

学位論文題名

Effect of di-(2-ethylhexyl) Phthalate(DEHP) on testis and pituitary -A toxicological study-

(フタル酸エステル (DEHP) が精巣および下垂体に引き起こす影響の毒性学的研究)

学位論文内容の要旨

ジエチルヘキシルフタル酸(DEHP)は、プラスチック可塑剤フタル酸エステルの一つであり、精巣萎縮、精子低形成などを引き起こす発癌性内分泌攪乱化学物質として知られている。DEHP曝露で発生する活性酸素、germ細胞とSertoli細胞の分離、亜鉛濃度の低下、そしてステロイドホルモン産生の異常等が精巣毒性の原因と推測されている。しかし、DEHPが精巣のステロイドホルモン、特に testosterone 産生や代謝、分泌に対して実際にどのような影響を及ぼすのかは報告されていない。そこで、本研究では、DEHPが、1)精巣の testosterone 合成・代謝、2) testosterone 分泌に関与するアラキドン生合成カスケード、に与える影響について明らかにした。また、DEHPがステロイドホルモン調節の中樞である下垂体細胞に対する影響についても殆ど報告はない。そこで、3)ラット下垂体由来のGH3細胞を用いて、DEHPが細胞増殖やタモキシフェン誘導アポトーシスに及ぼす影響について検討した。

【第1章】

DEHP(100、1000mg/kg)を性成熟前の4週齢オスWistarラットに5日間経口投与し、投与終了2週間後に、血液、肝臓、精巣を採取して、testosteroneの生合成・代謝に関与する酵素cytochrome P450 (CYP) やhydroxysteroid dehydrogenaseの活性、タンパクやmRNA発現量の変動を調べた。1000mg/kg DEHP投与で、精巣重量は、これまでの報告通り著しく減少した。DEHP投与濃度に伴って血中のtestosteroneレベルが低下したが、精巣においてtestosteroneを合成する17 β -HSDの活性に有意な変化は認められなかった。一方、精巣におけるtestosterone水酸化に関わるCYP3A2、CYP2C11の酵素活性は有意に増加した。さらにtestosteroneをdihydrotestosterone (DHT)に変換する5 α -reductase活性は、DEHP投与で有意に上昇した。従って、精巣内のtestosteroneクリアランスがDEHP投与ラットでは増加している可能性が考えられた。さらに、testosteroneをestrogenに変換し、精子形成維持に関与するCYP19 (aromatase) mRNAの発現は減少した。以上の結果から、DEHPの精巣毒性を引き起こす機構のひとつとして、testosterone代謝酵素群の活性の変動が考えられた。

【第2章】

DEHPは精巣や肝臓などにおいてリン脂質レベルに影響を与えることが報告されている。細胞膜のリン脂質の代謝で産生されるアラキドン酸は、精巣においてtestosteroneの産生・分泌を調節することが報告されている。そこで、DEHPが、精巣機能のホメオスタシスに重要なアラキドン酸カスケードにどのような影響を及ぼすのか検討した。精巣cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)の活性はDEHP投与で有意に減少し、そのタンパク発現レベルも抑制されることがわかった。DEHP投与では、cyclooxygenase-2(COX-2)発現に変化はなかったが、12-lipoxygenase(12-LOX)の発現が有意に増加することが明らかになった。一方、peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α)はアラキドン酸カスケードで産生されるエイコサノイドや脂肪酸によって活性化され、CYP4Aを介して脂肪酸の酸化・代謝を促進することが明らかになっている。DEHP投与したラットの精巣ではCYP4A1の有意な発現増加が観察された。

従って、DEHPを投与したラットの精巣では、cPLA2の活性及び発現の低下、さらにアラキドン酸の異化に関わる12-LOXとCYP4A1の発現が増加し、その結果、アラキドン酸作用が低下することが予想された。cPLA2をはじめとするアラキドン酸産生酵素の阻害は、testosterone産生・分泌を抑制することから、DEHPによるcPLA2発現及び活性の抑制はtestosterone生合成や分泌を抑制することが考えられた。

