

スメア一部分の染色が強くきれいな ladder は通常のエチジウム染色法では検出しにくい。DNA の 3'-OH を酵素的に ³²P アナログで標識し、オートラジオグラフィーにて検出する高感度法もあるが、アポトーシスの DNA 二本鎖切断のみを検出しているのではない点を強調したい。

4) その他：通常の組織染色である、ヘマトキシリン/エオシン染色でも或る程度アポトーシス細胞は同定されるが、その検出感度は一般的に低い。分散精巣細胞なら、propidium iodide 等により DNA 染色後、flow cytometry により 1C 以下の蛍光強度のピークを検討することによりアポトーシスを観察可能であった 12,13) が、ネクローシスの存在は否定できない。

5. 胎仔期及び周産期マウス精巣に於ける始原生殖細胞死 (図1) (図2)

1) PGC の移住直後の生殖細胞死：哺乳類精巣の実質的な発生・分化は、PGC が卵黄嚢壁より精巣原基に漂着してから開始するものであるが、それ以降周期的な精子形成過程が始まるまで様々な段階で生殖細胞の大量消失が生じる。胎生期のマウスでは、PGC は胎生 12 日目辺りに精巣原基に漂着し、13 日目以降増殖活性の顕著な増大と共に頻回な生殖細胞死を示す。Couchouvanis 等 13) は flow cytometry を用いて検討し、胎生 13-17 日目まで約 4% の一定の頻度で PGC にアポトーシスが生じると報告した。我々は、より定義に即したアポトーシスの頻度を得るため電子顕微鏡により形態観察 14) を行い、直接アポトーシス細胞を計数した所、確かに胎生 13-15 日目では PGC に典型的なアポトーシスが多数観察されたが、その頻度は一定では決してなく 13 日をピークに次第に減少し 17 日までにアポトーシス像は消失した。

図 1 に示したように、PGC のアポトーシス形態は大きく 3 つの段階に分類可能である。Early stage では、クロマチンの核内凝集を有す典型的なアポトーシス像を呈するが、Intermediate stage では核部分と細胞質小器官群とが対峙する奇妙な様相を呈す。更に進んで Late stage に於いては、核成分並びに細胞質成分はそれぞれ凝集塊として散在し、むしろネクローシス形態に近い。これらの形態を示す細胞を全てアポトーシス像として計数するとその変化は図 2 のようであった。これらのアポトーシス形態は、成熟精巣での精子形成過程で見られるアポトーシス像と一致するもので、PGC から既に見られる生殖細胞特有の形態と考えられた。(図1) (図2)

2) 周産期に於ける生殖細胞死：胎生 17 日目になると、アポトーシス像は全く見られなくなるが、一方アポトーシスとネクローシスの中間的な形態、則ち細胞全体としては電子密度が増大し成分の凝集が起こるが、核ではクロマチンの変性が認められ、一方細胞内小器官の崩壊が認められた。その後、出生直後には細胞全体の電子密度も減少し、いわゆるネクローシスへ更に類似した様相を呈する細胞が多数出現した。この種の細胞は TUNEL 陰性で、ネクローシスの一種と見られるが、その詳細は不明である。

出生後の雄性生殖細胞の挙動については多くの研究があるが、生後一週間以内に約 50-75% の精子形成細胞が消滅することが Roosen-Runge と Leik 等 15) により示されている。特に出生直後では、"very dark cells" 16 と呼ばれる核と細胞質に高い電子密度を示し且つ細胞内小器官の破壊を伴う細胞が多数観察されている。

ここで特に重要なことは、胎生後期から周産期に於いてネクローシス様な形態の細胞退縮が認められることで、発生過程で見られる細胞死は "programmed cell death" と呼ばれ更にアポトーシスと同義語として見なされているが、これは明らかに過大解釈である点を認識することであろう。

3) 精子形成過程の開始期に於ける生殖細胞死

マウスでは、生後 4-6 日目から精子形成過程が開始するが、その過程で多数の精原細胞が産生され、それに伴い典型的なアポトーシス像が再現する。ここで観察される精原細胞死は、通常と異なり精細管の基底膜とは離れた管腔内に認められる (14)。これらの細胞の電顕的形態 (17) は成熟精巣の精原細胞で認められるアポトーシス形態と一致しており、TUNEL も陽性であった。その出現ピークは生後 10 日目あたりであった (図 2)。最近アポトーシス誘導を阻害する遺伝子である Bcl-2 蛋白を過剰発現する transgenic マウスにおいてこれらのアポトーシスが阻害され、最終的に精子形成過程の異常に連なることが報告された (18)。精子形成過程開始期の精原細胞アポトーシスの誘導には、Bcl-2 と複合体を形成することによりその機能を中和する蛋白である Bax 発現の増大が関係しているようである。又、この時期に於ける精原細胞のアポトーシスによる除去は、栄養細胞である Sertoli 細胞の維持能力を越える過剰な精子形成を予め防ぐ狙いがあると思われる。

4) 成熟精巣に於ける生殖細胞死

正常成熟個体での精子形成過程では、種々の分化段階の生殖細胞で細胞死が生じていることが古くから知られているが、それがアポトーシスかネクロシスかについては議論となっていた。Allan 等は、電子顕微鏡的な観察に基づいて精原細胞の細胞死はアポトーシスであるが、精母細胞等に生じている細胞死はネクロシスであると報告した (19)。一方 Kerr は、精母細胞も光顕的なアポトーシスの形態として理解されている pyknosis 像を示すことを明らかにした (20)。その後、TUNEL 染色の結果精母細胞の核も染色されると共にその出現率と DNA ladder の染色強度が良く相関することが判明し、精子形成細胞の場合は形態的には必ずしも典型的なアポトーシス像を呈していなくてもアポトーシスと見なされるようになった。

