

分担研究報告要旨

ビスフェノールA, ゲニステインの胎仔期暴露の雄性生殖機能への影響評価

分担研究者 東京理科大学薬学部 武田 健

研究要旨

ビスフェノールAは経口投与1時間後には胎仔に相当量移行（母親血漿中濃度の約3分の1）することが明らかになった。時間の経過とともに母親血漿中のビスフェノールAは著しく低下したが、胎仔組織は高い濃度を維持した。ビスフェノールAはライディッチ細胞のテストステロン産生には影響を及ぼさなかった。ゲニステインの妊娠期経口投与により、生後2週の精巣において黄体形成ホルモン(LH)やアンドロゲンなどのホルモン受容体 mRNA の発現が亢進した。

研究協力者：田畑真佐子  
東京理科大学薬学部助手

A. 研究目的

ビスフェノールA, ゲニステインの胎仔期暴露のラット雄性生殖系への影響を明らかにすることを目的とした。特にテストステロン産生、性ホルモン代謝や作用に関わる遺伝子の発現変動に注目した。

B. 研究方法

妊娠ラット（ウイスター系）にビスフェノールAを経口投与し、胎仔への移行を調べた。ビスフェノールAの定量はGC/MSで行った。胎仔全組織を塩酸酸性メタノール中でホモジナイズした後遠心分離し、ビスフェノールAを抽出し

た。抽出液をn-hexaneで脱脂後、上清を除いた溶液に0.01N HClでメタノール含量を約15%になるように希釈し、固相カートリッジ GL-Pak PLS-2 で濃縮した。固相に吸着したビスフェノールAをメタノールで溶出し、溶媒を留去後、無水酢酸-ピリジンによりアセチル誘導体化した。その溶液を塩酸酸性下でトルエン抽出し、濃縮乾固した後、用時内部標準物質（d10-フルオランテン）を加えGC/MS-SIMで分析をした。母親ラット血漿については塩酸酸性として固相抽出し、上記に準じて分析した。

生まれた仔の精巣を摘出し、雄性生殖系に現れる変化を組織学的にまた生化学的に検討した。*in vitro*培養系で精巣ライディッチ細胞のテストステロン産生系を確立し、ビスフェノールA, ゲニステイン, その他化合物の影響を検討した。性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現をRT-PCR及びプリズムシークエンスディテクターで測定した。ゲニステイン妊娠期摂取の胎仔への影響の実験は国立健康・栄養研究所池上幸江部長との共同研究で行ったもので、妊娠5日目からゲニステインを含むイソフラボン飼料（イソフラボン 500 mg/kg diet, 及び

[略語]

LH, 黄体形成ホルモン; GC/MS, ガスクロマトグラフ/質量分析法; GC/MS-SIM, ガスクロマトグラフ/質量分析法-選択イオン検出; RT-PCR, 逆転写-複製連鎖反応; 3 $\beta$ -HSD, 3 $\beta$ -ヒドロキシルステロイド脱水素酵素 $\Delta^5$ - $\Delta^4$ 異性化酵素

1,000 mg/kg diet) で飼育された生後2週の子の精巣を供与して戴き、組織学的検討と性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現の検討を行った。

### C. 研究結果及び考察

#### 1. ビスフェノールAの胎仔への移行

妊娠19日齢のラットにビスフェノールA (10 mg/kg 体重) を経口投与した結果、1時間後母親ラット血漿中では約33 ppb、胎仔では約12 ppbのビスフェノールAが認められた。母親ラット血漿中のビスフェノールAは時間の経過とともに著しく低下したが、胎仔では余り変化せず、24時間後でも9 ppb存在した。母親のエストロゲンは血液—胎盤関門をほとんど通過しないと言われているが、かなりの量のビスフェノールAが胎仔に移行したことは、この関門通過においてエストロゲンとは異なる性質を有することが示唆された。また一旦胎仔に移行したビスフェノールAはなかなかクリアランスされないことが示唆された。なお妊娠12日齢のラットにもビスフェノールAを投与する実験を行い、1時間後には妊娠19日齢と同じように胎仔に移行することを確認している。

#### 2. ビスフェノールAの胎仔雄性生殖系への影響 (解析中)

妊娠期 (12日齢から7日間) にビスフェノールA (2  $\mu$ g/kg 体重) を経口投与したラット仔の雄性生殖機能への影響を検討中である。即ち、1日精子産生能、組織学的検討、性ホルモン合成酵素及びホルモン受容体 mRNA の発現を検討中である。

