

ビタミンB₁₂欠乏によるラット精巢の形態学的変化

山 川 めぐみ¹⁾, 渡 辺 敏 明¹⁾, 渡 辺 皓¹⁾

榎 原 周 平²⁾, 中 野 長 久²⁾

(¹⁾山形大学医学部*, (²⁾大阪府立大学農学部**)

Morphological Alterations of the Testes in Vitamin B₁₂-Deficient Rats

Megumi YAMAKAWA¹⁾, Toshiaki WATANABE¹⁾, Hiroshi WATANABE¹⁾,

Syuhei EBARA²⁾ and Yoshihisa NAKANO²⁾

¹⁾*Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585*

²⁾*Department of Biological Chemistry, University of Osaka Prefecture, Sakai, Osaka 599-8531*

The present study was to determine the effects of dietary vitamin B₁₂ (B₁₂) deficiency on the reproductive system in mammals. Male rats were fed a vitamin B₁₂-deficient diet for 14 weeks (group 1) or 23 weeks (group 2). In the B₁₂-deficient groups 1 and 2, the body weight and the wet weight of testis and epididymis were significantly depressed, as compared with the control group. The diameter of seminiferous tubules and the thickness of spermatogenic epithelium were decreased to about 50% of the control. In the spermatogenic epithelium of seminiferous tubules, the relative incidence of Sertoli cells in the B₁₂-deficient groups was higher than the control, and aplasia of spermatids and sperms were detected. Also numerous TUNEL positive cells were located in the spermatogenic epithelium from B₁₂-deficient rats in the group 1. The ultrastructural features by TEM can be considered to be apoptosis. However, the mechanism underlying which the induction of apoptosis by B₁₂ deficiency are unclear. In the connective tissue between the seminiferous tubules, many interstitial cells of Leydig and blood vessel were observed in the B₁₂-deficient groups, as compared with the control. In the present study B₁₂ deficiency affected the male reproductive system and inhibited the maturation of spermatogenic cells, which indicate that B₁₂ may be an essential constituent for spermatogenesis in rats.

* 所在地：山形市飯田西2-2-2 (〒990-9585)

** 所在地：堺市学園町1-1 (〒599-8531)

ビタミンB₁₂（以下B₁₂と略す）は、メチルマロニルCoA転移酵素やメチオニン合成酵素などの補酵素として、重要な役割を果たしている。ヒトの生殖機能を維持するために、B₁₂が不可欠であるとする報告は、これまでに多数ある。最近では、乏精子症で悪性貧血がある患者にB₁₂を投与したところ、精子形成が改善され、妊娠が認められている¹⁾⁻³⁾。一方、動物実験においては、B₁₂欠乏状態にすると、雌動物では、生殖機能に影響はみられないが、雄動物では、精子形成の障害されることが病理組織学的に観察されている^{4),5)}。しかしながら、B₁₂欠乏による精子形成障害の機序については、明らかにされていない。

そこで、本研究では、B₁₂欠乏が生殖機能に与える影響を形態学的に検討した。とくに、ビタミンB₁₂欠乏飼料で飼育したラットの精巢を用い、精細管、および間質に存在しテストステロンを分泌する間細胞の構造に注目して顕微鏡的観察を行った。

実験方法

1. 材料および実験条件

実験に使用した動物は、成熟ラット（kwl：Wistar）で、室温23℃、相対湿度60%の動物飼育室で飼育した。各実験群の設定およびサンプルの摂取は下記のとおりである。

- 1) B₁₂欠乏群：妊娠3週前から妊娠期間をとおして、6匹の母親ラットにB₁₂欠乏飼料を摂取させた。新生ラットには出生、離乳後もB₁₂欠乏飼料を与え、生後14週齢（欠乏群1, group 1）および生後23週齢（欠乏群2, group 2）のラットから精巢を摘出した。
- 2) 対照群：6匹の母親ラットに、妊娠3週前から新生ラットが離乳するまでの間、一般固型飼料（CRF-1, チャールズリバー）を摂取させた。離乳後は新生ラットにB₁₂添加飼料を与え、生後14週齢のラットから精巢を摘出した。本実験では、これらを対照群とした。

