

総説

医用材料からのビスフェノール類の溶出

滑川 亘希

純真学園大学 保健医療学部 医療工学科

Elution of bisphenols from biomedical materials

Koki NAMEKAWA

Department of Medical Engineering, JUNSHIN GAKUEN University

要旨: ビスフェノール類は、プラスチックの原料として日用品や医用材料として広く用いられている。しかしながら外因性内分泌攪乱物質（環境ホルモン）の一つで女性ホルモン様作用があり、安全性が懸念されてきた。近年、ビスフェノール類が内分泌系に及ぼす影響についての研究が大きく発展し、ビスフェノール類に対する新たな核内受容体の発見や代替ビスフェノールの開発が行われてきた。本稿では、ビスフェノール類に関する近年の研究動向についてまとめ、さらに医用材料からのビスフェノール類の溶出・安全性について述べる。

キーワード: ビスフェノール A, ビスフェノール S, 核内受容体, 溶出, 医療材料

Abstract: Bisphenols are widely used as raw materials in plastics. Bisphenol exhibits hormone-like properties that raise concerns about its suitability in consumer products and medical devices. This paper discusses our current understanding of toxic and the hormone like properties of Bisphenol A, new Bisphenol analogue and Bisphenol S and elution from biomaterial devices.

Keyword: Bisphenol A, Bisphenol S, endocrine receptor, elution, biomaterial

はじめに

環境ホルモンとは、正式には外因性内分泌攪乱物質と呼ばれ、生体にホルモン作用を示す（または阻害する）化学物質である¹⁾。特に水中の環境ホルモンが魚介類やヒトに及ぼす影響が検討されてきた²⁾。その中でも代表的な物質の一つがビスフェノール A (Bisphenol A; BPA) である³⁾。BPA は特に強度の高いプラスチックの原料であり、食品容器や DVD などの日用品や医療機器の素材として広く用いられている。しかし、BPA はエストロゲン（女性ホルモン）様作用を引き起こす⁴⁾ことが知られており、また洗浄等で BPA がプラスチックから溶出することからこれまで多くの検討が行われてきた。さらに近年、BPA がエストロゲン受容体だけではなく、エストロゲン関連受容体ガンマ型にも強く結合することが明らかになった⁵⁾。このような背景から、「BPA フリー」の材料としてビスフェノール S (Bisphenol S;

BPS) が使用されつつある⁶⁾。さらに、BPS の安全性の知見も蓄積されてきた。本稿では、これまでの BPA および BPS のヒトへの毒性についての最近の知見をまとめ、さらに医用材料からの溶出について述べる。

1. ビスフェノールの性質と医用材料への応用

ビスフェノールは二つのヒドロキシフェニル基を有する化合物の総称である (図1)。最も広く知られている物質は、アセトンの基本骨格を持つ BPA [2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane] である。BPA を原料とするプラスチックの特徴は強度と安定性であり、特に耐熱性の高い材料が得られる。また加工性が良いことから、様々なポリカーボネートやポリスルホンの原料であり、医療分野では、容器（外装）や透析膜等に用いられる⁷⁾。

