

琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用いた化学物質の影響解析

立命館大学 薬学部 高田達之

1. 背景

ビスフェノールA (BPA) は、エポキシ樹脂やポリカーボネートプラスチックなどの原料であり、哺乳瓶や牛乳パック、缶など食品や飲料の容器にも使用されている。紫外線や熱などにより、食品中や飲料中に溶け出すことが知られており、アメリカで行われた調査では、6歳以上の92.6%のヒトから検出されている(Calafat et al., 2008)。羊水や胎盤、臍帯血、母乳などからも検出されていることから(Vandenberg et al., 2010; Vom Saal and Hughes, 2005; Yamada et al., 2002; Zimmers et al., 2014)、特に、胎児や乳児への影響が懸念されている。

ノニルフェノール (NP) は、界面活性剤やポリ塩化ビニルの原料として、食品の包装材料などに使用されている。食品の包装時や電子レンジによる再加熱時に、食品中へ溶け出すことが報告されており(Inoue et al., 2001)、ヒトの尿や胎盤、母乳からも検出されている。このことから、BPAと同様に、胎児や乳児もNPへ曝露されていると考えられる(Ademollo et al., 2008; Balakrishnan et al., 2013; Li et al., 2013)。

これら、BPAやNPは、培養細胞を用いた*in vitro*試験において、エストロゲン受容体へ結合することが報告されている(Gould et al., 1998; Kuiper et al., 1998)。また、実験動物を用いた*in vivo*試験において、BPAの曝露により精子の質の低下(Wisniewski et al., 2015)や、NP曝露による卵巣の発達阻害(Gieske et al., 2011; Hunt et al., 2012)、精子形成能の低下など(De Jager et al., 1999)、多数の報告があり、これらの内分泌かく乱作用が報告されているがその詳細な作用メカニズムは明らかにされていない。一方で、若年男性の停留精巣や男性の前立腺ガン、女性の乳ガン、子供の神経発達、注意欠陥・多動性障害 (ADHD) などの疾患が近年増加していることから、内分泌かく乱作用を持つ物質とこれらの疾患との関連性が世界保健機構 (WHO) および国際連合環境計画 (UNEP) から報告されている(WHO/UNEP, 2013)。

BPAやNPは、琵琶湖に流入する河川水中からも検出されている (図1)。検出された最高濃度のNPは、実験魚として頻用されるファットヘッドミノを用いた*in vivo*実験において、精細胞の壊死や精子分化阻害を引き起こし得る濃度(Miles-Richardson et al., 1999)であるとされているだけでなく、生物濃縮係数が最大で1250と報告されていることから(Staples et al., 1998)、琵琶湖に生息する魚類の生殖機能へ

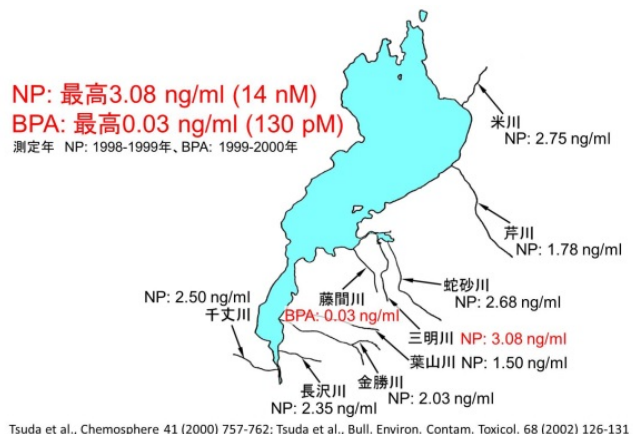


図1. 琵琶湖流入河川水中のNPとBPAの濃度

の影響が強く懸念される。

理化学的な分析手法では、化学物質の同定や濃度測定はできるものの、内分泌かく乱作用等の生物学的な影響についての評価は困難である。そこで、生物学的な影響について評価可能なバイオアッセイ（生物試験）が必要となるが、これまでは、小型実験モデル魚である、ゼブラフィッシュ、メダカ、ファットヘッドミノーなどを用いた *in vivo* 実験に依存していた。このため、内分泌かく乱物質の直接的な作用メカニズムの解明が困難であり、その危険性に関して科学的根拠が明確に示されてこなかった。

さらに、生体を用いた実験系では、毎年新しく登録される1000万種以上の化学物質を調べるにはコスト的にも時間的にも困難である。また、繁殖能力の高い実験魚とは繁殖生理の大きく異なる固有種への影響評価には不適だと考えられる。そこで、申請者らは、化学物質の内分泌かく乱作用のスクリーニングとして固有種の細胞を用いたバイオアッセイ系の開発を試みた。

まず初めに、琵琶湖固有種のうち、特に生息数の減少が著しく、絶滅危惧種IA類に指定されているコイ科の琵琶湖固有魚であるホンモロコに着目し、細胞株の樹立を試みた。その過程で、精巣、卵巣、受精卵由来の10種以上の細胞株樹立に成功した（図2）（Higaki et al., 2013b）。

