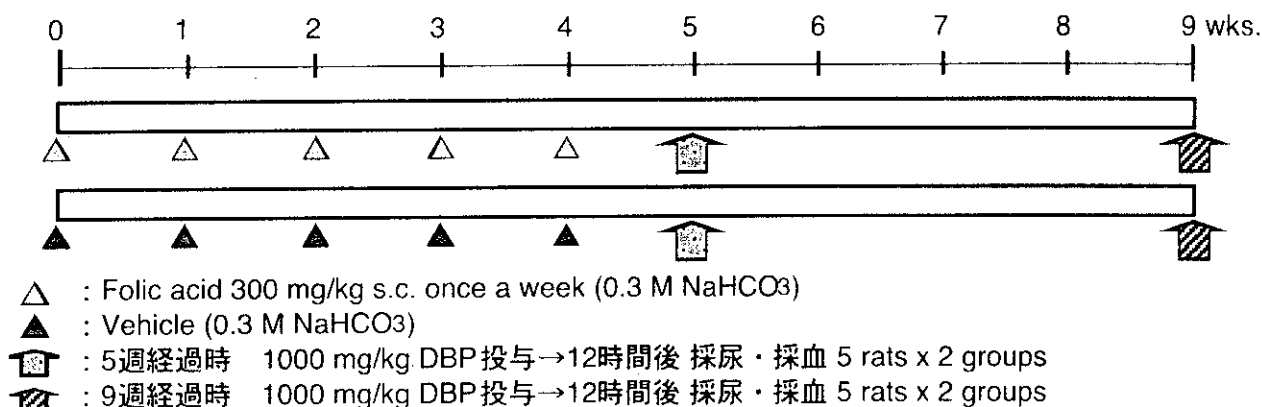


図 1

腎機能低下に伴うDBP精巣毒性増強作用の機構解明



〔血漿・尿・精巣中のDBP、MBPの濃度 [測定施設：名城大学 薬学部衛生化学（小嶋 仲夫教授）]
 〔肝・精巣のβ-glucuronidase活性（Western、mRNA）

表 1

Final Body and Kidney Weights, Urine Specific Gravity, and Serum BUN

Folic acid	DBP	Exper. week	No. of rats	Final B.W. (g)	Kidneys (%)	Urine specific gravity	Serum BUN (mg/dl)
—	+	5	3	248.0	0.69	1.0487	20.30
—(v)	+	5	6	246.2	0.72	1.0405	21.52
+	+	5	6	236.8	0.79	1.0358	25.80
—(v)	+	9	6	282.2	0.65	1.0487	20.58
+	+	9	6	279.0	0.71	1.0338 *	25.55 *

*: Significantly different from control group (group 4) at P<0.05

表 2

MBP Contents in the Urine of Rats Pretreated with Folic Acid

(Forced Urination 12 hrs After the Administration of DBP)

Group	Folic acid	Wks.	No. of rats	Urine volume (g)	DBP (μ g/ml)	MBP (mg/urine)			
						Untreatment with Enzyme	Treatment with Enzyme	Conjugate	Conjugation (%)
1	—	5	3	0.63 \pm 0.15	3.00 \pm 1.84 (2)a	9.59 \pm 4.73	12.74 \pm 1.20	3.16 \pm 1.20	26.2 \pm 6.85
2	—(v)	5	6	0.27 \pm 0.22	6.45 \pm 5.74 (4)a	4.99 \pm 3.84	9.05 \pm 1.78 (4)b	3.02 \pm 1.78 (4)b	32.7 \pm 6.00 (4)b
3	+	5	6	0.23 \pm 0.18	2.37 \pm 2.66	3.87 \pm 1.77 #	5.62 \pm 1.58 # (5)b	1.44 \pm 1.58 (5)b	19.9 \pm 15.2 (5)b
4	—(v)	9	6	0.10 \pm 0.06	4.64 \pm 5.54 (5)a	8.90 \pm 3.32	11.17 \pm 0.63 (4)b	2.64 \pm 0.63 (4)b	24.4 \pm 5.4 (4)b
5	+	9	6	0.15 \pm 0.15	2.86 \pm 3.05 (5)a	6.46 \pm 2.74	6.53 \pm 0.74 * (4)b	1.10 \pm 0.74 ** (4)b	16.4 \pm 11.1 (4)b

b : Not tested due to insufficient of sample

* , ** : Significantly different from control group (group 4) at P<0.05, respectively.

: Significantly different from control group (group 1) at P<0.05.

表 3

MBP Contents in the Urine of Rats Pretreated with Folic Acid (1)

(4-hours collection)

Group	Folic acid	Weeks	No. of rats	Urine Volume (g)	DBP (μ g/ml)	MBP (mg/urine)			
						Untreatment with Enzyme	Treatment with Enzyme	Conjugate	Conjugation (%)
1	—	5	3	1.28 \pm 0.68	— (0)a	1.96 \pm 2.20	2.80 \pm 0.40	0.84 \pm 0.27	29.7 \pm 5.5
2	—(V)	5	6	1.72 \pm 0.80	2.40(1)a	2.21 \pm 0.54	2.99 \pm 0.71	0.78 \pm 0.31	25.6 \pm 8.2
3	+	5	6	1.92 \pm 0.97	0.20(1)a	1.70 \pm 0.65	2.55 \pm 0.76	0.85 \pm 0.36	34.0 \pm 14.6
4	—(V)	9	6	1.00 \pm 0.43	— (0)a	3.39 \pm 0.91#	4.49 \pm 1.00 #	1.10 \pm 0.27	24.9 \pm 6.3
5	+	9	6	1.62 \pm 0.96	— (0)a	2.38 \pm 1.24	3.48 \pm 1.67	1.12 \pm 0.73	31.0 \pm 17.5

a : Other samples were ND (not detected).

: Significantly different from control group (group 1) at P<0.05.

表 4

The Amount of MBP in the Blood of Rats Pretreated with Folic Acid

Group	Folic acid	No. of Rats	DBP ($\mu\text{g/ml}$)		MBP ($\mu\text{g/ml}$)	Glucuronidated MBP ($\mu\text{g/ml}$)
1	—	3	—	(0)a	203 \pm 4.0	6.4 \pm 1.2 (2)
2	—(v)	6	0.10	— (0)a	241 \pm 39.1	5.9 \pm 4.3
3	+	6	0.10	— (2)a	282 \pm 70.3 #	18.6 \pm 11.6 *
4	—(v)	6	0.17 \pm 0.12	(1)a	226 \pm 43.5	14.8 \pm 6.5
5	+	6	0.10 \pm 0.00	(3)a	249 \pm 36.7	9.4 \pm 4.0 (5)

a : Other samples were ND (not detected).

: Significantly different from control group (group 1) at $P < 0.05$.

* : Significantly different from control group (group 2) at $P < 0.05$.

表 5

The Amount of MBP in the Testis of Rats Pretreated with Folic Acid

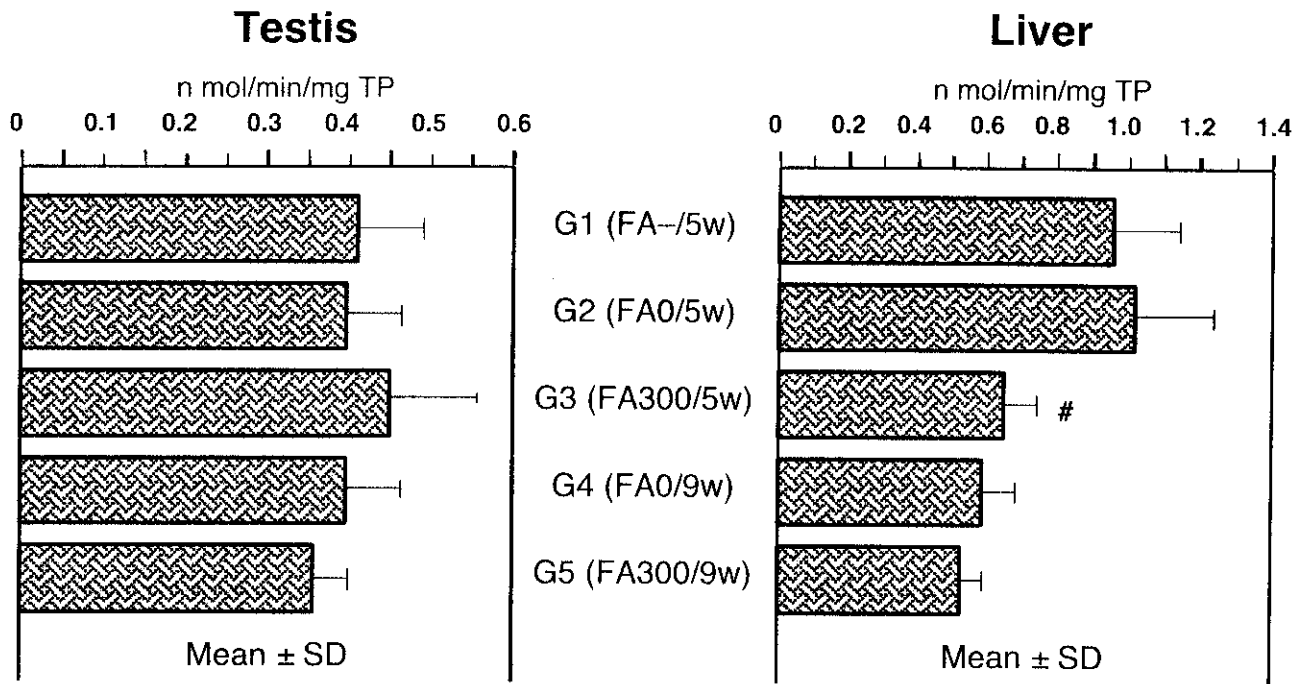
Group	Folic acid	Week	No. of rats	Testis Weight (g)	DBP ($\mu\text{g/g}$)		MBP ($\mu\text{g/g}$)	Content of MBP ($\mu\text{g/ testis}$)
1	—	5	3	0.77 \pm 0.02	—	(0)a	46.70 \pm 1.60	36.0 \pm 2.0
2	—(v)	5	6	0.70 \pm 0.11	—	(0)a	56.80 \pm 6.63 #	40.2 \pm 9.6
3	+	5	6	0.70 \pm 0.06	0.90 \pm 1.13	(2)a	69.72 \pm 25.34	49.3 \pm 19.8
4	—(v)	9	6	0.74 \pm 0.08 #, *	0.20	— (1)a	46.68 \pm 13.62	33.7 \pm 7.2
5	+	9	6	0.64 \pm 0.09	0.23 \pm 0.23	(3)a	56.68 \pm 15.46	35.5 \pm 8.8

a : Other samples were ND (not detected).

