

## SD ラット雄性生殖器における難燃剤テトラブロモ ビスフェノール A 新生児投与の影響

多田幸恵<sup>\*</sup>, 坂本義光<sup>\*</sup>, 矢野範男<sup>\*</sup>, 田山邦昭<sup>\*</sup>, 高橋博<sup>\*</sup>,  
湯澤勝廣<sup>\*</sup>, 安藤弘<sup>\*</sup>, 久保喜一<sup>\*</sup>, 長澤明道<sup>\*</sup>, 小縣昭夫<sup>\*</sup>

### Effects of Neonatal Exposure of Tetrabromobisphenol A, a Flame Retardant, in the Reproductive Organ of SD Male Rats

Yukie TADA<sup>\*</sup>, Yoshimitsu SAKAMOTO<sup>\*</sup>, Norio YANO<sup>\*</sup>, Kuniaki TAYAMA<sup>\*</sup>,  
Hiroshi TAKAHASHI<sup>\*</sup>, Katsuhiko YUZAWA<sup>\*</sup>, Hiroshi ANDO<sup>\*</sup>, Yoshikazu KUBO<sup>\*</sup>,  
Akemichi NAGASAWA<sup>\*</sup> and Akio OGATA<sup>\*</sup>

Tetrabromobisphenol A [ 2,2-bis-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-propane; TBBPA ], a brominated flame retardant, is produced in large amounts globally for use in electronic equipment, plastics, and building materials. TBBPA has been detected in air at dismantling plants, offices with computers, in sewage sludge, sediment and human serum samples.

In the present study, we examined the neonatal low dose effects of TBBPA on male reproductive organs and spermatogenesis. TBBPA, of at least 98.7% purity, was dissolved in dimethyl sulfoxide and administered to neonatal Sprague-Dawley rats at doses of 0(control), 1, 10, 100 and 1000 µg/kg body weight from post natal day (PND) 1 through 10 by subcutaneous injection using micro-syringe with dose volume of 1 mL/kg body weight. The offspring, 70 days-of-age, were anesthetized under ether and necropsied, then the reproductive organs and sperm production were examined. The results showed that the preputial gland weights were slightly higher, the averages of preleptotene spermatocyte, pachytene spermatocyte and round spermatid were slightly decreased, and the cauda epididymal sperm reserves were slightly decreased, in treated rats. However, there were no statistical differences between the control and treated groups.

**Keywords :** テトラブロモビスフェノール A tetrabromobisphenol A, 難燃剤 flame retardant, ラット rat, 精子 sperm, 生殖器 reproductive organ, 新生児投与 neonatal exposure

### 緒 言

プラスチック難燃剤テトラブロモビスフェノール A Tetrabromobisphenol A [ 2,2-bis-(3,5-dibromo-4-hydroxyphenyl)-propane; TBBPA ]は世界中で最も多く使われている臭素系難燃剤で, ABS 樹脂, エポキシ樹脂, ポリカーボネート樹脂及び接着剤等に反応性あるいは添加難燃剤として用いられる<sup>1)</sup>. 2002 年アジアにおける TBBPA の需要は 110,000 トンで世界の使用量の 84.6%にあたる(www.bsef.com). 環境中濃度の分析では, スエーデンの廃水処理工場泥から n.d.-220 ng/g 湿重量<sup>2)</sup>, スエーデンのプラスチック工場下流の底質から 270 ng/g 乾燥重量, 上流の底質から 34 ng/g 乾燥重量<sup>3)</sup>の報告がある. プラスチック分解工場あるいはコンピュータを設置した事務室の空气中濃度は, それぞれ 55 あるいは 0.066 pmol/m<sup>3</sup>

であった<sup>4)</sup>. 近年ヒト血清中濃度の上昇が報告され<sup>5)</sup>, Jakobsson らはコンピュータ技師の血清中濃度を測定し 10 人中 8 人の血清から TBBPA を検出した<sup>6)</sup>.