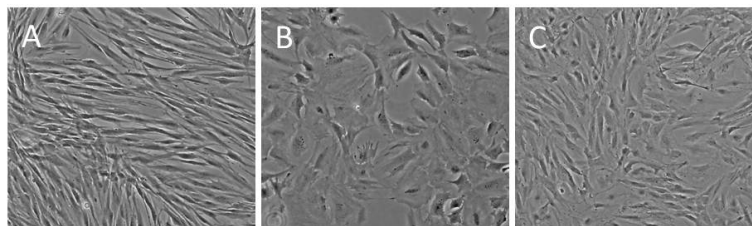


図2. ホンモロコから樹立した細胞株
(A 精巣由来、B 卵巣由来、C 受精卵由来)

それら細胞株の中には、魚類では初めてとなる、アンドロジェン、エストロジェン等の内在性核内レセプターを発現するセルトリ細胞（生殖細胞に対する看護細胞 *nurse cell*とも呼ばれ、精原細胞の増殖や精子形成の調節を行っている）由来の細胞株も含まれていたことから、この細胞株を用いたバイオアッセイ系の開発を行った。

当初、環境ホルモンにはエストロゲン（雌性ホルモンの一種）に似た作用を持つ物質が多く認められたことから、現在までに開発されているバイオアッセイ法は雌性ホルモン様物質の検出に重点が置かれた物が多く、主としてヒトの女性ホルモン受容体を哺乳類細胞あるいは酵母に発現させたアッセイ系が用いられており、他の（抗）ホルモン様作用についてはあまり研究されてこなかった。

近年、環境ホルモンの抗雄性ホルモン作用が注目されているものの、魚類細胞を用いたアッセイ系は開発されておらず、また、哺乳動物など他種細胞を用いた魚類受容体の発現系は細胞本来の反応を調べるには不適であると考え

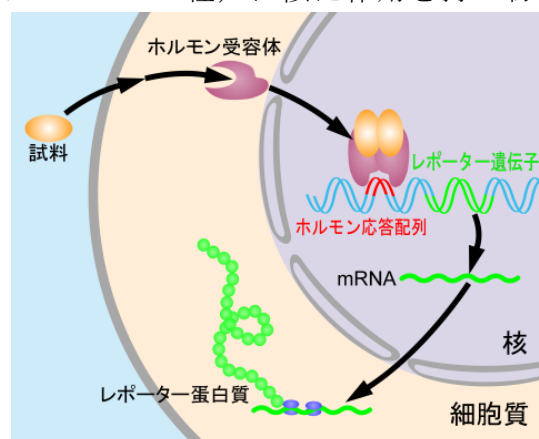


図3. レポーター遺伝子アッセイの概要

られたことから、本研究では、樹立した固有魚種由来細胞を用い、内在性のホルモン受容体を利用した抗雄性ホルモン作用を検出可能なレポーター遺伝子アッセイ法の開発を行った。

レポーター遺伝子アッセイ法は、ホルモンなどの生理活性物質の作用を、レポーター遺伝子の活性化を指標として検出する方法である（図3）。すなわち、樹立したセルトリ細胞株にホルモンに応答して蛍ルシフェラーゼを発現するベクターを安定導入した。その結果、魚類特異的な性ホルモンにのみ反応性を示す細胞株の開発に成功し（図4）、環境化学物質の一つであるNPが、魚類セルトリ細胞に対し、抗雄性ホルモン作用を示す事を初めて明らかにした（図5）。すなわちNPがホンモロコのセルトリ細胞に対し、抗雄性ホルモン効果を示すことを初めて示した(Higaki et al., 2013a)。