BPS [(4-hydroxyphenyl) sulfone] は三酸化硫黄を基本骨格を持つ化合物である。BPS の物理化

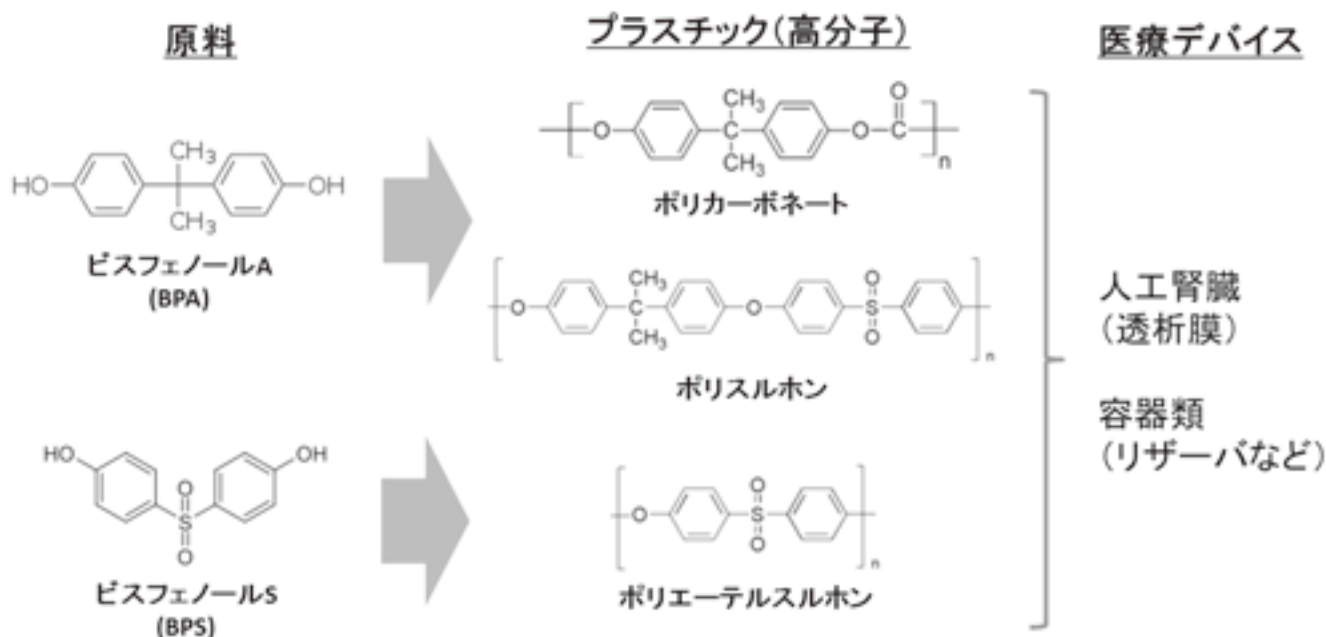


図1 ビスフェノール類の化学構造と医用材料への応用

学的性質はBPAよりやや安定である。これはBPSのS=O二重結合がBPAのC-C(C-H)結合よりも結合エネルギーが大きいためである。主にBPAの代替物として利用され、医療分野では透析膜(ポリエーテルスルホン)が有名である⁸⁾。

2. ビスフェノールAの毒性

環境ホルモンの評価法は、一般的に*in vitro/in silico*での実験として化学物質と受容体の結合能評価や、レポーター遺伝子アッセイやcDNAマイクロアレイといった遺伝子レベルの解析が行われる。一方、*in vivo*実験では形態変化や繁殖試験等の評価を用いる。

BPAはエストロゲン様作用を示すことが古くから知られており⁴⁾。詳細に研究なされてきた。以下に概要を述べる。

2.1 エストロゲン受容体との結合能

そこでBPAのエストロゲン受容体に対する結合試験が数多く行われ、いずれの報告においてもBPAはエストロゲン受容体に対する結合性を示した。しかしながら結合係数は、血清の影響や競争結合試験など条件にもよるが、 17β -エストラジオール(E2; 内分泌する女性ホルモンの一種)の $1/9900 \sim 1/15000$ である⁹⁻¹²⁾。

2.2 遺伝子発現

エストロゲンが標的細胞(子宮や乳腺など)内に入ると、あらかじめ熱ショックタンパク質(Hsp90)に結合しているエストロゲン受容体と複合体を形成する。この複合体は二量体化して核内に入り、DNA上のエストロゲン応答配列に作用する。さらに下流の転写制御因子を活性化させ、RNAポリメラーゼを活性化し、m-RNAを合成して遺伝子発現が起きる¹³⁾。(図2)

BPAの作用機序には、大きく分けて二つのパターンが考えられる。一つは、エストロゲンと構造や性質が類似するために遺伝子発現を誘導しエストロゲン様作用を示す(アゴニスト作用)。もう一つは、エストロゲン受容体との結合が不完全で遺伝子発現を誘導しない(あるいは低い)場合、エストロゲン量とBPAがエストロゲン受容体と競合するために、抗エストロゲン作用を示す(アンタゴニスト作用)。そこで二量体形成試験や遺伝子発現の解析が詳細に検討されてきた。

酵母ツーハイブリッドアッセイを用いたヒトエストロゲン受容体の二量体形成試験では、E2の $1/26000$ の二量体形成能を示した¹⁴⁾。エストロゲン受容体を導入した動物細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでもエストロゲン応答配列に依存した遺伝子の転写活性化を示した¹⁵⁻¹⁷⁾。さらに、

下流のプロモーター領域でも遺伝子の転写活性化を示した¹⁸⁻²⁰⁾.

