

称号及び氏名	博士（獣医学）古家 優
学位授与の日付	平成18年3月31日
論文名	「Effects of bisphenol-A, an endocrine disrupter, on the development of phenotypes and testes of male chickens」 (内分泌攪乱化学物質ビスフェノール-Aが雄鶏の形質と精巢の発達に及ぼす影響)
論文審査委員	主査 小川 和重 副査 稲葉 俊夫 副査 玉田 尋通 副査 塚本 康浩

論文要旨

緒言

精子数の減少や交尾機能不全など、近年問題となっている雄動物の繁殖能力の低下は、種の保存にとって極めて重要な問題であり、その原因の一つとしてエストロゲン様作用をもつ内分泌攪乱化学物質による曝露が疑われている。

ビスフェノール-A（以下 BPA）は、ポリカーボネート樹脂・エポキシ樹脂の材料として、食器や哺乳瓶のコーティング、歯の充填剤、医療機器等に幅広く使用されているが（2004年、世界で約 320 万 t、日本国内で約 60 万 t）、近年これらの製品からの加熱による溶出が問題となっている。*in vitro*の研究から、BPA はエストラジオール-17 β の 1000 から 100 万分の 1 の弱いエストロゲン様作用を持つことが報告されており、現在、我が国では内分泌攪乱化学物質の調査対象に指定されている。しかしながら、魚類・哺乳類を用いた研究ではそのエストロゲン様作用について諸説様々であり、一定した見解に至っていない。

そこで本研究では、自然界において雄の繁殖能力の低下が報告されている鳥類を対象に、BPA の内分泌攪乱作用を検討した。その理由としては、鳥類の性決定や雄の形質発現が、エストロゲンに強い影響を受けることが知られているからである。したがって、鳥類の雄は、弱いエストロゲン様作用をもつ内分泌攪乱化学物質に強く反応する可能性が高く、有用な実験モデルになるのではないかと予測した。

本研究では、鶏冠や肉垂など特徴的な形質をもつ白色レグホン種の雄を用い、BPA が生殖腺の発生、雄性形質の発達および精子形成に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

第1章 高濃度のBPA曝露が雄生殖腺の発生および雄性形質の発達に及ぼす影響

第1節 発生期のBPA曝露が生殖腺分化に及ぼす影響

原始生殖腺は皮質と髄質に分かれ、皮質が卵巣へ、髄質が精巣へと分化する。ニワトリの雄では両側の髄質が精巣へと分化するが、雌では左側皮質のみが卵巣へと分化し、右側生殖腺は完全に退化する。本節では、発育鶏卵へBPAを投与することで、BPAのエストロジェン様作用が雄生殖腺の発生・分化に与える影響を検討した。

性分化前に相当する4日齢の発育鶏卵の卵黄嚢内にBPA (2, 20, 200 $\mu\text{g/g egg}$) を単回投与し、孵化後8週齢の精巣を採取した。溶媒のみ投与した対照群の個体では精巣に異常は認められなかったが、BPA投与群では右側生殖腺は正常な発生像を示したものの、いくつかの個体では、左側生殖腺に著明な形態的異常が認められた。組織学的には、左側生殖腺の皮質領域は分厚く残存し、血管増生と原始生殖細胞様の細胞が認められ、また髄質領域では発達の悪い小さな精細管が観察された。このことは、雌では左側の卵巣のみが発達する現象と何らかの関係があると考えられた。また、興味あることにBPA曝露により、左側精巣において、エストロジェン合成酵素であるアロマターゼ遺伝子の顕著な発現上昇が認められたことから、エストロジェン合成が増加している可能性が示唆された。

これらの結果から、生殖腺分化の時期にBPAの曝露によってニワトリ雄胚子生殖腺がエストロジェン様作用を受け、生殖腺の雌性化が誘発された可能性があると考えられた。

第2節 高濃度のBPA曝露が雄鶏の鶏冠・精巣の発達に及ぼす影響

白色レグホン種の雄鶏は、鶏冠や肉垂など非常に特徴的な雄性形質を持っており、これらの発達には性ホルモンの作用が大きく関与していることがわかっている。本節では、雄の幼鳥へ高濃度のBPA曝露を行い、鶏冠と精巣の発達を調べた。

孵化後2週齢の雄雛にBPA (200 mg) を1週間ごとに経口投与した。また、エストラジオール-17 β を含むパラフィン小片を外科的に腹腔内に埋め込んだ個体を陽性対照とした。16週齢の時点で鶏冠・精巣を採取し、その発達について検討した。溶媒のみを投与した対照群は大きな鶏冠・精巣を有し、精巣の組織学的観察からは精細管腔内に多数の精子が観察された。しかしながら、BPA投与個体および陽性対照個体では鶏冠・精巣の発達が悪く、精巣の組織学的観察からは、精子形成が著しく抑制されていることが判明した。