なお、動物実験は、すべて山形大学医学部動物実験指針に従って実施した。

2. 標本作製法および観察・撮影法

- 1) パラフィン切片：摘出した標本を常法に従い、固定、脱水、包埋後、3.5～4.5μm厚のパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリンとエオジン（H&E）にて染色した。システム生物顕微鏡（オリンパスBX40, 以後光顕と略す）にて精細管の直径、管壁の厚さを計測した後、精上皮細胞における精子形成について観察した。また、光顕写真の撮影には自動顕微鏡撮影装置（オリンパスM-30）を用いた。
- 2) 樹脂切片：摘出した標本を常法に従い、固定、脱水、包埋後、約0.45μm厚の準超薄切片を作製、染色し、光顕的に観察した。同様に、厚さ60～90nmの超薄切片を作製し、染色後、電子顕微鏡（H-700, 以後電顕と略す）を用いて精上皮のアポトーシス細胞および間質細胞の構造について観察した。
- 3) TUNEL染色：パラフィン切片（10μm）を用いて、常法に従い、免疫組織化学染色をし、DNA切断を検出した。

結 果

1. 体重および精巣等の重量変化

欠乏群 1 におけるラットの体重および精巣，精巣上体の重量は，対照群と比較して有意に減少していた (Table 1)。また，精巣および精巣上体の相対重量も低下しており，欠乏群 1 の精巣は著しく萎縮していた。(Figs. 1-3)

Table 1. Body weight and organ weight of dietary vitamin B₁₂-deficient male rats

	Control	Deficiency (group 1)
Number of males used	6	6
Body weight (g)	491.8 ± 21.3	212.9 ± 38.8*
Testis (g)	3.87 ± 0.17	0.89 ± 0.24*
(g%)	0.79 ± 0.05	0.42 ± 0.10*
Epididymis (g)	1.16 ± 0.08	0.31 ± 0.04*
(g%)	0.24 ± 0.02	0.15 ± 0.02*

*p<0.01, significantly different from the control (t-test).
Values are expressed as mean ± s.d.

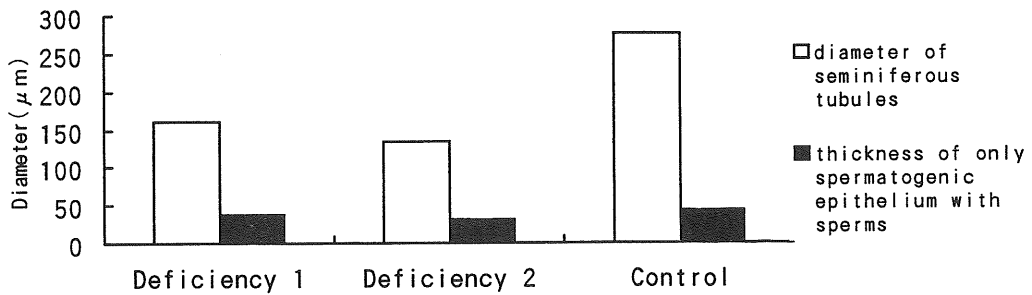


Fig. 1 Effects of vitamin B₁₂ deficiency on the development of the rat testes
Deficiency 1, group 1; Deficiency 2, group 2

