

## フタル酸エステルに誘導されたマウス精巣アポトーシスの免疫組織化学とTUNEL法による検索

市村 孝雄\*\*\* 河村 麻紀\*\* 吉田 陽子\*\* 新井 奈央\*

### 要約

内分泌攪乱化学物質のひとつであるフタル酸エステルのマウス精巣に対する作用を実験生理学的に検討した。4週令マウスにフタル酸エステルを胃内強制投与して12時間後の精巣組織を、断片化DNAを標識するTUNEL法とアポトーシス細胞死関連蛋白FasおよびFasリガンドを認識する免疫組織化学法で処理し、共焦点レーザー顕微鏡で検索した。精細管上皮の支持細胞セルトリ細胞にはFasリガンドの、精母細胞にはFasの強い発現が認められた。両者の発現パターンはTUNEL陽性細胞の出現パターンとよく相関し、とくにFasの発現は、精母細胞の核DNA断片化を示すTUNEL陽性細胞と同一細胞の細胞質あるいは細胞膜上に明確に認められた。このことは、フタル酸エステルが、Fasリガンド・Fas系を介する精母細胞の核DNA断片化によってマウス精巣にアポトーシス細胞死を引き起こす可能性を示唆する。

キーワード：アポトーシス、マウス精巣、フタル酸、TUNEL、Fas

### I はじめに

1992年Carlsenらが男性精子数の減少を報告して以来、エストロゲン様作用を示す内分泌攪乱化学物質の精巣への影響が注目され、多くの研究室で実験的研究が進められている<sup>(1)</sup>。フタル酸エステル (diethyl hexylphthalate, DEHP) はそのような作用を示す化学物質の一種であるが、プラスチック成型品の製造過程で可塑剤として添加され製品の使用中に溶出するので、日常生活環境に常在する内分泌攪乱化学物質のひとつとなっている。それゆえ、男性精巣への影響ばかりでなく、健康への影響が懸念される。DEHPは経口摂取されると腸管内で急速に分解されて活性型のmono-ethylhexyl-phthalate (MEHP) となり、このモノマーが雄性生殖器に対して細胞毒性作用を示し、精巣停留、精子形成不全などの異常を引き起こすことが知られている<sup>(2,3)</sup>。

In vivoおよびin vitroの多くの実験事実はMEHPの細胞毒性作用の標的が精細管上皮のセルトリ細胞にあることを示している<sup>(4,5)</sup>。MEHPは、卵胞刺激ホルモンに対するセルトリ細胞内セカンドメッセンジャーcAMP上昇を阻害することが培養細胞で確認されている。一方、精細管上皮の精祖細胞から精子細胞に至る精子形成細胞は、セルトリ細胞が作る内部環境で栄養とホルモンの支配を受けて分化を遂げる。これらの細胞はMEHPの作用を受けたセルトリ細胞から何らかのシグナルを受けて細胞死を起こす。この細胞死は組

織の壊死によるものではなく、核DNAがヌクレオソーム単位で断片化するアポトーシスによるものと考えられている<sup>(6,7)</sup>。Leeらによれば、ラット精巣では、細胞外シグナルを受けたセルトリ細胞の細胞膜にFas-Ligandが発現し、セルトリ細胞に接する細胞に発現するFasがFas-Ligandの細胞外ドメインを認識して結合する。ついで、Fasの細胞質側にあるdeath domainがアポトーシスの開始シグナルとなる<sup>(6,7)</sup>。しかしながら、MEHPによるマウス精巣の細胞死がリンパ球のアポトーシスと同様に、セルトリ細胞・精子形成細胞間のFas-Ligand/Fas系を介するアポトーシスであるか、あるいは他のシグナル伝達経路によるものかという点の実験的検証は充分ではない。そこで、この小論では、フタル酸エステルDEHPによって精細管上皮のセルトリ細胞にFas-Ligandが発現し、精子形成細胞に発現するFasを介して核DNAの断片化が誘導され、アポトーシスによる細胞死に至るシナリオを実験的に検証しようと試みた。