第2章 孵化後のBPA曝露が雄鶏の形質・精子形成・血清ホルモン濃度に及ぼす影響

ラット・マウスを用いた毒性試験から、BPAの生殖毒性における無作用量 (NOAEL) は50 mg/kg と定められ、また、ヒトでの1日許容摂取量 (ADI) は50 $\mu\text{g/kg}$ とされている。実際、環境中で検出されるBPAの濃度はこれらの用量よりもかなり低いため、ヒトに対する影響はほとんどないと考えられている。しかしながら、環境レベルに相当する曝露によって雄マウスの前立腺および精巣重量が減少するという報告もあり、BPAの生殖毒性については未だ明確な結論に至っていない。前章で高濃度のBPA曝露が雄鶏の形質および精子形成

に影響を与えることが判明したことを踏まえ、本章では、環境レベルに相当する低濃度から影響が認められた高濃度までの BPA 曝露を行い、雄性形質の発達、精子形成、血清ホルモン濃度に及ぼす影響について検討した。

孵化後 2 週齢から 25 週齢まで種々の濃度の BPA (2 μg ~200 mg/kg) を 1 日おきに経口投与した。5 週齢ごとに採材を行い、鶏冠・肉垂・精巣の組織重量を測定し、精巣は病理組織学的に観察した。実験期間を通して実験群間での体重差はみられなかったが、鶏冠や肉垂といった雄鶏の形質は、特に性成熟前の時期において低用量の 2 ~20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の曝露でも成長が抑制された。また、精巣の組織重量は 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の曝露で有意に減少した。精巣の組織学的観察からは実験期間を通じて、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の曝露で精細管の狭小化、精細管あたりの精原細胞・精祖細胞・精子細胞数の減少が認められた。また、細胞増殖活性を検索するために PCNA 抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の曝露で細胞増殖活性が盛んであるはずの精祖細胞・精母細胞において有意な陽性細胞数の減少が認められ、精子形成が抑制されていることが明らかになった。これらの結果から、比較的低用量の BPA 曝露でも雄鶏の形質の発達と精子形成が抑制されることが判明した。

また、ELISA 法によって血清中の性ホルモン濃度を測定したところ、血清中テストステロン濃度は、性成熟期までは 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の曝露で有意に低下したが、成鶏では 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ といった低用量曝露でも有意な低下が認められ、雄鶏の形質発達の抑制との関連が示唆された。一方、血清中エストラジオール-17 β 濃度は性成熟前の 5~10 週齢において 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の曝露で有意に上昇し、雄性形質や精巣の発達に影響を及ぼす一因となる可能性が推測された。

エストロジェンは、雄性形質や精巣の発達に対する直接的な作用に加えて、間接的に生殖腺のエストロジェンレセプター (ER) やアロマターゼ遺伝子の発現に影響を与えることも知られている。そこで、BPA 曝露による精巣内 ER α およびアロマターゼ遺伝子の発現量を半定量的 RT-PCR 法によって測定し、BPA 曝露による雄鶏形質の発達と精子形成抑制との関連性を検討した。精巣における ER α 遺伝子の発現量は、20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上の BPA 曝露により、10 週齢以降において有意に増加した。また、アロマターゼ遺伝子の発現量は性成熟前の 5 週齢 (2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上)、10 週齢 (200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上) において有意に増加した。

これらの結果から、BPA は性成熟前の段階でアロマターゼ遺伝子の発現量上昇による低テストステロン・高エストロジェンの状態を生み出し、また、ER α 遺伝子の発現を上昇させることにより、雄鶏に強いエストロジェン様作用をもたらすことが示唆された。これらの作用が重なった結果、雄性形質の成長抑制や精子形成の抑制が生じたと考えられた。

総括

- BPA は、ニワトリ雄胚子の生殖腺の発生に影響を与え、エストロジェン様作用によって生殖腺の雌性化を誘導する可能性が考えられた。
- 低用量の BPA を幼鳥期から曝露することによって、雄鶏の形質 (鶏冠・肉垂) の発達や

精子形成が抑制されることを明らかにし、雄鶏は哺乳類よりも、BPAにより強い影響を受けることを見出した。

- BPAは、精巣のアロマターゼ遺伝子の発現量を上昇させて低テストステロン・高エストロジェンの状態を生み出し、また、ER遺伝子の発現量も上昇させることによって、いっそう強く雄鶏にエストロジェン様作用を及ぼす可能性が考えられた。
- ニワトリは、弱いエストロジェン様物質であるBPAに対しても強い影響を受けたため、内分泌攪乱化学物質の研究に有用な実験動物になると考えられた。