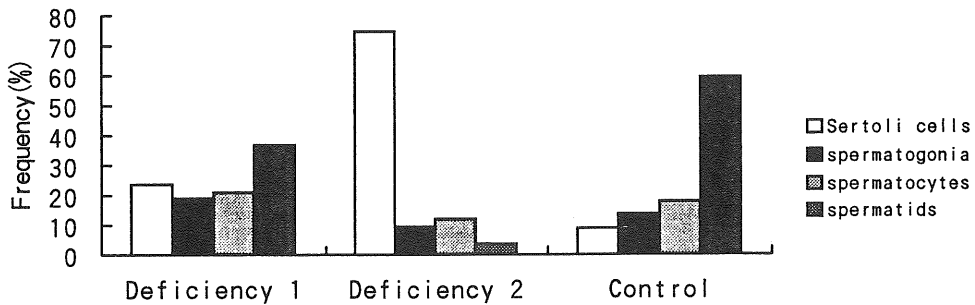


Fig. 2 Effects of vitamin B₁₂ deficiency on the frequency of spermatogenic cells in the rat testes
Deficiency 1, group 1; Deficiency 2, group 2

2. 精細管の直径と管壁の厚さ

対照群における精細管の直径は平均 $275.5\mu\text{m}$ で、管壁すなわち精上皮の厚さは $43.5\mu\text{m}$ であった (Fig. 4)。一方、欠乏群1において、精細管の直径は平均 $160.5\mu\text{m}$ で、対照群と比較して明らかに減少していた。欠乏群1では、精上皮細胞の構造が良好な状態で保持され、精子がみられた精細管と、精上皮の脱落した精細管がみられた。前者の直径は平均 $226.7\mu\text{m}$ であり、後者の $153.0\mu\text{m}$ と比べ、67%と有意に減少していた (Fig. 5)。

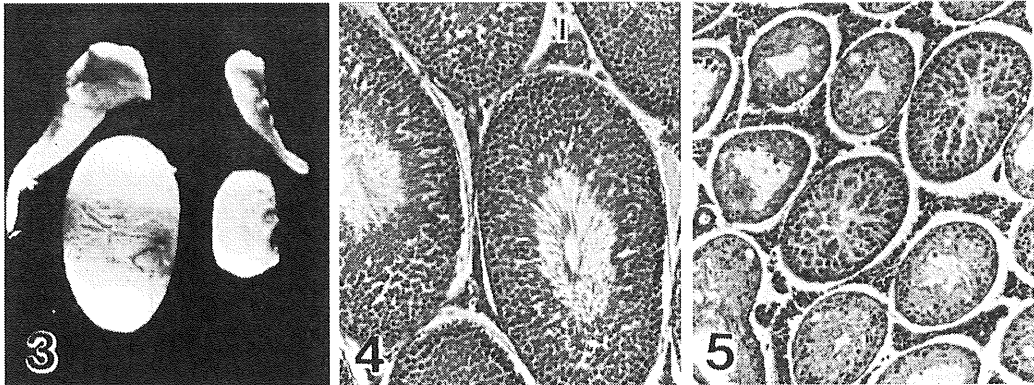


Fig. 3 Representative photograph of testis and epididymis from control rats (left) and B₁₂ deficient-rats in the group 1 (right)

Fig. 4 Typical appearance of seminiferous tubules from a control rat
Hematoxylin and eosin (H&E) stain, $\times 82$

Fig. 5 Micrograph of seminiferous tubules from B₁₂-deficient rats in the group 1
Both normal and impaired seminiferous tubules were detected. H&E stain, $\times 82$

欠乏群2において、精上皮が脱落した精細管の直径は平均 $133.5\mu\text{m}$ で、欠乏群1の精細管の87%にまで減少していた。しかし、いずれの欠乏群においても、一部の精細管では精上皮の構造が良好に保持され精子形成が認められた。これらの精細管の管壁の厚さは対照群と差はみられなかった (Fig. 1)。

3. 精細管の上皮細胞における精子形成の変化

対照群においては、ほとんどすべての精細管が正常な精上皮細胞の構造を保持していた。セルトリ細胞の核周部は、上皮の基底部に近く位置し、細胞の輪郭は不整形であった。また、精原細胞 (spermatogonia) は、セルトリ細胞より基底膜に近く位置し、その核は円形であった。精母細胞 (spermatocytes) の大きさは、精原細胞の約2倍であった。内腔面には、小型の精子細胞 (spermatids) および、精子が多数認められた (Fig. 6)。

