学位論文題名

Detoxification of Bisphenol A, an Environmental Estrogen,
by Glucuronidation Reaction in the Rat Hepatointestine

(ラット肝および腸における、環境エストロジェンビスフェノールAの
グルクロン酸抱合による解毒代謝)

学位論文内容の要旨

ポリカーボネート樹脂原料として使用されるビスフェノールAは内分泌かく乱物質の一つであり、生体に対してエストロジェン様の作用を示す。ビスフェノールAは重合の不十分により、食品パッケージ、食器、歯科シーラントなどから溶出することから、人や動物は主として経口的にこの化学物質に暴露されると推察される。近年の研究により、ビスフェノールAを経口投与されたラットにおいて尿および糞中に大量のビスフェノールAグルクロン酸抱合体が排泄されることが報告されている。グルクロン酸抱合はUDP-グルクロン酸転移酵素によって触媒される第二相の薬物代謝反応である。すなわち、経口的に人や動物の体内に浸したビスフェノールAは、その吸収の過程でグルクロン酸抱合され、結果的に低活性で水溶性を増したビスフェノールAグルクロン酸抱合体として尿または糞中に排泄されていることが考えられる。そこで本研究では、グルクロン酸抱合を主軸に定め、ラット肝および腸におけるビスフェノールA代謝・動態について検討した。

1. ラット腸管におけるビスフェノールAの吸収とグルクロン酸抱合

多くの薬物は腸管において吸収される。本研究では、まず吸収臓器である腸管に焦点を絞り、ビスフェノールAの吸収とグルクロン酸抱合による代謝について調べた。4等分したラット空回腸および結腸を用いて反転腸管を作成し、腸管の粘膜側にビスフェノールAを添加したところ、腸管のいずれの部位でもビスフェノールAの腸管組織中への吸収が認められた。腸管に吸収されたビスフェノールAのほとんどは組織中でグルクロン酸抱合され、腸管の粘膜側もしくは漿膜側に排泄された。ビスフェノールAグルクロン酸抱合体の粘膜側への排泄は空回腸に多く、結腸に少なかった。一方、漿膜側へのグルクロン酸抱合体の排泄は遠位消化管、特に結腸で多かった。反転腸管の粘膜側に適用するビスフェノールA濃度を増したところ、漿膜側に未抱合のビスフェノールAが検出された。未抱合ビスフェノールAの漿膜側への移送は特に結腸で顕著だった。以上の結果より、ラット腸管においてビスフェノールAは効率にグルクロン酸抱合され、近位消化管では粘膜側に、また遠位消化管では漿膜側に排泄されることが分かった。しかし、高濃度のビスフェノールA存在下ではビスフェノールAは腸壁を越えて血液中に移行することが明らかとなった。

2. ラット肝におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合および抱合体動態

血液中に流入したビスフェノールAは門脈を経て肝臓に流入する。そこで、ラット肝灌流

モデルを用いて、肝におけるビスフェノールA動態を調べた。ラット肝に門脈を介してビスフェノールAを灌流したところ、ほとんどのビスフェノールAは肝組織中に移行した。肝組織中に移行したビスフェノールAは高率にグルクロン酸抱合され、静脈中の灌流液ならびに胆汁中に排泄された。ビスフェノールAグルクロン酸抱合体の排泄は特に胆汁中に多く認められた。ラット肝に灌流させたビスフェノールA量を増加させたところ、胆汁側へのグルクロン酸抱合体排泄量がプラトーに達し、静脈側への排泄が代償的に増加した。これらの結果から、ラット肝においてビスフェノールAは高率にグルクロン酸抱合され、主として胆汁中に排泄されることが分かった。

