

原 著 奨励賞受賞発表論文**低用量フタル酸エステル曝露による
自己免疫性精巣炎への影響**

○寺山隼人¹⁾、伊藤正裕²⁾、平井宗一²⁾、内藤宗和³⁾、曲寧²⁾、倉升三幸²⁾、小川夕輝²⁾、
畑山直之²⁾、林省吾²⁾、平柳淑恵²⁾、隅山香織¹⁾、金沢輝久¹⁾、坂部貢¹⁾

1) 東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学

2) 東京医科大学人体構造学分野

3) 愛知医科大学医学部解剖学講座

**Effect of low-dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)
exposure to testicular autoimmunity in mice**

Hayato Terayama^{a)*}, Masahiro Itoh^{b)}, Shuichi Hirai^{b)}, Munekazu Naito^{c)},
Ning Qu^{b)}, Miyuki Kuramasu^{b)}, Yuki Ogawa^{b)}, Naoyuki Hatayama^{b)},
Shogo Hayashi^{b)}, Yoshie Hirayanagi^{b)}, Kaori Suyama^{a)},
Teruhisa Kanazawa^{a)}, and Kou Sakabe^{a)}

a) Department of Anatomy, Division of Basic Medicine, Tokai University School of Medicine

b) Department of Anatomy, Tokyo Medical University

c) Department of Anatomy, Aichi Medical University

要約

フタル酸エステル (Di-(2-ethylhexyl) phthalate : DEHP) の曝露により誘導される、酸化ストレスやアジュバント効果の影響により、精子形成障害が引き起こされることが報告されている。我々は、精子形成障害が誘導されない低用量の DEHP の曝露であっても、精巣内の免疫環境が変化していることを報告している。成熟精子は免疫系が既に確立された思春期以降に精細管内に出現するため、免疫系から異物として認識される様々な自己抗原を含んでいる。一方で、セルトリ細胞で構成される血液-精巣関門 (Blood-Testis Barrier : BTB) により、これらの自己抗原は免疫系の攻撃から守られている。以前、我々は、同系のマウスから精巣生殖細胞 (Testicular Germ Cell : TGC) の皮下注射を1回するだけでは明らかな精子形成障害が誘導できないが、2回以上皮下注射する事でリンパ球の浸潤と精子形成障害を特徴とする実験的自己免疫性精巣炎 (Experimental Autoimmune Orchitis : EAO) が誘導されることを示した。本研究は、低用量 DEHP 曝露が EAO 発症に及ぼす影響を解析した。

受付：平成27年9月2日 採用：平成27年9月3日

別刷請求宛先：寺山隼人

〒259-1193 神奈川県伊勢原市下糟屋143 東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学

Reprint Requests to Hayato Terayama, 143 Shimokasuya, Isehara-si, Kanagawa, 259-1193, Japan. Department of Anatomy, Division of Basic Medicine, Tokai University School of Medicine

実験動物は10週齢A/Jマウスを用いた。実験群は① Control群：通常の食餌、② DEHP群：0.01%DEHP含有食餌、③ TGC群：通常の食餌 + TGCの1回皮下注射、④ DEHP + TGC群：0.01%DEHP含有食餌 + TGCの1回皮下注射、の4群とした。注射から8週間後に安楽死させ、精巣と血清の解析を行った。解析方法は組織化学染色 (HE染色、HRP染色)、免疫組織化学染色 (F4/80、IFN- γ 、血清抗体)、Real-time PCR (F4/80、IFN- γ)、ELISA (血清IgG) を用いた。

TGC群は、精子形成障害が誘導されないが、精巣内への僅かなリンパ球浸潤、IFN- γ mRNAの上昇、精子・精子細胞に対する自己抗体の出現が認められた。DEHP群は、TGC群の障害に加え、HRPの精細管内への侵入やセルトリ細胞の空胞化が観察され、BTBの障害が認められた。さらに、DEHP + TGC群は、重度のEAOの誘導、精子・精子細胞に対する自己抗体の出現、HRPの精細管への侵入が観察され、他群と比較して、F4/80 mRNA、IFN- γ mRNA、自己抗体の上昇が認められた。本研究にて、精子形成障害をきたさない量のDEHP曝露であっても、BTBが障害され、自己免疫性精巣炎が誘導されやすい状態になっていることが明らかになった。

(臨床環境 24 : 48 - 57, 2015)

《キーワード》フタル酸エステル、低用量曝露、マウス、実験的自己免疫性精巣炎

Abstract

Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) induces spermatogenic disturbance (SD) through oxidative stress, and affects the immune system by acting as an adjuvant. Recently, we reported that a low dose of DEHP, which does not affect spermatogenesis, was able to alter the testicular immune microenvironment. Experimental autoimmune orchitis (EAO), an organ-specific autoimmunity of the testis, can be induced by repeated immunization with testicular antigens, and its pathology is characterized by the appearance of autoantibodies and SD. In the present study, we investigated the effect of low-dose DEHP on EAO susceptibility. The results showed that exposure to 0.01% DEHP-containing food caused a little functional damage to the blood-testis barrier with an increase of interferon gamma and resulted in the appearance of serum autoantibodies targeting haploid cells, but did not affect the spermatogenic state in mice. While only one immunization with testicular antigens caused very mild EAO, DEHP exposure after one immunization with testicular antigens induced severe EAO with significant increases in macrophages, interferon gamma, lymphocytic infiltration, and serum autoantibodies, accompanied by severe SD. Therefore, exposure to low-dose DEHP alone does not induce significant SD; however, it can cause an increase of interferon gamma and a little functional damage of the blood-testis barrier in the testis with leading to an autoimmune response against haploid cells autoantigens, resulting in increased susceptibility to EAO. (Jpn J Clin Ecol 24 : 48 - 57, 2015)

