

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

**研究要旨** ビスフェノールA母体經由暴露による周産期および成熟雄の血清テストステロン濃度, ステロイド代謝酵素, ゴナドトロピン受容体等への影響について検討した。ラットあるいはマウスに, ビスフェノールA 0.2, 2.20 および200 µg/ml を妊娠1日より出生後21日(離乳時)まで母体に, さらに離乳後の仔に飲水投与した。ビスフェノールA 2 µg/ml 投与母体の妊娠19日における血清ビスフェノールA濃度は30 ng/mlであった。ビスフェノールA 20 µg/ml 投与ラットの妊娠19日胎仔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。またビスフェノールA 0.2 および20 µg/ml を離乳時まで投与したマウスの出生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, 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。一方200 µg/ml 投与ラット出生日の血清テストステロン濃度が低下したことから高用量のビスフェノールAは性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。

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イヒ細胞で産生・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仔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

仔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。従って胎仔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・質的低下も母体経路で暴露された内分泌かく乱物質による胎仔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路暴露による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。11年度はビスフェノールAの母体経路暴露による周産期および成熟後のテストステロン濃度とその関連調節因子への影響を検討した。

## 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。11年度はビスフェノールAを投与した母マウスより生まれた雄マウスの精液濃度、精子運動率を検査するとともに、ビスフェノールA暴露精子の受精能を評価するため体外受精および顕微受精を行い、その受精率と発生率を検討した。

## III. ビスフェノールAの経胎盤による移行 ビスフェノールAの経胎盤による移行に

ついては、現在データは少ない。とくに低濃度母体暴露の移行については明らかではなく、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により母体に投与した各濃度ビスフェノールAの母体および胎仔、新生仔への移行を検討した。

## 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, 2.20および200 µg/mlを妊娠1日より出生後21日(離乳時)まで母体に、さらに離乳後の仔に継続して飲水投与した。現在、ラット妊娠19, 22日胎仔と出生2時間後(出生日)、4日と離乳時まで母体に投与したマウスの出生10週雄の血液と精巣をサンプリング中である。また離乳後の仔にビスフェノールAの飲水投与を現在継続中である。現在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精巣上体より回収した精子を37°C、5% CO<sub>2</sub> in air 中で30分間培養した後、その精子濃度と精子運動率を血球算定盤にて二検者により3回ずつ測定した。また、同精子を体外受精と顕微受精に供し、

受精率と胚発育を調べた。

Ⅲ. ビスフェノール A の経胎盤による移行  
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により母体  
に投与した各濃度ビスフェノール A の母体  
および胎仔、新生仔への移行を検討中であ  
る。

### C. 研究結果及び考察

#### 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 A 200 $\mu$ g/ml 投与群で出  
生 2 時間後の血清テストステロン濃度が有  
意に低下した。ビスフェノール A 20 $\mu$ g/ml  
群において妊娠 19 日胎仔精巣におけるステ  
ロイド代謝酵素 (P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD,  
P450<sub>c17</sub>, 17 $\alpha$ -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  $\mu$ g/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かつ  
た。またビスフェノール A 20  $\mu$ g/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 (P450<sub>scc</sub>, 3 $\beta$ -HSD, P450<sub>c17</sub>),  
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, 胎仔期から授乳期におけ  
るビスフェノール A 20  $\mu$ g/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。一方 20  
0  $\mu$ g/ml 投与ラット出生日の血清テストス  
テロン濃度が低下したことから高用量のビ  
スフェノール A は性分化や生殖器系の発  
達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪  
乱する可能性が示された。

#### II. 受精能への影響

ビスフェノール A 20  $\mu$ g/ml 群 (A) 8 匹、ビ  
スフェノール A 0.2  $\mu$ g/ml 群 (B) 8 匹、対照  
群 (C) 10 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 38 $\pm$ 1.8g (平均値 $\pm$ SD、以下同様)、B 群  
35 $\pm$ 4.8g、C 群 34 $\pm$ 3.8g、左右精巣重量は、  
A 群 104.2 $\pm$ 13.6mg、106.4 $\pm$ 10.4mg、B 群  
100.2 $\pm$ 10.2mg、99.4 $\pm$ 16.4mg、C 群 95.9  
 $\pm$ 9.4mg、96.4 $\pm$ 12.3mg、精子濃度は、A 群  
32.2 $\pm$ 18.3 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml、B 群 35.5 $\pm$ 18.3 $\times$   
10<sup>5</sup>/ml、C 群 29.3 $\pm$ 8.3 $\times$ 10<sup>5</sup>/ml、精子運動  
率は、A 群 52.3 $\pm$ 4.9%、B 群 47.8 $\pm$ 18.8%、  
C 群 49.1 $\pm$ 12.2% であった。各群間におけ  
る各 parameter に有意差は認めなかった。  
体外受精における受精率は、A 群 73.3 $\pm$   
12.2%、B 群 69.4 $\pm$ 14.9%、C 群 70.3 $\pm$   
17.2% と各群間に有意差は認めなかった。  
また、顕微受精における受精率も、A 群 50.4  
 $\pm$ 22.3%、B 群 57.6 $\pm$ 19.2%、C 群 54.3 $\pm$   
15.9% と各群間に有意差は認めなかった。

Ⅲ. ビスフェノール A の経胎盤による移行  
ビスフェノール A 2 µg/ml 投与マウス母体の妊娠 19 日における血清ビスフェノール A 濃度は 30 ng/ml であった。

#### D. 今後の展望

11 年度の研究から胎仔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リン 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うと考えられているが, 本年度の研究において 200 µg/ml 投与ラット出生 2 時間後の血清テストステロン濃度が低下したことから高用量のビスフェノール A は性分化や生殖器系の発達・分化に重要な周産期の内分泌環境を攪乱する可能性が示された。

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 LH 受容体への影響を明らかにする必要がある。また周産期をさらに細分しての検討も必要であり, 現在ビスフェノール A 各濃度投与の妊娠 22 日胎仔と出生 1 (出生日), 4 日の血清テストステロン濃度を測定中である。また今回調べていない因子 (アンドロゲンレセプター, 5 $\alpha$ -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。

また, 母体に投与した各濃度ビスフェノール A の胎仔, 新生仔への移行を測定中である

#### E. 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