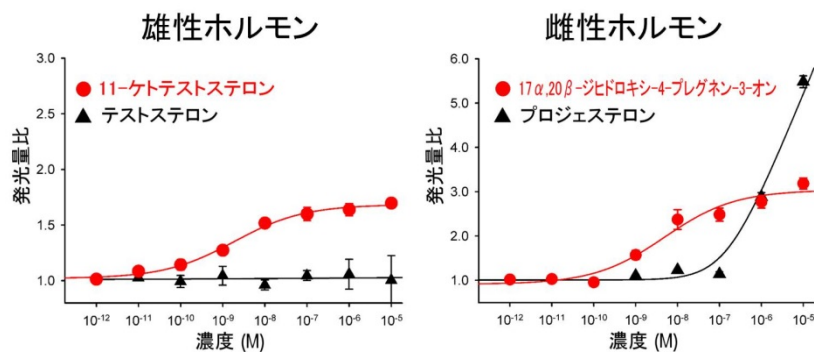


図4. ホルモンに対する反応性

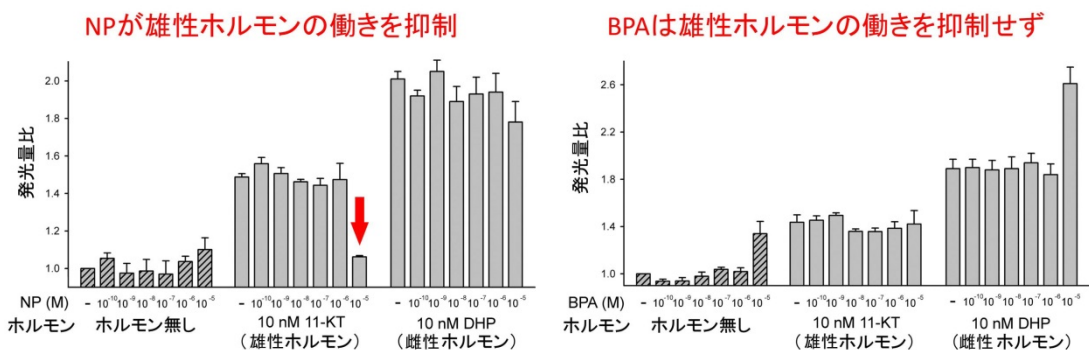


図5. 内分泌攪乱物質に対する反応性

2. 目的

申請者らは、上記ホンモロコ細胞株を用いたバイオアッセイ系の開発と並行して、ホンモロコにおける *in vitro* 精子分化に関する研究も行っており、魚類では初めて、繁殖季節および性成熟段階に依存しない *in vitro* 精子分化培養系の開発に成功している（図6、未発表）。この培養法を用いてホンモロコ精巣細胞を培養することにより、精巣組織中と非常に類似した分化過程を経て、精子が形成され、フローサイトメトリーによる核内 DNA 量解析から、*in vitro* においても正常に減数分裂が進行していること（図7）、また、*in vitro* で形成された精子が、正常な受精・発生能を有することも確認している。この結果は、本実験系が、生体における精子分化過程を正確に反映、模倣しており、精子分化モデルとして適していることを示唆している。

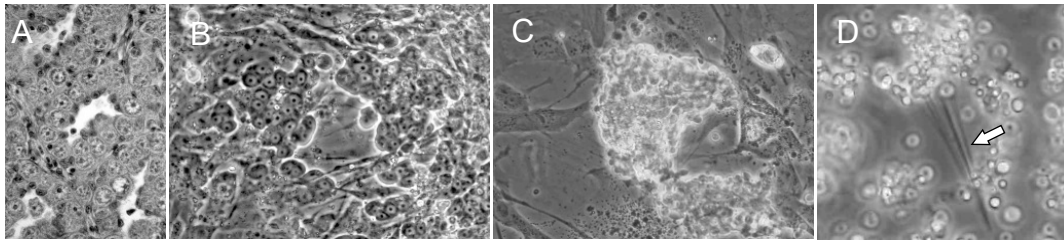


図6. ホンモロコの *in vitro* 精子分化培養(x400)
A:非繁殖期精巢、B: 培養1週目、C: 培養3週目、D:精子 (矢印は精子の鞭毛)

そこで本研究では、我々が独自に開発した琵琶湖固有魚種ホンモロコの *in vitro* 精子分化系を用いることにより、化学物質がホンモロコの精子形成に与える影響を明らかにし、それらのリスク評価、安全基準の設定を行うことを目的とした。

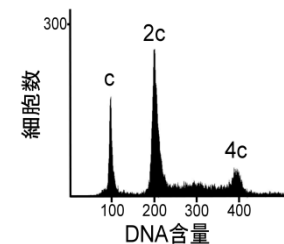


図7. ホンモロコ培養精巢細胞のDNA含量

3. 実験計画

3. 1 *In vitro* 精子分化培養法の至適化

現在の培養系には、雄性ホルモン(11-KT)を生理的レベル以上(160 nM)添加しているため、内分泌かく乱物質の影響解析には適していない可能性がある。申請者による、セルトリ細胞株を用いた研究では、NPの抗アンドロゲン効果が生理的レベル(10 nM)において認められたことから、現在使用しているホルモン濃度を生理的レベルまで低下させ、精子分化培養を行う。この時、11-KTのみならず培養液に添加しているhCG、PMSG、およびフォルスコリン(各10 U/ml、10 U/ml、10 μM)の濃度も検討し、本分化系の化学物質評価方法としての至適化を行う。

3. 2 化学物質が精子分化に与える影響の解析

3. 1で至適化した実験条件下において、NP、BPAの存在下で*in vitro*精子分化を行う。生体濃縮ファクターを考慮して添加濃度は1 nM~50 μMの範囲で行う。その影響は、(a)電子顕微鏡による精子形態観察、(b)フローサイトメトリーによる、一倍体精子の形成率を用いて評価する。

また最近フタル酸エステルが2世代、3世代にわたって影響するという報告がなされたことから、フタル酸エステルに関しても同様な実験を行い、影響を明らかにする。

これらの結果から固有種ホンモロコの精子分化を指標として、化学物質の影響を明らかにすると共に、安全基準値を設定する。さらに、実際の環境水の解析を想定し、それらを混合した条件で相乗効果を調べる。

3. 3 化学物質が*in vitro*精子の受精能に与える影響(人工授精実験)

NP、BPA、フタル酸エステルおよびそれらを混合した条件下で*in vitro*形成された精子を用いて人工授精を行い、卵割の進行、孵化率、奇形形成率を指標に化学物質の影響を明らかにすると共に、安全基準値を求める。

以上、本研究は、従来適切な評価系が無かったため曖昧なままであった化学物質の生殖能への影響とそのリスクを、固有種の*in vitro*精子分化という明瞭な配偶子形成現象を指標として明らかにし、琵琶湖、淀川水系の水質保全に資するものである。

4. 試料と方法

4. 1 ホンモロコ精巢の採材

ホンモロコ成魚は、山匠ホンモロコ養殖工房（滋賀県東近江市）で養殖している個体を使用した。採取した個体は、エアレーション下で立命館大学（滋賀県草津市）まで輸送し、到着後すぐに頭部叩打により安楽殺を行った。安楽殺したホンモロコを 70% エタノール噴霧により消毒し（図 8 A）、腹壁切開後（図 8 B）、精巢を無菌的に摘出した（図 8 C）。摘出した精巢は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中へ回収した（図 8 D）。一定数の精巢を回収した後、0.5% 漂白剤を含む PBS に 2 分間浸漬することで殺菌した。PBS へ 2 分間ずつ 3 回浸漬させ、洗浄した（図 8 E）。

