

## ヒト糞便からのビスフェノール A 分解細菌株の分離

### Isolation of a BisphenolA-Degrading Beta-Proteobacterium from a Human Stool Sample

植田 徹\*, 柴田 悟, 一藤 俊和, 松本 聡  
TORU UEDA, SATORU SHIBATA, TOSHIKAZU ICHIFUJI and SATOSHI MATSUMOTO

秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科 〒010-0195 秋田県秋田市下新城中野字街道端西241-7

\* TEL: 018-872-1623 FAX: 018-872-1677

\* E-mail: tueda@akita-pu.ac.jp

Faculty of Bioresources Sciences, Akita Prefectural University  
241-7 Kaidobata-Nishi, Shimoshinzyo-Nakano, Akita-shi, Akita 010-0195, Japan

(原稿受付 2004年9月18日 / 原稿受理 2004年12月13日)

Endocrine disruptors such as bisphenol A (BPA) were detected in the human follicular fluids indicating that the reproductive organs have been exposed to these substances. It is reported that BPA has positive and negative effects on embryo development in mice. Furthermore, BPA has been reported to activate aggressive behavior in mice. In order to develop biodegradation-technology of BPA in human and other environments, we have attempted to isolate of a BPA-degrading bacterium from a healthy human stool sample. By using BPA during enrichment, we isolated single strain (designated as SHIBATA-9) with the capability which can decompose BPA. The strain SHIBATA-9 is a gram-negative, aerobic bacillus that grows on BPA as a sole source of carbon and energy. Based on molecular evolutionary analysis of the partial nucleotide sequence (500 bp) of the 16S rRNA gene-targeted PCR product, the strain SHIBATA-9 was characterized as a beta-proteobacterium closely related to genus *Achromobacter*, *Alcaligenes*, and *Collimonas*. Interestingly, this bacterial strain cannot grow on any other carbon sources such as glucose and yeast extracts. These data suggests that this strain might be useful for regulation of biodegradation of BPA in human and other environments.

**Key words:** bisphenolA, Beta-Proteobacterium, stool, biodegradation, 16S rRNA gene

**キーワード:** ビスフェノール A, Beta-Proteobacterium, 糞便, 生分解, 16S rRNA 遺伝子

## 1. 緒 言

ビスフェノール A (BPA) はポリカーボネイト樹脂, エポキシ樹脂の原料として世界中で年間約350万トン, 国内では約50万トン生産されている汎用化学物質<sup>3)</sup>で, ここ数年にわたる一連の内分泌攪乱化学物質問題の発端となった物質でもある。1996年に世界的なベストセラーとなった, 奪われし未来<sup>4)</sup>の中で, ポリカーボネイト樹脂製フラスコから高温高压下で溶け出した BPA がエストロゲン活性を有する事を見出したスタンフォード大学クリシュマンらの論文<sup>16)</sup>が紹介された事と, 1998年, 米国ミズーリ州立大学のフレデリック・フォン・サール教授らが BPA の無有害性影響量とされる 50 mg/kg/日よりも遥かに低濃度である0.02および 0.002 mg/kg/日で BPA を摂取させた妊娠雌マウスから生まれた子マウスに前立腺肥大と精子数減少の異常を認めたという所謂「低用量効果」についての報告<sup>28)</sup>を行った事を契機として, 我が国において環境ホルモン騒動が勃発した。

しかしながら, その後, このフレデリック・フォン・サール教授が主張した「低容量効果」に関して再現性がとれず, その不確実性は被験マウス数が少なかったため

に起こった統計的揺らぎから来ている可能性が指摘され<sup>5)</sup>, 関係業界から大きな反発が発生した。また平成16年7月にも環境省は第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料: 哺乳類を用いた人健康への内分泌攪乱作用に関する試験結果まとめ表 (案)<sup>14)</sup>にて, 実際の環境から検出されるような低濃度ではラットへの影響は確認できない事を公表し, 環境ホルモン騒動は最近, 急速に鎮静化した。

