

研究要旨：

ビスフェノール A (BPA)あるいはエストラジオールベンゾエート(EB)をラットの新生児期に皮下投与し、成熟後の視床下部神経核、特に雄の性的二型核の構造変化と生殖機能障害性の有無を交尾行動および授胎能実験により確認した。その結果、BPA 群ではいずれの生殖関連指標にも投与の影響は認められなかったが、EB 群では性的二型核の体積が対照群の 35%に減少し、交尾行動の減弱ならびに授胎能の低下がみられ、性的二型核が生殖機能に関連していることが示唆された。

A. 研究目的

内分泌かく乱化学物質の胎生期あるいは新生児期曝露による CNS 障害に起因した生殖機能障害を明らかにすることを目的とした。すなわち、ラットを用いて、経胎盤的に、または血液－脳関門あるいは血液－精巣関門が完成していない新生児期に、内分泌かく乱作用が報告されている数種の化学物質を連日投与し、胎児あるいは新生児視床下部のアポトーシス誘発ならびに成熟後の視床下部神経核 SDN-POA あるいは AVPVN-POA の構造変化を調べ、次いで、交尾行動の観察および精子検査を含む受（授）胎能の確認ならびに性ホルモン濃度測定を実施し、併せて生殖器官の病理組織学的観察を行う。これらの結果を併せて視床下部神経核の構造変化が、後の生殖機能とどのように影響を及ぼすかを検討し、胎児期ならびに新生児期の視床下部神経核の構造変化が、内分泌かく乱作用を有する化学物質の生殖への影響のスクリーニングのための一つの指標となり得るかについて検討する。

B. 研究方法

今年度は予備的検討として、内分泌かく乱作用が報告されている化学物質 bisphenol A をラットの新生児期に投与し、成熟後の SDN-POA の構造変化と生殖機能障害性の有無を交尾行動の観察ならびに授胎能実験を実施した。さらに内分泌かく乱作用を有する数種の化学物質の生殖機能障害性についても併せて予備検討した。

Sprague-Dawley 系ラット(CD, IGS)を自然分娩させ、出生日（生後 0 日）翌日より 5 日間毎日、bisphenol A (BPA) 300 µg/g 体重あるいは estradiol benzoate (EB) 2µg/g 体重を皮下投与した。対照群にはコーン油 (2 µL/g) を投与した。生後 21 日に離乳させ、各群雌雄各 5 匹の出生児を灌流固定して生殖器官（精巣、精巣上体、精囊、前立腺）を病理組織学的に観察した。残りの出生児は 10 週齢時に無処置雌雄動物と同居させ、受（授）胎能の有無を確認するとともに、雄については交尾行動を観察した。14 週齢時に剖検し、生殖器官の病理組織学的観察ならびに重量測定を行った。

授胎能の有無の確認後、各群の雄について

交尾行動（性行動）を観察し、生殖機能を再度確認した。すなわち、性ホルモン処理して発情させた雌（卵巢摘出雌に 0.5 mg progesterone / animal、2 µg estradiol benzoate / animal 投与）と同居させ、その間、交尾行動（mount、intromission、ejaculation までの時間ならびにその回数）を観察した。

2. 内分泌かく乱作用が報告されている数種の化学物質、estradiol 17β (E₂)、estriol (E₃)、ethynyl estradiol (EE)、buthyl benzyl phthalate (BBP)、nonylphenol (NP)あるいは tamoxifen (TAM)の生後 1～5 日のラット新生児期投与による成熟後の生殖機能に及ぼす影響について予備的に検討した。すなわち、E₂ 2 µg/g (sc)、E₃ 2 µg/g (sc)、EE 2 µg/g (po)、BBP 500 µg/g (sc)、NP 500 µg/g (sc)あるいは TAM 20 µg/g (sc)を生後 1～5 日に 1 日 1 回、連日投与し、性周期、受胎能、交尾行動、精子運動性ならびに生殖器官の病理組織学的変化について調べた。