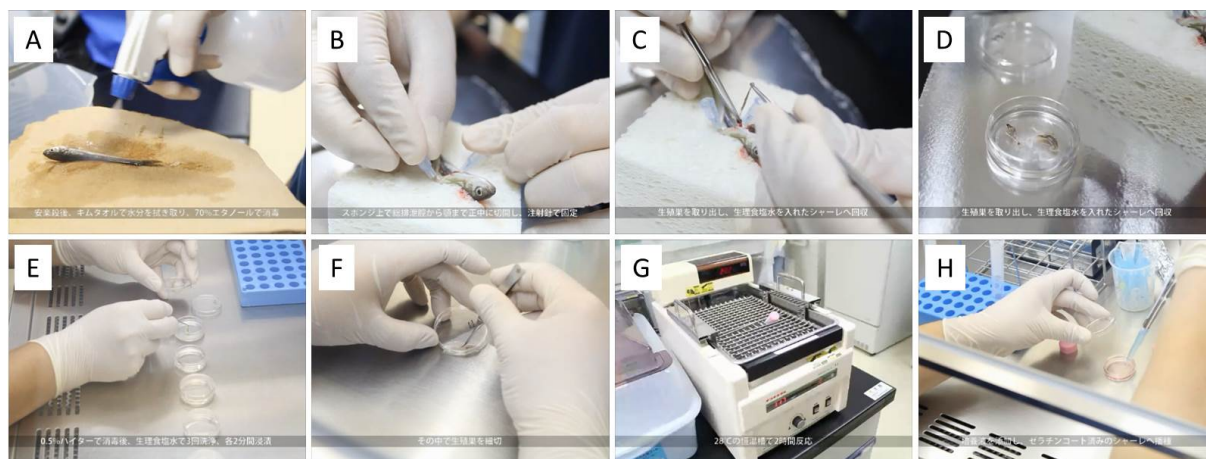


図 8. ホンモロコ精巢の採材

4. 2 精巢細胞の培養

精巢細胞の培養は、Sakai の開発した、ゼブラフィッシュ精巢細胞培養法(Sakai, 2006) に準じて行った。すなわち、殺菌・洗浄を行った精巢は、500 U/mL コラゲナーゼ typeIV（和光純薬）を含む Leibovitz's L-15 培養液中で眼科用ハサミを用いて精巢を細切り（図 8 F）、28°C で 2 時間振盪した（図 8 G）。また、振盪中は 20 分毎にピペッティングを行い、細胞を単離した。振盪後、10 倍量の 1% BSA を含む L-15 培養液を加え、40 μ m ナイロンメッシュを用いて濾過した。濾過した細胞懸濁液は遠心(120g, 7 分間)し、35 mm ディッシュ上で精巢細胞用培養液を用いて、18°C、大気下で 2~4 週間培養した（図 8 H）。

培養液は、ゼブラフィッシュ精巢細胞用培養液 Testicular cell culture medium (TCCM: (Sakai, 2006)) を基に、ホンモロコ精巢細胞用培養液を調製した。すなわち、Leibovitz's L-15 培養液へ、10 U/mL ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(HCG, あすか製薬)、10 U/mL 妊馬血清性性腺刺激ホルモン (PMSG, あすか製薬)、2 mM L-グルタミン (ナカライテスク)、0.5% ペニシリン-ストレプトマイシン混合溶液 (ナカライテスク)、100 μ g/mL カナマイシン硫酸塩 (ナカライテスク)、10 mM HEPES (pH 7.9, ナカライテスク)、800 μ M CaCl₂ (和光純薬)、20% Milli-Q 水、0.5% 牛血清アルブミン (BSA, Sigma-Aldrich)、10% ウシ胎子血清 (FBS, ニチレイ) を基本培養液として調製した。また、組換え上皮細胞成長因子 (EGF, Peprotech)、組換え線維芽細胞成長因子 (bFGF, Peprotech)、フォルスコリン (Sigma-Aldrich)、2-メルカプトエタノール (Sigma-Aldrich)、組換えインスリン様成長因子 I (IGF, Peprotech)、エストラジオール (和光純薬)、11-ケトテスト

ステロン (11-KT, コスモバイオ)、17 α ,20 β -ジヒドロキシプレグナ-4-エン-3-オン (DHP, Toronto Research Chemicals)、魚胚抽出物 (FEE) コイ血清 (CS) を使用直前に基本培養液に添加して、培養に用いた。

FEE はコイ (*Cyprinus carpio*) の孵化後 2~3 日の稚魚を 0.5% 漂白剤に 2 分間浸漬することによって殺菌し、魚用リンゲル液 (116 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 50 mM HEPES (pH7.2)) で 2 回洗浄した。その後、稚魚をホモジナイズし、Leibovitz's L-15 で希釈した。使用前に遠心分離 (4°C, 6500g, 10 分間) し、上清を 0.2 μ m のフィルターを用いて濾過滅菌して使用した。

CS はコイの血液を採取し、室温で 30 分~1 時間静置して凝固させ、遠心分離 (4°C, 3000g, 10 分間) した。上清を 0.2 μ m フィルターを用いて濾過滅菌して使用した。