アポトーシスの検出には、エンドヌクレアーゼによってヌクレオゾーム単位で断片化した核DNAの3'末端を蛍光標識ウリジンでラベルして可視化するTUNEL (Terminal deoxyUridin Nucleotidyl End Label) 法を用いた。この方法は、アポトーシスを起こした細胞の核DNAがおよそ180bpの整数倍の梯子状電気泳動像を示すDNA ladder法とよく対応し、信頼度の高い方法と認められているものである<sup>(9)</sup>。しかし、TUNEL法は一本鎖DNAと二本鎖DNAを共に検

\* 山口県立大学看護学部、\*\*山口県立大学大学院健康福祉学研究所

出するので、精巣標本に人為的なDNA損傷を作る凍結切片を避け、ビブラトーム切片を採用した。また、Fas-Ligand/Fas系の関与を調べるためには、2種の動物による3種の1次抗体を用いた免疫組織化学によってFas-LigandおよびFasの蛋白発現を検索し、発現の分布、局在の相関を解析した。

## II 方法

実験動物には24匹の4週令雄ddyマウスを用いた。4週令マウスを供給するために12週令から18週令のddyマウスを交配し、水及び飼料は制限することなく与え、4月から11月の自然明暗周期下で飼育した。

実験動物にはフタル酸エステル (diethylhexyl phthalate, DEHP)、4 mg/g体重を1 mlのコーンオイルに溶解し、胃に達するゾンデを使って強制投与した。

12時間後、右精巣をエーテル麻酔下に摘出し、パラフォルムアルデヒド (PFA) 固定液 (4% PFA, 0.1Mリン酸緩衝バッファー) に4℃で一晩、又は室温で3時間浸漬して固定した。

固定した精巣組織を0.1Mリン酸緩衝バッファーで洗い、ビブラトームを使って100-200 μmの切片とした。切片は0.2% Triton X-100又は1% Proteinase Kを加えた0.1Mリン酸緩衝バッファー中で膜透過処理を施した。

膜透過処理後の組織切片をスライドガラスに載せ、次の処理を行った。

(1) TUNEL法<sup>(8)</sup>に従い、37℃に保った切片上でDNA 3'末端標識酵素 (TdT酵素, Promega社) を用いてDNAのヌクレオゾーム単位切断端にFITC標識uridineを取り込ませ、共焦点レーザー顕微鏡 (Kerl Zeiss社LSM510) を使ってこのヌクレオチドで標識された断片化DNAを検出した。

(2) 抗FasL抗体 (サンタクルズ社)、抗Fas抗体 (サンタクルズ社)、およびFITC/BODIPY/Rhodamine標識2次抗体を用いて免疫組織化学反応を行い、カウンター染色としてPropidium Iodide (PI) による正常核染色を組み合わせ、レーザー顕微鏡で観察、記録した。

(3) フタル酸エステルを加えないコーンオイルを投与した4週令動物の精巣を同様に処理し、対照とした。レーザー顕微鏡観察にあたっては励起・蛍光シャッター機構を利用し、FITC/BODIPYのグリーン領域蛍光とRhodamine/PIの赤領域蛍光を完全に分離して観

察し記録した。

## III 結果

TUNEL法でDNA断端の標識された像を精細管断面上で検索すると、数個から十数個の陽性像が散開性小集団となって出現した (写真1)。ヌクレオゾーム単位DNA切断を起こした核は核質全体が均一に標識された。一方、DNA切断を起こしていない核はヨード化プロピジウム (PI) で均一に染められた。TUNEL陽性像とPI陽性像を独立した2チャンネルに分割して表示すると、同一の核DNAが二重に標識されることは希だった (写真2)。TUNEL陽性像は精細管断面の基底側に限局する場合もあり、基底側から離れて集団を形成する場合もあったが、管腔側表面に出現することはなかった。管腔側表面に留まる精子と管腔に遊離した精子の頭部がTUNEL法で陽性に染められた例も皆無で、すべてPIで強く染められた。