* : Significantly different from control group (group 4) at $P < 0.05$, respectively.

: Significantly different from control group (group 1) at $P < 0.05$.

図 2



: Significantly different from control group (group 2) at P<0.05.

SIGMA β -glucuronidase activity detection kit

β -Glucuronidase Activities

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
フタル酸／アジピン酸エステル類の生殖器障害に関する研究
－発達期ないし有病時暴露による影響評価－

分担研究報告書
種差による影響評価

分担研究者 九郎丸 正道（東京大学大学院農学生命科学研究科教授）

研究要旨：若齢ラットへの MEHP (600-1000mg/kg/day)連続経口投与試験(5日間)では 800mg/kg/day で、若齢マウスへの MEHP (500-900mg/kg/day)連続経口投与試験（3日間）では 700mg/kg/day で、精上皮におけるアポトーシス細胞数が最大となった。モルモットへの MEHP (2000mg/kg)急性経口投与試験（投与 3, 6, 9 時間後に採材）では、時間依存的にアポトーシス細胞の増大が認められた。若齢シバヤギ、ラット、およびモルモットの精巣器官培養系への MEHP (1×10^{-6} - 1×10^2 nmol/ml)添加試験（投与 1, 3, 6, 9 時間後に採材）では、濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞の増加が確認された。いずれの実験においても、セルトリ細胞の空胞化、精細胞の脱落が観察された。

A. 研究目的

プラスチック可塑剤として一般に広く利用されている DEHP [Di(2-ethylhexyl)phthalate] の加水分解代謝物であり、活性本体とされる MEHP [Mono(2-ethylhexyl)phthalate] の精巣に対する直接的な影響について種差という観点から検討するため、以下の経口投与試験ならびに精巣器官培養系への添加試験を試みた。

B. 研究方法

- 1) 若齢ラットへの MEHP 連続経口投与試験 (Fig. 1)
28日齢のSD雄ラットに600～1000mg/kg/dayを、5日間連続経口投与し、6日目に精巣を採材。4%パ

ラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の光顕観察およびTunel法によるアポトーシス細胞の観察に、5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

- 2) 若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験
28日齢のC57B雄マウスに500～900mg/kg/dayを、3日間連続経口投与し、4日目に精巣を採材。4%パラフォルムアルデヒド固定を施し、通常の光顕観察およびTunel法によるアポトーシス細胞の観察を行った。
- 3) 若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験
35日齢のモルモット (Hartley系)にMEHP2000mg/kgを経口投与し、投与

3, 6, 9 時間後に精巣を採材。4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の顕微鏡観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞数の観察に。5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

4) 若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験

2ヶ月齢のシバヤギ精巣器官培養系に MEHP (100, 1, 1×10^3 , 1×10^6 , 0 nmol/ml) を添加し、添加 1, 3, 6, 9 時間後に採材。5%グルタルアルデヒド固定後、電顕で観察した。

5) 若齢ラット精巣器官培養系への MEHP 添加試験

20日齢のSDラット精巣器官培養系に MEHP (100, 1, 1×10^3 , 1×10^6 , 0 nmol/ml) を添加し、添加 1, 3, 6, 9 時間後に採材。4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の顕微鏡観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に。5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

6) 若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験

35日齢のモルモット (Hartley 系) 精巣器官培養系に MEHP (100, 10, 1, 0 nmol/ml) を添加し、添加 3, 6, 9 時間後に採材。4%パラフォルムアルデヒド固定標本は、通常の顕微鏡観察および TUNEL 法によるアポトーシス細胞の観察に。5%グルタルアルデヒド固定標本は電顕観察に用いた。

(倫理面への配慮)

精巣の採材に際しては、各動物にペント

バルビタールによる深麻酔を施し、苦痛が全くない状態で行った。

C. 研究結果

1) 若齢ラットへの MEHP 連続経口投与試験

精巣重量は、700mg/kg/day 以上の投与群において、対照群と比べ、有意に高い値を示した (Fig.2)。顕微鏡像は、濃度依存的に精上皮の異常が増大した (Fig.3)。アポトーシス細胞数は、800mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べ、有意な増加を示した (Figs.4, 5)。電顕観察においては、セルトリ細胞内における空胞の出現、精細胞の脱落による精上皮内における巨大空胞の出現が認められ、またアポトーシス細胞に加えてネクローシスを示すセルトリ細胞、精細胞も観察された (Figs.6, 7)。

2) 若齢マウスへの MEHP 連続経口投与試験

精巣重量に関しては、実験群と対照群の間で有意差は認められなかった (Fig.8)。アポトーシス細胞数は 700mg/kg/day 投与群で最も多く、対照群と比べ、有意な増加を示した (Figs.9, 10)。

3) 若齢モルモットへの MEHP 急性経口投与試験

投与後6時間では精細胞の脱落が、9時間後では精細胞の脱落による精上皮の薄層化と精巣輸尿管の内腔に充満した脱落精細胞が観察された (Figs. 11, 12)。アポトーシス細胞数は

時間依存的に増加した (Figs.13, 14)。電顕像ではセルトリ細胞内の空胞出現が認められた。

4) 若齢シバヤギ精巣器官培養系への MEHP 添加試験 (Fig.15)

添加後 3 時間以降においては、アポトーシスを示す精細胞 (クロマチン濃縮、形質膜の崩壊を伴わない細胞質萎縮等を示す)、ネクローシスを示す精細胞 (膨化、崩壊したミトコンドリア、形質膜の溶解等を示す)、アポトーシスを示すセルトリ細胞 (核膜の溶解、核質の濃縮等を示す) およびネクローシスを示すセルトリ細胞 (核周囲に沿う辺縁クロマチン、膨化崩壊した細胞小器官等を示す) が認められた (Figs.16-20)。

5) 若齢ラット精巣器官培養系への MEHP 添加試験 (Fig.21)

アポトーシス細胞数は、濃度依存的、時間依存的に増加した (Table 1, Fig.22)。電顕観察においては、4) の実験と同様、アポトーシスを示す精細胞、セルトリ細胞、ネクローシスを示す精細胞、セルトリ細胞が認められた (Figs. 23, 24)。

6) 若齢モルモット精巣器官培養系への MEHP 添加試験 (Fig.25)

セルトリ細胞内の空胞出現、精細胞の脱落が認められた。アポトーシス細胞は、時間依存的、濃度依存的に増加した (Figs.26-29)。

D. 考察

MEHP のラットおよびマウスへの連

続経口投与試験の結果、5 日間連続投与したラットでは 800mg/kg/day で、3 日間連続投与した 700mg/kg/day で精上皮中のアポトーシス細胞数が最大となった。また、電顕観察の結果から、これまでの報告と同様、MEHP 投与→セルトリ細胞の変性 (空胞出現等) →精細胞 (主に精母細胞) のアポトーシスによる脱落→精上皮の薄層化→精細管の萎縮→精巣萎縮の順に変化が進行することが示唆された。セルトリ細胞の変性に伴う精細胞の脱落については、MEHP 投与によるセルトリ細胞内のビメンチンフィラメントの異常が指摘されているが、精細胞接着部におけるアクチンフィラメントの異常の可能性もあり、今後さらに検討が必要である。MEHP の精巣器官培養系への添加試験では、アポトーシス細胞数の変化を指標とした場合、ラットおよびモルモットにおいて、類似した影響が認められた。すなわち両者ともに濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。今後、マウスおよびサル類の精巣器官培養系への MEHP 添加試験、モルモットへの連続経口投与試験等を試み、種差の要因 (経口投与による代謝経路の差異か、セルトリ細胞自身の感受性の差異か) についてさらに検討を進める予定である。

E. 結論

MEHP のラットおよびマウスへの連続経口投与試験の結果、ラットでは 800mg/kg/day で、マウスでは 700mg/kg/day で精上皮中のアポトーシ

ス細胞数が最大となった。Tunel 法および電顕観察により、MEHP 投与による精巣の萎縮は、セルトリ細胞の変性（空胞出現等）→精細胞（主に精母細胞）のアポトーシスによる脱落→精上皮の薄層化→精細管の萎縮→精巣萎縮の順に進行することが示唆された。MEHP のラットおよびモルモット精巣器官培養系への添加試験では、両者ともに濃度依存的、時間依存的にアポトーシス細胞数の増加が確認された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Andriana, B. B., Tay, T. W., Tachiwana, T., Sato, T., Ishii, M., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono (2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in rats *in vitro*. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 80:127-136(2004)
- 2) Andriana, B. B., Tay, T. W., Ishii, M., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. An ultrastructural study on cytotoxic effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in Shiba goats *in vitro*. *J. Vet. Sci.* 投稿中
- 3) Awal, M. A., Kurohmaru, M., Ishii, M., Andriana, B. B., Kanai, Y., and Hayashi, Y. Mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) induces spermatogenic cell apoptosis in guinea pig testes at prepubertal stage *in vitro*. *Int. J. Toxicol.* 投稿中
- 4) Tay, T.W., Andriana, B.B., Ishii, M., Matsui, T., Sato, T., Matoba, S., Tachiwana, T., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in prepubertal rats. *J. Vet. Med. Sci.* 投稿中
- 5) Awal, M. A., Kurohmaru, M., Kanai, Y. and Hayashi, Y. Mono- (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue & Cell* 投稿中

