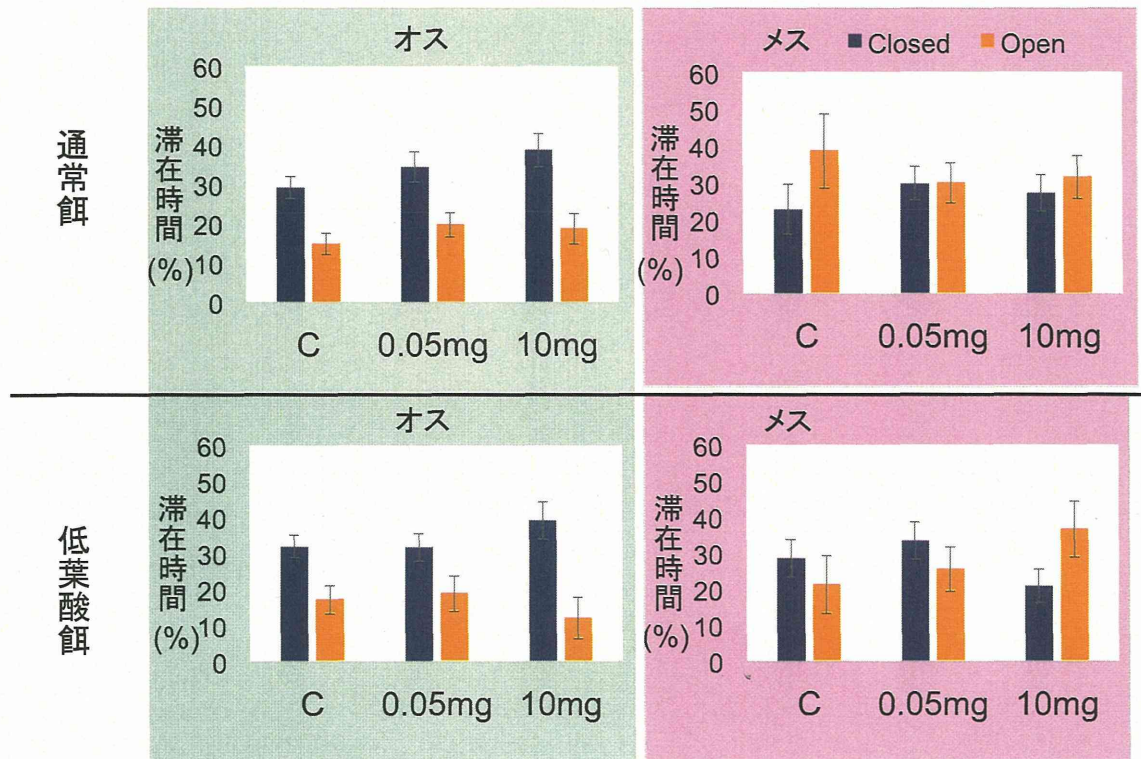


図4 BPAの前期投与による遅発性行動影響
高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。
全投与群において、BPA投与の影響に有意差はなかった。

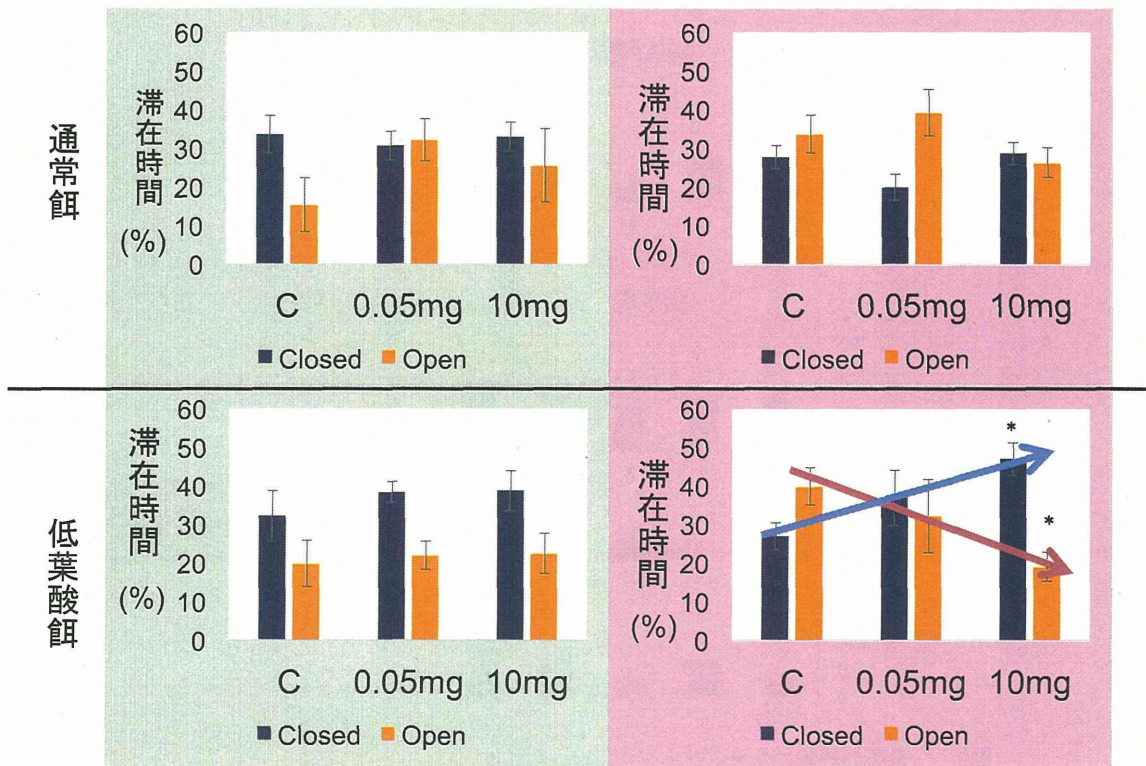


図5

BPAの後期投与による遅発性行動影響

高架式十字迷路により行動影響を調べた結果である。

低葉酸餌のメスにてBPAの影響が大きく、クローズドアームへの滞在時間が増えていた。