その一方, 2002年, 東京大学医学部産婦人科教室は, BPA 存在下では卵子の成熟が阻害され受精できなくなるという報告<sup>30)</sup>や BPA が着床前初期胚へ直接作用するという報告<sup>27)</sup>を行っている。また, 2003年, 九州大学医学部心療内科教室は, マウス胎児に BPA を曝露させれば成長後の子マウスが攻撃的な行動異常を示す事を報告している<sup>20)</sup>。更に, 環境省平成16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会資料「内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響調査研究」<sup>15)</sup>においても, 横浜市立大学医学部産婦人科教室他が, (対照データと必ずしも比較対応した群間での検討ではないものの) 尿道下裂児の母親の血中 BPA 濃度平均値が正常妊婦と比べ2倍以上高かった事を報告している。

以上の報告を総合的に踏まえると、フォン・サール教授が当初指摘した低容量効果の再現性がとれない事が明確になった点では環境ホルモン騒動は鎮静化したものの、その一方で BPA 被曝マウスの行動異常や不妊につながる新たなリスク知見は出現しており、やはり予防原則を踏まえた上で BPA 汚染除去技術を開発しておく必要性はあるものと考えられる。一方、従来、河川等の自然生態系から BPA 分解菌が多数分離されている<sup>7-9,13,17-19,23,25)</sup>が、ヒト腸内生態系に入った BPA の生分解に関する知見に関しては報告されていない。従って、本研究はヒト糞便をヒト腸内生態系試料として用い、そこから BPA を生分解可能な微生物を分離する事を目的とした。

## 2. 材料および方法

### 2.1. BPA 分解菌の集積培養

健康な22歳男性から得た新鮮なヒト糞便 10 g を、滅菌水 90 mL を予め加えた 300 mL 三角フラスコに加え、20分間激しく振とうし懸濁した。次に田代の無機基本液体培地<sup>12)</sup>(CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 34 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 100 mg, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 10 g, FeCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 20 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 2 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 100 μg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 114 μg, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 10 pg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 μg, 0.33 M リン酸緩衝液 10 ml: 1 L) を 50 mL 加えた 200 mL 三角フラスコに、2.5 mL DMSO に溶解させた 0.2 g のカルバゾール (和光純薬株式会社製 1 級) を添加しオートクレーブ滅菌後、超音波で10分間懸濁させた。その後、前述の糞便懸濁液 1 mL を接種し、27°C で 1 週間、120 rpm で一次振とう培養を行った。その後、新たに田代の無機基本液体培地 50 mL を加えた 200 mL 三角フラスコに、今度は 0.2 g の BPA (和光純薬株式会社製、1 級) を加えオートクレーブ滅菌後、超音波で10分間懸濁させた液体培地に、一次集積培養液 1 mL を植え継ぎ、27°C、120 rpm で更に 1 週間、二次集積培養を行った。次に、この炭素源が BPA のみの田代の無機基本液体培地への植え継ぎを更に 2 回繰り返す、4 次培養まで計 1 ヶ月間、集積培養を行った。得られた 4 次集積培養液を、BPA を 0.4% 添加した田代の無機基本寒天培地に接種し、27°C で静置培養したところ 2 日後に透明なハローを形成するコロニーが確認できたので、そこから純粋分離作業を行った。

### 2.2. BPA 含有寒天培地上での分離株の性状確認

BPA を 0.4% 添加して白濁させた田代の無機基本寒天培地に上の純粋分離株を接種し、26°C で 16 時間培養して得られた透明な分解域 (ハロー) を写真撮影した。またその際に分離株が寒天培地上で析出させた白色結晶をスパチュラで丁寧に取り出し、そのうち 20 mg をメタノール 20 mL (和光純薬工業株式会社, HPLC 用) で溶解後、HPLC 分析に供した。HPLC 分析は逆相 HPLC (カラム: 和光純薬株式会社製 Wakosil-II 5C18 RS φ4.6 mm × 250 mm (W), 検出器: 島津製作所製 SPD-6A, 波長: λ = 280 nm, 溶媒: 60%, 70% の 2 混合条件でのメタノール水溶液, 流量: 0.3 mL/min) で行い、BPA 標準品 (和光純薬株式会社製, 1 級) と保持時間と吸光度面積の差異を確認した。