4. 3 精巣組織の免疫染色

摘出した精巣は、PBS で洗浄後、4% (w/v) パラホルムアルデヒド溶液中で 4°C、一晚固定した。固定した精巣は、通常の操作に従ってパラフィン包埋した後、6 μ m 厚で薄切を行い、剥離防止処理済みのスライドガラス上へ拾った。十分に乾燥させ、以下の手順で染色を行った。

作成した切片は、脱パラフィンおよび脱水処理後、0.05% シトラコン酸ナトリウム水溶液 (イムノセイバー、日新 EM、東京) に浸漬し、98°C、45 分間加熱することで、抗原賦活化を行った。Triton X-100 により透過処理し、4% 正常ヤギ血清によりブロッキングを行った後、一次抗体として抗 vasa 抗体 (慶応大学 野瀬俊明教授) を 2000 倍に希釈し、4°C、一晚反応させた。洗浄後、500 倍希釈した二次抗体 Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (インビトロジェン) を室温で 45 分間反応させた。蛍光像は、オリンパス社の倒立顕微鏡 (IX70) へ接続した CCD カメラ (VB-7000) を用いて撮影した。陰性対象として、一次抗体を含まない正常ヤギ血清希釈液を用いた。

4. 4 精巣細胞のフローサイトメトリー解析

精巣細胞または培養精巣細胞をトリプシン処理により、単離・回収した後、氷冷 70% エタノールを用いて固定した。固定した細胞は、0.2 mg/mL RNase 処理後、20 μ g/mL プロピジウムイオダイド (PI、和光純薬) で、室温、30 分間、DNA 染色を行った。40 μ m ナイロンメッシュで濾過した後、FACScalibur HG フローサイトメーター (Becton, Dickinson and Company) を用いて核内 DNA 量を測定、解析した。

5. 結果と考察

5. 1 *In vitro* 精子分化培養法の至適化

現在使用している細胞培養液には、精子分化を進行させるため生理的レベルと比較すると過剰量と考えられる濃度で様々な成長因子、ホルモンを添加している。このような実験系では、化学物質が精子分化に与える影響を鋭敏に検出することが困難である可能性が考えられた。そこで *in vitro* 精子分化が可能な最低限の添加物を用いた培養系の構築を試みた。すなわち添加ホルモン濃度を段階的に希釈した培養液を用いて、その精子分化の進行を観察した。

その結果、生理的な濃度として報告されている濃度域で、精子分化が進行することが明らかとなった。そこで低濃度のホルモンを使用した *in vitro* 精子分化系を再構築した。

5. 2 フローサイトメトリー解析の至適化

次にフローサイトメトリーによる分化細胞の識別、定量解析を行うにあたり、まず初めに、精巣を構成する体細胞および様々な分化段階の生殖細胞を区別して測定、定量化可能なゲーティング設定の確立を試みた。

繁殖期（5月）と非繁殖期（1月、9月）の雄成魚を用い、精巣細胞の組織学的評価を基準として、フローサイトメトリー解析の条件検討を行った。まず精巣内に含まれる生殖細胞の分化段階を調べるため、摘出した精巣をパラホルムアルデヒド固定後、パラフィン包埋・細切し、ヘマトキシリン・エオシン染色および抗 vasa 免疫染色を行い、組織学的に同定した。次に、同時期の精巣を細切・酵素処理して細胞を単離し、抗 vasa 免疫染色およびプロピジウムイオダイドによる核染色後、フローサイトメトリーに供試した。その際、核 DNA 量、抗 vasa 免疫染色強度、前方散乱光強度（FSC：細胞の大きさ）、側方散乱光強度（SSC：細胞内部の複雑さ）の各種パラメーターを組み合わせることで各種細胞集団の分離、定量化を行った。

組織学的検討の結果、5月の精巣内には、精巣を構成する体細胞と、精原細胞、精母細胞、精子細胞および精子の存在が認められた。一方、9月の精巣内では精原細胞が、1月の精巣では精原細胞と精母細胞が生殖細胞の大部分を占めることが明らかとなった。また、フローサイトメトリー解析条件の至適化により、生殖細胞（精原細胞、精母細胞、精子細胞・精子）と体細胞を異なる細胞集団として検出し、これらの時期の精巣において、それぞれの細胞が占める割合を定量化することが可能となった（図 9 a,b）。