2. 学会発表

- 1) Andriana, B. B., Tay, T. W., Tachiwana, T., Ishii, M., Sato, T., Awal, M.A., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in rats *in vitro*. 第136回日本獣医学会学術集会、2003.10.03、青森
- 2) Tay, T.W., Andriana, B.B., Ishii, M., Sato, T., Matsui, T., Matoba, S., Tachiwana, T., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Chronic effects of mono-(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes of prepubertal SD rats. 第136回日本獣医学会学術集会、2003.10.03、青森
- 3) Tay, T.W., Andriana, B.B., Ishii, M., Kanai, Y., Kurohmaru, M. and Hayashi, Y. Effects of mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP) on testes in prepubertal mice. 7th National Biology Symposium, Genting Highlands, Malaysia, May, 2004

G. 知的所有権の取得状況

特になし

Fig.1. Rat [SD] (*in vivo*):28-day-old

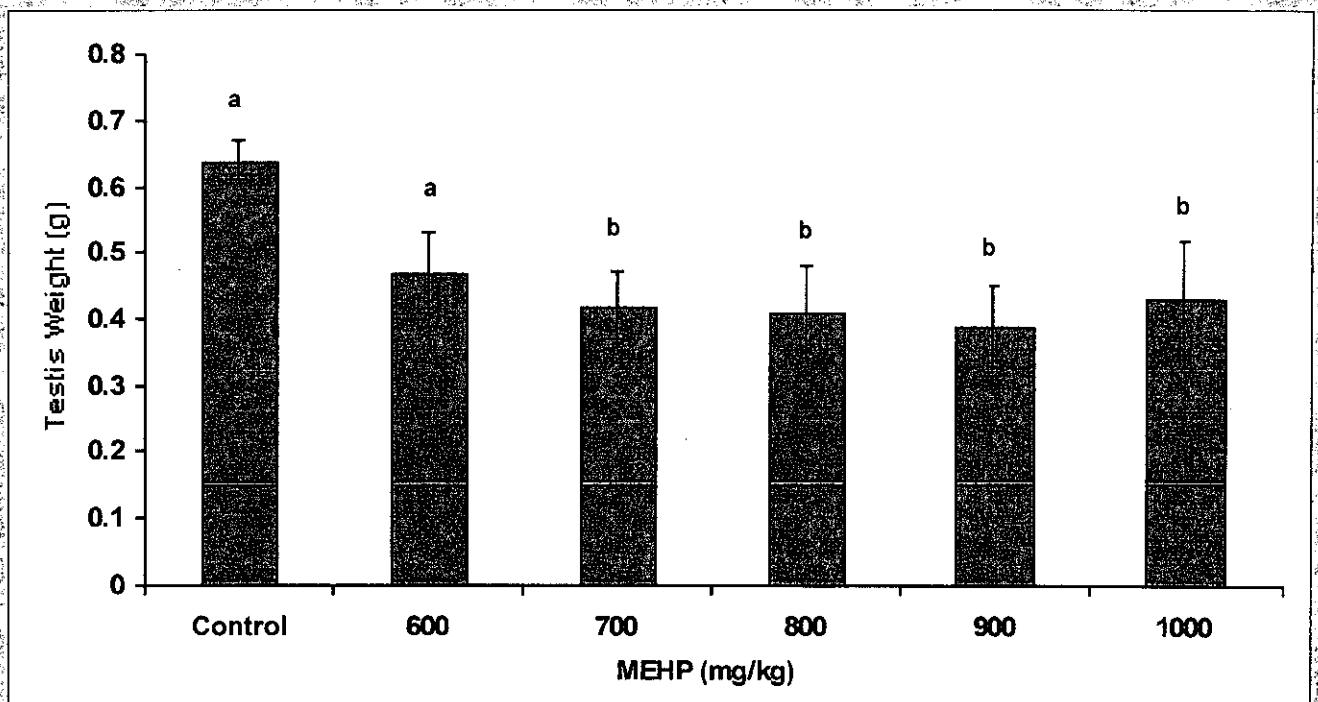
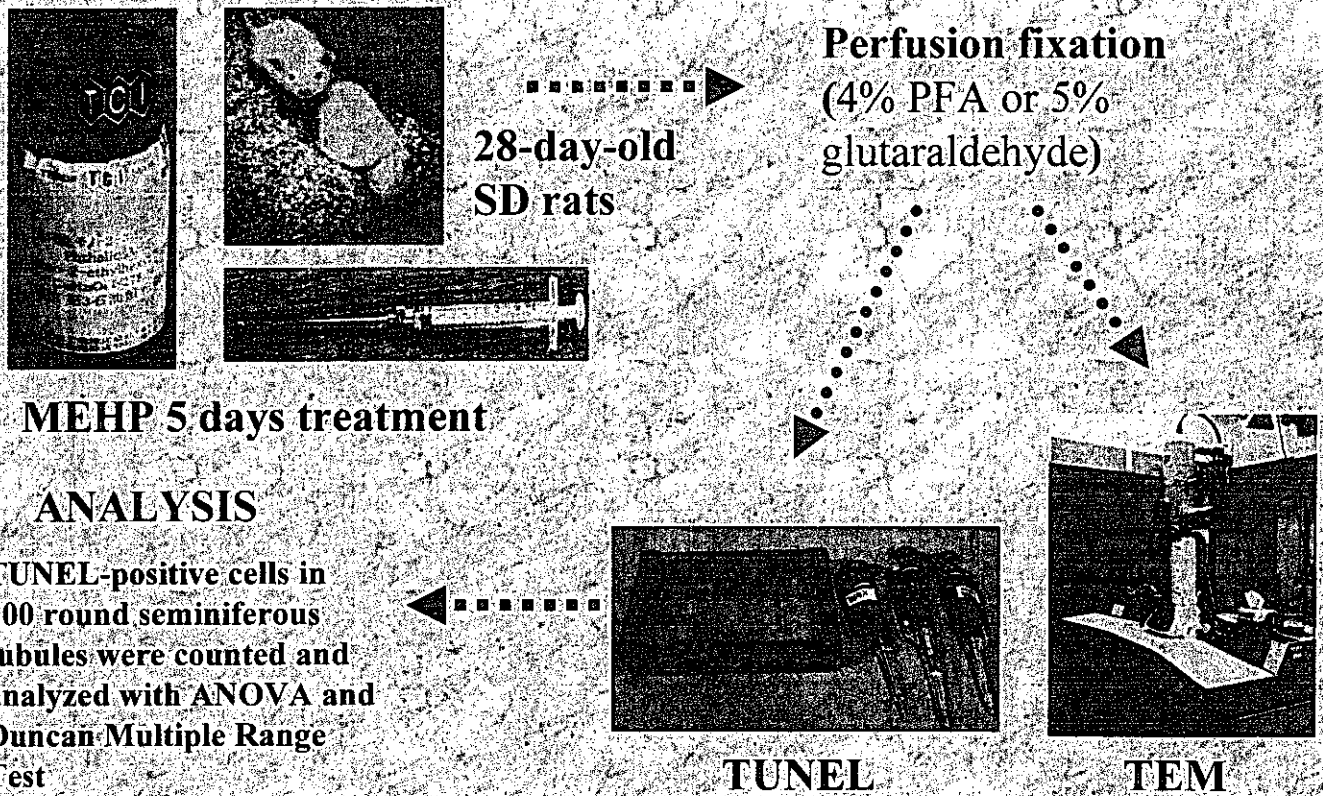





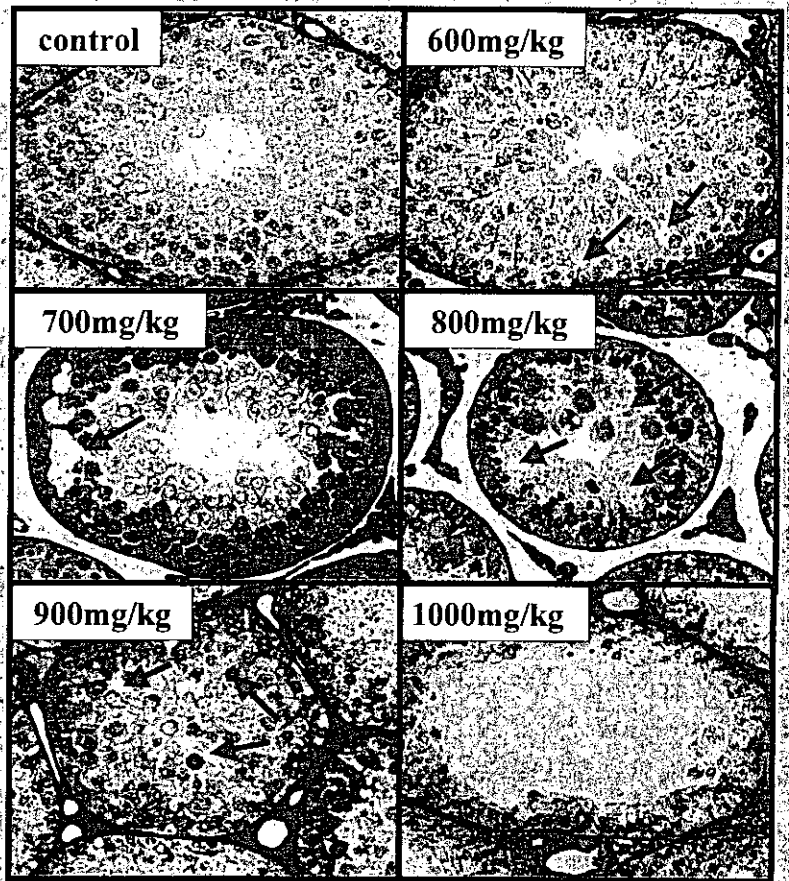
Fig. 2. Testis weight of rats treated with various doses of MEHP. Data are presented as mean \pm SEM and alphabets show Duncan grouping. The testis weight of rats (b) fed with either 700, 800, 900 or 1000 mg/kg MEHP is significantly different ($p < 0.05$) from that in control rats (a).

