

ビスフェノールA(BPA)がイエバエの性比ならびに 発育に及ぼす影響—続報—

泉 七江, 佐二木順子(衛生研究所環境ホルモンプロジェクト)

Effect of bisphenol A (BPA) on sex ratio and development of a housefly

Nanae IZUMI and Junko SAJIKI

Summary

The effects of bisphenol A (BPA) on life-cycle characteristics of *Musca domestica* were examined. Opposite results ($P<0.001$) were observed in sex ratio between control and BPA-treated (female>male for control and male>female for BPA treated). There was no difference in percentage of pupation between the groups. There was a significant negative correlation ($P<0.01$) between descendant of generations and percentage of emergence of a housefly. The results suggested that BPA could bring disorders in an endocrine function of a housefly.

I はじめに

環境中に存在する化学物質の内分泌攪乱作用は細胞内のホルモン受容体に関わる反応であるため、脊椎、無脊椎の両動物で認められ、それは生殖系、免疫系、脳神経系へと多岐に及ぶ。またこの作用は、低濃度の暴露で長期(多世代)にわたり発現するという点で、これまでの発ガン作用や変異原性などと異なる。そのため、このような化学物質の内分泌攪乱作用の効果判定に、寿命の長い脊椎動物を使用することには限界がある。その点、無脊椎動物は寿命が短いため、多世代にわたる影響を調べる系としては適しており、すでに様々な化学物質について無脊椎動物を使用した実験系の確立に関する実験が試みられている¹⁾²⁾。

著者らは、多世代にわたる化学物質の生殖作用への影響を調べるため、飼育、取り扱いが比較的簡単であり、雌雄差の判定が容易、確立された系がある等の理由からイエバエを実験動物に選定した。これまで、イエバエのライフサイクルに高濃度(1ppm)のビスフェノールA(BPA)を作用させ、卵の蛹化率、蛹の大きさ(重量)、羽化率、性比への影響について調べ、性比の変化など一定の結果を得、すでに報告した³⁾⁴⁾。

今回は、さらに低濃度のBPA曝露群を加え、曝露時期の違いがイエバエのライフサイクルの各ステージにどのような影響を及ぼすか検討した。さらに、生態変化とBPA曝露濃度との関連を明確にするため、飼育培地中のBPA濃度の経時変化を調べた。なお、BPAの曝露濃度の違いによる生態への影響について考察するため、すでに報告した1ppmのデータを再掲する。

II 実験材料

1. 試験動物

実験に使用したイエバエ *Musca domestica* は WHO 標準 SRS

千葉県衛生研究所
(2006年1月31日受理)

(国立感染症研究所より分与)を使用した。飼育室の温度は $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度は平均約50%、光は12h:12h(L:D)を保持した。飲み水は上水を15分沸騰放置した後、三角コルベんに挿入したキムワイプを通して与えた。成虫の飼料はブドウ糖とスキムミルク粉末を1:1の割合でシャーレに入れて与えた。

2. 飼育培地

飼育培地(採卵、孵化および幼虫用)の組成、作成方法は以前報告したとおりである¹⁾。フスマ(精製フスマ:日清製粉㈱、精撰:東日本製粉共同組合)、昆虫飼料(実験動物飼料・昆虫用:オリエンタル酵母工業㈱をミキサーで粉末にしたもの)、ドライイーストを使用した。なお、今回は、発生するカビを防止するため、フスマはオートクレーブ処理の上で使用した。作成方法はドライイースト(0.05%)を溶解した水75mLと昆虫飼料20gをガラスポット(13.5 x 10.0 x 4.0cm, 約1L)で均一になるように攪拌し、その後フスマ45gを加え更に攪拌した。BPA添加群は、BPA原液(27000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 0.5%メタノール;高速液体クロマトグラフィーによる測定値)を最終濃度100ならびに1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ になるように水で希釈し添加した。

3. 分析試薬

BPA (>95%)は和光純薬工業のものを使用した。分析に用いた水は、Milli-RX12 α (日本ミリポア社)による脱イオン化水からOasia-HLBでBPAを除去したものをを用いた。その他の溶媒は和光純薬工業の高速液体クロマト用またはそれに準じたものを使用した。分析に用いたガラス器具類は99%エタノールで洗浄したものをを使用した。

III 実験方法:

1. イエバエのBPA曝露実験

実験は図1に示した手順で行った。

実験1. 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAまたは1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAを0日(卵時)および4日(幼虫時)の2回曝露させた場合の発育に及ぼす影響