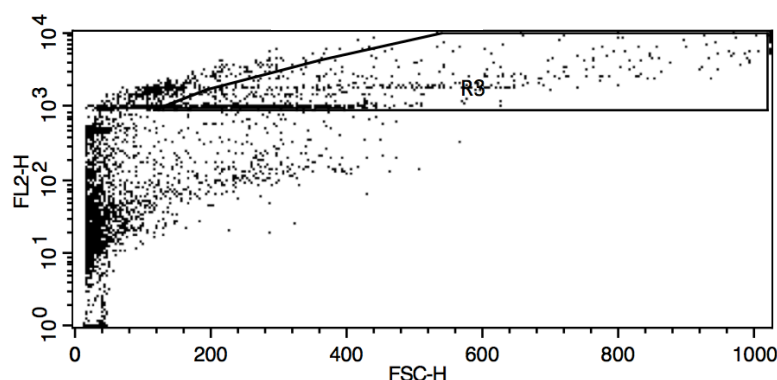


図 9a. フローサイトメトリーによるホンモロコ精巣細胞の分離

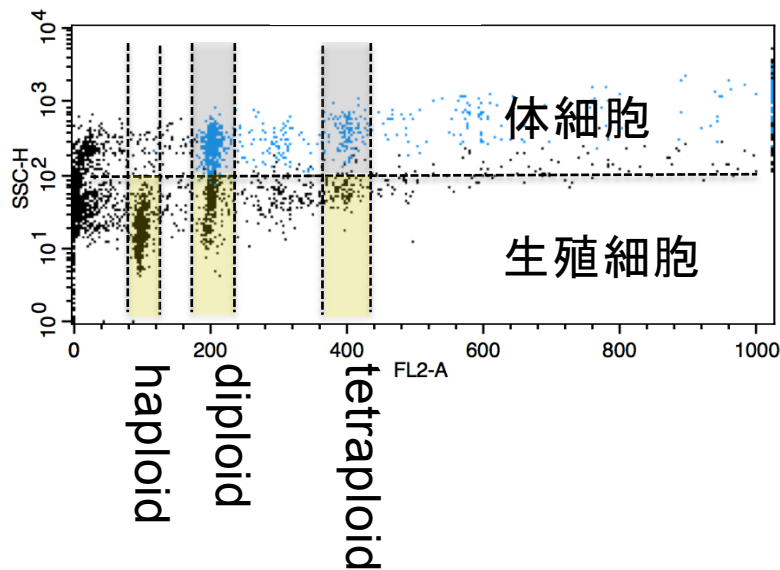


図 9b. フローサイトメトリーによるホンモロコ精巣細胞の分離

この分離条件を用いて生殖細胞と体細胞を分離し、生殖細胞集団における精子（一倍体）の存在比を算出した（図 10）。

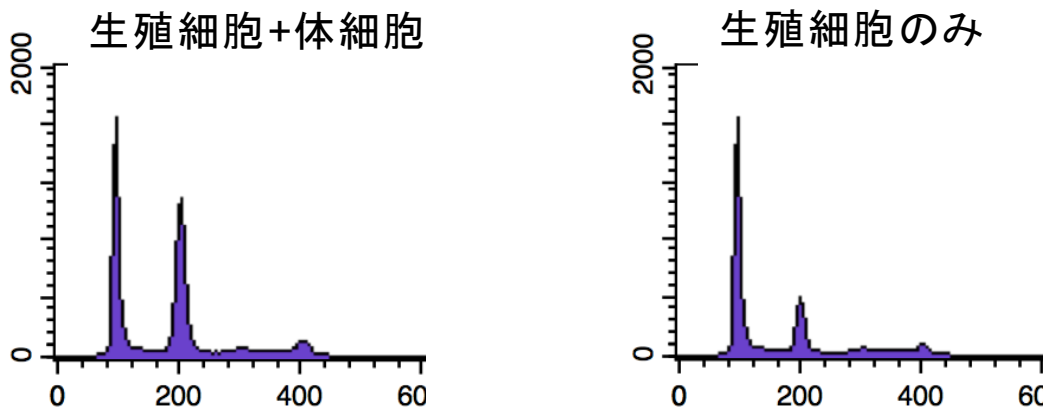


図 10. フローサイトメトリーによるホンモロコ精巣細胞の解析

5. 3 化学物質が精子分化に与える影響の解析

内分泌かく乱物質の一つである NP が、精子形成過程へ及ぼす影響を調べるため、最適化した *in vitro* 精子分化系を用いて、精巣細胞培養開始時より NP を 10 nM、100 nM、1 μM、10 μM の濃度で添加し培養を行った。精子分化培養開始後、2 週間目、3 週間目、4 週間目に培養細胞を回収し、生殖細胞に占める精子細胞および精子（1 倍体細胞）の形成割合を、フローサイトメーターを用いて解析した。

その結果、当初 NP 点添加により、精子形成が低下するという結果を得ていた（図 11）が、それは培養 4 週間後の結果であり、3 週間目においては逆に上昇しているとい

うことが継時的な解析により明らかとなった。すなわち琵琶湖固有種の *in vitro* 精子分化系において NP は精子形成を促進するという思いがけ無い結果が得られた(図 12)。またその効果は今回調査した最低濃度 10 nM においても観察された。

琵琶湖において検出される NP 濃度は北湖で 0.3 nM, 南湖で 0.5 nM と報告されている。琵琶湖に生息するコイにおいて NP の生体濃縮係数は 15-22 倍と報告されていることから、ホンモロコ体内における NP 濃度は 6.6-11 nM に達すると予想される。すなわち本研究により得られた結果は、琵琶湖水中で検出される NP 濃度において実際にホンモロコの精子形成が影響を受けているという可能性を強く示唆するものとなった。