### 2.3. 分離株の各種芳香族化合物資化能の確認

田代の無機基本寒天培地に唯一の炭素源としてカルバゾール (和光純薬工業株式会社, 特級) を 0.4%, p-n-ニルフェノール (和光純薬工業株式会社, 残留農薬試験用) を 0.2%, ベンゾ (a) ピレン (和光純薬工業株式会社, 特級) を 0.1%, 17β-エストラジオール (和光純薬工業株式会社, 生化学用) を 0.1%, エストリオール (和光純薬工業株式会社, 生化学用) を 0.1%, テストステロン (和光純薬工業株式会社, 生化学用) を 0.1%, それぞれ別に添加後、各々の培地に分離株を接種し培養を試みる事によって、それらの化合物への資化能を確認した。次に、分解酵素誘導剤として BPA を上記各培地にそれぞれ 0.4%, 更に加えた培地 (すなわち BPA と各種芳香族化合物を同時に加えた培地) で同様に分離株の培養確認を行った。

### 2.4. BPA 分解菌の分子同定

BPA を 0.4% 添加した細菌用標準液体培地に分離株を植菌し、30°C で一晩振とう培養後、培養液をろ紙 (東洋ろ紙, No. 6) で吸引ろ過したろ液を遠心分離する事によって集菌した。得られた菌体から抽出したゲノム DNA を鋳型として PCR により 16SrDNA 断片 (500 bp) を増幅<sup>29)</sup> し、塩基配列をダイレクトシーケンシング法によって解析した。PCR 産物の精製、サイクルシーケンスには MicroSeqTM 500 16SrDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems 社 U.S) を使用した。ゲノム DNA 抽出からサイクルシーケンスまでの操作に関しては Applied Biosystems 社のプロトコール (P/N4308132 Rev. A) に従った。サーマルサイクラーには GeneAmpR PCR System9600 (Applied Biosystems 社 U.S), DNA シーケンサーには ABI PRISM 377DNA Sequencer (Applied Biosystems 社 U.S) を使用した。得られた 16S rDNA の塩基配列を使って相同性検索、系統樹を作成し、検体の近縁種および帰属分類群の検討を行った。相同性検索および系統樹の作製には BLAST<sup>29)</sup> および MEGA<sup>22)</sup> を使用した。BLAST による相同性検索結果から選択抽出した。各種 16SrDNA 配列データを DDBJ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/Welcom-j.html>) の ClustalW を用いてアライメント (整列) し、ギャップを除いた上で Kimura 2-parameter で遺伝学的距離を算出し、近隣結合法<sup>26)</sup> で分子進化系統樹の作成を行った。なお分岐点検定のためブートストラップ検定は 1000 回行った。

## 3. 結果

### 3.1. BPA 資化微生物株の単離

前述した集積培養法によって炭素源を BPA のみとした無機栄養塩寒天培地で増殖可能な細菌株を 1 株分離でき、SHIBATA-9 株と名付けた。

### 3.2. BPA 含有寒天培地上での分離株の性状確認

図 1 で示したように BPA を 0.4% 添加し白濁させた無機栄養塩寒天培地に SHIBATA-9 株を 30°C で 16 時間培養した結果、固体培地中の BPA が分解された事を示す透明なハローが確認できた。この固体培地に含まれてい

る炭素源は BPA のみであるので、SHIBATA-9 株が BPA を資化し自らの菌体成分の炭素源にしていると同時に、エネルギー源としても利用し最終的には二酸化炭素まで分解しているものと考えられる。

なお、田代の無機栄養塩培地以外に、細菌用標準寒天培地を10倍希釈した固体培地（肉エキス 0.5 g, トリプトン 1 g, NaCl 10.1 g, 酵母エキス 0.25 g, グルコース 0.1 g, 蒸留水 1 L; pH 6.8）にも同様に BPA を0.4%添加した固体培地においても、上と同様な明確なハロー形成と結晶析出が確認できた。

ただ、BPA の代わりにグルコースを炭素源として加えた田代寒天培地や、BPA を加えず炭素源を肉エキス、トリプトン、酵母エキス、グルコースのみとした細菌用標準寒天培地では、SHIBATA-9 は増殖できず、本株は BPA 要求細菌である可能性が考えられた。

また、図1で確認できるように固体培地上で当該細菌株を接種したラインに沿って、白い結晶が析出している現象も確認でき100倍の光学顕微鏡で撮影した結果、幾何学的形状が認められた（図2）。