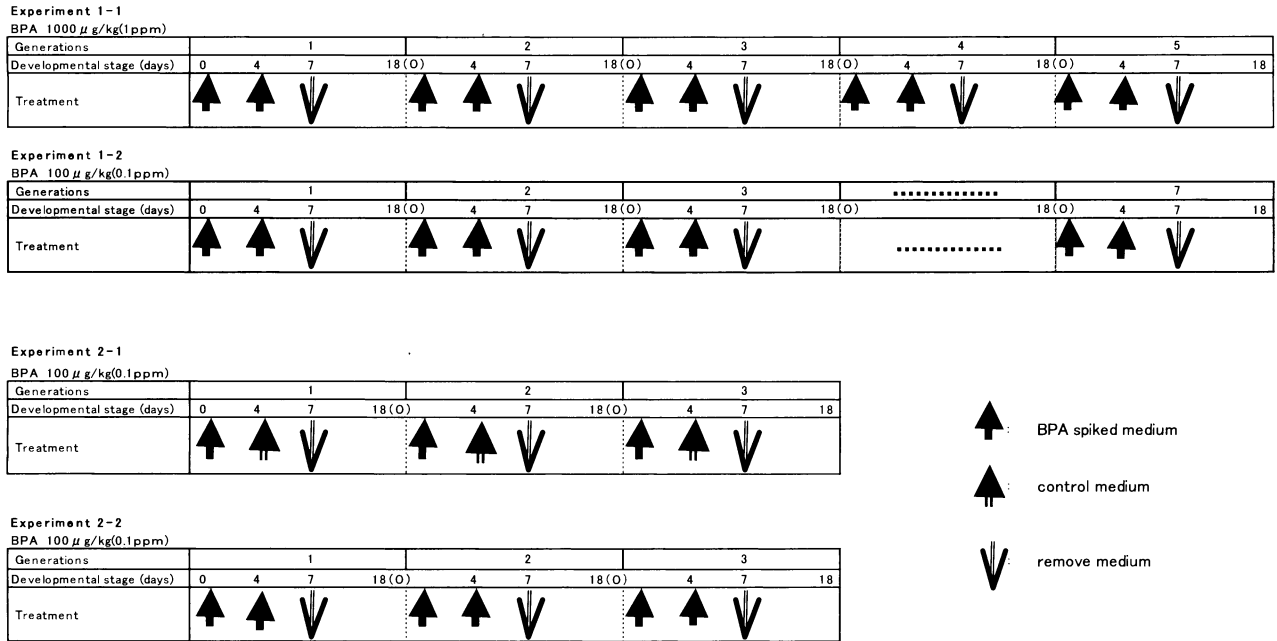
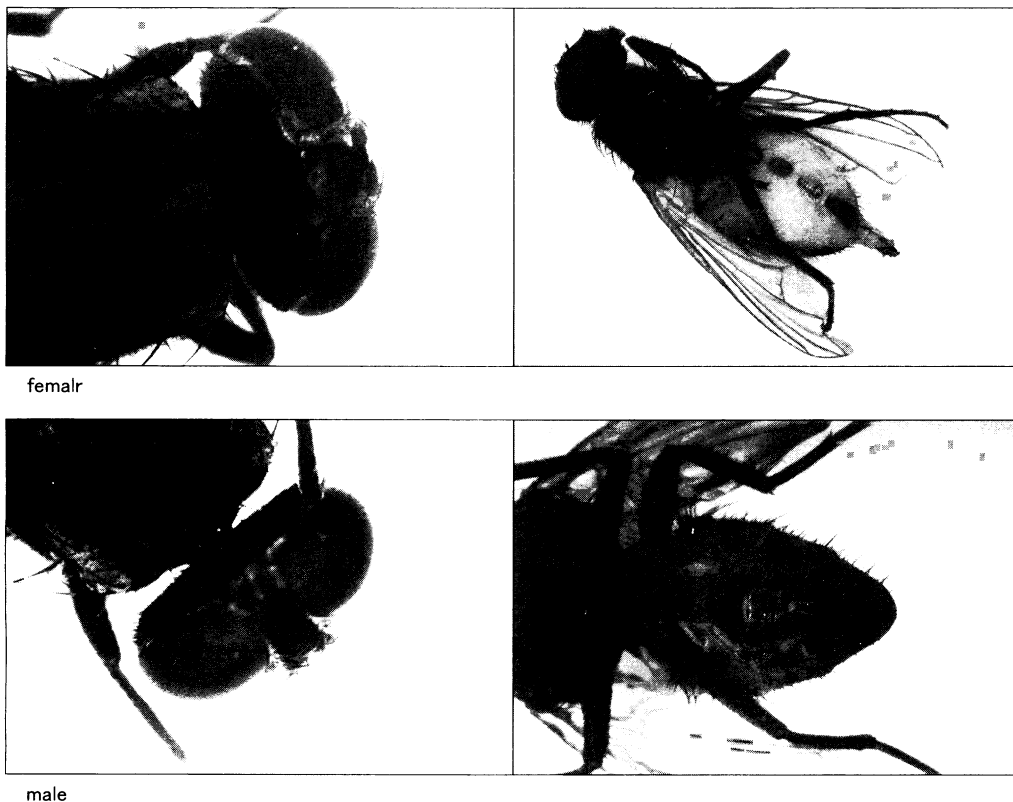


Fig.1 Design of the experiments

羽化7—10日のイエバエをBPA無添加の採卵培地(Φ9cmシャーレに入れた飼育培地)へ約3時間産卵させた。対照群, 100ならびに1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加群各2組ずつの孵化培地(100mLビーカー入り)を設け, 500個の卵をそれぞれの培地に接種した。採卵4日後に孵化培地から対照群, 100ならびに1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加群幼虫飼育培地に孵化培地ごと移し, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA群については採卵7日後, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA群については8日後に蛹の

重量, 数量, 長径を計測した。その後, 蛹を羽化ケージに入れ羽化7—10日後に次代を各々のケージから採卵した。採卵後, 成虫の性比並びに羽化していない蛹数を確認した。採卵から次世代までを一世代とし, 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAでは5世代, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAでは7世代の継代を行った。3回の繰り返し実験から得られた実験数値について統計処理を行った。性別は外部生殖器の形状と左右複眼間隔の違いを肉眼的観察により確認した。(写真1)

Photo. 1



実験2. 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAの添加時期の違いによるイエバエの発育への影響

実験1で得られた雌の比率の低下がBPA曝露によるものかを確認するため、BPAの曝露時期の異なる実験を行った。ここでは、幼虫時期における観察を加えより詳細な検討を行うため、孵化培地から幼虫飼育培地に移す際、孵化培地の影響がないように幼虫のみをピンセットで取り出し幼虫飼育培地に入れた。

実験2-1 卵時期1回のみBPA曝露実験

図1に示したとおり対照群(2個)ならびに100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加群(2個)の孵化培地(100mLピーカー入り)を設け、実験1と同様の方法で産卵させた250個の卵をそれぞれの培地に入れた。採卵4日後に対照群とBPA添加群、両群ともに孵化培地からBPA無添加の幼虫飼育培地に移した。この時、培地中のBPAの影響がなくなるよう、孵化培地で飼育した幼虫について幼虫を一匹ずつピンセットでつまみあげ、幼虫数(3令幼虫生存数)を確認し、BPA無添加培地に移した。この操作は、対照群についても同様に行った。なお、蛹の重量、数量、長径は採卵7日および10日後に計測した。

実験2-2 卵時期ならびに幼虫期のBPA2回曝露実験

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加培地(2個)ならびに対照群(2個)にそれぞれ250個の卵を入れ、孵化した幼虫を採卵4日後にBPA無添加群はBPA無添加培地に、BPA添加群はBPA添加の幼虫飼育培地に移した。この時も幼虫を一匹ずつピンセットでつまみあげ、それぞれの幼虫培地に移した。