TBBPA の毒性に関しては, 経口半数致死量(LD<sub>50</sub>)がラットで>5 g/kg 体重, マウスで>4 g/kg 体重, 皮膚塗布による LD<sub>50</sub>がウサギで>2 g/kg 体重の報告がある<sup>7)</sup>. ラットに経口投与された TBBPA は 3 日以内に主に糞便中に排泄され(91.7%), 少量が尿中に排泄される(0.3%)<sup>8)</sup>. TBBPA の反復投与毒性及び発生毒性は, 影響が無い, あるいは低いとの報告が多い<sup>7)</sup>. しかしながら最近, Meerts らは in vitro の実験で, ヒトのトランスサイレチンに対する T4 の結合を TBBPA が競合的に阻害すると報告し<sup>9)</sup>, 北村らは甲状腺ホルモンレセプター(TR) 結合試験で TR に対するトリヨードチロニン(T3)の結合を TBBPA が阻害するとの

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

報告をした<sup>10)</sup>。これらの結果は TBBPA が甲状腺ホルモンの恒常性に影響を与える可能性を示唆している。また培養細胞を用いた実験で Pullen らは TBBPA が免疫毒性を示したと報告している<sup>11)</sup>。

TBBPA の構造式はエストロゲン作用が問題とされるビスフェノール A (BPA)によく似ていることから、TBBPA についてもホルモン作用が懸念されるが、これまで TBBPA の生殖器系への影響は報告されていない。今回我々は、雄のラットを用い、生殖器の発達及び精子形成に及ぼす TBBPA の影響を検討した。

#### 実験方法

**被検物質** テトラブロモビスフェノール A 標準品(Lot No. 205G7207;純度 98.7%以上)は、関東化学から購入、ジメチルスルホキシド DMSO (Lot No. TCM7031)は和光純薬から購入した。

**動物** 18 匹の Crj:CD(SD)妊娠ラットをチャールスリバー・ジャパンから購入し、クリーンチップ(日本クレア)を敷いたプラスチックケージに 1 匹ずつ収容し、温度 22-24℃、湿度 50-60%、照明 12 時間の飼育室で、基礎飼料 CE-2 及び水を自由に摂取させ飼育した。自然分娩後、1 腹あたり 2-3 匹の雄の仔ラットを選び、親ラット 1 匹に 10 匹の雄の仔ラットを哺育させた。出生日を出生後 0 日(PND0)とし、PND21 に離乳し、その後は自動給水装置付きベルト式飼育棚のステンレス製懸垂式ケージに 5 匹ずつ収容し、CE-2 及び水を自由に摂取させ飼育した。

**投与** ラットの雄性生殖器発達の臨界期は出生直後にある<sup>12)</sup>ことから、今回の実験は TBBPA の投与を新生児期に行った。TBBPA は DMSO に溶解し、投与用量 0(対照群)、1, 10, 100 及び 1000 µg/kg 体重、投与液量 1 mL/kg 体重で新生児ラットに PND1~PND10 まで 1 日 1 回 10 日間マイクロシリンジを用いて背部皮下投与した。投与期間中は全ラットを毎日体重測定し、その後試験終了まで 1 週間

に 1 度体重測定した。

**病理検索** 仔ラットが 70 日齢(10 週齢)に達した時にエーテル軽麻酔下で放血致死させ解剖し、精巣、精巣上部、腹部前立腺及び包皮腺を摘出し、重量測定した。左側の精巣と精巣上部は精子数の計測時まで-80℃の冷凍庫で保存した。右側の精巣及び精巣上部はブアンの固定液で固定、他の器官は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。精嚢は中性緩衝ホルマリン液で固定後、凝固腺を取り除き重量を測定した。固定後、定法に従い HE 標本及び PAS 標本を製作し、組織検索した。

**精子形成細胞の定量** 精巣の HE 標本で、精子形成サイクルのステージ及びの精細管のうち、断面が正円形に近い精細管を動物 1 匹あたり 5 選出し、それぞれの精細管について、セルトリ細胞、精祖細胞、プレレプトテ期精母細胞、パキテ期精母細胞、球形(round)精子細胞の数を計数した。精子形成細胞の分類は Russell らの基準<sup>13)</sup>に従った。精子形成細胞それぞれの計数値から 1 精細管あたりの平均値を算出し、セルトリ細胞あたりの精子形成細胞数で表した。

