

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成12年度博士課程 入学

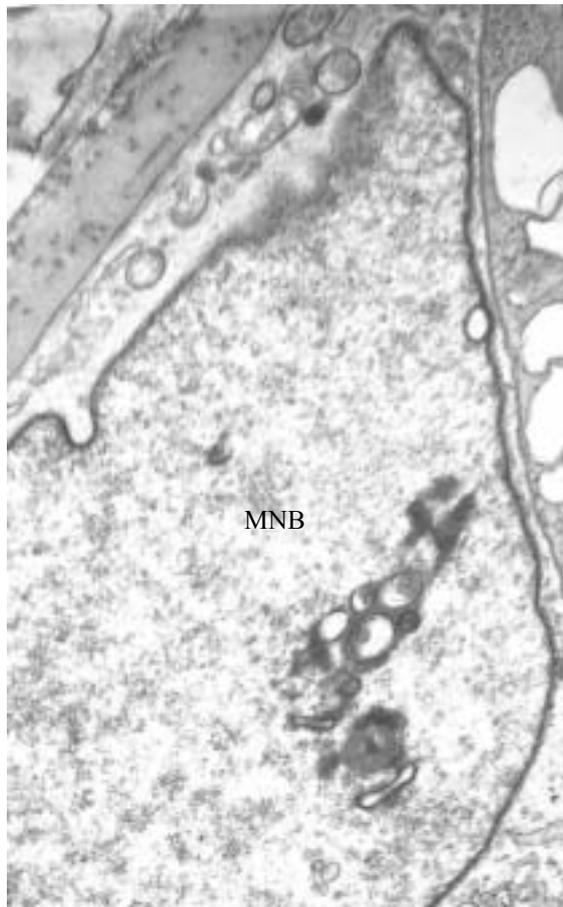
氏名 ビビン・ビンタン・アンドリアナ

指導教官名 林 良博

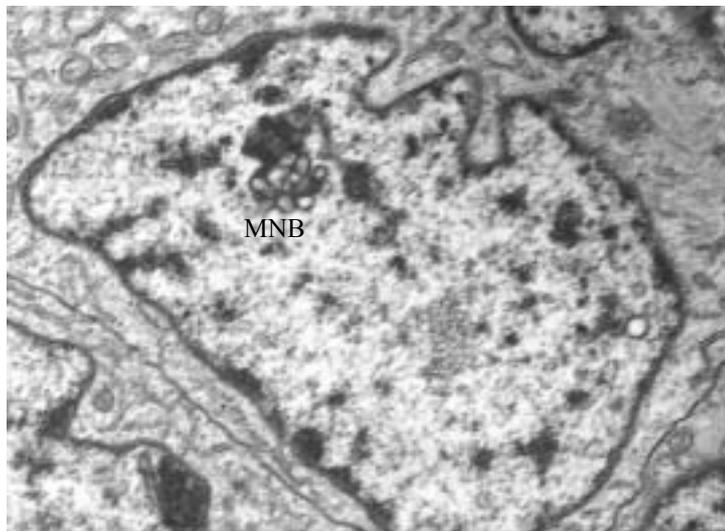
Comparative Morphological Studies on Ruminant Testes and Their Alteration Induced by Endocrine Disruptors *In Vitro*

(反芻類精巣に関する比較形態学的研究およびその培養下における内分泌かく
乱物質による変化)

セルトリ細胞核内に存在する Multivesicular nuclear body (MNB) は反芻類の精巣において特異的に観察され、他の哺乳類では認められない。一般的に MNB は小胞、管状構造、およびリボゾーム様構造からなる。本研究では、まずシバヤギ精巣の生後発達における MNB の形成過程を明らかにした。1, 2, 3, 4 および 5 ヶ月齢ならびに成体のシバヤギより精巣と取り出し、5%グルタルアルデヒドで精巣動脈より灌流固定後、1%オスミウム酸で後固定、エタノールで脱水後、アラルダイトに包埋した。精細管の厚切り切片および連続超薄切片を作製し、顕微鏡および透過電顕で形態学的、形態計測学的に観察した。シバヤギにおける MNB は種々の大きさの小胞、管状構造、およびリボゾーム様構造を含んでいた。各发育段階(1, 2, 3, 4, 5 ヶ月齢および成体)における MNB の体積は、それぞれ $269.3 \mu\text{m}^3$, $327.1 \mu\text{m}^3$, $361.3 \mu\text{m}^3$, $431.2 \mu\text{m}^3$, $525.0 \mu\text{m}^3$, および $760.4 \mu\text{m}^3$ であった。また、1セルトリ細胞当たりの小胞数の平均は、それぞれ 0, 7.4, 11.1, 12.3, 15.5, および 32.7 であった。1 ヶ月齢では、セルトリ細胞核内に、線維成分を含む 1 個ないし複数個の核小体が確認されたが、MNB は全く認められなかった。2 ヶ月齢で MNB は初めて確認されたが、まだ未発達で希にしか観察されなかった。この段階で MNB は少数の小胞とリボゾームからなり、核の辺縁に位置していた。その後の发育段階(3, 4, および 5 ヶ月齢)で、MNB は次第に発達し、数を増し、核の辺縁から中央部へ移動し、核小体と融合して成熟した MNB を形成した。成体では、セルトリ細胞核内において、成熟した大きな MNB が存在した。



