

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
(*In utero* di(*n*-butyl)phthalate exposure affects
rat testicularLeydig cells and Sertoli cells)

2020 年 2 月

麻布大学大学院 獣医学研究科
獣医学専攻 博士課程
応用動物科学

DV 1603 岡山 祐弥

目次

Abstract	3
要旨	4
緒論	8
第1章「胎生期 Di(n-butyl)Phtalate 曝露ラット精巣 Leydig 細胞の超微形態学的検討」	9
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」	20
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」	30
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」	42
総合考察	52
参考文献	50

ABSTRACT

Di (n-butyl) phthalate (DBP) is a widely used plasticizer with many advantages such as durability, long life and low cost. Therefore, it is a widely used organic compound such as medical tube, lacquer, adhesive, leather, printing ink, safety glass, cellophane, dye, pesticide production, fragrance solvent, textile lubricant, and cosmetics. DBP is a rapidly excreted compound. After i.g. of DBP to rats, 90 to 96% of administered dose is excreted in urine within 48 hr. But some DBP transferred to the placenta or breast milk and passed into the next generation, with particular effects on Leydig and Sertoli cells in rodent neonates. However, it has been unclear how in utero exposure to DBP affects from postpuberty to adulthood in the next generation. In this study, we investigated the effects of in utero exposure to DBP on testicular Leydig and Sertoli cells from puberty to adulthood in the next generation.

Chapter1

The ultrastructural features of rat testicular Leydig cells exposed to DBP in utero from puberty to adulthood has examined. The animals were divided into 4 groups of 0, 10, 50 and 100 mg DBP/kg/day and administered by gavage (i.g) from gestation days 12 to 21. Thereafter, the testes were harvested at the age of 5, 7, 9, 14, and 17 weeks after euthanasia. The present study describes atypical Leydig cell (LC) hyperplasia Sprague-Dawley rats with low testosterone and high luteinizing hormone levels after prenatal administration of 100 mg/kg/day di (n-butyl) phthalate on days 12 to 21 post conception. In testes exposed to 100 mg DBP, the total LC area and N/C of LC increased with age in weeks, and LC hyperplasia was observed. Aggregated LCs had atypical nuclei, abundant free ribosomes, stripped rough endoplasmic reticulum, intermediate-size filaments, elongated cytoplasmic filopodia, atypical tight junctions, and cilia formations. And, immunohistochemical analysis showed expression of proliferating cell nuclear antigen and vimentin in many hyperplastic LCs. Therefore Degenerative degeneration of the seminiferous tubules with numerous Sertoli cells was observed in the seminiferous tubules. Male rat offspring following exposure to 100mg/kg/day DBP in utero has lower serum T values and higher Luteinizing hormone(LH) levels than controls from postpuberty to adulthood. DBP exposed rats in utero showed high LH levels from puberty to adulthood, but T levels were not elevated. Therefore that LC hyperplasia occurred and impairment of LC suggested.

Chapter2

Expression of estrogen receptor α , β (ER α and ER β) and androgen receptor (AR) in hyperplastic LCs was studied because, LC hyperplasia indicative of impaired testicular LC was observed in rats in utero exposed to 100 mg/kg/day DBP. At 5, 7, 9, 14, and 17 weeks of age, Animals were euthanized. And these testes were harvested. In addition, the expression of ER α ER β AR protein and mRNA was examined using RT-PCR. Rats were housed under conditions similar to those in Chapter 1. There was no significant difference in the expression of sex hormone receptors from 5 to 7 weeks of age. However, at 9 to 17 weeks of age, LC in the DBP exposed in utero group had significantly higher and lower ER α and ER β and AR expression. The increased ER α in the testis suggested an increased sensitivity to estrogen in Leydig cells. The decreased AR also suggested a decreased sensitivity of Leydig cells to T.

Chapter3

Since decreased T production was observed from puberty to adulthood, the factors involved in T production, StAR and P 450 scc distributed in mitochondria (Mt) of LC and 3 β -HSD, P 450 c 17 and 17 β -HSD distributed in sER, were molecularly studied. Testis exposed to 100 mg DBP/kg in utero were examined at 5, 7, 9, 14, and 17 weeks of age after euthanasia, and testis T values were determined. StAR, P 450 scc, 3 β -HSD, P 450 c 17, and 17 β -HSD were examined for mRNA and protein expression.

This analyses revealed that StAR and P450scc, distributed in sER, levels in the DBP group were significantly lower at 5 and 7 weeks compared with the vehicle group but became similar during weeks 9–17. Although 3 β -HSD, P450c17, and 17 β -HSD, distributed in Mt, levels in the DBP group were similar to the vehicle control group at 5 and 7 weeks of age, they were significantly lower during weeks 9–17. The inhibition of T synthesis by DBP exposure in utero was thought to change with growth, because the T synthesis-related enzymes distributed in sER were inhibited during puberty and those distributed in Mt during adulthood.

Chapter4

Testicles exposed to 100 mg DBP/kg showed degenerative changes in which seminiferous tubules are occupied by Sertoli cells (St). Normal St is known as having a markedly lower mitotic activity. It has been examined the ability of St to divide by the BrdU reaction in degenerative seminiferous tubules in the next generation of rat exposed to DBP.

Testis exposed to 100 mg DBP/kg in utero were examined at 5, 7, 9, 14, and 17 weeks of age after euthanasia. We investigated ST numbers, number of vimentin labeled Sertoli

cells, BrdU-positive Sertoli cells/Sertoli cell ratios, and Percentage of DNA mitotic (S phase) cells in rats in utero exposed to 100 mg/kg/day DBP.

The numbers and diameters of ST testicular sections were statistically similar at weeks 7 and 9; however, at weeks 14 and 17, they were statistically different and displayed higher BrdU-positive Sertoli cells/Sertoli cell ratios in the DBP treatment group. In utero DBP exposure significantly increased Sertoli cell numbers and their cellular proliferation from postpuberty to adulthood. The significant increase in FSH after adulthood suggested that FSH caused Sertoli cell proliferation.

Summary

The lowest-observed-adverse-effect level for Leydig and Sertoli cells exposed to DBP in utero was 100 mg/kg. In the DBP group, significant inhibition of testosterone synthesis after puberty and adulthood and hyperplasia of atypical Leydig cells showing higher levels of hormone receptors such as increased ER α and decreased ER β and AR were observed. In addition, the expression of testosterone synthesis-related enzymes distributed in sER was suppressed during puberty, and the expression of related enzymes distributed in mitochondria was suppressed during adulthood.

要旨

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、低コストなどの利点が多いため、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、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巣 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巣 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 章では、胎生期 DBP 曝露ラット精巣 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。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投薬(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。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 は週齢に従い増加し LC 過形成が認められた。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。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。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。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 1 章において、胎生期 DBP100mgDBP/kg 曝露群ラットでは、精巣 LC の障害を示唆する LC 過形成が認められたので、第 2 章では、ホルモン受容体である 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検討を行った。胎生期 DBP 曝露群の次世代ラットを 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 たんぱく質および mRNA 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。

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、DBP 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 の発現が見られた。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増加が考えられた。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

T 産生低下が思春期から成獣期に認められたことから、第 3 章においては、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。

胎生期 100mgDBP/kg 曝露の精巣を 5、7、9、14、17 週齢時点で、安楽死後に精巣を採材し、精巣 T 値を測定した。また、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。

DBP 曝露群で思春期 5、7 週齢における sER の 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD の発現量が、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みられなかった。これに対して、DBP 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 DBP 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

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、第 4 章では、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。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) の割合を算出し、DNA 分裂期(S 期)細胞の割合を検討した。DBP 曝露群ラットの精巣あたりの精細管の数と直径を検討した。DBP 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、DBP 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。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。DBP 曝露群の精巣の St 増殖能が、成獣期に上昇することが明らかとなった。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」

DBP 曝露の Leydig 細胞、Sertoli 細胞への最小毒性量は 100mg/kg であった。DBP 曝露群では、思春期・成獣期以降有意にテストステロン合成阻害と、 $ER\alpha$ の増加と $ER\beta$ と AR の減少などホルモン受容体の以上を示す異形 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。

緒論

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、木材研磨剤、ラッカー、化粧品、印刷インクの添加剤としても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巣 Leydig 細胞および Sertoli 細胞に障害を及ぼすことが、先行研究で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精巣 Leydig 細胞および Sertoli 細胞に及ぼす影響についての検討を行った。

第1章

胎生期 Di(n-butyl)Phtalate 曝露ラット精巣 Leydig 細胞の超微形態学的検討

概要

胎生期 DBP 曝露ラット精巣 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。胎生期 DBP 曝露ラットは、形態学的な特徴として、成獣時に精巣 Leydig 細胞(LCs) 滑面小胞体 sER の消失を示した。妊娠 12 日齢から 21 日齢にかけて、胎生期 DBP(0、10、30、50、100mg/kg/day)曝露させたラットから、次世代 5、7、9、14、17 週齢時点で精巣を採材し、LCs の超微形態学的検討を実施した。胎生期 100mg/kgDBP 曝露群の精巣 LCs は、生後 7 週齢および 9 週齢時点で、たんぱく質を含有する小胞を持たない sER を豊富に有する。それら sER は 9 週齢以降経時的に数を減らしてゆき、17 週齢時点で消失する。胎生期 100mg/kgDBP 曝露群以外の濃度の胎生期 DBP 曝露群においては、sER に形態学的な変化は認められなかった。100mg/kgDBP 曝露群の LCs の総数は、9 週齢から 17 週齢にかけて、有意に増加していた。光学顕微鏡観察により、100mg/kgDBP 曝露群の LCs に認められる、LC 過形成像を検討した。LC は、重度に変性した精細管に囲まれ凝集しており、核小体と豊富な好酸球性細胞質を伴う大きな卵形核を含有していた。免疫組織化学的検討の結果、過形成性 LC は、多くの増殖細胞核抗原とビメンチンを発現していることが明らかになった。さらに電子顕微鏡検討により、胎生期 100mg/kgDBP 曝露群の精巣において、精細管の退縮、卵形のかつ異染色の核小体、小嚢状の拡張が認められない sER、いびつな細胞結合、微小管束、細胞突起、絨毛の形成等が認められた。LH レベルは 5 週齢から 7 週齢にかけて有意に低い値を示したが、一方で 9 週齢から 17 週齢にかけて、有意に高い値を示した。sER の減少は、LCs の活動および精巣 LH レベルと関連があると考えられた。

諸言

Di(n-butyl)phthalate、フタル酸エステルは様々な製品に使用される高用量化学物質である。フタル酸はものの柔軟性を増加させる効果を持ち、フタル酸が含有される製品には、子ども用おもちゃ、コスメ、歯科器具、塗料、パーソナルケア製品、化粧品、ワックス、そして食物包装が該当する(OSHA 2009)。製造業者ごとに製品に含有される DBP の濃度には大きなばらつきがあるが、ポリ塩化ビニル中の濃度は 8.5%(Kawakami Isanma1 Matsuoka 2011)、化粧品中の濃度は 5.98%(Hubinger et al. 2006)という調査結果がある。

フタル酸エステルの曝露は実験動物に様々な影響を与えるが、特に精巣の発達に最も深刻な影響を及ぼす(Mylchreest et al. 2002)。ただし、DBP は非常に速やかに体外に排泄される物質であり、投与量の 90~96%は 48 時間以内に尿中に排泄される Hoppin et al., 2002)。また、胎生期 DBP 曝露は異常な性腺細胞の発達を示すことも報告されている (Alam et al. 2010)。さらに、胎生期 DBP 曝露は、仔ラットに精巣発育不全を誘発するが、この発

育不全 DBP および DBP 代謝物が直接的に関与しているものとは考えられていない

(Mylchreest et al. 2002)。LC 過形成は、DBP 曝露を受けた雄動物の、精巣発育異常の重要な原因にである可能性が示唆されている (Mylchreest et al. 2002; Barlow, Phillips, and Foster 2004)。雄のラットが胎生期に DBP の曝露を受けると、精巣テストステロン (T) の合成が抑制されて、結果として DBP は抗 Androgen として作用し、成人期に LC 過形成を発症させる。(Mylchreest et al. 2002; Barlow, Phillips, and Foster 2004; Mahood et al. 2005)。DBP 以外のフタル酸エステルの曝露は、ラット LC の滑面小胞体 (sER) の小胞に異常を引き起こすことが報告されている (Jones et al. 1993)。しかし、DBP のラット胎生期曝露が誘発する、LC 過形成の詳細な形態像は明らかになっていない。

材料と方法

DBP (99.8% pure) は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) から購入した。生後 8 週齢の雌 Sprague-Dawley ラット (n=20) を SRL Co (静岡、日本) から妊娠 0 日目に調達した。妊娠 0 日目は、交尾が確認された日とした。到着後、無作為化を活用して分配した。飼育は、約 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ かつ 12 時間の明暗サイクルの環境下で実施した。高効率微粒子空気 (HEPA) でろ過した大気置換室で、木材チップを敷いたポリカーボネートケージに個別に収容した。動物には食餌 (MF、Oriental Yeast, Osaka, Japan) と水を自由摂取させた。すべての実験手順は、麻布大学獣医学部動物実験室使用承認委員会の承認を得て行われた。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、家畜の人道的使用およびケアに関する医療ガイドラインに従った。

DBP (0、10、50、100 mg/kg/day) を混合した 0.5 ml のコーンオイル (Nacalai Tesque INC., Osaka, Japan) を 4 つの群の妊娠ラット (1 群あたり 5 頭) に妊娠 12 日齢から 21 日齢の間に経口投与 (i.g.) した。新鮮な溶液を毎朝に調製し、午前 9 時に投与した。レジメンは、100 mg/kg/day DBP 胎生期曝露群が有害な影響を与えると報告した研究に基づいて作成した (Mylchreest et al. 1999; Barlow and Foster, 2003; Wakui et al, 2013, 2014)。生まれた仔は出生時に体重を測定し、性別判断を行った。DBP、コーンオイルを投与されていない母ラット 1 匹につき、4 匹の雄と 4 匹の雌で計 8 匹の子供を割り当てた。リッター調節で数を調節した。生後 21 日目に離乳を行った。仔ラットは、ポリカーボネートケージ中で飼育し、床に敷いた木材チップは 5 日ごとに交換した (1 ケージあたりに単一性別の 4 頭を飼育した)。

5、7、9、14、17 週齢時点で、DBP 処理および対照群の雄のラットを麻酔し、CO₂ の過剰摂取により安楽死させた。精巣を採取し、その重量を計った。光学顕微鏡観察のために、精巣を 24 時間に固定し、4 mm パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色をした (H&E)。増殖細胞核抗原 (PCNA) およびビメンチンの発現を観察するため、抗 PCNA モノクローナル抗体 (Dako, Hamburg, Germany; diluted 1:50) と抗ビメンチンモノクローナル抗体 (Dako, Hamburg, Germany; diluted 1:50) を用いてアビジン・ビオチン複合体 (ABC) 法を実施し、切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色した。精

巢サンプルを 0.1M リン酸緩衝化 1.2%グルタルアルデヒド中で 2 時間固定し、次いで 1.0% 四酸化オスミウム中で 2 時間後固定した。段階的にアルコール中で脱水した後、試験切片を Epon812 にて包埋した。薄い切片を Porter-Blum MT-IIb ウルトラミクロトームで切断し、メチレンブルーで染色するか、またはスリットグリッドに載せた。酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛で二重染色した後、切片を Hitachi H-2000 電子顕微鏡で観察した。精巣 T および LH レベルは、放射免疫測定法 (Milchreest et al. 2002) により測定した。それぞれの平均値について、Stat View-J5.9 (Abacus Concepts Co. Ltd.) を用いて、Scheffe の F 検定にて比較した。(p<0.5)

結果

胎生期 DBP 曝露ラットは、その DBP 投与量に関わらず、胎児の体重量自体に変化は認められなかった。生まれてくる仔ラットの頭数と性別の偏りにも、影響は認められなかった。対照群と比較して特徴的な構造学的変化は胎生期 100mg/kg DBP 曝露群でのみ認められた。7 週齢時までの仔ラットの精巣重量は、胎生期 100mg/kgDBP 曝露群と対照群の間に有意差は認められなかった。しかし 9 週齢時点以降、胎生期 100mg/kg DBP 曝露群ラット精巣の大きさ、および重量は、対照群と比較して、有意に低下することが明らかになった。通常の LCs は辺縁部にヘテロクロマチンを含有し、丸く、卵形の核小体を中央にもつ。さらに豊富な sER が細胞質微細構造として嚢状に拡張し、幅広く分布している。一方で、9 週齢以降の胎生期 100mg/kgDBP 曝露群 LCs では、異常所見が観察された。内部に多量の sER を有するが、sER の形態は、たんぱく質を含有する小胞を持たない異形成を呈している。胎生期 DBP100mg/kg 曝露群の 9 週齢以降の精巣について超微形態学的検討を実施した結果、9 週齢以降の個体において、精細管の退縮、卵形のかつ異染色の核小体、たんぱく質を含有する小嚢を持たない sER、いびつな細胞接合、微小管束、細胞突起、繊毛が認められた。また 9 週齢以降で、胎生期 100mg/kgDBP 曝露群精巣では異形成 LCs の過剰増殖が認められた。加齢に伴い、sER の消失を伴う精巣の萎縮が観察され、LC 中の細胞の数の増加が観察された。LCs 中の sER の密度は 9 週齢から減少を示し、14 週齢時点ではほとんどされなかった。17 週齢時点では、LCs 中に sER は観察されなかった。9 週齢から 14 週齢の sER の相対量は、5,7 週齢時点の観測と比較して、有意に低い値を示した。胎生期 100mg/kgDBP 曝露群の精巣では、精細管退縮が認められた。退縮した精細管のうち、精子形成が認められない精細管の数は少なかった。重度に変性した LCs は精細管に囲まれ、凝集する。LCs 中には核小体および豊富な好酸球性細胞質を伴う大きな卵形核が認められた。しかし、これらは LC 腺腫には分類されない病変である (McConnell et al. 1992)。結節性病変は、LC の直径が、精細管 3 本分の直径よりも幅広い場合において、腺腫と診断がくだされる。この規定より小さい変化は、過形成として分類される (McConnell et al. 1992)。過形成は、肥大とは異なる様相である。肥大は細胞大きさの変化のみによる変性を示すが、過形成は細胞の密度の増加による変性を示す。過形成 LCs は、免疫組織学的検討で、PCNA

およびビメンチンに対して陽性であった(1章図2)。胎生期 DBP100mg/kg 曝露群ラットの LCs は、嚢状構造をもたない sER が内部に数多く認められると同時に、ステロイドホルモンの欠乏していることが明らかとなった(1章図3,4)。この時、ミトコンドリア腫脹を表すミトコンドリアの総数の増加は認められず、ゴルジ体の形状変化も観察されなかった(1章図.3-5)。また胎生期 100mg/kgDBP 曝露群ラットの Teststeron (T) レベルは、対照群と比較して、7 週齢時点から 17 週齢時点において、有意に低い値を示した。7 週齢から 9 週齢、すなわち思春期の間、胎生期 100mg/kgDBP 曝露群ラットは対照群よりも有意に低い精巣 LH レベルを示した。しかし、9 週齢から 17 週齢時点においては、胎生期 100mg/kgDBP 曝露群ラットの精巣 LH レベルは、対照群と比較して有意に高い値を示した。

DBP100mg/kg 胎生期曝露群の LH のレベルは、5 週齢から 7 週齢の間にかけて、対照群と比較して有意に低い値を示していた。9 週齢以降は有意に示した。観察期間内においては、対照群と 100mg/kg 群以外の胎生期曝露群間では、T レベルと LH レベルに有意な差は認められなかった。