**精巣及び精巣上部尾部の精子数の計測** 精子数の計測は Robb らの方法<sup>14)</sup>を改変した大石の方法<sup>15)</sup>で行った。ラットの精子形成サイクルのステップ 17-19 過程には 6.1 日を要することから<sup>14)</sup>、精巣中の精子数及び精巣 g あたりの精子数をそれぞれ 6.1 で除し、一日精子産生量(DSP)及び精子産生効率(Efficiency; DSP/g of testis)を求めた。同様に、精巣上部尾部の精子数(Reserves)及び尾部 g あたりの精子数(Concentration)を求めた。

**統計学的解析** 対照群と投与群間の差を、Scheffe の多重比較検定<sup>16)</sup>で解析した。

#### 結果

一般症状、体重及び器官重量 試験期間中の一般症状観察で、投与に関連した変化は見られなかった。最終体重及

Table 1. Final Body and Organ Weights in SD Rats treated with Tetrabromobisphenol A<sup>a</sup>

	TBBPA (µg/kg body wt.)				
	0 (control)	1	10	100	1000
Examined number of rats	10	9	10	8	10
Final body weight (g)	392.9±21.9	392.5±21.1	383.1±22.0	391.6±33.9	386.0±38.4
<b>Absolute organ weight (mg)</b>					
Testes	3129.3±221.6	3113.3±162.4	3054.3±225.8	2921.4±182.3	3137.2±157.6
Epididymides	735.6±80.3	732.3±45.1	708.0±54.0	694.9±78.6	726.5±56.4
Ventral prostates	547.1±98.8	550.4±89.5	525.9±90.0	527.2±87.1	544.4±155.0
Seminal vesicles (fixed)	780.4±80.8	831.4±129.8	742.0±143.8	750.0±81.4	730.4±100.7
Preputial glands	84.2±16.4	100.6±39.4	111.8±40.7	104.7±40.7	102.9±34.9
<b>Relative organ weight (mg/100g body weight)</b>					
Testes	798.8 ± 72.9	794.6 ± 46.3	799.1 ± 66.1	751.6 ± 85.5	817.4 ± 61.0
Epididymides	188.2 ± 25.9	186.9 ± 12.2	184.9 ± 10.1	178.6 ± 24.1	188.9 ± 12.1
Ventral prostates	139.9 ± 28.2	140.4 ± 22.5	137.4 ± 23.1	134.9 ± 19.8	140.8 ± 34.2
Seminal vesicles (fixed)	199.4 ± 24.1	211.0 ± 22.8	193.0 ± 30.8	193.4 ± 31.1	190.8 ± 29.9
Preputial glands	21.5 ± 4.4	25.8 ± 10.7	29.1 ± 10.3	27.2 ± 11.8	26.6 ± 8.7

<sup>a</sup>Values are mean±SD.