フタル酸を含まないコーンオイルを投与された対照動物では、DNA切断を起こしていない核がPIによって一様に染色され、断面あたり3個以上の核を標識したTUNEL陽性像は出現しなかった (写真3)。

蛍光標識抗体によるFasLの免疫組織化学反応は、精細管上皮の基底側から管腔側に達するセルトリ細胞の広がり一致して、FasL陽性に強く染まったセルトリ細胞の細胞質がPI陽性の核を広く包みこむ状態が見られた (写真4)。一方、Fasの免疫組織化学反応は精母細胞の細胞質あるいは細胞膜上に現われ、TUNEL陽性の核をとりまく細胞質にFas陽性の反応が明瞭に現れる場合が見られた (写真5)。対照では、FasL、Fasともに陰性であった。

精細管周囲の間質では、ライディッヒ細胞にFasの陽性反応が見られたが、ライディッヒ細胞は対照においてもFas陽性であった (写真5)。

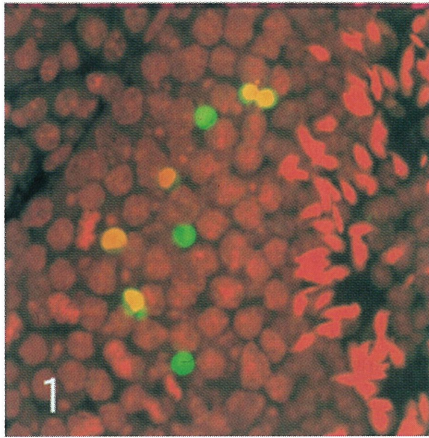


図1 フタル酸投与マウス精細管上皮断面の共焦点レーザー顕微鏡像。TUNEL法で検出したDNA断片化精母細胞の核(緑)がヨード化プロピジウムによるDNA染色で標識される正常な核(赤)の間に散在性に出現する。赤く染まった紡錘形の核は精子細胞と精子の頭部。(倍率×300)

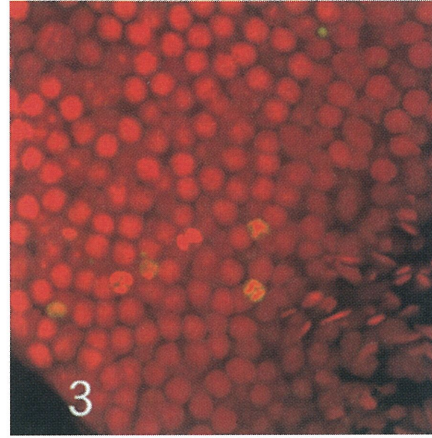


図3 フタル酸を投与しないマウスの精巣(対照動物)をTUNEL法とヨード化プロピジウム法で図1、2と同様に処理した精細管上皮断面。ほとんどすべての核はヨード化プロピジウムで標識される(赤)。(倍率×300)

