

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20380153

研究課題名(和文) 投与法、培養法及び移植法によるフタル酸エステルの
精巣毒性作用機序解明研究課題名(英文) Analysis of the toxicological effects of phthalate esters on testes
by administration, culture and transplantation methods

研究代表者

九郎丸 正道 (KUROHMARU MASAMICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号：00148636

研究成果の概要(和文)：

プラスチック製品の可塑剤として広く使用され、精巣毒性が知られているフタル酸エステル類に属する Di(n-butyl) phthalate (DBP) 及び Di-iso-butyl phthalate (DiBP) について、その作用機序を種々の実験系を用いて検討した。その結果、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。一方、DiBP によるアポトーシスはエストロゲンのそれと異なる作用経路によることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Phthalate esters, widely used as a plasticizer in the manufacturing process of consumer products, are known to affect testes toxicologically. In the present study, di(n-butyl) phthalate (DBP) and di-iso-butyl phthalate (DiBP) which belong to phthalate esters, are used as materials, and the mechanism of their toxicological effects on testes are investigated by some different methods. As a result, DBP acts like an estrogen, and induces spermatogenic cell apoptosis, probably by activating estrogen receptors. On the other hand, DiBP induces spermatogenic cell apoptosis, probably independent of estrogen-mediated activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：Di(n-butyl)phthalate、Di-iso-butyl phthalate、精細胞、アポトーシス、
テストステロン濃度、ステロイドホルモン合成酵素、エストロゲン、
エストロゲンレセプター

1. 研究開始当初の背景

Di(n-butyl)phthalate (DBP) 及び Di-iso-butyl phthalate (DiBP) はフタル酸エステル類に属し、現在、可塑剤として多種の日常製品の製造に使用されている。そのフタ

ル酸エステルの代謝物が環境中に排出されることによる、ヒト、家畜、および野生動物への健康被害が懸念されている。しかしながら、DBP 及び DiBP 曝露による精巣への影響のメカニズムはそれまで解明され

ていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、まず DBP, DiBP の経口投与による精巣への影響（精細胞アポトーシス、セルトリ細胞細胞骨格系の変化等）を形態学的観点から解析し、形態変化と精巣内テストステロン濃度、ステロイド合成酵素との関連性を明らかにし、その影響がエストロゲン様作用によるものか否かを検討した。

3. 研究の方法

Di(n-butyl)phthalate (DBP)

(1) 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 2 4 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。

(2) 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。

(3) 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* 実験を行った。DBP を濃度勾配 (0.1, 1, 100 nmol/ml) をかけて投与後、6 および 24 時間に培養セルトリ細胞を観察した。

(4) 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。

(5) 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 DBP ないし EB の投与を行った。

Di-iso-butyl phthalate (DiBP)

(6) DiBP の単回曝露 (24 時間) および連続曝露 (7 日間) を 3 週齢のマウスまたはラットに施した。

(7) DiBP および estradiol-3-benzoate (EB) 曝露による精巣内テストステロン濃度 (ITT) およびステロイドホルモン合成酵素の mRNA 発現量の変化を検討した。まず DiBP がエストロゲン様作用を示すか否かを検討するため、3 週齢ラットに DiBP ないし EB の

経口曝露前に、エストロゲンレセプター (ER) インヒビターである ICI を皮下投与し、その後精巣の組織学的検討を行った。

(8) DiBP または EB 曝露によって ITT 濃度変化を起こす主なステロイドホルモン合成酵素 (*P450sc*, *P450c17*, *3 β -HSD*, および *17 β -HSD*) の mRNA 発現変化を測定した。

(9) 3 週齢ラットの精巣組織および単離培養したセルトリ細胞を用いて、*in vitro* 条件下での DiBP の直接的な精巣への影響について検討した。組織培養試験においては、DiBP および 17β -estradiol (E_2) を 3 ないし 12 時間曝露した後、精細胞アポトーシス率の算出およびステロイドホルモン合成酵素 mRNA 発現の変化を測定した。

4. 研究成果

Di(n-butyl)phthalate (DBP)

(1) 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。

(2) 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) 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。

(4) 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。

(5) 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。

Di-iso-butyl phthalate (DiBP)

(6) 単回および連続曝露した精巣組織切片で TUNEL アッセイを行ったところ、ラットでは、両方の DiBP 曝露群でアポトーシス細胞数の増加が見られた。このことから、DiBP は他のフタル酸エステルと同様、精巣毒性を有することが明らかとなった。しかしながら、B6 マウスでは有意な精細胞アポトーシスの増加は認められず、DiBP による精巣への影響には種差が存在すると考えられた。