次に我々は固体培地に析出された結晶が BPA の分解産物か否かを確認するため、この結晶の逆相 HPLC 分析を行ったところ、60%メタノールと70%メタノールの双方の溶媒条件においても保持時間と単位重量当たりの UV ピーク面積が BPA 標準品と一致した。HPLC だけで物質の同定を完全に行えるものではないが、本株は寒天培地から吸収・資化した上で資化しきれなかった BPA を固体培地表面上で新たに結晶化させる特異な性質を持っている可能性が考えられる。なお、この性質は固体培地だけでなく液体培地においても確認でき、液体培地中に長さ 1~2 mm 程度にまで成長させた棒状結晶を無数に析出させるため、DNA 抽出前の集菌ステップにおいてはまず吸引ろ過で結晶を除去した上で遠心する必要があった。

### 3.3. 分離株の各種芳香族化合物資化能の確認

当該株を、BPA 以外のカルバゾール、p-n-ノニルフェノール、ベンゾ (a) ピレン、17β-エストラジオール、



Fig. 1. Clear-zone formation obtained with Beta-Proteobacterium SHIBATA-9 on a BPA-containing Tashiro Agar Plate.

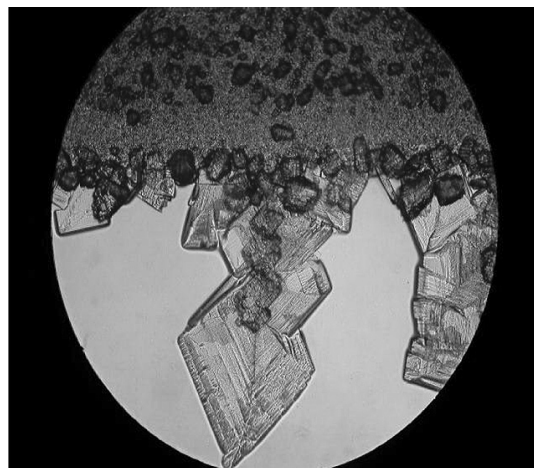


Fig. 2. Crystals created by Beta-Proteobacterium SHIBATA-9 on a BPA-containing Tashiro Agar Plate. (100× at the microscope)

エストリオール、テストステロンを唯一の炭素源とした無機栄養塩寒天培地に接種し、それらの化合物への資化能を確認した結果、当該株はいずれの寒天培地でも生育が認められなかった。また、前述したように当株はグルコース、肉エキス、酵母エキス、トリプトンも炭素源として利用できず、「BPA に対する栄養要求性を有する」と考えられた。

次に、BPA 分解酵素を誘導させる事を目的として当該寒天培地に BPA を0.4%添加した上で各種芳香族化合物分解確認を行った結果、BPA 以外にもカルバゾール、17β-エストラジオール、エストリオールも分解している可能性が固体培地上的ハロー形成の有無によって示唆された。その一方、ベンゾ (a) ピレン、テストステロン、ノニルフェノールについてはハロー形成が見られず、ある程度の基質特異性を持つ事が推察できた。

### 3.4. BPA 分解菌の分子同定

当株の 16S rRNA 遺伝子の部分配列データを日本 DNA データベース (DDBJ) に登録した (アクセッション番号: AB181502)。DDBJ, GenBank, EMBL データベースに対して BLAST 検索した結果、最も相同性が高かったのは Blackwater bioreactor bacterium BW6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence (AF394171)<sup>24)</sup> であり、99.0%の相同性を有していた。また、図3で示すように Gamma-Proteobacterium である *Pseudomonas* sp.VKM B-2265 (AF430121) をアウトグループとした分子進化学的解析 (近隣結合法) において、この株は明らかに β-プロテオバクテリアのクラスターに位置していた。ただ、属レベルでは *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Collimonas* 属細菌といずれも遺伝距離が近く、部分配列ではこれ以上の帰属決定が困難だったため暫定的に株名を Beta-Proteobacterium SHIBATA-9 株とした。

