

## ビスフェノール A のラット及びマウスの精巣及び雄性副生殖器に対する毒性(II). - 投与経路の違いによる差 -

高橋 省\*, 田中 豊人\*, 大石 眞之\*, 長井 二三子\*, 長澤 明道\*,  
湯澤 勝広\*, 高橋 博\*, 矢野 範男\*, 久保 喜一\*, 安藤 弘\*,  
小 縣 昭夫\*, 上村 尚\*, 加納 いつ\*

### Toxicity of Bisphenol A on Testis and Male Accessory Organs in Rats and Mice (II). Administration-Route Dependency

Osamu Takahashi\*, Toyohito Tanaka\*, Shinshi Oishi\*, Fumiko Nagai\*, Akemichi Nagasawa\*,  
Katsuhiko Yuzawa\*, Hiroshi Takahashi\*, Norio Yano\*, Yoshikazu Kubo\*, Hiroshi Ando\*,  
Akio Ogata\*, Hisashi Kamimura\* and Itsu Kano\*

**Keywords :** ビスフェノール A bisphenol A, 精巣 testis, 雄性副生殖器 male accessory organs, ラット rat, 毒性 toxicity, 投与経路 administration-route, 内分泌攪乱物質 endocrine disruptors

#### 緒 言

前報<sup>1)</sup>においてビスフェノール A (BPA) の雄ラットに対する生殖毒性が確認出来た。また、種差及び系統差の実験において F344 系のラットがもっとも感受性が高く、Wistar 及び Holtzman 系ラット、C57BL/6 及び ICR 系マウスではそれ以上の毒性は認められないことが分かった。本報告では、非経口投与を行い、投与経路による BPA の生殖毒性の差異を検討した。

#### 材料と方法

**投与物質** 東京化成試薬一級、2,2-ビス(4-ヒドロキシフェニル)プロパン、通称ビスフェノール A (BPA) を購入し使用した。ロット番号は GH01 で、純度はガスクロマトグラフィで 99.0% 以上である。

**動物及び飼料** 使用した雄ラットは、Jcl:Wistar 系で、日本クレアから 4 週齢で購入し直ちに投与を開始した。飼料は日本クレアの CE-2 を使用した。

**実験計画** ラットに対する非経口の毒性を知るために、皮下及び腹腔投与を実施した。皮下投与は、Jcl:Wistar 系ラット(4 週齢)に 200 mg/kg の BPA を 1 日 1 回、1 週間に月、火、木、金の 4 日間の割で 1 ヶ月間にわたり背部皮下に注射した。腹腔投与は、1 回の 200 mg/kg の投与でラットが死亡したため、用量を 20 及び 2 mg/kg/day とし、1 日 1 回、1 週間に月、火、木、金の 4 日間の割で 1 ヶ月間投与した。症状観察及び解剖後の処理は前報<sup>1)</sup>に準じた。

**病理組織学的検査** 皮下投与したラットについては、巣状の壊死を伴う変性は、1 個の精細管のみに変性が観察された場合を±とし、+及び 2+はそれぞれ 1/5、1/3 ぐらいの精細

管に認められた場合とした。また、生殖細胞の剥離及び IX-XI ステージ精細管辺縁部への線形精子細胞の停滞が認められた場合をそれぞれ+とし、基底膜については破壊を±、消失を+とした。精子形成の 4 ステージ (I-VI, VII-VIII, IX-XI, XII-XIV) について、その精細管の数を全 100 個について計数し、全体に対するパーセントで示した。ラットの組織病理学的観察は伊東ら<sup>2)</sup>に従った。腹腔投与と群ラットの小腸、大腸についても、組織病理学的検索を行った。煩雑を避けグレードを付けず 30 から 100%領域に変化が認められた場合を全て+とした。

一日精子生産量(DSP)、精巣上体精子保有量(ESR)及び血清テストステロン(T)濃度の測定 精巣内精子量、DSP、ESR 及び血清 T 濃度の測定は前報<sup>1)</sup>に従って測定した。統計処理 統計処理も前報<sup>1)</sup>に準じた。