SEMI-THIN SECTIONS

Fig. 3.

Semi-thin sections of testes of rats fed with various doses of MEHP (Toluidine blue staining) (Mag. x 100).

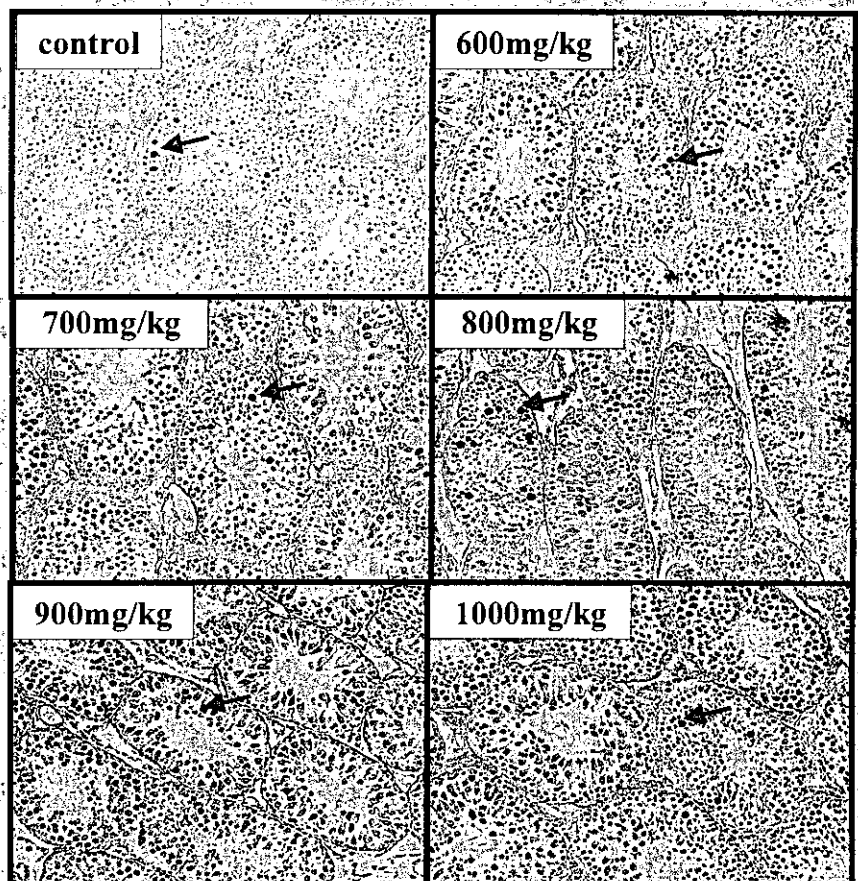
-  spaces between spermatogenic cells;
-  disruption of Sertoli cells;
-  degenerating spermatogenic cells.

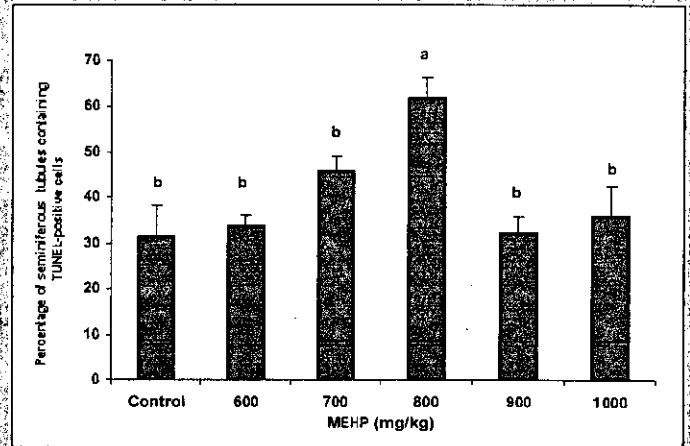
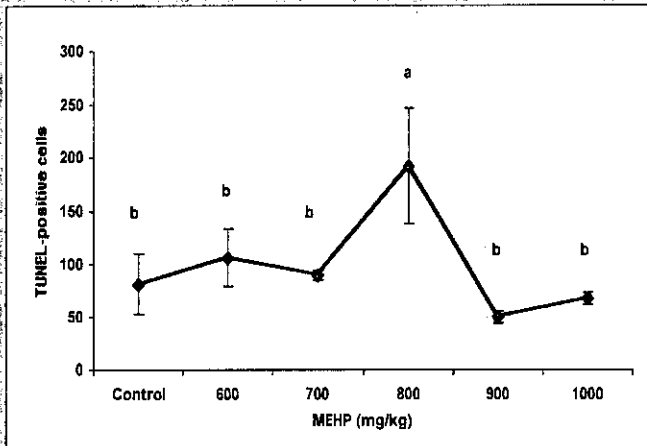


TUNEL

Fig. 4.

Sections of testes of rats fed with various doses of MEHP (TUNEL apoptosis kit) (Mag. x 50). Arrows indicate TUNEL-positive cells.





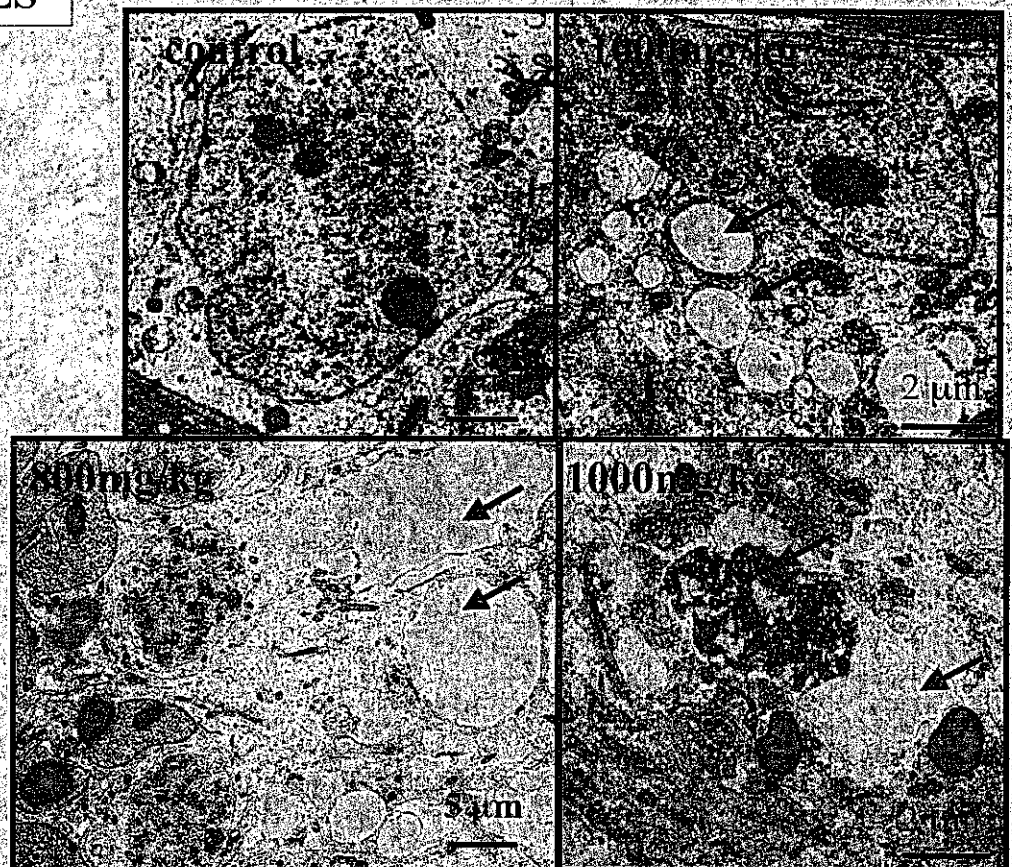
a) Total apoptotic cells in 100 round seminiferous tubules.

b) Percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cell.

Fig. 5. Total apoptotic cells in 100 round seminiferous tubules and percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cells in rats treated with various doses of MEHP. Data are presented as mean \pm SEM and alphabets show Duncan grouping. Rats fed with 800mg/kg MEHP (a) are significantly different ($p < 0.05$) from those in rats fed with other doses (b).

