

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 大 谷 尚 子

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 妊娠期ビスフェノールAおよびビスフェノールFの次世代行動
影響と胎盤通過性の検証

審 査 委 員

主査 教授 岩野 英知 (獣医生化学)

副査 教授 永幡 肇 (獣医衛生学)

副査 教授 寺岡 宏樹 (獣医薬理学)

副査 教授 横田 博 (獣医生化学)

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

妊娠時における化学物質の暴露は、低用量の曝露であっても胎仔へ移行し次世代に悪影響を及ぼす危険性がある。ビスフェノール A (BPA)は内分泌攪乱物質の一つであり、次世代行動影響が報告されているが、その作用メカニズムは不明のままである。BPAは成体で速やかに代謝をうけ排泄されるが、妊娠期においては代謝物が胎盤を通過することが報告されており、この胎仔移行が次世代影響に関係すると考えられる。安全性への懸念からBPAの使用に規制がかかる一方、ビスフェノール F (BPF)がBPA代替品として使用が増加している。BPFは、BPAと非常に類似した構造をもつため、BPAと同様の影響が懸念されているが、BPFの安全性についての報告は乏しく十分な調査が行われていないのが現状である。本研究は、BPA作用メカニズム解明の足掛かりとなるよう、妊娠期にBPAの影響を左右する時期を特定した。また、BPA代替品の安全性の調査として、BPFの次世代影響と妊娠期の代謝動態を検証した。その成果として、①妊娠期BPA曝露による行動影響の機序解明には妊娠後期に焦点を当て研究を行う必要があること、②BPAの影響を研究するにあたり葉酸などの栄養摂取量を考慮して実験を行う必要があること、③BPFは次世代に不安行動を引き起こしやすいこと、④BPFの硫酸抱合体は胎盤通過しやすい性質を持つことを示した。

研究の背景と目的

ビスフェノール A (BPA)は弱いエストロゲン活性を有す内分泌かく乱物質である。BPAは合成樹脂の原料として世界中で多くの工業製品に使用され、飲料や食品の容器を含む身の回りのプラスチック製品に使用されており、飲料や食品を介して日常的にBPAに曝露されている。BPAは成熟した個体では肝臓で速やかにグルクロン酸抱合体に代謝され、糞や尿中に排泄されるため、成体への影響はほとんどないと考えられている。しかし、げっ歯類を用いた実験では、妊娠期の曝露が次世代の不安行動などに影響を与えるという報告がある。毒性機序のメカニズムは未解明であり、予防的に使用規制がかかっている。一方、BPAの代替品として類似物質の使用が年々増加している。しかしこれらBPA代替品の安全性に関する研究は遅れており、ほとんど報告がない。本研究は、妊娠期の化学物質曝露による生体影響の抑制方策を見出し、次世代影響の低減を計ることを目的とした。メカニズム解明の足掛かりとなるよう、妊娠期にBPAの影響を左右すると考えられる要因

を検証し、また、BPA 代替品であるビスフェノール F (BPF)の次世代影響と妊娠期の代謝動態を検証した。

研究の成果

①異なる妊娠期間に BPA を曝露し、次世代の行動影響が左右されるか。

C57BL/6 マウスを用い、BPA 曝露(10mg/kg/day)の期間を妊娠前期(妊娠 5.5 日~12.5 日)と妊娠後期(妊娠 11.5 日~妊娠 18.5 日)に分け、生後 10 週の次世代の不安様行動を高架式十字迷路試験で調べた。その結果、妊娠後期が BPA 曝露の影響を受けやすく、不安行動の性差が失われることが分かった。

②母親の葉酸摂取量の差により次世代の行動影響が左右されるか。

近年、DNA メチル化による遺伝子発現調節が BPA により攪乱される可能性が報告されている。DNA のメチル化にはメチル基を供給するために葉酸が重要である。通常使用していた餌にはヒト妊娠期に推奨されている約 80 倍の葉酸量が含まれていたため、本研究では低葉酸餌(葉酸 4 μ g/餌 100g)を用意した。C57BL/6 マウスを葉酸量の異なる餌で順化し、BPA(10mg/kg/day)を妊娠後期に投与し、生後 10 週の次世代の不安様行動を高架式十字迷路試験で調べた。その結果、妊娠期 BPA 曝露による次世代の不安様行動は低葉酸餌群で顕著に現れた。BPA が次世代に及ぼす影響は、母親の嗜好や食生活に一部依存すると考えられた。

