

[別紙 2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 崔 恩京 (Choi Ehn-Kyoung)

近年、世界中の各地域で、爬虫類における性の転換、繁殖不能な鳥類、著しく減少したヒトの精子数、子どもができない夫婦の増加、精巣癌及び乳癌の増加などが報告されている。このような現象の原因として DDT(chlorodiphenyl trichloroethane) や PCB(polychlorinated biphenyls)などの内分泌かく乱物質（環境ホルモン）が取り上げられ、社会的にも深刻な問題となっている。こうした内分泌かく乱物質に関する研究は、この 10 年、主に受容体タンパク質の同定という分子レベルにおいて多くの進展をみせたが、最近になって DNA レベルのメチル化変動というエピジェネティックエフェクトについても報告がなされはじめた。しかし、そのメカニズムはいまだ明らかにされていない。内分泌かく乱物質の一つである有機塩素系殺虫剤 DDT は、高い発癌性と神経系・生殖器系などに与える影響が大きいため、先進国では 1971 年から使用禁止になっているが、多くの開発途上国で、今も主要な殺虫剤として使われている。また、使用・販売・製造を禁止した国においても、過去長年にわたり大量に使用していたことから、土壌や水は DDT に汚染されている。DDT は自然界で分解されず、高い脂溶性により食物連鎖を介して濃縮され、生命体へ影響を与えている。内分泌かく乱物質としての DDT の直接的メカニズムは、DDT がホルモンレセプターに結合して内分泌系を乱し、生殖機能低下や癌を誘発するものとされている。しかし、その具体的なメカニズムは現在でも明らかにされていない。さらに、DDT がエピジェネティックエフェクトを与えるか否かも知られていない。本研究は、DDT の代謝産物である *p,p'*-DDE (以下 DDE)を胎仔期及び生後期のラットへ曝露し、その次世代の雄性生殖器系に生じた影響を検討するとともに、精子 DNA のメチル化について実験を行い、エピジェネティックエフェクトとの関連性を検討したものである。

第 1 章では、胎仔における生殖腺の性分化と生殖腺の発達が起こる時期である胎仔期 10 日から 19 日までの 10 日間、妊娠ラットに、陰性対照として vehicle、DDE の抗アンドロゲン性に対する陽性対照として flutamide0.5mg/kg を、DDE は 20mg/kg ないし 100mg/kg を、各々 1 日 1 回経口投与した。その雄産仔(F1)を正常な雌と交配させ、生まれた雄産仔(F2)の生殖器について、次世代への影響を検討するため形態学的に解析した。その結果、高濃度 DDE (100mg/kg)投与の F2 雄ラットで、肛門-

生殖器間距離 (anogenital distance; AGD) の短縮が観察された。また、陽性対照の flutamide の F2 雄ラットでは、同じく AGD の短縮があり、しかも一日精子産生数 (daily sperm production) 及び精巣重量の減少が認められた。以上の結果より、抗アンドロゲン性物質である DDE と flutamide は、胎仔期曝露により父親経路で次世代(F2)の雄性生殖器系へ影響を及ぼすことが示唆された。

第2章では、出生後14日齢(2週齢)から70日齢(10週齢)までの間、雄ラット(F0)にDDE 20mg/kg ないし 200mg/kg を2日に1回経口投与し、正常な雌と交配させ、生まれた雄産仔(F1)の生殖器を形態学的に解析した。その結果、DDE 200mg/kg 投与の雄産仔(F1)で、一日精子産生数の減少、精細管内アポトーシスの増加、精巣上体重量の減少及び AGD の短縮が認められた。以上の結果より、出生後に DDE に曝露されても、雄が受けた影響はその次世代(F1)の雄の生殖器へ影響を及ぼすことが示唆された。

第3章では、胎仔期と生後期に DDE 及び flutamide に曝露された雄産仔(103日齢)の精子 DNA を用いて、エピジェネティックエフェクトの一つであるメチル化について検討した。bisulfite 法で LPLase gene (Chromosome 6q32)上での解析の結果、わずかながら、メチル化パターンの変化が認められた。

以上の結果から、DDE と flutamide は胎仔期投与でも生後期投与でもその抗アンドロゲン作用により、雄性生殖器へ精子数減少などの機能的な障害、及び重量変化などの形態学的な障害を起こし、その影響が父系を通じて次世代へ伝わる可能性が示された。これは、現世代が曝露されなくても、前世代が曝露された経歴があると、永久的にその影響が残ってしまうことを示唆し、環境により変化した形質が次世代へ遺伝するという獲得形質の遺伝 (ラマルキズム的現象) の可能性を提示した。これらの研究成果は、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。