

特発性男子不妊症精巣の組織化学的研究

—精細管壁における酸性複合糖質の検討—

名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 三宅弘治教授)

三 嶋 敦

A HISTOCHEMICAL STUDY ON THE TESTES FROM
PATIENTS WITH IDIOPATHIC MALE INFERTILITY :
IDENTIFICATION OF ACIDIC GLYCOCONJUGATES
IN THE SEMINIFEROUS TUBULAR WALLS

Atsushi Mishima

From the Department of Urology, Nagoya University School of Medicine

Acidic glycoconjugates in the seminiferous tubular walls in the testes from patients with idiopathic male infertility was identified light microscopically with the sensitized high iron diamine method in combination with digestions with chondroitinase ABC, chondroitinase B or testicular hyaluronidase.

Tissue specimens were obtained by testicular biopsy from 37 patients with idiopathic male infertility and 9 fertile adult males. Chondroitin sulfate A, B and C were identified in the tubular walls of oligozoospermic patients with idiopathic male infertility irrespective of the thickness of the walls. Similar results were obtained in the tubular walls of the testes from normal males. On the other hand, chondroitin sulfate B was a main acidic glycoconjugate in the tubular walls of the testes from azoospermic patients with idiopathic male infertility irrespective of the thickness of the walls. These findings suggest that the etiological factors of the impaired spermatogenesis in patients with idiopathic male infertility are not only the disturbance of nutritional transport across the seminiferous tubular walls due to peritubular thickening but the functional alterations of the tubular walls associated with changes in components of acidic glycoconjugates in the tubular walls. The pathogenesis of oligozoospermia does not seem to be similar to that of azoospermia since components of acidic glycoconjugates in the peritubular tissues between the two types of disorders are quite different.

(Acta Urol. Jpn. 39: 327-332, 1993)

Key words: Idiopathic male infertility, Seminiferous tubular walls, Acidic glycoconjugates, Histochemistry, Sensitized diamine method

緒 言

男子不妊症のうち特発性男子不妊症の占める割合は非常に多いにもかかわらず, andrology, 内分泌学ならびに遺伝子検索などの進歩した現在でも, その造精能障害の正確な病態生理についてはほとんど解明されていない。

特発性男子不妊症精巣の組織学的特徴の一つに精細管壁の肥厚とそれによる精細管の狭小化ないし閉塞が挙げられる^{1,2)}。欄ら³⁾は精細管壁の主要な構成成分である酸性複合糖質を, また高羽⁴⁾はコラーゲン等をそれぞれ検索して精細管壁の肥厚と造精能障害との関連

について検討を行った。今回著者は、本病態において顕著な所見である精細管壁の肥厚に着目し、近年開発された鋭敏な酸性複合糖質検出法である増感ジアミン法⁵⁾を用い、より詳細な酸性複合糖質の分子種ないし分子種群についての検討を行い、欄らの研究に対してさらなる考察を加えてこの病態解明を試みた結果若干の知見をえたので報告する。