#### 3. ビスフェノールAの *in vitro* 精巣培養細胞系への影響

*in vitro* の精巣ライディッチ細胞テストステロン産生アッセイ系を確立し、ビスフェノールAの影響を検討した。ビスフェノールAはテス

トステロンの産生には影響を与えなかった。この実験系では発がんプロモーターのオカダ酸が低濃度でテストステロンの産生を抑制することが明らかになった。

#### 4. ゲニステイン妊娠期摂取の児雄性生殖系への影響

ゲニステイン (イソフラボン 500 mg/kg diet) の妊娠期投与により、生後2週の子の精巣においてLH やアンドロゲンなどホルモン受容体 mRNA の発現が2~4倍亢進することが明らかになった。生化学的解析と並行して組織学的検討を行っているが、出生間もない精巣ではコントロールにもアポトーシス細胞が観察されるなど、被験試薬の影響についてははっきりした結論を出すにはもう少し時間をかける必要がある。(国立健康・栄養研究所池上幸江部長との共同研究である)

#### 5. ゲニステインの *in vitro* 精巣培養細胞系への影響

ゲニステインは *in vitro* 精巣ライディッチ細胞培養系でテストステロン合成酵素3 $\beta$ -HSDの発現を抑制した。ゲニステインは $\beta$ 型のエストロゲンレセプターを刺激したり、チロシンキナーゼを阻害するなど多様な活性を持つことが予想され、雄性生殖系に対する影響も単純ではなさそうである。今後この点を詳細に検討していきたい。

### E. 今後の展望

ビスフェノールAは妊娠ラットに経口投与すると、速やかに相当量胎仔に移行することが明らかになった。今後、1週間、1ヶ月という長時間に渡って胎仔組織のビスフェノールAの濃度変化を調べる必要がある。しかし、ビスフェノールAは今のところ雄性生殖系にはっきりした影響は認められていない。現在、妊娠期に低濃度ビスフェノールA連続1週間経口投与した児の精巣ホルモン代謝系への影響を解析していると

ころであり、その結果を待って総合的に判断したい。

一方、ゲニステインはテストステロン合成酵素、ホルモン受容体の発現に影響を与える可能性が示唆されたので、今後この点をさらに詳細に検討していきたい。

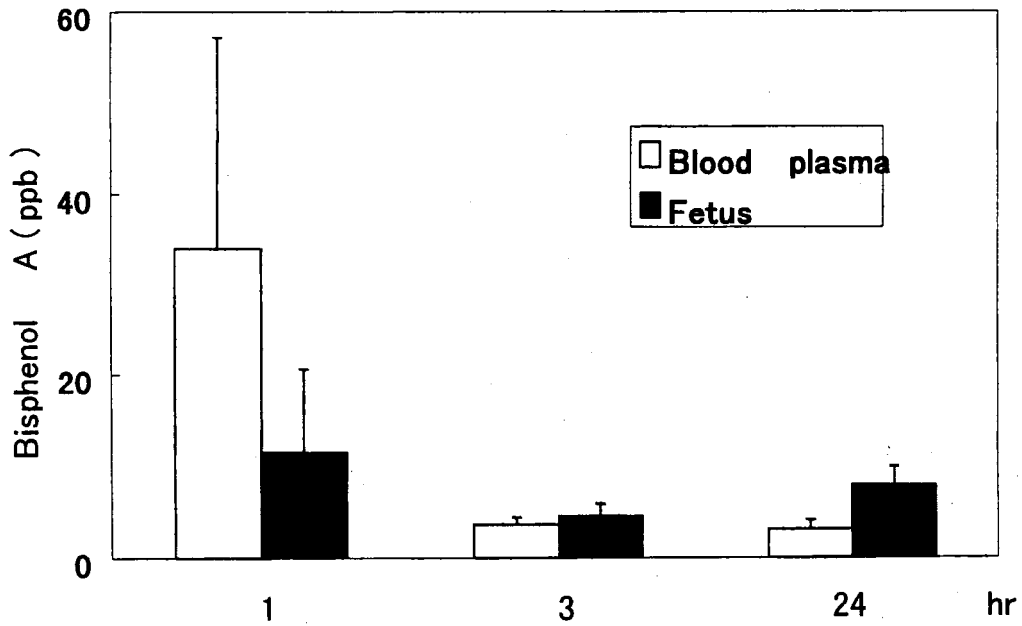
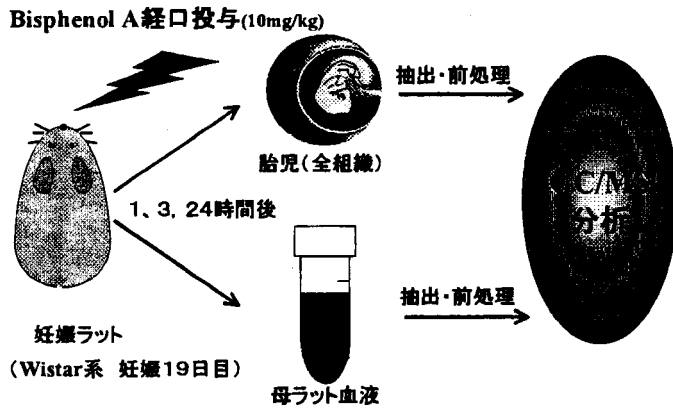


図1 妊娠期経口投与したビスフェノールAの胎児(胎仔)への移行 (n=5~7)