

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18791137
 研究課題名（和文） フタル酸による精子形成障害へのテトラヒドロピオプテリンによる予防と治療の試み
 研究課題名（英文） Prevention and treatment of aspermatogenesis during bis(2-ethylhexyl)phthalate) by tetrahydrobiopterin
 研究代表者
 寺山 隼人（TERAYAMA HAYATO）
 東京医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00384983

研究成果の概要：

2006、2007 年度に、内分泌かく乱物質であるフタル酸エステル（DEHP：オリエンタル社）の投与濃度による精子形成への影響を観察した。また、精子形成障害に対するテトラヒドロピオプテリン（BH4：第一アスピオファーマ社）の治療効果を検討するために、BH4 の投与時期や投与方法、使用マウス種の条件検討をした。その結果、高 DEHP 濃度（1.5%、1.0% DEHP）の長期間投与すると精巣にリンパ球浸潤が認められる事がわかった。また、低 DEHP 濃度において A/J マウスは感受性に個体差が少なかった。以上の結果から 2008 年度は A/J マウスに低濃度である 0.5% DEHP 食餌と BH4 水（20mg/kg・BH4 を給水に混ぜ自由摂取）を同時投与し、投与後の BH4 の予防効果を組織学的に検討した。A/J マウスに 0.5% DEHP 暴露による精子形成障害後に BH4 水を 1 週間与え、BH4 による障害に対する治療効果を組織学的に検討した。およびの結果として、DEHP + BH4 水投与群および DEHP のみ投与群を比較し、両群ともに肉眼的に変化はなかったが、光学顕微鏡下では DEHP 群に比べ DEHP + BH4 投与群は精細管内の細胞脱落および多少の精子形成障害の改善傾向を認めたが、有意差は得られなかった。光学顕微鏡下では DEHP 群に比べ DEHP + BH4 投与群は精細管内の細胞脱落の改善傾向を認めたが、有意差は得られなかった。今後、実験条件を改善する事で、DEHP 暴露による精子形成障害について BH4 が予防や治療効果を示す可能性があると思われる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,100,000	0	1,100,000
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	360,000	3,660,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：アンドロロジー

1. 研究開始当初の背景

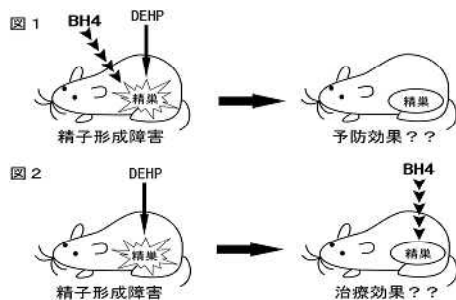
現在、内分泌かく乱物質として 70 種類に及ぶ物質が疑われているが、これらの中には、ポリ塩化ビフェニール（PBC）、ダイオキシン類、ポリカーボネート樹脂、ビスフ

エノール A、フタル酸エステル（DEHP）といった現在も広く使われているものも含まれている。DEHP は、玩具や手袋などポリ塩化ビニル（塩化ビニル）の軟化剤としてもっともよく使用されている。軟質塩化ビニルの

玩具などは小児が噛んだりし、口に入れる可能性があり、塩化ビニル手袋はコンビニエンスストアなどの弁当に食品をつめる際に使用したりし、我々の身近に存在している。実験的に DEHP をマウスやラットに投与すると、精子形成障害が起こるが、その疾患モデルにおいて、テストステロン、ゴナドトロピンあるいは亜鉛を投与した報告では、精子形成障害に対する予防・治療効果はなかった。しかし、ビタミン B12 投与により、予防効果があるという報告がされた。さらに最近我々は抗酸化ビタミン C・E 合剤には精子形成障害の予防のみならず治療効果がある事を見出した。そこで、申請者らは内因性抗酸化物質であるテトラヒドロプテリン (BH4) に注目した。

2. 研究の目的

上記背景より、DEHP による酸化ストレスが精子形成障害を引き起こし、抗酸化物質によりそれを抑制できるという仮説を立てた。そこで、内因性抗酸化物質である BH4 を用いて DEHP 単独投与群と DEHP と BH4 同時投与群の精子形成像を比較する。(図 1・予防実験)。さらに、DEHP 投与により精子形成障害を惹起させた後に BH4 を投与し、精子形成障害の回復に BH4 が影響をおよぼすかどうかを検討する(図 2・治療実験)。



3. 研究の方法

<材料>

- ・0.1、0.5、1.0、1.5%DEHP (Di-(2-ethylhexyl) phthalate) 含有食餌 (オリエンタル社)
- ・テトラヒドロピオプテリン (BH4: 第一アスピオファーマ社)
- ・ICR、A/J マウス
- ・ブアン固定液
- ・テクノビット包埋 (Heraeus Kulzer 社) 関連試薬
- ・ヘマトキシリンエオジン (HE) 染色試薬