対 象

名古屋大学医学部泌尿器科不妊外来を受診し精巣生検を施行した男子不妊症患者を対象とした。特発性男子不妊症37例でその患者の内訳は乏精子症21例、無精

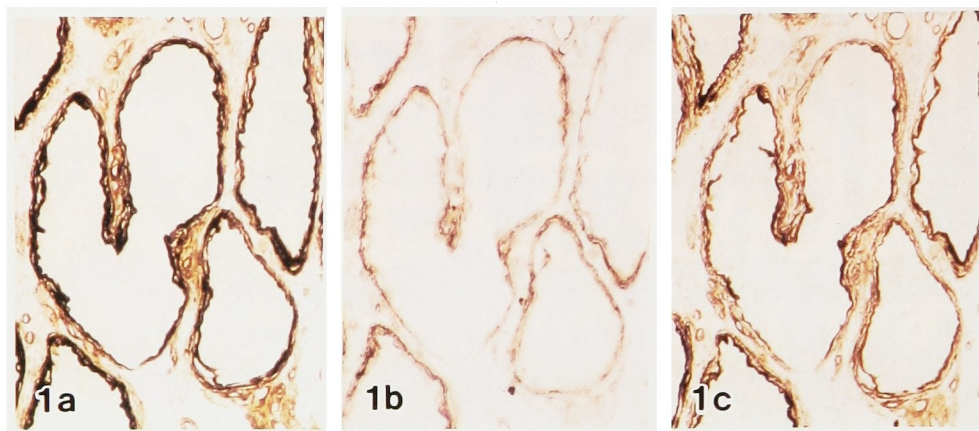


Fig. 1. Seminiferous tubular walls of normal testes. a) stained with sensitized high iron diamine (S-HID), b) stained with S-HID following digestion with chondroitinase B (Chase B/S-HID) and c) stained with S-HID following digestion with testicular hyaluronidase (T-Hylase/S-HID). $\times 130$.

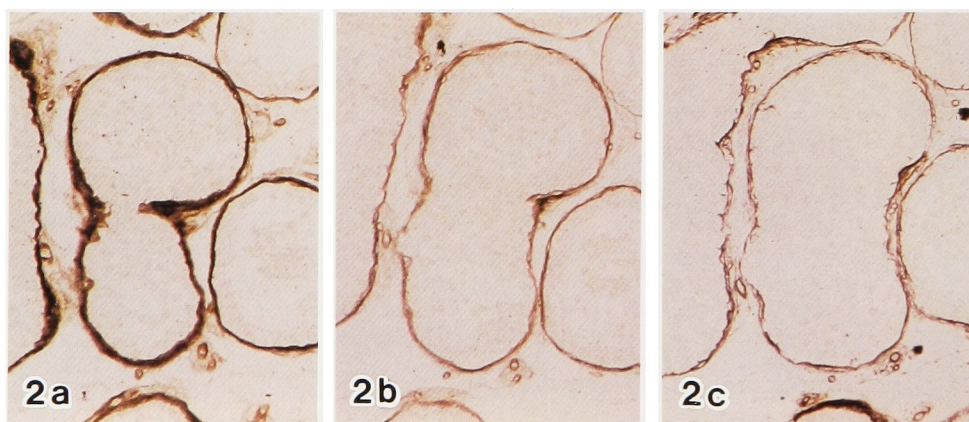


Fig. 2. Seminiferous tubular walls of oligozoospermia without peritubular thickening, a) S-HID, b) Chase B/S-HID and c) T-Hylase/S-HID. $\times 130$.

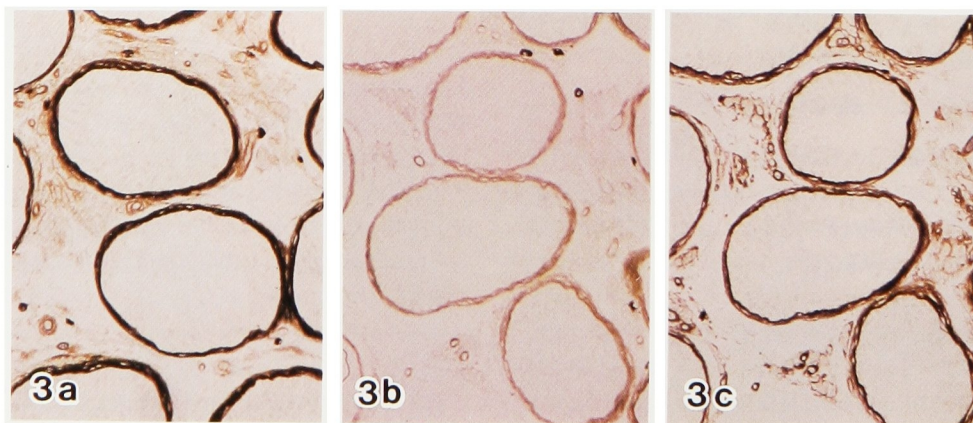


Fig. 3. Seminiferous tubular walls of azoospermia without peritubular thickening, a) S-HID, b) Chase B/S-HID and c) T-Hylase/S-HID. $\times 130$.

