哺乳期雄ラットの前立腺の微細構造に対する ビスフェノール A 低用量投与の影響

福 森 信 隆*,田 山 邦 昭*,安 藤 弘*,久 保 喜 一*, 矢 野 範 男*,高 橋 博*,長 澤 明 道*,湯 澤 勝 広*, 坂 本 義 光*,小 縣 昭 夫*

Low Dose Effects of Bisphenol A on the Ultrastructure of Prostate in Suckling Male Rats

Nobutaka FUKUMORI*, Kuniaki TAYAMA*, Hiroshi ANDO*, Yoshikazu KUBO*, Norio YANO*, Hiroshi TAKAHASHI*, Akemichi NAGASAWA*, Katsuhiro YUZAWA*, Yoshimitsu SAKAMOTO* and Akio OGATA*

Low dose effects of bisphenol A (BPA) on the ultrastructure of ventral prostate in suckling male rats were investigated using thin-section electron microscopy. BPA (0, 0.8, 4, 20, 500 \(\)g/kg) or 17\(\)end{bmath} -estradiol (E2:100 \(\)g/kg) dissolved in DMSO were subcutaneously administered to suckling male rats from Day 1 through Day 21 after birth. An increase in secretory granules accompanied by (or coupled with) the disappearance of microvilli on the surface of the glandular epithelium and the proliferation of fibroblasts in the fibromuscular layer of the stroma were observed in the E2-treated rats. The secretory epithelial cell height of the prostate in the rats treated with E2 was essentially unchanged in comparison with those of the rats treated with DMSO only. Though a slight increase in secretory granules in the glandular epithelium was observed in the rats treated with 20 and 500 \(\)gBPA/kg, the alteration in the stroma was not salient in comparison with that of the rats treated with E2. These findings suggest that a low dose of BPA may exert estrogenic effects on the ventral prostate in suckling male rats at the ultrastructural level.

Keywords: ビスフェノール A bisphenol A , エストラジオール 17â-estradiol , 前立腺 prostate gland , ラット rat , 電子顕微鏡観察 electron microscopic observation

緒 言

内分泌かく乱作用が疑われる物質は,いわゆる環境ホルモンと称され,生体が持つ本来の内分泌系の機能を阻害すると考えられている.ヒトや野生生物の生殖機能や次世代に悪影響を与えることから,食物を含めて環境中でのヒトへの暴露が問題となっている.特に胎児期や乳幼児期の暴露は,その後の成育に与える影響が大きいと考えられるが,疫学的にはホルモン様作用が及ぼす生体への関与を十分に解明するには至っていない.

ビスフェノールA(BPAと略)は、ポリカーボネートやエポキシ樹脂及び歯科材料等に広く使用されている・哺乳びんや給食の食器から溶出が認められたことから ①、小児への摂取が懸念される・既に低用量の BPA の生体影響について、雌ラット及びマウスを用い子宮あるいは膣組織の微細構造の変化を観察して、粘膜上皮細胞を中心に女性ホルモン様作用を検索した・子宮では、上皮細胞の背高や内腔側微絨毛の伸長と細胞嵌合の増加が対照動物に比べて多く観察された・膣では、重層扁平上皮細胞の基底膜側の有

棘細胞の分化が多数みられ,細胞間隙の間橋や張原線維の増加が観察された.これらの変化は弱い作用ではあるが,陽性対照に使用した女性ホルモンであるエストラジオール(E2 と略)の投与でみられた微細構造の変化と同様な形態を示した $^{2.3}$.

これまでエストロゲンの高用量投与は,前立腺の発達を遅らせることが知られている.近年,マウスの胎児期に低用量の E2 を投与した時や合成の強力なエストロゲンであるジエチルスチルベストロール (DES と略) を妊娠中に投与した動物の子は,高用量とは反対の作用を受け,前立腺の重量が増加するという報告がある 4 .更に BPA に関して,2 及び 20 ìg/kg/dayで前立腺や包皮腺の肥大を観察し,精巣上体の萎縮を認めている.20 ìg/kg/dayでは精子の産生能力の低下を報告し,低用量域における内分泌かく乱作用の重大性に警告を発した 5 . これらの結果に対して,DES及び BPA の同用量で追試を行ったところ,前立腺の重量の増加や精子の産生能力に影響を及ぼさないという報告がある 6 .

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

^{*}Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

今回,性成熟の発達していない哺乳期雄ラットに BPA を投与した時の前立腺組織の微細構造に対する変化を電子顕微鏡(電顕と略)により観察し,雄動物におけるエストロゲン様作用を陰性及び陽性対照と比較検討した.