《Key words》di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Low-dose, mouse, experimental autoimmune orchitis (EAO)

I 緒言

Nielsenらは、「環境汚染物質の曝露は免疫系に影響を与える。」と提唱した¹⁾。合成ポリマープラスチックの可塑剤として広く使用されているDi-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) は、免疫応答を促進する生体異物としての性質を有している²⁾。DEHP自体は免疫原性抗原ではないが、マウスに

において免疫原性活性を増強することができ、そのため、DEHPはアジュバント作用を有する⁽³⁻⁷⁾。また、DEHPへの曝露はマウスおよびラットにおける精子形成障害を惹起し、精巣の萎縮を引き起こす⁽⁸⁻¹³⁾。いくつかの研究では、DEHPは代謝により最初 mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) に加水分解され、その後は複雑な代謝過程を経る。

その代謝過程で酸化ストレスによる精子形成障害の誘導が報告されている^(8,13)。さらに生殖細胞の支持細胞であるセルトリ細胞の細胞質に小空胞が発生する事が報告され、血液-精巣関門 (Blood Testis Barrier: BTB) のタイトジャンクションの形態学的変化が生ずる可能性が示唆されている⁽¹⁴⁾。最近我々は精子形成障害が誘導されない程度の低濃度DEHP曝露マウスにおいて、セルトリ細胞に小空胞を出現させ、BTBへダメージを与え、リンパ球浸潤に伴い、インターフェロン γ (IFN- γ) の mRNA 発現上昇など精巣の微小環境が変化する事を報告した⁽¹⁵⁾。

精子・精子細胞は免疫系の成熟後に精細管内に出現してくるため、発達段階において新生児免疫寛容が誘導されず、体細胞と時期的なずれが生じている。そのため、宿主にとって異物と認識され、精子・精子細胞抗原に対する自己免疫性炎症が起きやすいと考えられている。一方、通常はセルトリ細胞同士の間で構成されるBTBにより精子・精子細胞は免疫系から隔離されていると推察されている。しかし、精巣マクロファージの分布や管上皮細胞による精子貪食機構などの報告により、精子・精子細胞は免疫系に認識されているが、自己拒絶が引き起こらない程度に何らかの免疫学的抑制機構が働いている可能性がある^(16,17)。実験的自己免疫性精巣炎 (EAO) は、IFN- γ の増加、BTB の破綻および精子形成障害に伴いマクロファージやリンパ球が浸潤することで引き起こされる自己免疫原性の精巣機能障害である。最近の研究において、自己免疫性精巣炎が主な男性不妊の原因の一つとして提案されている^(18,20)。したがって、EAO は特発性男性不妊症の慢性炎症モデルである⁽²¹⁾。DEHP は男性生殖および免疫微小環境の両方に影響を有するため、比較的低用量のDEHPを投与することでEAOの誘導を促進させる可能性が考えられる。本研究の目的は、DEHP曝露がEAOに対する感受性に影響を与えるかどうか調査することである。

II 対象と方法

1, 実験動物

動物は9週齢 A/J マウスの雄 (Charles River laboratories Japan, Kanagawa, Japan) を購入し、その後1週間東京医科大学の動物実験センターにて飼育したものを実験に用いた。マウスは室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間ごとの明暗周期の条件下で飼育し、固形飼料ならびに水を自由摂取させた。なお、本研究で行う動物実験については動物実験の倫理性と安全性を確保するために、日本学術会議作成の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に則り、東京医科大学動物実験委員会の承認を得て行った。

2, 化学物質

気液クロマトグラフィーにて98%の化学純度である Bis (2-ethylhexyl) Phthalate (DEHP) (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いた。マウスに投与する飼料 CLEA Rodent Diet CE-2 (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan) を購入し、0.01% DEHP 含有 CE-2飼料を作製した (Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan)。今回使用した0.01% DEHP 含有 CE-2飼料は0.0113から0.0133mg/g/日の量に当たり、マウスにおける DEHP の NOAEL (no-observed-adverse-effect level) 値と同等である⁽²²⁾。また、以前の我々の実験では、0.01% DEHP 投与群と対照群との間の食物および水の摂取量における有意差はなかった⁽¹⁵⁾。さらに、0.01% DEHP 投与群と対照群との間の体重および精巣重量における有意差はなかった⁽¹⁵⁾。

3, 精巣生殖細胞 (Testicular Germ Cell: TGC) の単離

EAO の誘導 (n=8) および ELISA (n=6) で必要な TGC を準備するため、10週齢 A/J マウスの雄を安楽死後、精巣を摘出し、Hanks' balanced salt solution (HBSS) 上でステンレスメッシュにて単離し、遠心 (400g・10分間) を行った⁽²³⁾。

