

学 位 論 文 要 旨

氏名 橋 徹

題 目：マウス生殖器形成期におけるビスフェノール A 曝露の生殖毒性学的研究

論文要旨：内分泌かく乱物質であるビスフェノール A (4,4'-isopropylidenediphenol; BPA) は弱いエストロゲン活性(エストラジオールの 1/10000-1/15000)を示し、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の原料、フェノール樹脂、酸化防止剤などの原料として使用されており、ヒトの健康影響が懸念されている。ヒトへの曝露および曝露量における内分泌かく乱作用の有無に関して様々な取り組みがなされており、げっ歯類を用いて BPA の生殖毒性学的を調べる実験は、数多く行われている。多世代生殖毒性試験も行われ NOAEL が算出されているが、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分に検討されていない。そこで、本研究は、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を解明すること、また、胎子期、特に生殖器形成期に限定した BPA 曝露が次世代雌性生殖器系へ影響を及ぼすかどうかを解明することを目的として実施した。

着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響に関しては、ICR マウスに BPA10mg/kg/day を妊娠 0 日から妊娠 7 日まで皮下投与した。妊娠 10 日目および妊娠 12 日目に開腹し、妊娠子宮を採取した後、着床胎子数および子宮重量を測定した。その後、光学顕微鏡を用いて胎盤の形態学的観察を行った。

生殖器形成期にのみ限定した BPA 曝露が次世代の生殖機能への影響に関しては、ICR マウスに BPA を 100、200、500 および 1000mg/kg/day を妊娠 12 日から妊娠 16 日まで皮下投与した。産子 (F1) は、BPA に曝露させることなく、性成熟期である生後 56 日に正常の雄と交配させ分娩させ授乳させた。F1 世代および F2 世代の雌は生後 56 日に体重を計測した後安楽死させ、子宮および卵巣を採材し、子宮および卵巣重量の計測および形態学的解析を行った。また、BPA に対する感受性を調べるため、雌の F1 世代および F2 世代に、BPA を F0 と同等の濃度を 3 日間投与し、最終投与翌日に前述と同様に処理した。エピジェネティクスな影響を調べるため、F2 世代の子宮より抽出した DNA を用いて HOXA10 遺伝子のプロモーター領域およびイントロン領域におけるメチル化解析を行った。

着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響に関しては、着床胎子数、子宮重量および産子数が減少すること、胎盤形成および子育てに影響を及ぼすことが示された。

生殖器形成期にのみ限定した BPA の曝露が次世代の生殖機能への影響に関しては、F2 世代に、体重の増加が認められ、子宮においては、子宮重量の減少、子宮腺の増加など形態学的変化が認められ、卵巣においては、卵巣重量の減少および卵胞の成熟度合いに違いが認められた。感受性試験では、F2 世代で感受性の増加が認められ、HOXA10 メチル化解析では、イントロン領域での非メチル化が認められた。これらの結果から、F2 世代においても生殖器のさまざまな形態的および

(別紙様式第 3 号)

分子生物学的な異常が引き起こされ、BPA の影響が次世代にも残存する可能性が示唆された。

本研究から、着床期から胎盤形成期の BPA 曝露は胎盤構造や子育てに影響を及ぼすことを、生殖器形成期に限定した BPA 曝露は F2 世代においても生殖器に形態学および分子生物学的な影響を及ぼすことを明らかにした。

内分泌かく乱化学物質の低用量問題、これまで影響を表すと考えられていたよりもはるかに少ない量で影響が認められ用量反応パターンは逆 U 字形を示すという低用量仮説に関しては、生殖毒性に関しては、低用量作用はないと結論つけられて、BPA のヒトへの健康影響に関しては、米国食品医薬品局や欧州食品安全機関が、近年、通常の曝露レベルにおいて、ヒト（胎児・乳幼児を含む全年齢）に健康リスクはないと発表している。しかしながら、内分泌かく乱化学物質の影響は、低用量でも、感受性の高い時期と曝露時期が一致した場合、影響が顕在化する可能性が示唆されている。莫大な数の実験が行われた BPA においても、感受性の高い時期は必ずしも明らかではない。このため、常時低用量であるが曝露されているヒトにおいて、今回認められた分子生物学的な影響が起こることは否定できず、常に曝露され続けている我々人間への BPA の影響は懸念が残る。形態学的に様々な異常が見られたにもかかわらず、F1 世代は正常に子孫を残しており、F2 世代でも正常に発情周期が回っていることが確認されている。今回認められた次世代への BPA の影響は、クリティカルなものではないのかもしれない。内分泌かく乱物質としての BPA の危険性も考慮しながら、しかしあまり過敏に反応することなく、利用していくことが大事であると考ええる。

