

氏 名（本籍）	岡 山 祐 弥（東京都）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	甲第 159 号
学位授与年月日	令和 2 年 3 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 2 項該当
学位論文題名	胎生期 di (n-butyl)phthalate 曝露のラット精巢 Leydig Cells および Sertoli Cells への影響
論文審査委員	（主査）和久井 信 （副査）村 上 賢 折 戸 謙 介

論 文 内 容 の 要 旨

〔諸言〕

Di(n-butyl)phthalate(以下 DBP)は広く利用されている可塑剤で、耐久性、長寿命、低コストなど利点が多いため、医療用チューブ、ラッカー、接着剤、レザー、印刷インキ、安全ガラス、セロハン、染料、殺虫剤の製造、香料の溶剤、織物用潤滑剤、ニトロセルロース・塩化ビニル樹脂・セルロースアセテート・ポリスチレン・メタクリル樹脂の可塑剤、化粧品原料など幅広く利用されている有機化合物である。DBP は速やかに体外に排泄される化合物であり、投与量の 90～96%は 48 時間以内に尿中に排泄される、しかし、一部は胎盤に移行もしくは母乳内に溶出し次世代に移行し、特にげっ歯類新生仔の精巢 Leydig 細胞 および Sertoli 細胞に障害を及ぼすことが明らかにされている。しかし、胎生期 DBP 曝露が次世代の思春期から成獣期へいかなる影響を及ぼすかについては不明とされてきた。

本研究では、DBP のラット胎生期曝露が次世代の思春期から成獣期の精巢 Leydig 細胞 および Sertoli 細胞に及ぼす影響について以下 4 項目について検討を行った。

〔第 1 章〕胎生期 DBP 曝露ラット精巢 Leydig 細胞の超微形態学的検討

〔目的〕 胎生期 DBP 曝露ラット精巢 Leydig 細胞の次世代思春期から成獣期における超微形態について検討を行った。

〔材料および方法〕

DBP (99.8% pure)は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)から入手した。湿度 55±5%、約 22±2℃で 12 時間の明暗環境下で、高効率粒子空気(HEPA)でろ過した大気置換室において、木材チップを

敷いたポリカーボネートゲージに個別に収容した。動物には餌と水を自由摂取させた。すべての実験手順は、麻布大学動物実験倫理委員会の承認を得て行った。また国立衛生研究所公衆衛生サービスポリシーによって定められた、家畜の人的使用およびケアに関する医療ガイドラインに従った。妊娠 Sprague-Dawley ラットを SRC(静岡、日本)から入手した。(対照群) 0mg、10mg、50mg、100mgDBP/kg/day の 4 つのグループに分け、妊娠 12 日齢から 21 日齢まで強制経口投与(i.g)を行った。その後次世代出生、5 週齢、7 週齢、9 週齢、14 週齢、17 週齢の各週齢で、安楽死後精巣を採材した。

[結果と考察]

10mg、50mg、100mgDBP/kg 胎生期曝露の次世代ラットでは体重、体長、生存率、性別の偏りに有意差は認められなかった。しかし、100mgDBP 曝露群は成獣期 9、14、17 週齢時点で他群と比べ精巣重量の有意な減少と、Leydig 細胞 (LC)の過形成が認められた。超微形態学的観察から、胎生期 100mgDBP/kg 曝露の精巣では他群と比較して、総 LC 面積、LC の N/C は週齢に従い LC 過形成が認められた。さらに、過形成 LC には、核小体を伴う非定形の核と粗面小胞体、遊離リボソーム、中間系ミクロフィラメント、微小管束、細胞突起、線毛が認められた。しかし、滑面小胞体(sER)と Testosterone(T)代謝に関与するペルオキシゾームはほとんど認められなかった。さらに、過形成 LC は免疫組織化学的に PCNA とビメンチンに陽性を示した。また、精細管中に多数の Sertoli 細胞を認める精細管の退行変性が認められた。100mg DBP 曝露群は次世代思春期から成獣期で、有意に低い精巣 T 値を示したのに対して、精巣 Luteinizing hormone(LH)値は有意に高い値を示した。100mg DBP 曝露群の次世代ラットは、思春期から成獣期で高 LH 値を示すも、T 値が上昇しないことから、LC 過形成が発現したものと考えられ、LC の障害が示唆された。

