

[別紙2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 祝 暁波

Di-iso-butyl phthalate(DiBP)はフタル酸エステル類に属し、現在、可塑剤として多種の日常製品の製造に使用されている。そのフタル酸エステルの代謝物が環境中に排出されることによる、ヒト、家畜、および野生動物への健康被害が懸念されている。DiBP 曝露による精巣への影響はこれまで解明されていないことから、本研究は DiBP による精巣毒性作用およびその作用機序を解明することを目的とした。

第一章では、単回曝露 (24 時間) および連続曝露 (7 日間) を 3 週齢のマウスまたはラットに施した。単回および連続曝露した精巣組織切片で TUNEL アッセイを行ったところ、ラットでは、両方の DiBP 曝露群で TUNEL 陽性細胞数の増加が見られた。このことから、DiBP は他のフタル酸エステルと同様、精巣毒性を有することが明らかとなった。しかしながら、B6 マウスでは有意な精細胞アポトーシスの増加は認められず、DiBP による精巣への影響には種差が存在すると考えられた。

第二章では、DiBP および estradiol-3-benzoate (EB) 曝露による精巣内テストステロン濃度 (ITT) およびステロイドホルモン合成酵素の mRNA 発現量の変化を検討した。まず DiBP がエストロゲン様作用を示すか否かを検討するため、3 週齢ラットに DiBP ないし EB の経口曝露前に、エストロゲンレセプター(ER)インヒビターである ICI182,780 を皮下投与し、その後精巣の組織学的検討を行った。その結果、精細胞のアポトーシスの減少が EB 群で見られたものの、DiBP 群では認められなかった。このことから、DiBP によるアポトーシスはエストロゲンとは異なる作用経路によることが示唆された。加えて、ITT 濃度の有意な減少は EB 曝露した 6 および 24 時間後にともに見られたのに対し、DiBP 曝露群では 24 時間での回復が確認された。以上の結果から、1) 精細胞アポトーシスの増加は ITT 濃度変化と直接の関連がない、2) EB と異なり、DiBP はホルモン循環系全体に影響を与えるものではないと結論付けた。次に、DiBP または EB 曝露によって ITT 濃度変化を起こす主要なステロイドホルモン合成酵素(*P450scc*, *P450c17*,  $\beta$ -*HSD*, および  $17\beta$ -*HSD*) の mRNA 発現変化を測定した。その結果、*P450scc*, *P450c17*, および  $17\beta$ -*HSD* の遺伝子発現は DiBP ないし EB の単回曝露群において有意に低下した。しかし、 $\beta$ -*HSD* の発現が減少したのは DiBP 群のみであった。この結果も、DiBP と EB 曝露は精巣内ステロイド合成に異なる影響を与えることを示唆している。さらに、DiBP、アンドロジェン・アンタゴニストの flutamide (FM)、および EB で、それぞれ連続曝露した精巣のアポトーシス率、ITT 濃度、ステロイ

ドホルモン合成酵素発現量、および免疫染色を比較すると、ライディッヒ細胞での  $\beta$ -HSD の染色性に違いが見られたが、アポトーシス率は同レベルであったことから、三者は異なった経路でアポトーシスを誘導する可能性が考えられた。さらにアポトーシス関連因子である Fas Ligand (FasL) と Caspase-3、さらにセルトリ細胞内の vimentin filament に対する免疫染色を、DiBP、FM、および EB 曝露群の間で比較検討したところ、FasL と Caspase-3 染色性の増大と vimentin の減少が全ての曝露群において確認された。このことは、DiBP 曝露による精細胞のアポトーシスは、Fas/FasL 経路に従うことを示唆している。

第三章では、3 週齢ラットの精巣組織および単離培養したセルトリ細胞を用いて、*in vitro* 条件下での DiBP の直接的な精巣への影響について検討した。組織培養試験においては、DiBP および 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) を 3 ないし 12 時間曝露した後、精細胞アポトーシス率の算出およびステロイドホルモン合成酵素 mRNA 発現の変化を測定した。その結果、アポトーシスは曝露 12 時間後に最も増加したものの、ステロイドホルモン合成酵素 mRNA の変化は全ての曝露群において認められなかった。同じ手法で単離したセルトリ細胞を曝露した結果では、高濃度の DiBP および E<sub>2</sub> 処理群において vimentin filament の減少が顕著に認められた。以上のように、*in vitro* 曝露において、DiBP は有意に精細胞のアポトーシスを引き起こしたことから、DiBP の精巣への直接的な影響が確認できた。

本研究の結論として、DiBP の精巣毒性には種差が存在し、この精巣への影響は直接的でまた ITT 濃度に左右されずに精細胞のアポトーシスを引き起こすと推測された。本研究で明らかにした DiBP の精巣における影響は複数の点において、エストロゲンとの違いが認められ、よって ER を介した伝達経路で精細胞のアポトーシスを誘起するものではない可能性が考えられた。これらの研究成果は、農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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。