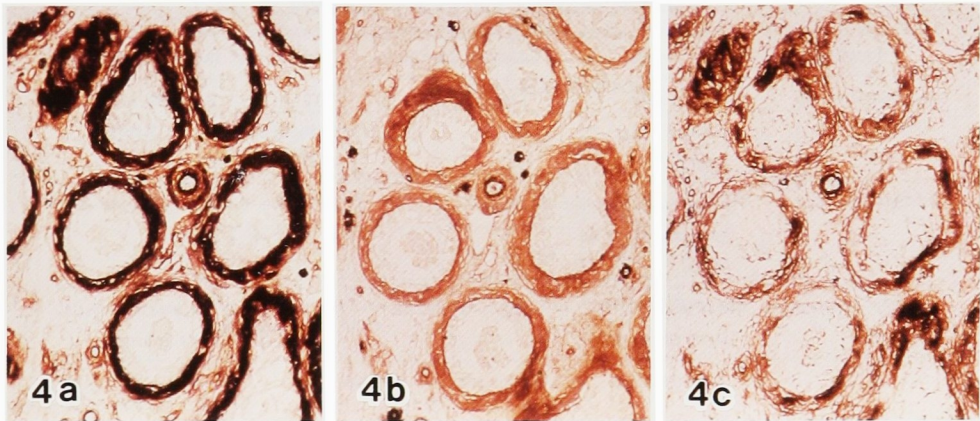


Fig. 4. Thickened seminiferous tubular walls of oligozoospermia, a) S-HID, b) Chase B/S-HID and c) T-Hylase/S-HID. $\times 130$.

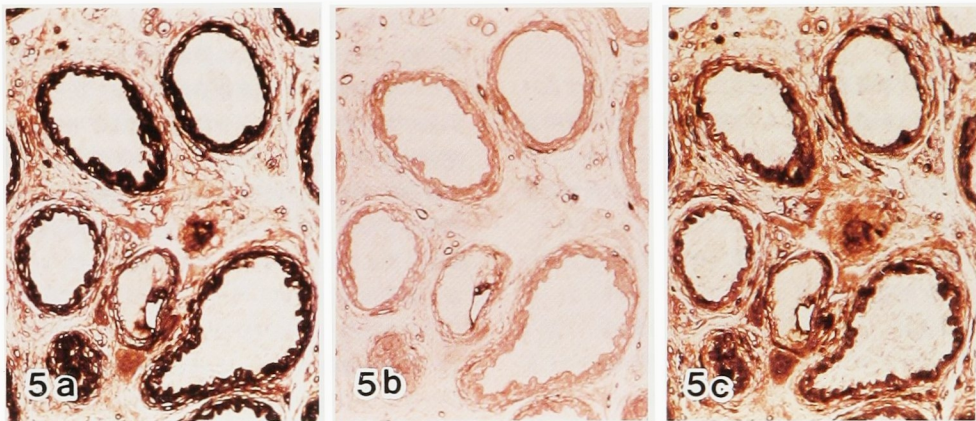


Fig. 5. Thickened seminiferous tubular walls of azoospermia, a) S-HID, b) Chase B/S-HID and c) T-Hylase/S-HID. $\times 130$.