2. 培地中のBPA濃度の測定

培地からのBPAの抽出は、飼育培地の3箇所から、無作為にそれぞれ0.25gを3検体採取し、20mLのエタノール/50mMグリシン緩衝液(pH11)(1:1)を加えミキサー(ULTRA-TURRAX)でホモジナイズし、1,000xgで遠心し上清を得た。沈殿物についてこの操作をさらに繰り返し、得られた2回の上清をあわせた。この上清10mLに水30mLを加え、予めエタノールと水で洗浄したOASIS-HLB(3mL, Waters, CoLtd)を用い、Sajikiの方法⁽⁵⁾に従ってBPAを抽出した。すなわち、サンプルをのせたカラムを5mLの15%エタノール、水、石油エーテルの順に洗浄し、最後に5mLの酢酸エチルエステルでBPAならびに関連物質を溶出した。N₂ガス下、40°Cで蒸発乾固させた。1mLの40%アセトニトリルで溶解させたものを分析サンプルとした。

幼虫については無作為に集めた0.25gを3検体採取し、水2mLを加え乳鉢で潰し、培地と同様の方法でBPAを抽出した。

なお、飼育実験中の培地から大気中へのBPAの拡散を調べるため、使用培地と同量の水に実験で使用した濃度のBPA(100 $\mu\text{g}/\text{kg}$)を添加し、水量とBPAの絶対量を経日的に測定した。

BPAはHPLC-ECD法⁽⁵⁾で、BPA-o-quinoneならびにBPA関連生成物はHPLC-MS法⁽⁵⁾で測定した。HPLC-ECDシステムは、Model LC-10 AD(Shimadzu, Kyoto, Japan)カラムはShim-Pack VP-ODS column(150 x 4.6mm I.D., Shimadzu, Kyoto, Japan)検出器は電気化学検出器(ECD, Coulochem II 5200 A, ESA, MA, USA)であった。使用溶媒:アセトニトリル/50mM phosphate buffer(pH3)(10:75)、流量:1.0mL/min、カラム温度:40°C、注入量:50 μL であった。ECDの測定

条件は guard cell potential, E 600mV; analytical cell potentials, E1 300 mV and E2 550 mV; sensitivity, 1 μA であった。BPA-o-キノンならびにBPA関連物質の測定に用いたLC/MSシステムはHPLC:Alliance 2690 model(Waters, MA, USA)カラム:Symmetry C18 column(3.5 μm , 150mm x 2.1 mm I.D.)検出器:ZMD Z-spray mass spectrometer(Waters, MA, USA)であった。溶媒はアセトニトリル-水(40:60)、流量:0.25mL/min、カラム温度40°C、注入量10 μL であった。分析条件はESI(negative ion scanning mode)、capillary voltage:3.1kV、cone voltage:33V、source block温度:90°C、解離温度:175°Cであった。

なお、確認に用いたBPA-o-キノンはBPAにFenton試薬を加え生成させた。

3. 数値の解析

成虫の性比(雌/雄+雌)に関しては χ^2 検定とt検定、3元配置分散分析、蛹の重量(蛹総重量/蛹数)3元配置(Exp.1)及び2元配置分散分析、蛹化率(蛹数/卵数)、孵化率に関しては、2元配置分散分析、蛹の長径(計測蛹総長径/計測蛹数)に関してはt検定と2元配置分散分析、羽化率(羽化数/蛹数)に関しては、2元配置分散分析、回帰分析を行った。

IV 結果

1. イエバエのBPA曝露実験

実験1, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAまたは1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPAを0日目(卵時)および4日目(幼虫時)の2回曝露させた場合の発育に及ぼす影響

① 雌発生率について

各世代での性比については、雌の発生率として3回繰り返し実験で得られた総ハエ数に対する雌ハエ数(%)を表1に示した。1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加群は対照群に比べ雌の発生率が減少した(t-test, $p < 0.001$)。雌発生率について3元配置分散分析(実験群間、世代間、繰り返し間)を行った結果、実験群間と世代間に1%の危険率で有意差が確認されたが、他の因子間並びに各因子間の交互作用は見られなかった。100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加7世代の実験でも、BPA添加群の雌発生率は対照群と比較していずれの世代でも低かった。その比率について、 χ^2 検定、分散分析を行った。いずれの統計学分析法を用いても両者の間に0.1%以下の危険率で有意差が認められた。また両者の全実験データを纏めて χ^2 検定を行うと性比に0.1%以下の危険率で有意差が認められた。

② 蛹の重量について

1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加実験の全世代平均の蛹重量は、対照群0.0213g、BPA添加群0.0194gであった(表2)。各世代の数値もほぼ全世代平均の数値と同じであった。3元配置分散分析の結果、世代間、繰り返し実験間に有意な差は認められなかったが、実験群間には1%の危険率で有意差が認められた。

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BPA添加の7世代にわたる実験で、全世代の平均蛹重量は、対照群0.0196g、BPA添加群0.0202gであった(表2)。

その重量について、分散分析を行った結果、実験群間、世代間、繰り返し実験間に差は認められなかった。

Table1 Ratio of female fly in Exp. 1

Generation	1000 μ g/Kg BPA		BPA	
	Female/Total fly	Female ratio	Female/Total fly	Female ratio
1	249/478	0.521	254/547	0.464
2	673/1276	0.527	446/909	0.491
3	465/869	0.539	373/782	0.477
4	462/879	0.526	471/967	0.487
5	399/769	0.519	324/771	0.420
Total	2248/4271	0.526**	1868/3976	0.47**

Significant difference of total generations between control and BPA treatment according to a student t-test **p<0.01

100 μ g/Kg BPA

Generation	control		BPA	
	Female/Total fly	Female ratio	Female/Total fly	Female ratio
1	505/946	0.534	412/847	0.486
2	445/878	0.507	428/936	0.457
3	491/910	0.54	498/1102	0.452
4	422/809	0.522	438/980	0.447
5	507/946	0.536	378/831	0.455
6	319/537	0.594	389/809	0.481
7	395/787	0.502	334/685	0.488
Total	3084/5849	0.527**	2877/6190	0.465**

Significant difference of total generations between control and BPA treatment according to a student t-test **p<0.01

Significance of data in Exp.1 according to three-way analysis of variance

Source of variance	Significance	
	1000 μ g/Kg BPA	100 μ g/Kg BPA
A(treatments)	**	**
B(repetition)		
C(generations)	**	
Interaction (A x B)		
Interaction (B x C)		
Interaction (A x C)		

