

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 藪崎 梨沙

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 ビスフェノールAとその類似物質の代謝動態について

審査委員

主査 教授 横田 博（獣医生化学）

副査 教授 北澤多喜雄（獣医薬理学）

副査 教授 翁長 武紀（獣医栄養生理学）

副査 准教授 岩野 英知（獣医生化学）

学位論文要旨

ビスフェノール A とその類似物質の代謝動態について

酪農学園大学大学院獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

21141008 藪崎 梨沙

近年、世界的に BPA の安全性について再評価が行われており、BPA に対する特に胎児・新生児期における暴露に関する規制が強くなっている。この動きをうけ、市場では BPA の代替物質である BPF や BPAF などの BPA の類似物質の需要が高くなってきている。しかしながら、BPA 類似物質の毒性評価は不十分なままである。本研究では、第 I 章で BPF、BPAF の胎児および乳幼児における代謝活性および、UGT2B1 の発現量の比較を行った。第 II 章では、BPF について妊娠期・非妊娠期の肝臓から胆汁中または静脈中への代謝物の排出について比較検証を行った。また胎盤を通過した BPA の胎仔での動態および毒性発現機序はいまだ不明なままである。胎児、新生児において腸管内での β -グルクロニターゼ活性が高く、脱抱合され腸管循環しやすいとされること、多くの報告で羊水中から BPA が検出されていることから、胎盤を通過した BPA-GA が胎児腸管内で BPA へ脱抱合されているのではないかという仮説を立てた。第 III 章では胎仔腸管を使った灌流実験により、BPA-GA の腸管内での脱抱合および腸組織における β -グルクロニターゼの局在について検証を行った。

第 I 章ではマウス胎仔、新生仔、母体における肝臓の UGT 活性の比較、UGT2B1、UGT1A6 の遺伝子発現量の比較を行った。BPAF に対する UGT 活性は BPA や BPF に比べて大変低く、BPF、BPA に対する UGT 活性は、胎仔期、新生仔期は母親と比較すると大変低かった。また胎仔、新生仔の UGT2B1 の発現量は母親と比較すると大変低く、BPF は BPA の様に、主に UGT2B1 で代謝されていると考えられる。

第Ⅱ章ではラットオス、非妊娠期メス、妊娠期メス、Eisai hyperbilirubinemic rats (EHBR) オスにおいて、BPFの肝灌流実験を行った。BPFはBPF-GA、BPF-GASに代謝され、オスで主にBPF-GASが胆汁中に、非妊娠期のメスで主にBPF-GAが胆汁中に排出された。妊娠期のメスでは胆汁中の排出が減少し、代償的に静脈中への排出が増加し、特に非妊娠期にはほとんど見られなかったBPF-GASの静脈排出が認められた。MRP2欠損マウスであるEHBRでは胆汁排出がほとんど見られず、静脈排出が主であった。このことから、BPF-GAとBPF-GASの両抱合体の胆汁中への排出はMRP2を介在していることを示唆された。

第Ⅲ章ではラット胎仔におけるBPA-GAおよびBPAの腸管灌流実験およびβ-グルクロニターゼの免疫組織染色を行った。BPA-GAを腸管に灌流させると、腸組織、基底膜側からBPAが検出された。BPA-GAが小腸でBPAに変換され、さらに基底膜側に移送されること示した。β-グルクロニターゼは両粘膜上皮の細胞質に局在していることが分かった。

これらの結果より、BPA類似物質であるBPF、BPAFがBPAよりも胎児暴露リスクが高い可能性があること、胎仔へ移行したBPAが胎児腸管で脱抱合されることが分かった。今後、BPA類似物質の詳細な代謝動態およびBPAの毒性発現機序についてさらなる検証が必要である。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

本論文は、内分泌攪乱物質ビスフェノール A (BPA) とその類似化合物である BPF((4,4-Hexafluoroisopropylidene)diphenol)や BPAF (Bis(4-hydroxyphenyl)sulfone) の実験動物妊娠母親、胎仔、乳幼仔(新生仔)の体内代謝動態を明らかにし、内分泌攪乱作用リスクを予測したものである。