審査結果の要旨

エストロジェン様作用をもつ内分泌攪乱化学物質の曝露が、雄動物の繁殖能力を低下させる原因の一つとして疑われている。ポリカーボネート樹脂・エポキシ樹脂の合成材料であるビスフェノール-A (BPA) は、エストラジオール-17 β (E₂) の10⁻³-10⁻⁶の弱いエストロジェン様作用を示し、また、加水分解などにより樹脂から溶出して環境が汚染されるため、内分泌攪乱化学物質の調査対象に指定されている。マウス・ラットの生殖毒性試験から、BPAの無作用量は50 mg/kg、ヒトの1日許容摂取量は50 μ g/kgと定められている。環境中で検出されるBPA濃度はかなり低く、ヒトにはほとんど影響を及ぼさないと考えられているが、環境レベルに相当する曝露で雄マウスの前立腺と精巣重量の減少を示す報告がある。BPAの生殖毒性については明確でなく、魚類・哺乳類を用いた動物実験では一定の見解が得られていない。申請者は、鳥類における性決定や雄の形質発現がエストロジェンの影響を強く受ける点に着目し、雄のニワトリはBPAのエストロジェン様作用を実証する有用な実験モデル動物になると推測した。本研究では、白色レグホン種の雄を用い、生殖腺の発生、精子形成、鶏冠や肉垂など雄性形質の発達に及ぼすBPAの影響を検討し、以下の成果が得られている。

第1章の第1節では、高濃度のBPA (2-200 μ g/g egg) を発育鶏卵の卵黄嚢内に単回投与し、孵化後8週齢の精巣を対象に、生殖腺分化に及ぼすBPAの影響について検討した。原始生殖腺の皮質は卵巣、髄質は精巣へ分化するが、ニワトリの雄では両側の髄質が精巣、雌では左側皮質のみが卵巣へと分化し、右側生殖腺は完全に退化する。BPA投与により、左側精巣に著明な形態的異常を示す個体が認められ、異常精巣においてエストロジェン合成酵素であるアロマターゼ遺伝子発現が有意に上昇していた。左側のみの異常は、左側生殖腺から分化する卵巣の発達と何らかの関連性が考えられた。高濃度のBPAは、ニワトリ雄胚子生殖腺の正常な分化を阻害することが明らかになり、雌性化を誘発する可能性が示唆された。

第1章の第2節では、高濃度のBPA (200 mg/kg) を孵化後2週齢の雄雛に週1回経口投与し、16週齢の鶏冠と精巣の発達について検討した。BPA投与個体は、E₂投与個体に類似し、鶏冠の発達が阻害され、精子形成が著しく抑制されていた。高濃度のBPAによる雄性形

質の発達阻害と精子形成抑制が明らかになった。

第2章では、低濃度（2 µg/kg：環境レベルに相当）から高濃度（200 mg/kg）のBPAを、孵化後2週齢から25週齢まで1日おきに経口投与し、5週毎に採材して雄性形質の発達、精子形成、性ホルモン産生能について検討した。BPAの体重に及ぼす影響は無かったが、2 µg/kg以上の曝露で特に性成熟前の週齢で鶏冠や肉垂の成長阻害が認められ、また、20 µg/kg以上の曝露で精巣重量と精細胞数は有意に減少し、比較的低濃度のBPAによる雄性形質の発達阻害と精子形成抑制が示された。血清中テストステロン濃度は、性成熟期まで（15週齢以下）では200 µg/kg以上、成鶏（25週齢）では2 µg/kg以上の曝露で有意に低下し、雄性形質発達抑制との関連性が示唆された。血清中E₂濃度は性成熟前（5-10週齢）の200 µg/kg以上の曝露で有意に上昇し、雄性形質や精巣の発達に影響を及ぼす一因になることが示唆された。一方、エストロゲンレセプター（ER）α遺伝子の精巣発現量は、20 µg/kg以上のBPA曝露で、10週齢以降に有意に増加し、アロマターゼ遺伝子の発現量は5週齢（2 µg/kg以上）、10週齢（200 µg/kg以上）で有意に増加した。これらの結果から、BPAはアロマターゼ遺伝子の発現量上昇による低テストステロン・高エストロジェンの状態とERα遺伝子の発現上昇により、雄鶏に強いエストロゲン様作用をもたらし、雄性形質や精子形成を抑制することが示唆された。

本研究で、BPAが、ニワトリ雄胚子の生殖腺の発生に悪影響を及ぼすこと、低濃度の幼鳥期曝露により雄性形質の発達を阻害し精子形成を抑制することが実験的に証明され、ニワトリは哺乳類よりもBPAの影響を強く受けることが見出された。さらに、この現象が、BPA自体のエストロゲン様作用に加え、BPAが誘導する精巣内のアロマターゼ遺伝子とER遺伝子の発現上昇を介した低テストステロン・高エストロジェン状態によって誘発される可能性が示された。これまで不明確であったBPAの生殖毒性を実証したことと内分泌攪乱化学物質の研究に有用な実験動物としてニワトリを提示したことは、医学・獣医学分野における内分泌攪乱化学物質に関する研究の発展に大きく貢献するものである。従って、本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。