考察

DBP とその主要代謝物はアンドロゲン受容体に直接は作用しないことが明らかになっている(Harris et al. 1997; Gray and Furr 2006; Mylchreest et al. 2002)。しかし、成獣期にテストステロンの減少および LC 過形成を引き起こしており、DBP 曝露は、出生前もしくは出生後ラットに対して、抗 Androgen 的に作用していた(Mylchreest et al. 2002; Barlow et al. 2004)。LCs 過形成内で観察された核の異形および核小体はまた、特発性ヒト LC 過形成病変と似た特徴を表す。(Sodertro 1987)。通常の LC は、大量の sER を含有するため、コレステロール代謝と T 産生について高い活性をもつとされた(Ghadially 1975、Soderstrom 1987、Akingbemi et al. 2001、Barlow, Phillips, and Foster 2004、Hu et al. 2009)。またフタル酸(di(2-ethylhexyl) phthalate, di-n-pentyl phthalate, di-n-octyl phthalate, and diethyl phthalate)を 2 日間投与した 6 週齢から 8 週齢のラットでは、LC で sER が小胞化および拡張することが認められたが、sER の総量は有意な減少をしめさなかった (Jones et al. 1993)。今回過形成病変を示した LC で sER はほとんど観察されなかった。この所見から、胎生期 DBP 曝露は、DBP 以外のフタル酸エステル類の曝露よりも、LC に対して強い精巣毒性を引き起こすことが示唆された。実際に、DBP 曝露群の T レベルは対照群と比較して有意に低い値を示していた。ラット、マウス、モルモット、およびヒトの正常な LC において、T 代謝に関与すると考えられている微小体が、(Soerstrom 1987 Jones et al. 1993) この研究で観察した過形成 LC s 上では認められなかった。さらに、過形成性 LC 中で数多く観察された中間径フィラメントは、sER や微小体も含む細胞小器官の減少に対する代償的な証拠であるとされた (Ghadially 1975; Soderstrom 1987)。隣接する LC に接する細胞突起の数、遊離 ER、およびいびつな細胞接合の増加が観察され、これらは前がん病変の特徴と一致していた。さらに、今回の研究で観察された、1 つの LC に

1本ないし2本の繊毛が生じる現象は前がん病変の特徴と類似していた(1章図4)。繊毛が生じる現象は、人間男性(Takayama 1981)、ウサギ(Crabo 1963)、および犬(Connell and Christensen 1975)でそれぞれ報告されていた。繊毛形成がLCsの過形成と具体的にどのような関係があるかは記述されていない。しかし、繊毛は細胞増殖の制御およびいくつかの発達シグナル伝達経路で重要な役割を果たすことが示唆されていた(Seeley and Nachury 2009)。

慢性的LH刺激は、ラットのLC過形成を誘発すると報告された。(Jegou and Sharpe 1993)、不妊に悩む男性は、一般男性よりも血清T値が有意に低く、LHレベルが有意に高いため、一定のLC機能障害を生じていることが示唆された(Soderstrom 1987; Holm et al. 2003)。出生後の雄ラットに対する高容量DBP曝露は、LCs数の増加を伴う精巣の形成不全および精巣ステロイドホルモンの不変化もしくは減少を引き起こすと報告されている(Kim et al. 2004, Alam et al. 2010)。そして、di(2-ethylhexyl) phthalate, di-n-pentyl phthalate, di-n-octyl phthalate, diethylphthalate等のフタル酸エステルを6週齢から8週齢ラットに2日間投与することで、LC上のERの小嚢化と膨張が認められたという、超微構造学的検討が実施された(Jones et al. 1993)。また妊娠12日齢から21日齢の間、妊娠ラットに対してフタル酸エステルを毎日投与することは、LCs中でステロイド生成能が欠乏したsERを大量に含有する像が観察されることと関係があると考えられた。成獣期、すなわち生後9週齢以降、胎生期100mg/kg曝露群LCs中のsERの総量、は加齢に伴い緩やかに減少し続け、17週齢時点ではLCsがほとんど観察されなくなる。これらのデータより、DBP曝露はLC中のsERに対して、経時的な形態学的影響を及ぼすことが示された。フタル酸エステルを経口投与すると、それらは48時間以内に速やかに代謝され排泄されることが明らかになっている(Hoppin et al. 2002)。胎生期に曝露を受けると胎児のLCsは直接的な影響を受ける。胎生期曝露は、思春期のLCsの数を増減させない。しかし、90日齢以降になると、テストステロン不足が引き金となる精巣内テストステロイド生成に対する代償的な反応として、LCsの数が増加する(Mylchreet et al. 2002, Barlow Foter 2003, Hu et al. 2009)。また一方で、胎生期にフタル酸エステルを100mg/kg曝露させることで、5週齢から17週齢までのすべての時点において、Tレベルは有意に低い値を示す。LCsの数の増加は7週齢時点まで観察されなかったが、100mg/kg胎生期曝露群においては、9週齢以降において有意なLCsの数の増加を示し、その数に応じてLHレベルも有意な増加を示した。人間の患者におけるLC過形成は、低い精巣Tレベルおよび高いLHレベルにより引き起こされた(Booth et al. 1987, Holm et al. 2003)。ラットにおいては、胎生期100mg/kgDBP曝露は、思春期後にsERの増加および異形成LCsの増殖を引き起こすとされている。この増加は、LCsおよび血清LHレベルの増加と相関していた。胎生期100mg/kgDBP曝露群ラットは、LCs内に拡張した小嚢を含まないsERを形成した。それらsERの総数は、成獣期において有意に低い値を呈する。さらに、有意に低いTレベルおよび有意に高いLHレベルは、sERの増減と相関していた。1) 胎児ステロイドホルモンと遺伝子の変化は糖質コ

ルチコイドがその異常を増幅されている可能性があること(Howdeshell et al. 2007)。2) コレステロール調節結合たんぱく質 REBP2 依存性遺伝子発現経路の阻害とも相関性があること(Drake et al. 2009)。3) 胎児の Leydig 細胞を介したフタル酸曝露によるステロイドホルモンの生成の抑制作用が、霊長類およびげっ歯類に引き起こされること(Hallmark et al.2007)。4) ラットの胎生期フタル酸曝露が引き起こす出生後の LC の顕著な変化は、成獣期に sER の消失を導くこと(Wakui et al. 2012)が立証されているが、これらについての分子構造学的かつ用量依存的影響について解明されていない。

100mg/kgDBP 胎生期曝露により、Leydig 細胞に毒性がみられたことから、最小毒性量は 100mg/kg/day と考えられる。DBP 胎生期曝露群において、異形 Leydig 細胞が増加することから、DBP の対象臓器が Leydig 細胞と考えられた。次世代の有意に低いテストステロンの値を示したことから Leydig 細胞の機能不全が考えられた。

図 1.

(A) 20 週齢ラット精巣の外観

左が胎生期 DBP

曝露群ラットの精巣

右が対照群ラットの精巣

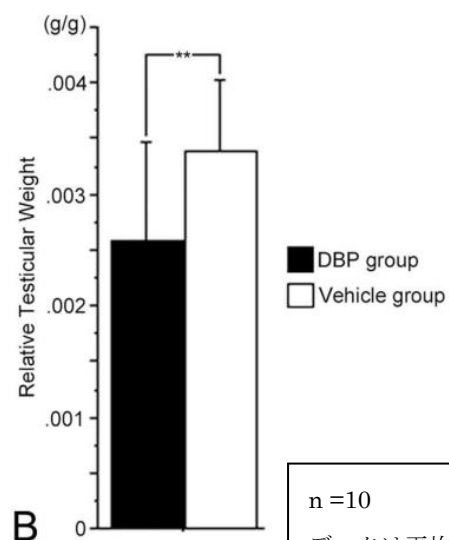


(B) 20 週齢の胎生期 DBP 曝露群

のラットの平均相対精巣重量

(精巣重量/体重) は、

対照群よりも有意に低い。



n = 10

データは平均値±標準誤差で示し、**p
<0.05 とした

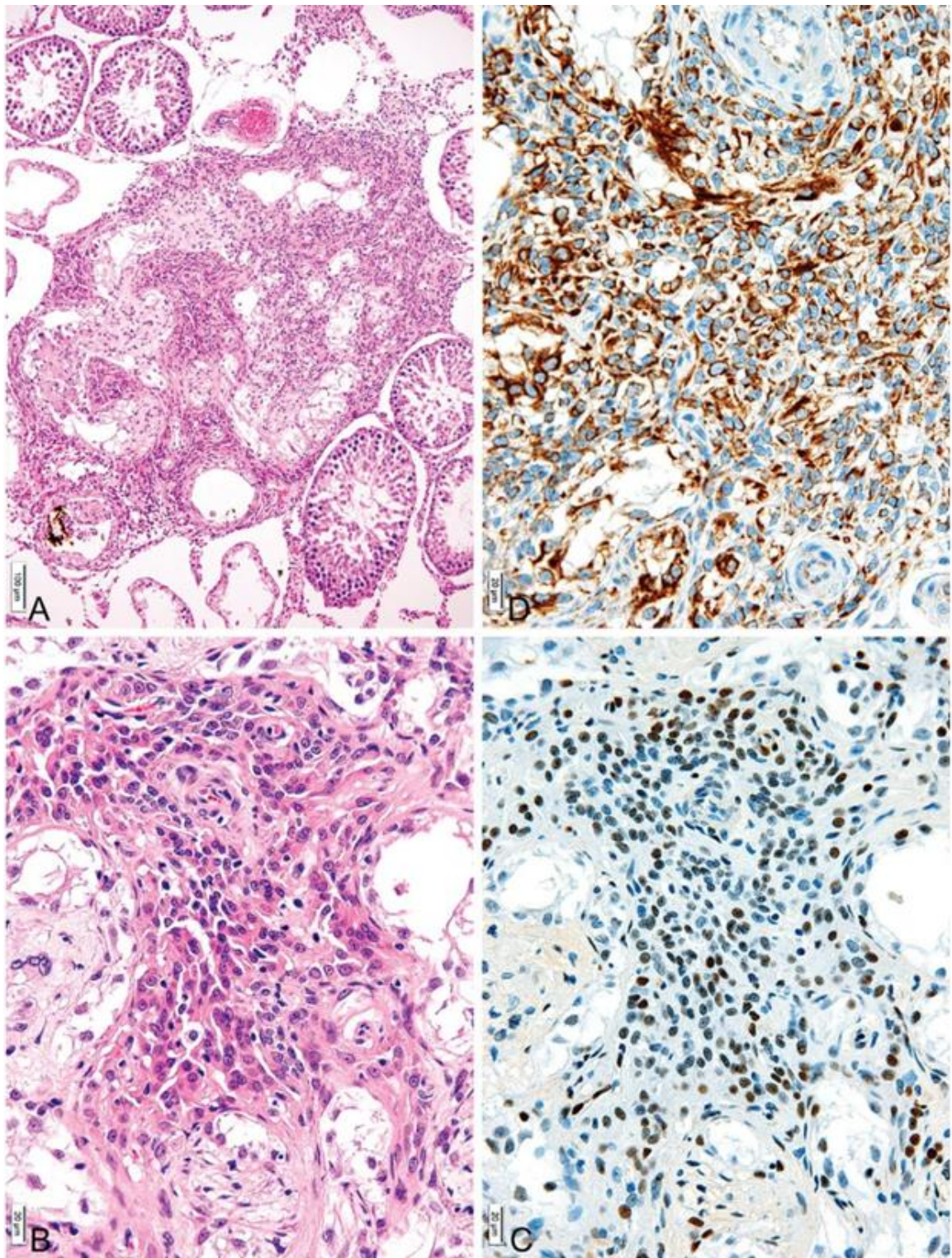


図 2.

胎生期 DBP 曝露群の LCs 過形成の光学顕微鏡写真 bar=100 μ m

A) 結節性の特徴はないが、重度に変性した精細管に囲まれた LC 過形成の病変。

B) 重度に変性した精細管に囲まれた LC 過形成が認められる。LC の凝集は、核小体と

豊富な好酸球性細胞質を含有する大型の卵形核からなる。

C) A) と同様の部位における、PCNA による免疫組織化学分析である。多くの過形成性 LC の細胞質は、PCNA 陽性を示した。

D) (A) の連続した部位における、ビメンチンの免疫組織化学分析である。多くの過形成性 LC の細胞質は、ビメンチン陽性を示した。

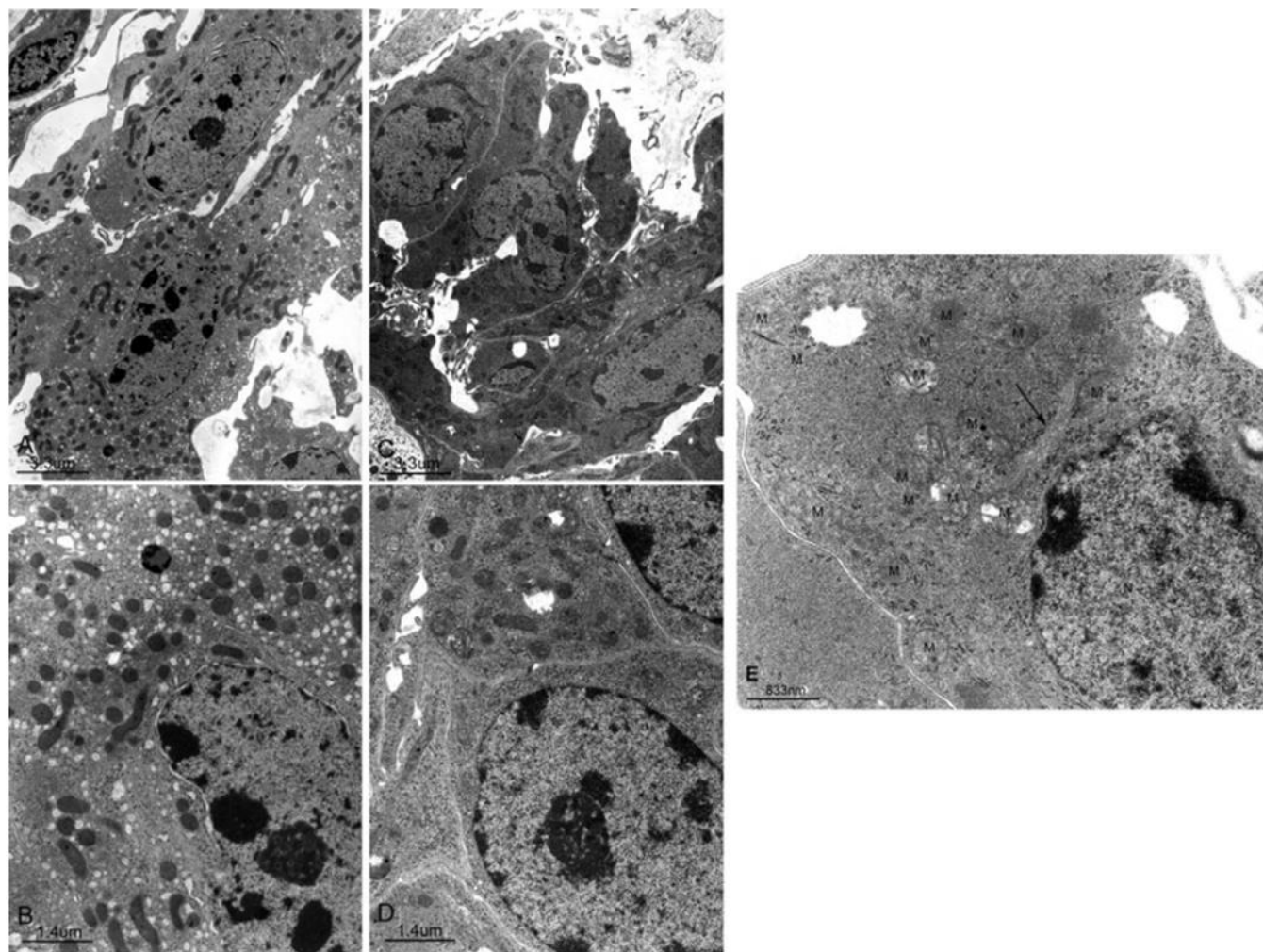


図 3. bar=100 μ m

(A)(B)は対照群の代表的な電子顕微鏡下の写真である。卵形核、豊富に発達した sER、拡張した小胞を含み、大量のミトコンドリアが観察される。

(C)(D)(E)は胎生期 DBP 曝露群の過形成病変を示す LC の、代表的な電子顕微鏡写真。非定型核と数多くのミトコンドリアが観察される。

(E)LC 過形成病変の細胞質の電子顕微鏡写真の高倍率の像である。ミクロフィラメント成分、中間フィラメントの束 (矢印)、多くのミトコンドリア (M)、遊離 rER、および非定型核 (N) で占められている