子症16例であった。正常対照群としては精管結紮を希望して来院した正常男性9例の精管結紮時に採取した精巣組織を用いた。

方 法

1. 組織調製法

組織試料は Charny の方法⁶⁾に準じ精巣生検を行い採取した後、ただちに Carnoy 液に浸漬し、室温にて3時間固定した。固定組織塊を常法に従ってエタノール脱水ならびにパラフィン包埋した後、厚さ $3\mu\text{m}$ の連続切片を作製し、ゼラチン処理したスライドガラスに貼付した。

2. 染色法

キシレンおよびエタノール系列で水和した切片に組織学的検討を行うためにヘマトキシリン・エオジン (以下 HE と略す) 染色法を、また酸性複合糖質の組

織化学的検討を行うために増感高鉄ジアミン (以下 S-HID と略す) 染色法を以下の手順により行った。増感高鉄ジアミン (S-HID) 染色法⁵⁾

水和切片を：

- ①高鉄ジアミン液 [N,N'-ジメチル-p-フェニレンジアミン1塩酸塩 20mg, N,N'-ジメチル-m-フェニレンジアミン2塩酸塩 120mg を 50ml の蒸留水に溶解し40%塩化第二鉄溶液 (5%塩酸含有) 1.4ml を加える。] に $25\sim 30^{\circ}\text{C}$ にて60分浸漬する。
- ②10～20分流水水洗し、蒸留水にて短時間水洗する。
- ③0.5mM トリクロロ (エチレン) 白金酸カリウム溶液 [0.05M Clarke-Lubs (ホウ酸・水酸化ナトリウム) 緩衝液 (0.1M ホウ酸-0.1M 塩化カリウム) 溶液 50ml に 0.1M 水酸化ナトリウム溶液 4ml を加え蒸留水で 100ml とする。pH 8.0) 100ml にトリクロロ (エチレン) 白金酸カリウム 18.4mg

Table 1. Enzyme digestion procedures

Enzymes	Origin	Substrate specificity	Conditions of the enzyme digestion
Chondroitinase ABC (Protease Free)	Proteus vulgaris (Seikagaku Kogyo Co., Japan)	CHS-A, B, C, D, E, HA, CH	1.0 U/ml in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) containing 0.03 M sodium acetate. at 37°C for 3 hours.
Chondroitinase B	Flavobacterium heparinum (Seikagaku Kogyo Co., Japan)	CHS-B	0.5 U/ml in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) at 30°C for 3 hours.
Testicular hyaluronidase (Type VIII)	Bovine testis (Sigma Chem., USA)	CHS-A, C, HA, CH	1.0 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer (pH 5.5) at 37°C for 3 hours.

CHS: chondroitin sulfate, HA: hyaluronic acid, CH: chondroitin

を溶解する]に室温で60分浸漬する。

- ④10～20分流水水洗し、蒸留水にて短時間水洗する。
- ⑤0.1～0.5%水素化ホウ酸ナトリウム含有1.0%無水リン酸水素二ナトリウム溶液中に室温にて10～30秒浸漬する。
- ⑥10～20分流水水洗し、蒸留水にて短時間水洗する。
- ⑦暗箱または安全灯を備える暗室内にて物理現象液(*)中に20°Cにて5～10分浸漬して現象する。

(*)物理現象液は下記のA, B両液を使用直前に混和して使用する。

A液: 20%アラビアゴム水溶液(**) 45 ml
10%硝酸銀水溶液 1 ml
B液: 蒸留水 15 ml
ヒドロキノン 100 mg
クエン酸 300 ml

(**)アラビアゴム水溶液は溶解後4°Cにて超遠心(12,000 rpm, 60分)して、その上清を使用する。

- ⑧蒸留水にて短時間洗浄する。
- ⑨5倍希釈した写真用定着液(スーパーフジフィクス)に室温で2分浸漬する。
- ⑩10～20分流水水洗する。
- ⑪エタノール系列にて脱水する。
- ⑫キシレンにて透徹した後HSR液にて封入する。