研究の背景と目的

BPA は合成樹脂プラスチックの一種であるポリカーボネートの構成化合物として多くの工業製品に使用されている。しかし、極微量でも内分泌の合成/分泌さらに活性を阻害することが判明し、工業製品として使用する場合の法律的な規制が確立されてきた。そこで、BPA と同様にポリカーボネート材料と成り得る類似化合物 (BPF や BPAF) が多くの工業製品で BPA の代替品として多用されてきている。しかしながら、これら類似化合物の毒性や内分泌攪乱作用について判明していることは少なく、唯一 *In Vitro* でのエストロゲン活性が BPA に比べ BPF は同じ程度で、BPAF は低いことのみである。ところが、最近、内分泌攪乱作用はエストロゲン活性のみでは推し量ることは出来ないことが分かって来ている。そこで、申請者はこれまでの BPA の研究を参考にし、類似化合物の内分泌攪乱作用を推察する為の基礎的研究として、それらの生体内代謝動態や胎仔体内での代謝等に付いて件明らかにすることを目的とした。

研究の成果

1) これまで、BPA は肝臓で主な代謝反応としてグルクロン酸抱合を受けることと硫酸抱合を受けることが判明している。そこで、実験動物マウスを用いて、妊娠母、胎仔、乳幼仔(新生仔)の肝臓を用いて、BPF (類似化合物を代表して) と同じく類似化合物である BPAF のグルクロン酸抱合活性 (UGT 活性) を測定した。その結果、BPA に比べ BPAF は UGT 活性が低かった。確認の為に、この UGT 活性を担う UGT2B1 の肝臓内 mRNA を測定したところ、やはり同時期の発現量は低い値であった。このことにより、BPA に比べ、特に BPAF は体内代謝速度が遅く体内に蓄積する傾向が高いことが分かった。

2) BPA は肝臓でグルクロン酸抱合され胆汁中に排泄される。そこで、BPF の代謝動態を明らかにする目的で、肝灌流実験を行なった。その結果、BPF はグルクロン酸の結合した抱合体 (BPF-GA) とグルクロン酸と硫酸の2つが結合した抱合体 (BPF-GAS) に代謝された。興味深い

ことに、妊娠期では、これらの代謝物は BPA の場合と同じく胆汁側ではなく静脈側に多く排出された。このことは、妊娠期では、BPF 抱合体は、BPA 抱合体と同じく又はそれ以上に血流を介して胎盤を通過し胎児に暴露される危険性が高いことを示している。

3) BPA の胎児体内での代謝を明らかにする為に次の様な実験を試みた。即ち、BPA 抱合体は胎盤を介して胎仔側に移行し、脱抱合されることが分かっている。他のこれまでの情報から、申請者は、脱抱合される部位は胎仔腸管内であると予測して、BPA 抱合体の腸管灌流を行なった。その結果、胎仔腸管内で脱抱合していることを実験的に示した。更に脱抱合反応を担う酵素が胎仔腸管上皮細胞に局在していることも示し、上記の結果を裏付けた。

研究の評価

妊娠期に BPF 等の BPA 類似化合物の代謝速度 (UGT 活性) は BPA に比べ遅く、抱合体の肝臓から静脈内への代謝排泄が多い、つまり胎仔への暴露リスクが高いことが判明した。このことは、BPA と同じかそれ以上の胎仔毒性や内分泌攪乱作用が予測されることを明らかにした。よって今後は、BPA 代替品として現在多用されている BPF 等の類似化合物の内分泌攪乱作用の有無を詳細に明らかにするとともに、その後に攪乱機序に応じた何らかの規制を検討する必要性も生じてきた。これらの研究成果は、内分泌攪乱物質の次世代影響の機序を解明し、その作用を未然に防ぐ為に、科学的にも獣医学的にも重要な意義を含んでいる。

以上のことから、本論分は博士 (獣医学) の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査委員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 4 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2015年 9月10日

審査委員

主査	教授	横田	博
副査	教授	北澤多喜雄	
副査	教授	翁長	武紀
副査	准教授	岩野	英知