

## 論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成15年度博士課程 入学

氏名 Tay Tat Wei

指導教員名 九郎丸正道

論文題目 Effects of Mono(2-Ethylhexyl)Phthalate on Mice Testes *In Vivo* and *In Vitro*  
(*In Vivo* 及び *In Vitro* 実験系における Mono(2-Ethylhexyl)Phthalate の  
マウス精巣に対する影響)

Di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)は、食品包装材、医療器具など、多くのプラスチック製品の可塑剤として広く使用されている。DEHPは、ネズミ類において妊孕性を減少させ、精巣萎縮を誘起する。ネズミ類に経口投与した際、DEHPは非特異的エステラーゼにより消化管において直ちに加水分解され、そのモノエステル代謝物である Mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP)が産生される。MEHPは、DEHPの毒性作用の活性本体であることが明らかとなっている。これまでの研究から、性成熟前の若い個体が成体に比べ MEHP 曝露に対して、より感受性が高く、またセルトリ細胞が精巣における MEHP の標的細胞であることが知られている。精上皮内に存在する精細胞の消失と精細管腔内における精細胞の出現は、フタル酸を含むいくつかのセルトリ細胞毒性物質投与に際して、しばしば認められる現象である。しかしながら、その具体的なメカニズムについては未だ明らかにされていない。本研究は、MEHP 曝露により精巣において生じる諸現象に注目し、その原因究明を試みたものである。

第1章 *In Vivo* 実験系における Mono(2-ethylhexyl)phthalate のマウス及びラット精巣に対する影響

21日齢の C57B1/6N 雄マウス及び28日齢の Sprague Dawley 雄ラット精巣に対する MEHP の影響を、光学顕微鏡並びに透過型電子顕微鏡により観察した。マウスには MEHP を 500-900mg/kg/day の濃度で3日間連続経口投与し、一方ラットには MEHP を 600-1000mg/kg/day の濃度で5日間連続経口投与した。その結果、MEHP は精巣重量を有意に減少させ、またマウスの MEHP700mg/kg 投与群及びラットの MEHP800mg/kg 投与群では、TUNEL 陽性細胞の有意な増加が認められた。より高濃度の MEHP 投与群では、マウス、ラットとも変性した精細胞が観察された。セルトリ細胞細胞質の空胞化

及び精細胞の精細管腔への脱落も確認された。管腔へ脱落した精細胞は”sloughing”（毒物に誘起された離脱）ないし”shedding”（通常の離脱）により脱落したものと思われた。sloughing による脱落細胞はネクロシス細胞の、shedding により脱落した細胞はアポトーシス細胞の形態を示した。マウスとラットの比較では、MEHP の精巣毒性に対して、マウスがラットに比べ、かなり感受性が低いことが判明した。

## 第2章 *In Vivo* 及び *In Vitro* 実験系における Mono(2-ethylhexyl)phthalate 曝露後のマウス精巣での食作用及び細胞死シグナル

MEHP 投与により生じたアポトーシス細胞の除去に際しての食作用の役割および細胞死シグナルについて、*In Vivo* 及び *In Vitro* 実験系を用いて検討した。材料としては、21日齢の C57B1/6N 雄マウスを用いた。まず *In Vivo* 実験系として、マウスに MEHP 800mg/kg を単回経口投与し、投与後、1, 3, 5, 7 及び9日に精巣を採材した。MEHP 投与によるアポトーシスに際しての食作用の役割は、アネキシン V を用いて解析した。*In Vitro* 実験系（精巣器官培養系）では、培養したマウス精巣組織に、MEHP を 0, 1, ないし 100 nmol/ml の濃度で添加し、添加後、1, 3, 6, 及び9日後に採材した。細胞死シグナルは、Fas, FasL 及び TRAIL 抗体を用いて検討した。*In Vivo* 実験系では、MEHP 投与マウスはコントロールと比べ、精巣重量の減少及び有意な TUNEL 陽性細胞数の増加を示した。しかし、この現象は可逆的であり、TUNEL 陽性細胞数は9日後に正常値に回復した。アネキシン V 処理後に MEHP を投与したマウスは、MEHP 投与のみのマウスに比べ、有意差のある顕著な TUNEL 陽性細胞数の増加を示した。このことは、MEHP 投与で傷害されたマウス精巣の死細胞の除去に際して、フォスファチジルセリンを介した食作用が効率的で重要な役割を担うことを明らかに示唆する。*In Vitro* 実験系では、MEHP 添加群において、TUNEL 陽性細胞数並びに FasL 及び TRAIL の発現の時間、濃度依存的上昇が認められた。また、連続切片の観察によって、Fas 及び FasL の発現部位が互いに近接していることが示された。しかし残念ながら、それらと TUNEL 陽性細胞の局在との相関は確認できなかった。精巣における TRAIL の同定は、MEHP 添加により生じる精細胞のアポトーシスにおいて、Fas-FasL 系と協調して機能する他の細胞死シグナル経路の存在を示唆する。他の経路の存在は、Fas-FasL 発現パターンと TUNEL 解析結果の不一致を支持するものである。

## 第3章 Mono(2-ethylhexyl)phthalate はマウス・セルトリ細胞に異常をもたらす。

*In Vivo* 実験系、セルトリ細胞初代培養系及び精巣器官培養系を用いて、MEHP がもたらすセルトリ細胞の異常について解析した。材料としては、21日齢の C57B1/6N 雄マウスを用いた。*In Vivo* 実験系では、マウスに MEHP 800mg/kg を単回経口投与し、24時間後に採材した。マウス精巣より立ち上げたセルトリ細胞培養系及び精巣器官培養系には、MEHP を 0, 1, ないし 100 nmol/ml の濃度で添加し、0, 3, 6, 12 及び24時間後に採材した。セルトリ細胞における中間径フィラメントの局在変化を調べる目的でビメンチ

ン抗体を使用した。また、前アポトーシスシグナルの発現及びアポトーシス細胞の存在は、アネキシン V-FITC 及び TUNEL 法により、それぞれ観察した。*In Vivo* 実験の結果、MEHP 投与マウスの精巣において、TUNEL 陽性細胞の増加とセルトリ細胞内のビメンチンフィラメントの崩壊との間に相関が見られた。MEHP 添加セルトリ細胞培養系のトルイジンブルー染色の結果、セルトリ細胞細胞質における空胞の数と大きさの増大が認められた。また、ビメンチン免疫染色の結果、セルトリ細胞培養系及び精巣器官培養系において、MEHP 添加による時間、濃度依存的なビメンチン反応の減少が確認された。一部のセルトリ細胞は、アネキシン V-FITC 陽性を示したが、残念ながら TUNEL 陽性細胞は認められなかった。さらに、F アクチンの崩壊が、MEHP 長期曝露のセルトリ細胞培養系で観察された。

以上の結果から、MEHP はまず、セルトリ細胞の構造的崩壊（ビメンチンフィラメント減少、空胞形成及び F アクチン崩壊）を誘起する。但し、セルトリ細胞死を招くことはない。次いで、Fas-FasL 及び TRAIL 細胞死シグナルが発動し、TUNEL 陽性細胞の増大がもたらされるものと考えられる。