#### 結 果

皮下投与により終体重、精巣、精巣上体、精囊、前立腺重量は顕著に減少した(表 1)。病理組織学的には精細管の巣状変性、生殖細胞剥離、ステージ IX-X における後期精子細胞の停滞が認められた(表 2, 写真 1)。精細管のステージバランスに変化はない(表 3)が、DSP、ESR など精子数大幅に減少した(表 4)。200 mg/kg の腹腔 1 回投与では、4 日後に半数が死亡した。腹腔 20 mg/kg/day 群においては、終体重及び腹葉前立腺重量の減少が認められた(表 1)が、最も顕著な変化は小腸肥大であった(表 1)。精巣の病理組織学的所見(表 2)及び精細管のステージバランスに変化はない(表 3)。DSP、ESR に有意差はなく、血清 T 濃度が有意に減少した(表 4)。小腸への影響では、剖検所見で回腸肥大が観察された。組織病理所見により、十二

\* 東京都健康安全研究センター環境保健部薬理研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

\* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

表1. 皮下あるいは腹腔投与 Wistar ラットの体重及び器官重量 ( N = 5 , 腹腔 20mg BPA/kg 群のみ N = 6 )

	皮下 対照群	皮下 BPA 200mg/kg	腹腔 対照群	腹腔 BPA 2 mg/kg	腹腔 BPA 20 mg/kg
終体重 (g)	313.0±13.5	249.8±8.9*	317.0±12.3	323.8±12.3	279.3±21.6*
器官重量 (絶対重量)					
精巢 (g)	2.69±0.08	2.10±0.43*	2.91±0.17	2.88±0.08	2.85±0.11
精巢上体 (mg)	521±30	296±73*	539±41	578±28	549±26
精囊及び凝固腺 (mg)	665±93	125±75*	692±45	728±39	587±156
腹葉前立腺 (mg)	235±19	77.9±27.8*	274±32	254±29	195±44*
側背葉前立腺 (mg)	177±38	65.1±27.1*	194±62	178±37	160±26
包皮腺 (mg)	132±26	102±26	153±22	167±27	123±55
小腸 (g)			12.9±1.7	13.6±1.5	28.9±13.9*
盲腸 (g)			6.73±0.56	7.55±0.91	8.31±3.52
大腸 (g)			5.49±0.65	5.16±0.64	4.79±1.58
器官重量 (体重 100 g 当たりの相対重量)					
精巢 (mg)	860±30	843±173	918±57	891±33	1024±91*
精巢上体 (mg)	166±6	119±28*	170±15	179±17	197±16*
精囊及び凝固腺 (mg)	212±22	49.6±28.7*	218±13	207±49	208±45
腹葉前立腺 (mg)	75.0±4.9	31.2±10.9*	86.7±11.5	78.5±10.2	69.6±12.2
側背葉前立腺 (mg)	56.4±11.5	25.9±10.2*	60.9±17.7	55.3±12.6	57.1±6.2
包皮腺 (mg)	42.3±8.6	41.0±11.6	39.4±12.8	51.5±8.0	43.6±17.8
小腸 (g)			4.06±0.48	4.19±0.42	10.65±5.83*
盲腸 (g)			2.13±0.21	2.34±0.31	2.94±1.17
大腸 (g)			1.74±0.24	1.60±0.21	1.70±0.50

