

## 内分泌かく乱物質による精巣内ホルモン環境、精子形成能、受精能に関する研究

分担研究者 小林 真一 聖マリアンナ医科大学 教授

研究協力者 田中 政巳 聖マリアンナ医科大学 講師

研究協力者 栗林 靖 聖マリアンナ医科大学 講師

研究協力者 野澤資亜利 聖マリアンナ医科大学 助手

**研究要旨** ビスフェノールA母体経由暴露による周産期および成熟雄のステロイド代謝酵素やゴナドトロピン受容体等への影響について検討した。ラットとマウスに、ビスフェノールA 0.2および20 µg/ml を妊娠1日より出生後21日まで母体に飲水投与した。ラットビスフェノールA 20 µg/ml群の妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。またマウスビスフェノールA 0.2および20 µg/ml群の出生10週における血清中テストステロン濃度と精巣、前立腺、貯精嚢および凝固腺重量は対照と有意な差はなく、ビスフェノールA 20 µg/ml群の出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。また、ビスフェノールAを投与した雌から生まれた雄マウスの産仔を性成熟期まで生育させ、その精子濃度、精子運動率を検査したところ、0.2および20 µg/ml群ともに対照群との間に有意差を認めなかった。

## A. 研究目的

## I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

精子形成にはホルモンの存在が必須でありゴナドトロピン (FSH, LH) およびテストステロンが独立にあるいは協調して作用する。セルトリ細胞でつくられるアンドロゲン結合蛋白はライディヒ細胞で産生・分泌されたテストステロンを精路において高濃度に保つのに作用し、精子の成熟に働くテストステロンの作用を高めている。正常な精子形成がおこなわれるためには性成熟期においてテストステロンとゴナドトロピンおよびその受容体が正常に発現することが必要である。

脳や生殖器の性分化は胎児精巣由来のテストステロンに依存している。ヒトでは胎齢8週頃、ラットでは胎齢15日頃から胎児精巣に形成されるライディヒ細胞から分泌されるテストステロンへの暴露

によって雄型に誘導され、暴露されなければ雌型へ誘導される。またラット血清テストステロン濃度は出生直後に、LH受容体mRNAの発現は出生直前にピークを示し、これらは脳の性分化や生殖器の発達・分化に関わると考えられている。従って胎児期や新生仔期におけるホルモン環境、ことにテストステロン作用の乱れは性分化の異常を誘導し、成熟後の生殖器に不可逆的な変化を引き起こすと考えられる。近年不安視されている精子の量的・質的低下も母体経由で暴露された内分泌かく乱物質による胎児期や新生仔期の精巣ホルモン環境のかく乱が原因となる可能性が考えられ、本研究では内分泌かく乱物質の母体経由暴露による胎児期および新生仔期精巣のテストステロン産生とその関連調節因子への影響を検討する。10年度は内分泌かく乱物質としてビスフェノールAをラットおよびマウス

に投与し、周産期および成熟後のステロイド代謝酵素やゴナドトロピン受容体への影響について予備的検討をおこなった。

## II. 受精能への影響

内分泌かく乱物質の母体経路暴露における雄性生殖機能への影響を検討することを目的とする。10年度はビスフェノールAを投与した母マウスから生まれた雄マウスの精子濃度、精子運動率を検査するとともに、体外受精や顕微鏡受精による受精率と発生率を求めるための予備的検討を行った。

## B. 研究方法

### I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

SD系ラットとICR/MCH系マウスを用い、ビスフェノールA 0.2および20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ を妊娠1日（膈プラグ確認日）より出生後21日まで母体に飲水投与した。現在、ラット妊娠19、21日胎児雄と出生1、3日とマウス出生10週雄の血液と精巣をサンプリング中である。血清中テストステロン濃度と精巣のステロイド代謝酵素、FSH受容体、LH受容体、アンドロゲン結合蛋白およびインヒビンのmRNAの発現をRT-PCR法により調べている。

### II. 受精能への影響

上記の条件でビスフェノールAを投与したICR/MCH系マウスを用いた。10週齢以降の雄マウスの精巣上部より回収した精子を37°C、5%CO<sub>2</sub> in air中で30分巻培養した後、その精子濃度と運動率を血球計算盤にて二検者により3回ずつ測定した。また、マウスの顕微受精のための装置の設定を行い、顕微受精技術の基礎的検討として、未受精卵への精子の注入とその後の胚発生を確認した。

## C. 研究結果

### I. 精巣内ホルモン環境、精子形成能への影響

#### 【ラット】

ビスフェノールA20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群において妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素（P450scc, 3 $\beta$ -HSD, P450c17, 17 $\beta$ -HSD）とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。出生1日精巣における

17 $\beta$ -HSDとLH受容体のmRNAの発現も対照と差はなかった。

#### 【マウス】

ビスフェノールA 0.2および20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群において出生10週における血清中テストステロン濃度（図1）と精巣、前立腺、貯精囊および凝固腺重量（表1）は対照と有意な差はなかった。またビスフェノールA 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群において出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素（P450scc, 3 $\beta$ -HSD, P450c17）、LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。

以上の結果は、胎児期から授乳期におけるビスフェノールA 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の母体経路の暴露は妊娠19日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現には影響しないことを示唆している。しかし今回よりも低濃度のビスフェノールAの母体経路暴露によって成熟後のラットの精子産生が抑制されることが報告されており、今回調べた因子以外の変動を介して精子産生が抑制される可能性も考えられる。また周産期のテストステロン濃度やLH受容体mRNAの発現は著しく変動することから、周産期の他の時期におけるステロイド代謝酵素やLH受容体のmRNAの発現等への影響を明らかにする必要がある。