** p<0.001

Table2 Pupal weight in Exp. 1

Exp.1-1 (1000 μ g/Kg BPA)

generation	pupal weight (g/pupa) ¹⁾	
	control	BPA
1	0.0217±0.0014	0.0188±0.0026
2	0.0209±0.0024	0.0193±0.0009
3	0.0217±0.0015	0.0206±0.0009
4	0.0215±0.0016	0.0198±0.0023
5	0.0208±0.0013	0.0184±0.0010
Total	0.0213±0.0014	0.0194±0.0019

¹⁾Mean ±SD of triplicate

Significance of data in Exp.1-1 for three factors

Source of variation	Significance	
	Exp.1-1	Exp.1-2
A(treatments)	**	
B(repetition)		
C(generations)		
Interaction AxB		
Interaction AxC		
Interaction BxC		

**p<0.01

③ 蛹の長径について

100 μ g/kg BPA 添加の7世代の実験で、蛹の平均長径は対照群5.765 mm, BPA 添加群5.748mmであった。蛹の長さについて分散分析を行った結果、実験群間、世代間、繰り返し実験間に差は認められなかった。

④ 蛹化率

1000 μ g/kg BPA 添加実験の全世代の蛹化率は対照群35.6%, BPA 添加群35.3%であった。100 μ g/kg BPA 添加の7世代の実験

Exp.1-2(100 μ g/Kg BPA)

generation	pupal weight (g/pupa) ¹⁾	
	control	BPA
1	0.0208±0.0010	0.0219±0.0007
2	0.0193±0.0011	0.0197±0.0010
3	0.0209±0.0012	0.0209±0.0008
4	0.0190±0.0004	0.0196±0.0010
5	0.0198±0.0010	0.0205±0.0004
6	0.0184±0.0006	0.0189±0.0003
7	0.0191±0.0003	0.0197±0.0003
Total	0.0196±0.0019	0.0202±0.0010

¹⁾Mean ±SD of triplicate

では対照群35.9%, BPA 添加群37.8%であった。分散分析の結果、両実験において実験群間、世代間、繰り返し実験間で有意な差は認められなかった。

⑤ 羽化率

1000 μ g/kg BPA 添加5世代実験の羽化率に関しては、各世代の羽化率は、図2に示したように世代を重ねることにより有意に減少する傾向が認められた。各世代の羽化率を回帰分析した結果、対照群 ($y=0.068x+0.778$) とBPA 対照群 ($y=-0.0033x+0.790$) 間の回帰係数に1%以下の危険率で有意差が認められた。

100 μ g/kg BPA 添加7世代の実験で羽化率に関しては、各世代の羽化率は、図3に示したように世代を重ねることにより有意に減少する傾向が認められた。各世代の羽化率を回帰分析した結果、対照群 ($y=-0.013x+0.329$) とBPA 対照群 ($y=-0.016x+0.354$) 間の回帰係数に5%以下の危険率で有意差が認められた。

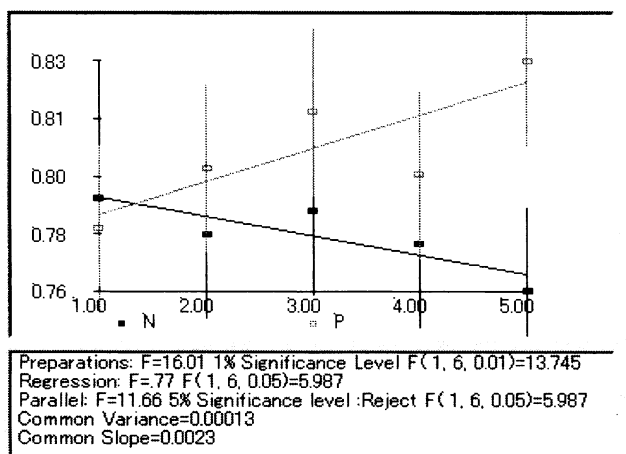


Fig.2 Change in ratio of emergence (1000 $\mu\text{g/Kg}$ BPA)

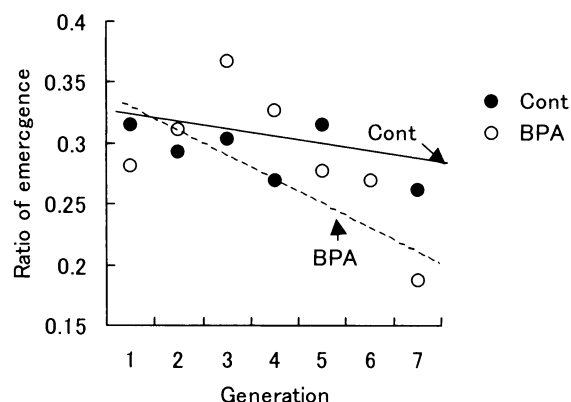


Fig.3 Change in ratio of emergence (100 $\mu\text{g/Kg}$ BPA)

⑥ 羽化開始時間

BPA 曝露群では羽化の開始が遅れる傾向にあった。

実験 2. 100 $\mu\text{g/kg}$ BPA の添加時期の違いによるイエバエの発育への影響

BPA の添加時期の違いによるハエの発育に及ぼす影響について表 3, 表 4 にまとめた。

① 3 令幼虫生存率について

実験 2-1 (卵時に BPA に 1 回曝露された場合) の 3 令幼虫生存率は対照群 1 世代 0.534 ± 0.048 , 2 世代 0.444 ± 0.062 , 3 世代 0.518

± 0.071 , BPA 群 1 世代 0.48 ± 0.028 , 2 世代 0.45 ± 0.071 , 3 世代 0.584 ± 0.079 であった。実験 2-2 (卵時に BPA 1 回曝露された場合) の孵化率は対照群 1 世代 0.478 ± 0.076 , 2 世代 0.452 ± 0 , 3 世代 0.53 ± 0.031 , BPA 群 1 世代 0.524 ± 0.0057 , 2 世代 0.258 ± 0.0085 , 3 世代 0.442 ± 0.0028 であった。実験 2-1 では有意差は認められなかった。実験 2-2 では幼虫数について, 実験群間, 世代間および相互因子間に各々有意差 ($p < 0.01$) が認められた。3 令幼虫生存率についても, 実験群間 ($p < 0.01$), 世代間 ($p < 0.01$) および相互因子間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