実験方法

被験物質及び実験動物:BPA(東京化成,Lot No GG01)は dimethyl-sulfoxide(DMSO と略,和光純薬,Lot No 349-0111025)に溶解し,0.8,4,20 及び 500 ìg/kg に調整した.陽性対照として DMSO に溶解した 100 ìg/kg の E2(シグマ,Lot No 28H0818)を用い,陰性対照には DMSO のみを投与した.また動物は,日本チャールスリバーの F344 ラットの哺乳期雄を各群 3 匹ずつ使用した.実験方法:DMSO に溶解した BPA と E2 及び陰性対照としての DMSO は,1 週当り 5 日間の割でラットの生後 1日目から 21 日目まで,1 日 1 回マイクロシリンジを用いて皮下注射した.投与液量は体重 1g 当り 1 ìL とした.22日目に解剖して,腹側前立腺を摘出し,2.5 %の冷グルタールアルデヒドの前固定液(0.1M 燐酸緩衝液)に浸漬した.

試料作製法:冷蔵庫内で3日間の前固定を行った後,一晩 燐酸緩衝液で洗浄し,1%オスミウム酸(pH7.3,0.1M 燐酸緩衝液)で2時間の後固定を実施した.オスミウム酸を緩衝液で洗浄後,50%からのエタノール系列で脱水し,置換剤(QY-1)処理を行い,Polybed 812 と Araldite の混合樹脂に包埋した.

超薄切片の作製前に,トルイジンブルーで光学顕微鏡用の準超薄切片を染色してから,トリミングを行った.超薄切片は,銀白色の約70 nm の厚さを得て,酢酸ウラニルとクエン酸鉛の二重染色を行った.検鏡は,150 メッシュのグリッドに載せ,加速電圧75 kv の透過型電顕(日立,H-7000型)を用いて観察した.

実験結果

前立腺上皮細胞の所見

Fig.1 は,DMSOのみ投与した陰性対照動物(対照と略)の腺上皮細胞を示した.この部の上皮細胞は,細長い単層の円柱上皮で形成され,基底部側に比較的大きい球形な核を有していた.細胞質内では,良く発達した粗面小胞体(RERと略)が豊富に存在し,中央部から管腔側にゴルジ装置が認められた.管腔側の遊離表面では,短い微絨毛が内腔に突出しているのが観察された.その部に近い上皮細胞内では,電子密度の高い小さな分泌顆粒が認められた.顆粒の層は全体に薄く,顆粒のみられない上皮細胞もあった.Fig.3a は,対照で管腔側の分泌顆粒の存在する部位としない部位を強拡大で示した.対照では,分泌顆粒の存在する上皮表面においても若干の微絨毛の伸長がみられない腺上皮では,更に多数の微絨毛の伸長が認められた.腺上皮細胞の背高は一様ではなく,管の大きさによって異なっていたが,多列化はみられなかった.

細胞の境界は,形質膜により明瞭に区切られていた.

E2 投与動物の前立腺上皮細胞を Fig.2 に示した .腺上皮では,一部多列化を認めるが,細胞の背高や核の位置,大きさ等,対照動物と比べて著しい変化はみられなかった.細胞質内では,小空胞の散在が認められたが,RER やゴルジ装置は,変化を認めなかった.管腔側の上皮細胞では,大小の形をした分泌顆粒が豊富にみられ,全体的に対照ラットより厚い層として認められた.Fig.3bに E2 投与での管腔側の遊離表面の拡大を示した.分泌顆粒は,小さな形のものほど電子密度の濃い均質な構造を呈していたが,大きい形では粗粒子状構造物を内包していた.顆粒の多い部の管腔内への微絨毛の伸長は減少しており,わずかに小突起を認めるに過ぎなかった.