〔染色結果〕本法によれば硫酸基を有する酸性複合糖質は褐ないし黒色に着色する。

また組織中に含まれる酸性複合糖質の分子種を同定するために、Table 1の条件によりグリコサミノグリカン分解酵素であるchondroitinase ABC^{7,8)}, chondroitinase B^{9,10)}ならびにtesticular hyaluronidase^{8,11)}による酵素消化法をS-HID染色法に先立ち施行した。酵素消化法の対照は、切片に酵素消化を行わず無処理としたもの、または、酵素を除いた溶媒(緩衝液)にて酵素消化法と同温度、同時間浸漬したものをを用いた。

結 果

1 組織学的所見

正常精巣組織では精細管壁の肥厚は見られず、間質、精上皮においても特に異常な所見は観察されなかった。特発性男子不妊症精巣組織では、精細管腔の狭小化や壁の肥厚などを示す精細管および増加した間質細胞が観察され、種々の程度の造精能障害を認めた。これらのHE染色の所見によって精細管壁の肥厚の程度にしたがって、乏精子症ならびに無精子症精巣組織を2群に大別し、組織化学的に検索した。

2. 組織化学的所見

1) 正常精巣

S-HID染色により、すべての精細管壁が黒色の強陽性反応を示した(Fig. 1a)。本組織にchondroitinase B消化(Fig. 1b)ならびにtesticular hyaluronidase消化(Fig. 1c)を行うと壁のS-HID染色性は著明に減弱した。またchondroitinase ABC消化によりこれらのS-HID染色性は陰性化した。

2) 精細管壁の軽度な肥厚(正常とほぼ同様の厚さ)を示す特発性男子不妊症精巣

乏精子症精巣では、S-HID染色によりすべての精細管壁が黒色の強陽性反応を示した(Fig. 2a)。本組織にchondroitinase B消化(Fig. 2b)ならびにtesticular hyaluronidase消化(Fig. 2c)を施すと壁のS-HID染色性は顕著に減弱した。

無精子症精巣では、乏精子症精巣の場合と同様にS-HID染色によりすべての精細管壁が強陽性反応を示した(Fig. 3a)。本組織にchondroitinase B消化を施すと、壁のS-HID染色性は顕著な減弱を示した(Fig. 3b)が、testicular hyaluronidase消化ではS-HID染色性は弱いし中等度の減弱を示すのみであった(Fig. 3c)。

上述の2種の精巣組織にchondroitinase ABC消

Table 2. Acidic glycoconjugate contents in seminiferous tubular walls in idiopathic male infertility

Thickness of seminiferous tubular walls	Normal	Oligozoospermia		Azoospermia	
		TL	TH	TL	TH
CHS-A, C	卅	卅	卅	+	—~+
CHS-B	卅	卅	卅	卅	卅

TL: Thickless seminiferous tubular walls, TH: Thick seminiferous tubular walls,
CHS: Chondroitine sulfate

化を施すと壁の S-HID 染色性はいずれも陰性化した。

3) 精細管壁の高度な肥厚を示す特発性男子不妊症精巣

乏精子症精巣に S-HID 染色を施すと肥厚し層状化した精細管壁が中等度ないし強陽性の不均一な染色像を示した (Fig. 4a)。本組織に chondroitinase B 消化を行うと、壁の S-HID 染色性は中等度の減弱を示した (Fig. 4b)。また testicular hyaluronidase 消化を行うと、壁の S-HID 染色性が僅かに消化に抵抗する部分も観察されたが、全体的には顕著な減弱が認められた (Fig. 4c)。

無精子症精巣組織では、S-HID 染色を施すと、不均一に肥厚し層状化した精細管壁が顕著な陽性反応を示した (Fig. 5a)。本組織に chondroitinase B 消化を施すと壁の S-HID 染色性は顕著に減弱した (Fig. 5b) が、testicular hyaluronidase 消化では肥厚層状化した壁の S-HID 染色性は乏精子症精巣の場合と異なり有意な減弱を示さなかった (Fig. 5c)。