これらの結果から、BPAはエストロゲン受容体に結合し、下流の遺伝子を発現するアゴニスト作用を示す。しかし、遺伝子発現の強度はE2の0.01%程度と極めて小さい。

2.3 哺乳動物の内分泌系

エストロゲン作用を検出する *in vivo* 試験として子宮増殖アッセイが行われてきた。雌のラットにBPAを三日間強制経口投与および皮下投与した子宮増殖アッセイにおいて、経口投与で160mg/kg/day以上の群、皮下投与では8mg/kg/day以上の群で子宮重量の増加が観察されている²¹⁾。さらに、雌のラット三日間皮下投与した子宮増殖アッセイでは、20mg/kg/day以上の群で子宮重量の増加が観察されている²²⁾。従って *in vivo* 試験でも内分泌系による毒性が明らかになった。

2.4 生殖発生

ラットを用いた一代試験 (F1)、二代試験 (F2) ではBPAの投与による生殖能に影響はなかった^{23, 24)}。三代試験では、500mg/kg/dayで全世代を通じて卵巣重量および全仔数と生存仔数の減少が認められた。50mg/kg/day以上で親動物に体重増加抑制、500mg/kg/dayで雌に腎臓と肝臓に軽微から軽度の変化が認められた²⁵⁾。ラット三代試験 (F3) での生殖発生毒性の有無有害作用

量 (No Observed Adverse Effect Level; NOAEL) は親動物の一般毒性で5mg/kg/day、生殖毒性に対しては50mg/kg/dayと推定されている²⁵⁾。

2.5 低用量効果

von Saalらは、BPAが従来の無作用量より低濃度でのみ毒性を有する、という「低用量効果 (仮説)」を提唱した²⁶⁾。マウスにBPA 0, 0.002, 0.02mg/kg/dayを強制経口投与した実験 (これは前述のNOAELよりも極めて低濃度) では、0.002mg/kg/day群で前立腺重量及び包皮腺重量の増加と精巣上体重量の減少、0.02mg/kg/day群で前立腺重量増加、精子生産率の低下が報告されている²⁷⁾。この報告に対し、0.002mg/kg/day群でみられた変化 (例えば包皮腺重量の増加) が0.02mg/kg/day群で観察されておらず、これまでの薬理学に反する結果であった。そのため、再現性を確認するため追試が実施されたが、低用量効果は観察されていない²⁸⁻²⁹⁾。また、*in vitro* 試験から、BPAのエストロゲン受容体への結合強度が非常に弱い点も指摘された。

このような議論を受け、専門サブパネルは「低用量のBPAが前立腺重量に影響を及ぼすとの証拠があるが、BPAの低用量作用は、現時点ではかなり限定的な実験条件下で観察される現象であり、普遍化した現象とは考え難い」との見解が示された³⁰⁻³¹⁾。