3. ビスフェノールAグルクロン酸抱合体輸送におけるMRP2の関与

多くの薬物グルクロン酸抱合体はmultidrug resistance associated protein (MRP)によって輸送される。MRPファミリーの一つ、MRP2は肝細胞の胆管側膜や腸粘膜上皮細胞の刷子縁膜などに局在し、細胞内の薬物グルクロン酸抱合体を細胞外へと汲み出す。本研究でラット反転腸管および肝灌流実験で認められたビスフェノールAグルクロン酸抱合体の排泄方向の決定に、MRP2が関与するか調べるべく、MRP2欠損ラットであるEisai hyperbilirubinemic rat (EHBR)を用いた肝灌流実験を行った。EHBR肝にビスフェノールAを流入させたところ、胆汁側へのビスフェノールAグルクロン酸抱合体排泄がほとんど消失し、静脈側への排泄が著明に増加した。このことからMRP2はビスフェノールAの排泄に関与することが明らかとなった。

4. ラット肝ビスフェノールAグルクロン酸抱合能に及ぼす妊娠の影響

ラット肝MRP2発現量は妊娠時に減少する。また以前の研究において、妊娠時にはラット肝ミクロゾームでのビスフェノールAグルクロン酸抱合能の低下が示されている。これらの点から、臓器レベルでの肝ビスフェノールAグルクロン酸抱合能は妊娠時に減退するとの仮説を立て、これを検証した。雌雄ラットを用いて肝灌流実験を行い、ビスフェノールA動態を比較したところ、雌雄共にビスフェノールAは肝組織中で高率にグルクロン酸抱合され、主として胆汁中に排泄されることが分かった。ビスフェノールAグルクロン酸抱合体の胆汁または静脈中への総排泄量は雌が雄を上回った。さらに、妊娠ラット肝を用いて肝灌流実験を行い、非妊娠雌ラットと比較したところ、妊娠時では非妊娠時に比べて胆汁側へのビスフェノールA排泄量が約2分の1に低下した。一方、代償的に静脈側へのグルクロン酸抱合体排泄量は非妊娠時の約3倍に増加した。妊娠ラット肝におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合体の胆汁または静脈中への総排泄量は、わずかに非妊娠雌ラットを下回った。以上の結果、妊娠時には胆汁中へのビスフェノールAグルクロン酸抱合体排泄量が減少し、代償的に静脈中への排泄量が増すことが分かった。

以上をまとめると、ラットにおいてビスフェノールAは腸および肝において高率にグルクロン酸抱合されることが分かった。生成されたグルクロン酸抱合体のうち、腸管で粘膜側に排泄されたものと、肝で胆汁中に排泄されたものは共に糞中に、また腸管で漿膜側に排泄されたものと、肝で静脈側に排泄されたものは共に血液を介して腎臓から尿中に排泄されることが推察された。しかし、肝ビスフェノールAグルクロン酸抱合体動態は、妊娠時において大きく変調し、妊娠時には血中を巡るビスフェノールAグルクロン酸抱合体量が増加することが考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 村 守
副 査 教 授 坂 口 和 靖
副 査 教 授 矢 澤 道 生
副 査 教 授 斉 藤 昌 之 (獣医学研究科)

学位論文題名

Detoxification of Bisphenol A, an Environmental Estrogen, by Glucuronidation Reaction in the Rat Hepatointestine

(ラット肝および腸における、環境エストロジェンビスフェノールAの
グルクロン酸抱合による解毒代謝)

本論文は、内分泌攪乱物質の一つであるポリカボネート系樹脂原料のビスフェノールAの生体内解毒機構の解明を目指し、グルクロン酸抱合を主軸に定め、ラット肝および腸におけるビスフェノールA代謝・動態について検討した結果の報告である。

