

マウス生殖腺の分化および精子、卵形成への
内分泌かく乱化学物質の影響に関する研究

分担研究者 井口 泰泉 横浜市立大学・理学部・機能科学科教授

研究要旨

マウスの胎仔期あるいは出生直後にジエチルスチルベストロール（DES）、ビスフェノール A(BPA)を投与し、卵巢を摘出し、臍を組織学的に検討した。胎仔期での投与では DES 投与のみでエストロゲン非依存の臍上皮の多層化が誘起されたが、出生直後の投与では大量の DES、BPA とともにエストロゲン非依存の臍上皮の増殖と、多卵性卵胞が誘起された。さらに、妊娠期に投与した BPA は 30 分で胎児の血中、脳、肝臓、子宮、精巣に移行した。

A. 研究目的

ポリカーボネート樹脂原料の BPA は、内分泌攪乱化学物質のうちの一つで、*in vitro*、*in vivo* ともにエストロゲン様作用を示す。一方、DES を周生期の雌マウスに投与すると、高頻度で多卵性卵胞の形成を誘起し、加齢とともに子宮や臍の腫瘍化が知られている。そこで、BPA の周生期マウスへの影響を明らかにするために DES をポジティブコントロールとして、胎仔期と新生仔期に投与して、どのような影響が顕れるかを組織学的に解析した。

B. 研究方法

A 胎仔期の処理

臍栓の確認日を妊娠 0 日とし、妊娠

10 日目から 18 日目までの 9 日間、母親マウスの体重 30g あたり 0.0002 から 2 μ g の DES と、300 および 3000 μ g の BPA を皮下に投与し、マウス生殖器官への影響を調べた。30 日齢で卵巢除去手術を行い、40 日齢で生殖器官を組織学的に観察する群と、卵巢摘出は行わず 70 日齢まで臍スミアの観察を行い、さらに正常な雄マウスと交配させ群を作成した。

B 新生仔期の処理

出生日から 5 日間、0.3、3 μ g の DES と 15、150 μ g の BPA を投与し、30 日齢で卵巢除去手術を行った後、40 日齢と 90 日齢の生殖器官を組織学的に観察した。

C 胎仔への BPA の移行

妊娠17日目のマウスの皮下にBPA、3000 μg /30 g 体重、を投与し、30分、1、2、3、6、12、24時間後に、母胎の血中、肝臓、脳、胎盤、および、胎仔の血中、肝臓、脳、子宮、精巣中のBPAを測定した。

C. 研究結果

胎仔期の投与では、高濃度のDES処理群で卵巣除去処理後も子宮や膣の上皮細胞の多層化が確認された。しかし、BPA処理群では卵巣に依存しており、卵巣摘出により子宮および膣の上皮は退化的な組織像を示した。40日齢の黄体形成率はDES処理群で低く、2 μg DES処理群では無排卵になり不妊であった。BPAでは半数が黄体を形成しており、90日齢では80%以上が受胎した。また、DES、BPA処理群ともに、生まれた仔の数や性比は対照群と差がなかった。40日齢の雌において、体重当たり的大腿骨の長さには有意な差は見られなかったが、300 μg BPA処理群と卵巣除去後の0.02 μg DES処理群では大腿骨におけるカルシウム含有量に有意な減少が見られた。また30日齢の雄で、300 μg BPA処理群と2 μg DES処理群においては、体重、体重当たり的大腿骨の長さ、大腿骨におけるカルシウム含有量は有意に減少していたが、60日齢ではこの差はなくなっていた。

新生仔期の投与では、40、90日齢ともに卵巣を除去した、DESとBPA 150 μg 処理群では、膣上皮の多層化や細胞分裂率の増加、高頻度の多卵性卵胞がみられた。また90日齢では、DES処理群は無排卵になり、BPAの処理群でも黄体形成率は低かった。妊娠17日目の母親の皮下にBPAを投与すると、30分で母親の組織はもとより、胎仔の組織へのBPAの移行が確認された。さらに肝臓と胎盤では、投与後3時間から24時間の間のBPA量は、ピーク時よりは減少しているもののほぼ一定レベルに保たれていた。

