

博士（医学）足立祐二

学位論文題名

ラットにおける正常および実験的停留精巣内グルタチオン
S-トランスフェラーゼの免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

I はじめに

グルタチオンS-トランスフェラーゼ (glutathions S-transferase : GST) は、精巣では Leydig 細胞と精細管に局在しているといわれている。この研究では、未熟な精巣および停留精巣内での GST の動きを理解するため、ヒト腎から精製した GST に対するポリクロナール抗体を用いて、ラットの出生日から成熟期までの正常および実験的停留精巣を酵素抗体法で染色し観察した。この染色で明瞭に染色される Leydig 細胞の量の変化も、計量形態学的に追求した。また、実験的停留精巣は、ヒトの先天的停留精巣とも比較するために、生後 1 週の早期に精巣導帯の切断法により作成した。

II 材料と方法

総計60匹の Wistar 系ラットを用いた。正常精巣群は36匹で、出生日と生後 1, 2, 3, 4, 6, 8, 14, 20週に 4 匹ずつ屠殺し、両側の精巣を摘出した。停留精巣群は24匹で、生後 1 週目にネンブタール腹腔内注射による麻酔後と、下腹部正中切断にて開腹し、両側精巣を露出し、陰囊部に続く精巣導帯を切断して腹腔内に戻した。動物は、生後 3, 4, 6, 8, 14, 20週に 4 匹ずつ屠殺し、両側腹腔内精巣を摘出した。これらの精巣は重量測定後、Bouin 液で固定、エタノール列にて脱水、パラフィンに包埋、連続切片を作製した。酵素抗体法は、両群のパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、ヒト腎 GST ウサキ抗体を用いて Sternberger の peroxidase anti-peroxidase (PAP) 法により GST 活性を染色し、ヘマトキシリン対比染色も行い観察した。対照実験は、Delellis らの方法に準じて行い、染色性も統一するため各スライドにヒト腎組織も同時に包埋し染色した。立体計量形態学的には、両群の PAP 染色標本を顕微投影器で紙に00倍拡大投影し、全精巣断面と染色された Leydig 細胞をトレースして、各面積を計測した。これらを、Weibel の stereology の原理にもとづき、(1)精巣重量とともに、(2)精巣内での Leydig 細

胞の体積比率, (3)Leydig 細胞の重量を求め, 両群を比較した。

III 結 果

間質 Leydig 細胞は, 正常・停留精巣とも全ての週で GST 活性を示した。分布状態は, 正常精巣で生後 4 週まで散在性に分布していたが, 6 週以降に菱形状の集簇を形成した。停留精巣は, 生後 6 週まで正常精巣と同じで, 14 週以降さらに急激に増加し, 萎縮した精細管により拡大した間質を占め組織学的に Leydig 細胞過形成像を呈していた。定量的観察では, 精巣重量は正常群で生後 4 週まで徐々に増加し, その後は急激に増加し, 8 週以降ほぼ一定となった。停留群は生後 4 週まで正常群と大差なく, それ以降は増加せず, 正常群の約 1/3 であった。Leydig 細胞の体積比率は, 正常群で出生日から 1 週で減少し, それ以降上昇し 8 週で最大となり, その後再び減少した。停留群は生後 4 週まで正常群と同様で, その後急激な増加を示して 14 週で最大となり, 20 週で減少した。生後 6 ~ 20 週で停留群では正常群の 2 ~ 3 倍であった。Leydig 細胞の重量は, 正常群で生後 4 週より急激に増加し 8 週で最大となり, その後減少し 20 週で 8 週の約 1/2 となった。停留群は正常群とほぼ同様に増加するが, 8 週で正常群の約 1/2 で 14 週の最大値で正常群と同様となった。その後減少するが, 生後 20 週で停留群は正常群の約 2 倍と有意に大きかった。

正常精巣の精細管は, 生後 2 週に初めて GST 活性を示す細胞と球状体（核をもたない細胞類似の小体）が出現し, これらは 4 週で数を増した。GST 活性を示す細胞および球状体は, 大きなものは細糸期, 接合期一次精母細胞と同様であり, 小さなものは直径 2 ~ 3 μ m の球状を呈しており, 上皮内でやや管腔側に散在していた。GST 活性に細胞質にみられ, 核で胞体内で偏在していた。これらの形態から GST 活性は, 一次精母細胞が接合期の段階で変性していく細胞に出現すると判定した。しかし, 生後 6 週以降になると GST に対する染色性は見られなくなった。停留精巣の精細管は, 生後 3 週に GST 活性を示す細胞と球状体が出現し, 4 週まで数を増した。これらは正常と同様に, 大多数は細糸期と接合期以前の一次精母細胞の変性する過程のものとみなされたが, 少数は大型の核と胞体をもつ厚糸期一次精母細胞の形態で破壊途上にあることを示した。生後 6 週以降では, 一次の精細管に GST 活性を示す変性破壊途上の精母細胞が残っていたが, 大部分の精細管は GST 活性を示さない精祖細胞と Sertoli 細胞のみで構成されていた。