4, 実験方法

以前、我々はアジュバントを使用せずに 1×10^7 個の TGC のみを2週間おきに2回皮下注射し、高率に EAO を誘導できる事を報告した^(19, 23)。さら

に TGC を繰り返し皮下注射すればするほど、より確実に EAO を誘導することが出来るが、1回 TGC を皮下注射しただけでは、EAO を誘導できる可能性が低くなる⁽²³⁾。したがって、本研究では、低用量 DEHP 曝露が EAO 誘導を促進できるかどうか調べるため、TGC をマウスに1回皮下注射することを選択した。

実験方法として、CE-2飼料投与群に HBSS (0.2ml) を1回皮下注射した群 (Control群: n=8)、0.01% DEHP 含有 CE-2飼料投与に HBSS を1回皮下注射した群 (DEHP群: n=8)、CE-2飼料投与群に TGC (1×10⁷個/0.2ml) を1回皮下注射した群 (TGC群: n=8)、0.01% DEHP 含有 CE-2飼料投与に TGC を1回皮下注射した群 (DEHP + TGC群: n=8)、の4群にマウスを分け、10週齢から18週齢までの8週間自由給餌および水を自由摂取させた。18週齢にてソムノペンチル (Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) による深麻酔下にて心採血後、開腹処置を行い、精巣を摘出した。

5, 組織化学的観察

Control群 (n=4)、DEHP群 (n=4)、TGC群 (n=4) および DEHP + TGC群 (n=4) から摘出した精巣をブアン液にて3日間固定した。その後、常法通りにエタノールで脱水し、プラスチック包埋 (Technovit 7100, Kulzer社) を行った。5μm の切片をマイクロトーム (HN-360; Microme社) にて作製し、ヘマトキシリンと2% エオジンにて染色 (HE染色) を行い光学顕微鏡で観察した。各群の4検体から得られた HE 染色組織切片を観察し計測を行った。精子形成障害の判定にはジョンソンスコアを用いた。1検体あたり無作為に選んだ精細管100個をスコア1 (繊維成分のみで細胞組織なし) からスコア10 (完全な造精機能や精細胞層が厚く正しく配列し、内腔があり数多くの精子を認める) に分類し、判定を行った^(15, 24)。リンパ球の測定は、1検体あたり無作為に5箇所間の精巣間質を選択し、間質1mm²あたりに含まれるリンパ球数を数えた⁽¹⁵⁾。

6, 免疫組織学的観察

a) F4/80および IFN-γ

Control群 (n=4)、DEHP群 (n=4)、TGC群 (n=4) および DEHP + TGC群 (n=4) から摘出した精巣を OCT コンパウンドで包埋後、迅速液体窒素で凍結、厚さ5μm の切片をクリオスタット (HM-550; Microme社) にて作製した後、IFN-γ の染色には -20℃ のアセトンで2分間固定し風乾したものを用いた。また、F4/80の染色には95%アルコールにて10分間固定し風乾したものをを用いた。組織切片は、非特異的染色を防止するためにブロックエース (DS Pharma Biomedical Co., Ltd., Osaka, Japan) 10分、内因性ペルオキシダーゼ反応の除去に0.3% 過酸化水素水・メタノール溶液30分、Protain Block, Serum-Free (Dako, Glostrup, Denmark) で20分ブロッキングしたのち1次抗体および陰性対照には1% BSA 添加 PBS を用い、室温で2時間反応させた。2次抗体としてビオチン化抗 IgG 抗体 (Vector Laboratories, California, USA) を室温で30分間反応させた。その後、VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector laboratories, California, USA) を室温30分間反応させ、DAB Substrate Kit (Vector laboratories, California, USA) を用い室温で5分間反応させ発色し、光学顕微鏡で観察した。1次抗体としてラット抗 F4/80 抗体 (macrophage marker, 1:500 dilution, Abcam, Cambridge, UK)、ラット抗 IFN-γ 抗体 (1:100 dilution, Calbiochem, Darmstadt, Germany) を用いた。また2次抗体はビオチン化抗ラット IgG 抗体 (VECTASTAIN Elite ABC kit, Vector laboratories, California, USA) を用いた。

b) 自己抗体

10週齢 A/J マウス (n=3) からから摘出した精巣を OCT コンパウンドで包埋後、迅速液体窒素で凍結、厚さ5μm の切片をクリオスタットにて作製した後、-20℃ の95% エタノールで10分間固定し風乾した。組織切片は、組織切片は、非特異的染色を防止するためにブロックエース10分、内因性ペルオキシダーゼ反応の除去に0.3% 過酸化水素水・メタノール溶液30分、Protain Block, Serum-Free で20分ブロッキングしたのち1次抗体および陰性対照には1% BSA 添加 PBS

を用い、室温で2時間反応させた。Horseradish Peroxidase (HRP) 標識二次抗体 (抗マウス IgG 抗体) に室温で30分間反応後、DAB Substrate Kit を用い室温で5分間反応させ発色し、光学顕微鏡で観察した。1次抗体として Control 群 (n=4)、DEHP 群 (n=4)、TGC 群 (n=4) および DEHP + TGC 群 (n=4) の血清 (1:50 dilution) を用いた。