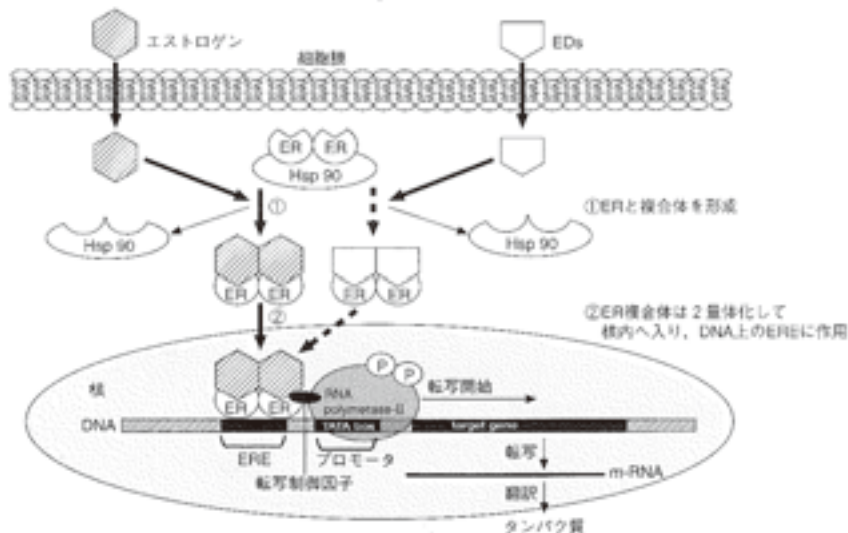


図2 エストロゲンの作用機序 文献13より引用

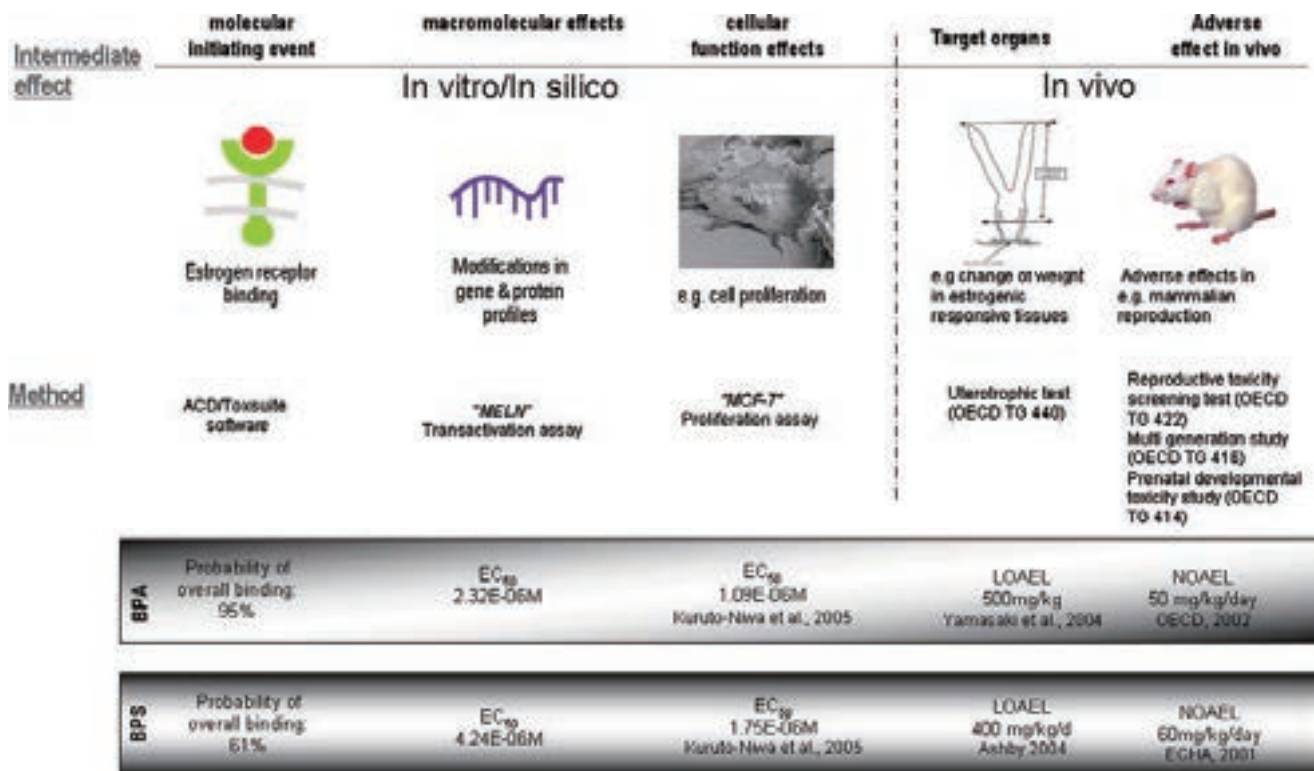


図3 BPA と BPS のエストロゲン様作用の比較 文献40より引用

2.6 エストロゲン関連受容体ガンマ型への結合

ヒトには48種類の核内受容体があり、そのうち女性ホルモンに関連するエストロゲン関連受容体は九種類存在する。そのうち三種類（ α 型、 β 型、 γ 型）は、エストロゲン関連受容体と呼ばれ、ホルモン無しで高い活性を示す（オーファン受容体）³²⁾。

エストロゲン関連受容体 γ 型へビスフェノールAが非常に強固に結合することが2007年に明らかになった³³⁾。解離定数は5.5nMで濃度に換算すると1.25ppbと非常に強固であり、低用量効果についての解明が期待された。