## 4. 考 察

以上、本研究によってヒト糞便から BPA 栄養性を有する興味深いプロテオバクテリア株が分離できた。た



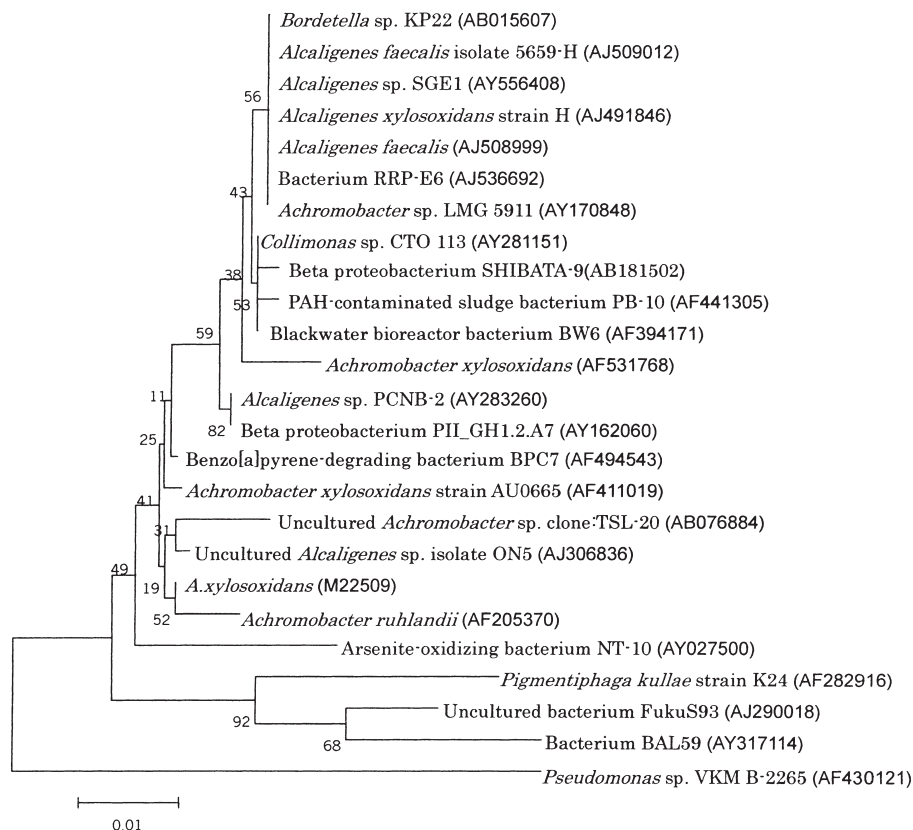


Fig. 3. Phylogenetic tree constructed by using the neighbour-joining method based on partial 16S rDNA sequences of strain SHIBATA-9 and related bacteria. The numbers at the branch points are bootstrap values based on 1000 samplings. *Pseudomonas* sp. VKM B-2265 (AF430121) was used as the outgroup. The bar indicates 0.02 substitution per nucleotide position.

だ、本株がヒト腸内生態系に恒常的に生息しているのか、あるいは食餌由来なのかは、今の段階ではわからない。しかし、いずれにせよヒトの健康への悪影響が未だ懸念されている BPA を生分解できる微生物株が、腸内細菌を大量に含むヒト糞便から分離できた事は興味深い。

環境微生物学分野では従来、人為起源化学物質を分解可能な微生物が多数見つかったが、炭素源として人為起源化学物質のみしか資化できないような特異な栄養要求性を示す細菌株の発見は聞かない。本株は唯一の炭素源として BPA を生育に要求するが、ヒト腸内や飲食物に恒常的に BPA が存在しているとは考えにくい。それではこの菌はヒト腸内生態系や自然界では何を炭素源として生息しているのだろうか？ BPA はつい百年程前に初めて合成された人工物質である一方、バクテリア側は一般に30億年以上の進化史を持つことを考えれば、つい百年程前に初めて地球上に現れた物質のみしか炭素源として利用できないような特異な進化戦略をバクテリアが採用しているとは考えにくい。そういった進化的背景を踏まえると、このバクテリア株は自然界では恐らく BPA と立体構造が非常によく似た何らかの天然化学物質を資化しているものと考えるのが最も自然であろう。その物質を同定するには糞便抽出液をクロマトグラフィーで分離し、どの画分が本株の増殖能を有しているか調べる必要があると思われるが、本報告ではそこまでは踏み込んでいない。

なお、興味深いことに1992年、ジェネラルエレクトリック社も、廃水処理上の活性汚泥から MV1 株と名付けら

れた、ある種の *Pseudomonas* 属細菌（旧属名 *Chryseomonas*, *Flavimonas*）と推定される BPA 資化菌を分離した事を報告<sup>23)</sup> しており、彼らの分離源が糞便等処理物の活性汚泥である点が、ヒト糞便を分離源とした本研究と相通ずる点がある。そういった意味では、このような BPA 資化菌株は糞便をベースとした環境に普遍的に存在しているのかもしれない。ただ、ジェネラルエレクトリック社が分離した MV1 株は 16S rRNA 遺伝子データは示されていないものの SHIBATA-9 株とは違って炭素源として BPA 以外のグルコース等も同時に利用できるだけでなく培地中への結晶形成能もなく、かつコロニーの形状も異なっているので別種の細菌と考えられる。