小腸, 大腸は内容物も一緒に測定した。  
測定せず。

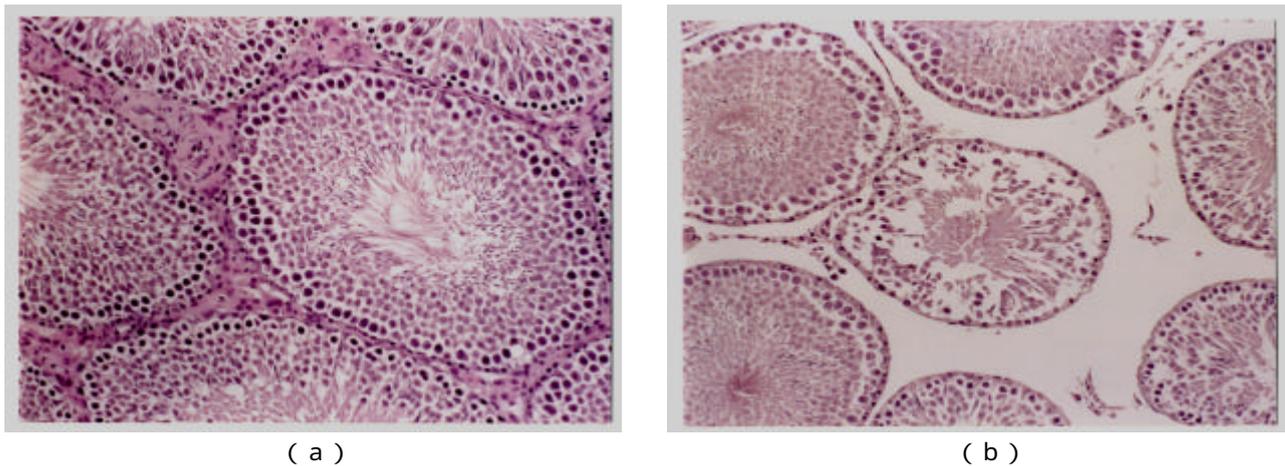
\* Student t 検定あるいは Dunnett 検定有意。

表2. 皮下あるいは腹腔投与 Wistar ラット精細管の病理組織学的所見 ( N = 5 , 腹腔 20mg BPA/kg 群のみ N = 6 )

	グ レ ード	皮下 対照群	皮下 BPA 200mg/kg	腹腔 対照群	腹腔 BPA 2 mg/kg	腹腔 BPA 20 mg/kg
空胞変性	+	1	1	5	3	3
巢状変性	±	0	1¶	0	0	0
	+	0	2¶	0	0	0
	2+	0	1¶	0	0	0
萎縮	±	0	0	1	2	0
	+	0	0	0	0	2
剥離	±	0	0	1	0	0
	+	0	3†	0	0	2
脱落塊	±	0	0	0	1	3
	+	1	1	1	0	0
基底膜消失	±	0	1	0	0	0
	+	0	1	0	0	0
ステージ VII-VIII 後期精子細胞減少	+	0	0	0	0	2
	2+	0	2	0	0	0
ステージ IX-X 後期精子細胞停滞	+	0	3†	0	0	0

† カイ二乗検定有意。

¶ Mantel-Haenzel 検定有意。



( a )

( b )

写真 1 . ビスフェノール ( BPA ) を皮下注射したラットの精巣頭微鏡写真 ( ヘマトキシリン - エオジン染色 , 50 倍 )  
( a ) 対照群 , ( b ) BPA 投与群

表 3 . 皮下あるいは腹腔投与 Wistar ラット精細管の精子形成ステージの割合 ( N=5 , 腹腔 20mg BPA/kg 群のみ N=6 )

	皮下 対照群	皮下 BPA 200mg/kg	腹腔 対照群	腹腔 BPA 2 mg/kg	腹腔 BPA 20 mg/kg
I-VI	42.7±7.5	37.9±13.2	48.3±7.6	50.4±7.7	47.9±5.7
VII-VIII	26.2±6.8	26.3±5.2	26.7±5.2	21.1±6.1	24.8±2.8
IX-XI	9.8±3.0	20.3±14.9	9.9±3.0	11.3±2.0	9.8±2.7
XII-XIV	19.3±3.6	15.4±6.6	15.1±3.2	17.2±6.1	17.5±4.9

表 4 . 皮下あるいは腹腔投与 Wistar ラットにおける 1 日精子生産数 ( DSP ) , 精巣上体精子貯蔵数 ( ESR ) 及び血清テストステロン濃度 ( N=5 , 腹腔 20mg BPA/kg 群のみ N=6 )

	皮下 対照群	皮下 BPA 200mg/kg	腹腔 対照群	腹腔 BPA 2 mg/kg	腹腔 BPA 20 mg/kg
DSP ( x 10 <sup>7</sup> )	2.86±0.42	2.07±0.26*	2.85±0.21	2.91±0.38	3.03±0.43
精巣 1 g 当たりの DSP ( x 10 <sup>7</sup> )	2.16±0.35	2.05±0.52	2.02±0.21	2.03±0.26	2.15±0.31
頭体部 ESR ( x 10 <sup>7</sup> )	6.76±1.05	2.50±1.75*	6.43±1.04	7.66±0.78	6.15±1.41
尾部 ESR ( x 10 <sup>7</sup> )	5.86±0.93	1.25±1.53*	4.82±0.59	5.12±1.11	5.03±1.10
精巣上体 1 g 当たりの頭体部 ESR ( x 10 <sup>8</sup> )	4.19±0.57	2.40±1.32*	4.01±0.49	4.49±0.43	3.58±0.73
精巣上体 1 g 当たりの尾部 ESR ( x 10 <sup>8</sup> )	6.42±0.62	2.42±2.26*	4.56±0.36	4.52±0.39	4.99±0.95
血清テストステロン濃度 ( ng/ml )	3.99±4.54	2.84±3.80	3.03±2.22	1.98±0.98	0.95±1.07 *

DSP=daily sperm production; ESR=epididymis sperm reserves.