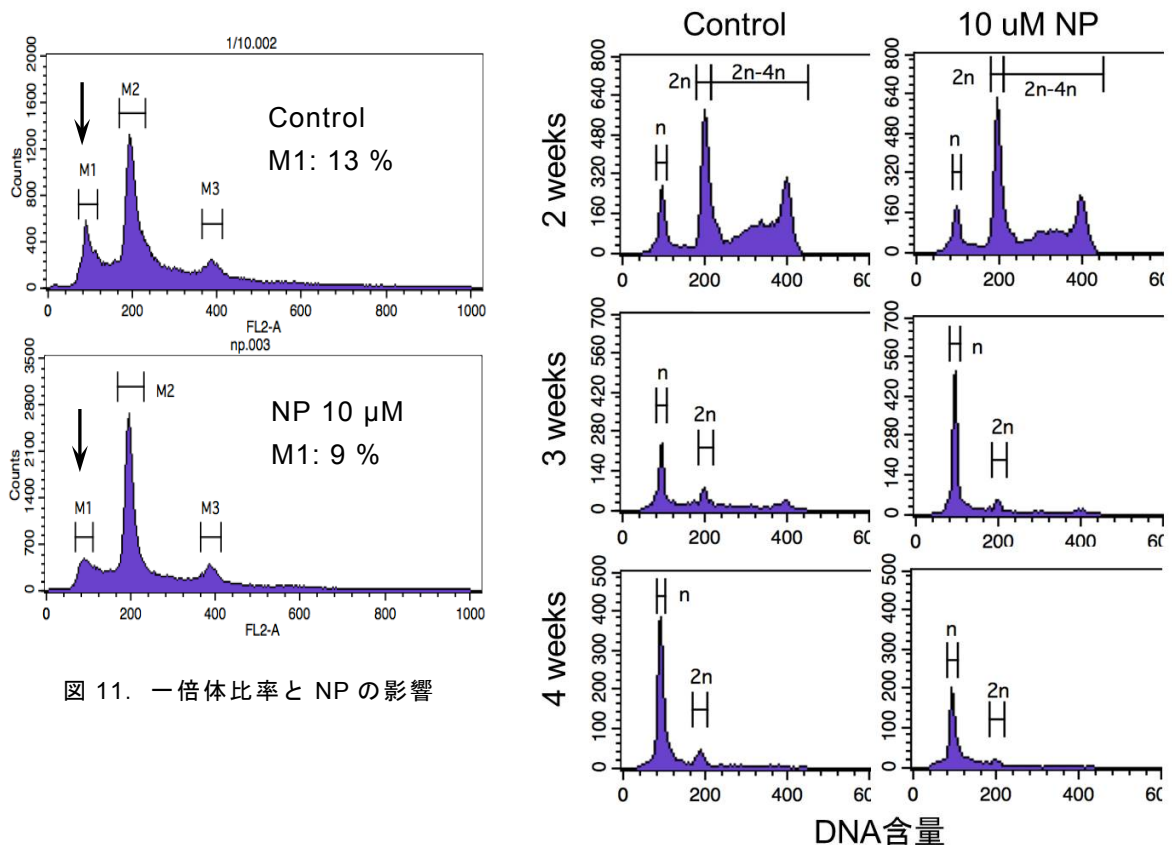


図 11. 一倍体比率と NP の影響

図 12. 一倍体比率の経時的変化と NP の影響

6. まとめと今後の課題

以上、本研究により、*in vitro* 精子分化系を利用することにより、外因性環境化学物質が精子形成に与える影響を定量的に解析可能であることが明らかとなった。さらに現在、琵琶湖水中で検出される NP 濃度が固有種ホンモロコの精子形成に影響する可能性が示唆され、その危険性に関し、初めて科学的根拠を示すこととなった。すなわち本研究により、解析困難であった外因性環境化学物質が固有種の精子形成に与える直接影響を定量的に評価する方法論が提示されたと考えられる。今後は、本研究方法を発展させ、抗体を用いて、各分化段階の生殖細胞を選択的に染色し、NP などの環境中の化学物質が精子形成過程のどの段階に影響するかを詳細に解析し、そのメカニズムを明らかにすることにより、化学物質の危険性を正しく理解することが可能となると考えられる。

7. 謝辞

本研究は、平成 26 年度 財団法人琵琶湖・淀川水質保全機構の「水質保全研究助成」による援助を受けて実施いたしました。本研究を遂行するにあたり、ホンモロコのサンプリング、血清の採取に関し、下村修一氏（草津ホンモロコ生産組合）、山本哲夫氏（山匠ホンモロコ養殖工房）ならびに山本太右エ門氏（山本養魚場）のご協力をいただきました。ホンモロコ精巣組織切片の作成には、滋賀医科大学 遠山育夫教授をはじめ、山元武文氏、森康博氏（滋賀医科大学実験実習支援センター）のご協力をいただきました。また、琵琶湖博物館 藤岡康広博士ならびに国立遺伝学研究所 酒井則良准教授には、ご専門の立場から、様々なご助言をいただきました。ご協力いただいた関係各位に心から感謝を申し上げます。

8. 関連業績

講演

1. 高田 達之

琵琶湖固有種における分子細胞生物学研究とその保存への応用
琵琶湖Σ研究センター・セミナー、草津 BKC、滋賀、2014 (6/26)

2. 高田 達之

幹細胞生物学を利用した琵琶湖固有種の保存研究
環びわ湖大学・地域コンソーシアムによる高大連携事業
滋賀県内の公立学校に勤務する教員向け 10 年経験者研修、草津 BKC、滋賀、2014 (8/6)生物多様性の保全

