

〔別紙 1〕

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成18年度博士課程 入学

氏名 **MOHAMMAD SHAH ALAM**

指導教員名 九郎丸 正道

論文題目 **Effects of di(n-butyl) phthalate on prepubertal rat testes:  
Relationship between spermatogenic cell apoptosis and  
testicular steroidogenesis**

(Di(n-butyl)phthalateの未成熟ラット精巣への影響：精細胞  
アポトーシスと精巣内ステロイド生成との関係)

フタル酸エステル類は食品包装材、医療器具等のプラスチック製品の可塑剤として広く利用されており、こうした製品の使用に際して環境への溶出が懸念されている物質である。フタル酸エステル類の1種であるdi(n-butyl) phthalate (DBP)は、精上皮の変性により精巣萎縮を引き起こすことが知られているが、その詳細なメカニズムについては依然として不明である。

本研究ではDBPの精巣への毒性作用機序について明らかにするために、1) DBPにより誘起される精細胞アポトーシスの特徴を明確にする、2) DBPがセルトリ細胞に影響を与えるか否か、またセルトリ細胞-精細胞間の相互作用に関わるか否かについて検討する、3) 精細胞アポトーシスと精巣におけるステロイド生成との関連性を検討する、さらに4) DBPのエストロゲン様作用を確認することを試みた。

まず、DBPを3週齢のラットに濃度勾配(250, 500, 1,000 mg/kg/day)をかけて、1日1回、7日間連続経口投与し、最終投与24時間後に精巣を採材し、実

験に供した。採材した精巣を用いて、光学顕微鏡、透過型電子顕微鏡、および TUNEL 法により精巣の形態変化を、またテストステロン-EIA kit により精巣内テストステロン濃度を、さらにリアルタイム RT-PCR 法を用いて、*cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc)*, *cytochrome P450 17 $\alpha$ /C<sub>17-20</sub> lyase (P450c17)*, *3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase (3 $\beta$ HSD)*, *17 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase (17 $\beta$ HSD)*, *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)*, および *uncoupling protein 2 (UCP2)* の mRNA 発現レベルを解析した。その結果、DBP は有意な精巣重量の減少と精細管の萎縮を濃度依存的にもたらした。500 mg/kg/day 投与群でアポトーシス精細胞数の有意な増加が見られ、1,000 mg/kg/day 投与群では精細胞の著しい脱落が認められた。しかしながら、精巣内テストステロン濃度、ならびに *P450scc*, *P450c17*, *3 $\beta$ HSD*, および *17 $\beta$ HSD* の発現レベルは対照群とほぼ同一であった。これらのことから、精巣内テストステロンレベルは DBP により誘起された精巣萎縮に関与しない可能性が示唆された。興味深いことに、セルトリ細胞およびライディッヒ細胞内における脂肪滴の出現に加えて、*PEPCK* および *UCP2* mRNA の増加が観察された。これらの遺伝子はエネルギーの恒常性に関与することから、DBP は少なくとも一部においてセルトリ細胞のエネルギーシステムに影響を与え、精巣萎縮を誘起しているのかもしれない。

次に、DBP のセルトリ細胞および精細胞アポトーシスに与える急性の影響について、3週齢のラットを用い、*in vivo* および *in vitro* 実験系により検討した。同時に DBP 投与ラットにおける初回の精子発生に際しての精細胞の成熟について実験を試みた。3週齢ラットに 500 mg/kg の DBP を単回投与し、投与後、3、6、および 24 時間に精巣を採材し、実験に供した。その結果、DBP 投与により、精細胞の精細管腔への脱落の進行が認められた。また、透過型電子顕微鏡による微細形態の観察では、セルトリ細胞内およびセルトリ細胞-精細胞間の結合部において、いくつかの大きさの異なる空胞が確認された。TUNEL 法によりアポトーシス精細胞数を検討したところ、投与後 6 時間に最大となり、その後、24 時間後まで徐々に減少した。また、アポトーシス精細胞数の増加と免疫染色により明らかにした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認められた。3週齢ラットより分離した精巣を細切し、*collagenase* および *trypsin-EDTA* 処理等を施して立ち上げたセルトリ細胞初代培養系を用いた *in vitro* 実験においても、DBP を濃度勾配 (0.1, 1, 100 nmol/ml) をかけて投与後、6 および 24 時間に観察したところ、セルトリ細胞内における空胞の数と大きさの増大およびビメンチンフィラメントの崩壊が、濃度依存的、時間依存的に認められた。これらの実験から、DBP 投与によりセルトリ細胞内のビメンチンフィラメントの崩壊が

誘起され、その結果、セルトリ細胞による支持を失った精細胞の精上皮からの脱落が起こり、脱落した精細胞はアポトーシスに陥ることが示唆された。さらに、DBP 投与後の精巣の回復試験を試みた。500 mg/kg の DBP を 3 週齢のラットに単回投与し、1、2、4、6、9、12、20、および 30 日後に精巣を採材し、実験に供した。投与後 1 日では有意な数のアポトーシスを起こした精細胞が認められたが、これらは時間の経過とともに徐々に減少した。一方、精巣重量の増加は、初回精子発生終了後でも抑制されていた。伸長型精子細胞のマーカである Hsc70t を用いて精上皮を免疫染色し観察した結果、DBP 投与ラットでは精細胞の成熟が、初回精子発生終了後でも抑制されていることが確認された。

最後に、DBP のエストロゲン作用および DBP ないしエストロゲンにより誘起された精細胞アポトーシスと精巣内ステロイド生成の関連性について実験を行った。3 週齢のラットに DBP を単回投与し、投与後 3、6、および 24 時間に精巣を採材し、アポトーシス精細胞数、精巣内テストステロン濃度、*P450scc*, *P450c17*, *3βHSD*, および *17βHSD* の発現レベル、RIA による LH レベル、ならびに FSH ELISA assay による FSH レベルを検討した。その結果、DBP 投与ラットで、精細胞アポトーシスの増大、LH、FSH の減少、*P450scc*, *P450c17*, *3βHSD*, および *17βHSD* の発現レベルの減少、ならびに精巣内テストステロン濃度の減少が確認された。さらに、DBP のエストロゲン活性を検討するため、抗エストロゲン作用を有する ICI 182,780 (ICI) を用いて、DBP ないし estradiol-3-benzoate (EB) 投与により誘起された精細胞アポトーシスの抑制試験を行った。抑制試験においては、ラットに ICI を前投与し、その後に DBP ないし EB の投与を行った。DBP ないし EB 単独投与群においては、いずれも有意なアポトーシス精細胞数の増大が認められたが、ICI 前投与群 (ICI+DBP, ICI+EB) ではアポトーシス精細胞数の有意な減少が確認された。一方、すべての実験群において、精巣内テストステロンおよび FSH レベルは有意に減少していた。これらの結果を考え合わせると、本研究から、DBP はエストロゲン様作用を示し、DBP 投与により誘起される精細胞アポトーシスは精巣におけるエストロゲン受容体の活性化によりもたらされると考えられた。また、精巣内ステロイド生成の減少は精細胞アポトーシスに関与しない可能性が示唆された。