Fig.4 から Fig.6 までは, BPA 投与動物の前立腺上皮細 胞を示した . Fig.4 は 4 ìg/kg 投与の電顕写真で, 不整な核 膜を持つ細胞がみられたが、核の形は陰性対照動物の上皮 細胞においても球形を示さない場合があるため,BPAに特 異的な変化ではなかった.また細胞質中の小空胞も同様に 対照でも認められ、RER やゴルジ装置の変化はみられなか った.管腔側の上皮細胞の一部には,分泌顆粒の蓄積を認 めるが存在しない部が多く、この遊離表面では多数の微絨 毛の伸長が観察された これらの管腔側の腺上皮の所見は , 陰性対照ラットと比べ変化を認めなかった .BPA の 20 ìg/kg 投与の像を Fig.5 に示した. 前立腺上皮細胞の背高 や核の配列,多列化は,対照動物と比較して著しい変化を 示さなかった.管腔に近い RER は,拡張して小空胞を形 成している細胞が一部に認められたが、消失や滑面小胞体 (SER と略)への移行は観察されなかった. Fig.5 は,特 に管腔側の上皮細胞で電子密度の異なる分泌顆粒の豊富な 蓄積を認めた部位の写真で、遊離表面の微絨毛の多くは消 失していた.分泌顆粒の蓄積に関して,20 ig/kgの所見は 顆粒の存在しない腺上皮もあるが,陰性対照動物の電顕像 より E2 投与による組織像に類似していた . Fig.6 は , 濃度 の高い 500 ig/kg 投与の前立腺上皮細胞を示した. 腺上皮 の背高は一定でないが、多列化はほとんどみられなかった. 細胞質内に小空胞の散在を認めるが、RER 及びゴルジ装置 は陰性対照と同様の像を呈していた.管腔側の上皮細胞で は、表面の大部分で微絨毛の消失を伴った分泌顆粒の蓄積 がみられ,20 ìg/kg と同様な所見が観察された.なお,0.8 ìg/kg 投与の上皮細胞では,顕著な変化は認められなかっ た.

間質の所見

Fig.7 は陰性対照動物の間質部を示した.腺上皮細胞を取り囲む間質では,上皮細胞の基底部側に2-3層の細長く伸びた線維芽細胞が観察され,中央部は膠原線維や平滑筋で構成されていた.

E2 投与動物の間質部を Fig.8 に示した .間質の線維筋層の軽度な増加がみられ,腺上皮の基底部側で線維芽細胞の増殖を観察した.また,平滑筋の増生が前立腺上皮細胞の周囲で認められた.

BPA 投与動物の 0.8 及び 4 ig/kg では,陰性対照と比べて変化がみられなかった .20 及び 500 ig/kg で,平滑筋や膠原線維の増生は認められなかった.しかし,写真で示さなかったが,軽度の線維芽細胞の増殖を伴った間質がみられた.

考 察

臨床的には,前立腺肥大や前立腺癌の治療にエストロゲ ンが使用されている.しかし,現在問題となっている環境 ホルモンは、微量で生物の内分泌バランスを破壊して様々 な影響を及ぼすという観点から,治療薬としてのエストロ ゲンと同一に考えることはできない.vom Saal らは,雄 マウスの胎児期に投与した低用量の E2(25 及び 100 ìg/kg) や DES (20 及び 200ìg/kg) が血清中の E2 濃度を上昇さ せ,8ヵ月後の成熟動物で前立腺重量の増加を見出した. 高用量(300ìg/kg)では血清中の E2 濃度は,投与量に伴っ て漸次上昇するが,低用量とは反対に前立腺重量が減少す ることを報告している.E2 の低用量でみられた前立腺重 量の増加は,エストロゲンがアンドロゲンの作用をかく乱 させ,前立腺の分化に影響を及ぼしていると推察している 4). また,妊娠11日から17日に投与した2及び20ìg/kg の BPA やオクチルフェノールにおいても包皮腺や前立腺 の重量の増加を認め,他の精巣上体では萎縮を報告してい る.これらの報告は,内分泌かく乱作用が疑われる物質の 低用量域における生殖器官や脳あるいは動物の行動に対し て,多大な影響を及ぼしていることを指摘した 5. 先に行 った雌動物の子宮や膣組織の微細構造の変化は,低用量の ホルモン様作用を検索する上で有用な方法であったため ^{2,3)},雄ラットの前立腺の微細構造の変化を把握することは, 低用量域での前立腺の重量の増加を解明するために,良好 な手段と考える.

前立腺は、分泌機能を行う RER やゴルジ装置が多い腺 上皮細胞と、その周囲を取り巻く間質から構成され、アン ドロゲンの影響を強く受けている. 今回行った出生後の哺 乳期に BPA や E2 を投与した動物の前立腺上皮細胞は,細 胞の背高や RER, ゴルジ装置に変化を認めないことから, 機能的には正常な機能が保持されていると考えられる.し かし,管腔側の遊離表面に蓄積した分泌顆粒は,E2 や 20 及び 500 ìg/kg で増加傾向がみられ,微絨毛の消失を伴っ ていることから,分泌顆粒の放出にエストロゲンの関与が 示唆される. 成熟動物に 1 mg/kg の高濃度の estradiol valerate を 10 日間皮下注射したラットの腹側前立腺の組 織構造に対する報告は,去勢をしていない動物にエストロ ゲンを与えると抗アンドロゲン作用で上皮細胞の背高が低 くなり,分泌顆粒の蓄積が減少することを観察した.別に 去勢した動物では,エストロゲンである estradiol valerate の上皮細胞に対する影響は,明瞭な変化を認めていない7. このことは,前立腺上皮細胞に対して estradiol valerate 単独では著しい変化を惹起させないが、アンドロゲンに対 して拮抗的に作用することを示唆している.