7, Real time RT-PCR

Control 群 (n=4)、DEHP 群 (n=4)、TGC 群 (n=4) および DEHP + TGC 群 (n=4) より摘出した精巣をそれぞれ RNA 抽出 kit である TRIzol (Invitrogen, Tokyo, Japan) を用い、手順は同社のマニュアルに従い RNA 抽出を行った。吸光度を測定した後、High Capacity cDNA Archive Kit (PE Applied Biosystems, California, USA) を用い、手順は同社のマニュアルに従い逆転写を行った。また逆転写反応には iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, California, USA) を使用し、検体は使用時まで -80°C にて保管した。Real-time RT-PCR 解析を用いて、マウスの IFN- γ (3' -tgaacgctacacatgcatcttc-5', 3' -cgactcctttccgcttctctgag -5'), F4/80 (3' -ctttggctatgggcttccagtc-5', 3' -gcaaggagacagagtttatcgtg -5') と内部標準物質である Glyceraldehyde 3-phosphate (GAPDH) (3' -tgtgtcctgctggatctga-5', 3' -ttgctgttgaagtcgagag-5') を測定した。Real-time PCR は SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa) および Thermal Cycler Dice Real-Time System TP800 (TaKaRa) を使用し、 $2\Delta\Delta Ct$ (comparative Ct method) 法で行った。なお、各遺伝子の発現量は、内部標準 (GAPDH) の発現量により補正した後、対照群と比較し、その発現比を算出した。

8, HRP

BTBの状態を検証するため、トレーサーである horseradish peroxidase (HRP:10mg/mouse、SIGMA 社) を生理食塩水0.2ml に溶解して、Control 群 (n=4)、DEHP 群 (n=4)、TGC 群 (n=4) および DEHP + TGC 群 (n=4) に腹腔内注射した。30分後にソムノペンチル麻酔下で2%パラホルムアルデヒド -0.1M リン酸緩衝液

(pH7.4, 4°C) での灌流固定を行い、さらに1%パラホルムアルデヒド -0.1M リン酸緩衝液 (pH7.4, 4°C) で1時間浸漬固定した。次に、10%スクロース加 PBS 溶液で1時間、20%スクロース加 PBS 溶液で1時間、30%スクロース加 PBS 溶液で1時間、固定組織の洗浄を行った。OCT コンパウンド包埋後、迅速液体窒素で凍結、厚さ5 μ m の切片を作製した。1時間風乾の後、0.01% H_2O_2 含有 0.1% ジアミノベンチジン -50mM トリス緩衝液 (pH7.6) で発色し、光学顕微鏡で観察した。

9, ELISA

単離した TGC を carbonate-bicarbonate buffer (Sigma) 中でホモジネーションを行い、microtiter plate (Nunc 96 micro-well plate; Thermo Fisher Scientific, Kanagawa, Japan) のウェルに分注後、37°C で30分インキュベーションした。coating solution を分注後、PBS-Tween 20で3回洗浄した。ラビット抗 GAPDH 抗体 (housekeeping gene; Bethyl Laboratories, Inc., TX, USA; 1/200 ~1/1000 dilution) に1% ヤギ血清を添加した PBS で血清を連続的に希釈し、GAPDH 抗体および希釈血清をウェルに200 μ L 分注後、2時間室温でインキュベーションした。さらに、PBS-Tween 20で5回洗浄後、HRP 標識ヤギ抗ラビット IgG 抗体 (Cappel, PA, USA; 1:1000)、anti-GAPDH antibody、HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Cappel, PA, USA; 1:1000) を20 μ L 分注し、2時間室温でインキュベーションした。ウェルを PBS-Tween20で5回洗浄した後、pNPP 溶液 (Alkaline Phosphatase Yellow) を200 μ L ずつ各ウェルに添加し、30分室温でインキュベーションした。測定は microtiter plate reader (NJ-2300, Nalge, Tokyo, Japan) を用いて吸光度450 nm にて行った⁽²⁵⁾。

10, 統計

統計解析は Microsoft Excel (Microsoft 社) を用いて行った。各種測定値は平均値 \pm 標準偏差で表し、t 検定にて統計学的に解析した。有意水準は0.05以下とした。