IV 考 察

GST は多くの臓器に分布し, 広い基質特異性を示す多反応性酵素である。今回用いた抗ヒト

腎 GST ウサギ抗体は、等電点 pH11.1、サブユニット分子量19,000のヒト腎由来の GST を抗原として作成したもので、従来のラット肝 GST より小さな分子量を特徴としている。Leydig 細胞が GST を含む理由は、GST がステロイドホルモン合成経路を触媒する△⁵—3—ケトステロイドイソメラーゼ作用に関与していると理解されている。今回の観察でも例外なく、全例 Leydig 細胞は GST に染まっていた。しかし、ラットは生後ステロイドが大きく変化するといわれるが、GST 染色性に変化はあらわれなかった。Leydig 細胞内での GST 作用は、直接テストステロン合成を反映していないようにみえた。また、正常精巣群と停留精巣群の比較では、Leydig 細胞は停留精巣で組織学的に過形成像を示したが、さらに計量形態学的方法を用いることで、比較的正確な重量として停留群の過形成を証明することができた。少なくとも、この実験系では、停留精巣のテストステロンが分泌障害のフィードバックを介するゴナドトロピン刺激により、Leydig 細胞の重量が上昇したといえる。

精細管内の GST の作用機序は知られていない。今回の観察では、GST 染色性は正常幼若ラット精巣および停留精巣ともに未熟な精細管の変性していく精母細胞と核の消失していく球状体にあらわれていた。精細管で変性していく胚細胞が GST を含むことを示したのは、この研究が最初である。GST は、有害物質の解毒の再のグルタチオン抱合の触媒酵素として働くといわれており、グルタチオンを高濃度に含む一次精母細胞が GST 活性をもつことは、細胞が変性・破壊されていく過程で発生した有害物質を解毒する作用（グルタチオン抱合）に関連し、最終的に利用されなくなった GST が球状体に濃縮されていく過程をみているとも推測される。また、変性に陥る際に GST の利用が停止して細胞内に蓄積していくことも考えられる。ラットで血液—精巣閥門は生後16～20日頃に完成するとされ、正常精巣で幼若期に一次精母細胞に変性があらわれるのは、この未完成の閥門を通過してくる物質により、影響を受けやすい減数分裂途上の細胞が変性したとも推測される。ラット精細管内の GST の染色性により、精細管上皮の細胞変性・破壊における代謝作用に関して貴重な情報が得られた。

さらに実験手段に関して、今回の精巣導帯切断法は発育途中の出生早期でも可能であり、先天性停留精巣と比較できる内分泌環境を作り得ると考えた。手術操作も簡便で、生後 4 週以降に停留精巣特有の組織変化があらわれ、良い実験モデルと考える。

V 結 論

抗ヒト腎 GST 抗体を用いて、出生から成熟までのラット精巣を免疫組織化学的に染色し、次の結論を得た。1. Leydig 細胞が明瞭に染め出され、その量の生後変化、実験による変化を明

確に把握できた。2. 幼若時に作製した停留精巣の重量は成熟ラットで正常の1/3になるにもかかわらず、Leydig 細胞の量は正常の2倍となっていることを知った。3. 精細管では、変性していく胚細胞が染色された。このような細胞は正常では生後2週から4週にあらわれ、その後に消失したが、停留精巣では生後早期から成熟期まで出現していた。このような変化は、血液-精巣門門の分化と関連すると考えた。4. 生後早期に行う精巣導帯切断法は、先天的停留精巣の実験モデルを作製するのに有用であった。

学位論文審査の要旨

主査 教授 小柳知彦
副査 教授 西 信三
副査 教授 石橋輝雄

glutathione S-transferase (GST) は、精巣では Leydig 細胞と精細管に局在しているといわれる。本研究では、ヒト腎から精製した GST に対するポリクロナール抗体を用いて、ラットの出生日から成熟期までの正常および実験的停留精巣を酵素抗体法で染色し観察した。また、染色される Leydig 細胞の量の変化も、計量形態学的に追求した。