上述の2種の精巣組織に chondroitinase ABC 消化を施すと壁の S-HID 染色性はいずれも陰性化した。

3. 酵素消化法の対照に関する所見

本研究で用いた酵素消化法の対照は、無処理の組織切片ならびに酵素を含まない溶媒 (緩衝液) による浸漬を行った組織切片のいずれの場合においても S-HID 染色の染色性を変化させなかった。

考 察

本研究において用いた酸性複合糖質検出法の選択性および特異性ならびにグリコサミノグリカン分解酵素消化法の基質特異性⁷⁻¹¹⁾を考慮して、精細管壁に含まれるコンドロイチン硫酸 (以下 CHS と略す) 異性体分子種について考察したものが Table 2 である。

正常精巣組織の精細管壁には CHS-A, B および C

が存在した。

乏精子症精巣の精細管壁には壁の肥厚の程度に関係なく、正常精巣同様に、CHS-A, B および C が存在した。

無精子症精巣の精細管壁では CHS-B については正常および乏精子症精巣と同様であったが、CHS-A および C については正常および乏精子症精巣と異なり顕著に減少していた。また、この所見は壁の肥厚が著明になるにつれて、CHS-A および C の減少傾向が顕著となることが観察された。

CHS-A, C は軟骨に多く含まれる酸性複合糖質分子種であり、そのプロテオグリカン (以下 PG と略す) はヒアルロン酸を介してⅡ型コラーゲンとの関連が深い¹²⁾。また CHS-B は皮膚に多く含まれる酸性複合糖質分子種であり、その PG の多くはⅢ型コラーゲンと結合しているとされている^{12,13)}。近年、軟骨や皮膚に分布する PG とは分子サイズが異なり、かつ CHS-A, C ならびに B の混合鎖を持つ M 型 PG が皮膚、腱、角膜、発生初期結合組織などで見出され、これらの PG がヒアルロン酸のみならずⅠ, Ⅱ, Ⅲ, V 型コラーゲンやフィブロネクチンにも結合能を示すことが判明してきた^{13,14)}。また M 型 PG はニワトリ胚の肢芽の軟骨形成や羽毛原基の形成において上皮細胞基底膜と間質との間に広く分布して細胞増殖ならびに細胞移動時に増加し、その後には急速に減少することが知られている^{15,16)}。

他方、高羽⁴⁾は、特発性男子不妊症精巣の肥厚した精細管壁では正常精巣のそれと比較してⅠ型およびⅢ型コラーゲンが増加していることを観察したが、上述のような PG とコラーゲンとの関連を考慮すると、この所見は本研究における PG の変化と相応するものと考えられる。

現在、特発性男子不妊症は、精細管壁の肥厚が生じこれによって引き起こされる精上皮の栄養障害が病態の一因とも考えられているが、本研究の結果ならびに

現在知られている PG の分化・増殖に関する役割から考えて、CHS-A, B および C が精上皮細胞においてもその分化・増殖になんらかの役割を担っているものと考えられる。従って、本病態は精細管壁の肥厚による物質の透過性の異常による単純な栄養障害によるのみではなく、精細管壁に含まれる酸性複合糖質の質的ならびに量的変化に起因している可能性が示唆される。この事実は、また、乏精子症と無精子症の両者が根本的に異質の病態である可能性をも示唆するものである。

本研究の結果によって、欄らの研究³⁾において不明であった特発性男子不妊症精巣における造精能障害の程度と PG との関連性のある程度解明することはできたが、乏精子症および無精子症における精細管壁の PG 分子種の相違を如何に解釈するかは依然不明である。今後の基礎的ならびに臨床的研究による PG 分子の機能解明によって特発性男子不妊症の成因ならびに病態の経過がより明らかにされるものと考えられる。