<方法>

2006 年 DEHP 投与濃度の検討

0.1、0.5、1.0、1.5%DEHP を ICR マウスおよび A/J マウスに投与し、投与開始から 2 週、4 週、6 週、8 週、10 週後における経時的精子形成障害変化を HE 染色で観察した。

2007 年 BH4 投与条件の検討

BH4 の投与方法の検討の為、A/J マウスに BH4 を腹腔内、経口、筋肉注射し、体重の変化を観察した。

BH4 の抗酸化作用におけるリンパ球浸潤に対する影響を検討するため、リンパ球浸潤と精細管の委縮を主とする実験的自己免疫性精巣炎 (Experimental Autoimmune Orchitis: EAO) において BH4 を投与し、HE 染色で精子形成障害変化を観察した。

・2008 年 BH4 投与実験

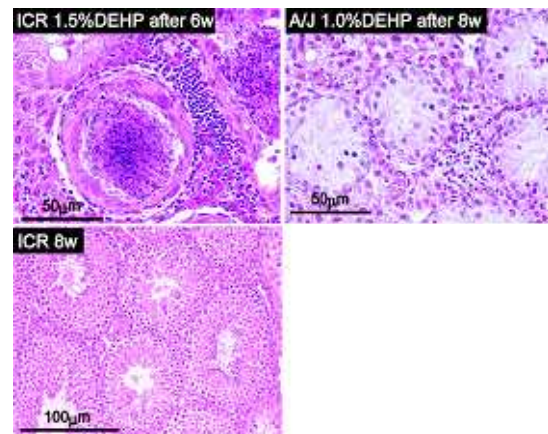
A/J マウスに 0.5%DEHP 食餌投与と同時に BH4 を 2 週間与え、BH4 を与えない DEHP 食餌のみのコントロールと比較し、計 2 週間の BH4 投与による精子形成障害に対する予防効果を組織学的に検討した。

A/J マウスに 0.5%DEHP 暴露による精子形成障害後に BH4 を 1 週間与え、精子形成像を観察・評価し、BH4 による障害に対する治療効果を組織学的に検討した。

4. 研究成果

・2006 年

ICR マウスは 0.1%DEHP 投与後 2 週目は軽度精子形成障害を発症したが、4 週目は精子形成障害がみられなかった。また、投与期間においても精子形成障害程度に多少のパラッキが見られた。ICR および A/J マウスともに全体的には DEHP 投与量・期間に対して濃度依存的に障害が増悪する傾向にあるものの、A/J マウスより ICR マウスほうが低濃度ほどマウスによって毒性感受性に違いがあり、個体差が影響している事が明らかになった。また、DEHP の長期投与では精子形成障害における精細管の破壊に伴うリンパ球浸潤が見られた。



・2007 年

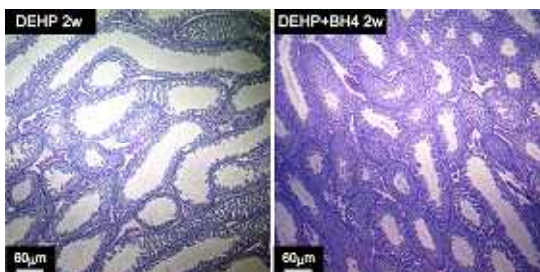
BH4 の連日筋肉注射、腹腔内および経口投与では身体的ストレスがかかり体重の減

少が見られ、DEHP 投与マウスも暴露期間において著明な体重減少が見られる事がわかっており、体重減少の要因が複数存在してしまう為、BH4 を給水ビン中の水に混ぜ、BH4 含有水とし自由摂取させた事で体重減少が解消した。

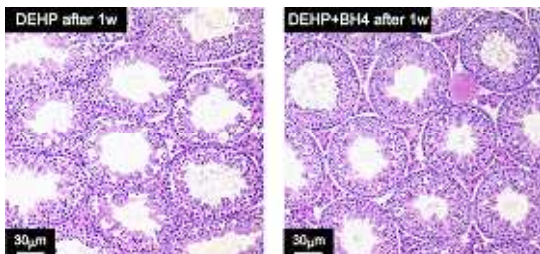
BH4 水投与しない群に比べ BH4 水投与群では EAO の病態が若干軽減したが、有意な差はなかった。

・ 2008 年

DEHP + BH4 水投与群および DEHP のみ投与群を比較し、両群ともに肉眼的に変化はなかったが、光学顕微鏡下では DEHP 群に比べ DEHP + BH4 投与群は精細管内の細胞脱落および多少の精子形成障害の改善傾向を認めたと、有意差は得られなかった。



DEHP + BH4 水投与群および DEHP のみ投与群を比較し、両群ともに肉眼的に変化はなかったが、光学顕微鏡下では DEHP 群に比べ DEHP + BH4 投与群は精細管内の細胞脱落の改善傾向を認めたと、有意差は得られなかった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

1. Takahashi K, Naito M, Terayama H, Qu N, Cheng L, Tainosho S, Itoh M. Immunomorphological aspects of the tubuli recti and the surrounding interstitium in normal mice. International Journal of Andrology, 2007, 30(1):21-27 査読有.

