

[別紙 2]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Mohammad Shah Alam

フタル酸エステル類はプラスチック製品の可塑剤として広く利用されており、環境への溶出が懸念されている物質である。その1種である di(n-butyl) phthalate (DBP) は、精巣萎縮を引き起こすことが知られているが、詳細な作用機序については不明である。

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、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、光顕、透過型電顕、TUNEL 法による形態変化、精巣内テストステロン濃度、およびステロイドホルモン合成酵素の 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、精巣内テストステロン濃度およびステロイドホルモン合成酵素の発現レベルは対照群とほぼ同一であった。以上のことから、精巣内テストステロンは DBP による精巣萎縮に関与しない可能性が示唆された。

次に、DBP の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。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、精細胞の脱落の進行が認められた。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週齢ラット精巣より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。

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、ステロイドホルモン合成酵素 mRNA の発現、LH、ならびに 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、ステロイドホルモン合成酵素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、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。

本研究は、DBP がエストロゲン作用を示し、また DBP により誘起される精細胞アポトーシスが精巣内ステロイド生成と関与しないという新しい情報を提供しており、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。