その後ERR- γ の機能について幅広く検討され、脳神経系の発達や乳がん、概日リズム等へ影響を及ぼすことが明らかになった³⁴⁻³⁹⁾。特に胎児の脳や胎盤にERR- γ が多く発現することが明らかになっている。

しかしながらERR- γ の天然リガンドは見つかっておらず、全貌は明らかではない。また、他の核内受容体との相互作用も示唆され、現在も分子生物学的アプローチから活発な研究が行われている。

3. ビスフェノールSの毒性

BPSは前述の通り、BPAの代替物として用いられ、特に日本では積極的に採用されてきた。そこでエストロゲン受容体への結合とエストロゲン様作用が検討された⁴⁰⁻⁴²⁾。In vitro, in vivoいずれの結果においてもBPSはBPAとほぼ同等かやや弱いエストロゲン様作用を示している（図3）。

ゼブラフィッシュを用いた研究では、血清中のエストロゲン・テストステロン（男性ホルモン）の低下や産卵量の低下など内分泌系攪乱を示唆する結果が報告されている⁴³⁾。2015年には、胚ゼブラフィッシュ（ヒト妊娠中期に相当）において神経発達障害を及ぼすことが報告され、さらにエストロゲン受容体ではなくアンドロゲン受容体（男性ホルモン受容体の一つ）との相関が示唆された⁴⁴⁾。同年には、BPAおよびBPSの内分泌攪乱活性のシステマティックレビューが報告され、BPSは20論文を評価した結果、BPAと同等レベルの内分泌攪乱活性（エストロゲン活性およびアンドロゲン活性を含む）を有すると結論付けられている⁴⁵⁾。

このように、直近五年間でBPSの毒性に関する

る知見は大きく発展した。一方で分子レベルでは未解明な点も多く、核内受容体同士のネットワークについても全貌は明らかではない。

4. ビスフェノール類の暴露評価

BPA, BPSともに様々な日用品の原料として用いられており、BPAについては暴露評価が行われてきた。日本人においては年齢にもよるが最大でも $1.1 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ と非常に低い水準⁴⁶⁾であり、BPAは経口摂取では肝臓で初回通過効果を受け、グルクロン酸抱合され、尿中へ24時間以内に放出される⁴⁷⁾。血中へ直接暴露した場合でも、代謝の速度は極めて速い。すなわち健常人に対しての健康被害は無いものと考えられている。

BPSはBPAと同様に尿中へ排出される。健常人の尿中においても検出され、特に日本では $1.67 \mu\text{g}/\text{day}/\text{person}$ であり、体重を考慮するとBPAの5%程度であった。日本は他国と比較して尿中排出量が最も多く、BPSの暴露があることも報告されている⁴⁸⁾。

毒性と暴露量を定量的に考慮すると、BPA, BPSともに非常に低い暴露量であり、健常人に対しての健康被害の可能性は極めて低い。

5 医用材料からの溶出

医用材料からの溶出は、急性期における治療ではNOAEL以上の暴露は想定されにくい。しかし、腎不全により代謝機能が失われている慢性維持透析患者に対してはBPA・BPSは体内に蓄積することから問題となる。また、化学構造内にフェノールを有するタンパク結合性尿毒素であり⁴⁹⁾、拡散・ろ過による通常の血液透析の除去率は極めて低い。そこで透析膜からのビスフェノールの溶出量と慢性維持透析患者の体内蓄積量が検討されてきた。

ポリスルホン膜やポリエステル系ポリマーアロイ膜といったBPAを原料に含む透析膜からは、一回の治療で $48\sim 140\text{ng}$ のBPAが体内へ暴露されている⁵⁰⁻⁵¹⁾。また、純水や生理食塩水に比較して血液はBPAを溶出させやすく、最大で 2000ng のBPAが溶出することも報告されている。ただし2001年の報告であり⁵²⁾、現在の透析器は溶出量が少ないことが想定される。

透析患者の血液中のBPA濃度は使用する透析

膜の種類に強く依存する。ポリスルホン膜とセルロース膜(BPA非含有)のクロスオーバー試験では、ポリスルホン膜使用時にBPAの血中濃度が $4\text{ng}/\text{mL}$ 以上まで増加する一方、セルロース膜では $2\text{ng}/\text{mL}$ 未満に抑えられることが示されている⁵⁰⁾。西ヨーロッパの透析患者(Stage 5;腎機能がほぼ無)では $10\text{ng}/\text{mL}$ 以上の体内蓄積の報告がある⁵¹⁾。また、ポリスルホン膜を用いた血液透析中にはポリエーテルスルホン膜に比して、炎症マーカーおよび酸化ストレスマーカーが高値を示しており、その原因の一つとしてBPAによるサイトカイン産生の誘導が示唆されている⁵³⁾。