III 結果

Control 群、DEHP 群、TGC 群および DEHP

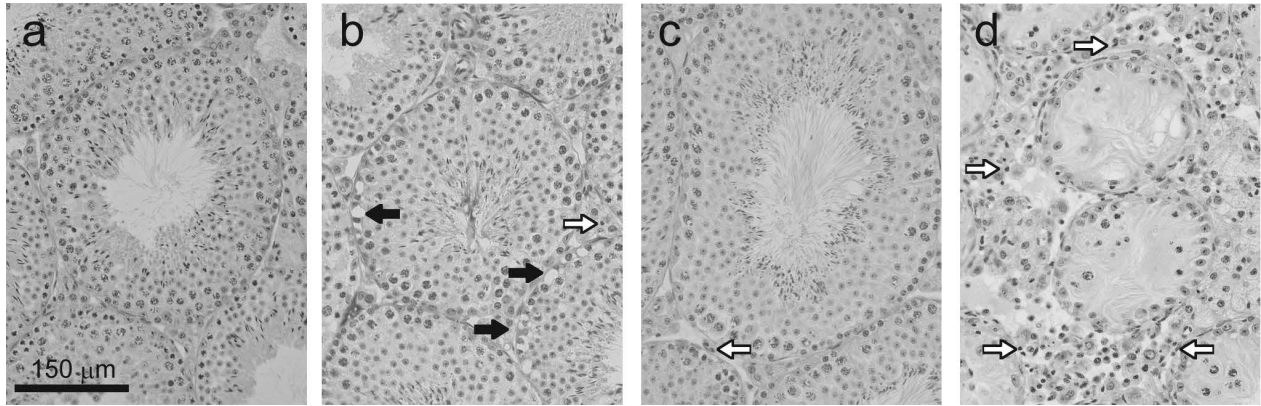


図1. Images of testicular sections stained with hematoxylin and eosin (a, b, c, and d) in the control (a), DEHP (b), TGC (c), and DEHP+TGC (d) groups. Black arrows indicate vacuoles in the cytoplasm of the Sertoli cells. White arrows indicate infiltrating lymphocytes. Note the spermatogenic disturbance with many infiltrating lymphocytes in d. 文献42を改変

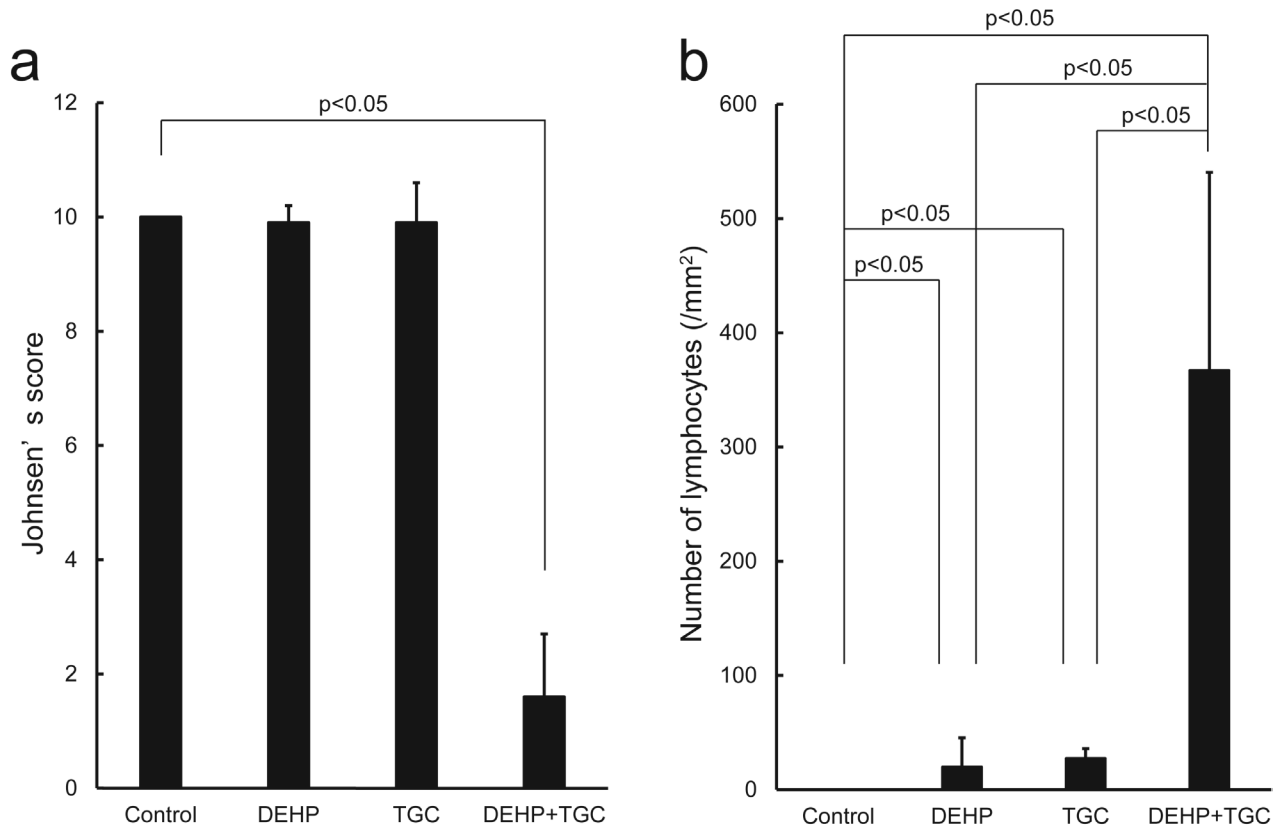


図2. The grade of spermatogenic disturbance (a) and lymphocytic infiltration (b) in the control, DEHP, TGC, and DEHP+TGC groups. The number of lymphocytes in 1mm^2 testicular interstitium. The mean \pm SD of 4 mice per group is shown in each column. 文献42を改変