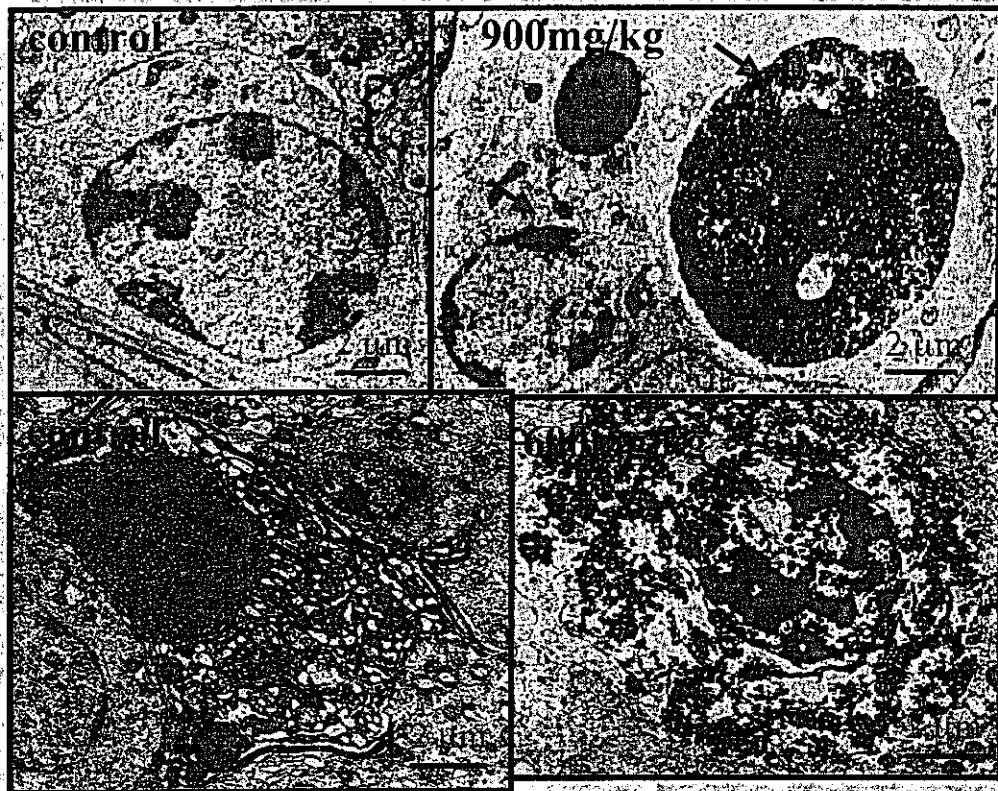
SERTOLI CELLS

Fig. 6. Sertoli cells in control and treated rats. [top left] Normal Sertoli cell; [top right] Presence of vacuoles (white arrow) in Sertoli cell indicating necrosis; [bottom left] Sertoli cell disruption indicated by large spaces (black arrow); [bottom right] Necrotic Sertoli cell with nuclear membrane lysis (black arrow) and presence of vacuoles (white arrow);



SPERMATOGENIC CELLS

Fig.7. Spermatogenic cells in control and treated rats. [top left] Normal spermatogenic cell (spermatogonium); [top right] Necrotic spermatogenic cell (black arrow) beside a normal one (white arrow); [bottom left] Apoptotic spermatogenic cell with vacuoles (white arrow) and functioning mitochondria (black arrow); [bottom right] Degenerating spermatogenic cell showing heterochromatin within the nucleus (black arrow).



Mouse [C57B6N] (*in vivo*):28-day-old, MEHP 3 days treatment

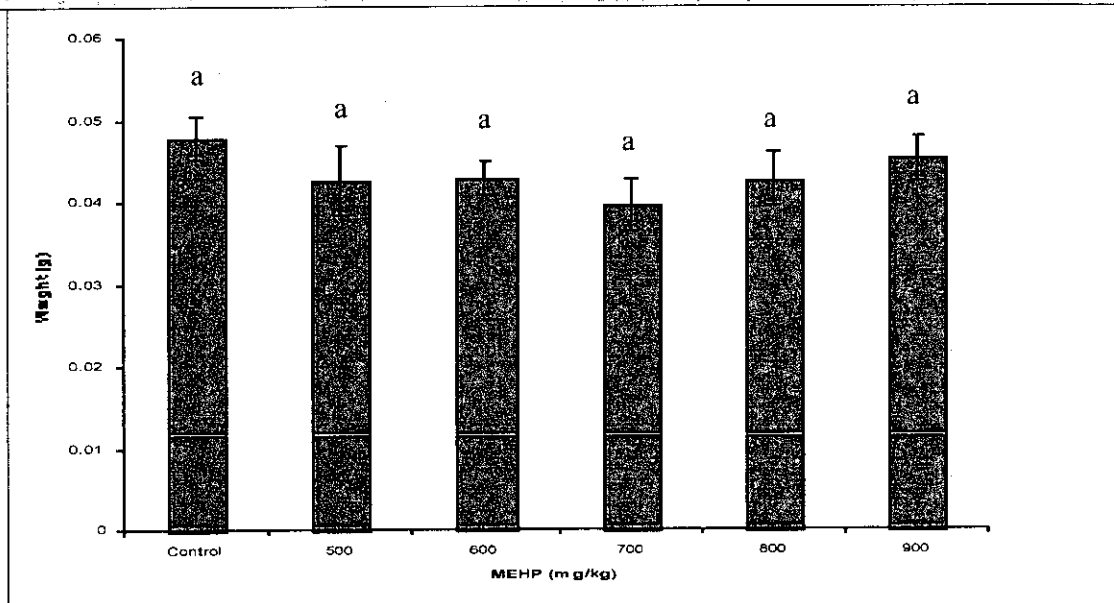
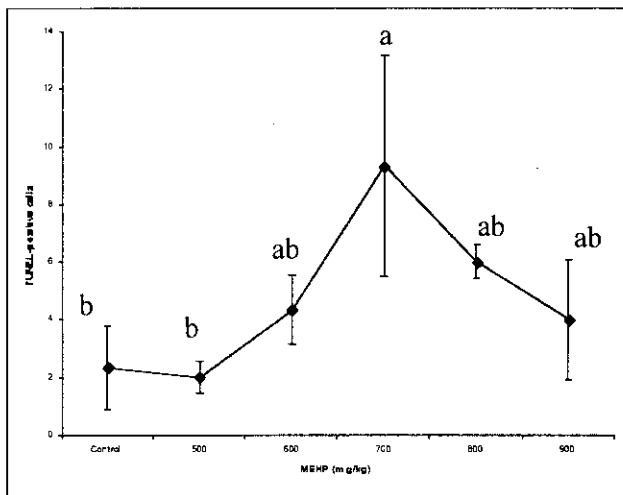
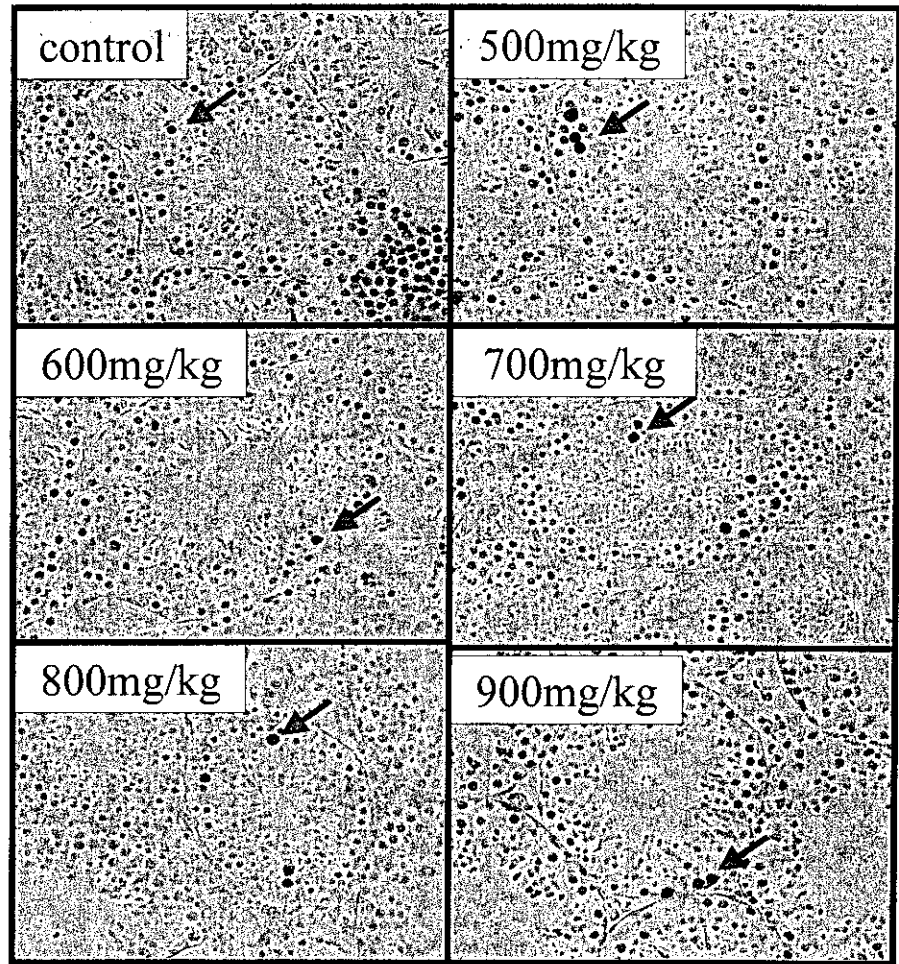


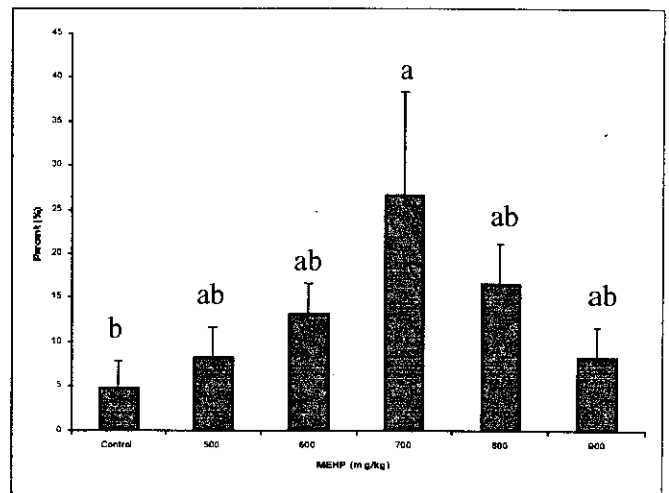
Fig.8. Testis weight of mouse treated with various doses of MEHP. Data are presented as mean \pm SEM and alphabets show Duncan grouping. The testes weight of mouse treated with MEHP are not significantly different ($p > 0.05$) from that in control mouse.