C. 研究結果および考察

1. 生後 1～5 日の投与期間中に新生児の死亡はなく、離乳までの生存率は BPA 群ならびに EB 群とも対照群と同レベルであった。さらに離乳後も BPA 群、EB 群の雌雄動物に死亡例はなかった。生後発育に関しては、EB 群の雌雄とも体重が投与期間終了から 14 週齢まで対照群と比較して低値で推移したが、BPA 群の体重増加は対照群と同レベルであった。歯牙萌出、皮膚毛生、眼瞼開裂など一般分化の完成時期には BPA あるいは EB 投与の影響はみられなかったが、性成熟に関しては、EB 群の雄では精巣下降および包皮分離の時期が遅延し、雌では膈開口の時期が早まった。BPA 群の性成熟の時期は、雌雄と

も対照群と差はなかった。BPA 群では、交尾率 [B/A] および受胎率 [C/B] には対照群との間に有意差はなく、さらに妊娠雌の 1 腹平均の生存胚数も対照レベルであった。一方、EB 群では雌雄の全例が 2 週間の同居期間中に交尾しなかった。さらに EB 群の雌を生殖能力の確認されている対照群の雄と、EB 群の雄を無処置雌動物と再度同居させたが、いずれも交尾は成立しなかった。

生後 21 日の離乳時および 14 週齢時に各群の雌雄について生殖器官の病理組織学的観察を実施した結果、EB 群の雄の生後 21 日では、精細管委縮が観察されたが、EB 群の雌および BPA 群の雌雄に組織学的変化は観察されなかった。14 週齢では、EB 群の雄に精細管委縮、精巣上体管腔内に生殖細胞残屑、前立腺および精囊にリンパ球を主体とする炎症細胞浸潤が、雌に多核卵母細胞が観察されたが、BPA 群の雌雄には変化は認められなかった。EB 群では精巣および精巣上体の重量ならびに比体重値が対照群と比較して有意に低値を示したが、EB 群の脳、BPA 群の精巣、精巣上体および脳の重量はいずれも対照群と差は認められなかった。

受胎能確認の後、雄の脳を摘出してホルマリン固定後、視床下部神経核（性的二型核：SDN-POA）を含む組織切片を作成して thionin で染色し、観察した。その結果、EB 群では SDN-POA の体積は対照群と比較して著しく縮小したが、BPA 群の SDN-POA は対照レベルであった。以上のことから、BPA 300 µg/g をラットの新生児期の早期に連日皮下投与しても、成熟後の生殖機能ならびに視床下部神経核の構造に影響はないことが明らかになった。しかし、EB 2 µg/g の新生児期の早期投与では、雄の生殖器官の発達が

比較的早期に障害され、成熟後の生殖機能ならびに視床下部神経核の構造にも変化が及ぶことが確認された。

2. いずれの化学物質投与群においても投与期間中に新生児死亡はなく、離乳までの生存率ならびに離乳後の生存率には、投与群と対照群との間に有意差は認められなかった。生後発育に関しては、EE 群、NP 群および TAM 群の体重増加が投与期間終了から抑制され、14 週齢まで対照群と比較して有意に低値で推移した。7 週齢より交尾成立まで性周期を観察した結果、BBP 群ではほぼ正常に回帰したが、EE 群、E₂ 群、E₃ 群では規則的に性周期は回帰しなかった（連続発情を示す傾向）。TAM 群では性周期を回帰する時期が遅延した。BBP 投与には生殖能力に及ぼす影響はみられず、交尾率ならびに受胎率はいずれも対照群と同レベルであった。E₂ 群では著しい交尾率の低下がみられ、さらに交尾成立雌の全例が受胎しなかった。E₃ 群では全例に交尾がみられたが、受胎率の有意な低下がみられた。NP 群においても有意な交尾率および受胎率の低下がみられた。EE 群および TAM 群では全例が交尾しなかった。交尾しなかった雄について、無処置雌と 1 週間を限度に再度交配した結果、EE 群および TAM 群ではいずれも交尾は成立しなかった。E₂ 群および NP 群では 90% 以上に交尾がみられ、さらに受胎も確認された。交尾しなかった雌について妊孕性の確認されている対照群の雄と再度交配させたが、E₂ 群、EE 群および TAM 群のいずれにも交尾は確認されなかった。