なお、本研究においてヒト糞便から BPA で集積培養を行う前に BPA と同じく複素環式芳香族化合物であるカルバゾールを用いて一次集積培養を行ったが、これは BPA のみならず、同じく複素環式芳香族化合物であるダイオキシン類をも分解できる微生物の分離を当初目指したからである。しかしながら、結果として分離できたのは BPA 以外の炭化水素化合物は資化できないと言う特異な性質の株であった。ただ、前述のように無機栄養塩寒天培地に BPA を添加し BPA 分解酵素を誘導させた形で同時に各種の芳香族化合物を懸濁させた培地にて各種の芳香族化合物分解を示唆するハロー形成能を確認したところ、本株は BPA だけでなくカルバゾールに対するハロー形成能も示したので、一次集積培養時には液体培地中に BPA を添加していなかったものの、糞便中の BPA と立体構造が似た何らかの成分によって当該酵

素が誘導されていたためカルバゾールを資化できたものと推測した。

次に分子同定に関しては、図 3 で示したように本株の分子進化系統解析を行った結果、本株は  $\beta$ -プロテオバクテリアに属している事が明らかとなったが、属に関しては部分塩基配列による解析のためか帰属決定が困難だった。ただ、興味深い事にこの分子進化的解析によって本株は PAH-contaminated sludge bacterium PB-10 (AF441305), Benzopyrene-degrading bacterium BPC7 (AF494543)<sup>21)</sup>, Arsenite-oxidizing bacterium NT-10 (AY027500) といった各種の芳香族化合物分解細菌株や PCB 分解能が知られている *Achromobacter* 属細菌, *Alcaligenes* 属細菌<sup>10)</sup> と遺伝距離が比較的近い事が確認できた。

なお、これまで *Achromobacter* 属, *Alcaligenes* 属では BPA 分解菌の報告はなされていないが PCB 分解菌<sup>14,11)</sup> の報告はなされている事から、これらの属には芳香族化合物分解細菌が多いものと推察できるかもしれない。

最後に再度繰り返すが、本研究において分離した BPA 分解菌株の最も大きな特徴は、BPA を栄養源に含まないと生育できないという点であり、そのような性質を持つ微生物の取得例は国内外ともない。この性質を環境工学的に考えた場合この株をヒト腸内を含む様々な環境中に導入しても汚染物質である BPA を分解し尽くせば増殖が自ずと止まる事が期待できるかもしれない。すなわち、導入した株がその環境で増えすぎて生態系における生物多様性を攪乱するリスクを、BPA に対して特異的な栄養要求性によって制御できる事につながる可能性が考えられる。本研究が今後、新たな生物環境工学技術の開発につながる事を期待したい。