学会発表

1. 檜垣彰吾, 島田愛美, 川本和明, 藤岡康弘, 酒井則良, 高田達之: 琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) における *in vitro* 精子分化培養法の開発: 平成 26 年度日本水産学会秋季大会 福岡市, 2014 年 9 月 21 日
2. 手島黎子, 檜垣彰吾, 島田愛美, 川本和明, 藤岡康弘, 酒井則良, 高田達之: 琵琶湖固有種ホンモロコの *in vitro* 精子生産: 立命館大学琵琶湖Σ研究センター第 5 回シンポジウム 草津市, 2014 年 9 月 24 日
3. 小野友梨子, 檜垣彰吾, 藤東貴昭, 手島黎子, 酒井則良, 高田達之: 魚類 *in vitro* 分化系を用いたノニルフェノールの影響解析: 第 17 回日本内分泌攪乱化学物質学会 東京, 2014 年 12 月 10 日
4. 檜垣彰吾, 藤東貴昭, 手島黎子, 島田愛美, 小野友梨子, 高田達之: フローサイトメトリーによる琵琶湖固有種ホンモロコ (*Gnathopogon caerulescens*) 精巣細胞の解析: 琵琶湖Σ研究センター研究発表会 大津市, 2015 年 1 月 18 日

7. 参考文献

Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., Funari, E., 2008. Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment international*. 34, 984-987.

- Balakrishnan, B., Thorstensen, E., Ponnampalam, A., Mitchell, M., 2013. Passage of 4-nonylphenol across the human placenta. *Placenta*. 32, 788-792.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.-Y., Reidy, J.A., Needham, L.L., 2008. Exposure of the US population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003-2004. *Environmental health perspectives*. 39-44.
- De Jager, C., Bornman, M., Oosthuizen, J., 1999. The effect of p-nonylphenol on the fertility potential of male rats after gestational, lactational and direct exposure. *Andrologia*. 31, 107-113.
- Gieske, M.C., Lawson, C., Smith, H., Murdoch, B., VandeVoort, C., Hunt, P.A., 2011. Fetal Exposure to Bisphenol A Causes Meiotic Defects and Abnormal Follicle Formation in a Primate Model. *Biology of Reproduction*. 85, 36.
- Gould, J.C., Leonard, L.S., Maness, S.C., Wagner, B.L., Conner, K., Zacharewski, T., Safe, S., McDonnell, D.P., Gaido, K.W., 1998. Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol. *Molecular and cellular endocrinology*. 142, 203-214.
- Higaki, S., Koyama, Y., Shimada, M., Ono, Y., Tooyama, I., Fujioka, Y., Sakai, N., Ikeuchi, T., Takada, T., 2013a. Response to fish specific reproductive hormones and endocrine disrupting chemicals of a Sertoli cell line expressing endogenous receptors from an endemic cyprinid *Gnathopogon caerulescens*. *General and comparative endocrinology*. 191, 65-73.
- Higaki, S., Koyama, Y., Shirai, E., Yokota, T., Fujioka, Y., Sakai, N., Takada, T., 2013b. Establishment of testicular and ovarian cell lines from Honmoroko (*Gnathopogon caerulescens*). *Fish physiology and biochemistry*. 39, 701-711.
- Hunt, P.A., Lawson, C., Gieske, M., Murdoch, B., Smith, H., Marre, A., Hassold, T., VandeVoort, C.A., 2012. Bisphenol A alters early oogenesis and follicle formation in the fetal ovary of the rhesus monkey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109, 17525-17530.
- Inoue, K., Kondo, S., Yoshie, Y., Kato, K., Yoshimura, Y., Horie, M., Nakazawa, H., 2001. Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Additives & Contaminants*. 18, 157-164.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.-A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor α . *Endocrinology*. 139, 4252-4263.
- Li, X., Ying, G.-G., Zhao, J.-L., Chen, Z.-F., Lai, H.-J., Su, H.-C., 2013. 4-Nonylphenol, bisphenol-A and triclosan levels in human urine of children and students in China, and the effects of drinking these bottled materials on the levels. *Environment international*. 52, 81-86.
- Miles-Richardson, S., Pierens, S., Nichols, K., Kramer, V., Snyder, E., Snyder, S., Render, J., Fitzgerald, S., Giesy, J., 1999. Effects of waterborne exposure to 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate on secondary sex characteristics and gonads of fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Research*. 80, S122-S137.
- Sakai, N., 2006. In vitro male germ cell cultures of zebrafish. *Methods*. 39, 239-245.

- Staples, C.A., Weeks, J., Hall, J.F., Naylor, C.G., 1998. Evaluation of aquatic toxicity and bioaccumulation of C8- and C9-alkylphenol ethoxylates. *Environmental toxicology and chemistry*. 17, 2470-2480.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental health perspectives*. 1055-1070.
- Vom Saal, F.S., Hughes, C., 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*. 926-933.
- WHO/UNEP, State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012. An assessment of the state of the science of endocrine disruptors prepared by a group of experts for the United Nations Environment Programme (UNEP) and WHO, 2013.
- Wisniewski, P., Romano, R.M., Kizys, M.M., Oliveira, K.C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias-da-Silva, M.R., Romano, M.A., 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic–pituitary–testicular axis. *Toxicology*.
- Yamada, H., Furuta, I., Kato, E.H., Kataoka, S., Usuki, Y., Kobashi, G., Sata, F., Kishi, R., Fujimoto, S., 2002. Maternal serum and amniotic fluid bisphenol A concentrations in the early second trimester. *Reproductive toxicology*. 16, 735-739.
- Zimmers, S.M., Browne, E.P., O’Keefe, P.W., Anderton, D.L., Kramer, L., Reckhow, D.A., Arcaro, K.F., 2014. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of US women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere*. 104, 237-243.