TUNEL

Fig.9. Sections of testes of mouse treated with various doses of MEHP (TUNEL apoptosis kit) (x50). Arrows indicate TUNEL-positive cells.



a) Total apoptotic cells in 20 round seminiferous tubules.



b) Percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cells.

Fig.10. Total apoptotic cells in 20 round seminiferous tubules and percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cells in mouse treated with various doses of MEHP. Data presented as mean ± SEM and alphabets show Duncan grouping.

Guinea pig [Hartley] (*in vivo*), 35-day-old
MEHP(2000mg/kg) administration

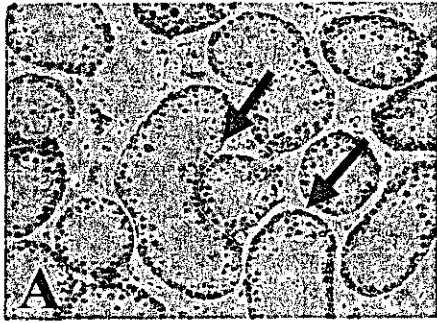


Fig.11. In control, seminiferous tubules of guinea pig showed normal (A, arrows). Lumina of efferent ductules almost revealed an empty space (B, arrows)

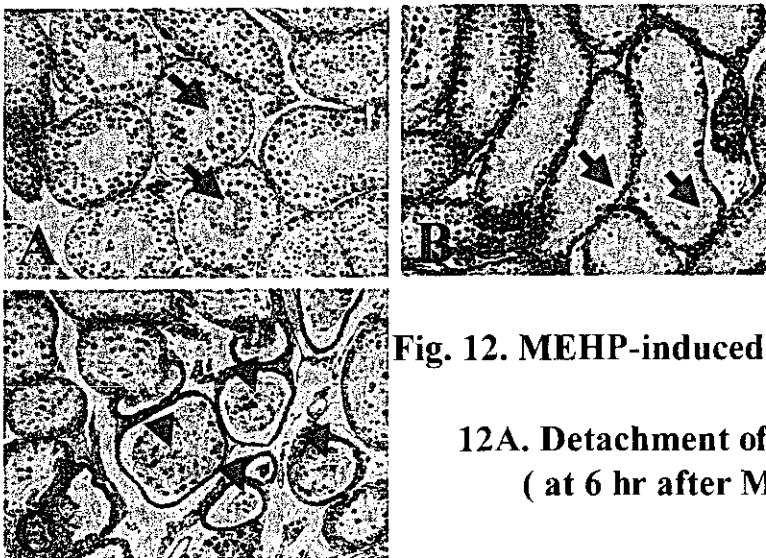


Fig. 12. MEHP-induced testicular alterations in guinea pigs.

**12A. Detachment of spermatogenic cells
(at 6 hr after MEHP treatment).**

**12B. Thin seminiferous epithelia due to sloughed
spermatogenic cells (at 9hr after MEHP treatment).**

**12C. Lumina of efferent ductules contained sloughed
spermatic cells (at 9 hr after MEHP treatment).**

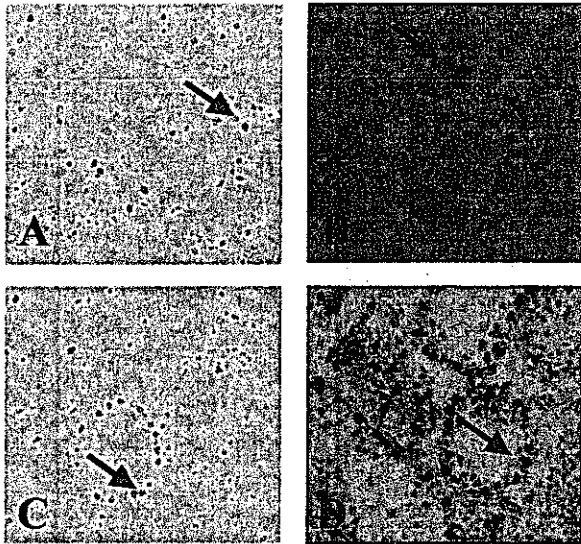


Fig.13. TUNEL-positive apoptotic spermatogenic cells from 3 to 9 hr after MEHP treatment.

13A-D. Apoptotic spermatogenic cells appeared at 3 hr in control (A). Percentage (%) of apoptotic spermatogenic cells gradually and significantly increased from 3 to 9 hr after MEHP treatment (B-D).

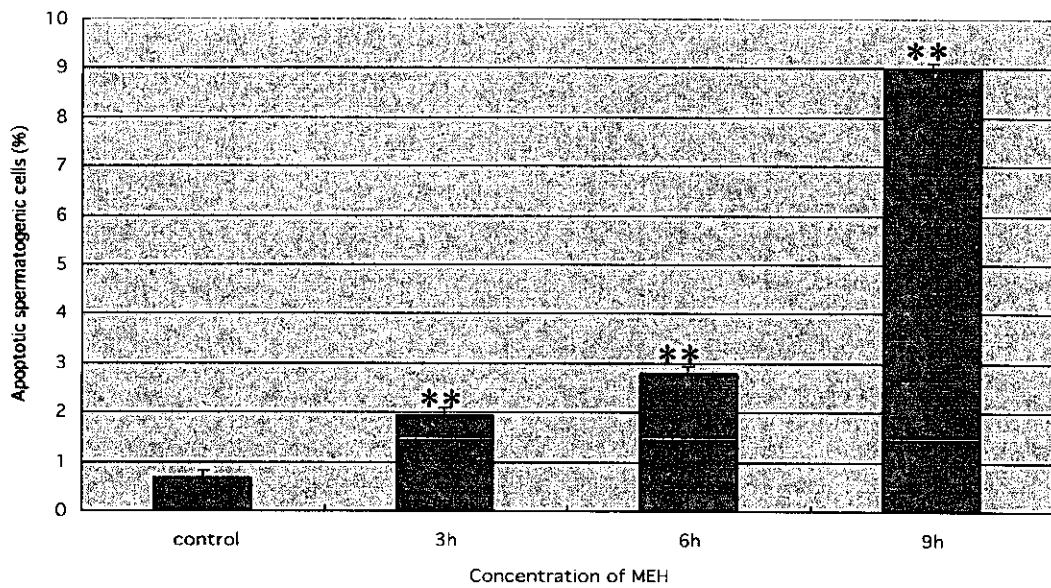
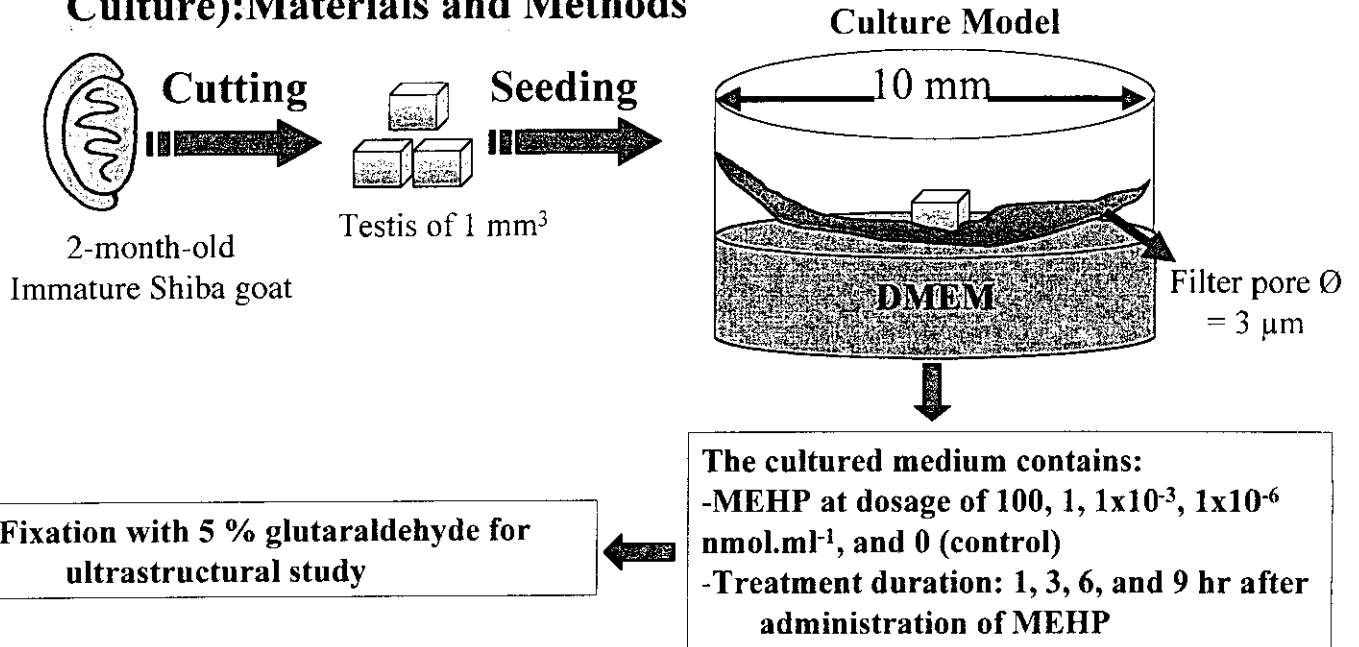


Fig. 14. Apoptotic spermatogenic cells increased in a time-dependent manner (P<0.01)**

Fig.15. Shiba goat (Testicular Tissue Culture):Materials and Methods



The number of apoptotic testicular cells was counted in 25 randomly selected round seminiferous tubules from 20 testicular tissue cultures. The data, calculated as a percentage, were expressed as the mean \pm SD. The significance between each group ($p < 0.05$) was determined by single factor analysis of variance (ANOVA).