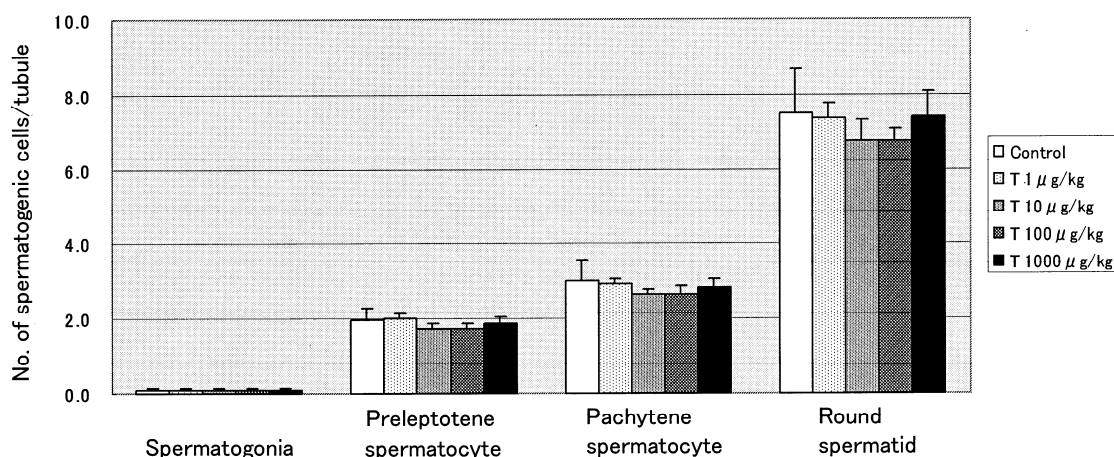


Fig. 1. Number of Spermatogenic Cells in Seminiferous Tubules of Rats treated with Tetrabromobisphenol A. The data were expressed as the numbers of spermatogenic cells per Sertoli cell per seminiferous tubule. Values are mean±SD for ten rats, except where nine and eight for 1 and 100 μg/kg groups, respectively.

び器官重量を Table 1 に示した。包皮腺の絶対重量及び体重 100 g あたりの相対重量が、対照群と比較し投与群で高い値を示したが統計学的に有意な差は認められなかった。包皮腺を除く生殖器の重量及び最終体重には投与による影響はみられなかった。

病理検索 精巣、精巣上体、前立腺、精嚢及び包皮腺の組織検索では、対照群との比較で TBBPA 投与による影響は観察されなかった。

精子形成細胞の定量 精子形成細胞の計数結果を Fig. 1 に示した。対照群、TBBPA 1, 10, 100 及び 1000 μg/kg 投与群のセルトリ細胞数は、それぞれ  $25.0 \pm 3.9$ ,  $25.4 \pm 2.7$ ,  $27.5 \pm 2.3$ ,  $26.5 \pm 2.4$  及び  $25.7 \pm 3.0$  で、対照群と比較し投与と各群で有意な差はみられなかった。精細管中の精子形成細胞の計数では、TBBPA 10 及び 100 μg/kg 投与群のプレレプトテン期精母細胞、パキテン期精母細胞及び球形 (round) 精子細胞のそれぞれの数が対照群と比較し低い値を示したが、統計的に有意な差ではなかった。

精巣及び精巣上体尾部の精子数の計測 精巣の精子計数結果を Table 2 に、精巣上体尾部の精子計数結果を Table 3 に示した。一日精子産生量 (DSP) 精子産生効率 (Efficiency) とともに TBBPA 投与による有意な変化はみられなかった。

Table 2. Sperm Counts in the Testis of Rats treated with Tetrabromobisphenol A<sup>a</sup>

TBBPA (μg/kg BW)	DSP <sup>b</sup> (x10 <sup>6</sup> )	Efficiency <sup>c</sup> (x10 <sup>6</sup> )
0 (control)	25.1 ± 3.34	17.5 ± 1.50
1	26.8 ± 2.20 (9)	18.8 ± 1.43 (9)
10	26.4 ± 2.79	18.6 ± 1.38
100	25.0 ± 1.91 (8)	18.5 ± 0.83 (8)
1000	25.8 ± 1.71	17.8 ± 1.31

<sup>a</sup>Values are mean±SD for ten rats, except where other numbers are indicated in brackets.

<sup>b</sup>Daily sperm production.

<sup>c</sup>DSP/g of testis.

Table 3. Sperm Counts in the Cauda Epididymis of Rats treated with Tetrabromobisphenol A<sup>a</sup>

TBBPA (μg/kg BW)	Reserves (x10 <sup>6</sup> /cauda)	Concentration (x10 <sup>6</sup> /g cauda)
0 (control)	95.8±16.9	609.0±61.2
1	85.9±16.1 (9)	548.9±81.1 (9)
10	87.2±9.55	562.2±51.2
100	81.4±17.3 (8)	544.3±59.3 (8)
1000	84.0±9.12	538.9±43.8

<sup>a</sup>Values are mean±SD for ten rats, except where other numbers are indicated in brackets.