結 語

- 1 特発性男子不妊症精巣の精細管壁における酸性複合糖質を組織化学的に検索した。
- 2 正常および乏精子症精巣の精細管壁に分布する酸性複合糖質分子種は CHS-A, B および C であった。
- 3 無精子症精巣の精細管壁に分布する酸性複合糖質分子種は CHS-B が主体であった。
- 4 特発性男子不妊症精巣の造精能障害は精細管の壁の肥厚による単純な栄養障害のほか、精細管の壁に含まれる酸性複合糖質分子種の相違による機能的な相違も密接に関連しているものと考えられた。

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導ならびに御校閲を賜った恩師三宅弘治教授に感謝いたします。また、本研究に多大なる御指導御鞭撻をいただいた名古屋市立大学医学部第二解剖学教室山田和順教授、平林義章助手に深謝いたします。

本論文の要旨は、第11回日本アンドロロジー学会学術大会(1992年 宇部)において発表した。

文 献

- 1) Nistal M and Paniagua R: Testicular and Epididymal Pathology. 1st ed., pp. 94, Thieme-Stratton Inc., New York, 1984
- 2) 三宅弘治: 精巣生検よりみた特発性男子不妊症. 泌尿紀要 29: 991-1004, 1983
- 3) 欄 芳郎, 三宅弘治, 三矢英輔: 特発性男子不妊症における精巣組織の組織化学的研究. 第1報

複合糖質(特に酸性ムコ多糖を中心に). 日泌尿会誌 71: 1271-1280, 1980

- 4) 高羽秀典: 特発性男子不妊症の精巣の形態学的研究. 一細胞外基質(各型コラーゲンとラミニン)の変化に対する免疫組織化学的検討一. 泌尿紀要 36: 1173-1180, 1990
- 5) Hirabayashi Y: Light-microscopic detection of acidic glycoconjugates with sensitized diamine procedures. Histochem J 24: 409-418, 1992
- 6) Charny CW: Testicular biopsy. Its value in male sterility. JAMA 115: 1429-1433, 1940
- 7) Yamagata T, Saito H, Habuchi O, et al.: Purification and properties of bacterial chondroitinases and chondrosulfatases. J Biol Chem 243: 1523-1535, 1968
- 8) 山形達也: コンドロイチン硫酸構造の多様性とコンドロイチン硫酸分解酵素. 蛋・核・酵 14: 1152-1171, 1969
- 9) Michelacci YM and Dietrich CP: A comparative study between a chondroitinase B and a chondroitinase AC from Flavobacterium heparinum. Isolation of a chondroitinase AC-susceptible dodecasaccharide from chondroitin sulphate B. Biochem J 151: 121-129, 1975
- 10) Ototani N and Yoshizawa Z: Purification of chondroitinase B and chondroitinase C using glycosaminoglycan-bound AH-sepharose 4B. Chabohydr Res 70: 295-306, 1979
- 11) Leppi TJ and Stoward PJ: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid mucin in tissue sections. J Histochem Cytochem 13: 406-407, 1965
- 12) 梶川欽一郎: 結合組織. pp. 1-588, 金原出版, 東京, 1984
- 13) 林 利彦: 2.1 コラーゲン. 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. 藤本大三郎編. pp. 5-47, アイビーシー, 東京, 1990
- 14) 木全弘治: 2.3 プロテオグリカンの構造と機能. 細胞外マトリックスのバイオサイエンスとバイオテクノロジー. 藤本大三郎編. pp. 89-110, アイビーシー, 東京, 1990
- 15) Kimata K, Oike Y, Tani K, et al.: A large chondroitin sulfate proteoglycan (PG-M) synthesized before chondrogenesis in the limb bud of chick embryo. J Biol Chem 261: 13517-13525, 1986
- 16) Kitamura K: The structure and distribution of proteochondroitin sulfate during the formation of chick embryo feather germs. Development 100: 501-512, 1987

(Received on November 30, 1992)

(Accepted on January 28, 1993)

(迅速掲載)