\* Student t 検定あるいは Dunnett 検定有意 .

指腸の絨毛短縮 , 空腸肥大 , 回腸肥大 , 盲腸筋層肥厚が認められた ( 表 5 , 写真 2 ) .

#### 考 察

BPA の経口毒性は前報<sup>1)</sup>のように比較的弱いのであるが , 非経口毒性ははるかに強い . 1 週間に 4 日間の 200 mg/kg/day の皮下注射は延べ用量にすると 114 mg/kg/day と計算されるが , この用量の注射で精巣 , 精巣上体 , 精囊 , 前立腺重量は顕著に減少し , 病理組織学的には精細管の巣状変性 , 生殖細胞剥離 , ステージ IX-X における後期精子細胞の停滞が認められた . また , 精巣及び精巣上体の精子

数が大幅に減少した . 今回は 1 用量しか検討していないが , もっと低い用量でも作用があると推測される . DES を 3.3 mg/kg/day 皮下注射すると , 血清 T 濃度 , 精巣上体及び精巣重量 , DSP が減少する<sup>3)</sup>ので , BPA の皮下毒性は DES に割合近いものと思われる . 一方 BPA の腹腔急性毒性は非常に強く , 1 回投与した 200 mg/kg で半数のラットが死亡したので , この用量は腹腔投与 BPA の LD<sub>50</sub>と考えられる . 1 週間に 4 日間の 20 mg/kg/day の腹腔投与 ( 延べ用量 11.4 mg/kg/day ) でも , 腹部膨満 , 回腸肥大などが観察され , 腸管刺激に起因する麻痺性イレウスを来していると考えられる . 腹腔 BPA の生殖毒性に関しては , 腹葉前立

腺重量及び血清 T 濃度の減少が認められたのみである。

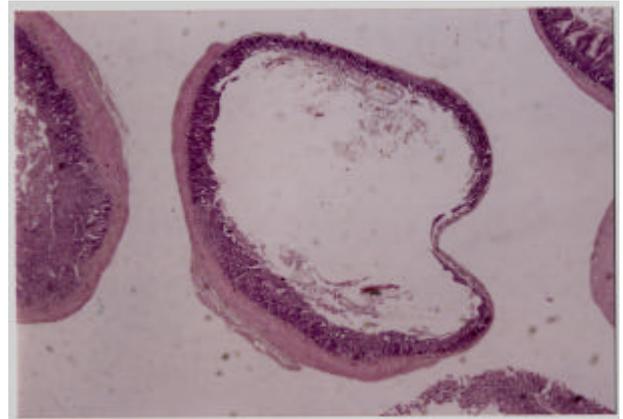
表 5 . 腹腔投与 Wistar ラット腸管の病理組織学的所見  
( N= 5 , 20mg BPA/kg 群のみ N= 6 )

	腹腔 対照群	腹腔 BPA 2 mg/kg	腹腔 BPA 20 mg/kg
<b>十二指腸</b>			
肥大 †¶	0	0	4
絨毛消失	0	2	3
絨毛空胞変性	2	3	4
絨毛短縮 †¶	0	0	6*
陰か拡大 †¶	0	0	4
内外筋層肥厚 †¶	0	0	3
粘膜固有層空胞変性	1	2	3
パネート細胞好酸性顆粒増加 ¶	0	2	4
<b>空腸</b>			
肥大 †¶	0	0	5*
絨毛消失 ¶	1	3	5
絨毛空胞変性	4	4	5
絨毛短縮	0	0	1
内外筋層肥厚 †¶	0	0	3
粘膜固有層空胞変性 ¶	0	2	4
粘膜固有層炎症及び線維化	0	1	1
パネート細胞好酸性顆粒増加	0	1	2
<b>回腸</b>			
肥大 †¶	0	0	6*
絨毛消失 ¶	1	0	4
絨毛空胞変性 †	4	4	5
内外筋層肥厚	0	0	2
粘膜固有層空胞変性 ¶	0	3	4
粘膜固有層炎症及び線維化	0	1	2
パネート細胞好酸性顆粒増加	0	1	3
外筋層水腫	0	0	2
<b>盲腸</b>			
粘膜過形成 ¶	0	2	4
内外筋層肥厚 †¶	0	3	6*
外筋層水腫 †¶	0	0	3
<b>結腸</b>			
粘膜過形成	0	0	1
内外筋層肥厚	0	0	2
管腔内線維増殖	0	0	1
空胞変性粘膜の剥離	0	0	1
<b>直腸</b>			
肥大	0	0	1
内外筋層肥厚	0	0	2
粘膜空胞変性	0	0	1
筋層水腫	0	1	0