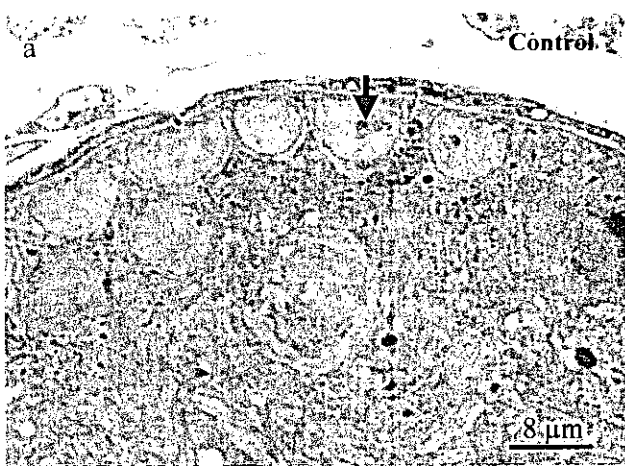


Fig. 16.
Light micrographs of testicular tissue culture stained with toluidine blue.

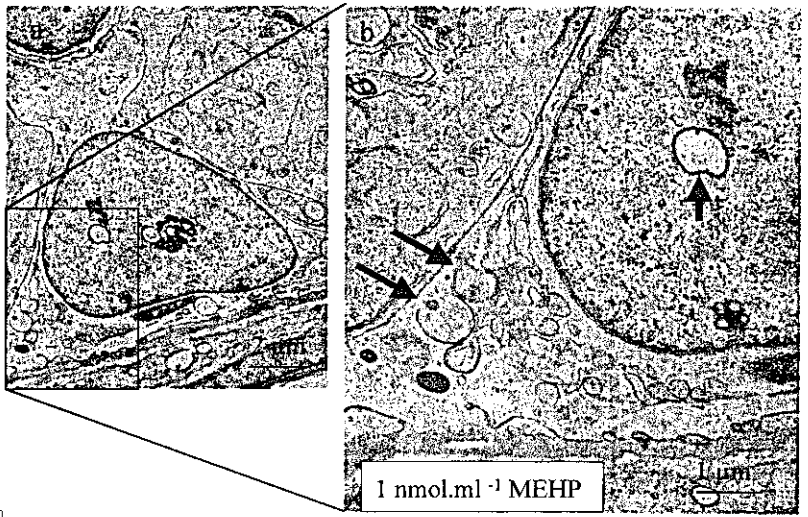


a) Control, b) MEHP-treated (1 nmol.ml^{-1}). Vacuolization (#) and degenerated cells (black arrows) can be identified (magnification 5×100). Red arrows indicate a visible vesicle of multivesicular nuclear body.

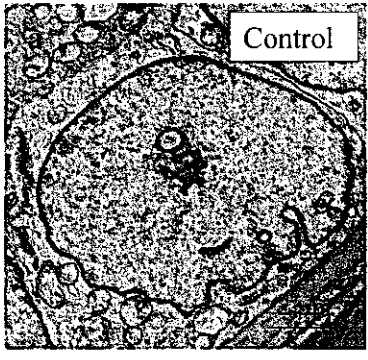


Transmission electron micrograph showing seminiferous tubule of testicular tissue culture from 2-month-old Shiba goat. Sertoli cells dominate a seminiferous tubule. (Control).

Fig. 17. Ultrastructural appearance of necrotic Sertoli cell in MEHP-treated (1 nmol.ml^{-1}) testicular tissue culture at 1 hr after treatment.



a) Low magnification. b) Higher magnification. A large vesicle (red arrow) is visible, and a ruptured membrane of mitochondria (black arrow) is also identified. It should be the first step of necrosis.

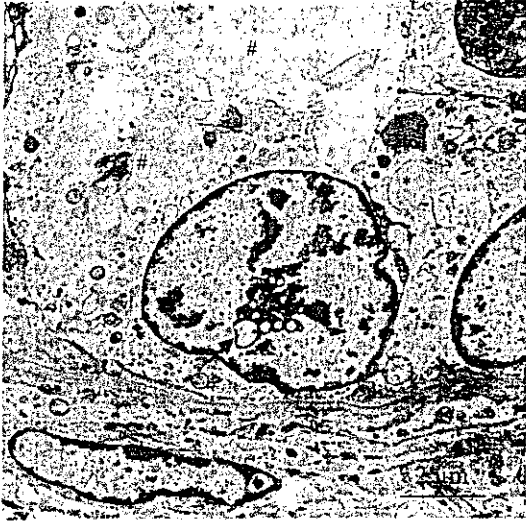


a)control

Fig. 18. Transmission electron micrographs



b)Abnormal vesicles (arrow) after MEHP treatment (1 nmol.ml^{-1}) for 3 hr (b).



Degenerated Sertoli cell. The nucleus contains an abnormal vesicle (arrow) and has some marginal chromatin along the nuclear membrane. Mitochondria distention (*) and vacuolization (#) are also visible. Treated with 1 nmol.ml^{-1} MEHP for 3 hr.

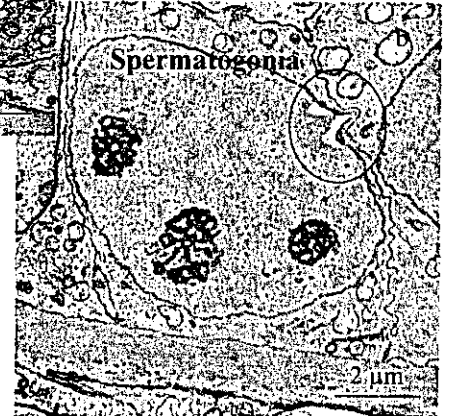
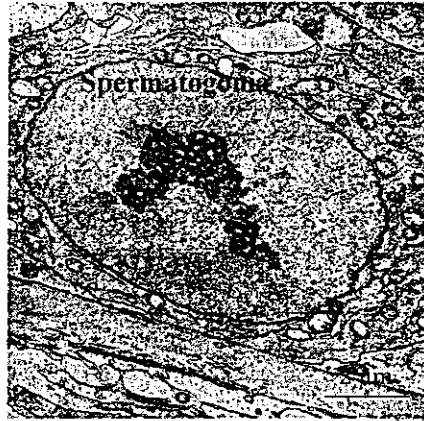
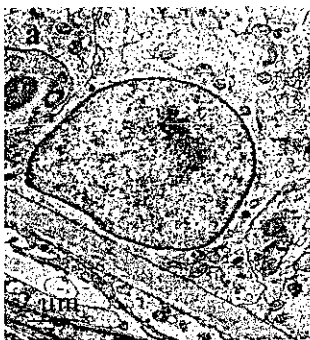
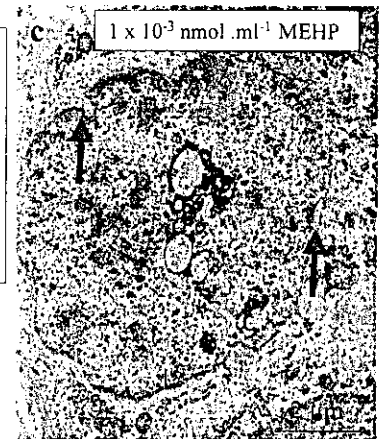


Fig. 19. Transmission electron micrographs

Degenerated spermatogonia at early stage. a) Control. b) Spermatogonia reveal an abnormal appearance (circle). Treated with 1 nmol.ml^{-1} MEHP for 3 hr.

Fig. 20.

c) Sertoli cell nucleus after MEHP-treatment ($1 \times 10^{-3} \text{ nmol.ml}^{-1}$) for 6 hr. Abnormality of the nucleus can be seen. Some chromatin along the nuclear membrane (arrows) reveal abnormal in appearance.

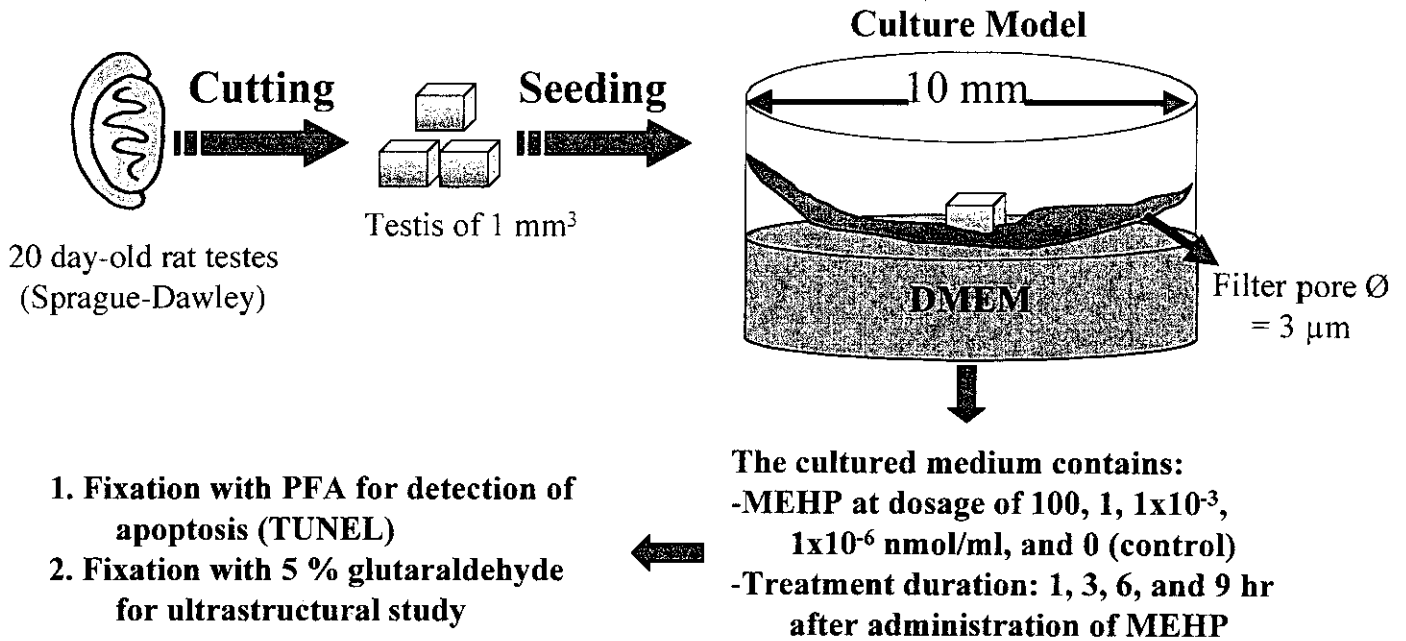


Transmission electron micrographs of testicular tissue culture.
a) Normal Sertoli cell, control.



b) Apoptotic Sertoli cell, control, seeded for 6 hr.