+ TGC 群の病理組織学的評価は、図1および図2に示す。DEHP 群はいくつかの精細管中に生殖細胞の脱落およびセルトリ細胞の細胞質の小空胞形成を認め (図1b)、精巢間質に少数のリンパ球を認めた (図1b、図2b)。TGC 群の4匹中1匹は

間質ではなく精巢白膜に若干のリンパ球浸潤を認めたが、残りの3匹は白膜および間質 (図1c、図2b) にリンパ球浸潤は認められなかった。対照的に、DEHP+ TGC 群はすべてのマウスに重度の精子形成障害と間質にリンパ球浸潤が認められ

た(図1d、図2b)。DEHP+ TGC群の精子形成障害とリンパ球浸潤はControl群、DEHP群およびTGC群に比べ優位に高かった(図2)。

F4/80陽性マクロファージは、Control群、DEHP群、TGC群およびDEHP + TGC群の間質に認められ、特にDEHP+ TGC群では、多くのF4/80陽性マクロファージが精子形成障害のある精細管周囲の間質において観察された。IFN- γ は、Control群、DEHP群、TGC群およびDEHP + TGC群のセルトリ細胞と間質の細胞で検出され、特にDEHP+ TGC群では、間質中の炎症性細胞と関連して広範囲に検出された。

精巣中のF4/80 mRNA発現は、Control群およびDEHP群と比較してDEHP+ TGC群で優位に増加した。また、精巣中IFN- γ mRNA発現は、Control群と比較してDEHP群、TGC群およびDEHP + TGC群で有意に増加し、さらに、DEHP+ TGC群では、DEHP群およびTGC群と比較して顕著に増加した。

トレーサーとしてHRPを用いた解析では、Control群およびTGC群の精細管の管腔内に検出されなかった。しかし、DEHP群およびDEHP + TGC群では、いくつかの精細管の管腔内にHRPが検出され、BTBを超えて精細管の内腔に浸潤していることがわかった。

Control群の血清中に精巣細胞に対する自己抗体の存在は確認出来なかった。しかしながら、DEHP群、TGC群およびDEHP + TGC群血清中には、精子細胞および精巣の精子・精子細胞に対する自己抗体が存在する事がわかった。ELISA分析において、DEHP群およびTGC群のTGCに対する抗体価はControl群に比べて有意に増加した。さらに、DEHP+ TGC群では、他の3群と比較してTGCに対する抗体価は顕著に増加した。

IV考察

本研究において、低用量DEHP曝露は精子形成に影響を与えることはないが、セルトリ細胞の障害や精子・精子細胞に対する血清自己抗体の増加を示し、BTBの機能障害を引き起こすことが示された。さらに、TGCを一回皮下注射するだ

けではEAOを誘導することは難しいが、同時に低用量DEHP曝露する事によって、EAOを増悪させることがわかり、低用量DEHP曝露はEAO感受性を増加させることが示された。

セルトリ細胞同士の連結で構成されるBTBによって自己抗原性の強いTGCは全身の免疫系から守られている。そのセルトリ細胞がマウスやラットの実験において、DEHPやMEHPの毒性の主な標的となっていることが報告されている^(26, 27)。DEHPやMEHPはBTBの細胞接着関連分子であるclaudin-11、Cx43、ZO-1などを発現低下させ生殖細胞の脱落を誘導する⁽²⁸⁾。また、MEHPの曝露は隣接するセルトリ細胞間のタイトジャンクションのリモデリングに関係するmatrix metalloproteinase 2活性の調節を行っているtissue inhibitor of metalloproteinase-2発現を低下させることも報告されている⁽²⁹⁾。一方、DEHP自体の免疫原性はないが、アジュバントとして作用することが多く報告されている⁽³⁷⁾。我々は低用量DEHP曝露が精子形成に影響を与えないことを示したが、BTBの機能的障害や精子・精子細胞に対する血清抗体の出現を明らかにした。さらに、リンパ球浸潤やIFN- γ の発現など初期段階におけるEAOの重要なpathological mediatorがDEHP群で優位に増加した。このことはBTBから半数体生殖細胞中の自己抗原の漏出により、精巣の自己免疫反応性が増加したことを示している。

精巣ホモジネートの皮下注射により抗精子抗体の産生などの自己免疫反応が生じるのは以前より知られていたが、それだけでは精巣の免疫抑制機構を打ち破ることができないため、マウスにおいては、精巣ホモジネートに結核死菌を含んだcomplete Freund's adjuvant (CFA)を混合させ、さらに百日咳死菌(BP)静注の追加などで免疫増強することによりEAOを誘導するのが従来の方法であった⁽³⁰⁻³²⁾。しかし、精巣ホモジネートとCFAを混合して注射すると精子・精子細胞抗原のみならず、精粗細胞、精母細胞、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞や精細管基底膜などに対する自己免疫応答までもが誘導されるので、かな