1. ラット腸管におけるビスフェノールAの吸収とグルクロン酸抱合

多くの薬物は腸管において吸収される。本研究では、まず吸収臓器である腸管に焦点を絞り、ビスフェノールAの吸収とグルクロン酸抱合による代謝について調べた。4等分したラット空回腸および結腸を用いて反転腸管を作成し、腸管の粘膜側にビスフェノールAを添加したところ、腸管のいずれの部位でもビスフェノールAの腸管組織中への吸収が認められた。腸管に吸収されたビスフェノールAのほとんどは組織中でグルクロン酸抱合され、腸管の粘膜側もしくは漿膜側に排泄された。ビスフェノールAグルクロン酸抱合体の粘膜側への排泄は空回腸に多く、結腸に少なかった。一方、漿膜側へのグルクロン酸抱合体の排泄は遠位消化管、特に結腸で多かった。反転腸管の粘膜側に適用するビスフェノールA濃度を増したところ、漿膜側に未抱合のビスフェノールAが検出された。未抱合ビスフェノールAの漿膜側への移送は特に結腸で顕著だった。以上の結果より、ラット腸管においてビスフェノールAは効率にグルクロン酸抱合され、近位消化管では粘膜側に、また遠位消化管では漿膜側に排泄されることが分かった。しかし、高濃度のビスフェノールA存在下ではビスフェノールAは腸壁を越えて血液中に移行することが明らかとなった。

2. ラット肝におけるビスフェノールAグルクロン酸抱合および抱合体動態

血液中に流入したビスフェノールAは門脈を経て肝臓に流入する。そこで、ラット肝灌流モデルを用いて、肝におけるビスフェノールA動態を調べた。ラット肝に門脈を介してビスフェノールAを灌流したところ、ほとんどのビスフェノールAは肝組織中に移行した。肝組織中に

移行したビスフェノール A は高率にグルクロン酸抱合され、静脈中の灌流液ならびに胆汁中に排泄された。ビスフェノール A グルクロン酸抱合体の排泄は特に胆汁中に多く認められた。ラット肝に灌流させたビスフェノール A 量を増加させたところ、胆汁側へのグルクロン酸抱合体排泄量がプラトーに達し、静脈側への排泄が代償的に増加した。これらの結果から、ラット肝においてビスフェノール A は高率にグルクロン酸抱合され、主として胆汁中に排泄されることが分かった。

3. ビスフェノール A グルクロン酸抱合体輸送における MRP2 の関与と妊娠への影響

多くの薬物グルクロン酸抱合体は multidrug resistance associated protein (MRP) によって輸送される。MRP ファミリーの一つ、MRP2 は肝細胞の胆管側膜や腸粘膜上皮細胞の刷子縁膜などに局在し、細胞内の薬物グルクロン酸抱合体を細胞外へと汲み出す。本研究でラット反転腸管および肝灌流実験で認められたビスフェノール A グルクロン酸抱合体の排泄方向の決定に、MRP2 が関与するか調べるべく、MRP2 欠損ラットである Eisai hyperbilirubinemic rat (EHBR) を用いた肝灌流実験を行った。EHBR 肝にビスフェノール A を流入させたところ、胆汁側へのビスフェノール A グルクロン酸抱合体排泄がほとんど消失し、静脈側への排泄が著明に増加した。このことから MRP2 はビスフェノール A の排泄に関与することが明らかとなった。次にラット肝 MRP2 発現量は妊娠時に減少しラット肝ミクロゾームでのビスフェノール A グルクロン酸抱合能の低下が示されている。申請者は、雌雄ラットを用いて肝灌流実験を行い、ビスフェノール A 動態を比較したところ、雌雄共にビスフェノール A は肝組織中で高率にグルクロン酸抱合され、主として胆汁中に排泄されることを示した。ビスフェノール A グルクロン酸抱合体の胆汁または静脈中への総排泄量は雌が雄を上回った。さらに、妊娠ラット肝を用いて肝灌流実験を行い、非妊娠雌ラットと比較したところ、妊娠時では非妊娠時に比べて胆汁側へのビスフェノール A 排泄量が約 2 分の 1 に低下した。一方、代償的に静脈側へのグルクロン酸抱合体排泄量は非妊娠時の約 3 倍に増加した。以上の結果、妊娠時には胆汁中へのビスフェノール A グルクロン酸抱合体排泄量が減少し、代償的に静脈中への排泄量が増すことが分かった。

以上の結果は、環境エストロゲンであるビスフェノール A の生体内解毒機構を明らかにしたもので、特に妊娠時の挙動は本物質の生体毒性を初めて生化学的な立場から示唆したものであり、北海道大学博士（理学）を授与される資格があるものと認める。