



# The Apoptotic Changes of Testicular Germ Cells in the Obstructive Azoospermia Models of Prepubertal and Adult Rats

稲葉, 洋子

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-09-09

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2269

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002269>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	稲葉洋子 <sup>いなばようこ</sup> （大阪府）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	博ろ第1652号
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位授与の日付	平成10年9月9日
学位論文題目	THE APOPTOTIC CHANGES OF TESTICULAR GERM CELLS IN THE OBSTRUCTIVE AZOOSPERMIA MODELS OF PREPUBERTAL AND ADULT RATS （ラットを用いた思春期前期および成人期閉塞性無精子症モデルにおける精細胞のアポトーシス）
審査委員	主査 教授 守 殿 貞 夫 教授 寺 島 俊 雄      教授 丸 尾 猛

## 論文内容の要旨

### I 緒論

精路の閉塞を原因とする閉塞性無精子症は、主に顕微鏡下精路再建術の進歩により治療成績が飛躍的に改善した。しかし、精管結紮術後の精路再建手術の成績が良好なのに対して、小児期の単径ヘルニア手術に起因する閉塞性無精子症の手術成績は極めて不良である。文献的にも、精巣が発育する思春期より前に精路の閉塞がおこると、将来的に精子形成能に障害をきたす可能性が指摘されているが、その機序は不明である。そこで、閉塞性無精子症における精子形成障害の病態解明を目的として、思春期前および成人期の閉塞性無精子症モデルをラットを用いて作成し、精細胞のアポトーシスについて検討した。

### II 方法

#### 対象

思春期前期および成人期の閉塞性無精子症モデルとして、それぞれ生後10日目と生後8週目のラットを使用した。生後10日目に両側精管結紮術を施行した群とコントロール群、生後8週目に両側精管結紮術を施行した群とそのコントロール群の計4群を作成し、比較検討した。

#### 精巣および精巣上体の発育

思春期前期の閉塞性無精子症モデルとそのコントロール群では、生後2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 16週目に、成人期の閉塞性無精子症モデルとそのコントロール群では、生後9, 10, 11, 12, 16週目に、それぞれ3匹ずつ屠殺したのち、両側精巣および精巣上体を摘出し、それぞれの重量を計測した。

#### 電子顕微鏡検査

精巣組織の一部を2% glutaraldehyde で固定し、電子顕微鏡を用いて精細胞の核の濃縮・くびれ・アポトーシス小体の出現などを検索し、アポトーシスの有無を調べた。

#### in situ end-labeling 法

残りの精巣組織を10%緩衝ホルマリンで固定したのち、4ミクロンのパラフィン切片を作成し、断

裂をおこした DNA 末端の 3'-OH を検出する in situ end-labeling 法を用いてアポトーシスをおこしている細胞を染色した。発色には、diaminobenzidine (DAB) を使用し、対比染色にはメチルグリーンを用いた。精細管を 14stage に分類し、各 stage 3 個ずつ、合計 42 の精細管断面を無作為に選択し、精細管中のラベルされた spermatogonia および spermatocyte の数を算定した。Apoptotic Index (AI) = 42 精細管中のラベルされた spermatogonia および spermatocyte の数 / 42 とし、AI の週齢変化を定量化することによりアポトーシスの程度を比較検討した。

#### PAS (Periodic Acid Schiff) 染色

16 週齢となった各グループのラット精巣の PAS 染色を行い、精細管直径を比較検討した。さらに、精細管を 14stage に分類して stage 毎に精細管断面内の spermatogonia と Sertoli 細胞数をそれぞれ算定し、それらの比である S-Sratio = spermatogonia 数 / Sertoli 細胞数を求めた。

### III 結果

#### 精巣および精巣上体の発育

左右の精巣の重量の変化は、思春期前期閉塞性無精子症モデル群、成人期閉塞性無精子症モデル群、およびそれぞれのコントロール群との間で特に差はなかった。精巣上体重量は、左右とも 9 ~ 16 週齢において思春期前期閉塞性無精子症モデル群で他の群に比べて有意に増加していたが、主に精巣上体の granuloma 形成によるものであった。

#### 電子顕微鏡検査

思春期前期閉塞性無精子症モデル群では、精管結紮術後 4 日目には核の濃縮・くびれ・アポトーシス小体などが出現する典型的なアポトーシスの所見が観察された。アポトーシスは主に spermatocyte に認められた。

#### in situ end-labeling 法

生後 4 週目の思春期前期ラットにおいては、コントロール群においてもラベルされた細胞は多く認められた。思春期前期閉塞性無精子症モデル群の 3, 4 週齢ラットの AI は  $1.05 \pm 0.46$  および  $2.15 \pm 0.61$  であった。この値はコントロール群の 3, 4 週齢ラットの  $AI 0.57 \pm 0.22$  および  $1.25 \pm 0.49$  の約 2 倍であり、思春期前期閉塞性無精子症モデル群の 3, 4 週齢ラットでは有意にアポトーシスが亢進していた。成人期閉塞性無精子症モデル群では AI はコントロール群とほぼ同じであり、アポトーシスの亢進は認められなかった。

#### 精細管直径および S-S ratio

16 週齢ラットの精細管直径の平均値は、思春期閉塞性無精子症モデル群で  $238.4 \pm 15.7 \mu\text{m}$  であり、コントロール群の  $253.3 \pm 14.3 \mu\text{m}$ 、成人期閉塞性無精子症モデル群の  $254.8 \pm 18.0 \mu\text{m}$  と比較して有意に小さかった。S-S ratio は、思春期前閉塞モデル群の精細管 stage IV で有意に低値であり、精祖細胞数の減少が認められた。