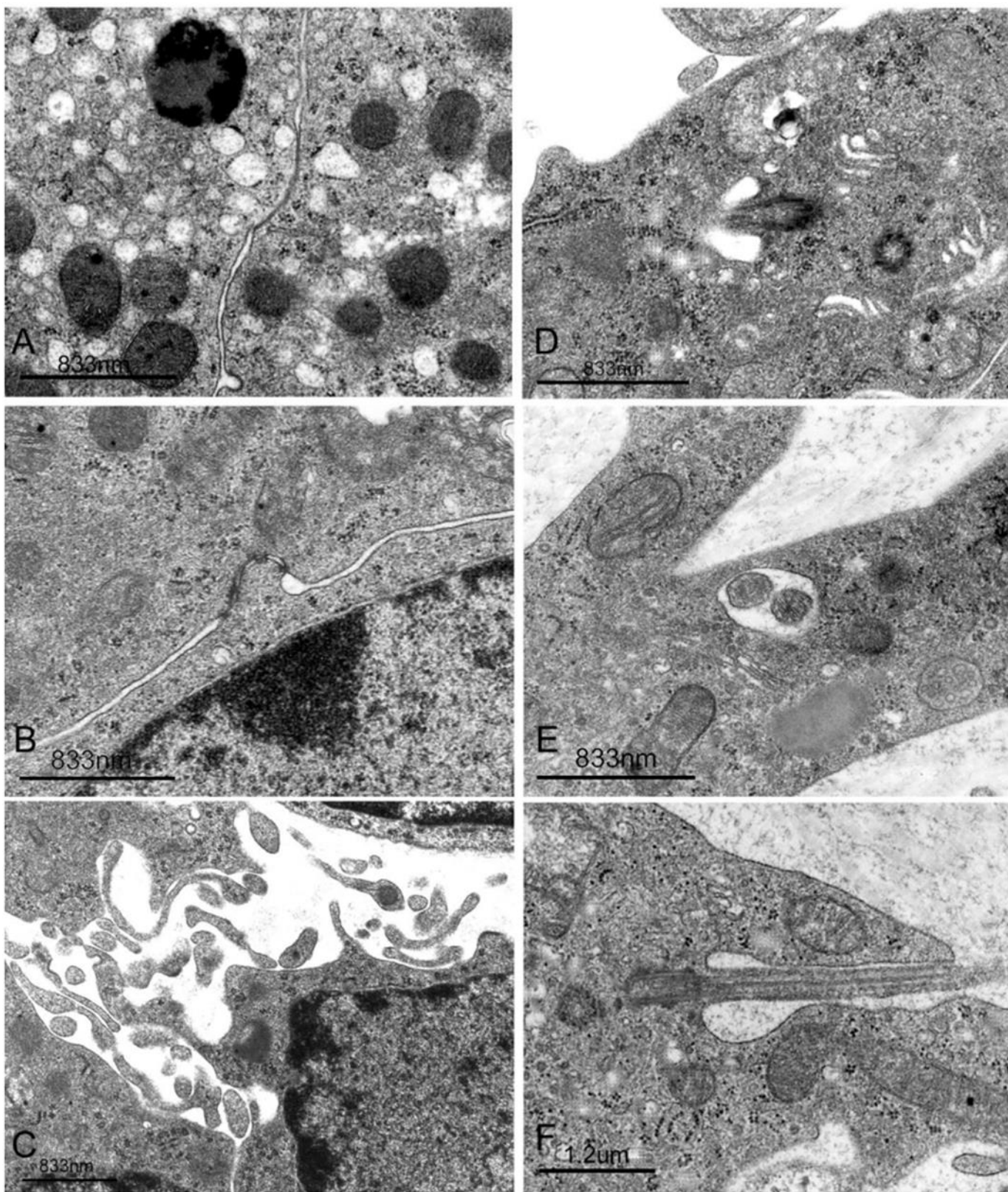


図 4. 胎生期 DBP 曝露群 LC 電子顕微鏡写真

(A)(B) LC は不完全な細胞接合装置を示す(C)多数の細胞質突起が認められる(D)(E)(F)多

数の絨毛が認められる

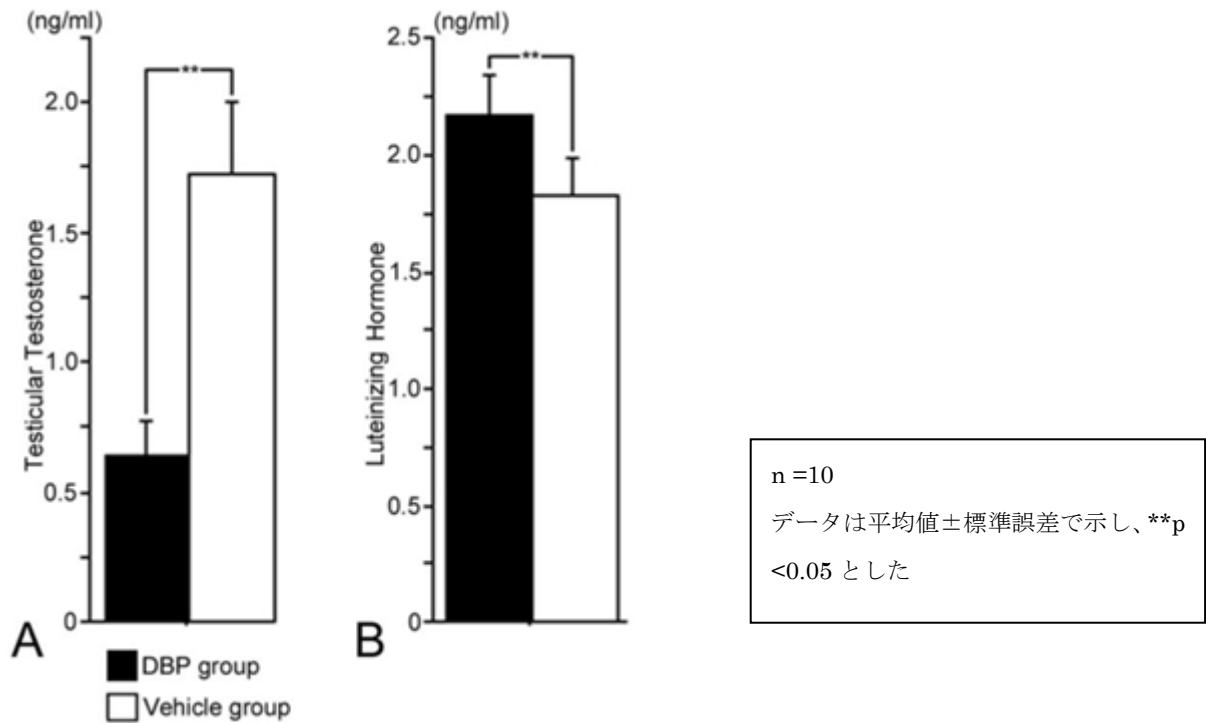


図 5.
精巣テストステロンレベル(ng/ml)および(B)LH レベル(ng/ml)を示す

Effect noted	Vehicle group	DBP group
Atypical nuclei	—	++
sER	++	—
rER	±	++
Free ribosomes	±	++
Cytoplasmic microfilaments	±	++
Microbody	+	—
Cytoplasmic filopodia	±	++
Cilia formation	±	++
Atypical tight junction	—	++

Note. Details are noted on the study; ++, many; +, some; ±, a few; —, none.

(表 1)対照群と胎生期 DBP 曝露群間における、精巣 Leydig 細胞の超微細構造の比較

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」

概要

胎生期 DBP100mgDBP/kg 曝露群ラットでは、精巣 LC の障害を示唆する LC 過形成が認められたので、核内受容体であり性ホルモン受容体である 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検討を行った。5 週齢、7 週齢、9 週齢、14 週齢時点および 17 週齢時点の 5 段階で、Estrogen と Androgen の受容器である、estrogen receptor α 、 β (ER α 、ER β) および androgen receptor (AR) の発現について精査した。免疫組織化学、ウェスタンブロッティング、RT-PCR の手法を用いて ER α 、ER β 、AR 発現タンパク質および RNA 量の測定を実施した。結果、5 週齢から 7 週齢時点のラット思春期の間では、DBP 投与群中 mRNA 量は DBP 投与群と対照群の間に違いは認められなかった。一方で、胎生期 DBP 曝露群ラットは、9 週齢から 17 週齢の成獣期においては、有意に高いレベルの ER α 、および有意に低いレベルの ER β および AR の発現を表した。胎生期 DBP 曝露は成獣期のラットの LC 増加を引き起こす。またこの増加は、LC 内の ER α の増加および ER β と AR の減少が原因である考えられる。

材料と方法

DBP (99.8% pure) は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI) から購入した。生後 8 週齢の雌 Sprague-Dawley ラット (n=20) を SRL Co (静岡、日本) から妊娠 0 日目に調達した。妊娠 0 日目は、交尾が確認された日とした。到着後、ランダムイズを活用して分配した。飼育は、約 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ かつ 12 時間の明暗サイクルの環境下で実施した。高効率微粒子空気 (HEPA) でろ過した大気置換室で、木材チップを敷いたポリカーボネートケージに個別に収容した。動物には食餌 (MF、Oriental Yeast, Osaka, Japan) と水を自由摂取させた。DBP (0 (対照群)、10、50、100mg/kg/day) を混合した 0.5ml のコーンオイル (Nacalai Tesque INC., Osaka, Japan) を 4 つの群の妊娠ラット (1 群あたり 5 頭) に妊娠 12 日齢から 21 日齢の間に経口投与 (i.g.) した。新鮮な溶液を毎朝に調製し、午前 9 時に投与した。レジメンは、100mg/kg/day DBP 胎生期曝露群が有害な影響を与えると報告した研究に基づいて作成した (Mylchreest et al. 1999; Barlow and Foster, 2003; Wakui et al, 2013, 2014)。生まれた仔は出生時に体重を測定し、性別判断を行った。DBP、コーンオイルを投与されていない母ラット 1 匹につき、4 匹の雄と 4 匹の雌で計 8 匹の子供を割り当てた。リッター調節で数を調節した。生後 21 日目に離乳を行った。仔ラットは、ポリカーボネートケージにて飼育を行い、床に敷いた木材チップは 5 日ごとに交換した (1 ケージあたりに単一性別の 4 頭を飼育)。5、7、9、14、17 週齢時点で、DBP 処理および対照群の雄のラットを麻酔し、CO₂ の過剰摂取により安楽死させた。本研究に使用されなかった動物は、他の調査で利用した。精巣を取り出して重量を測定し、サンプルを 10% ホルムアルデヒド 0.1 M リン酸緩衝液 (pH

7.4) で固定した。ホルマリン固定された精巣を切断し、パラフィンブロックに包埋した上で、厚さ $5\mu\text{m}$ の組織切片が精細管全体の断面を示すよう薄切した。LC の数は、コンピュータ形態計測プログラム Image-Pro Plus バージョン 7.0.1 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD) を使用して、セクションごとに $16\times 10^4\mu\text{m}$ の 50 以上の正方形領域において、ランダムにカウントした。特異性が確認されている $\text{ER}\alpha$ 、 $\text{ER}\beta$ 、および AR 抗体を用いた (Saunders et al. 1997; Wakui et al. 2011) $\text{ER}\alpha$ の検出には、 $\text{ER}\beta$ と構造上の類似点を持たない (Saunders et al. 1997; Wakui et al. 2011) マウス抗 ER 抗体である MC-20 血清 (Santa Cruz Santa Cruz CA) を使用した。 $\text{ER}\beta$ の検出には、ウサギ抗 ER 抗体である PA1-310 抗血清 (Affinity BioReagents Golden CO) を、AR の検出にはウサギ抗 AR 抗体である PA1-111 血清 (Affinity BioReagents Golden CO) を用いた。これら血清はアフィニティ精製で製造されている。免疫組織学的検査は ABC 法を用いて行った。

結果

妊娠 12 日齢から 21 日齢まで飼養した DBP 投与群の体重量には変化は認められなかった。生まれてくる仔ラットの個体サイズおよび生存率、および性別の偏りにも、対照群と比べて差異は認められなかった (Shirai et al. 2013)。7 週齢時までの仔ラットの精巣重量は、投与群と対照群の間で差異は認められなかった。しかし、9 週齢時点において、胎生期曝露群ラット精巣重量は顕著な減少を示した (Shirai et al. 2013)。一方で、DBP 投与群は、対照群と比較して、T レベルの有意な減少がすべての週齢において発生している。精巣 LH レベルは、7 から 9 週齢、すなわち思春期には、DBP 投与群は、対照群よりも低い値を示した。しかし一方で、9 から 17 週齢時点においては、対照群と比較して顕著に高い値を指し示した (Shirai et al. 2013)。光学顕微鏡下および電子顕微鏡下の、ラットにおける LCs の観察を、胎生期 100mg/kg 投与群および対照群それぞれについて、5 から 17 週齢の各週齢にて行った。顕微鏡観察下での精巣構造は、7 から 9 週齢時点では対照群と有意差のない構造を示していた。しかし加齢に伴い、拡張した精原細胞の消失を伴う精巣の萎縮が徐々に観察され、LC 中の細胞の数の増加が観察された。また、9 週齢以降、精巣の萎縮および異形成 LCs の過剰増殖が認められた。免疫組織学的検査とウェスタンブロットにより示された、胎生期 DBP 曝露群および対照群の LC 中で発現した $\text{ER}\alpha$ $\text{ER}\beta$ AR は 5、7 週齢時点で近い値を表した。しかし 9-17 週齢間において、 $\text{ER}\alpha$ は増加を示し、 $\text{ER}\beta$ と AR の発現は DBP 曝露群において減少傾向を示した (2 章図 5)。RT-PCR による検証においても、 $\text{ER}\alpha$ と $\text{ER}\beta$ 、AR の mRNA の発現は 5 週齢から 7 週齢時点で曝露群と対照群の間で差異は認められなかったが、9 週齢から 17 週齢時点において、 $\text{ER}\alpha$ mRNA は高値を、 $\text{ER}\beta$ mRNA と AR は優位に低い値を示すことが明らかになった (2 章図 2、3)。

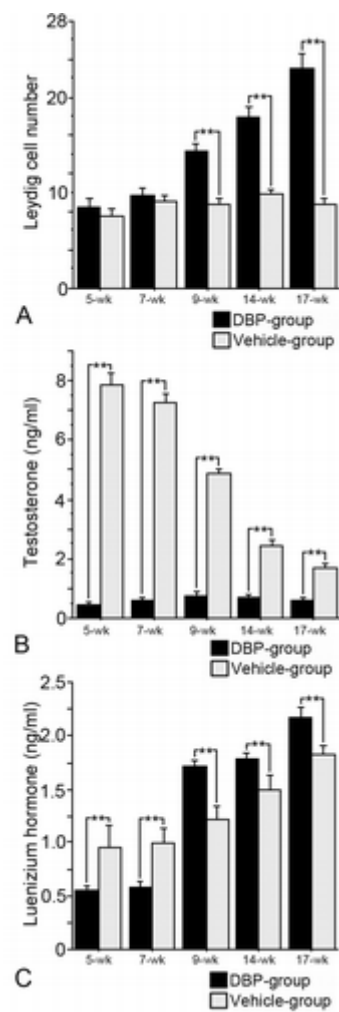
考察

DBP を含むフタル酸エステルの主要な作用ターゲットは、雄の主要ステロイドホルモンと

生殖細胞成熟を調節するとされている $ER\alpha$ $ER\beta$ AR と男性ホルモンおよび、それらを分泌する LCs(Harris et al. 1997、Paech et al.1997、Mylchreest et al. 1999、Parks et al. 2000、Akingbemi et al. 2001、Foser et al.2001、Gray et al. 2001、Akingbemi et al.2004、Selva et al. 2004、Alam et al. 2010)。出生後ラットにおける、未成熟の LC s および成熟 LCs の二つの状態における LCs の生成状況がそれぞれ調査された。後者はほとんどの 8 週齢のラットで分布が認められた。成熟 LCs は二次性徴、交尾行動、および受胎に必須である(Chen et al. 2009、Wu et al. 2010)。成熟 LCs に対する DBP が及ぼす直接的な作用は、T レベルの減少、および LH レベルの補填的な増加である(Pan et al. 2006)。未成熟 LC s に対する直接的な DBP の作用は 4 週齢の思春期ラットに 30 日間 DBP を曝露させることで発生する(Ryuet al. 2007)。そしてまた、Diethylhexyl phthalate(DEHP)の場合は 28 日間曝露させることによって 3 週齢時点で発現する(Akigbemi et al. 2001)。その作用は精巣テストステロンレベルの上昇および血清 LH レベルの上昇である。さらに 5 から 14 日齢ラットが DBP 曝露(Kim et al. 2004)もしくは 4 週齢のラットに 30 日間 DBP を投与する(Ryu et al. 2007)ことにより、精巣 $ER\beta$ および AR の値の有意な下降が認められたが、精巣 $ER\alpha$ のレベルは変化を示さないか、もしくは不明瞭な変化であった。

一方で、妊娠時の成熟 LC s に対するフタル酸曝露の影響は、生後の曝露による影響とはまた異なるものと考えられている(Mylchreest et al. 1998、Barlow、Foster 2003 Wakui et al.2012、Shirai et al.2013)。なぜなら DBP は速やかに胎盤を経由して胎児に移行するからであり(Clouwet al. 2008)、フタル酸モノエステルの半減期は 24 時間であることから、胎児に対する曝露は速やかに終了し、DBP はラットの仔の体内から除去される(Hoppinet al. 2002、Barlow,Foter 2003)。妊娠期の DBP 曝露は、母体の LC s に直接の影響を与えないが、DBP は、胎児の LC s に刺激を与えて、過形成を伴う非定型成熟 LC s が引き起こす(Wakui et al. 2012、Shirai et al. 2013)。成獣期の低 T レベルは、胎生期 DBP 曝露を受けた LCs が分子形態学的に非常に少ない ER レベルを示したために生じた(Wakui et al. 2012、Shirai et al. 2013)。胎生期 DBP 曝露が、成獣期に LC 過形成を伴う高 LH レベルを示すのは、不十分な T に対する補償的な反応と考えられている(Mylchreest 1998、Gray 1999、Mylchreest 2001、Shultz 2001、Mylchreest 2002、Barlow 2004)。T の減少は LCs 中 $ER\alpha$ の活動を促進して(Delbeet al. 2005)、胎生期の DBP 曝露による成獣期 LCs の過形成は、 $ER\alpha$ の経路活動の増強により引き起こされるとされている。胎生期 DBP 曝露は成獣ラットの LC に不可逆の影響を与えた。そして LCs の過形成はまた、LH レベルの向上と LCs 上の $ER\alpha$ の高い発現を引き起こすと考えられる。さらに精細管の退縮が T レベルおよび LCs 上の $ER\beta$ および AR の低発現により引き起こされるともされる。、 $ER\alpha$ は心臓血管系や骨といった他の臓器でも発現することから、胎生期 DBP 曝露は他の臓器にも影響を与えていると考えられた。

精巣の $ER\alpha$ の増加から Leydig 細胞におけるエストロゲンに対するが考えられる。また、 AR の低下から、Leydig 細胞のテストステロンへの感受性の低下が考えられる



n =5

データは平均値±標準誤差で示し、**p
<0.05 とした

図 1.

(A)単位平方あたりの Leydig 細胞数 ($16 \times 10^4 \mu\text{m}$) (B)精巣テストステロン (ng / ml) レベル(C) 血清黄体形成ホルモン (ng / ml)

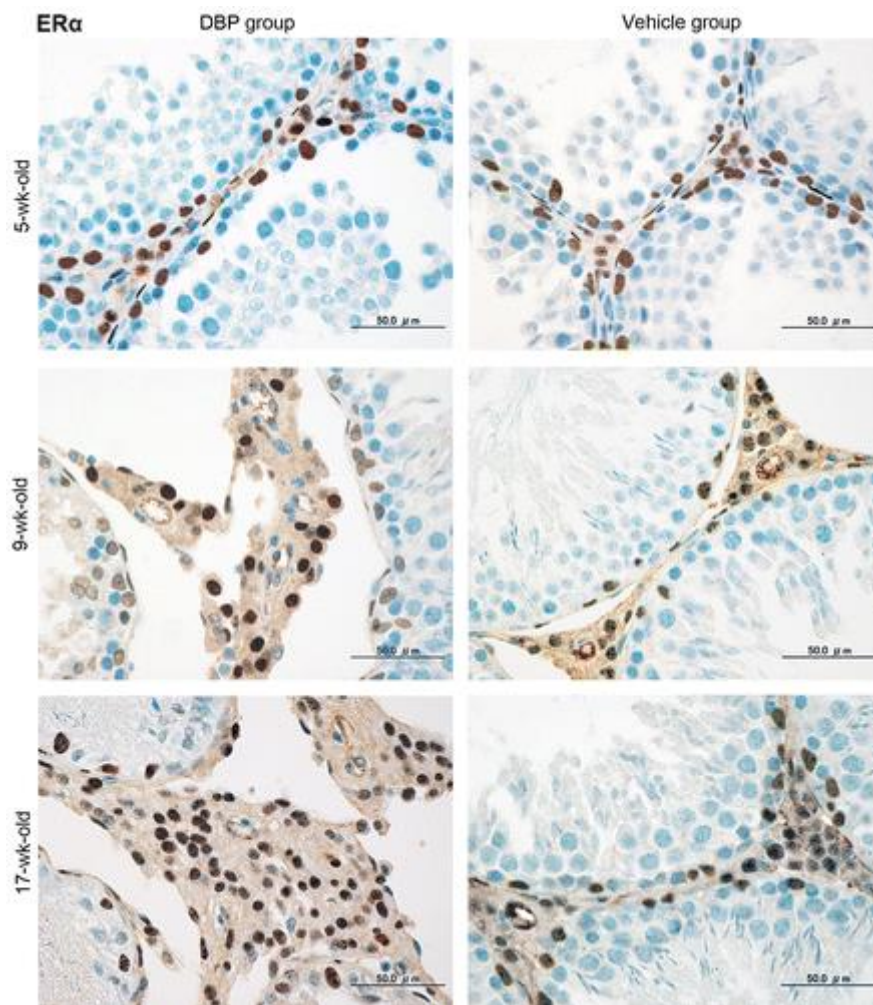


図 2.