材料と方法：総計60匹の Wister 系ラットを用いた。正常精巣群は36匹で、出生日と生後1, 2, 3, 4, 6, 8, 14, 20週に4匹ずつ屠殺し、両側の精巣を摘出した。停留精巣群は24匹で、生後1週にネンブタール腹腔内注射で麻酔後、下腹部正中切開で両側精巣を露出し、精細導帯を切断して腹腔内に戻した。動物は、生後3, 4, 6, 8, 14, 20週に4匹ずつ屠殺し、両側腹腔内精巣を摘出した。これらの精巣は、Bouin 液で固定、エタノール列にて脱水、パラフィン連続切片を作製した。酵素抗体法は、両群のパラフィン切片をヒト腎 GST ウサギ抗体を用いて Sternberger PAP 法により染色し、ヘマトキシリン核染色も行い観察した。対照実験は、De Lellis らの方法に準じた。立体計量形態学的には、両群の PAP 染色標本を顕微投影器で紙に100倍拡大投影し、全精巣断面と Leydig 細胞をトレースして、各面積を計測した。これらを Weibel の stereology の原理で(1)精巣重量、(2)Leydig 細胞の体積比率、(3)Leydig 細胞の重量を求め、両群を比較した。

結果：間質 Leydig 細胞は正常・停留精巣とも全週で GST に染色された。定量的観察

では、精巣重量は正常群で生後 4 週まで徐々に増加し、その後急増し、8 週以降で一定した。停留群は生後 4 週まで正常群と大差なく、それ以降も正常群の約 1/3 であった。Leydig 細胞の体積比率は、正常群で出生日から 1 週で減少し、その後上昇し 8 週で最大となり、その後再び減少した。停留群は生後 4 週まで正常群と同様で、その後急増し 14 週で最大となり、20 週で減少した。Leydig 細胞の重量は、正常群で生後 4 週より急増し 8 週で最大となり、その後減少し 20 週で 8 週の約 1/2 となった。停留群は 8 週で正常群の約 1/2 で 14 週の最大値で正常群と同様、その後減少し生後 20 週で正常群の 2 倍と有意に大きかった。正常精巣の精細管は、生後 2 ~ 4 週に GST に染まる細胞と球状体が出現した。これらは、細糸期、接合期一次精母細胞で小さなものは直径 2 ~ 3 μ m の球状を呈していた。形態上、GST は一次精母細胞が変性していく時に出現すると判断した。生後 6 週以降では、GST の染色性はなかった。停留精巣の精細管は、生後 3 週に正常と同様に GST 染色が出現し、大多数は細糸期と接合期以前の一次精母細胞の変性過程とみなされたが、少数は大型の核と胞体で厚糸期で破壊途上で染色された。生後 6 週以降は、一部に GST 染色をもつ変性破壊途中の精母細胞が残っていたが、大部分の精細管は GST に染まらない精祖細胞と Sertoli 細胞のみで構成されていた。

考 察 : Leydig 細胞が GST を含む理由は、GST がステロイドホルモン合成経路を触媒する Δ^5 -3-ケトステロイドイソメラーゼ作用に関与していると理解されている。今回の観察でも例外なく、全例 Leydig 細胞は GST に染まっていた。抗 GST 抗体を用いた PAP 法は、Leydig 細胞の局在・分布およびステロイド産生を検討するうえでも有用であった。また、正常・停留精巣群の比較では、Leydig 細胞は停留精巣で組織学的に過形成像を示したが、さらに計量形態学的にも比較的正確な重量として停留群の過形成を証明できた。この実験系では停留精巣のテストステロン分泌障害のフィールドバックを介するゴナドトロピン刺激により、Leydig 細胞の重量が上昇したといえる。精細管内の GST の作用機序は知られていない。今回の観察では、変性していく精母細胞と核の消失していく球状体にあらわれた。精細管で変性していく胚細胞が GST を含むことを示したのは、この研究が最初である。GST は、有害物質の解毒の際のグルタチオン抱合の触媒酵素として働くとされ、グルタチオンを高濃度に含む一次精母細胞が GST 活性をもつことは、細胞が変性・破壊されていく過程で発生した有害物質が解毒する作用（グルタチオン抱合）に関連し、最終的に利用されなくなった GST が球状体に濃縮されていくものと推測した。精細管上皮の細胞変性・破壊における代謝作用に関して興味深い知見が得られた。さらに、実験手段に関して、今回の精巣導帯切断法は発育途中の出生早期でも可能であり、先天性停留精巣と比較できる内分泌環境を作り得ると考えた。

以上本研究は、実験的停留精巣の組織を GST 抗血清を用いて、PAP 法にて GST の局在と分布を観察し Leydig 細胞の量と経時的变化を立体計量形態学的に計測し比較検討した唯一の研究であり学位授与に値する。