一方間質部において,本実験では哺乳期投与の E2 で線 維筋層の軽度の増加がみられ,中でも線維芽細胞の増殖や 平滑筋の増生を認めた.また, BPA の 20 ìg/kg からも軽 度な線維芽細胞の増殖を認めた.去勢したラットの成熟動 物に estradiol valerate を与えると,間質で平滑筋の大き さや数が増加するという報告がみられる ♡. 加えて,新生 児ラットに25 ìg/kgの estradiol benzoate を皮下注射した 動物の間質では,線維芽細胞の増殖がみられ,これはエス トロゲンレセプターáの活性によるところが大きく, estradiol benzoate の直接作用と推察し,線維筋層の増加 は,間質細胞と腺上皮細胞の分化をコントロールしている と報告している®.また, estradiol cypionate を出生後5 時間以内のマウスに皮下投与した3週後の前立腺では,炎 症を惹起させる.好中球は,間質や腺上皮細胞から管腔内 へ移行し ,リンパ球の浸潤は 間質や上皮細胞内でみられ, 平滑筋を通過して上皮細胞で観察されることから、平滑筋 が前立腺におけるエストロゲン作用の標的になっていると 考察している報告がある 9. 今回の哺乳期ラットへの投与 では,炎症を呈する像は明確ではなかった.

前立腺の部位による比較で,去勢したラットに3日間皮下注射して1日後解剖した動物では,外側前立腺に低用量の1 ig/kg で RER の減少や小空胞の出現がみられ,高用量の100 ig/kg で腺上皮細胞の背高の低下や細胞内小器官の減少,分泌顆粒の遊離表面での蓄積を認めている.これに対して,腹側前立腺での影響は少ないと報告している100、今回の哺乳期ラットの腹側前立腺のエストロゲン様作用がいくぶん弱かったことは,摘出した部位による差異とも考えられる.

概して前立腺に対する E2 の作用は,投与量や投与条件, 摘出部位等により種々の変化の相違が想定される.エスト ロゲンに感受性が高い C57BL/6N 系のマウスを用いて,成 熟動物及び授乳期の未成熟動物あるいは胎児期の各段階で 2,20 及び 200 ìg/kg の BPA 投与の影響を調べた.その結 果,体重や臓器重量,精子数あるいは腹側前立腺を含む病 理組織変化が検出できなかったことから,BPAの低用量で の影響は認められないという報告もある 11) .BPA の低用量 が齧歯動物へ与える影響に関して,動物種や系統によって **も作用が異なるため極めて複雑であり,主に経口的に摂取** されるヒトへの有害作用を検索するという目的から、環境 ホルモンの検出法に対して再評価の必要性を論じた報告が ある 12) . 本実験での哺乳期投与によるラットの前立腺の微 細構造に対して,BPAの低用量の影響は,対照と比較して, E2 投与に多くみられた上皮細胞の分泌顆粒の蓄積が20及 び 500 ìg/kg で軽度な増加を認めた.間質では,E2 投与 でみられた線維筋層での平滑筋や線維芽細胞の増殖は, BPA 投与では顕著でなかった.このような今回ラットで観 察された分泌顆粒の蓄積や間質での結合組織の観察等を踏 まえて,マウス等の他種動物を用い,BPAの低用量の影響 を今後検討する必要がある.

文 献

- 1) 船山惠市,渡辺悠二,金子令子,他:東京衛研年報, **50**,202-207,1999.
- 2) 福森信隆,小縣昭夫,安藤 弘,他:環境ホルモン学 会第3回研究発表会要旨集,300,2000.
- 3) 福森信隆, 多田幸恵, 安藤 弘, 他:環境ホルモン学 会第4回研究発表会要旨集, 315, 2001.
- 4) vom Saal, F.S., Timms, B.G., Montano, M.M., *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 2056-2061, 1997.
- 5) vom Saal, F, S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L., *et al.*: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260, 1998.
- 6) Ashby, J., Timwell, H. and Haseman, J., Regul. *Toxicol. Pharm.*, **30**, 156-166, 1999.