免疫組織化学法により ER α 抗体を分析した。Leydig 細胞、セルトリ細胞、および尿細管周囲細胞の核に褐色の免疫組織化学的染色が認められた。Leydig 細胞の数は年齢とともに増加し、胎生期 DBP 曝露群ラットは LC 過形成が見られる。

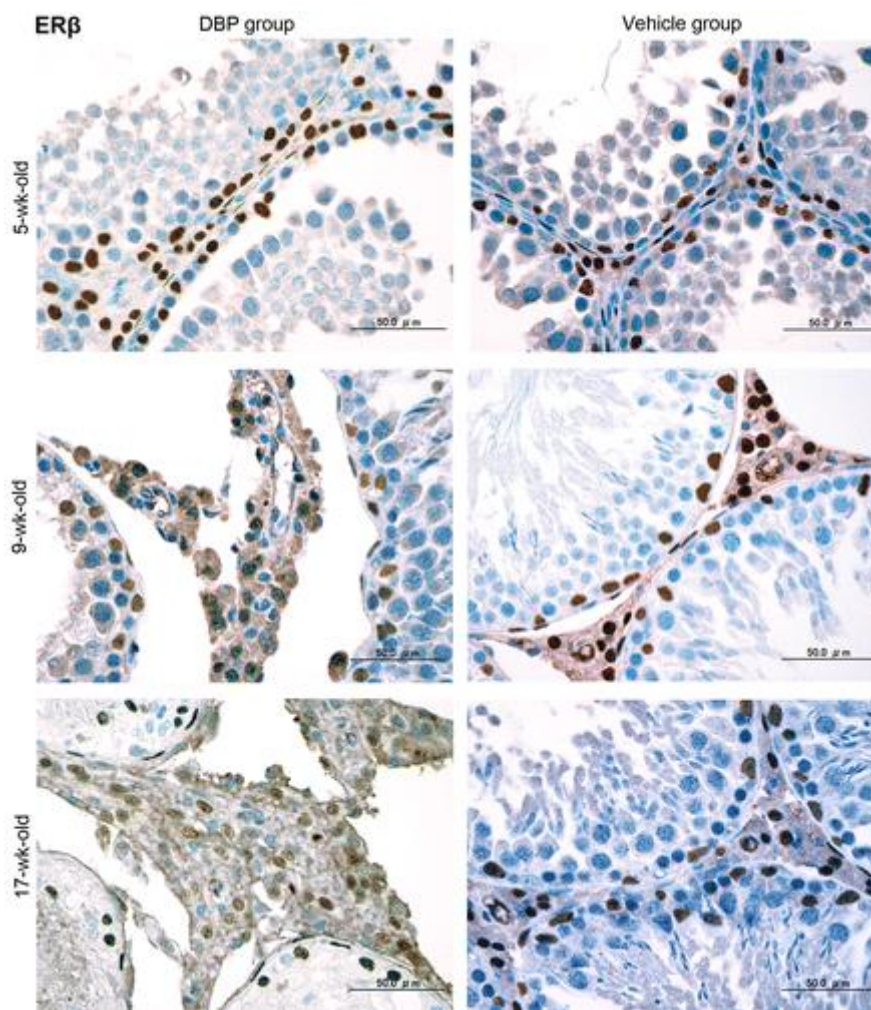


図 3.

免疫組織化学法により ER β 抗体を分析した。Leydig 細胞、Sertoli 細胞、および尿細管周囲細胞の核に褐色の免疫組織化学的染色が認められた。Leydig 細胞の数は年齢とともに増加し、胎生期 DBP 曝露群ラットは 9 週齢時点で LC 過形成が見られる。

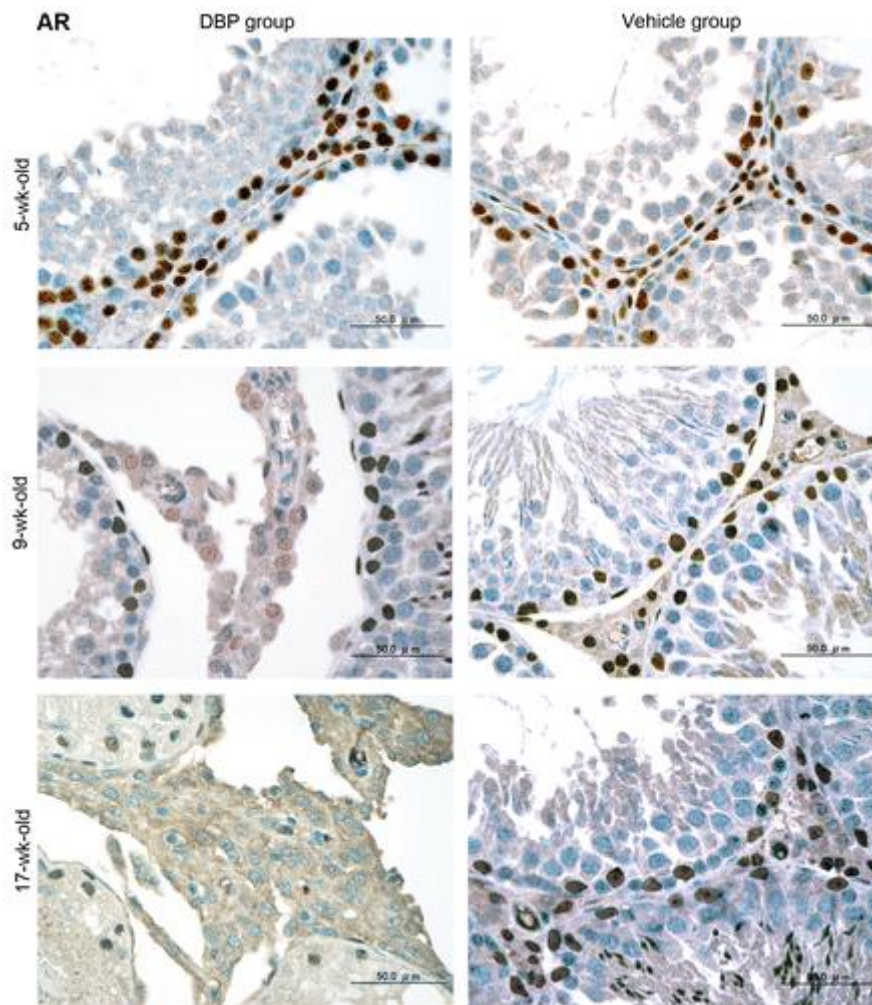
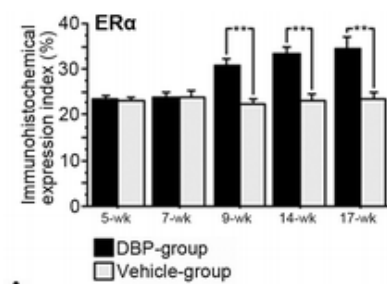
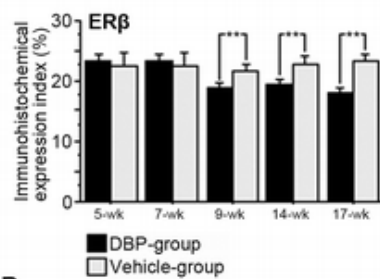


図 4.

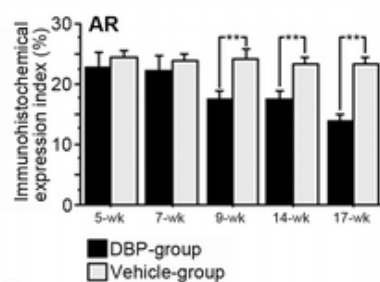
免疫組織化学法により ER α 抗体を分析した。Leydig 細胞、Sertoli 細胞、および尿細管周囲細胞の核に褐色の免疫組織化学的染色が認められた。Leydig 細胞の数は年齢とともに増加し、胎生期 DBP 曝露群ラットは 9 週齢時点で LC 過形成が見られる。



A



B



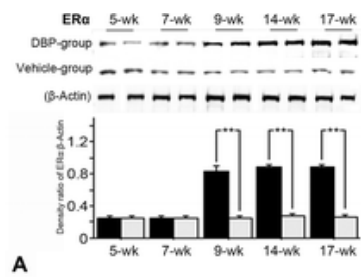
C

n = 5

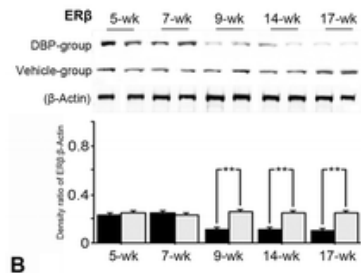
データは平均値±標準誤差で示し、**p

<0.05 とした

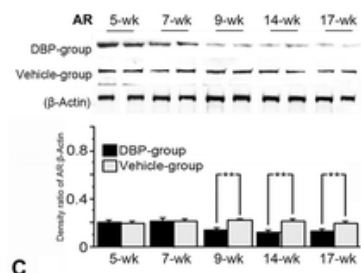
図 5. 各週齢時の DBP 曝露群と対照群の免疫組織化学的発現比較 (A) ER α (B) ER β (C) AR



A



B



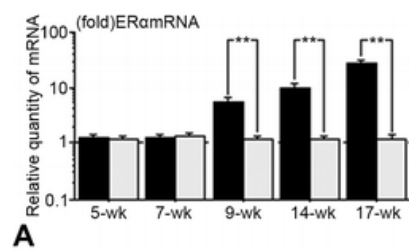
C

n = 5

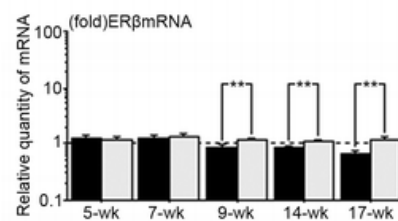
データは平均値±標準誤差で示し、**p

<0.05 とした

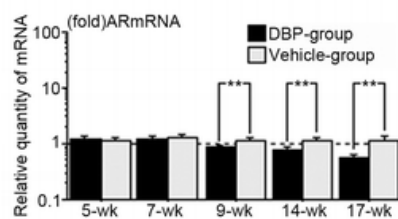
図6. ウェスタンブロット法による5, 7, 14, 17週齢ラット精巣における(A)ER α (B)ER β (C)ARそれぞれのたんぱく質検出の結果。上のパネルはバンドを表している



A



B



C

n = 5

データは平均値±標準誤差で示し、**p
<0.05 とした

図 7. RT-PCR 法による 5, 7, 14, 17 週齢ラット精巣における (A)ER α (B)ER β (C)AR それぞれの mRNA 発現レベル p < .05

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」

概要

胎生期 DBP100mgDBP/kg 曝露群ラットの LC の sER の分布状況を超微形態学的に観察し、胎生期 DBP 曝露との関連性について検討した。さらに 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、P450_{scc} と、sER に分布する 3 β -HSD、P450c17、17 β -HSD、について分子生物学的に検討した。胎生期 DBP 曝露ラットの LC 中の ER は思春期以降数を減少し、最終的に消失することが明らかになった。RT-PCR およびウェスタンブロッティング分析により、胎生期 DBP 曝露群ラットの StAR および P450_{scc} レベルは、対照群と比較して 5 および 7 週齢時点で有意に低かったが、9 から 17 週齢時点で有意な差がなくなるまで上昇することが明らかになった。胎生期 DBP 曝露群ラットの 3 α -HSD、P450c17、m17 α -HSD mRNA およびタンパク質発現レベルは、5 週齢および 7 週齢時点で対照群と有意な差はなかったが、9 から 17 週齢時点では有意な低下を示した。胎生期 DBP 曝露は、LC の ER に変化をもたらし、T 生合成酵素の減少を引き起こした。

諸言

雌親個体に投与された DPB は、様々な繁殖異常を子孫の雄ラットに引き起こす。その異常は、アンドレジェンレセプターへのアンタゴニスト投与にて観察される異常と近似することが知られている。生殖突起肛門距離の減少 2) 精巣下降の遅延 3) 尿道下裂 4) nipple retention 5) 雄ラットにおける膺の発達が認められている。それに加えて、先行研究により、子宮分析により、エストロゲンが既定値を示さないことが判明している。妊娠時にフタル酸を投与されたラットでは、胎盤バリアを超えて、経胎盤移行することによって、胎児がフタル酸に曝露される。LCs は、ミトコンドリア、sER と関連のあるステロイドホルモン生成酵素を介した、テストステロン合成能を持つ。LCs はまた、胎児の発達と雄の性差に重要な役割を果たすことが報告されている。胎生期 DBP 曝露は、特有の Leydig 細胞滑面小胞体減少を思春期のラットに引き起こす。胎生期 DBP 曝露ラットの Leydig 細胞内の形態学的変化とテストステロン生化学的遺伝子、たんぱく質間の、発現レベルについての相関性は明示されている。しかしこれら LCs の変容のメカニズムは不明瞭である。故に今回の実験においては、Leydig 細胞滑面小胞体の形態学的変化とテストステロンステロイド生成関連酵素たんぱく質年齢相関的な関連性の調査が目的となる。胎生期に DBP (100mg/kg) の曝露を受けた、ミトコンドリア関連酵素 StAR、P450_{scc}、および滑面小胞体関連酵素である 3 β -HSD、P450c17、17 β -HSD に関連する実験である。

材料と方法

DBP (99.8% pure)は Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)から購入した。生後 8 週齢の雌 Sprague-Dawley ラット (n=20)を SRL Co (静岡、日本)から妊娠 0 日目に調達した。妊娠

0 日目は、交尾が確認された日とする。到着後、無作為化を活用して分配。湿度 $55 \pm 5\%$ 、約 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ で 12 時間の明暗サイクルに維持された高効率粒子空気 (HEPA) でろ過した待機置換室に設置した、木材チップ敷き詰めたポリカーボネートゲージに収容した。動物には食餌 (MF、OrientalYeast, Osaka, Japan) と水を自由摂取させた。DBP を混合の 0.5ml のコーンオイル (Nacalai Tesque INC., Osaka, Japan) を 4 グループの妊娠ラット (1 グループあたり 5 頭) に経口投与 (i. g.) 投与。対照群および胎生期 DBP10、50、100mg/kg/day 曝露群毎でグループ分けを実施。溶液を毎朝に調製し、午前 9 時に投与した。レジメンは、以前に実施された、100mg/kg/day DBP 胎生期曝露群が有害な影響を示した研究のものに基づいて作成した (Mylchreest et al. 1999; Barlow and Foster, 2003; Wakui et al, 2013, 2014)。生まれた仔は出生時に体重を測定し、性別判断を行った。母ラット 1 匹につき、4 匹の雄と 4 匹の雌で 8 匹の子孫となるよう、リッター調節で数を減らした。生後 21 日目に離乳を行い、母ラットから仔ラットを離した。仔ラットは、ポリカーボネイトケージにて飼育を行い、寝具として用いる木材チップは 5 日ごとに交換する (1 ケージあたり 4 頭、単一性別)。すべての動物は、出生時に体重を測定し、5, 7, 9, 14 および 17 週齢で再び体重を測定した。各時点 (5, 7, 9, 14 および 17 週齢) について、5 匹の雄 (各用量群の 5 つのケージから 1 匹の雄を無作為に選択) を秤量し、麻酔し、CO₂ 過剰摂取により安楽死させた。各時点で 1 群あたり 5 匹のラットの精巣を、1.2% グルタルアルデヒド (2.0 時間) を含有する 0.1M リン酸緩衝液に固定し、1.0% 四酸化オスミウム (2.0 時間) 中で後固定した。段階的にアルコール中で脱水した後、標本を Epon 812 (TAAB, Berkshire, UK) に包埋した。切片 ($1.0 \mu\text{m}$) を Porter-Blum MT-IIb ウルトラミクロトームを用いて切断し、メチレンブルーで染色した。LC をカウントするために、CCD アタッチメント DP73 (Olympus, Tokyo, Japan) を備えたオリンパス BX53 顕微鏡で、光学顕微鏡画像を、40× 対物レンズで捕捉した。LC は精細管なしの間質組織領域内に位置するため、間質組織領域 ($104 \mu\text{m}^2$) の単位平方当りの LC の数をカウントした。サンプリングバイアスを回避するために、各グループの各精巣の 10 個の異なる試料ブロックから 50 個のランダムに選択された部位を調べた。超微細構造研究のために、薄切片を Porter-Blum MT-IIb ウルトラミクロトームで切断し、formvar (ポリビニルホルマール) 被覆スリットグリッド上に載せた。酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色した後、電子顕微鏡 (H500H, Hitachi, JEM-1400plus, JEOL, Tokyo, Japan) を用いて切片を検査した。白井 et al. によって確立された sER を定量化するための分析法を用いた。この研究では、sER の量として半定量化するために、重複を避けるために単位円 (直径 $2.0 \mu\text{m}$) を重ね、LC の細胞質領域の電子顕微鏡写真の各 sER 質量に対して 15,000 倍の倍率でランダムに撮影し、サンプリングバイアスを防いだ。単位平方あたりの単位円の数 ($8.4 \mu\text{m}$ $10.4 \mu\text{m}$) を使用して、LC の sER の相対量を定量化した。20 個の Leydig 細胞ミトコンドリア (Mt) を、各精巣を介して 10 個の異なる標本ブロックのそれぞれからランダムに取り出し、写真グラフ化した。Mt の形態計測は、Image-Pro Plus (Media Cybernetics) によって分析した。Mt の横断面の直径を Mt の大きさとみなし、Mt の最長径 (Mt の長径) の平方根

から計算を行った。長さとの比が 2 未満の Mt を適用した。Mt、核、および LC 細胞質の領域も Image-Pro Plus (Media Cybernetics) によって分析した。LC の N / C 比は核領域 / 細胞質領域として計算した。各群から 5 匹のラットを選出し、精巣 T レベルを測定した。測定にはラジオイムノアッセイを用いた。解剖後、各精巣から切片を採取し、各精巣切片から 0.5mg 分を切り出し取り、ニトログリセリン溶液中に $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。各ラット個体の右精巣左精巣をセットで解凍し、ホモジナイズを実施した。ホモジナイズはそれぞれ 0.5ml PBS にて実施した。解凍で得たアリコートはジエチルエーテル (2.0ml) および 5 分間の振盪の後、ドライアイスマタノールバス (-98°C) 中に静置した。抽出で分離した非水和性部の上澄みを採取し、一晚蒸気中に保存し乾燥させて、試料緩衝液中にて再構成させた。試料の検出限界 (LOD) は 40pg/tissue であった。冷凍精巣から QIAshredding ホモジナイザーおよび RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Inc., sdValencia, CA) を用いて Total RNA を抽出した。分離後、得た RNA サンプル Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA) および RNA 6000 LabChip Kit (Agilent Technologies) を使用して精査した。TaqMan Reverse Transcription kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) を用いて一本鎖 cDNA を生合成するために各 RNA サンプルから 100ng のサンプルを用いた。ついで 2 ステップのプロトコルを用いて。対照群は RNA-RT を用いず、また no RNA + RT の状態で合成を実施した。Reverse transcription を含有する 1×TaqMan RT buffer: 5.5 mM MgCl₂; 500mM dATP, dGTP, dCTP、それぞれにおいて 500mM を最終的に混合した。標的遺伝子の定量調査においては、RT-PCR (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, PE Applied Biosystems TaqMan chemistry and probes Taq man を用いた分析を実施した。標的遺伝子の TaqMan プローブおよびプライマーは、事前検証済みの TaqMan アッセイ、すなわち (Applied Biosystems Inc., Foster City CA) (StAR: Rn00280695 ml、P450scc: Rn00568733 ml、3β-HSD: Rn01774741 ml、P450c17: Rn00562601 ml、17β-HSD: Rn00563388 g1) 最適なプライマー、プローブ、cDNA 濃度は、別個の実験セットによって決定された。PCR 反応は、各サンプルの第 1 鎖 cDNA (2.0 ml)、Universal PCR Master Mix キット (PE Applied Biosystems)、250 nM TaqMan プローブ、0.16 U AmpErase UNG (ウラシル N-グリコシラーゼ)、900 nM TaqMan プローブで行った。標的遺伝子および GAPDH のフォワードおよびリバースプライマー。2 つ実験それぞれで、サンプルごとに 3 つの測定を実行した。結果は、ABI Sequence Detector ソフトウェアバージョン 1.7 (PE Applied Biosystems) で分析した。標的遺伝子発現の相対定量化のために、標準曲線法が適用した。製造元の推奨に従って、クローニングキット TOPO II TA (Invitrogen, Carlsbad, CA) を使用して各 PCR 産物から得られたトータル RNA サンプルの 5 種類の希釈 (100、50、25、10、5.0 ng を含む) で、各ターゲット遺伝子 cDNA および GAPDH 増幅プロットの検量線を調べた。標的遺伝子の正規化された値は、平均標的遺伝子値を平均 GAPDH 値で割ることによって決定された。商の標準偏差 (SD) は、次の式を使用して、標的遺伝子と GAPDH の SD から計算された。