(7) 精細胞のアポトーシスの減少が EB 群で見られたものの、DiBP 群では認められなかった。このことから、DiBP によるアポトーシスはエストロゲンとは異なる作用経路によることが示唆された。加えて、ITT 濃度の有意な減少は EB 曝露した 6 および 24 時間後にも見られたのに対し、DiBP 曝露群では 24 時間での回復が確認された。以上の結果から、1) 精細胞アポトーシスの増加は ITT 濃度変化と直接の関連がない、2) EB と異なり、DiBP はホルモン循環系全体に影響を与えるものではないと結論付けた。

(8) *P450sc*, *P450c17*, および *17β-HSD* の遺伝子発現は DiBP ないし EB の単回曝露群において有意に低下した。しかし、*3β-HSD* の発現が減少したのは DiBP 群のみであった。この結果も、DiBP と EB 曝露は精巣内ステロイド合成に異なる影響を与えることを示唆している。

(9) アポトーシスは曝露 12 時間後に最も増加したものの、ステロイドホルモン合成酵素 mRNA の変化は全ての曝露群において認められなかった。同じ手法で単離したセルトリ細胞を曝露した結果では、高濃度の DiBP および E₂ 処理群においてビメンチンフィラメントの減少が顕著に認められた。以上のように、*in vitro* 曝露において、DiBP は有意に精細胞のアポトーシスを引き起こしたことから、DiBP の精巣への直接的な影響が確認できた。

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 5 件)

- (1) Choi, E. K., Tsunekawa, N., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. A new preparation protocol for measurement of testicular sperm production. J. Reprod. Dev. 査読有 Vol. 54, No. 1, 2008, pp90-93.
- (2) Alam, M. S., Ohsako, S., Matsuwaki, T.,

Zhu, X. B., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Sone, H., Tohyama, C. and Kurohmaru, M.

Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis : A possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. Reproduction 査読有 Vol. 139, 2010, pp427-437.

- (3) Alam, M. S., Ohsako, S., Tay, T. W., Tsunekawa, N., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. Di(n-butyl) phthalate induce vimentin filaments disruption in rat Sertoli cells: A possible relation with spermatogenic cell apoptosis. Anat. Histol. Embryol. 査読有, Vol. 39, 2010, pp186-193.
- (4) Alam, M. S., Andriana, B. B., Tay, T. W., Tsunekawa, N., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. Single administration of di(n-butyl) phthalate delays spermatogenesis in prepubertal rats. Tissue & Cell, 査読有, Vol. 42, No. 2, pp129-135.
- (5) Zhu, X. B., Tay, T. W., Andriana, B. B., Alam, M. S., Choi, E. K., Tsunekawa, N., Kanai, Y. and Kurohmaru, M. Effects of di-iso-butyl phthalate on testes of prepubertal rats and mice. Okajimas Folia Anat. Jpn., 査読有, Vol. 86, No. 4, pp129-136.

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 祝 暁波, 大迫誠一郎, Mohammad Shah Alam, 恒川直樹, 金井克晃, 遠山千春, 九郎丸正道 (2008)
Di-iso-butyl phthalate (DIBP) の精巣毒性における特異性の検討
第 1 4 6 回日本獣医学会 (宮崎)
- (2) Mohammad Shah Alam, 大迫誠一郎, 祝 暁波, 恒川直樹, 金井克晃, 九郎丸正道 (2009)
Di(n-butyl) phthalate (DBP) induces spermatogenic cell apoptosis via estrogen receptor in prepubertal rat testes
第 1 4 7 回日本獣医学会 (宇都宮)
- (3) Alam, M. S., Ohsako, S., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Tohyama, C., Kurohmaru, M. (2009) Induction of spermatogenic c

ell apoptosis in prepubertal rat testes: an estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate and its relationship with testicular steroidogenesis The 3rd Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomists (Korea)

- (4) Alam, M. S., Ohsako, S., Matsuwaki, T., Tsunekawa, N., Kanai, Y., Kurohmaru, M. (2009) Induction of spermatogenic cell apoptosis in prepubertal rat testes irrespective of testicular steroidogenesis: a possible estrogenic effect of di(n-butyl) phthalate. 21st Century Advances in the Molecular Toxicology of Environmental Chemicals and Pathogenesis of Disease (Tokyo)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

九郎丸 正道 (KUROHMARU MASAMICHI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：00148636

(2) 研究分担者

金井 克晃 (KANAI YOSHIKIRA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授
研究者番号：30260326

(3) 研究分担者

大迫 誠一郎 (OHSAKO SEIICHIRO)

東京大学・大学院医学（系）研究科・准教授
研究者番号：00274837

(4) 研究分担者

前田 誠司 (MAEDA SEISHI)

兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10309445

(5) 研究分担者

恒川 直樹 (TSUNEKAWA NAOKI)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教
研究者番号：50431838