り人工的な疾患モデルという要素がある⁽³³⁻³⁶⁾。我々は、マウスにおいて、精巣ホモジネートでなく分離したばかりの生きた同系精巣細胞の二回皮下注射によって、CFAやBPを用いずに精巣への炎症細胞浸潤や精子・精子細胞のみに対する抗体出現などをともなうEAOを高い発症率で誘導させたことを報告している^(21, 23)。また、我々は精巣抗原ではなくCFAとBPのみを免疫したマウスにおいてセトリ細胞や精子・精子細胞に対する抗体が血清中に存在することを報告し⁽³⁷⁾、CFAやBPなどのアジュバント(免疫増強剤)自身が自己免疫性抗原だけでなく、他の精巣細胞に対する精巣自己免疫反応性を促進することを明らかにした。本研究では、実験群(DEHP群、TGC群およびDEHP+TGC群)すべてにおいて精子・精子細胞に対する自己抗体のみが検出された。つまり、精子・精子細胞以外の他の精巣細胞に対する抗体が検出されないことから、低用量DEHP曝露によるアジュバント効果が自己免疫反応を強く高めることはないことが示唆された。

近年、アレルギー疾患に対してDEHPが影響しているという報告がされ始めている^(7, 38-40)。疫学研究において、Bornehagら⁽³⁸⁾はDEHP曝露が子供の喘息・喘鳴・鼻炎の有病率の上昇と関係していると報告した。また、チリ中のダニアレルゲンとDEHP曝露のマウス実験において、高野ら⁽⁷⁾はヤケヒョウヒダニを用いて、アトピー性皮膚炎のような皮膚病変の臨床スコアは肥満細胞の増加に伴い悪化すると報告した。本研究では、低用量DEHP曝露はBTBを超えて半数体生殖細胞中の自己抗原の漏出やBTBの機能的な損傷によって精巣自己免疫反応の感受性の増加に繋がることがわかった。したがって、精巣は他の臓器と比較し、DEHPの自己免疫障害の重要なターゲット臓器の一つであることがわかった。

精巣における環境汚染物質の免疫系への影響を調査するには、自己抗原に対する免疫反応を重要な因子として考慮する必要がある。最近、我々はカドミウム曝露が精巣免疫微小環境を変化させ、EAO感受性を増加させることを報告した⁽⁴¹⁾。それゆえ、DEHPやカドミウム以外の免疫系に作

用する環境汚染物質もEAOの感受性を高める可能性がある。今後は、精巣毒性を有するdichloro diphenyl trichloroethane、pentachlorophenol、dieldrin、dinitrobenzene、tert-octylphenolなどの環境毒性物質を用いて、精巣自己免疫反応を促進するかどうか検討したい。

利益相反

本研究の内容に関連して開示すべき利益相反事項はありません。

謝辞

稿を終えるにあたり、東海大学医学部基礎医学系生体構造機能学領域の田中理先生、古谷祐生子秘書および東京医科大学人体構造学講座の小山耕一助手、河田晋一助手、桑名慶子書記、阿保亜希子書記のご協力・ご支援に深く謝意を表します。また、本研究内容の一部は科学研究費・基盤研究C(26460809、25340050)の助成を受け、文献42の内容および図表に加筆・修正・改変したものです。第23回日本臨床環境医学会学術集会において奨励賞を頂き、大変光栄に存じます。高野裕久大会長はじめ、学会関係者の先生方に感謝申し上げます。

文献

- 1) Nielsen GD, Larsen ST, et al. Do indoor chemicals promote development of airway allergy? *Indoor Air* 17: 236-255, 2007
- 2) Thomas JA, Darby TD, et al. A review of the biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol.* 45: 1-27, 1978.
- 3) Hansen JS, Larsen ST, et al. Adjuvant effects of inhaled mono-2-ethylhexyl phthalate in BALB/cJ mice. *Toxicology* 232: 79-88, 2007
- 4) Larsen ST, Hansen JS, et al. Adjuvant and immunosuppressive effect of six monophthalates in a subcutaneous injection model with BALB/c mice. *Toxicology* 169: 37-51, 2001
- 5) Larsen ST, Lund RM, et al. Adjuvant effect of di-n-butyl-, di-n-octyl-, di-isoo-nonyl- and di-isoo-decyl phthalate in a subcutaneous injection model using BALB/c mice. *Pharmacol Toxicol* 91: 264-272, 2002
- 6) Larsen ST, Hansen JS, et al. Airway inflammation and adjuvant effect after repeated airborne