商の平均商の CV SD

$$CV2 = CV12 + CV22$$

標的遺伝子値の CV SD は、標的遺伝子値の平均

GAPDH 値の CV SD

平均 GAPDH

正規化されたターゲット遺伝子値は、異なるサンプル中のターゲット遺伝子の相対的な量を比較するために使用される単位のない数値である。この比較を行う 1 つの方法として、サンプルの 1 つをキャリブレーターとして指定する方法がある。この検討においては、2 つのパターンキャリブレーターをキャリブレーターとして選択した。1 つ目は、各年齢での DBP の影響を調査するために使用された対照群の精巣組織であり、2 つ目は、対照群の 19 週齢の精巣組織を用いた。次に、相対的な遺伝子発現の定量化のためのメーカーの指示に従って、平均標的遺伝子値を平均キャリブレーター値で割ったウェスタンブロット分析において、検体を 50 mM Tris-HCl、150 mM KCl (pH 7.4)、1% Triton X-100、0.25 mM フェニルメチルスルホニルフルオリドでホモジナイズし、80,000 g (30 分、4°C) で遠心分離した。ペレットは溶解バッファー (10 mM Tris-HCl、1% SDS、1.0 mM EDTA、10% グリセロール、および 5% 2-メルカプトエタノール) で溶解した。ライセート中のタンパク質濃度 (4.0 µl) を Protein 200 Lab-chip キット (Agilent Technologies Inc.) を使用して定量し、Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent Technologies Inc.) で実行した。各ライセート液から等量 (10 µg) のタンパク質が 10% SDS ポリアクリルアミドで分離された。各溶解物からの等量 (10 µg) のタンパク質を変性条件下で 10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて分離し、免疫ブロットポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Bio-Rad Lab., Hercules, CA) に転写した。0.1% Tween 20 (PBS-T) を含むリン酸緩衝生理食塩水 5% 非脂肪粉乳に浸して、一晩ブロッキングした後、StAR 抗体 (FL-285、ウサギポリクローナル IgG、Santa Cruz Biotech; 1:1000 に希釈)、P450scc (SC-18043、ウサギポリクローナル IgG、Santa Cruz Biotech; 1:1000 に希釈)、3 β-HSD (P-18、ヤギポリクローナル IgG、Santa Cruz Biotech; 1:1000 に希釈)、P450c17 (SC-46081、ヤギポリクローナル IgG、Santa Cruz Biotech; 1:2000 に希釈)、17 α-HSD (M-174、ウサギポリクローナル IgG、Santa Cruz Biotech; PBS-T で β-アクトニンポリクローナル IgG (Santa Cruz Biotech; 1:4000 に希釈)、室温で 1.0 時間オービタルシェーカーでインキュベートした。PBS-T で 3 回洗浄した後、膜をペルオキシダーゼ結合ウサギ IgG (ICN/Cappel Inc., Costa Mesa, CA)、ペルオキシダーゼ結合ヤギ IgG (ICN/Cappel) の 1:2500 希釈液でインキュベートした。シェーカーで 1.0 時間。PBS-T で 3 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System (Applied Biosystems) を使用して膜を検出した。各レーンのタンパク質の相対量を確認するために、対照群として β-アクトニンのレベルを決定した。各データセットについて、平均値、標準偏差、および

平均の標準誤差が計算され、統計分析プログラム Stat View-J 5.0 を使用したスチューデントの t 検定またはシェッフェの F 検定を使用して比較した。0.05 未満の p 値は統計的に有意であると見なした (Abacus Concepts, Piscataway, NJ)。

結果

胎生期 DBP 曝露ラットは、その DBP 投与量に関わらず、胎児の体重量自体に影響は与えなかった (3 章図 1)。産子数、性別の偏りに影響は認められなかった。しかし、精巣の重さと大きさは、成獣期以降、時間経過に伴い、対照群と比べて有意に低い値を示した (3 章図 2)。LH レベルが生後 5 週齢から 7 週齢にかけて有意に低値を示した一方で、9 から 17 週齢の間では有意に高値を示した。DBP を胎生期曝露されたラットの LCs 内の sER の量は、年齢と LCs の増殖および血清 LH レベルに伴って減少した。光学顕微鏡観察で、9 週齢から 17 週齢にかけて、対照群と比較して、LCs の総量は高値を示した (3 章図 4) 通常、LC は異染色体を含む卵形の核小体をもつ。LC はステロイド産生細胞でもあるため、sER を細胞内に豊富に含有しており、滑面小胞体は内部に分泌たんぱく質を多く含有し、膨らんだ小胞として細胞質中に認められている。LC が含有する滑面小胞体 (LCsErs) は、DBP 投与群と比べて、構造的な変容が観察される。5 週齢 7 週齢時点の 100mg/kg 胎生期曝露群の LC の内部構造は通常と異なり多量の滑面小胞体を含む。しかし LCsErs は通常の sER と異なり、たんぱく質を含有する小胞が存在しない。さらに同領域に粗面小胞体および遊離リボソームはほとんど認められなかった (3 章図 5)。sER の総量は 9 週齢以降有意な減少を示し、17 週齢時点で観察されなくなった (3 章図 6)。StaR、P450_{sec}、3 β -HSD、P450_{c17} それぞれの mRNA の発現は RT-PCR を用いて評価した。5 週齢 7 週齢時点で胎生期 DBP 曝露群のこれら mRNA の発現は有意に低い値を示した。9 週齢 14 週齢、および 17 週齢時点では、これら mRNA の発現量は対照群と比べて有意に高い値を示した。しかし、5、7 週齢時点における Hsd3b、Cyp17a1、Hsd17b の発現レベルに、胎生期 DBP 曝露群と対照群間に有意な差は認められなかった (3 章図 7)。一方で、9 週齢以降においては、胎生期 DBP 曝露群は対照群と比較して、有意に低い発現レベルの値を示した。これら mRNA の発現調節と、たんぱく質の発現レベルの関連性を精査するために、ウェスタンブロット法を実施した。たんぱく質の発現の量的関連性をそれぞれの mRNA 発現のパターンから関連を導き出した (3 章図 8)

考察

Di (n-butylphthalate (DBP) 等のフタル酸はアンドロゲン受容体に直接結合することはないが、雄の子孫に影響を及ぼす。精巣テストステロンの生合成はステロイド産生酵素関連たんぱく質の減少を介して発生し、それはコレステロール吸収輸送および雄性げっ歯類体内と培養された LCs 上におけるステロイド産生に影響を与えることが明らかになっている。ステロイド産生酵素関連遺伝子たんぱく質による胎児ラットの精巣萎縮は胎生期 DBP 曝露の直接的な結果として特徴づけられている。しかし、テストステロン生合成機能の変化は、出生後の DBP 曝露によって観察されるという主張に対しての反対意見がいくつか存

在する。Ivell et al. (2003)は500mg/kg DBPを妊娠14.5日齢時から出生後6日齢までの間曝露させたSprague-Dawleyラット個体が、生後24日齢時および生後90日齢時において、精巣テストステロンレベルおよびLC量に違いを示さなかったという報告を上げている。また、Scarano et al (2010)による報告によると、胎生期14日齢から21日齢まで100mg/kgDBPを曝露させた生後60日齢Wistarラットが、対照群と比べ精巣重量および精巣テストステロンレベルに有意な差を示さなかった。Ahmad et al. (2014)の報告によると、アルビノラットに対して50mg/kgDBPを妊娠14から21日齢投与によっても、生後75日齢時点では、精巣テストステロンに影響が現れなかったという。それとは対照的に、Giribabu et al. (2012)は妊娠12日齢から19日齢の間に100mg/kg および500mg/kgDBP 曝露を施したWistarラットは生後90日齢時点で精巣重量および精巣テストステロンレベルに有意な低下を示し、生後100日齢時点では、LCsに過形成も認められたと報告している。妊娠12日齢から21日齢にかけて胎生期DBP曝露を施したSDラットが精巣テストステロンレベルを生後5週齢から17週齢時点全てにおいて、有意に低い値を示したことを以前の実験において示された。また胎生期曝露群は生後9週齢以降、LCsに過形成を示した。詳細な理由は不明であるが、胎生期DBP曝露ラットの精巣Tのステロイド産生に影響を示さず、出生後にLCの過剰増殖、過形成、形態学的変化の有意な増加を示さない研究も存在した。対照的に、胎生期DBP曝露を受けたラットは、生後の精巣T生合成低下および年齢依存の精巣萎縮と精子形成能への障害、LC過形成へと進行する細胞の増殖を引き起こすという報告も損じしている。これら矛盾は胎生期DBP曝露による生後のテストステロンへの影響により不明瞭であるが(Giribabu et al. (2012))それに加えて、胎児LCsは成獣LCsと比較して個体数が異なること、および研究から、胎生期曝露された胎児とその成獣のLCsの差異が重要であることが示唆された。

ラットのLC上でコレステロールから生合成されるTは、ミトコンドリアおよびsER上に存在する2つの主要なカテゴリーの酵素と補酵素によって生成される。その経路は順に、(1)コレステロールはStARによってミトコンドリア内膜に輸送され、P450_{scc}を介して生体内変換されてプレグネノロンを生成(2)プレグネノロンはsERに移動し、3 β -HSDに結合した後、プロゲス(3)プロゲステロンはP450_{c17}によりアンドロステンジオンに代謝され(4)アンドロステンジオンは17 β -HSDによりテストステロンに変換される。Giribabu et al. は100mg/kg および500mg/kgDBP 胎生期曝露(妊娠(妊娠12日から19日齢) Wistarラットは生後100日齢時点で血清Tおよび精巣3 β -HSD、17 β -HSDレベルは有意な減少を示したが、若齢期から周産期までの結果は存在しない。Ivell et al. により、胎生期DBP曝露(妊娠14.5日齢から生後6日齢)SDラットは、生後24日齢および90日齢時点で、StAR、Cyp11a1、Cyp17a1、Hsd17bの発現に有意差が認められなかったと報告されているが、その際肉眼的な精巣形成異常または萎縮を示した雄仔ラットは除外されていた。今回の検証で、胎生期DBP曝露で生じる仔ラットの出生後のT生合成抑制は、出生後発育後の遺伝子転写の二相減少(思春期前時点までのStAR (StAR) P450_{scc} (Cyp11a1) のダウンレギュレーション、思春期

後期から成人期における 3β -HSD (Hsd3b)、P450c17 (Cyp17a1)、 17β -HSD (Hsd17b) のダウンレギュレーション)と同時に発生されたことが説明された。StAR、P450scc、 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD の発現は、ステロイド産生因子 1 (SF1) によって調節されていると考えられている。しかし、今回の検証によって、胎生期曝露により生じる StAR、P450scc と 3β -HSD、P450c17、 17β -HSD の発現パターンにかなりの違いがあることが明らかになった。この研究では、SF1 以外のレベルの調節が存在することが示唆されており、実際、liver receptor homologue-1 (LRH) が LC でのタンパク質の発現に関与することが報告されている。

胎生期 DBP 曝露は、仔ラットの LCsER に、年齢と関連のある形態学的変化を示した。胎生期 DPB 曝露群ラットは対照群と比較して 5, 7 週齢時に有意に多くの LCsER が観察される一方で、9 週齢から徐々に sER の総量が減少し、17 週齢時点で消失する。さらに、胎生期 DBP 曝露群のテストステロン生合成関連遺伝子のダウンレギュレーションは、思春期の前後で異なっていた。思春期前時点で観察された低 T レベルは StAR と P430scc のダウンレギュレーションにより生じたものであった。これら 2 つは、テストステロン生合成の初期段階に置いて律速段階を規定する重要なミトコンドリアたんぱく質である。故に、テストステロン生合成中間物質であるプレグネノロンの不足が、思春期前に有意に多く LCsER が発生した原因であることが示唆された。ただし、DBP 曝露で生じる LC ミトコンドリアの形態学的変化については不明であり、胎生期 DBP 曝露ラット LC ミトコンドリアについてのさらなる検証が必要である。また、 3β -HSD、P450c17、 17β のダウンレギュレーションが、胎生期 DBP 曝露ラットの思春期後期から成獣期に観察される精巣 T レベルの有意な減少に関連があることを示唆している。これらは sER に存在する重要な T 生合成酵素である。しかし、sER に関連する T 生合成酵素のダウンレギュレーションが、思春期後から成獣期までの sER の消失の原因であるかどうかの確率はできなかった。これら上記のメカニズムの検討が必要である。さらに、胎児 LC は成獣 LC と比較して異なるため、胎児および成獣 LC の胎生期曝露効果の違いについて考慮する必要がある。フタル酸エステルの半減期はほぼ 12 時間である。胎生期に体内に吸収されたフタル酸エステルは、離乳後には既に消失しているため、胎生期のフタル酸エステルは、成獣期の T 生合成抑制の直接的な原因とは考えられなかった。胎児期に取り込まれた DBP は、出生後もしくは離乳後時点ですでに消失していると考えられる。本研究で明らかにされた LC に特異的なテストステロンステロイド生合成酵素の変化は、胎生期 DBP 曝露が出生後の LC に、間接的に影響をもたらしていたことを示唆している。酵素の発現の結果から、胎生期 DBP 曝露によるテストステロンの合成の抑制は、成長に伴い変化すると考えられた。

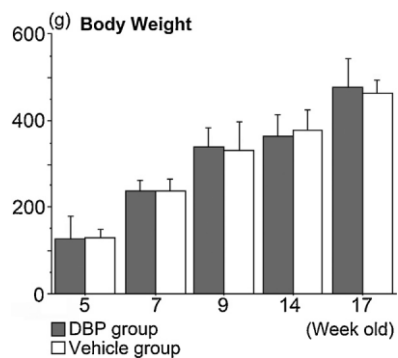


図 1. 対照群および胎生期 100mg/kgDBP 曝露ラット雄ラットの体重。各群ごとに n=5。 (* p < 0.5 Scheffé' s F test)。

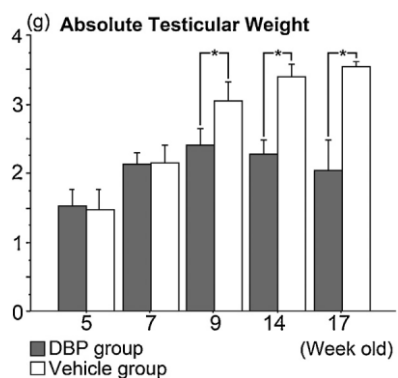


図 2. 対照群および胎生期 100mg/kgDBP 曝露ラット精巣体重。各群ごとに n=5。 (* p < 0.5 Scheffé' s F test)。

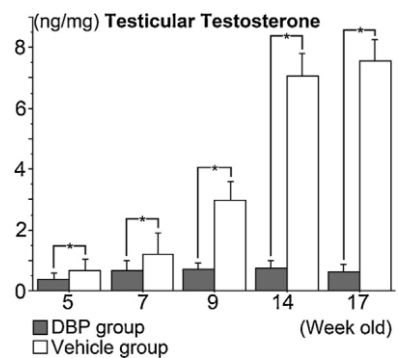


図 3. 対照群および胎生期 100mg/kgDBP 曝露ラット精巣テストステロン値(ng/mg)。各群ごとに n=5。 (* p < 0.5 Scheffé' s F test)。

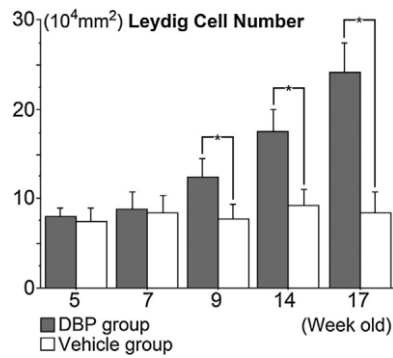


図 4. 対照群および胎生期 100mg/kgDBP 曝露ラットの単位平方あたりの LC 数。各群ごとに n=5。 (* $p < 0.5$ Scheffé' s F test))

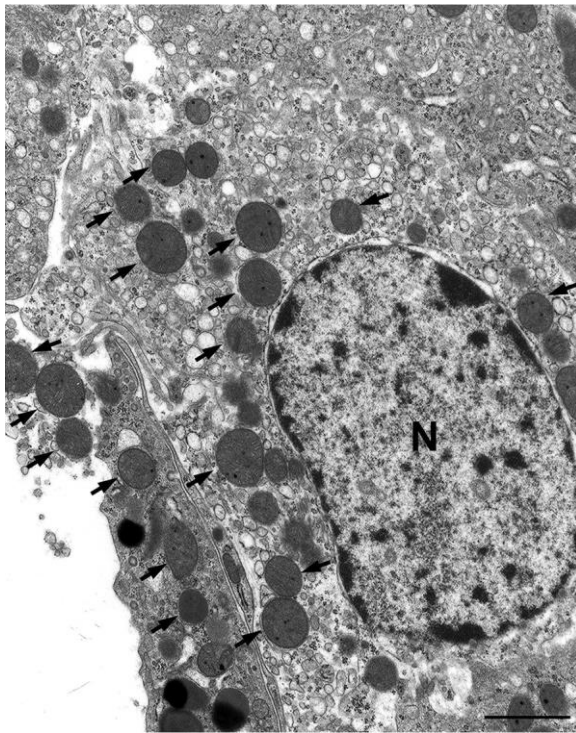
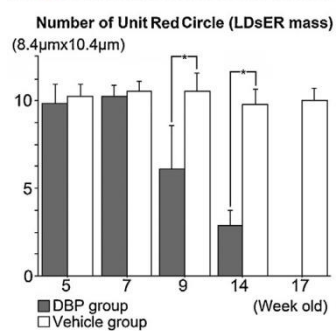
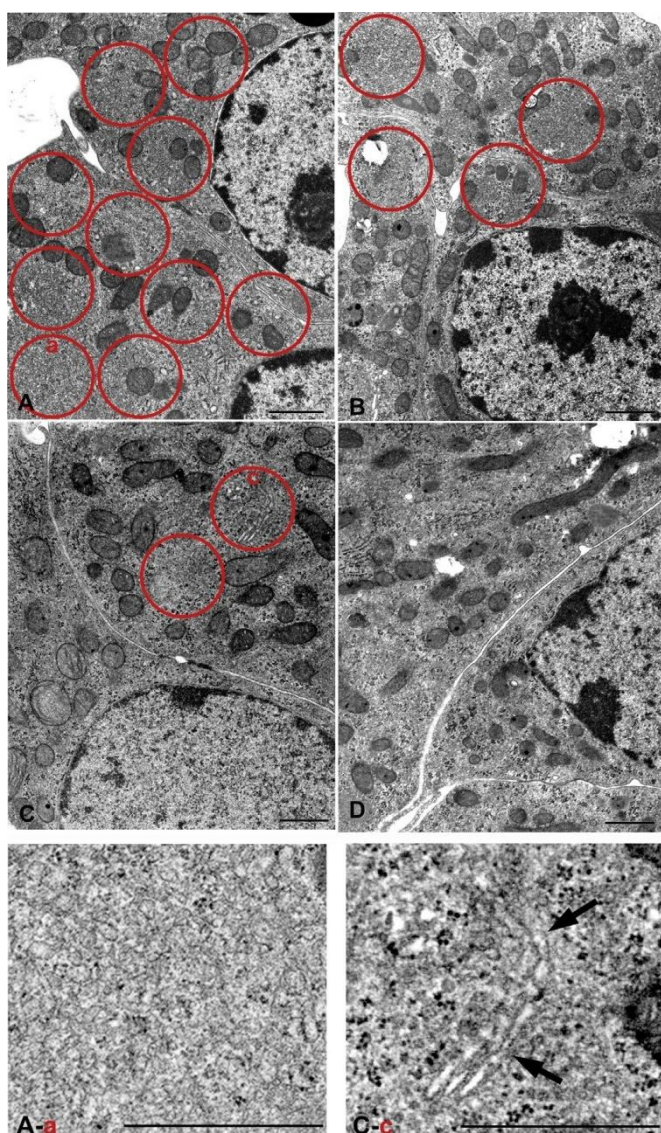