Table3 Summary of the results of Exp.2

Exp.2-1 (once BPA treatment at Day 0)

Treatment	Generation	Groups	Number of eggs	Number of survival larvae for 4 days	Ratio of larvae per total eggs	Number of pupae		Ratio of pupation		Total number of emergences	Ratio of emergences		Ratio of female fly	
						Day 7	Day 10	per total eggs	per total larvae		per total eggs	per pupae		
Control	1	A	250	125	0.488	58	38	96	0.384	0.768	158	0.316	0.705	0.468
		B	250	142	0.568	75	53	128	0.512	0.901				
	2	A	250	122	0.488	101	5	106	0.424	0.869	132	0.264	0.684	0.53
		B	250	100	0.400	78	9	87	0.348	0.870				
	3	A	250	142	0.568	116	16	132	0.528	0.930	136	0.272	0.569	0.507
		B	250	117	0.468	86	21	107	0.428	0.915				
BPA	1	A	250	115	0.460	29	54	83	0.332	0.722	122	0.244	0.713	0.492
		B	250	125	0.500	29	59	88	0.352	0.704				
	2	A	250	125	0.500	107	5	112	0.448	0.896	157	0.314	0.755	0.503
		B	250	100	0.400	87	9	96	0.384	0.960				
	3	A	250	160	0.640	128	15	143	0.572	0.894	144	0.288	0.541	0.472
		B	250	132	0.528	106	17	123	0.492	0.932				

Exp.2-2 (twice BPA treatments at Day 0 and 4)

Treatment	Generation	Groups	Number of eggs	Number of survival larvae for 4 days	Ratio of larvae per total eggs	Number of pupae		Ratio of pupation		Total number of emergences	Ratio of emergences		Ratio of female fly	
						Day 7	Day 10	per total eggs	per total larvae		per total eggs	per pupae		
Control	1	A	250	106	0.424	99	7	106	0.424	1.000	153	0.306	0.64	0.490
		B	250	133	0.532	126	7	133	0.532	1.000				
	2	A	250	113	0.452	98	6	104	0.416	0.920	100	0.200	0.481	0.580
		B	250	113	0.452	99	5	104	0.416	0.920				
	3	A	250	127	0.508	122	1	123	0.492	0.969	146	0.292	0.573	0.452
		B	250	138	0.552	128	4	132	0.528	0.957				
BPA	1	A	250	130	0.520	110	10	120	0.480	0.923	125	0.250	0.519	0.480
		B	250	132	0.528	105	16	121	0.484	0.917				
	2	A	250	63	0.252	46	8	54	0.216	0.857	82	0.164	0.726	0.537
		B	250	66	0.264	34	25	59	0.236	0.894				
	3	A	250	110	0.440	81	22	103	0.412	0.936	147	0.294	0.746	0.429
		B	250	111	0.444	61	33	94	0.376	0.847				

Table 4 Statistic analysis of Table 3

Significance of data in Exp.2-1 for two factors

	Number of survival larvae for 4 days	Ratio of larvae		Number of pupae		Number of total pupae	Ratio of pupation		Total number of emergences	Ratio of emergences		Ratio of female fly
		per total eggs	Day 7	Day 10	per total eggs		per total larvae	per total eggs		per pupae		
A(treatment)												
B(generation)			*	**				**				
Interaction (AxB)								*				
		** p<0.01										
		* p<0.05										

Significance of data in Exp.2-2 for two factors

	Number of survival larvae for 4 days	Ratio of larvae		Number of pupae		Number of total pupae	Ratio of pupation		Total number of emergence	Ratio of emergence		Ratio of female fly
		per total eggs	Day 7	Day 10	per total eggs		per total larvae	per total eggs		per pupae		
A(treatment)	**	**	**	**	**	**	**	**				
B(generation)	**	**	**	**	**	**	**	**				*
Interaction (AxB)	**	*	*	*	*	*	*	*				
		** p<0.01										
		* p<0.05										

① 蛹化率について

実験2-1の蛹化率は対照群1世代0.448±0.091, 2世代0.386±0.054, 3世代0.478±0.071, BPA群1世代0.342±0.014, 2世代0.416±0.045, 3世代0.532±0.057であった。実験2-2の蛹化率は対照群1世代0.478±0.076, 2世代0.416±0, 3世代0.51±0.025, BPA群1世代0.482±0.0028, 2世代0.226±0.014, 3世代0.394±0.025であった。実験2-1の総蛹数, 蛹化数ともに実験群間に有意差は認められなかったが, 実験2-2では総蛹数, 蛹化率(対卵)とも実験群間に有意差(p<0.01)が認められた。なお, 実験2-2では発育日数により蛹の数に差がみられた。7日における蛹数は対照群1世代112.5±19.1, 2世代98.5±0.71, 3世代125±4.2, BPA曝露群1世代107.5±3.5, 2世代40±8.5, 3世代71±0.1であり実験群間(p<0.01)世代間(p<0.01)に有意差が, 10日における蛹数は対照群1世代7±0, 2世代3±2.9, 3世代2.5±2.1, BPA曝露群1世代13±4.2, 2世代16.5±12, 3世代27.5±7.8であり実験群間(p<0.01)に有意差が認められた。

② 羽化率

実験2-1, 実験2-2とも, 羽化率についてBPA曝露群と対照群とに有意差は認められなかった。

③ 雌発生率

実験2-1, 実験2-2とも, 雌発生率についてBPA曝露群と対照群とに有意差は認められなかったが, 両実験とも2~3世代のBPA曝露群の雌発生率は対照群に比べ低かった。

④ 羽化開始時間

実験2-1では, 対照群に比べ羽化開始時間に1代目19時間, 2代目15時間, 3代目24時間の遅延が観察された。実験2-2の羽化開始時間は1代目23時間, 2代目約34時間, 3代目は34時間の遅延であった。なお, 3代目の羽化がピークに達する時間の遅れは48時間であった(図4)。