- 7) Thompson, S.A., Rowley, D.R. and Heidger, P.M., : *Invest. Urol.*, **17**, 83-89, 1979.
- 8) Chang, W.Y., Wilson, M.J., Birch, L., *et al.* : *Endocrinology*, **140**, 405-415, 1999.
- 9) Kawamura, H., Nonogaki, T., Yoshikawa, K., et al.: Ann. Anat., **182**, 269-274, 2000.
- 10) Timms, B.G. and Chandler, J.A. : *Prostate*, **6**, 61-79, 1985.
- 11) Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K., et al.: Reprod. Toxicol., **16**, 123-130, 2002.
- 12) Milman, H.A., Bosland, M.C., Waldem, P.D., et al.: Regul. Toxicol. Pharmacol., **35**, 338-346, 2002.

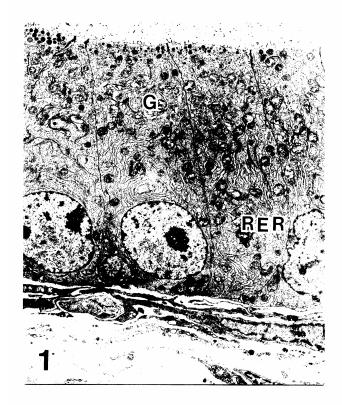


Fig.1. Electron micrograph of ventral prostate from a control rat (DMSO). The presence of rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi apparatus (G) are observed in the columnar epithelium. (x 3,800)

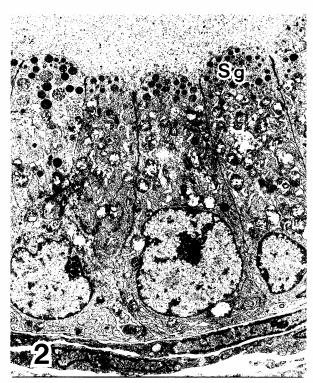


Fig.2. Prostate epithelium from a rat treated with estradiol (E2). The increase of secretory granules (Sg) is found near the apical surface. (\mathbf{x} 4,400)

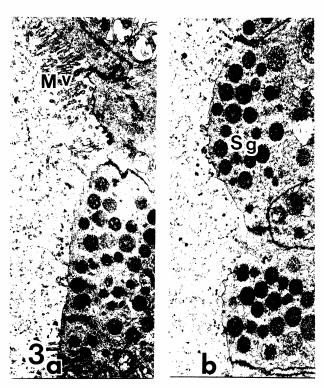


Fig.3. Higher magnification of the apical surface of glandular epithelium. The disappearance of microvilli (Mv) and the abundant granules (Sg) are often seen in E2-treatment rat (b) compared to the control (a). (x 11,000)

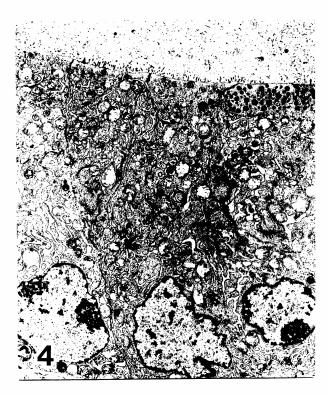


Fig.4. Prostate epithelium from a rat treated with 4 ig BPA during suckling. No abnormalities are observed. (x 4,400)

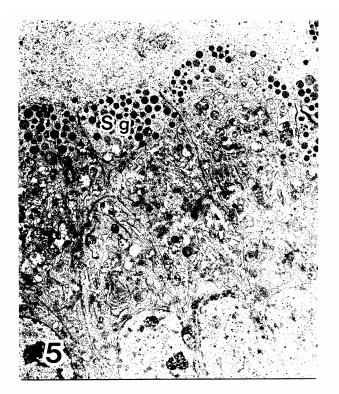


Fig.5. Prostate epithelium from a rat treated with 20 ig BPA. A number of secretory granules (Sg) are present at the apical surface of glandular epithelium. The microvilli are scarcely observed. (x3,800)

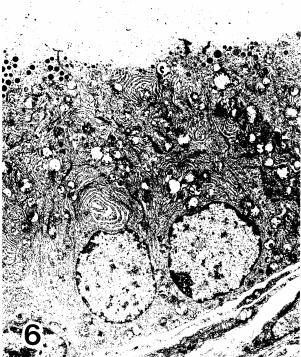


Fig.6. Prostate epithelium from a rat treated with a high dose of 500 ìg BPA. Some alteration are similarly observed in comparison with a 20 ìg BPA-treated rat. (x 4,400)



Fig.7. Electron micrograph of stroma from a control rat prostate gland. Fibroblast and collagen fiber are present at periductal matrix. (x 3,000)



Fig.8. Prostatic stroma from a rat treated with E2. The increased smooth muscle becomes more electron dense. (x 3,000)