図 5.対照群 7 週齢ラットの LC 電子顕微鏡写真。卵形核(N)、sER、ミトコンドリア(矢印)が観察される。酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛染色;bar= 1.2 μ m。



E

図 6. 妊娠 12～21 日の暴露ラット (100 mg DBP / kg / day) の LC の sER をカウントするために使用した電子顕微鏡写真。定量的に小胞体を測定するために直径 2.0 μm の円 (赤い円) を sER に重ねた。(E) Leydig 細胞 (LCsER) 滑面小胞体の相対量を示すグラフ。

(A) 7 週齢; (B) 9 週齢; (C) 14 週齢; (D) 17 週齢。酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛染色; bar = 1.2 μm。(A) は通常の LCsER を豊富に含有する。(C) は、非拡張槽を含有する LCsER

をみとめた (矢印)。bar= 1.2 μ m

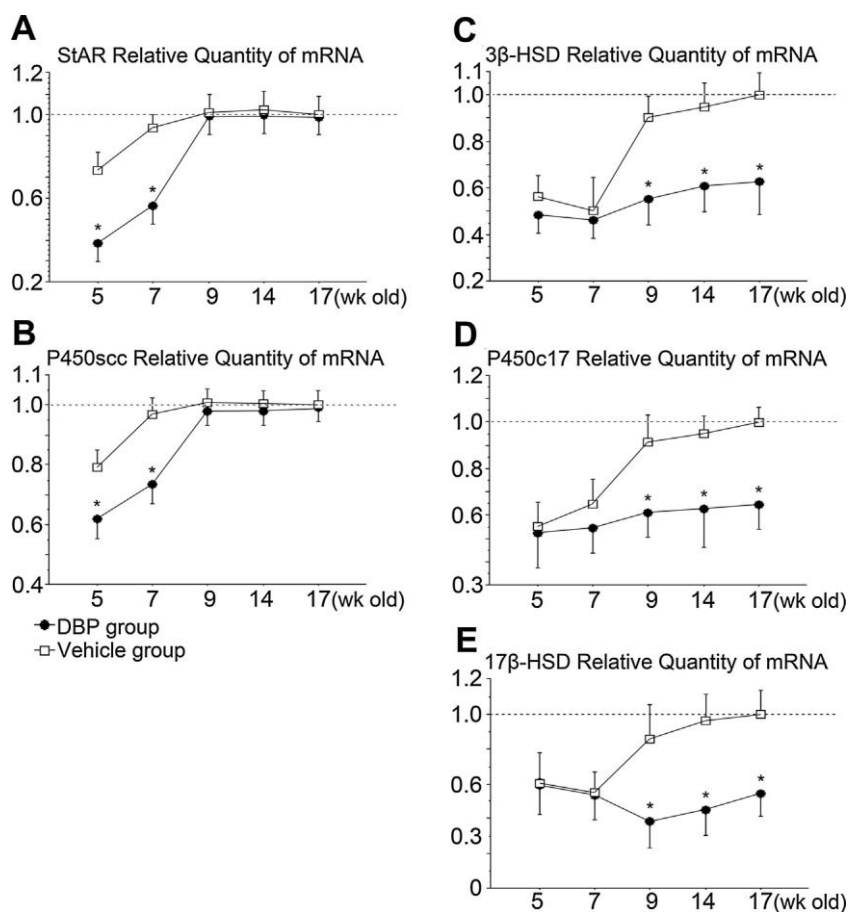


図 7. (A) : StAR mRNA (StAR)、(B) : P450scc mRNA (Cyp11a1)、(C) : 3β -HSDmRNA (Hsd3b)、(D) : P450c17 mRNA (CYP17a1)、(E) : 17β -HSDmRNA (Hsd7b) それぞれの、対照群と胎生期 100 mg DBP / kg DBP 曝露群ラットにおける発現レベル。mRNA レベルは、RT-PCR によって定量され、キャリブレーターから標準曲線法を使用して分析された。各組織の各 mRNA 値は、内因性ハウスキーピング遺伝子 GAPDH に対して正規化された。年齢相関的な変化を調べるために、対照群の 19 週齢の精巣組織の各値の相対量の 1 倍に設定したキャリブレーター値を適用した。DBP グループの StAR mRNA (StAR) および P450scc mRNA (Cyp11a1) のレベルは、5、7 週齢の対照群のレベルよりも有意に低い。DBP および対照群は有意に大きい値を示し、2 つの群の発現レベルは 9、14 および 17 週齢で同等の値に至った。胎生期 DBP 曝露ラット群の 3β -HSDmRNA (Hsd3b)、P450c17 mRNA (CYP17a1)、および 17β -HSDmRNA (Hsd7b) のレベルは、5 週齢と 7 週齢の対照群のレベルと同様である。9、14、および 17 週齢の対照群は胎生期 DBP 曝露ラット群よりも有意に高かった。胎生期 DBP 曝露ラット群は、5、7、9、14、および 17 週齢で有意差はなかった。各群ごとに n=5。(* $p < 0.5$ Scheffé's F test)。

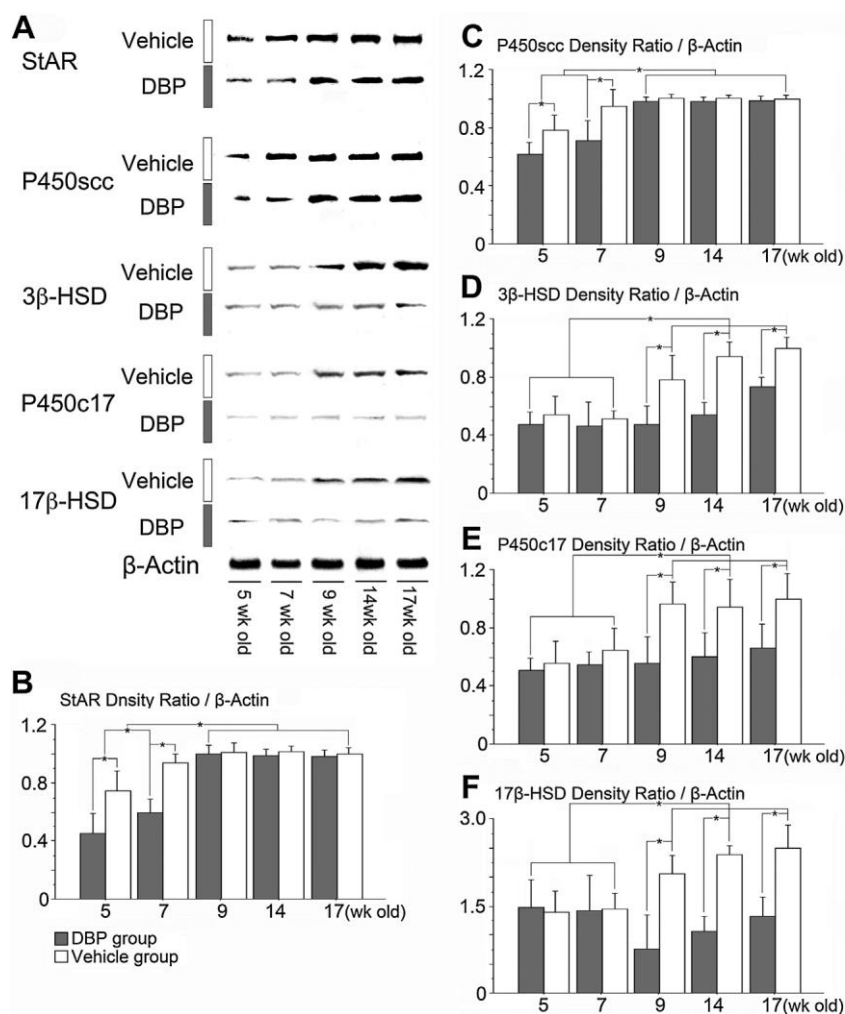


図 8. (A) 対照群および胎生期 100mg/kgDBP 曝露ラットの 5~17 週齢ラットの精巣における StAR、P450scc、3s-HSD、P450c17、17β-HSD のウエスタンブロット結果。タンパク質濃度は、標準としてウシ血清アルブミンを含むビシンコン酸タンパク質アッセイ試薬キット (Pierce) を使用。ミクロソームサンプル (10 μg) をウエスタンブロット分析に適用し、化学発光を使用して免疫反応性タンパク質を検出した。(B)-(F) StAR、P450scc、3β-HSD、P450c17、および 17β-HSD 密度比/β-アクチン表す。結果は、各グループの 5 匹のラットのサンプルをスクリーニングすることで得た。各群ごとに n=5。(* p < 0.5 Scheffé's F test))

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」

概要

100mgDBP/kg 曝露群の精巣 Leydig 細胞では成獣期、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。そこで DBP 胎生期曝露次世代 St の形態学的変化を検討した。また、正常 St は細胞分裂能が顕著に低いことから、胎生期 DBP 曝露次世代に認められる退行変性を示す精細管における St の細胞分裂能について BrdU 反応で検討した。精細管の最大横形は7週齢9週齢時点では、曝露群と対照群の間で有意な差は認められなかったが、14週齢と17週齢では有意な差を示した。DBP 曝露群で有意に高い BrdU 陽性 Sertoli 細胞/Sertoli 細胞比を示した。DBP 曝露群では、血清 FSH レベルが有意に高く、精巣 T が低かった。胎生期 DBP 曝露が Sertoli 細胞数を思春期後期から成人期までに有意に増加させ、精巣テストステロンの有意な減少と FSH の有意な増加を引き起こした。

緒言

哺乳類では、Sertoli 細胞は胚形成期および周産期発生期にのみ増殖活性を示す(Kluin, Kramer, and de Rooij 1984)。一方ラットでは、胎児期から生後約2週齢までの期間が Sertoli 細胞は有糸分裂期を示す。ラットは15から18日齢で血液精巣関門が形成されるが、Sertoli 細胞は精子形成を維持するために分化を続ける。ラットは思春期の時期に、Sertoli 細胞数は明らかに減少を示していた(Steinberger and Steinberger 1971; Orth 1982; Orth, Gunsalus, and Lamperti 1988; Vergouwn, Jacobs, and Huiskamp 1991; Riera et al. 2012; Hu et al. 2014)。成獣期に至ると、季節問わず、Sertoli 細胞の数は安定する(Richburg and Boekelheide 1996)。Sertoli 細胞の分化は、精子形成細胞が付着する部位が形成するために、精子形成に必要不可欠である。Sertoli 細胞と精子形成細胞の間の相互作用は、精子形成のために重要である(Hess, Cooke, and Bunick 1993; Alam et al. 2010)。したがって、Sertoli 細胞の数は、人間を含む動物の精子産生能力を決定づけるといえる(Hess, Cooke, and Bunick 1993)。胎生期 DBP 曝露が周産期に Sertoli 細胞に有害作用を引き起こすことが報告されていた。胎生期 DBP 曝露が Sertoli 細胞の総数を大幅に減らす、その総数は思春期までに回復を示した(Kleymenova et al. 2005; Hutchison et al. 2008; Auharek et al. 2010; Rodriguez-Sosa et al. 2014; van den Driesche et al. 2015)。ただし、思春期後から成人期までの胎生期 DBP 曝露ラットの Sertoli 細胞の変化に関するデータは、不十分であると考えられる。そのため胎生期12日齢から21日齢まで DPB100mg/kg を曝露したラットの7、9、14、17週齢時点における Sertoli 細胞の形態学的変化を調査した。

手段と方法

DBP (99.8% pure)はAldrich Chemical Co. (Milwaukee, WI)から購入した。生後8週齢の雌 Sprague-Dawley ラット(n=20)をSRL Co(静岡、日本)から妊娠0日目に調達した。妊娠

0 日目は、交尾が確認された日とした。到着後、無作為化を活用して分配した。飼育は、約 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ かつ 12 時間の明暗サイクルの環境下で実施した。高効率微粒子空気 (HEPA) でろ過した大気置換室で、木材チップを敷いたポリカーボネートケージに個別に収容した。動物には食餌 (MF, OrientalYeast, Osaka, Japan) と水を自由摂取させた。DBP (0 (対照群)、10、50、100mg/kg/day) を混合した 0.5ml のコーンオイル (Nacalai Tesque INC., Osaka, Japan) を 4 つの群の妊娠ラット (1 群あたり 5 頭) に妊娠 12 日齢から 21 日齢の間に経口投与 (i. g.) した。新鮮な溶液を毎朝に調製し、午前 9 時に投与した。レジメンは、100mg/kg/day DBP 胎生期曝露群が有害な影響を与えると報告した研究に基づいて作成した (Mylchreest et al. 1999; Barlow and Foster, 2003; Wakui et al, 2013, 2014)。生まれた仔は出生時に体重を測定し、性別判断を行った。DBP、コーンオイルを投与されていない母ラット 1 匹につき、4 匹の雄と 4 匹の雌で計 8 匹の子供を割り当てた。リッター調節で数を調節した。生後 21 日目に離乳を行った。仔ラットは、ポリカーボネートケージにて飼育を行い、床に敷いた木材チップは 5 日ごとに交換した (1 ケージあたりに単一性別の 4 頭を飼育)。5、7、9、14、17 週齢時点で、DBP 処理および対照群の雄のラットを麻酔し、 CO_2 の過剰摂取により安楽死させた。精巣を採取し、その重量を計った。光学顕微鏡観察のために、精巣を 24 時間にわたりブイヨン溶液にて固定し、4mm パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色をした (H&E)。

ビメンチン標識は、アビジン-ビオチン複合体 (ABC) 法を使用して分析した。脱パラフィンおよび水和後、厚さ $4 \mu\text{m}$ の切片を作成し、4 切片 \times 20 ラット \times 2 精巣 = 160 の顕微鏡スライドを 0.3% H_2O_2 で処理 (10 分) し、リン酸緩衝生理食塩水中の 10% ヤギまたは馬血清でブロックした (PBS、10 mM KPO_4 、150 mM NaCl 、pH 7.4; 20 分)。に、切片を PBS で洗浄し、ビメンチン抗体 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO; 20 倍に希釈) で 12 時間処理した。ビメンチン抗体は、ビオチン化 IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA、100 倍、3.0 時間) で検出され、ABC-ペルオキシダーゼ染色 (Vector Laboratories) およびジアミノベンジジン (DAB; Sigma-Aldrich) で 1.0 時間検出されました。次に、切片を、0.1 M アジ化ナトリウムと 0.005% 水素ペルオキシダーゼを含有する、Tris-HCl 緩衝 0.02% 3, 3'-DAB 四塩酸塩 (DAB) に 6.0 分間浸漬した。また切片をマイヤーのヘマトキシリンで対比染色した (1 分)。陰性対照として、一次抗体を非免疫血清としたものを用意した。長さ と 幅 の比が 2 未満の精細管 (ST) の断面直径を調べ、全てのビメンチン抗体染色切片の Sertoli 細胞の数を、画像分析 (Nikon Coolscope, Tokyo, Japan) を用いて数えた。各精巣切片の精巣横断面における ST およびビメンチン陽性 Sertoli 細胞の総数を定量化した。

7、9、14、17 日目の増殖 Sertoli 細胞の免疫組織化学的検出のために、5 匹の対照ラットと 5 匹の DBP 投与群ラットを無作為に選択し、5-BrdU (Zymed Laboratories, San Francisco, CA) の腹腔内注射を投与した。BrdU 注射後 3.0 時間時点で、ラットをペントバルビタールの過剰投与を行い安楽死させた。ラットから精巣をすぐに取り出し、4 つの連続切片に切断し、MDF で 2.0 日間固定し、パラフィンに包埋して厚さ $4.0 \mu\text{m}$ で切片を作成した。スライ

ド切片を脱パラフィンし、900 W でマイクロ波照射した (15 分; 100 nM クエン酸緩衝液)。内因性ペルオキシダーゼ活性は、0.3% H₂O₂ を含むメタノールをインキュベートすることで急冷、停止させた (30 分)。スライドをブロッキング血清 (10% 正常ウサギ血清、室温で 20 分) でインキュベートし、BrdU 細胞増殖キット (Abcam) を使用してラット抗 BrdU モノクローナル抗体 (ab623; Abcam, Cambridge, United Kingdom) とインキュベートした。過ヨウ素酸シッフ染色を使用して、対比染色を実施した。

次に、各精巣において、Coolscope (Tokyo, Japan) を用いて ST ごとに BrdU 陽性 Sertoli 細胞の数をカウントし、BrdU 陽性 Sertoli 細胞 / (BrdU 陽性 Sertoli 細胞 + BrdU 陰性 Sertoli 細胞) の割合を計算した。BrdU 染色は核に局在し、Sertoli 細胞数の検証は専門的な診断方法を用いて検証を行った。BrdU 陽性細胞は、細胞周期のうち S 期 (DNA 複製期) の Sertoli 細胞を指し示す。核に局在する BrdU 陽性 Sertoli 細胞の形態は、成熟 Sertoli 細胞とは異なっていた。BrdU 陽性細胞の核は比較的大きく、他の精子形成細胞と比較してかなり異なっていた。4 人の病理学者 (S. W.、E. K.、H. T.、H. I.) が、BrdU 陽性細胞と BrdU 陰性 Sertoli 細胞をカウントした。T および FSH レベルは、各週齢の群ごとに、5 匹の雄ラットの個々の精巣を採取し、放射免疫測定法を使用して測定された (Mylchreest et al. 1999; Fisher 2004; Wakui, Muto, et al. 2012; Wakui, Shirai, et al. 2013)。解剖後、精巣を組織に細断し、液体窒素で凍結し、分析まで -80 ± 10°C で保存した。ラット T ELISA キット (ab108666) およびラット FSH ELISA キット (kt-15332) を使用した。精巣を解凍し、個別にホモジナイズした (500 µl PBS、pH 7.4)。この溶液をジエチルエーテル (2.0 ml) で抽出し、振盪 (5.0 分) し、ドライアイスにて冷却したメタノールに入れた。抽出物の水でない部分を除去し、ドラフト内で一晚乾燥させ、アッセイバッファーで再構成した。検出は 1 精巣あたり 40 pg であった。統計コンピューター分析システム StatView-J version 5.0 (Abacus Concepts Co. Ltd.) を使用して、Scheffé の F 検定 (p < .05) を実施した。

