

論文の内容の要旨

獣医学 専攻

平成 10 年度博士課程 入学

氏名 坂上 元栄

指導教官 林 良博

論文題目 精巢内ステロイド合成系へのエストロゲンおよび

内分泌かく乱化学物質ビスフェノール A の影響に関する研究

近年、ヒトの射出精子数が減少しているという報告があり、種の存続を脅かす可能性があることから、学術分野だけではなく広く一般の関心も集めている。この原因として、環境中に存在するエストロゲン作用を示す物質が正常な内分泌系を乱す、いわゆる内分泌かく乱作用を示すことでヒトの精子発生を妨げているとする仮説がある。一方で、雄個体におけるエストロゲンの存在が報告されて以来、その生理学的な役割については不明であったが、近年になって、生殖器系においても直接的に重要な役割を持つことが報告されてきた。そのエストロゲンの作用の一つとして、精子発生に不可欠であるテストステロン産生抑制作用があるが、エストロゲンがテストステロンを合成するステロイド合成系に及ぼす影響について分子生物学的に検討した報告は少ない。本研究では、エストロゲンがステロイド合成系に関与する遺伝子の発現に与える影響を明らかにすることを目的とし、さらに、エストロゲン様活性をもち内分泌かく乱化学物質とされるビスフェノール A (BPA) がステロイド合成系に与える影響を明らかにすることを目的とする。

第 I 章では、まず、BPA の精子発生への影響について検討した。13 週齢の雄

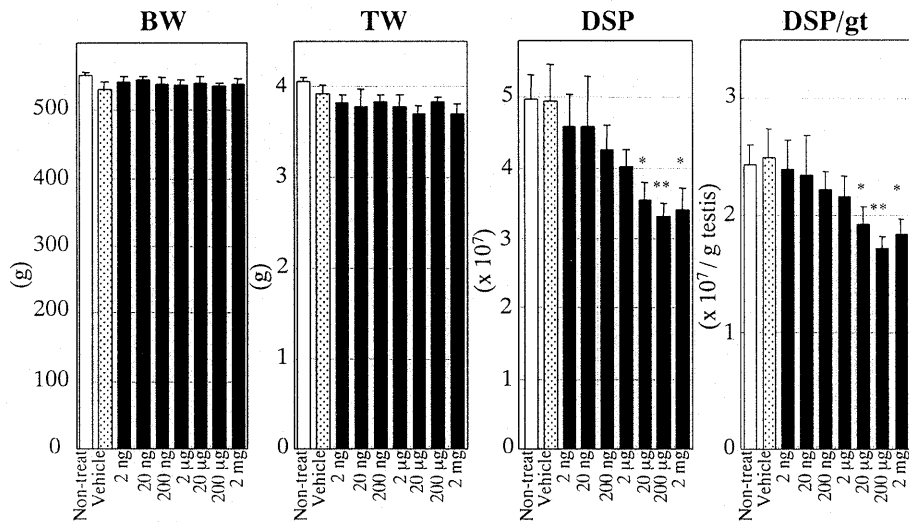


図1 W18の成熟SDラットにおけるBPAの影響。有意差は対照群（Vehicle）と比較したものを示した。図の値はSEMで表示している。*はP<0.05, **はP<0.005を示している。

Sprague-Dawley (SD) ラットにBPAを6日間強制経口投与し、投与開始8日目(W14)および36日目(W18)に解剖し、体重(BW)、両側精巣重量(TW)、1日精子産生数(DSP)、精巣重量あたりのDSP(DSP/gt)を測定した。W14ではいずれも有意な変化は見られなかった。W18において、両側精巣重量が減少傾向を示し、DSPおよびDSP/gtは有意な減少を示した(図1)。さらにBPAの精巣タンパク質発現への影響を検討するため、W13の雄ラットにBPA 20 μg/kg体重を単回投与し、精巣の細胞質分画を2D-PAGEにより解析したところ、投与群においていくつかのスポットに変化が見られたことから、BPAが精巣に対して影響を与えていることがタンパク質レベルにおいても示された。

一般的にBPAはエストロゲン作用を持つ化学物質とされており、精子発生に重要であるテストステロン産生に影響することが考えられる。しかしながら、エストロゲンのテストステロン産生抑制機序については不明な点が多い。そこで、第II章では、まず、精巣のステロイド合成系におけるエストロゲンの作用を検討した。雄SDラットにEstradiol-3-benzoate(EB)を筋肉内に単回投与し、24時間後に血清中黄体形成ホルモン(LH)レベル、精巣内のテストステロンレベルおよびステロイド合成酵素mRNAレベルを観察した。EB投与により、血清中LHレベルは変化を示さなかったが、ラットの精巣内テストステロンレベルは著しく減少した。半定量的RT-PCR法による解析から、EB投与により、テストステロン合成に関与する四つのステロイド合成酵素のうち、シトクロームP450側鎖切断酵素