2. Miura Y, Naito M, Ablake M, Terayama H, Shuang-Qin Yi, Qu N, Cheng L, Suna S, Jitsunari F, Itoh M. Short term effects of

di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on testes, liver, kidneys and pancreas in mice. Asian Journal of Andrology, 2007, 9(2):199-255 査読有.

3. Nakamura Y, Yi SQ, Terayama H, Naito M, Li J, Moriyama H, Tsuchida A, Itoh M: Sequential histopathology of pancreatic tissues in aly/aly mice. Cells Tissues Organs. 2007 186(3):204-209 査読有.

4. Nakamura Y, Qu N, Terayama H, Naito M, Shuang-Qin Yi, Moriyama H, Itoh M: Structure of thymic cysts in congenital lymph nodes lacked mice. Anatomia Histologia Embryologia, 2008 37:126-130 査読有.

5. Terayama H, Yi SQ, Naito M, Qu N, Hirai S, Kitaoka M, Iimura A, Moriyama H, Steinke H and Itoh M: Right gonadal arteries passing dorsally to the inferior vena cava: embryological hypotheses. Surgical and Radiologic Anatomy, 2008 30(8): 657-661 査読有.

6. Qu N, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Hirai S, Kitaoka M, Yi SQ, Itoh M: Caput epididymitis but not orchitis was induced by vasectomy in a murine model of experimental autoimmune orchitis. Reproduction, 2008 135(6):859-866 査読有.

7. Tokunaga Y, Terayama H, Naito M, Qu N, Hirai S, Ogawa Y, Yi SQ, Itoh M: Splenic cytokines in mice immunized with testicular germ cells. International Journal of Andrology, 2008 31(5):471-476 査読有.

8. Naito M, Terayama H, Hirai S, Qu S, Moriyama H, Itoh M: The presence of intra-tubular lymphocytes in normal testis of the mouse. Okajimas Folia Anatomica Japonica 2008 85(3):91-96 査読有.

[学会発表](計 9 件)

1. 寺山隼人、内藤宗和、徳永葉、北岡三幸、曲寧、小茂田文子、程林仙、小川夕輝、伊藤正裕：特発性男性不妊モデルにおけるサイトカイン分泌動態。第 135 回日本生殖医学会関東地方部会，2007/2/10，世田谷。

2. Terayama H, Naito M, Tokunaga Y, Qu N, Itoh M: Changes of cytokines production

during murine experimental autoimmune orchitis. 27th Annual Meeting American Society for Reproductive Immunology, 2007/5/14-16, Tronto.

3. **寺山隼人**、内藤宗和、曲寧、平井宗一、北岡三幸、小茂田文子、小川夕輝、徳永葉、伊藤正裕: Changes of cytokines production during testicular autoimmunity in mice. 第 72 回日本泌尿器科学会東部総会, 2007/8/29-31, 札幌.

4. **寺山隼人**、内藤宗和、平井宗一、曲寧、北岡三幸、小川夕輝、徳永葉、伊藤正裕: 環境毒性物質投与によるマウス精巣障害におけるサイトカイン変化. 第 22 回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2007/11/30-12/1, 新宿.

5. **寺山隼人**、内藤宗和、平井宗一: 免疫学的、化学的、物理的精巣障害とサイトカイン. 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会, シンポジウム(精子形成過程に於ける細胞動態制御の分子解剖学), 2008/3/27-29, 大分.

6. **寺山隼人**、内藤宗和、平井宗一、曲寧、北岡三幸、小川夕輝、伊藤正裕: A new murine model of autoimmune orchitis induced by intraperitoneal fixation of donor's testis, epididymis and vas deference. 第 161 回東京医科大学医学会総会, 2008/6/7, 新宿.

7. **寺山隼人**、内藤宗和、平井宗一、曲寧、北岡三幸、小川夕輝、河田晋一、伊藤正裕: 環境毒性物質による精巣障害と IL-6 の関連性. 第 28 回麻布環境科学研究会, 2008/9/6, 相模原.

8. **寺山隼人**、内藤宗和、伊藤正裕: Analysis of target antigens for testicular autoimmunity in mice. 第 53 回日本生殖医学会総会・学術講演会, 2008/10/23-24, 神戸

9. **寺山隼人**、内藤宗和、平井宗一、曲寧、片桐千秋、松下正之、伊藤正裕: マウス自己免疫精巣炎を引き起こす自己抗原のプロテオーム解析. 第 23 回日本生殖免疫学会総会・学術集会, 2008/12/6-7, 富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺山 隼人 (TERAYAMA HAYATO)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00384983

