

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Tay Tat Wei

Di(2-ethylhexyl)phthalate(DEHP)は、食品包装材、医療器具等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。経口投与した際、DEHP はエステラーゼにより消化管において加水分解され、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、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が、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章では、21日齢の雄マウス及び28日齢の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/k/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/k/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。セルトリ細胞の空胞化及び精細胞の管腔への脱落も確認された。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を明らかにした。

第2章では、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及び細胞死シグナルについて検討した。21日齢雄マウスを材料として用いた。まず *In Vivo* 実験として、マウスに MEHP 800mg/kg を単回経口投与し、1, 3, 5, 7及び9日後に精巣を採材した。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(精巣器官培養系)では、培養した精巣組織に、MEHP を 0, 1, ないし 100 nmol/ml の濃度で添加し、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* 実験では、MEHP 投与マウスは対照群と比べ、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。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除去に際して、フォスファチジルセリンを介し

リンを介した食作用が重要な役割を担うことを示唆する。*In Vitro* 実験では、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。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別の細胞死シグナル経路の存在を示した。

第3章では、*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 によるセルトリ細胞の異常について解析した。21日齢雄マウスを材料として用いた。*In Vivo* 実験では、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ビメンチンの局在変化は抗体を用いて調べた。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のビメンチン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では、セルトリ細胞における空胞の数と大きさの増大が認められた。また、免疫染色の結果、両培養系において、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、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（ビメンチン減少、空胞形成及び F アクチン崩壊）を誘起し、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ことが明らかにされた。これらの成果は、獣医学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値のあるものと認めた。