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	橋 徹
審 査 委 員	主 査：山口大学・教授・木曾 康郎
	副 査：鹿児島大学・教授・松元 光春
	副 査：山口大学・教授・佐藤 晃一
	副 査：山口大学・准教授・日下部 健
	副 査：山口大学・准教授・加納 聖
題 目	マウス生殖器形成期におけるビスフェノール A 曝露の生殖毒性学的研究

審査結果の要旨：

内分泌かく乱物質であるビスフェノール A (4,4'-isopropylidenediphenol; BPA) は弱いエストロゲン活性(エストラジオールの 1/10000-1/15000)を示し、ポリカーボネートプラスチックやエポキシ樹脂の原料、フェノール樹脂、酸化防止剤などの原料として使用されており、ヒトの健康影響が懸念されている。ヒトへの曝露および曝露量における内分泌かく乱作用の有無に関して様々な取り組みがなされており、げっ歯類を用いて BPA の生殖毒性的を調べる実験は、数多く行われている。多世代生殖毒性試験も行われ NOAEL が算出されているが、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分に検討されていない。そこで、申請者は、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を解明すること、また、胎子期、特に生殖器形成期に限定した BPA 曝露が次世代雌性生殖器系へ影響を及ぼすかを解明することを目的として、以下の実験を行った。

まず、これまでに、子宮胎盤への BPA 曝露の影響については十分な検討がなされていなかったことから、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響を検討した。ICR マウスに BPA10mg/kg/day を妊娠 0 日から妊娠 7 日まで皮下投与した。妊娠 10 日および妊娠 12 日に開腹し、妊娠子宮を採取した後、着床胎子数および子宮重量を測定した。その後、光学顕微鏡を用いて胎盤の形態学的観察を行った。その結果、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響に関して、着床胎子数、子宮重量および産子数が減少すること、胎盤形成および子育てに影響を及ぼすことを明らかにした。これは、BPA の恒常的なエストロゲン受容体への刺激により、着床機構が阻害され、着床胎子数、子宮重量および産子数の減少が

引き起こされたことを示すが、特に、BPA 曝露が胎盤の分化・増殖機構に対して、母体側胎盤（子宮部）には増殖、一方、胎子側胎盤（迷路部および接合体）には抑制作用を示し、母体側と胎子側の胎盤の分化・増殖機構において BPA の影響に違いがあることを示したことが重要である。

次に、世代を超えた BPA 曝露の影響は十分に検討されていなかったことから、申請者は次世代の生殖機能への影響、胎子期、特に生殖器形成期に限定した BPA 曝露の次世代の生殖機能への影響に関して検討した。ICR マウスに BPA を 100, 200, 500 および 1000mg/kg/day を妊娠 12 日から妊娠 16 日まで皮下投与した。産子 (F1) は、BPA に曝露させることなく、性成熟期である生後 56 日に正常雄 (BPA 暴露経験なし) と交配させ、分娩させ、授乳させた。F1 世代および F2 世代の雌は生後 56 日に体重計測後、安楽死させ、子宮および卵巣を採材し、それらの計測および形態学的解析を行った。また、BPA に対する感受性を調べるため、雌の F1 世代および F2 世代に、BPA を F0 と同等の濃度を 3 日間投与し、最終投与翌日に前述と同様に処理した。エピジェネティクスな影響を調べるため、F2 世代の子宮より抽出した DNA を用いて HOXA10 遺伝子のプロモーター領域およびイントロン領域におけるメチル化解析を行った。その結果、F2 世代に、体重の増加が認められ、子宮においては、子宮重量の減少、子宮腺の増加など形態学的変化が認められ、卵巣においては、卵巣重量の減少および卵胞の成熟度合いに違いが認められた。感受性試験では、F2 世代で感受性の増加が認められ、HOXA10 メチル化解析では、イントロン領域での脱メチル化が認められた。これらは、F2 世代においても生殖器のさまざまな形態的および分子生物学的な異常が引き起こされ、BPA の影響が次世代にも残存することを強く示唆している。重要なことは、子宮へより悪影響（過去の報告より）を与えていること、特に、F2 世代で、子宮の形態異常および脱メチル化が確認されたことより、F1 世代が子宮内で受けた修飾が完全には修復されずに、F2 世代に引き継がれたことを示したことが重要である。

以上のように、申請者は形態学的及び分子生物学的解析を駆使して、着床期から胎盤形成期の妊娠子宮への BPA 曝露の影響、また、BPA 曝露が次世代の雌性生殖器系への影響を明らかにするとともに、米国食品医薬品局や欧州食品安全機関が、近年、通常曝露レベルにおいて、ヒト（胎児・乳幼児を含む全年齢）に健康リスクはないと発表していることへの懸念を示した。これらの成果は生殖毒性分野の発展に貢献するものである。以上より、本論文は博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしいと判断した。