### IV 考察と結論

精路の閉塞がヒト精巣に組織学的変化をおこすことはよく知られているが、その機序は明らかにされていない。この精路閉塞による精細胞への影響は、閉塞時期によりその機序が異なる可能性が考えられる。今回の検討で、思春期前期の閉塞ではアポトーシスが亢進することにより、精細胞が減少することが示唆された。さらに、発育後成人期においても、精細管径および精粗細胞数が減少していることが明らかとなった。このアポトーシスを引き起こす機序に関して、尿管でのアポトーシスは腎盂内圧の上昇が原因となるという報告がみられ、精細管においても精路の閉塞による内圧上昇がアポトーシスを誘発する可能性が考えられた。

思春期前期に精路が閉塞した場合、精細胞がより鋭敏に反応してアポトーシスをおこし、将来にわたる不可逆的な造精機能障害を起こす可能性が考えられた。したがって、思春期前期の精路の閉塞はできるだけ早期に精路を再建すべきであると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

男性不妊をきたす原因疾患のうち、精路閉塞に伴う閉塞性無精子症は、外科的に治療可能なもののひとつである。近年、手術用顕微鏡の改良と精路再建手術手技の確立により、閉塞性無精子症の治療は飛躍的な進歩をとげた。とくに、精管結紮後の精路再建手術の術後成績は非常に良好である。一方、小児期の単径ヘルニア手術に起因する閉塞性無精子症は、精路再建がなされても術後の精液所見の回復がおもわしくない場合が多い。このような小児期の精路閉塞の精路に及ぼす影響は、多方面において研究され、精巣が発育する思春期により前に精路の閉塞がおこると、将来的に精子形成能に障害をきたす可能性が指摘されている。しかしながら、その障害の機序はいまだ明らかでない。本研究者は、精路閉塞による精子形成障害の病態解明を目的として、ラットを用いて思春期前および成人期の閉塞性無精子症モデルを作成し、精細胞のアポトーシスについて検討した。

### 【方法】

思春期前期および成人期の閉塞性無精子症モデルとして、生後10日目および生後8週目に両側精管結紮術を施行した2群と、それぞれのコントロール群の計4群を作成した。1週間ごとに各群から3匹ずつ屠殺して両側精巣および精巣上体を摘出し、それぞれの重量を計測するとともに、以下の実験に供した。

#### 電子顕微鏡検査

電子顕微鏡を用いて精細胞の核の濃縮・くびれ・アポトーシス小体の出現などを検索し、アポトーシスの有無を調べた。

#### in situ end-labeling 法

精巣組織のパラフィン切片を作成し、断裂をおこしたDNA末端の3'-OHを検出する in situ end-labeling 法を用いてアポトーシスをおこしている細胞染色した。精細管を14stageに分類し、各 stage 3検体ずつ、合計42の精細管断面を無作為に選択した。Apoptotic Index (AI) = 42精細管中のラベルされた spermatogonia および spermatocyte の数/42とし、AIの週齢変化を定量化することによりアポトーシスの程度を比較検討した。

#### PAS (Periodic Acid Schiff) 染色

16週齢となった各グループのラット精巣のPAS染色を行い、精細管直径を比較検討した。さらに精細管を stage 毎に、S-Sratio=spermatogonia 数/Sertoli 細胞数を求め、比較検討した。

### 【結果】

#### 精巣および精巣上体の発育

左右の精巣の重量の変化は、閉塞性無精子症モデル群とそれぞれのコントロール群との間で特に差はなかった。精巣上体重量は、左右とも9～16週齢において思春期前期閉塞性無精子症モデル群で他の群に比べて有意に重かったが、granuloma 形成によるものであった。

#### 電子顕微鏡検査

思春期前期閉塞性無精子症モデル群では、精管結紮術後4日目には典型的なアポトーシスの所見が顕著に観察された。

#### in situ end-labeling 法

思春期前期閉塞性無精子症モデル群の3, 4週齢ラットのAIは $1.05 \pm 0.46$ および $2.15 \pm 0.61$ であった。この値はコントロール群の3, 4週齢ラットのAI $0.57 \pm 0.22$ および $1.25 \pm 0.49$ の約2倍であり、有意にアポトーシスが亢進していた。成人期閉塞性無精子症モデル群ではAIはコントロール群とほぼ同じであり、アポトーシスの亢進は認められなかった。

#### 精細管直径および S-S ratio

16週齢ラットの精細管直径の平均値は、思春期閉塞性無精子症モデル群で $238.4 \pm 15.7 \mu\text{m}$ であり、コントロール群の $253.3 \pm 14.3 \mu\text{m}$ 、成人期閉塞性無精子症モデル群の $254.8 \pm 18.0 \mu\text{m}$ と比較して有意に小さかった。S-S ratioは、思春期前閉塞モデル群の精細管 stage IV で有意に低値であり、精祖細胞数の減少が認められた。

以上の結果から、思春期前期の精路閉塞では閉塞後早期に精細胞のアポトーシスが亢進することにより、精細胞が減少することが示唆された。また、発育後の成人期においても、精細管径および精粗細胞数が減少していることが明らかとなった。このように、本研究者は、思春期前期に精路が閉塞した場合、精細胞がより鋭敏に反応してアポトーシスをおこし、将来にわたる不可逆的な造精機能障害を起こす可能性をはじめて見い出した。このことは、思春期前期の精路の閉塞はできるだけ早期に再建すべきであることを裏付けるものである。本研究は、精路閉塞による精細胞への影響について、精路の閉塞時期と精細胞のアポトーシスならびに組織学的変化について研究したものであり、従来ほとんど行われなかった精路閉塞における精細胞減少の機序について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。