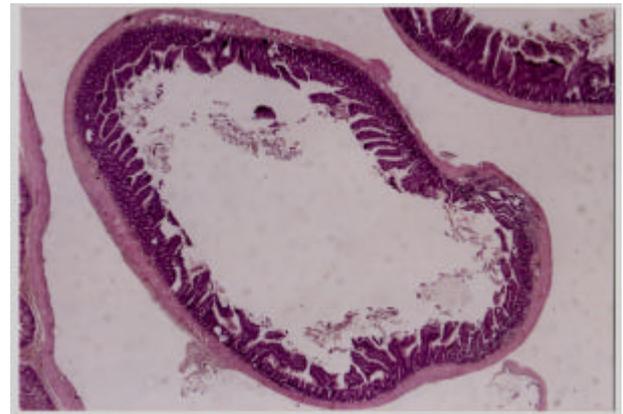
\* Fisher 直接確率検定有意.

† カイ二乗検定有意.

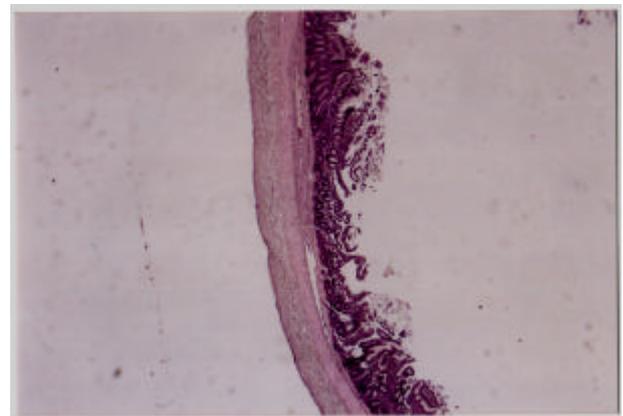
¶ Mantel-Haenzel 検定有意



(a)



(b)



(c)

写真 2 . ビスフェノール A ( BPA ) を腹腔注射したラットの回腸頭微鏡写真 ( ヘマトキシリン - エオジン染色 , 5 倍 )

(a) 対照群 ,

(b) 2 mg/kg/day BPA 投与群 ,

(c) 20mg/k/day BPA 投与群

以上のような BPA の毒性の投与経路による違いはその代謝の差に基づくものと考えられる . BPA の血中濃度の最大値は , 腹腔投与の場合が一番高く , 次が皮下注射で , 経口投与では低い <sup>4)</sup> . これは経口 BPA が門脈経路で摂取され肝臓において容易に抱合体に解毒されるためである <sup>5)</sup> . 従って BPA の通常の経口摂取では , その毒性はあまり強くないものと推定される . 精巢毒性の程度、副生殖器への影

響等を総合的に判断して BPA の雄生殖毒性はそのエストロゲン類似作用に基づくものと考えられ<sup>6)</sup>、その作用機構は複数のホルモンのバランス異常の結果というより、初発的には精巢そのものに直接作用していると推定された。

#### 結 論

皮下あるいは腹腔投与による BPA の毒性は経口毒性より強い。つまり、皮下投与により明瞭で重篤な生殖毒性が認められた。また、腹腔投与が最も毒性が強いが、それは腸管に対する急性毒性であった。投与経路の違いによる毒性の差は BPA の代謝の差に基づくものと考えられる。

#### 文 献

- 1) 高橋省, 田中豊人, 大石眞之他: 衛研年報 **00**, 00-00, 2003 .
- 2) 伊東信行: 最新毒性病理学, 219-229, 1994, 中山書店, 東京 .
- 3) Goyal, H.O., Braden, T.D., Mansour, M., *et al.*: *Biol. Reprod.*, **64**, 927-934, 2001 .
- 4) Pottenger, L.H., Domoradzki, J.Y., Markham, D.A., *et al.*: *Toxicol. Sci.*, **54**, 3-18, 2000 .
- 5) Snyder, R.W., Manes, S.C., Gaido, K.W., *et al.*: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **168**, 225-234, 2000 .
- 6) Yamasaki, K., Sawaki, M. and Takatsuki, M.: *Environ. Health Perspect.*, **108**, 1147-1150, 2000 .