透析患者に対するBPAの体内蓄積は、病態に直接影響を及ぼす程度の濃度ではないと考えられているが、炎症状態や酸化ストレスへの影響が示唆されている。また、BPSの体内蓄積への検討は進んでいない。

おわりに

ビスフェノール類は、その性質を活かし多くの材料に用いられている。化学構造の一部を変化させるだけで生体への影響が大きく異なる。現在は次世代ビスフェノールの開発が進んでおり(例えばビスフェノールAF)生体への影響が軽微な材料が期待される。

また、臨床現場においてもビスフェノール類の患者への体内侵入を抑制する技術が重要である。その一つとして洗浄法が挙げられ、今後の工夫が期待される。

本稿では、ビスフェノール類の毒性および医療材料からの溶出について概説した。遺伝子解析技術の発展に伴い、これまで解析が進んでこなかった複雑な生体システムについても分子レベルで評価が進んでいる。今後はこれらの知見を活かして、材料と臨床の両面で新たな医療技術が発展することを期待する。

参考文献

- 1) 立花隆, 環境ホルモン入門, 新潮社, 1998
- 2) A. Schecter et al, Polybrominated diphenyl ethers contamination of United States food, Environ. Sci. Technol. **38** 5306-5311, 2004
- 3) K. Pivnenko et al, Bisphenol A and its structural analogues

- in household waste paper. *Waste Management* **44**: 39–47. 2005
- 4) E.C. Dodds and W. Lawson, Synthetic Estrogenic Agents without the Phenanthrene Nucleus. *Nature* **137**: 996. 1936
 - 5) A. Matsumura et al, Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma, *J. Biochem.* **142**: 517–524, 2007
 - 6) Jenna Bilbrey, BPA-Free Plastic Containers May Be Just as Hazardous. *Scientific American*. Aug 11, 2014
 - 7) 石原一彦ら, バイオマテリアルサイエンス, 東京化学同人社, 2003
 - 8) 崎山亮一, 峰島三千男, 血液透析膜の変遷と展望, *人工臓器* **39** 77–80, 2010
 - 9) Sheeler et al, Environmental estrogens induce transcriptionally active estrogen receptor dimers in yeast: Activity potentiated by the coactivator RIP140. *Environ. Health Perspect.*, **108**, 97–103. 2000
 - 10) SC. Nagel, et al, Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ. Health Perspect.*, **105**, 70–76. 1997
 - 11) R.M. Blair et al, The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol. Sci.*, **54**, 138–153. 2000
 - 12) CERi (化学物質評価研究機構) 平成 12 年度経済産業省環境対応技術開発等委託調査研究, 環境ホルモン効果に関する評価・試験法開発報告書, 2001
 - 13) 大橋篤, 医療用プラスチック材料から溶出する環境ホルモン, *Clinical Engineering* **15** 842–852, 2004
 - 14) R. Steinmetz et al, The Environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo, *Endocrinology*, **138**, 1780–1786 1997
 - 15) J. Legler, et al, Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* **48**, 55–66, 1999
 - 16) N.G Coldham et al, Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ. Health Perspect.*, **105** 734–742. 1997
 - 17) K.W. Gaido et al, Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **143**, 205–212. 1997
 - 18) T. Nishihara, et al, Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J. Health Sci.*, **46**, 282–298. 2000
 - 19) R. Steinmetz et al, The Environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo, *Endocrinology*, **138**, 1780–1786 1997
 - 20) M. Jorgensen et al, Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. *Environ. Health Perspect.*, **108**, 403–412, 2000
 - 21) P. Diel et al, Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **73**, 1–10. 2000
 - 22) K. Yamasaki et al, Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A. *Environ. Health Perspect.*, **108**, 1147–1150. 2000
 - 23) K. Yamasaki et al, Comparison of Reporter Gene Assay and Immature Rat Uterotrophic Assay of Twenty-three Chemicals. *Toxicology*, **170**, 21–30, 2001
 - 24) M. Ema et al, Rat two-generation reproductive toxicity study of bisphenol A. *Reprod. Toxicol.*, **15**, 505–523, 2001
 - 25) R.W. Tyl et al, Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague–Dawley rats. *Toxicol. Sci.* **68**, 121–146, 2002
 - 26) vom Saal FS and C. Hughes, An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect.* **113** 926–933, 2005
 - 27) vom Saal FS. et al, 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, 1998
 - 28) J. Ashby et al, Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in vitro. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 156–166. 1999
 - 29) S.Z. Cagen et al, Normal reproductive organ development in Wistar rats exposed to bisphenol A in the drinking water. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 130–139, 1999
 - 30) NTP, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, 9th Report on Carcinogens, 2000
 - 31) 経済産業省, ビスフェノール A の有害性評価, www.meti.go.jp/report/downloadfiles/g20515b15j.pdf (2015 年 9 月 30 日閲覧)
 - 32) 本郷利憲ら, 標準生理学, 第六版, 2005
 - 33) A. Matsumura et al, Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma, *J. Biochem.* **142**: 517–524, 2007
 - 34) N. Ijichi, et al, Estrogen-related receptor α modulates the expression of adipogenesis-related genes during adipocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **358**: 813–818 2007
 - 35) M. Kubo et al, Modulation of adipogenesis-related gene expression by estrogen-related receptor γ during adipocytic