【第3章】

雄性ホルモンtestosteroneレベルを低下させるDEHPが、雌性ホルモンestrogenのantagonistであるタモキシフェン(TAM)の作用にどのような影響を及ぼすかを検討した。ラット下垂体由来GH3細胞をTAMおよびDEHPに曝露した。TAMはGH3細胞にアポトーシスを引き起こしたが、TAMとDEHPの同時処置により、TAMの引き起こす細胞生存率減少が回復されることが分かった。同細胞を核染色したところ、TAM曝露によって起こるnuclear fragmentationがDEHPとの同時曝露で抑制されていた。フローサイトメトリーで分析した結果、TAMによって増加されたsubG1のpeakがDEHP曝露によって顕著に減少された。また、caspase-3の基質であるPARPに関して、TAM曝露では85kD付近のタンパクが増加するが、DEHPの同時曝露によってPARP活性化が抑制されることが明らかになった。以上の結果から、GH3細胞においてTAMによって引き起こされるアポトーシスがDEHPによって阻害されることが明らかとなった。

本研究から、DEHPの精巣毒性の原因として、ステロイド合成・代謝およびアラキドン酸カスケードに影響を与えることが考えられた。また、下垂体細胞に関しては、タモキシフェン誘導アポトーシスがDEHPによって抑制されることが明らかとなった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 藤 田 正 一
副 査 助 教 授 稲 波 修
副 査 助 教 授 片 桐 成 二
副 査 助 教 授 石 塚 真 由 美

学 位 論 文 題 名

Effect of di-(2-ethylhexyl) Phthalate(DEHP) on testis and pituitary -A toxicological study-

(フタル酸エステル (DEHP) が精巣および
下垂体に引き起こす影響の毒性学的研究)

ジエチルヘキシルフタル酸(DEHP)は、プラスチック可塑剤フタル酸エステルの一つであり、精巣萎縮、精子低形成などを引き起こす発癌性内分泌攪乱化学物質として知られている。しかし、DEHPが精巣のステロイドホルモン、特に testosterone 産生や代謝、分泌に対して実際にどのような影響を及ぼすのかは報告されていない。このことを明らかにするため、金亨燮氏は以下の研究を行った。

DEHPを性成熟前の4週齢オスラットに5日間経口投与したところ、精巣におけるtestosterone水酸化に関わる酵素活性は有意に増加した。さらにtestosteroneをdihydrotestosterone (DHT)に変換する5 α -reductase活性は、DEHP投与で有意に上昇した。従って、精巣内のtestosteroneクリアランスがDEHP投与ラットでは増加している可能性が考えられた。testosteroneをestrogenに変換し、精子形成維持に関与するCYP19 (aromatase) mRNAの発現は減少した。

細胞膜のリン脂質の代謝で産生されるアラキドン酸は、精巣においてtestosteroneの産生・分泌を調節することが報告されている。DEHPを投与したラットの精巣では、cytosolic phospholipase A2 (cPLA2)の活性及び発現の低下、さらにアラキドン酸の異化に関わる12-lipoxygenase (12-LOX)とCYP4A1の発現が増加し、その結果、アラキドン酸作用が低下することが予想された。

雄性ホルモンtestosteroneレベルを低下させるDEHPが、雌性ホルモンestrogenのantagonistであるタモキシフェン(TAM)の作用にどのような影響を及ぼすかを検討したところ、TAMによって引き起こされるアポトーシスがDEHPによって阻害されることが明らかとなった。

本研究で金亨燮氏は、未解明であったDEHPの精巣毒性の要因として、1) 精巣の testosterone

合成・代謝、2) testosterone 分泌に関与するアラキドン生合成カスケード、に与える影響を明らかにした。また、3)ラット下垂体由来のGH3細胞を用いて、DEHPが細胞増殖やTAM誘導アポトーシス阻害作用があることについても明らかにした。よって、審査員一同は、上記学位論文提出者金亨燮氏の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規程第6条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。