受胎能の有無の確認後、各群の雄について交尾行動を観察した結果、EE 群の mount をした雄の割合、E₂ 群の mount 回数にそれぞれ有意差が認められた。また NP 群の初回

mount までの時間が有意に早まった。

14 週齢の剖検時に実施した精子検査の結果、いずれの化学物質の新生児期処理においても、精子の運動性には影響はみられず、各指標の対照値に対する比は約 1 であった。

剖検時に測定した精巣、精巣上体、精囊および前立腺の重量は、EE 群では精巣、精囊および前立腺の重量およびその体重比重量、NP 群の精巣重量、TAM 群の精巣、精巣上体および精囊の重量がそれぞれ有意に低値を示した。E₂、E₃ および BBP 群では生殖器官重量に変化はみられなかった。

剖検時に測定した精巣、精巣上体、精囊および前立腺の重量は、EE 群では精巣、精囊および前立腺の重量およびその体重比重量、NP 群の精巣重量、TAM 群の精巣、精巣上体および精囊の重量がそれぞれ有意に低値を示した。E₂、E₃ および BBP 群では生殖器官重量に変化はみられなかった。

剖検では E₂ 群の雄に精巣・精巣上体委縮あるいは精巣水腫様腫大が、EE 群の雄に精巣上体腫大および精囊委縮が、NP 群の雄に精巣・精巣上体委縮が、それぞれ散見されたが、病理組織学的に観察した結果、E₃ 群および BBP 群では、精巣、精巣上体、精囊、前立腺のいずれにも変化はみられなかった。EE 群の精巣では、精子形成サイクルステージ VII 期の精細管に円形精子細胞由来の多核巨細胞がみられ、さらに生殖細胞（パキテン期精母細胞と思われる）の減少がみられた。E₂ 群の精細管は生殖細胞が消失しセルトリ細胞のみで構成されており、また精巣上体管内には脱落したと考えられる生殖細胞および精子尾が観察された。NP 群では精巣上体管内に脱落した生殖細胞が充満していた。雌については、BBP 群の未交尾例の卵巣および子宮に

異常はみられなかったが、E₂ 群の未交尾例および不妊例、E₃ および NP 群の不妊例、EE 群の未交尾例の卵巣では、卵胞の閉鎖が著しく、黄体はほとんど形成されていなかった。また、これらの群の子宮では、腔上皮細胞の肥大、子宮筋層の肥大がみられ、さらに E₂ 群および NP 群では、子宮角の腔上皮に扁平上皮化生がみられた（TAM 群の雌雄については観察中）。

E. 結論

BPA 群ではいずれの生殖関連指標にも投与の影響は認められなかったが、EB 群では性的二型核の体積が対照群の 35% に減少し、交尾行動の減弱ならびに授胎能の低下がみられ、性的二型核が生殖機能に関連していることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tetsuji Nagao, Makiko Kuwagata, and Yoshiaki Saito, Effects of prenatal exposure to 5-fluoro-2'-deoxyuridine on developing central nervous system

and reproductive function in male offspring of mice, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis, 18, 73-92, 1998

2. Tetsuji Nagao, Makiko Kuwagata, and Yoshiaki Saito, Effects of prenatal exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine on the developing brain and reproductive function in male mouse offspring, Reproductive Toxicology, 12, 4, 477-487, 1998.
3. Makiko Kuwagata and Tetsuji Nagao, Behavior and reproductive function of rat male offspring treated prenatally with 5-bromo-2'-deoxyuridine, Reproductive Toxicology, 12, 5, 541-549, 1998.

2 学会発表

長尾哲二、齊藤義明、桑形麻樹子、臼見憲司、松本亜紀、今井 清、小野 宏、「ビスフェノール A のラット新生児期暴露による生殖への影響」 第 1 回日本内分泌化学物質学会（京都）1998