2-month-old Shiba goat Sertoli cell



Lesser mouse deer
Sertoli cell

次に最も原始的な反芻類とされるマメジカの成体における MNB の有無を検討した。他の反芻類と同様、マメジカのセルトリ細胞においても MNB および層状滑面小胞体が存在した。MNB はセルトリ細胞内に位置し、小胞、不規則な形状の管状構造およびリボゾーム様構造からなっていた

が、他の反芻類と比べ、希にしか観察されなかった。1セルトリ細胞核当たりのMNBの小胞の数は、平均4.4であり、小胞の直径は、30~180nmの範囲にあった。マメジカのMNBは、ウシやヤギのそれに比べ、未発達であったが、最も原始的な反芻類であるマメジカに存在したことから、MNBは反芻類の精巣に共通した特有の構造だと考えられる。また、マメジカの精巣には、もう一つ特徴的な構造が認められた。それはライディツヒ細胞に存在するアクチンフィラメントおよび中間径フィラメントの特有な束である。これらの束は顕微鏡レベルでも確認可能であった。径約5nmのアクチンフィラメントからなる束は、ライディツヒ細胞の細胞質と核の両方に存在したが、径約10nmの中間径フィラメントからなる束は、細胞質のみに認められた。こうしたフィラメント束は、他の哺乳類の精巣では確認されておらず、マメジカのライディツヒ細胞に特有の構造と考えられるが、その機能、存在意義については不明である。

次にシバヤギ精巣の培養系を用いて、内分泌かく乱物質のリスク評価試験を試みた。内分泌かく乱物質として用いたのは、プラスチック製品の可塑剤であるmono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) およびポリカーボネート製品から溶出するBisphenol Aである。こうした試験は、マウスやラットなど、ネズミ類のみで実行されており、他種哺乳類を用いた例はほとんどない。2ヶ月齢のシバヤギより採材した精巣を細切後、培養液に移し、精巣器官培養系とした。この培養系にMEHPないしBisphenol Aを種々の濃度(0, 100, 1×10^{-3} , および 1×10^{-6} nmol/ml)で添加し、添加後、1, 3, 6, および9時間後に採材、顕微鏡による観察に供した。添加後1時間では、セルトリ細胞内における空胞の出現および核膜の崩壊が認められた。この現象は時間依存的、濃度依存的に増大する傾向を示した。添加後3時間以降においては、アポトーシスを示す精細胞(クロマチン濃縮、形質膜の崩壊を伴わない細胞質萎縮、機能している細胞小器官、および膜で境界された小体内の密集した細胞成分といった特徴をもつ。)、ネクローシスを示す精細胞(膨化し崩壊したミトコンドリア、形質膜の溶解、散在した細胞成分およびクロマチンの凝集といった特徴をもつ。)、アポトーシスを示すセルトリ細胞(核膜の溶解、核質の濃縮を特徴とする。)、およびネクローシスを示すセルトリ細胞(核周囲に沿う辺縁クロマチン、膨化崩壊した細胞小器官を特徴とする。)が観察された。MNBの小胞の崩壊も同時に認められた。結論として、MEHP, Bisphenol Aはともに、低濃度では精細胞をアポトーシスに、高濃度では精細胞およびセルトリ細胞をネクローシスに導くことが示唆された。セルトリ細胞初代培養系へのMEHP, Bisphenol Aの添加試験においても、細胞内における空胞の出現によるセルトリ細胞の変性および核膜の溶解が確認された。次に上記のシバヤギ精巣を用いた内分泌かく乱物質の培養系への添加試験の対照試験として、20日齢ラット(SD)精巣器官培養系へのMEHP添加試験を試みた。添加後1時間で、Tunel陽性精細胞が出現し、その数は時間依存的、濃度依存的に増大した。また、顕微鏡観察においては、シバヤギでの実験と同様、アポトーシスを示す精細胞、セルトリ細胞、ネクローシスを示す精細胞、セルトリ細胞が確認された。結論として、MEHPのラッ

ト精巣器官培養系への影響は、精細胞をネクローシスに導くことが示唆された。このように、精巣器官培養系は内分泌かく乱物質等に添加試験に有用であることが示された。