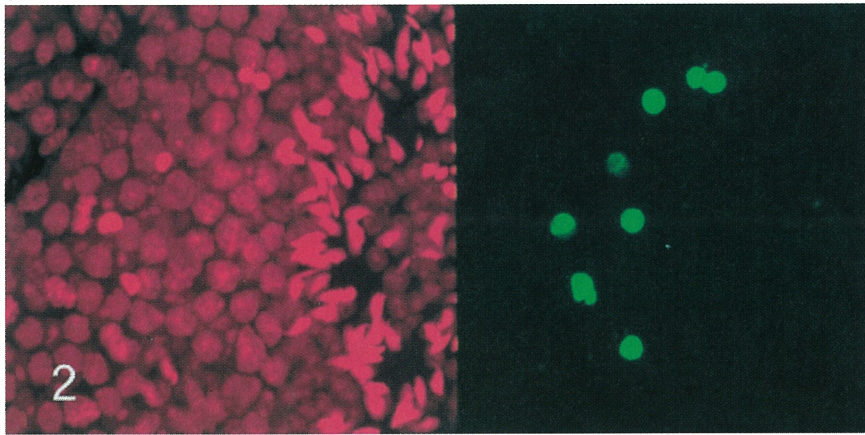


図2 図1と同様に、フタル酸投与マウス精細管上皮断面のTUNEL法によるDNA断片化像(右、緑)と正常核のヨード化プロピジウムによるDNA標識像(左、赤)の分割表示。8個のgerm cellが選択的にTUNEL法で標識されている。(倍率×300)

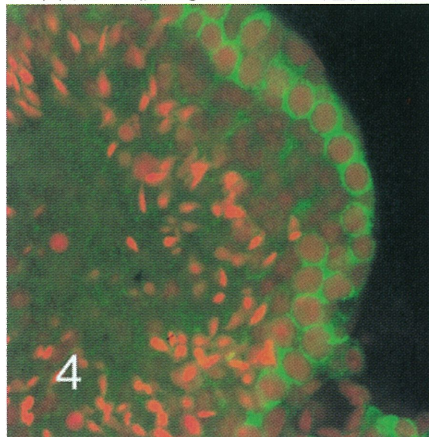


図4 フタル酸投与マウス精細管に発現したFasリガンドを間接免疫蛍光法でラベルし、正常核をPI法で染めた像。多数の精母細胞を支持するセルトリ細胞の精細管上皮基底側にFasリガンドが強く発現している(緑)。精子細胞、精子および他のgerm cellはヨード化プロピジウムによって一様に標識されている(赤)。(倍率×300)

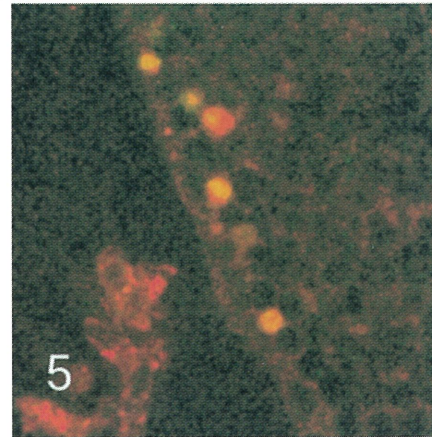


図5 フタル酸投与マウス精細管に発現したFasを間接免疫蛍光法でラベルし、DNA断片化核をTUNEL法で検出した像。抗Fas抗体の強い反応(赤)が、TUNEL法で黄ないし緑に標識された核と重なり、あるいは核を包圍している。間質のライディッチ細胞にも抗Fas抗体の弱い反応が斑点状に見られる。(倍率×300)

#### IV 考 察

この報告では、フタル酸投与マウスの精巣をTUNEL法と免疫組織化学法で調べ、精母細胞のFas発現とDNA断片化、セルトリ細胞のFasL発現を検索して、精母細胞のアポトーシスを示唆する所見を示した。

TUNEL陽性像は精細管断面に数個から十数個の核の散開性小集団となって出現した。対照動物では精細管断面あたり1ないし2個の少数の陽性像が散見された。この観察は、ラット精巣に対するフタル酸の影響を調べたLeeらの結果とよく相応する<sup>(6, 7)</sup>。ラットでは、精細管断面あたり3個以上のTUNEL陽性細胞が出現する頻度は、フタル酸投与12時間後に投与前の約7倍に増加、FasLはセルトリ細胞に一致して上皮基底側から上皮を縦断する分布を示した。Fasは精母細胞だけに見られた。マウスとラットの間のこの類似は、当然、FasL/Fas系が精子形成細胞アポトーシスを誘導する共通のシグナル伝達系として機能することを示唆する。