⑤ 蛹の重量ならびに長径について

各世代の蛹一個あたりの平均重量と分散分析結果を表5に, 平均長径と分散分析結果を表6に示した。

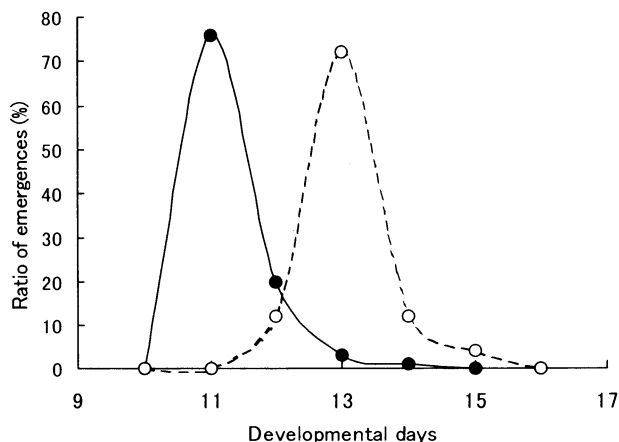


Fig.1 Ratio of emergences in control and BPA groups in the third generation of Exp.2-2 as a function of developmental days

Table5 Pupal weight at Day 7 and 10 in Exp.2

Generation	Pupal weight (g/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	0.0213±0.0001	0.0218±0.0009	0.0169±0.0088	0.0173±0.0004
2	0.0215±0.0004	0.0212±0.0002	0.0207±0.0025	0.0192±0.0013
3	0.0194±0.0013	0.0217±0.0015	0.0182±0.0016	0.0221±0.0011
Total	0.0207±0.0012	0.0215±0.0008	0.0186±0.0045	0.0195±0.0023

Generation	Pupal weight (g/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	0.0181±0.0010	0.0214±0.0013	0.0124±0.0018	0.0177±0.0001
2	0.0188±0.0003	0.0219±0.0014	0.0133±0.0017	0.0196±0.0002
3	0.018±0.0004	0.0223±0.0001	0.0109±0.0039	0.019±0.0001
Total	0.0183±0.0006	0.0219±0.0010	0.0122±0.0023	0.0187±0.0009

1) Mean ± SD of duplicate

Two-way analysis of variance for Exp.2

	Exp.2-1 7d	Exp.2-1 10d	Exp.2-2 7d	Exp.2-2 10d
A(treatment)			**	**
B(generation)				
Interaction (AxB)				

** p<0.01

Table6 Pupal length at Day 7 and 10 in Exp.2

Generation	Pupal length (mm/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	5.78±0.33	5.66±0.01	5.38±0.09	5.40±0.09
2	5.76±0.07	5.79±0.02	5.58±0.34	5.58±0.07
3	5.68±0.01	5.76±0.13	5.19±0.62	5.84±0.10
Total	5.74±0.16	5.74±0.09	5.38±0.36	5.61±0.21

Generation	Pupal length (mm/pupa) ¹⁾			
	Day 7		Day 10	
	Control	BPA	Control	BPA
1	5.43±0.12	5.64±0.11	4.95±0.23	5.75±0.08
2	5.88±0.02	6.12±0.06	5.74±0.30	5.99±0.15
3	5.73±0.01	6.09±0.14	5.02±0.72	5.98±0.07
Total	5.68±0.23	5.95±0.25	5.24±0.54	5.91±0.15

1) Mean ± SD of duplicate

Two-way analysis of variance for Exp.2

	Exp.2-1 7d	Exp.2-1 10d	Exp.2-2 7d	Exp.2-2 10d
A(treatment)			**	*
B(generation)			**	
Interaction (AxB)				

** p<0.01

* p<0.05

重量について、実験2-1においては7日目、10日目ともにBPA曝露群と対照群とに有意差は認められなかったが、両群とも7日目より10日目の重量が低かった。実験2-2においては、7日目、10日目ともにBPA曝露群が対照群より有意に重かった (p<0.01)。さらに両群ともに7日目より10日目の重量が有意に軽かった (p

<0.01)。長径について、実験2-1においては実験群間、発育日間に有意差は認められなかったが、実験2-2においては、7日目 (p<0.01)、10日目 (p<0.05) ともBPA曝露群が対照群に比べ長かった。

2. 培地ならびにイエバエ幼虫中のBPA濃度の測定

培地からの抽出溶媒として、①100%エタノール、②50mMグリシン緩衝液 (pH11)、③①と②の混液 (1:1) を用い100 μ g/kgBPA 添加培地からの回収率を調べた結果、①55.2 \pm 6.9% (n=3)、②9.9 \pm 1.1% (n=3)、③106.7 \pm 6.3% (n=3)であった。③液を用いて100 μ g/kgBPA 添加幼虫からBPAを抽出した場合のBPAの回収率は94.8 \pm 21.7% (n=3)であった。図5には100 μ g/kgBPAを添加した培地を25 $^{\circ}$ Cに放置した際のBPA濃度の経時変化を示した。培地に添加したBPAの濃度は添加後著しく減少し、1時間後の値は0時間の86.8%、4時間後は31.8%であり、24時間以降BPAは検出されなかった。なお、培地からBPA- α -キノンは検出されなかった。図5の右上図には100 μ g/kg BPAを添加した水を25 $^{\circ}$ Cに放置した際の水量とBPA絶対量の経日変化を示した。水量は1日間平均4.1mL/日の減少を認めたが、BPA絶対量は変わらなかった。この結果は、培地中でのBPAの減少は培地からの空気中への拡散によるものではないことを示すものであった。なお、BPA添加培地で飼育された1代幼虫1日目のものからはBPAは検出されなかった。

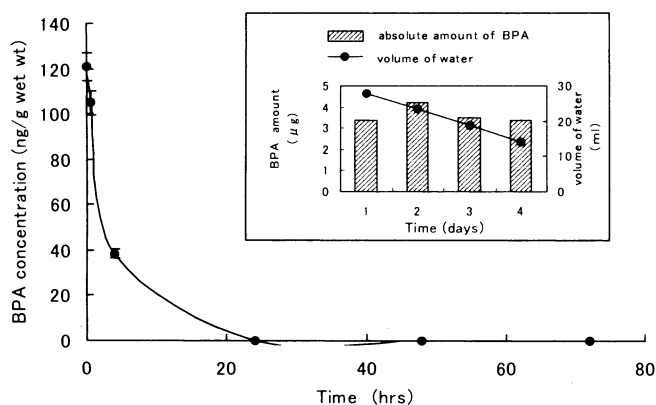


Fig.5 Changes of the BPA concentrations in larval medium at 25 $^{\circ}$ C
Figure at upper right represents changes in volume of water and absolute amounts of BPA in the same volume BPA spiked water as medium