精巣上体尾部の精子数 (Reserves) 及び尾部 g あたりの精子数 (Concentration) は、TBBPA 1 及び 100 μg/kg 投与群でやや低い値を示したが、対照群と比較し有意な差ではなかった。

## 考 察

TBBPA はエストロゲン様活性が問題とされる BPA に臭素が 4 つ結合した構造をしている。BPA 投与が生殖器に及ぼす影響に関してはこれまでいくつか報告がある。Vom Saal らは低用量の BPA をマウスの母体に投与し、仔マウスで包皮腺重量の増加、精巣上体重量の減少及び精子産生効率の低下が認められたと報告している<sup>17)</sup>。Gupta はラット胎児への BPA 投与が雄仔ラットの生殖機能に影響を与えるかどうかを検討し、BPA が前立腺の成長を促進させるという結果を報告した<sup>18)</sup>。一方、BPA には内分泌攪乱作用が認められないという報告もある<sup>19-22)</sup>。今回、我々は新生児ラットに TBBPA を低用量投与し、成熟した段階で精巣、精巣上体など生殖器の発達と精子産生能を検索した。その結果、TBBPA 投与群で包皮腺重量の軽度な増加、精巣の精細管における精母細胞及び精子細胞数の軽度な減少、精巣上体尾部の精子数の軽度な減少を認めた。しかしこれら

の変化はいずれも統計学的に有意な差ではなく、生殖器の器官重量に有意な差がみられなかったことを考慮すると、今実験条件下において TBBPA のホルモン作用は、明らかでなかったと考えられる。

Ashby らは BPA 経口投与による精子産生能の変化を検討したレポートの中で、DSP 実測値を 1995 年～2002 年に報告された 34 報の論文の DSP 値と比較している。Ashby らが引用した論文のコントロールラットの DSP/g 精巢 (Efficiency) の平均値は  $18.5 \pm 3.5$  (mean  $\pm$  SD) であった<sup>20)</sup>。今回我々の試験における Efficiency は、対照群で  $17.5 \pm 1.50$ 、TBBPA 処理群で  $17.8 \pm 1.31 \sim 18.8 \pm 1.43$  であり、コントロールラットの平均値に近いものであった。

新生児期におけるエストロゲンの投与は、セルトリ細胞数と精子形成能に変化をもたらすとの報告があるが<sup>23, 24)</sup>、今回の試験では、TBBPA 1～1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  体重の新生児投与は生殖器の発達及び精子形成能に明らかな影響を及ぼさなかった。Samuelsen らは MCF-7 細胞を用いて、BPA と TBBPA、mono-BBPA、di-BBPA 及び tri-BBPA のエストロゲン様活性を比較した。その結果、プロモビスフェノール A に関しては臭素の数が少ないほどエストロゲン活性が強いことを報告している<sup>25)</sup>。また Meeerts らも T47D 乳ガン細胞を用いた実験で、プロモビスフェノール A のエストロゲン様活性は臭素化が低いほど活性が高いと報告している<sup>26)</sup>。TBBPA による生殖器系への影響が明らかでなかった今回の結果は、TBBPA のエストロゲン様活性の弱さを反映した結果であるかもしれない。

TBBPA は環境中に容易に蓄積せず、強い毒性を示さない安全な不燃剤として開発された。しかしながら最近、TBBPA が甲状腺あるいは免疫機能に影響を与えるとの結果が報告された<sup>9-11)</sup>。TBBPA は、プラスチック器具・機材の生産、使用、特に使用済みの器具・機材の破壊工程において環境中に放出される。TBBPA の職業暴露には十分な注意が払われるべきである。一般の人が TBBPA を取り込む経路は主に食物を通じてであり、特に動物由来の油脂からが多いとされるが<sup>27)</sup>、コンピュータ技師の血清から TBBPA が検出されたとの報告は<sup>6)</sup>、空気中からの TBBPA 暴露も無視できないことを示している。ノルウェイの血清バンクに 1977～1981 年に貯蔵された血清からは TBBPA が検出されなかったが、1986～1999 年に貯蔵された血清からは TBBPA が検出された<sup>5)</sup>。今回の試験では TBBPA の新生児投与による生殖器への影響は明らかでなかったが、投与期間、投与濃度を変えたさらなる検討が必要であると思われる。