結論

胎生期 DBP 曝露ラットは、その DBP 投与量に関わらず、胎児の体重量自体に変化は認められなかった。生まれてくる仔ラットの頭数と性別の偏りにも、影響は認められなかった。対照群と比較して特徴的な構造学的変化は胎生期 100mg/kg DBP 曝露群でのみ認められた。9 週齢時までの仔ラットの精巣重量は、胎生期 100mg/kg DBP 曝露群と対照群の間で有意差は認められなかった。しかし 14 週齢 17 週齢時点で、胎生期 100mg/kg DBP 曝露群ラット精巣の大きさ、体重あたりの精巣重量は、対照群と比較して、有意に低下することが明らかになった (1 章図 1)。通常の LCs は辺縁部にヘテロクロマチンを含有し、丸く、卵形の核小体を中央にもつ。さらに豊富な sER が細胞質微細構造として嚢状に拡張し、幅広く分布している (3 章図 1)。一方で、9 週齢以降の胎生期 100mg/kg DBP 曝露群 LCs では、異常所見が観察された。内部に多量の sER を有するが、sER の形態は、たんぱく質を含有する小胞を持たない異形成を呈している。胎生期 DBP 100mg/kg 曝露群の 9 週齢以降の精

巢について超微形態学的検討を実施した結果、9週齢以降の個体において、精細管の退縮、卵形のかつ異染色の核小体、たんぱく質を含有する小嚢を持たないsER、いびつな細胞接合、微小管束、細胞突起、絨毛が認められた。また9週齢以降で、胎生期100mg/kgDBP曝露群精巣では異形成LCsの過剰増殖が認められた。加齢に伴い、sERの消失を伴う精巣の萎縮が観察され、LC中の細胞の数の増加が観察された。LCs中のsERの密度は9週齢から減少を示し、14週齢時点ではsERがほとんど観察されなかった。17週齢時点では、LCs中にsERは観察されなかった。9週齢から14週齢のsERの相対量は、5,7週齢時点の観測と比較して、有意に低い値を示した。胎生期100mg/kgDBP曝露群の精巣では、精細管退縮が認められた。退縮した精細管のうち、精子形成が認められない精細管の数は少なかった。重度に変性したLCsは精細管に囲まれ、凝集していた。LCs中には核小体および豊富な好酸球性細胞質を伴う大きな卵形核が認められた。

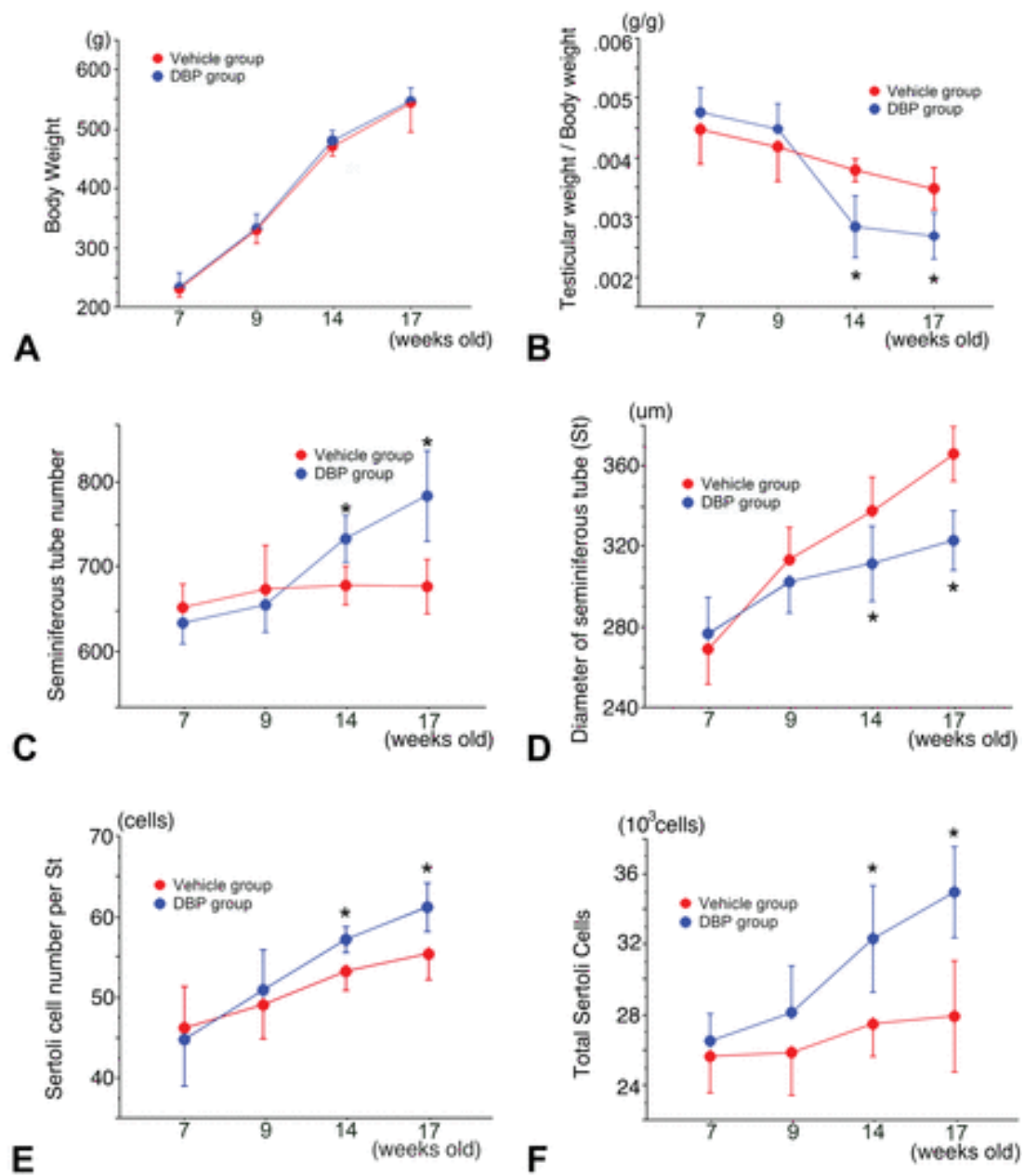
精巣あたりのSTの直径と数を評価した。ST数は、7週齢と9週齢で統計的に類似していたが、14週齢と17週齢時点で対照群より有意に多くなった。対照的に、14週齢17週齢では、平均ST直径が対照群よりも有意に短かった ($p < .05$)。ビメンチン染色より、1STあたりのビメンチン陽性Sertoli細胞の数は7週齢と9週齢時点で類似していたが、14、17週齢時点でDBP曝露群は有意に高い値を示した。Sertoli細胞の総数は14週齢、17週齢で有意に高い総数を示した。BrdU免疫組織化学染色により、1STあたりのSertoli細胞数、すなわちBrdU陽性細胞は、7週齢と9週齢の間で有意差は認められなかったが、14、17週齢では胎生期DBP曝露群が統計的に有意に高い値を示した ($p < .05$) ことが明らかになった。BrdU陽性Sertoli細胞/Sertoli細胞の比率を確認すると、7、9週齢時点で差は認められなかったが、14、17週齢時点で統計学的に有意に高い値を示した ($p < .05$)。胎生期DBP曝露群は7,9,14,17週齢において、対照群よりも有意に低いTレベルを呈したが、血清FSHレベルは有意に高い値を示した。

考察

フタル酸エステル類は環境中に広く分布し、内分泌活性物質としてもまた指定されている(Fisher 2004; Wakui, Muto, et al. 2012; Wakui, Shirai, et al. 2013; Motohashi, Wempe, Mutou, Okayama, et al. 2016; Motohashi, Wempe, Mutou, Takahashi, et al. 2016)。3週齢のラットをDBP (500 mg / kg) に曝露すると、精巣萎縮を伴う精子形成の失活が報告されている(Alam et al. 2010)。この研究では(1) 精巣重量/体重比の変化を伴う有意な精巣萎縮および(2) 加齢とともにST数および直径の有意な減少(14、17週齢時点で観察)が明らかになった。しかし、胎生期DBP曝露により誘発される精子形成への影響メカニズムは完全には解明されていない(Alam et al. 2010)。フタル酸エステル曝露による特定の生化学的形態学的変化の様相から基づいて、多くの研究者はフタル酸エステルがSertoli細胞を標的にする可能性を推測した(Richburg and Boekelheide 1996; Boekelheide et al. 2009)。胎生期DBP(500mg/kg/day、妊娠12から21日もしくは13.5から21.5日)曝露雄ラットが

Sertoli 細胞の数を有意に減少させることが報告されていた。周産期に精原細胞は 50%ほど減少したが、3、4 週間で正常レベルまで回復した(Kleymenova et al. 2005; Hutchison et al. 2008; Scott et al. 2008; Auharek et al. 2010; Rodriguez-Sosa et al. 2014; van den Driesche et al. 2015)。

今回の実験は2つの処置群からなりたつ。一つの群は対照群(コーン油のみ投与した対照群。F0 20 匹から F1100 匹を得た)。もう一群は胎生期 100mg/kg/dayDBP 曝露群(妊娠 12 日齢から 21 日齢まで経口投与。F0 20 匹から F1100 匹を得た)である。仔ラットの体重、生存率、性比、および生まれてきた個体数は、2 群間で有意な差は認められなかった。しかし 14、17 週齢時点で、DBP 曝露群の大きさは対照群よりも有意に小さく、精巣萎縮を示していた。DBP 投与群の ST 数は、14 週齢と 17 週齢のより有意に大きかった。対照的に、14 週齢と 17 週齢では、平均 ST 直径が対照群よりも有意低かった。最大の精巣横断面を観察すると、ST の量の増加は、ST の直径の縮小と関連があることが確認され、また精巣萎縮が確認された。さらに、14 週齢と 17 週齢では、DBP 曝露群における Sertoli 細胞の総数が有意に高かった。BrdU 免疫組織化学染色により、1ST あたりの Sertoli 細胞数 (BrdU 陽性細胞) は、14 週齢と 17 週齢の DBP 投与群で有意に高いことが明らかになった。1ST あたりの Sertoli 細胞数の増加は、精巣萎縮の結果であると推測される。さらに、細胞あたりの細胞増殖の程度を調査するために、BrdU 陽性 Sertoli 細胞/合計 (BrdU 陽性+ BrdU 陰性) Sertoli 細胞比をプロットした。比率は、14 週齢と 17 週齢の胎生期 DBP 曝露群で有意に高かった。胎生期 DBP 曝露群ラット T レベルは 7,9,14,17 週齢時点全ての時点において有意に高い値を示した。胎生期 DBP 曝露は Leydig 細胞機能障害を引き起こし、T レベルを低下させることが報告されていた(Wakui, Muto, et al. 2012; Wakui, Shirai, et al. 2013; Shirai et al. 2013; Motohashi, Wempe, Mutou, Okayama, et al. 2016; Motohashi, Wempe, Mutou, Takahashi, et al. 2016)。精巣 T は精子形成の決定因子であり、Sertoli 細胞のアンドロゲン結合たんぱく質と結合して糖たんぱく質(β グロブリン)を生成する。T および FSH レベルの値が有意に低いと、精子形成能が低下することが報告されている(Orth 1982; Sharpe et al. 2003; Chaudhary et al. 2005)。一方で、Sertoli 細胞は 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126)の胎生期曝露により成獣ラットの体内で増加することが報告されているが、T および FSH 濃度は対照群と変わらなかった(Wakui, Takahashi, et al. 2012)。今回、血清 FSH レベルは、7、9、14、および 17 週齢時点で胎生期 DBP 曝露群は有意に高い値を示した。本検討により、胎生期 DBP 曝露が、ラットの思春期から成獣期にわたり Sertoli 細胞を有意に増加させ、精巣 T の有意な減少と血清 FSH の有意な増加を示すことが明らかとなった。成獣期以降、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。



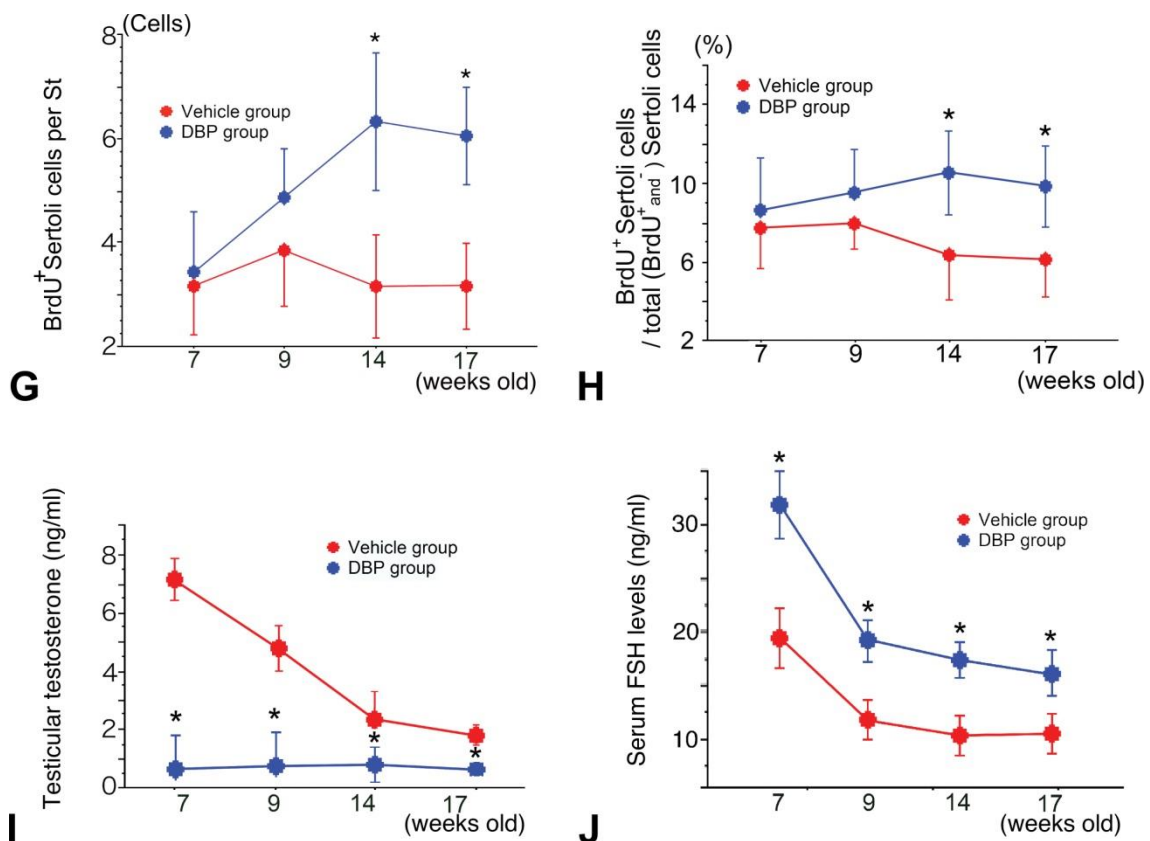


図 1.

胎生期 DBP 曝露群と対照群(コーン油経口投与群)比較。各週齢ごとに 20 匹のラットを適用した。データは平均値±標準誤差で示し、n=4、* : P<0.05 とし、対照群と比較した。n=20 (A)体重(B)相対的精巣重量(精巣重量/体重)(C)最大精巣横断面中の精細管の数(D)最大精巣横断面における精細管の直径(E)精細管あたりの Sertoli 細胞の数(F)Sertoli 細胞の総数(G)精細管あたりの BrdU 陽性 Sertoli 細胞の数(H)BrdU 陽性 Sertoli 細胞数/(BrdU 陽性 Sertoli 細胞数+ BrdU 陰性 Sertoli 細胞数)(I)精巣テストステロンレベル(J)血清 FSH レベル

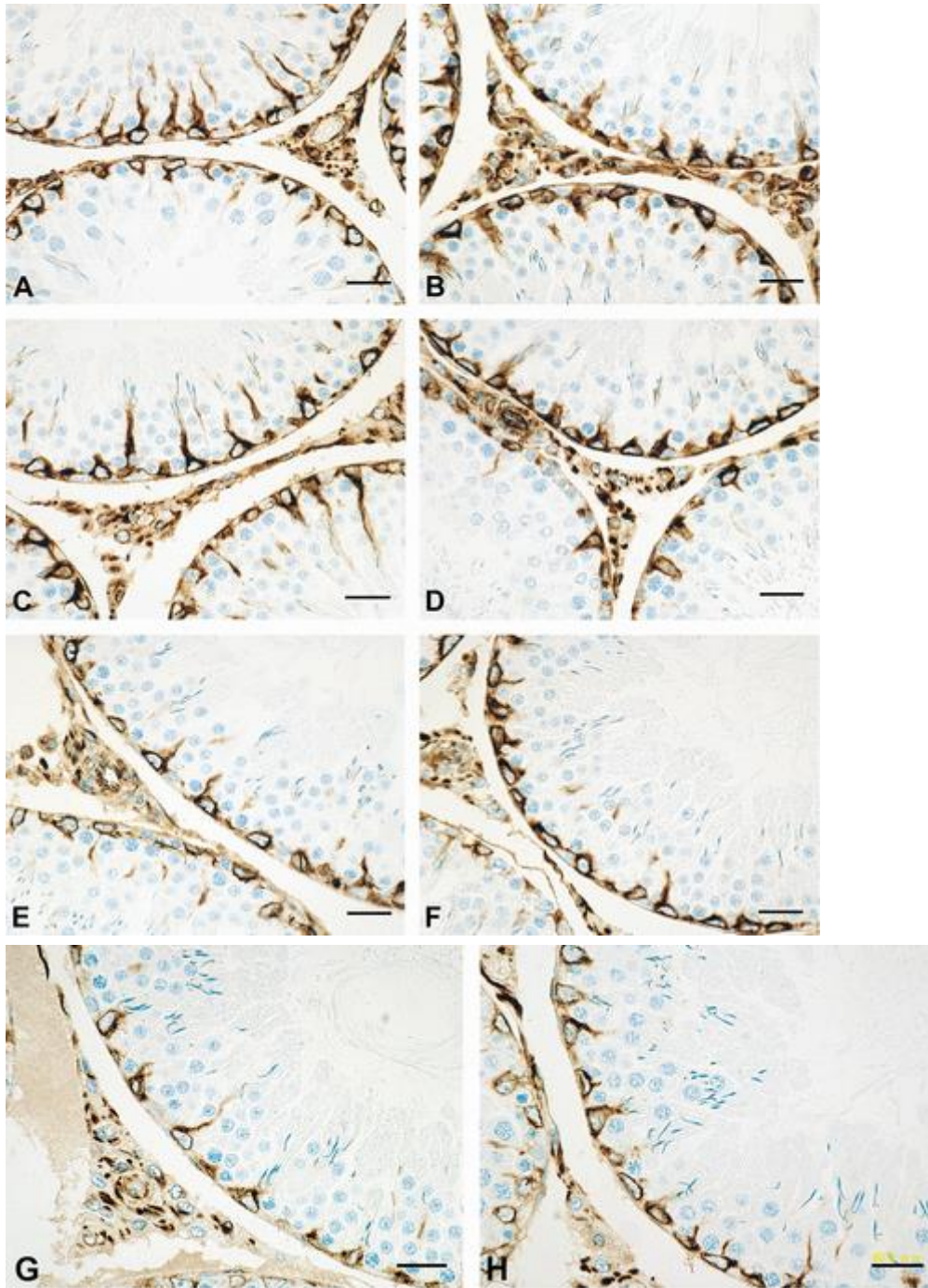


図 2.