V 考察

一般に内分泌攪乱物質のヒトへの影響を調べるためには、なるべくヒトに近い動物を用いるのが常道であるが、寿命の長い動物を用いて多世代に亘る影響を予測することは不可能である。様々な生物がホルモン受容体を有しており、種が異なっても、同じように内分泌攪乱物質の影響を受けるものと考えられている。エクダイソンなどの無脊椎動物のホルモンは殺虫剤などの化学物質に影響を受けやすいことがすでに明らかである⁽⁶⁷⁾。このような理由から内分泌攪乱物質の検定に寿命の短い無脊椎動物を使用する意義がある。

イエバエを用いてBPAの多世代にわたる影響を調べた研究はこれまで例がなく、今回が初めての報告である。今回の実験1で、0.1ならびに1ppmBPAがハエの雌発生率の低下 ($p < 0.001$) を

引き起こした。実験2では実験に用いた卵の数が実験1の半数と少なく、反復回数が少なかったため有意差はなかったが、卵時1回曝露(実験2-1)でさえも2代目から雌比率の低下傾向が観察された。一方、世代を重ねる(5代目)と羽化率に低下傾向がみられたが、雌発生率の低下は1-2世代から観察された。このことは、雌発生率の低下が羽化率の変化(例えば、雌の羽化が抑えられた)によるものとは考えにくい。イエバエはショウジョウバエに比べ、環境因子などにより性遺伝子の変異を引き起こしやすいことが知られており⁽⁶⁸⁾、今回の結果がイエバエの性差決定過程へのBPAによる作用の可能性を否定できない。BPAにより遺伝子系に変化を与えたかどうか今後更なる検討が必要である。

BPAによる無脊椎動物の性の逆転現象は、他の種で認められている。福堀⁽⁶⁹⁾は、腔腸動物であるヒドラにBPA (1000~4000 μ g/kg)を作用させ生殖への影響を調べた結果、精巣を発現する個体の割合及び一個体に発現する精巣数の減少等雄化の抑制を報告している。堀口⁽⁷⁰⁾は有機スズ化合物であるトリブチルスズとトリフェニルスズがイボニシの雌を雄化するため、船体の塗料に用いられている有機スズの使用は、軟体動物の個体減少に繋がると危惧している。

無脊椎動物を用いたBPAの影響についてはこれまで2, 3の報告⁽¹¹⁾がなされている。線虫を用いた実験では、BPAやBPAの代謝産物が致死や繁殖に影響を与え⁽¹¹⁾、ユスリカで行った実験では、羽化の時間や脱皮の遅延が認められている^(12, 13)。ユスリカを使用した実験では、BPAと17 α -ethinylestradiolを作用させ、発育と繁殖に及ぼす影響⁽¹²⁾及び幼虫の脱皮並びに脱皮機構に及ぼす影響⁽¹³⁾が報告されている。ユスリカの実験では、BPA (0.78-750 μ g/kg)により、雄、雌の2代目の羽化にのみ5%の危険率で遅延が見られたが、他の現象(成虫の数、性比、卵産能力)に変化は観察されていない。BPAの濃度をさらに高めると(1000 μ g/kg)、ユスリカの脱皮の遅延が認められている。BPA曝露されたミジンコでも、胎生期における発育抑制や脱皮遅延が認められている⁽¹⁵⁾。我々のイエバエ実験についてもBPA 100 μ g/kg添加培地での飼育で幼虫数(3令幼虫生存数)の低下、蛹化の遅延、羽化開始の遅延が認められた。今回の実験で、昆虫の発育遅延が認められたBPA濃度はユスリカで確認されたものの1/10という低濃度であった。

このような現象の作用機作として、Muらは、BPA⁽¹⁵⁾や防衛剤のfenarimol⁽¹⁶⁾を曝露されたミジンコの発育遅延時に幼若ホルモンの1種(methyl farnesoate)が関与していることを見出し、BPA等の化学物質がこれら昆虫ホルモンの脱皮制御過程に影響を与えたためと考えている。幼若ホルモンは多くの無脊椎動物で脱皮を遅らせることが明らかであり、今回イエバエで観察されたBPA曝露の様々な影響にBPAの昆虫ホルモン攪乱作用が関与している可能性が高い。Dinanらはショウジョウバエの細胞の脱皮ホルモンレセプターをBPAが脱皮ホルモンと競合することを報告している⁽¹⁷⁾。

培地中のBPA濃度は添加後直ちに減少した。BPAはメトヘモグロビンと結合し⁽¹⁸⁾、環境中では活性酸素や細菌などにより分解され易い⁽¹⁹⁾ことが知られている。このような培地でのBPAの減少が培地中の何らかの物質と結合したか、分解したかは不明であるが、今回の実験で、ハエの卵をBPA添加培地に加えた時間は

培地に BPA を添加した時間の約 4 時間後であった。この時間差を考慮すると、卵への BPA の作用濃度は添加濃度より低い可能性が高く、BPA のイエバエに惹き起こした様々な影響は $100 \mu\text{g}/\text{Kg}$ 以下の低濃度で十分起こりうるものと考えられる。ミジンコ (in vivo)⁽¹³⁾ やショウジョウバエの細胞 (in vitro)⁽¹⁴⁾ を用いたこれまでの報告によると EC50 は $10-20 \mu\text{g}/\text{kg}$ と今回のイエバエを用いた実験に比べ 100 倍以上高い。このような BPA に対する感受性の差が種の違いに基づくかどうかさらに検討を要する。

発育段階初期(卵時と幼虫時)における BPA の曝露でイエバエの発育に様々な影響が観察された。とくに、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA の卵時一回曝露でさえ羽化時間に明らかな遅延が認められた事実は、発育段階初期の BPA 曝露がその後のイエバエの発育に重要であることを示すものであった。

イエバエで BPA 曝露が 6 世代以上になると、羽化率のほか産卵率にも明らかな低下が認められたが、単に羽化率低下による産卵率の低下か、BPA の内分泌攪乱作用による結果か更なる検討が必要である。ミジンコの内分泌攪乱作用による発育異常と親の生殖力の低下とに相関が認められている⁽¹⁵⁾。ハエについても産卵率の低下と次世代の発育遅延との関連は無視できない。