欠乏群1では、全体の90%、欠乏群2では全体の98%の精細管において、精上皮細胞が脱落していた。両欠乏群ともセルトリ細胞とみられる構造が観察されたが、それ以外の細胞の判別は困難であった。一方、正常な精上皮を備えた精細管が少数ながら観察された (Figs. 5, 7, 8)。

両欠乏群にみられるセルトリ細胞の占有率は対照群に比べ高くなってはいたが、精子細胞のそれは低下していた。精原細胞および精母細胞の分布密度（割合）に関しては、両欠乏群と対照群との間に大きな差はみられなかった（Fig. 2）。また、構造においても、両群間に大きな差はみられなかった。

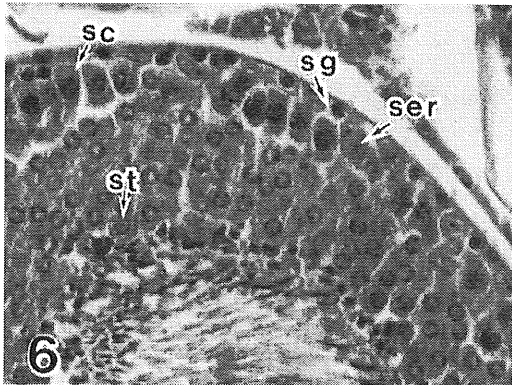


Fig. 6 Tissue section of seminiferous tubules from a control rat, Four kinds of spermatogenic cells in the seminiferous epithelium were shown, ser, Sertoli cells ; sg, spermatogonium ; sc, spermatocyte ; st, spermatid. H&E stain, × 330

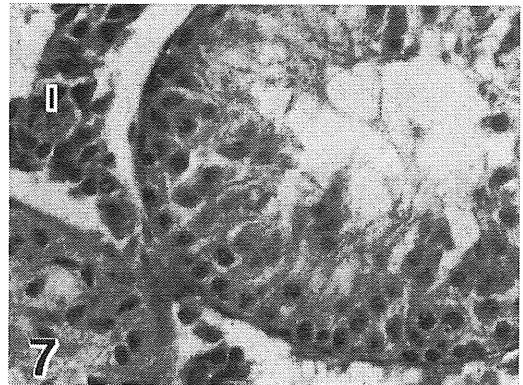


Fig. 7 Tissue section of seminiferous tubules from B₁₂-deficient rats in the group 1
Many spermatogenic cells were decreased. I, interstitial cells. H&E stain, × 330

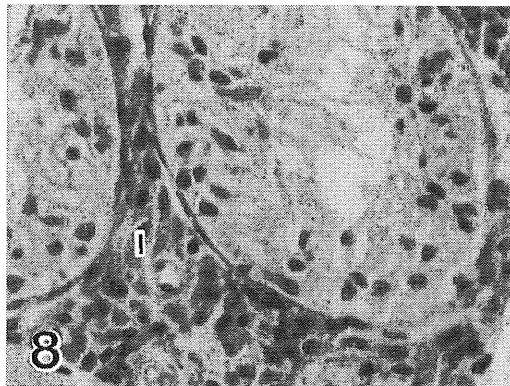


Fig. 8 Tissue section of seminiferous tubules from B₁₂-deficient rats in the group 2
The spermatogenic cells were more severely impaired and many Sertoli cells were detected. I, interstitial cells. H&E stain, × 330

4. アポトーシスの誘発

TUNEL染色を施したパラフィン切片を光顕的に観察した結果、対照群の精細管にアポトーシスの発現はほとんどみられなかった。一方、欠乏群では精上皮細胞にアポトーシスがみられ、欠乏群2と比較して欠乏群1においてより高頻度にもみられた（Figs. 9, 10）。しかし、精子形成のどの段階の細胞にアポト-