- differentiation. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 71–77 2009
- 36) H. Okada et al, Direct evidence revealing structural elements essential for the high binding ability of bisphenol A to human estrogen-related receptor-gamma. *Environ Health Perspect* **116**, 32–38 2008
- 37) XY Qin, et al, Individual variation of the genetic response to bisphenol a in human foreskin fibroblast cells derived from cryptorchidism and hypospadias patients. *PLoS One* **7**, e52756 2012
- 38) T Nose et al, Exploration of endocrine disrupting chemicals on estrogen receptor alpha by the agonist/antagonist differential-docking screening method, *Toxicology let* **191** 33–39, 2009
- 39) Y. Takeda et al, Placenta expressing the greatest quantity of bisphenol A receptor ERR-gamma among the human reproductive tissues: Predominant expression of type-1 ERR-gamma isoform. *J. Biochem.* **146** (1): 113–122, 2009
- 40) E. Grignard, et al, Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S, *Toxicol in vitro* **26**, 727–731 2012
- 41) R.Kuruto-Niwa, *et al.* Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **19**, 121–130, 2005
- 42) R.W. Tyl et al, Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol. Sci.* **104**, 362–384 2008
- 43) K. Ji *et al*, Effects of Bisphenol S Exposure on Endocrine Functions and Reproduction of Zebrafish, *Environ Sci Technol* **47**, 8793–8800, 2013
- 44) C.D. Kinch et al, Low-dose exposure to bisphenol A and replacement bisphenol S induces precocious hypothalamic neurogenesis in embryonic zebrafish, *Proc Nat Acad Sci* **112** 1475–1480, 2015
- 45) J.R. Rochester and A.L. Bolden, Bisphenol S and F: A systematic Review and Comparison of the Hormonal Activity of Bisphenol A Substitutes, *Environ Health Perspect* **123**, 643–650, 2015
- 46) 産業技術総合研究所, 詳細リスク評価書ビスフェノール A, 2005
- 47) M. Suiko et al, Sulfation of environmental estrogen-like chemicals by human cytosolic sulfotransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 80–84, 2000
- 48) C. Liao et al, Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures, *Environ Sci Technol* **46**, 6860–6866, 2012
- 49) R. Vanholder, et al, A bench to bedside view of uremic toxins, *J Am Soc Nephrol*, **19**, 863–870, 2008
- 50) K. Murakami, et al, Accumulation of bisphenol A in hemodialysis patients, *Blood Purif* **25** 290–294, 2007
- 51) D.H.Krieter, *et al*, Bisphenol A in chronic kidney disease, *Artif Organs*, **37** 283–290, 2013
- 52) Y. Haishima, *et al*, Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins, *J Biomed Mater Res*, **58**, 209–215, 2001
- 53) Enrique Bosch-Panadero, *et al*, The Choice of Hemodialysis Membrane Affects Bisphenol A Levels in Blood, *J Am Soc Nepro* (early view; DOI: 10.1681/ASN.2015030312)