## 文 献

- Ahmed, M., and D.D. Focht. 1973. Oxidation of polychlorinated biphenyls by achromobacter pCB. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10: 70-72.
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic logical alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- ビスフェノール A 安全性 5 社研究会. ビスフェノール A とはどんな物質か. <http://www.bisphenol-a.gr.jp/frame3.html>.
- Commandeur, L.C., R.J. May, H. Mokross, D.L. Bedard, W. Reineke, H.A. Govers, and J.R. Parsons. 1973. Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes* sp. JB1: metabolites and enzymes. *Bull Environ Contam Toxicol.* 10: 70-72.
- Cagen, S.Z., J.M. Waechter Jr, S.S. Dimond, W.J. Breslin, J.H. Butala, F.W. Jekat, R.L. Joiner, R.N. Shiotsuka, G.E. Veenstra, and L.R. Harris. 1999. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci.* 50: 36-44.
- Colborn, T., D. Dumanoski, and J.P. Myers. 1997. 奪われし未来. 翔泳社. 東京.
- 陳昌淑, 徳弘健郎, 池 道彦. 1996. 河川水マイクロロブムによるビスフェノール A(BPA) の分解. *日本水環境学会誌.* 11: 878-884.
- 陳 昌淑, 池 道彦, 藤田正憲. 1996. *Pseudomonas Paucimobilis* FJ-4株によるビスフェノール A の代謝経路. *日本水処理生物学会誌.* 3: 199-210.
- Dorn, P.B., C. Chou, and J. Gentempo. 1983. Degradation of Bisphenol A in natural waters. *Chemosphere.* 7: 1501-1507.
- Furukawa, K., N. Hayase, K. Taira, and N. Tomizuka. 1989. Molecular relationship of chromosomal genes encoding biphenyl/polychlorinated biphenyl catabolism: some soil bacteria possess a highly conserved bph operon. *J. Bacteriology.* 171: 5467-5472.
- Haluska, L., G. Barancikova, S. Balaz, K. Dercova, B. Vrana, M. Paz-Weisshaar, E. Furciová, and P. Bielek. 1995. Degradation of PCB in different soils by inoculated *Alcaligenes xylooxidans*. *Sci. Total. Environ.* 175: 275-285.
- 岩撫暁生, 芳野恭士, 蓮実文彦, 太田俊也. 2002. アルキルフェノールを分解する微生物の探索と環境浄化技術への応用: ノニルフェノールを分解する微生物の単離. 静岡県沼津工業技術センター研究報告. 第8号
- Ike, M., Jin. Chang-Suk, and M. Fujita. 1995. Isolation and characterization of a novel bisphenol A-degrading bacterium. *Pseudomonas Paucimobilis* Strain FJ-4. *Japanese journal of water treatment biology.* 3: 203-212.
- 環境省. 2004. 哺乳類を用いた人健康への内分泌攪乱作用に関する試験結果まとめ表 (案) <http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1601/mat/mat03-1.pdf>.
- 環境省. 2004. H16年度第1回内分泌攪乱化学物質問題検討会 内分泌攪乱化学物質のヒトへの影響調査研究 <http://www.env.go.jp/chemi/end/kento1601/mat/mat13.pdf>
- Krishnan, A.V., P. Stathis, S.F. Permuth, L. Tokes, and D. Feldman. 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology.* 132: 2279-2286.
- Klecka, G.M., S.J. Gonsior, R.J. West, P.A. Goodwin, D.A. Markham, et al. 2001. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 12: 2725-2735.
- Kang, J.H., and F. Kondo. 2002. Bisphenol A degradation by bacteria Isolation from river water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 43: 265-269.
- Kang, J.H., and F. Kondo. 2002. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere.* 49: 493-498.
- Kawai, K., T. Nozaki, H. Nishikata, S. Aou, M. Takii, and C. Kubo. 2003. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect.* 11: 175-178.
- Kanaly, R.A., S. Harayama, and K. Watanabe. 2002. Rhodanobacter sp. Strain BPC1 in a Benzo[a]pyrene-Mineralizing Bacterial Consortium. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5826-5833.
- Kumar, K. Tamura, I.B. Jakobsen, and M. Nei. 2001. MEGA2 molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics.* 12: 1244-1245.
- Lobos, J.H., T.K. Leib, Tah-Mun Su. 1992. Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by a Gram-Negative Aerobic Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology.* 6: 1823-1831.
- Morgan, C.A., A. Hudson, A. Konopka, and C.H. Nakatsu. 2002. Analyses of microbial activity in biomass-recycle reactors using denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA and 16S rRNA PCR products. *Can. J. Microbiol.* 48: 333-341.
- 大谷仁己, 藤波洋征, 齋藤武夫. 2000. ビスフェノール A 分解菌の河川水からの分離. [http://www.pref.gunma.jo/c/02/eIkanken/2000\\_p92.htm](http://www.pref.gunma.jo/c/02/eIkanken/2000_p92.htm)
- Saitou, N., and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- 堤 治. 2000. 内分泌攪乱化学物質の着床前初期胚への直接作用. *日本臨牀.* 58: 2464-2468.
- Vom Saal, F.S., P.S. Cooke, D.L. Buchanan, P. Palanza, K.A. Thayer, S.C. Nagel, S. Parmigiani, and W.V. Welshons. 1998. A physiologically based approach to the study of bisphenol A

- and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health*. 14 : 239-260.
- 29) Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier, and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 : 697-703.
- 30) Xu, J., Y. Osuga, T. Yano, Y. Morita, X. Tang, T. Fujiwara, Y. Takai, H. Matsumi, K. Koga, Y. Taketani, and O. Tsutsumi. 2002. Bisphenol A induces apoptosis and G2-to-M arrest of ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 292: 456-462.