- exposures to di-(2-ethylhexyl)phthalate and ovalbumin in BALB/c mice. *Toxicology* 235: 119–129, 2007
- 7) Takano H, Yanagisawa R, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate enhances atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Environ Health Perspect* 114: 1266–1269, 2006
 - 8) Albro PW, Thomas RO. Enzymatic hydrolysis of di-(2-ethylhexyl) phthalate by lipases. *Biochim Biophys Acta* 306: 380–390, 1973
 - 9) Daniel JW, Bratt H. The absorption, metabolism and tissue distribution of di(2-ethylhexyl)phthalate in rats. *Toxicology* 2: 51–65, 1974
 - 10) Gray TJ, Butterworth KR, et al. Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Food Cosmet Toxicol* 15: 389–399, 1977
 - 11) Gray TJ, Gangolli SD. Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters. *Environ Health Perspect* 65: 229–235, 1986
 - 12) Oishi S. Effects of co-administration of di(2-ethylhexyl)phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Arch Toxicol* 63: 289–295, 1989
 - 13) Oishi S. Effects of phthalic acid esters on testicular mitochondrial functions in the rat. *Arch Toxicol* 64: 143–147, 1990
 - 14) Tay TW, Andriana BB, et al. An ultrastructural study on the effects of mono(2-ethylhexyl) phthalate on mice testes: cell death and sloughing of spermatogenic cells. *Okajimas Folia Anat Jpn* 83: 123–130, 2007
 - 15) Kitaoka M, Hirai S, et al. Effects on the local immunity in the testis by exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in mice. *J Reprod Dev* 59: 485–490, 2013
 - 16) Itoh M, Terayama H, et al. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *J Reprod Immunol* 67: 57–67, 2005
 - 17) Naito M, Itoh M. Patterns of infiltration of lymphocytes into the testis under normal and pathological conditions in mice. *Am J Reprod Immunol* 59: 55–61, 2008
 - 18) Duan Y-G, Yu C-F, et al. Immunodeviation towards a Th17 immune response associated with testicular damage in azoospermic men. *Int J Androl* 34: e536–45, 2011
 - 19) Naito M, Hirai S, et al. Postinflammation stage of autoimmune orchitis induced by immunization with syngeneic testicular germ cells alone in mice. *Med Mol Morphol* 45: 35–44, 2012
 - 20) Schuppe H-C, Meinhardt A, et al. Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility? *Andrologia* 40: 84–91, 2008
 - 21) Naito M, Terayama H, et al. Experimental autoimmune orchitis as a model of immunological male infertility. *Med Mol Morphol* 45: 185–189, 2012
 - 22) David RM, Moore MR, et al. Chronic toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in mice. *Toxicol Sci* 58: 377–385, 2000
 - 23) Itoh M, Hiramane C, et al. A new murine model of autoimmune orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells alone. I. Immunological and histological studies. *Clin Exp Immunol* 83: 137–142, 1991
 - 24) Johnsen SG. Testicular biopsy score count-A method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2–25, 1970
 - 25) Hirai S, Naito M, et al. Serum autoantibodies in mice immunized with syngeneic testicular germ cells alone. *Am J Reprod Immunol* 70: 509–517, 2013
 - 26) Sjöberg P, Bondesson U, et al. Kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate in immature and mature rats and effect on testis. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 56: 30–37, 1985
 - 27) Sjöberg P, Lindqvist NG, et al. Age-dependent response of the rat testes to di(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Perspect* 65: 237–242, 1986
 - 28) Sobarzo CM, Lustig L, et al. Effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on gap and tight junction protein expression in the testis of prepubertal rats. *Microsc Res Tech* 72: 868–877, 2009
 - 29) Yao P-L, Lin Y-C, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate-induced disruption of junctional complexes in the seminiferous epithelium of the rodent testis is mediated by MMP2. *Biol Reprod* 82: 516–527, 2010
 - 30) Sato K, Hirokawa K, et al. Experimental allergic orchitis in mice. histopathological and immunological studies. *Virchows Arch (Pathol Anat)* 392: 147–158, 1981
 - 31) Kohno S, Munoz J, et al. Immunopathology of murine experimental allergic orchitis. *J Immunol*

- 130: 2675-2682, 1983
- 32) Itoh M, Hiramane C, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detecting antisperm antibodies in mice with testicular autoimmunity. *Am J Reprod Immunol* 21: 9-15, 1989
 - 33) Ichisohasama R, Hirokawa K, et al. Spermatogenic disturbance induced in mice by combined local injection of monoclonal antibodies to Sertoli cell and to basal lamina of seminiferous tubule. *Am J Reprod Immunol* 10: 158-165, 1986
 - 34) Yule TD, Montoya GD, et al. Autoantigenic germ cells exist outside the blood testis barrier. *J Immunol* 141: 1161-1167, 1988
 - 35) Tung PS, Fritz IR. Histopathological changes in testes of adult inbred rats immunized against pachytene spermatocytes or Sertoli cells. *Int J Androl* 2: 459-481, 1987
 - 36) Lustig L, Satz ML, et al. Antigens of the basement membrane of the seminiferous tubules induce autoimmunity in Wistar rats. *J Reprod Immunol* 4: 79-90, 1982
 - 37) Musha M, Hirai S, et al. The effects of adjuvants on autoimmune responses against testicular antigens in mice. *J Reprod Dev* 59: 139-144, 2013
 - 38) Bornehag CG, Nanberg E. Phthalate exposure and asthma in children. *Int J Androl* 33: 333-345, 2010
 - 39) Hsu N-Y, Lee C-C, et al. Predicted risk of childhood allergy, asthma, and reported symptoms using measured phthalate exposure in dust and urine. *Indoor Air* 22: 186-199, 2012
 - 40) Yao P-L, Lin Y-C, et al. TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod* 80: 581-589, 2009
 - 41) Ogawa Y, Itoh M, et al. Cadmium exposure increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. *J Appl Toxicol* 33: 652-660, 2013
 - 42) Hirai S, Naito M, et al. Low-dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) exposure increases susceptibility to testicular autoimmunity in mice. *Reprod Biol* 15: 163-171, 2015