(A)7 週齢時点での対照群ラット精巣ビメンチン染色。ビメンチン陽性 Sertoli 細胞が認められる(bar=50 μ m)(B)7 週齢時点での胎生期 DBP 曝露群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m) (C)9 週齢時点での対照群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m) (D)9 週齢時点での対照群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m) (E)14 週齢時点での対照群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m) (F)14 週齢時点での胎生期 DBP 曝露群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m) (G)17 週齢時点での胎生期 DBP 曝露群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m)

m) (H)17 週齢時点での対照群ラット精巣ビメンチン染色(bar=50 μ m)

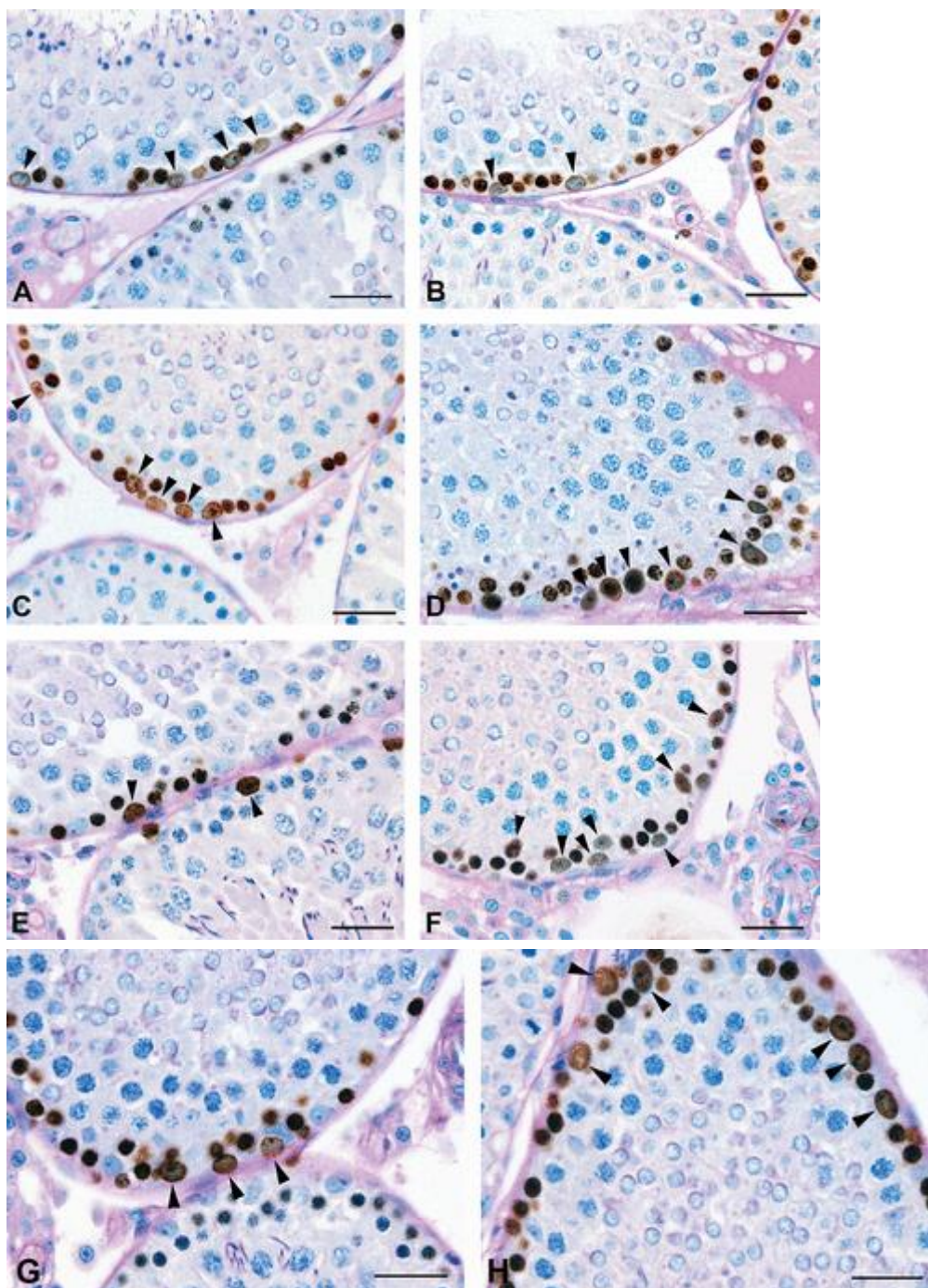


図 3.(A)対照群ラットの 7 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m) (B)胎生期 DBP 曝露群ラットの 7 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(C)対照群ラットの 9 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(D)胎生期 DBP 曝露群ラットの 9 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(E)対照群ラットの 14 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(F)胎生期 DBP 曝露群ラットの 14 週齢時点の BrdU 染色。BrdU

陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(G)胎生期 DBP 曝露群ラットの 17 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)(H)胎生期 DBP 曝露群ラットの 17 週齢時点の BrdU 染色。BrdU 陽性 Sertoli 細胞(黒矢印)(bar=2 μ m)

総合考察

以上の検討から、(1)胎生期の DBP 曝露の次世代の精巣 Leydig 細胞, Sertoli 細胞への最小毒性量は、100mgDBP/kg 胎生期曝露、妊娠 12 日齢から 21 日齢まで強制経口投与投薬(i. g)、であることが明らかになった。さらに、次世代の思春期から成獣期で、有意に低いテストステロン値および有意に高い LH 値を示すことが明らかとなった。さらに、精巣障害として異形 Leydig 細胞過形成と精細管の退行変性が認められた。また(2)過形成 Leydig 細胞は ER α の増加と ER β と AR の減少を示す異形 Leydig 細胞であった。さらに(3)ステロイドホルモンの産生に関与する sER は成獣期に顕著に減少した。テストステロン合成関連酵素の発現への障害は、思春期には sER に分布する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ることが明らかになった。また(4)成獣期に認められる退行変性を示す精細管は、Sertoli 細胞の細胞分裂増殖を伴うことが明らかとなった。

胎生期 DBP 曝露の標的細胞は、Leydig 細胞と Sertoli 細胞であり、その最小毒性量は、100mg/kg/day であった。異形 Leydig 細胞が増殖したが、テストステロンの値が低下し、さらに Leydig 細胞に超微形態学的に異形が観察されたことから、Leydig 細胞の機能不全が考えられた。また、ER α の増加と AR の減少から、Leydig 細胞におけるホルモン感受性の変化が考えられた。酵素の発現の結果から、テストステロンの合成の抑制の機序は、成長に伴い変化していることが考えられた。成獣期以降、FSH が有意な増加を示すことから、Sertoli 細胞の増殖が認められた。

Some parts written in this thesis have been published in Toxicol Pathology.

著者:Okayama Y, Wakui S, Wempe MF, Sugiyama M, Motohashi M, Mutou T, Takahashi H, Kume E, Ikegami H.

論文タイトル: In Utero Exposure to Di(n-butyl)phthalate Induces Morphological and Biochemical Changes in Rats Postpuberty

雑誌名:Toxicol Pathology(2017) Copyright © [year] (Copyright Holder).

巻号: Vol.45(4)

発行年:2017

頁: 526-535

ISSN: 0192-6233

PMID: 28641505

DOI: 10.1177/0192623317709091

本論文の 1 章は以下に掲載した

Okayama Y, Wakui S, Wempe MF, Sugiyama M, Motohashi M, Mutou T, Takahashi H, Kume E, Ikegami H. In Utero Exposure to Di(n-butyl)phthalate Induces Morphological and Biochemical Changes in Rats Postpuberty. *Toxicol Pathol* 45(4), 526–535

参考文献

Akingbemi, B. T., Youker, R. T., Sottas, C. M., Ge, R., Katz, E., Klinefelter, G. R., Zirkin, B. R., and Hardy, P. (2001). Modulation of rat Leydig cell steroidogenesis function by Di(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 65, 1252–59.

Ahmad, R., Gautam, A. K., Verma, Y., Sedha, S., Kumar, S., Effect of in utero di-butyl phthalate and butyl benzyl phthalate exposure on offspring development and male reproduction of rat, *Environ. Sci. Poll. Res.* 21 (2014) 3156–3165.

Auharek, S. A., Franca, L. R., McKinnell, C., Jpbeing, M. S., Scott, H. M., Sharpe, R. M. (2010). Prenatal plus postnatal exposure to di(n-butyl) phthalate and/or flutamide markedly reduced final Sertoli cell number in the rat. *Reprod Develop* 151, 2868-75.

Barlow, N. J., Foster, P. M. D. (2003). Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol* 32, 319-410.

Barlow, N. J., Phillips, S. L., and Foster, P. M. D. (2004). Male reproductive tract lesions at 6, 12, and 18 months of age following in utero exposure to Di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Pathol* 34, 79–90.

Boekelheide, K., Kleymenova, E., Liu, K., Swanson, C., Gaido, K. W. (2009). Dose-dependent effects on cell proliferation, seminiferous tubules, and male germ cells in the feral rat testis following exposure to di(n-butyl)phthalate. *Microsc Res Tech* 72, 629-38.

Chaudhary, J., Sadler-Riggieman, I., Ague, J. M., Skinner, M. K. (2005). The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce postmitotic terminally differentiated Sertoli cells to reenter the cell cycle and proliferate. *Biol Reprod* 72, 1205–17.

Christen, V., Crettaz, P., Oberli-Schrammli A., Fent K., Some flame retardants and the antimicrobials triclosan and triclocarban enhance the androgenic in vitro, *Chemosphere* 81 (2010) 1245–1252.

Fisher, J. S. (2004). Environmental anti-androgens and male reproductive health:

Focus on phthalates and testicular dysgenesis syndrome. *Reprod* 127, 305–15.

Ghadially, F. N. (1975). Microbodies (peroxisomes, miroperoxisomes and catalosomes). In *Ultrastructural Pathology of the Cell and Matrix*, Vol. II., pp.767–826, Butterworths, London, UK.

Giribabu.N, Sainath. SB, Reddy.P., Prenatal di-n-butyl phthalate exposure alters reproductive functions at adulthood in male rats, *Environ. Toxicol.* 29 (2012) 534–544.

Gray, L. E., Jr., and Furr, J. (2006). Differential expression of the phthalate syndrome of reproductive tract malformations in male Sprague-Dawley and Wistar rat strains. In *Program and Abstracts of U.S. Society for Study of Reproduction*, July 29 and August 1, Omaha, NE. Abstract 2006-A41.

Holm, M., Meyts, E. R. D., Adersson, A. M., and Skakkebaek, N. E. (2003).Leydig cell micronodules are a common finding in testicular biopsies from men with impaired spermatogenesis and are associated with decreased testosterone/LH ratio. *J Pathol* 199, 278–386.

Harris,C.A.,Henttu,P.,Parker,M.G.,andSumpter,J.P.(1997).The estrogenicactivity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 105, 802–11.

Hess, R. A., Cooke, P. S., Bunick, D. (1993). Adult testicular enlargement induced by neonatal hypothyroidism is accompanied by increased Sertoli and germ cell numbers. *Endocrinol* 132, 2607–13.

Hoppin, J.A., Brock, B.T., Davis, B.T., and Baierd, D.D. (2002). Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environ Health Perspect* 110, 515–518.

Hu, G. X., Lian, Q. Q., Ge, R. S., Hardy, D. O., and Li, X. K. (2009). Phthalate-induced testicular dysgenesis syndrome: Leydig cell influence. *Trends Endocrinol Metab* 20, 139–45

Hu, Y., Wand, R., Xiang, Z., Qian, W., Han, X., Li, D. (2014). Antagonistic effects of a mixture of low-dose nonylphenol and di-n-butyl phthalate (monobutyl phthalate) on the Sertoli cells and serum reproductive hormones in prepubertal male rats in vitro and in vivo. *PLoS* 9, e93425.

Hutchison, G. R., Scott, H. M., Walker, M., McKinnell, C., Ferrara, D., Madood, I. K., Sharpe, R. M. (2008). Sertoli cell development and function in a seminal model of testicular dysgenesis syndrome. *Biol Reprod* 78, 352–60.

Ivell. R., Heng. K., Nicholson. H., Anand-Ivell. R., Brief maternal exposure of rats to the xenobiotics dibutyl phthalate or diethylstilbestrol alters adult-type Leydig cell development in male offspring, *Asian J. Androl.* 15 (2013) 261–268.

Jegou, B., and Sharpe, R. M. (1993). Paracrine mechanisms in testicular control. In

Molecular Biology of the Male Reproductive System, pp. 271–301, Academic Press, San Diego, CA.

Jones, M. S., Ohsako, S., Matsuwaki, T., Zhu, X. B., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Sone, H. (2010). Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. *Reprod* 139, 427–37.

Kavlock, R., Boekelheide, K., Chapin, R., Cunningham, M., Faustman, E., Foster, P., Golub, M.. (2002). NTP Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction: Phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-n-butyl phthalate. *Reprod Toxicol* 16, 489–527.

Kim, H. S., Kim, T. S., Shin, J. H., Moon, H. J., Kang, I. H., Kim, I. Y., Oh, J. Y., and Han, S. Y. (2004). Neonatal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductivetract development. *J Toxicol Environ Health* 67, 2045–60.

Kleymenova, E., Swanson, C., Boekelheide, K., Gaido, K. W. (2005). Exposure in utero to di(n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biology Reproduct* 73, 482–490.

Kluin, P. M., Kramer, M. F., de Rooij, D. G. (1984). Proliferation of spermatogonia and Sertoli cells in maturing mice. *Anat Embryol (Berl)* 169, 73–78.

Lee. K.Y., Shibutani. M., Takagi. H., KatoN., TakigamiS., UneyamaC., HiroseM., Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation, *Toxicology* 203 (2004) 221–238.

Motohashi, M., Wempe, M. F., Mutou, T., Okayama, Y., Kansaku, N., Takahashi, H., Ikegami, M.. (2016). In utero-exposed di(n-butyl) phthalate induce dose dependent, age-related changes of morphology and testosterone-biosynthesis enzymes/associated proteins of Leydig cell mitochondria in rat. *J Toxicol Sci* 41, 195–206.

Motohashi, M., Wempe, M. F., Mutou, T., Takahashi, H., Kansaku, N., Ikegami, M., Inomata, T.. (2016). Male rats exposed in utero to di(n-butyl) phthalate: Age-related changes in Leydig cell smooth endoplasmic reticulum and testicular testosterone-biosynthesis enzymes/proteins. *Reprod Toxicol* 59, 139–46.

Mylchreest, E., Sar, M., Cattley, R. C., Foster, P. M. (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di(n-butyl) phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 156, 81–95.

Mylchreest, E., Sar, M., Wallace, D. G., and Foster, P. M. D. (2002). Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di(n-butyl) phthalate. *Reprod Toxicol* 16, 19–28.

Okayama Y, Wakui S, Wempe MF, Sugiyama M, Motohashi M, Mutou T, Takahashi H, Kume E, Ikegami H. In Utero Exposure to Di(n-butyl)phthalate Induces Morphological and Biochemical Changes in Rats Postpuberty. *Toxicol Pathol* 45(4), 526–535

Orth, J. M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat Rec* 203, 485–92.

Orth, J. M., Gunsalus, G. L., Lamperti, A. A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinol* 122, 787–94.

Parks, L. G., Ostby, L. S., Lambright, C. R., Abbott, B. D., Klinefelter, G. R., Barlow, N. J., and Gray, L. E. (2000). The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 58, 339–49.

Paech, K., Webb, P., Keiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., and Scanlan, T. S. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 277, 1508–10.

Richburg, J. H., Boekelheide, K. (1996). Mono-(3-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicology App Pharmacol* 137, 42–50.

Riera, M. F., Regueira, M., Galardo, M. N., Pellizzari, E. H., Meroni, S. B., Cigorraga, S. B. (2012). Signal transduction pathways in FSH regulation of rat Sertoli cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302, E914–23.

Rodriguez-Sosa, J. R., Bondareva, A., Tang, L., Avelar, G. F., Coyle, K. M., Modelski, M., Alpaugh, W. (2014). Phthalate esters affect maturation and function of primate tissue ectopically grafted in mice. *Mol Cell Endocrinol* 398, 89–100.

Scarano, W.R., Toledo, F.C., Guerra, M.T., Pinheiro, P.F.F., Domeniconi, R.F., Felisbino S.L., Campos, S.G.P., Taboga, S.R., Kempinas, W.G., Functional and morphological reproductive aspects in male rats exposed to di-n-butyl phthalate (DBP) in utero and during lactation, *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 73 (2010) 972–984.

Scott, H. M., Hutchison, G. R., Jobling, M. S., McKinnell, C., Drake, A. J., Sharpe, R. M. (2008). Relationship between androgen action in the “male programming window,” fetal Sertoli cell number, and adult testis size in the rat. *Endocrinol* 149, 5280–87.

Sharpe, R. M., McKinnell, C., Kivlin, C., Fisher, J. S. (2003). Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reprod* 125, 769–84.

Shirai, M., Wakui, S., Wempe, M. F., Muto, T., Oyama, N., Motohashi, M., Takahashi,

H. (2013). Male Sprague-Dawley rats exposure to in utero di(n-butyl) phthalate: Dose dependent and age-related morphological change in Leydig cells smooth endoplasmic reticulum. *Toxicol Pathol* 41, 984–81.

Shultz, V. D., Phillips, S., Sar, M., Foster, P. M. D., and Galdo, K. W. (2001). Altered gene profiles in fetal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate. *Toxicol Sci* 64, 233–42.

Soderstrom, K. O. (1987). Leydig cell hyperplasia. *Arch Androl* 17, 57–65. Takayama, H. (1981). Single cilia formation in cells of the testicular interstitium in fertile men. *Int J Andol* 4, 246–56.

Steinberger, A., Steinberger, E. (1971). Replication pattern of Sertoli cells in maturing rat testis in vivo and in organ culture. *Biol Reprod* 4, 84–87.

van den Driesche, S., McKinnell, C., Calarrao, A., Kennedy, L., Hutchison, G. R., Hrabalkiva, L., Jobling, M. S.. (2015). Comparative effects of di(n-butyl) phthalate exposure on fetal germ cell development on the rat and on human fetal testis xenografts. *Environ Health Perspect* 123, 223–30.

Vergouwn, R. P. F. A., Jacobs, S. G. P. M., Huiskamp, R. (1991). Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice. *J Reprod Fertil* 93, 233–43.

Wakui, S., Muto, T., Suzuki, Y., Takahashi, H., Hano, H. (2012). Sertoli cell roliferation in adult rats with prenatal exposure to 3,3' ,4,4' ,5-pentachlorobiphenyl. *Arch Toxicol* 86, 159-62.

Wakui, S., Shirai, M., Motohashi, M., Mutou, T., Oyama, N., Wempe, M. F., Takahashi, H. (2013). Effect of in utero exposure to di(n-butyl) phthalate for estrogen receptor alpha, beta, and androgen receptor of Leydig cell on rats. *Toxicol Pathol* 42, 877–87.

Wakui, S., Takahashi, H., Muto, T., Shirai, M., Promsuk, J., Anzai, N., Wempe, M. F.. (2012). Atypical Leydig cell hyperplasia in adult rats with low T and high LH induced by prenatal di(n-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Pathol* 40, 1–7.

謝辞

稿を終えるにのぞみ、本研究の実施に際して、その研究の機会を与えていただき、修士懇切なるご指導とご校閲を賜りました麻布大学比較毒性学研究室、和久井信准教授に深甚なる感謝の意を表します。それと共に、多大なるご協力を頂きました比較毒性学研究室生書士に感謝いたします。また、本研究に多くの譲歩を提供してくれた動物たちに感謝の意を表します。