シスが誘発されているのかを明確にすることはできなかった。

5. 間質の間細胞の変化

対照群における精細管の細胞間質には、間細胞が観察され、毛細血管も豊富に分布していた。欠乏群では精細管の構造に大きな変化がみられたが、間細胞の構造に変化は認められなかった (Fig. 11)。欠乏群ではむしろ間細胞の数が増加する傾向が認められた。また、テストステロンの血中濃度を測定した結果、欠乏群1では $5.3 \pm 4.37\text{pg/ml}$ と、対照群の $3.0 \pm 0.90\text{pg/ml}$ と比べ差異はみられなかった。

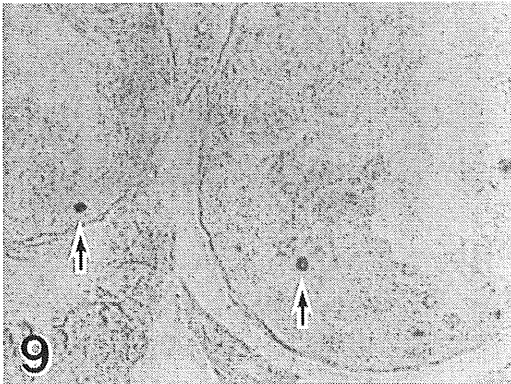


Fig. 9 The TUNEL staining of the tissue section of seminiferous tubules from B₁₂-deficient rats in the group 1
Methyl green was used as a counterstain. Arrows indicate some diaminobenzidine (DAB)-positive cells. $\times 330$

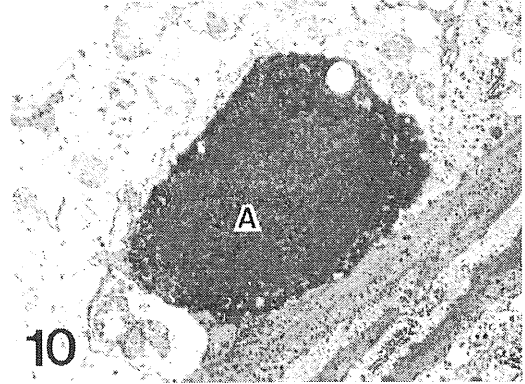


Fig. 10 Transmission electron microscopy (TEM) of spermatogenic cells from testes of B₁₂-deficient rats in the group 1
Occasional apoptotic cells were noted, and electron-dense and intracellular inclusions were common. $\times 5200$

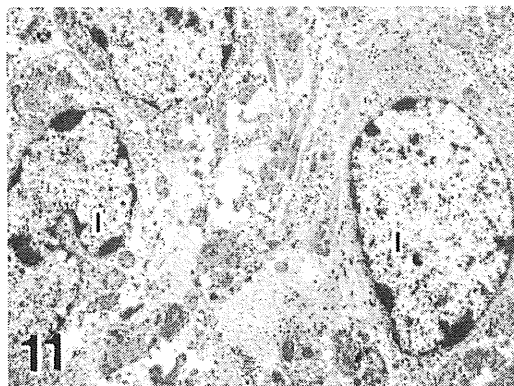


Fig. 11 Transmission electron microscopy (TEM) of the connective tissue between seminiferous tubules from the B₁₂-deficient rats in the group 1
Many interstitial endocrinocytes were occupied. $\times 4100$

考 察

1. B₁₂欠乏による体重、精巣等への影響

B₁₂欠乏実験におけるラットの体重、精巣、精巣上体の重量および精巣の重量および相対重量は、いずれも対照群と比較して著しく減少していた。また、欠乏群の精巣の大きさは対照群と比較して縮小していた。このことから、B₁₂欠乏は成長を抑制するばかりでなく、精巣を著しく萎縮させることが確認された。

2. B₁₂欠乏による精細管、精上皮細胞への影響

欠乏群の精細管の直径は対照群と比較して、小さく、欠乏期間が長くなるとさらに縮小していた。また、欠乏群2における精子や精子細胞が認められなかった精細管では管壁の厚さが減少していた。しかし、正常な精上皮を備えた精細管の管壁の厚さは、いずれの実験群でも差がなかった。B₁₂欠乏ラットの精巣組織像を観察したKawataらの報告でも、精細管の萎縮と精子および精子細胞の形成不全が明らかにされている^{4), 5)}。このようにB₁₂欠乏はラットの精子形成を阻害し、精細管の発育を抑制することが示唆された。