D. 考察

胎仔期での処理では、高濃度のDESでのみ生殖器官に卵巣非依存の不可逆的な影響を及ぼした。BPAは母親から胎仔組織への移行は確認したが、組織学的な変化は誘起しなかった。新生仔期では高濃度のBPAも不可逆的な影響を及ぼすことがわかった。このことから、マウス生殖器官は、発達過程で発生時期特異的なエストロゲン感受性を持ち、この時期のホルモン環境によってその後の発達が阻害されることが考えられる。

E. 結論

BPAの影響を、卵巣非依存の膣上皮の増殖、多卵性卵胞の誘起、不妊を中心に考えると、胎仔期での影響よりも

新生仔期での影響が強くあらわれることが明らかとなった。さらに、本研究の様なエンドポイントを誘起するには大量のBPAが必要である。

F. 研究発表

1. Iguchi, T. and T. Sato: Endocrine disruption and developmental abnormalities of female reproduction. *Am. Zoologist*, (in press).
2. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Further study of methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumors. *Anticancer Res.* (in press).
3. Yamamura, Y., K. Sayama, Y. Takeda, A. Matsuzawa, T. Iguchi and Y. Ohta: Differences in methallothionein expression in transplantable mouse mammary tumor lines. *Cancer Lett.*, 138: 167-174, 1999.
4. Cunha, G.R., J.-G. Forsberg, R. Golden, A. Haney, T. Iguchi, R. Newbold, S. Swan and W. Welshons: New approaches for estimating risk from exposure to diethylstilbestrol. *Environ. Health Perspect.*, 107 (Suppl. 4): 625-630, 1999.
5. Hashimoto, S., Bessho, H., Hara, A., Nakamura, M., Iguchi, T. and Fujita, K.: Elevated serum vitellogenin levels and gonadal abnormalities in wild flounder (*Pleuronectes yokohamae*) from Tokyo Bay, *Japan. Marine Environ. Res.*, 48: 1-17, 1999.
6. Hirabayashi, H., T. Sato, S. Kohno, M. Tanaka, S. Kobayashi, Y. Ohta and T. Iguchi: Apoptotic cell death in artificially induced deciduoma of pseudopregnant mice. *Anat. Rec.*, 254: 205-213, 1999.
7. Fukazawa, Y. and T. Iguchi: Effects of steroid hormones and growth factors on the development of the male mouse reproductive tract *in vitro*. *Zool. Sci.*, 16: 153-160, 1999.

2. 学会発表

1. Suzuki, A., Sugihara, A. and Iguchi, I.: Developmental effects of diethylstilbestrol and bisphenol A on reproductive organs in female mice. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会、神戸、アブストラクトD64, 1999.
2. Uchida, K., Kobayashi, Y., Sato, T., Ohta, Y. and Iguchi, T.:

- Effects of estrogenic compounds on osteogenesis of mice in utero. 日本内分泌攪乱化学物質学会第2回大会、神戸、アブストラクト D65, 1999.
3. 内田薫、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：マウス胎仔の骨形成に対する女性ホルモンの影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 4. 鈴木敦子、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：胎児期に投与されたエストロゲン様化学物質の雌マウス生殖器官への影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 5. 杉原秋香、佐藤友美、太田康彦、井口泰泉：出生直後のマウス雌性生殖器官に対するエストロゲン様化学物質の影響. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 6. 漆谷博志、佐藤友美、井口泰泉：マミチヨグのエストロゲン受容体遺伝子のクローニング及び発生段階での発現変化について. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 14, 1999.
 7. 岡田晃宣、佐藤友美、井口泰泉：出生前の雌ラット生殖輸管細胞の増殖及び EGF の発現. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 15, 1999.
 8. 河野郷通、藤目誠、上島孝久、井口泰泉：ニホンアマガエルの皮膚での水分吸収量の性差と下垂体後葉ホルモン受容体発現量. 日本動物学会第70回大会. 山形、Zool. Sci. 16, Suupl.: 8, 1999.
- 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