Leeらによると、FasL-mRNAの発現はフタル酸投与6時間後に最大となって12時間後にはやや下降し、Fas-mRNA発現は12時間後に最大となる。我々のフタル酸投与12時間後の今回の観察では、FasLはセルトリ細胞に強く発現し、Fasは精母細胞に発現した。Fasの強く発現した精母細胞の核がTUNEL法で明瞭に検出され、同一細胞のFasとDNA断片化の同時発現が確認された。これらの所見から、フタル酸投与12時間後には精母細胞を支持するセルトリ細胞にFasLが発現しており、時間遅れをもって精母細胞に発現したFasがFasLと相互作用して精母細胞にアポトーシスを誘導し、DNAを断片化してTUNEL陽性像を出現させたとのシナリオを描くことが可能である。

フタル酸非投与マウスにおいて示したとおり、正常の精子形成過程でも、セルトリ細胞の支持能とのバランスを保つために精子形成細胞では低い頻度でアポトーシスが見られる。とくに30日令を過ぎる成熟マウスでは頻度がやや高くなることが知られている<sup>(9)</sup>。今回の実験では対象を幼若期末の28日(4週)令マウスに限定したが、対照動物に見られたアポトーシス像はこの成熟直前の正常アポトーシスを示す。TUNEL法によるアポトーシスの検出は、断片化DNAを定量するDNA ladderの濃度とよく相関する感度と信頼度の高いアポトーシス検出法なので<sup>(6)</sup>、この正常アポトーシスを高感度で検出したものと考えられる。

#### 文 献

- 1) Carlsen E, Givercman A, Keiding N, Skakebaek NE: Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br Med J* 305, 609-613 (1992)
- 2) Albro PW, Chapin RE, Corbett JT, Schroeder J, Phelps JL: Mono-2-ethylhexyl phthalate, a metabolite of di-(2-ethylhexyl) phthalate, causally linked to testicular atrophy in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 100, 193-200 (1989)
- 3) Dostal LA, Chapin RE, Stefanski SA, Harris MW, Schwetz BA: Testicular toxicity and reduced Sertoli cell numbers in neonatal rats by di(2-ethylhexyl) phthalate and the recovery of fertility as adults. *Toxicol Appl Pharmacol* 95, 104-121 (1988)
- 4) Li LH, William H, Jester Jr, Orth JM: Effects of relatively low levels of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on cultured Sertoli cells and gonocytes from neonatal rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 153, 258-265 (1998)
- 5) Lee J, Richburg JH, Boekelheide K: Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both Sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicol Appl Pharmacol* 137, 42-50 (1996)
- 6) Lee J, Richburg JH, Younkin C, Boekelheide K: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138, 2081-2088 (1997)
- 7) Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K: The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140, 852-858 (1999)
- 8) Gavrieli Y., Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501 (1992)
- 9) 小路武彦：精巣機能とアポトーシス。ホルモンと臨床45, 19-26 (1997)

**Title:** Immunohistochemical and TUNEL detection of apoptosis in mouse testis after administration of diethylhexyl phthalate.

**Author:** Takao Ichimura<sup>1,2)</sup>, Maki Kawamura<sup>1)</sup>, Yoko Yoshida<sup>1)</sup> & Nao Arai<sup>2)</sup> (Graduate School<sup>1)</sup> and School of Nursing<sup>2)</sup>, Yamaguchi Prefectural University)

**Abstract:**

Expression of FasL and Fas, as well as DNA fragmentation were examined in 4 weeks mouse testis 12 hours after oral administration of diethylhexyl phthalate. FasL and Fas were examined by immunocytochemistry, and DNA fragmentation was detected by TUNEL method. Intact nucleus was counterstained by propidium iodide. Immunoreactivity to Fas was detected on the periphery of spermatids, while FasL immunoreactivity was found along Sertoli cell cytoplasm. These immunoreactive cells were accumulated in close association to TUNEL-positive cells with fragmented DNA. This correlated distribution of cells expressing Fas or FasL and cells with fragmented DNA suggests a possible scenario of apoptosis induced by diethylhexyl phthalate.

**Key words:** apoptosis, testis, phthalate, TUNEL, Fas

---