Fig. 21. SD rat (Testicular Tissue Culture)

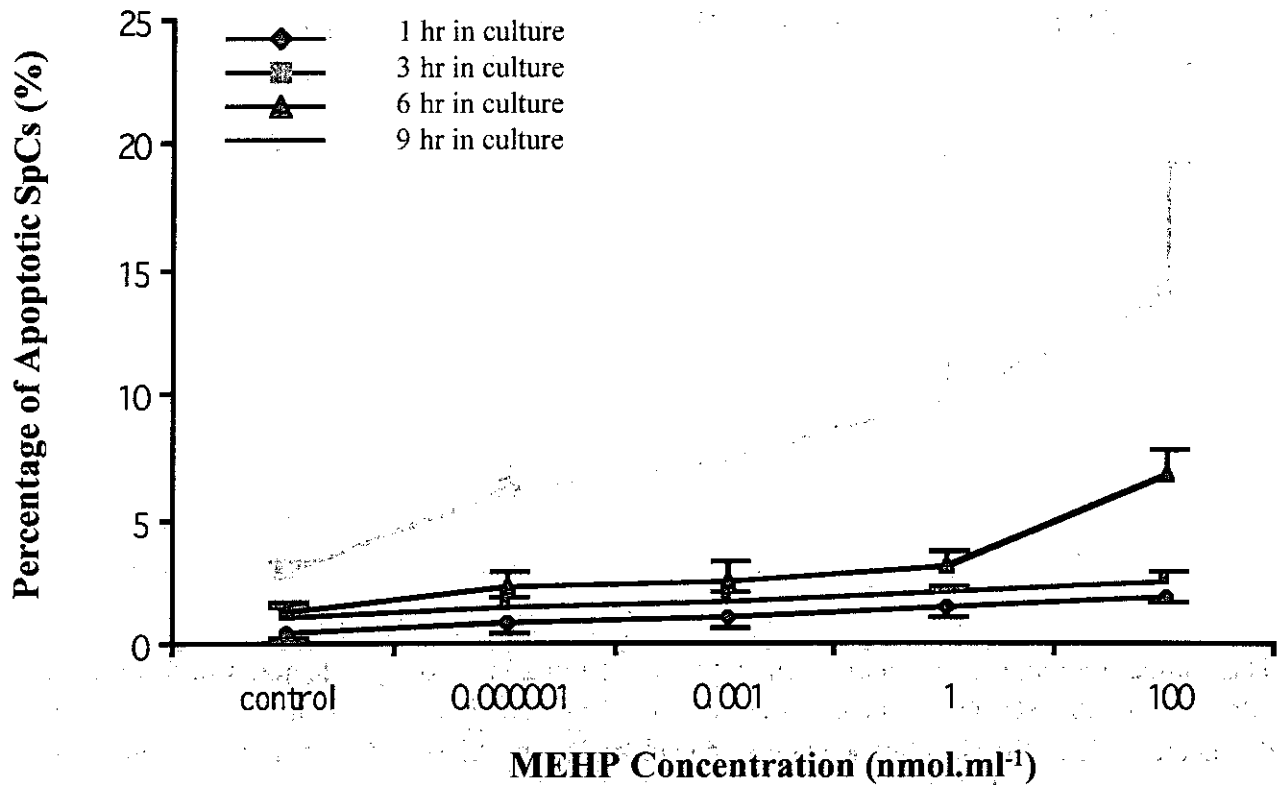


The number of apoptotic testicular cells was counted in 25 randomly selected round seminiferous tubules from 20 testicular tissue cultures. The data, calculated as a percentage, were expressed as the mean \pm SD. The significance between each group ($p < 0.05$) was determined by single factor analysis of variance (ANOVA).

Table 1. Percentage of MEHP-induced apoptotic spermatogenic cells. Apoptotic spermatogenic cells are detected by TUNEL staining. Arrows indicate spermatogenic cells undergoing apoptosis.

TIME	Concentration of MEHP (nmol/ml)				
	Control	1×10^{-6}	1×10^{-3}	1	100
1 hr	0.5% \pm 0.4%	0.9% \pm 0.5%	1.1% \pm 0.4%	1.5% \pm 0.4%	1.7% \pm 0.4%
3 hr	1% \pm 0.4%	1.4% \pm 0.4%	1.6% \pm 0.4	2% \pm 0.3%	2.5% \pm 0.3%
6 hr	1.2% \pm 0.4%	2.3% \pm 0.6%	2.5% \pm 0.7%	3% \pm 0.6%	6.8% \pm 1.1%
9 hr	2.8% \pm 0.4%	6.1% \pm 1.1%	7.4% \pm 0.7%	9.8% \pm 2.5%	14% \pm 5.2%

Fig. 22. Percentage of MEHP-induced apoptotic spermatogenic cells



SpC = Spermatogenic Cell

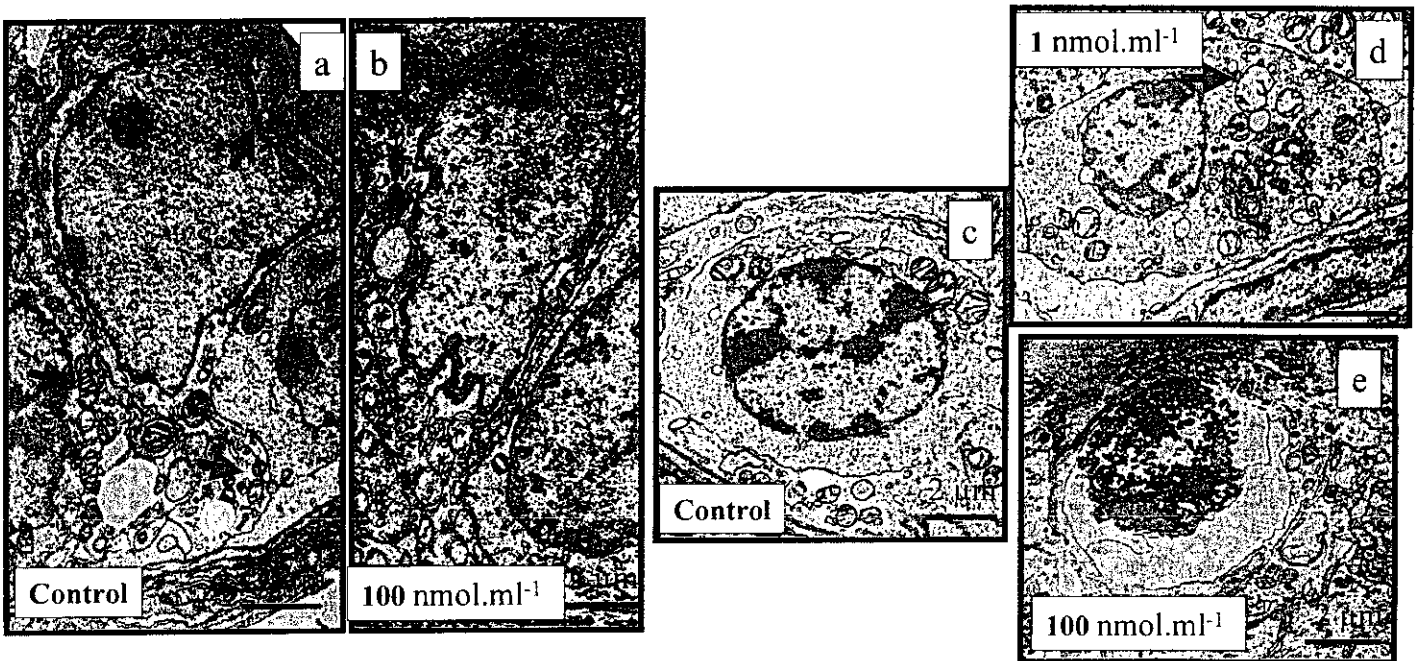


Fig. 23. Ultrastructural appearances of control and MEHP-treated testicular cells at 1 hr after seeding.

(a); In control Sertoli cell, vacuolization occurs, while mitochondria in normal shape are dominated (yellow arrow), (b); Sertoli nuclear membrane is partly lysed (round marker). It should be the first step of apoptosis, (c); Normal spermatogenic cell in control, (d); Swollen mitochondria (red arrow). It might be the early stage of necrotic spermatogenic cell after administration of 1 nmol/ml MEHP, (e); Apoptotic spermatogenic cell is infrequently found at the highest concentration of MEHP. ScN = Sertoli cell nucleus.