(P450scc), シトクローム P450 17 α -hydroxylase/C₁₇₋₂₀ lyase (P450c17) および 17 β -ヒドロキ
 システロイド脱水素酵素 III 型 (17 β -HSD-III) の発現が有意に減少し, 3 β -ヒドロキシステ
 ロイド脱水素酵素 I 型 (3 β -HSD-I) の発現には変化がなかった (図 2)。さらに EB 2 μ g/kg
 体重を腹腔内投与し, 投与 1, 2, 6 時間後の変化を解析したところ, 血清中 LH レベルは減
 少していたが, 精巣内テストステロンレベルは投与 1 時間後に増加し, その後は減少した。
 この精巣内テストステロンレベル変化に対応して, ステロイドホルモン合成短期調節タン
 パク (steroidogenic acute regulatory protein: StAR) の発現が有意に上昇していた。これらの結
 果から, 投与初期には StAR の発現増加により一過性にテストステロン産生が亢進し, その
 後, P450scc, P450c17 の発現が減少することでテストステロン産生が抑制されることが明
 らかになった。

第 III 章では, BPA 投与によるステロイド合成系への影響を観察した。BPA 200 mg/kg

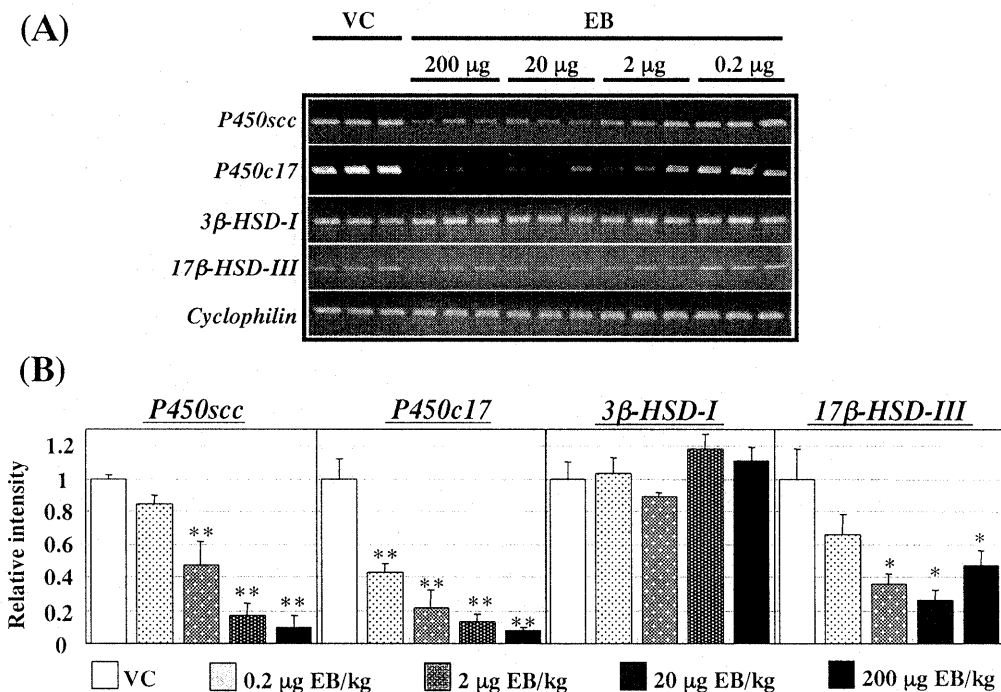


図 2 成熟ラット精巣における, テストステロン合成系で働く四つのステロイド合成酵素 mRNA レベルへの EB の影響を半定量的 RT-PCR にて解析した結果。(A) は PCR 産物をアガロースゲルを用いて電気泳動したパターン, (B) は Cyclophilin の発現量で除し, 標準化した値を, 対照群の平均値に対する相対平均値 \pm 標準誤差で示した。統計学的解析は分散分析後, post hoc test として Fisher's PLSD test を使用した (*, $P < 0.01$; **, $P < 0.001$)。

体重を 6 日間強制経口投与し、投与開始 8 日目における血清中テストステロンレベル、精巣内のステロイド合成系に関わる主な遺伝子の mRNA レベルをリアルタイム PCR にて観察したところ、血清中テストステロンレベルが減少しており、ステロイド合成酵素では、P450scc の発現だけが有意に減少していた。さらに BPA 2 mg/kg 体重の単回経口投与による経時的な影響についても検討した。血清中 LH レベルは投与 1 時間後で減少した。精巣内テストステロンレベルは投与 0 時間後と比較して投与 2 時間後には上昇し、3 時間後では減少する傾向にあった。精巣内のステロイド合成系に関わる主な遺伝子の mRNA レベルは、投与 2 時間後には、テストステロンの原料となるコレステロールの細胞内への取り込みを担う Scavenger receptor, class B, type I (SRBI) および P450scc の発現が増加していた。従って、BPA 投与初期には SRBI および P450scc の増加がテストステロン産生の増加を引き起こし、6 日間投与後におけるテストステロンの減少は P450scc の減少によることが明らかになった。

以上のことから、エストロゲンによるテストステロン産生抑制はステロイド合成系の遺伝子発現の抑制が一因となっていることが示唆された。また、BPA 投与によって精子発生が抑制されること、および精巣内ステロイド合成系に影響することが明らかとなった。さらに BPA の精巣内ステロイド合成系への影響パターンがエストロゲンのものと異なることから、BPA の作用機序について従来のような ER を介したものではなく別の作用機序が存在すると思われた。そして、BPA 投与により観察された精子発生の抑制は、おそらく BPA によりテストステロン産生が影響を受けることによって精子発生の量的な減少を引き起こしたことによると思われた。