第 2 章「胎生期 DBP 曝露ラット精巣 Leydig 細胞の Estrogen/Androgen 受容体発現に関する検討」

[目的]

胎生期 100mg DBP/kg 曝露ラットでは、精巣 LC の障害を示唆する LC 過形成が認められたので、性ホルモン受容体であり核内受容体である estrogen receptor α 、 β (ER α 、ER β)および androgen receptor(AR)の、過形成 LC おける発現について分子生物学的な検討を行った。

[材料および方法]

胎生期 100mgDBP 曝露の次世代ラットを 5 週齢、7 週齢、9 週齢、14 週、17 週齢時点で安楽死後精巣を採材した。さらに RT-PCR を用いて ER α 、ER β 、AR・mRNA およびタンパク質の発現について検討した。ラットは第 1 章と同等の条件下で飼育した。

[結果と考察]

5 週齢から 7 週齢時点で、性ホルモン受容体の発現に、有意差は認められなかった。しかし、9 から 17 週齢時点では、100mgDBP 曝露群の LC では、有意に高い ER α 、および、有意に低い ER β と AR の発現が認められた。精巣の ER α の増加から Leydig 細胞におけるエストロゲンに対する感受性の上

昇が考えられた。また、AR の低下から、Leydig 細胞の T への感受性の低下が考えられた。

第 3 章「胎生期 DBP 曝露ラット精巣 Leydig 細胞の Teststeron 生合成酵素発現に関する検討」

〔目的〕

T 産生低下が思春期から成獣期に認められたことから、T 産生に関与する因子、LC のミトコンドリア(Mt)に分布する StAR、P450scc と、sER に分布する 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD について分子生物学的に検討した。

〔材料と方法〕

胎生期 100mgDBP/kg 曝露の次世代 5、7、9、14、17 週齢時点で、安楽死後に精巣を採材した。精巣 T 値を測定した。さらに、StAR、P450scc、 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD、について、mRNA の発現とタンパクの発現を検討した。ラットは第 1 章第 2 章と同等の条件下で飼育した。

〔結果と考察〕

100mgDBP 曝露群で思春期 5、7 週齢における sER の 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD 発現量が、有意に低い値を示した一方で、9、14、17 週齢時点では、これらの発現量は対照群と有意差は認められなかった。これに対して、100mgDBP 曝露群における、Mt に分布する StAR、P450scc の発現は、5、7 週齢時点では、対照群と比べて有意差は認められなかったが、9 週齢以降で有意に低い値を示した。思春期には sER に分布する T 合成関連酵素が抑制され、成獣期では Mt に分布する関連酵素が抑制されたことから、胎生期 100mgDBP 曝露による T の合成の抑制は、成長に伴い変化すると考えられた。

第 4 章「胎生期 DBP 曝露ラット精巣 Sertoli 細胞の BrdU 発現に関する検討」

〔目的〕 100mgDBP/kg 曝露の精巣では、精細管が Sertoli 細胞(St)で占められる退行変性を示すことが明らかとなった。正常 St は細胞分裂能が顕著に低いことから、DBP 曝露群の次世代において、退行変性を示す精細管における St の細胞分裂能を BrdU 反応で検討した。

〔材料と方法〕

100mgDBP 曝露群の次世代 5、7、9、14、17 週齢時点で、ラットから安楽死後精巣を採材した。精細管あたりの BrdU 陽性 St の数を検討し、BrdU 陽性 St / (BrdU 陽性 St + BrdU 陰性 St) を算出し、DNA 分裂期(S 期)細胞の割合を検討した。ラットは第 1 章第 2 章第 3 章と同等の条件下で飼育した。