③BPF による次世代行動影響

C57BL/6 マウスを用い、妊娠後期に BPA 及び BPF を 10mg/kg/day で経口投与し、生後 10 週の次世代の不安様行動をオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験で調べ、うつ様行動を強制水泳試験で調べた。その結果、不安様行動への影響は BPA より BPF の方が顕著に現れた。また、BPF ではうつ様行動が増加した。BPF は BPA 代替品として安全性に問題があると考えられた。

④BPF 代謝物の種類により胎盤通過性の違いがあるか。

妊娠 18 日の SD ラットを用い、BPF グルクロン酸抱合体、BPF 硫酸抱合体、BPF グルクロン酸/硫酸抱合体(10 μ M)を子宮灌流し、胎盤通過性を比較した。その結果、硫酸抱合体が最も胎盤を通過しやすく、また脱抱合された BPF を胎仔組織で検出したことから、抱合体は胎盤で脱抱合される可能性が考えられた。

研究の評価

本研究の結果は、①BPA の次世代行動影響の機序解明には妊娠後期に焦点を当て研究を行う必要があること、②BPA の影響を研究するにあたり葉酸などの栄養摂取量を考慮して実験を行う必要があること、③BPF は次世代に不安行動を引き起こしやすいこと、④BPF の硫酸抱合体は胎盤に吸収されやすく脱抱合し、胎仔へ移行している可能性があることを示した。本研究は、BPA 及び BPF の今後の研究に限らず、次世代の毒性研究においても

大きく貢献できる結果を含んでいる。これまで種々の化学物質において次世代影響の有無や程度を報告するものは数多くあげられており、個々の化学物質の危険性を調査するものは多かった。しかし、それらの研究は個々の化学物質だけにとどまっている。本研究は、化学物質として BPA 及び BPF をとりあげているが、それらの結果から「成体での代謝産物が胎盤を通過し次世代に影響を与えるもの」としてその胎盤通過メカニズムや胎仔内動態をさぐり、化学物質全般の胎仔移行のリスク低減を計るという目標を見据えた、かなり視野を広げた研究である。特に代謝物の抱合形態によって胎盤通過のしやすさが変わる可能性を見出したことは、今後の毒性研究においても大きく貢献できる結果を含んでいる。特に抱合体の胎盤通過性については妊娠禁忌薬の胎盤通過性との関連の調査も視野に入れており、今後の研究が期待される研究分野を切り開く内容である。

上記内容は、*The Journal of Veterinary Medical Science* に受理され (in press) さらに、以下の学会での各賞を受賞した。