### II. 受精能への影響

ビスフェノールA 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群(A) 4匹、0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 群(B) 4匹、対照群(C) 5匹について体重、左右精巣重量、精子濃度、精子運動率を検査した。体重はA群37  $\pm$  1.4g（平均値  $\pm$  SD、以下同様）、B群39  $\pm$  4.2g、C群33.5  $\pm$  2.3g、左右精巣重量は、A群101.5  $\pm$  12.33mg, 105.2  $\pm$  11.43mg, B群95.2  $\pm$  7.34mg, 98.5  $\pm$  9.01mg, C群90.2  $\pm$  15.65mg, 94.7  $\pm$  16.14mg、精子濃度は、A群28.8  $\pm$  19.73  $\times 10^5/\text{ml}$ 、B群30.1  $\pm$  19.37  $\times 10^5/\text{ml}$ 、C群25.6  $\pm$  9.14  $\times 10^5/\text{ml}$ 、精子運動率は、A群53.8  $\pm$  6.97%、B群46.8  $\pm$  20.72%、C群48.5  $\pm$  14.69%であった。各群間における各parameterにおける有意差は認めなかった。

顕微受精の準備状況については、採卵数やそのquality、セッティングした

injection pipetteの状況により差が出るものの、その後の胚発生を確認するまでにいたっている。

#### D. 考察

10年度の研究から胎児期から授乳期におけるビスフェノールA 20 µg/ml以下の母体経由の暴露は妊娠19日および成熟後の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体、アンドロゲン結合蛋白およびインヒビンmRNAの発現には影響しないことが示唆されたが、周産期を通じてのステロイド代謝酵素やLH受容体mRNAの発現等への影響を確認することが必要であり現在サンプリング中である。特に周産期の血清中テストステロン濃度は出生2時間後に急峻なピークを示して性分化に重要な役割を担い、また精巣のテストステロン産生を刺激するLHの受容体mRNAの発現は出生前日にピークを示すことが知られており、内分泌かく乱物質暴露による周産期のテストステロン産生やLH受容体への影響を明らかにするために、周産期をさらに細分しての検討も今後行う計画である。また今回調べていない因子（アンドロゲンレセプター、5α-レダクターゼ等）、組織（精巣上体、下垂体等）および内分泌かく乱物質（スチレン、ノニルフェノール等）の検討も実施する。

受精能に関する検討においては、引き続き顕微受精による検討を進めるとともに、体外受精により発生した胚を胚移植し産仔を得る系を確立する予定である。

また、蛍光プレラベル化剤を用いた液体高速クロマトグラフによる高感度測定法を応用して、母体に投与したビスフェノールAの胎児、新生仔への移行を検討する。

#### E. 結論

ラットとマウスに、ビスフェノールA 0.2および20 µg/mlを妊娠1日より出生後21日まで母体に飲水投与した。ラットビスフェノールA 20 µg/ml群の妊娠19日胎児精巣におけるステロイド代謝酵素とLH受容体のmRNAの発現は対照と差はなかった。またマウスビスフェノールA

0.2および20 µg/ml群の出生10週における血清中テストステロン濃度と精巣、前立腺、貯精囊および凝固腺重量は対照と有意な差はなく、ビスフェノールA 20 µg/ml群の出生10週の精巣におけるステロイド代謝酵素、LH受容体およびインヒビンのmRNAの発現は対照と差はなかった。また、ビスフェノールAを投与した雌から生まれた雄マウスの産仔を性成熟期まで生育させ、その精子濃度、精子運動率を検査したところ、0.2および20 µg/ml群ともに対照群との間に有意差を認めなかった。

#### F. 研究発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

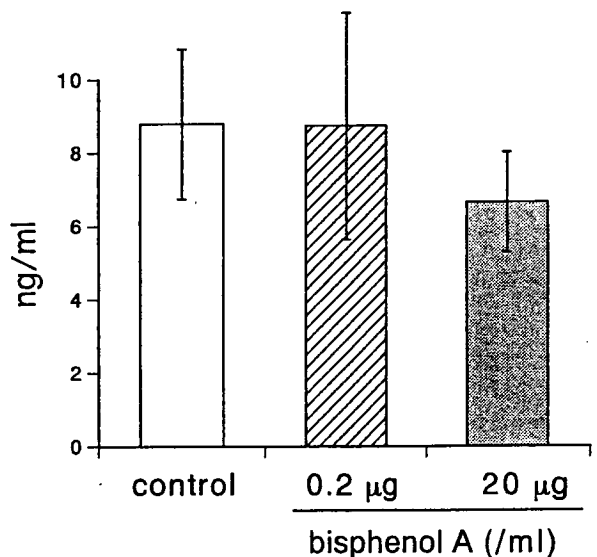


図1. ビスフェノールA投与群マウス(10週)における血清中テストステロン濃度

表1. ビスフェノール投与群マウス(10週)の体重および臓器重量

bisphenol A ( $\mu\text{g/ml}$ )	body (g)	testis	prostate	coagulating g.	seminal v.
		(mg/20g BW)			
control	37.1 $\pm$ 0.6	134.1 $\pm$ 3.4	6.2 $\pm$ 0.3	13.6 $\pm$ 0.5	43.1 $\pm$ 2.3
0.2	36.0 $\pm$ 0.3	128.0 $\pm$ 5.5	6.9 $\pm$ 0.5	12.1 $\pm$ 0.4	41.1 $\pm$ 2.0
20	36.4 $\pm$ 0.2	126.7 $\pm$ 3.6	5.3 $\pm$ 0.4	14.2 $\pm$ 1.1	44.7 $\pm$ 2.4