〔結果と考察〕

100mgDBP 曝露群の精細管の数は、7、9 週齢時点では対照群と比べ有意差はなかったが、14、17 週齢では有意な増加を示した。また、精細管あたりのビメンチン陽性 St 細胞数は、100mgDBP 曝露群ラットは、7 と 9 週齢時点で対照群と同様の値を示していたが、14、17 週齢時点で対照群と比べて有意に高い値を示した。さらに、BrdU 陽性 St/St の比率は、14、17 週齢時点で、有意に高値を示した。100mgDBP 曝露群の精巣の St 増殖能が、成獣期に上昇することが認められた。成獣期以降に FSH が有意な増加を示すことから、FSH により Sertoli 細胞の増殖が引き起こされたと考えられた。

「総括」

胎生期 DBP 曝露の Leydig 細胞、Sertoli 細胞への最小毒性量は 100mg/kg であった。100mgDBP 曝露群では、思春期・成獣以降有意にテストステロン合成阻害と、ER α の増加と ER β と AR の減少などホルモン受容体の異常を示す異形 Leydig 細胞の過形成が認められた。さらに、思春期には sER に分布するテストステロン合成関連酵素の発現抑制を認め、成獣期ではミトコンドリアに分布する関連酵素の抑制が認められた。また、成獣期では FSH 上昇と精細管における Sertoli 細胞の細胞分裂増殖が認められた。

論文審査の結果の要旨

Di(*n*-butyl)phthalate(以下 DBP)は広く利用されている可塑剤で、医療用チューブ、接着剤、絵の具、研磨剤、ラッカー、化粧品、印刷インクの添加剤として幅広く利用されている有機化合物である。経口摂取された DBP は速やかに体外に排泄される化合物であり、投与量の 90～96%は 48 時間以内に尿中に排泄される、しかし、その一部は胎盤に移行、または母乳内に溶出し次世代に移行する、そして、げっ歯類・新生仔の精巣 Leydig 細胞 および Sertoli 細胞を障害することが明らかにされている。しかし、胎生期 DBP 曝露が次世代の思春期から成獣期へいかなる影響を及ぼすかについては、未だ充分解明されてはいない。

本研究者は、DBP のラット胎生期曝露が、次世代の思春期から成獣期の精巣、Leydig 細胞 および Sertoli 細胞に及ぼす影響について、以下 4 章に分けてに究明を行っている。

その概要は以下の通りである。

第 1 章では、まず胎生期 DBP 曝露ラット、精巣 Leydig 細胞と Sertoli 細胞の次世代思春期から成獣期における形態変化について検討している。対象としては、SD ラットの、妊娠 12 日から 21 日齢まで、DBP を 0 mg、10mg、50mg、100mgDBP/kg/day の 4 つのグループに分け、経口投与を行った。その次世代出生後、思春期として 5 週齢、7 週齢を、成獣期として 9 週齢、14 週齢、17 週齢の各週齢で、安楽死後精巣を採取している。結果として、10mg、および 50mg、DBP/kg 胎生期曝露の次世代ラットでは、思春期・成獣期ともに形態的に対照群と有意差は認められなかった。これに対し、100mgDBP 曝露群では、他群と比べ精巣重量の減少と、Leydig 細胞の過形成が認められた。さらに、曲精細管中に多数の Sertoli 細胞を認める、退行変性が発現することを明らかにしている。また、100mgDBP 曝露群は、有意に低い精巣 Testosterone 値を示したのに対して、精巣 Luteinizing hormone 値は有意に高い値を示すことを明らかにした。このことから、胎生期 DBP 曝露の Leydig 細胞、Sertoli 細胞への最小毒性量は 100mg/kg であることを証明した。また、超微形態学的に、胎生期 100mgDBP/kg