- 1) 平成 27 年度 内外環境応答・代謝酵素研究会 優秀研究発表権賞
- 2) 平成 27 年度 環境ホルモン学会・第 18 回研究発表会 優秀ポスター賞

以上のことから、大谷尚子 氏は博士 (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。

2017年 2月15日

審査委員

主査	教授	岩野	英知
副査	教授	永幡	肇
副査	教授	寺岡	宏樹
副査	教授	横田	博

要旨

妊娠期ビスフェノール A およびビスフェノール F の 次世代行動影響と胎盤通過性の検証

酪農学園大学院 獣医学研究科 獣医学専攻博士課程
大谷尚子

ビスフェノール A (BPA) は弱いエストロゲン活性を有す内分泌かく乱物質である。BPA は合成樹脂の原料として世界中で多くの工業製品に使用され、飲料や食品の容器を含む身の回りのプラスチック製品に使用されており、我々は飲料や食品を介して日常的に BPA に曝露されている。BPA は成熟した個体では肝臓で速やかにグルクロン酸抱合体に代謝され、糞や尿中に排泄されるため、成体への影響はほとんどないと考えられている。しかし、げっ歯類を用いた実験では、妊娠期の曝露が次世代の不安行動などに影響を与えるという報告がある。毒性機序は未解明であるが、EU やカナダ、アメリカの一部の州では使用が規制されている。一方、BPA の代替品として類似物質の使用が年々増加している。しかしこれら BPA 代替品の安全性に関する研究は遅れており、ほとんど報告例がない。本研究は、メカニズム解明の足掛かりとなるよう、妊娠期に BPA の影響を左右すると考えられる要因の検証を行った。また、BPA 代替品の安全性の調査として、BPA 代替品であるビスフェノール F (BPF) の次世代影響と妊娠期の代謝動態を検証した。

第 I 章では異なる妊娠期間に BPA を曝露し、次世代の行動影響が左右されるかを調査した。C57BL/6 マウスを用い、BPA 曝露 (10 mg/kg/day) の期間を妊娠前期 (妊娠 5.5 日~12.5 日) と妊娠後期 (妊娠 11.5 日~妊娠 18.5 日) に分け、生後 10 週の次世代の不安様行動を高架式十字迷路試験で調べた。その結果、妊娠後期が BPA 曝露の影響を受けやすく、不安行動の性差が失われることが分

かった。

第II章では母親の葉酸摂取量の差により次世代の行動影響が左右されるかを調査した。近年、DNAメチル化による遺伝子発現調節がBPAにより攪乱される可能性が報告されている。DNAのメチル化にはメチル基を供給するために葉酸が重要である。我々が通常使用する餌にはヒトの妊娠期に推奨されている約80倍の葉酸量が含まれていたため、本研究では低葉酸餌（葉酸4 µg/餌100 g）を用意した。C57BL/6マウスを葉酸含量の異なる餌で順化し、BPA（10 mg/kg/day）を妊娠後期に投与し、生後10週の次世代の不安様行動を高架式十字迷路試験で調べた。その結果、妊娠期BPA曝露による次世代の不安様行動は低葉酸餌群で顕著に現れた。BPAが次世代に及ぼす影響は、母親の嗜好や食生活に一部依存すると考えられた。

第III章ではBPFによる次世代行動影響を調べ、BPFの安全性を調査した。C57BL/6マウスを用い、妊娠後期にBPA及びBPFを10 mg/kg/dayで経口投与し、生後10週の次世代の不安様行動をオープンフィールド試験と高架式十字迷路試験で調べ、うつ様行動を強制水泳試験で調べた。その結果、不安様行動への影響はBPAよりBPFの方が顕著に現れた。また、BPFではうつ様行動が増加した。BPFはBPA代替品として安全性に問題があると考えられた。

第IV章はBPF代謝物の種類によって胎盤通過性が異なる可能性を考え、妊娠18日のSDラットを用い、BPFグルクロン酸抱合体、BPF硫酸抱合体、BPFグルクロン酸/硫酸抱合体（10 µM）を子宮灌流し、胎盤通過性を比較した。その結果、硫酸抱合体が最も胎盤を通過しやすく、また脱抱合されたBPFを胎仔組織で検出したことから、抱合体は胎盤で脱抱合される可能性が考えられた。

本研究の成果は、①BPAの次世代行動影響の機序解明には妊娠後期に焦点を当て研究を行う必要があること、②BPAの影響を研究するにあたり葉酸などの栄養摂取量を考慮して実験を行う必要があること、③BPFはマウスで次世代に

行動影響を及ぼすこと、④BPF 硫酸抱合体が胎盤を通過し胎仔に影響を及ぼしている可能性があること、を示した。これらのことから、化学物質による次世代影響は、曝露期間や母親が摂取する栄養に左右されるだけでなく、これまで安全と考えられてきた抱合代謝物の胎盤通過に関わる可能性があり、次世代影響メカニズム解明の手掛かりになると考えた。抱合体の胎盤通過性については今後更に研究を進める必要がある。本研究はBPA及びBPFの今後の研究に限らず、これまでメカニズムが解明されていない妊娠禁忌薬の次世代影響の研究に大きく貢献できる結果を含んでいる。