蛹の重量に関して、実験 2 で得られた結果は、実験 1 のそれと異なっていた。すなわち、実験 1 の $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA では重量に明らかな低下が認められたが、実験 2 ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露) では増加であった。この蛹重量の差が単なる BPA 曝露濃度による差であるならば、 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群の重量低下は高濃度化学物質による毒性であり、 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群で観察された重量増加は BPA の内分泌攪乱作用による影響かもしれない。Watts ら⁽¹⁶⁾ はコスリカを用いた実験で、 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群での幼虫重量の減少を報告している。K-Smith ら (20) はトマトガに $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ のホルモン類 (estrogen, thyroxine, testosterone) を作用させ、幼虫や蛹の重量低下を観察しており、その原因の一つとして食餌量の低下をあげている。今回の実験では幼虫の食餌量の測定は不可能であり、蛹重量の増加が幼虫の食餌量の違いに基づくものか、BPA 曝露によるものか不明である。

VI まとめ

今回 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ および $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA をイエバエに作用させた結果、以下の事実が明らかになった。

1. 両濃度曝露実験において、0.1% 以下の危険率で性比に有意な差 (雄 > 雌) が認められた。即ち、BPA 添加群の雄の数が有意に増加した。

2. $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群の羽化開始日数が約 2 日遅れた。孵化、蛹化にも遅れが認められており、羽化遅延の原因は、発育段階初期の BPA 曝露による幼虫の発育の遅れに起因するものと考えられた。

3. $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群の蛹の重量は増加した ($p < 0.01$)。しかし、 $1000 \mu\text{g}/\text{kg}$ BPA 曝露群の蛹の重量は低下しており BPA 濃度による差が明らかであった。

以上の結果は、BPA がイエバエの生育ならびに性比に影響を及ぼす可能性を示唆するものであった。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、統計解析のご指導を賜りました元 国立感染症研究所 生物統計室長 石田説而博士並びにイエバエを分与して下さった 国立感染症研究所 殺虫殺そ剤室長 富田隆史博士に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) Ankley G, Mihaich E, Stahl R et al. Overview of a workshop on screening methods for detecting potential (anti-) estrogenic/androgenic chemicals in wildlife. Environ. Toxicol.Chem., 17:68-87 (1998)
- 2) LeBlanc GA, Steroid hormone-regulated processes in invertebrates and their susceptibility to environmental endocrine disruption. In Guillette LJ, Jr., and Crain DA eds, Environmental Endocrine Disruptors: An Evolutionary Perspective. Taylor and Francis, London, UK: pp.126-151 (1998).
- 3) 泉七江, 佐二木 順子, ビスフェノール A がイエバエの性比に及ぼす影響. 衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨 p98 (2003)
- 4) 泉七江, 佐二木 順子, ビスフェノール A がイエバエの性比に及ぼす影響. 千葉県研究所研究報告. 27: 14-17 (2003)
- 5) Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J. Sensitive method for the determination of bisphenol A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B, 736:255-261 (1999)
- 6) Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. Annu Rev Entomol. 43:545-569 (1998)
- 7) Olmstead A W, LeBlanc G. Insecticidal juvenile hormone analogs stimulate the production of male offspring in the crustacean *Daphnia magna*, Environ. Health perspect. 111:919-924 (2003)
- 8) Dubendorfer A, Hediger M, Burghardt G, Bopp D. *Mucosa domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. Int.J.Dev.Biol., 46:75-79 (2002)
- 9) 福堀順敏, 木村 博: ビスフェノール A (BPA) のヒドラ雄性化への影響. <http://www.env.go.jp/chemi/end/2002report/data/pd-5.html>, PD-96
- 10) Horiguti, T., Shiraishi, H., Shimizu, M., Morita, M. Effect of Triphenyltin chloride and five other organotin compounds the development of imposex in the rock shell, *Thais Clavigera*: Enviro. Pollut., 95(1): (1997)
- 11) 石橋弘志, 松村尚美, 平野将司, 中本貴士, 高良真也, 吉原新一, 有蘭孝司. ビスフェノール A 代謝物 4-メチル-2,4-ビス(p-ヒドロキシフェニル) ベント-1-エンの生態影響評価. フォーラム 2003. 衛生薬学・環境トキシコロジー講演要旨: p101 (2003)

- 12) Watts, M. M., Pascoe, D., Carroll, K. Chronic exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on development and reproduction in the freshwater invertebrate *Chironomus riparius*. *Aquat Toxicol.* 55 (1-2):113-124, (2001)
- 13) Watts, M. M., Pascoe, D., Carroll, K. Exposure to 17 α -ethinylestradiol and bisphenol A-effects on larval moulting and mouthpart structure of *Chironomus riparius*. *Exotoxicol Environ Saf.* 51(2):207-215 (2003)
- 14) Sohoni, P., Tyler, G. R., Hurd, K., Cauter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., Sumpter, J. P. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environ Sci Technol.* 35(14):2917-2925 (2001)
- 15) Mu X, Rider CV, Hwang GS, Hoy H, LeBlanc GA. Covert signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involves cross talk between signaling pathways. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:146-152 (2005)
- 16) Mu X, LeBlanc GA. Environmental anti-ecdysteroids alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *J.Exp.Zool.* 292:287-292 (2002)
- 17) Dinan L, Bourne P, Whiting P, Dhadialla TS, Hutchinson TH. Screening of environmental contaminants for ecdysteroid agonist and antagonist activity using the *Drosophila melanogaster* B11 cell in vitro assay. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:2038-2046 (2001)
- 18) Sajiki J. Determination of bisphenol A in blood using high-performance liquid chromatography-electrochemical detection with solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B.* 755:9-15 (2001)
- 19) Suzuki, T., Nakagawa Y, Takano I, Yaguchi K, Yasuda K. Environmental fate of bisphenol A and its biological metabolites in xeno-estrogenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 38:2389-2396 (2004)
- 20) K-Smith AE, Bell HA, Edwards JP. Effects of three vertebrate hormones on the growth, development, and reproduction of the Tomato moth, *Lacanobia Oleracea* L., *Environ.Toxicol.Chem.* 20:1838-1845 (2001)