曝露群で認められた、過形成 Leydig 細胞は、微小管、細胞突起、線毛などを有するなど、形態異常を示す異形 Leydig 細胞から構成されることを証明した。これらのことから、胎生期 100mgDBP 曝露群の次世代ラットでは、高い精巣 Luteinizing hormone によって Testosterone 合成が惹起され、Leydig 細胞の過形成が形成されるも、Leydig 細胞に異常が起きていることが示唆された。

第 2 章では、第 1 章で示唆された Leydig 細胞の異常が、性ホルモン受容体の異常に起因するか否かについて明らかにするために、胎生期 100mgDBP 曝露ラットの過形成 Leydig 細胞における estrogen receptor α 、 β および androgen receptor の、発現について分子生物学的な検討を行っている。結果として、思春期では、性ホルモン受容体の発現に、有意差は認められなかった。しかし、成獣期では、DBP100mg 曝露群の Leydig 細胞では有意に高い estrogen receptor α 、および、有意に低い estrogen receptor β と androgen receptor の発現を示すことを明らかにしている。これらのことから、過形成 Leydig 細胞のエストロゲンに対する感受性の増加と、Testosterone への感受性の低下を明らかにした。

第 3 章では、第 1 章で示唆された Leydig 細胞の異常が、Testosterone 合成低下に、いかに関与しているかを明らかにするために、Leydig 細胞における Testosterone 合成酵素の発現に関する分子生物学的検討を行っている。結果として、100mgDBP 曝露群では、思春期においてはミトコンドリアに分布する Testosterone 合成酵素は、対照群と比べて有意差は認められなかったが、成獣期では有意に低い値を呈していた。これに対して、滑面小胞体に分布する Testosterone 合成酵素は、思春期では有意に低い値を示すが、成獣期では対照群と有意差は認められなくなることを明らかにした。このことから、100mgDBP 曝露群で認められた過形成 Leydig 細胞は、思春期・成獣期で異なる機序で Testosterone 合成阻害を示す、異なる細胞機能を持つことを明らかにした。

第 4 章では、第 1 章で明らかになった、胎生期 100mgDBP 曝露ラットで認められた、曲精細管内 Sertoli 細胞の増加が、細胞分裂によるものか否かを、BrdU 法で検証した。正常 Sertoli 細胞は、細胞分裂能が顕著に低いことが知られている、これに対して、DBP 曝露群の BrdU 陽性率は、思春期、対照群と同様を呈していたが、成獣期には、対照群と比べて有意に高い値を示した。さらに、成獣期に FSH が有意に増加することが明らかになった。このことから、成獣期に増加した FSH により、Sertoli 細胞の増殖が引き起こされたことが示唆された。

本研究から、胎生期 DBP 曝露の Leydig 細胞、Sertoli 細胞への最小毒性量は 100mg/kg であることを証明した。さらに、DBP 曝露群では、思春期・成獣期に有意に高いテストステロン合成阻害、estrogen receptor α の増加と estrogen receptor β と androgen receptor の減少など、ホルモン受容体の異常を示す、異形 Leydig 細胞の過形成であることが立証された。さらに、100mgDBP 曝露群では、思春期には、滑面小胞体に分布するテストステロン合成酵素の発現抑制を認め、成獣期では、ミトコンドリアに分布する合成酵素の抑制を明らかにした。このことから、過形成 Leydig 細胞は成長に伴いその細胞機能を変化させることを証明した。さらに、100mgDBP 曝露群では、成獣期では FSH 上昇と曲精細管における Sertoli 細胞の細胞分裂増殖が関連することを示唆している。

このように、本研究は多方面から研究方法を駆使し、その結果に多くの新知見を得ており、獣医学・

トキシコロジーおよび実験動物学の観点から社会に大きく貢献するものであり、博士（獣医学）の学位を授与するのにふさわしい論文と判定した。