#### 文 献

- 1) Wit, C.A.: *Chemosphere*, **46**, 583-624, 2002.
- 2) Öberg, K., Warman, K. and Öberg, T.: *Chemosphere*, **48**, 805-809, 2002.
- 3) Sellström, U. and Jansson, B.: *Chemosphere*, **31**, 3085-3092, 1995.
- 4) Bergman, Å., Athanasiadou, M., Klasson, W.E. et al.: *Organohalogen Compd.*, **43**, 89-92, 1999.
- 5) Thomsen, C., Lundanes, E. and Becher, G.: *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1414-1418, 2002.
- 6) Jakobsson, K., Thuresson, K., Rylander, L. et al.: *Chemosphere*, **46**, 709-716, 2002.
- 7) WHO/IPCS: *Environ. Health Criteria*, **172**, 1995, Geneva, Switzerland.
- 8) Hakk, H., Larsen, G., Bergman, A. et al.: *Xenobiotica*, **30**, 881-890, 2000.
- 9) Meerts, I.A., Zanden, J.J., Luijckx, E.A. et al.: *Toxicol. Sci.*, **56**, 95-104, 2000.
- 10) Kitamura, S., Jinno, N., Ohta, S. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **293**, 554-559, 2002.
- 11) Pullen, S., Boecker, R. and Tiegs, G.: *Toxicology*, **184**, 11-22, 2003.
- 12) Lee, P.C.: *Endocrine*, **9**, 105-111, 1998.
- 13) Russell, L.D., Ettlin, R.A., Hikim, A.S. et al.: Staging for laboratory species. In *Histological and histopathological evaluation of the testis*, 62-118, 1990, Cache River Press, United States.
- 14) Robb, G.W., Amann, R.P. and Killian, G.J.: *J. Reproduction and Fertility*, **54**, 103-107, 1978.
- 15) Oishi, S.: *Toxicol. Ind. Health*, **17**, 31-39, 2001.
- 16) Gad, S.C. and Weil, C.S.: Statistics for toxicologists. In Hayes, A.W. (Ed), *Principles and methods of toxicology*, 3rd edn., 221-274, 1994. Raven Press, New York.
- 17) Vom Saal, F.S., Cooke, P.S., Buchanan, D.L. et al.: *Toxicol. Ind. Health*, **14**, 239-260, 1998.
- 18) Gupta, C.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **224**, 61-68, 2000.
- 19) Ashby, J., Tinwell, H. and Haseman, J.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 156-166, 1999.
- 20) Ashby, J., Tinwell, H., Lefevre, P.A. et al.: *Toxicol. Sci.*, **74**, 129-138, 2003.
- 21) Nagao, T., Saito, Y., Usumi, K. et al.: *Reprod. Toxicol.*, **13**, 303-311, 1999.
- 22) Cagen, S.Z., Waechter, J.M. Jr, Dimond, S.S. et al.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **30**, 130-139, 1999.
- 23) Atanassova, N., McKinnell, C., Walker, M. et al.: *Endocrinology*, **140**, 5364-5373, 1999.
- 24) Sharpe, R.M., Atanassova, N., McKinnell, C. et al.: *Biol. Reprod.*, **59**, 1084-1094, 1998.
- 25) Samuelsen, M., Olsen, C., Holme, J.A. et al.: *Cell Biol. Toxicol.*, **17**, 139-151, 2001.
- 26) Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S. et al.: *Environ. Health Persp.*, **109**, 399-407, 2001.
- 27) Darnerud, P.O., Eriksen, G.S., Johannesson, T. et al.: *Environ. Health Perspect.*, **109**, 49-68, 2001.