精細管の壁を形成する精上皮は、セルトリの支持細胞（セルトリ細胞）と、精子産生細胞からなる⁶⁾。B₁₂欠乏飼料で飼育したラットの精巣組織像の観察結果から、B₁₂欠乏は精子形成過程に障害を起こすことが知られている⁷⁾。本研究において、欠乏群では対照群と比較して精子細胞の占有率が低下しており、欠乏群2では欠乏群1よりさらに低下していた。一方、セルトリ細胞に関しては、対照群と比較して、欠乏群における占有率が増加しており、欠乏群2では欠乏群1よりさらに増加していた。この結果は、セルトリ細胞は精子産生細胞と比較して、B₁₂欠乏に対し感受性が低いためと考えられる。また、対照群と欠乏群の間で精原細胞および精母細胞の占有率に大きな差がみられなかったのは、これらの細胞の寿命が精子細胞に比べ長い⁶⁾、いずれの実験下においても観察されやすいためと考えられる。これらのことからB₁₂欠乏により、精子産生細胞の形成不全が起り、生殖機能が低下したり^{4), 5), 7)}、また、欠乏状態にある期間が長いほど大きな影響を受けることが明らかになった。

アポトーシスの誘発が、欠乏群2より欠乏群1で高頻度に認められたのは、欠乏群2では既に大部分の精上皮細胞が脱落していることによる。一方、欠乏群1では構造が保持されている精上皮細胞が少数ながら残存していたためと考えられる。

3. B₁₂欠乏による間細胞への影響

対照群では、精細管の間質に、間細胞の集団と毛細血管が豊富に観察された。欠乏群では、間細胞の数は増加する傾向が認められた。血清中のテストステロンを測定した結果、欠乏群1と対照群で差異はみられなかった。これらの結果より、精上皮細胞の脱落に対して間細胞が増加しているが、テストステロンの分泌は阻害されている可能性が考えられる。

結 論

本研究の結果から、次のことが明らかとなった。

1. B₁₂欠乏は、ラットの体重および精巣、精巣上体の重量が減少させ、精細管を萎縮させる。
2. B₁₂欠乏は、ラットの精子産生細胞に形成不全をきたし、生殖機能を低下させ、欠乏状態にある期間

が長いほど精巣はより強い影響を受ける。

3. B₁₂欠乏により、精細管の精上皮細胞にアポトーシスが誘発され、精上皮が退縮する。
4. B₁₂欠乏により、精細管の構造は大きな影響を受けるが、間質の間細胞は増加する傾向が認められる。

文 献

- 1) Watson, A. A. (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii:644
- 2) Sharp, A. A. and L. J. Witts (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii:779
- 3) Tomaszewski, L., B. Zmudzka and J. Nadworny (1963) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* i:170
- 4) Kawata, T., T. Takada, F. Morimoto, N. Fujimoto, N. Tanaka, K. Yamada, M. Wada, T. Tadokoro and A. Maekawa (1992) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testes tissue in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38:305-316
- 5) Kawata, T., A. Tamiki, A. Tashiro, K. Suga, S. Kamioka, K. Yamada, M. Wada, N. Tanaka, T. Tadokoro and A. Maekawa (1997) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testicular tissue in rats fed by pair-feeding. *Res. J. Vit. Nutr. Int.* 67:17-21
- 6) 藤田尚男, 藤田恒夫 (1980) 標準組織学 (各論), 医学書院, 東京: pp. 189-212
- 7) 押尾 茂, 矢崎恒忠, 梅田 隆, 尾崎 覚, 大川 功, 毛利秀雄 (1991) ビタミンB₁₂欠乏食飼育で惹起したマウス造精機能障害に及ぼすメコバラミンの効果. *日不妊誌* 36:178-184