正常状態で生じる生殖細胞アポトーシスが生殖上皮周期のどの様なステージで好発するかについては、ラットではステージ I-IV と XI-XIV 即ち減数分裂の分裂期前後 (21) で、又マウスでもステージ XII 辺りの減数分裂分裂期前後の premeiotic 生殖細胞で頻回であることを我々は観察している。

尚、成熟精巣で見られる精子形成細胞アポトーシスの誘導の分子機構に関しては現在不明である。また、Bcl-2 の過剰発現マウスでも、成熟精巣アポトーシスを阻害することは出来ない (18)。

6. 内分泌系の人為操作に伴うアポトーシスの変化

1) 下垂体摘出モデル: Tapanainen 等 (22) によると、幼若ラット (21 日齢) から下垂体摘出を行うと、精巣から抽出した DNA のアガロースゲル電気泳動に於いて、2 日後では明らかな ladder が観察された。Russel & Clermont (23) による、下垂体摘出後 5.5 日でステージ VII の精母細胞と精子細胞に顕著な退化が生じるという観察に基づいて考えると、この ladder 形成は主として精母細胞に由来するものと考えられる。また FSH 或いはテストステロン投与により顕著に ladder 形成が抑えられることから、下垂体摘出に伴う精母細胞のアポトーシスの誘導はテストステロンの欠損によると考えられた。

2) GnRH antagonist 投与モデル: 上記の下垂体摘出モデルと同様の機構に絡むアポトーシス研究モデルとして GnRH antagonist の腹腔投与も利用されている。Billig 等 (24) は、幼若ラット (16-32 日齢) に azaline-B を投与して検討した所、DNA ladder 形成の観察と共に TUNEL による精母細胞の陽性染色結果を得た。一方成熟ラットでの同様の検討では FSH と LH のレベルの顕著

な減少は認められたにもかかわらず azaline-B の効果は見られなかった。このことは、最初の精子形成過程は以降の過程と比較して FSH の要求性と同様にテストステロンへの要求性も高いことを示している。

本研究では、成熟ラットの特にステージ VII でアポトーシスが観察されず、むしろステージ I と XII-XIV で精母細胞のアポトーシスが頻度高く見られたことは要注意である。Sinha Hikim 等 25) は、GnRH antagonist として Nal-Glu を成熟ラットに投与した所、テストステロンの消失とステージ VII での精母細胞並びに精子細胞のアポトーシスを見出した。この結果はアンドロゲン受容体発現が、同じくステージ VII の Sertoli 細胞で強く発現していることを考慮すると合理的であるが、Billig 等の内容とは矛盾する。両論文での成熟 spermatogenesis のステージ VII への両拮抗剤の作用の差異は、後述するように薬理的な機構の違いを反映している可能性もあり検討を要する 21)。

3) 潜伏辜丸モデル：加温による spermatogenesis の阻害モデルとして潜伏辜丸は頻用されるものの一つで特に A 精原細胞以外の生殖細胞を退化消滅することが出来る。Sikone 等 26) は、幼若ラット (22 日齢) 精巣を腹腔内に固定し、潜伏精巣とすると 7 日以内に DNA ladder 形成が 3-4 倍となり、TUNEL により主として精母細胞がアポトーシスを起こしていることが明らかとなった。この際、血中テストステロンレベルには変化がなかった。成熟ラットで潜伏精巣を起こすと、24-28 時間で明らかに精原細胞以外の生殖細胞にそのステージに関わらずアポトーシスの誘導が観察された 27)。

従って、このアポトーシスの誘導には、ホルモン非依存的な障害機構が関わっていることが予想される。一般的に精原細胞は加温に抵抗性を示すが、他の細胞は弱く加温効果により死滅するのは予想できることであるが、これらの研究はそれがアポトーシスを介していることを示した訳である。もっとも、Allan 等 28) によると、精巣を 43 °C で 30 分加温処理すると精原細胞と preleptotene 精母細胞はアポトーシスを示すが他の精母細胞はネクローシスを生じるとあるので、加温の程度で死滅様式が変化する可能性もある。

4) エストロゲン大量投与モデル：成熟マウスにエストロゲンを大量投与すると type B 精原細胞以降の分化段階の生殖細胞が消失することが知られている 29)。我々も、成熟マウス腹腔内へ β -estradiol-3-benzoate を連続大量投与したところ特に精母細胞並びに精子細胞が TUNEL 陽性となり、アポトーシスで死滅していることが判明した。この際、後述するアポトーシス誘導受容体である Fas が生殖細胞に強く発現され、また Sertoli 細胞によるアポトーシス誘導シグナルである Fas リガンド発現も増強されていることも判った 30)。エストロゲン大量投与による雄性生殖細胞アポトーシス誘導と同様な現象が diethylstilbestrol 投与で生じることも既に報告されている 31)。

7. 生殖毒性物質のアポトーシスへの影響

Troiano 等 12) は、ethane dimethane sulphonate を成熟ラットに投与し、Leydig 細胞を障害し血中テストステロンを検出レベル以下に下げ、生殖細胞の DNA 量を flow cytometry で検討した。その結果 DNA の断片化が検出されアポトーシスの誘導が示唆されるが、DNA ladder は認められなかった。

Ku 等 32) は、2-methoxyethanol の精母細胞への毒性をラットとモルモットで検討し、pachytene 精母細胞でラットでは形態的にはネクローシス像を示し、モルモットではアポトーシス像を示すこ

とが明らかにした。しかし、両者で共に DNA ladder の出現と TUNEL 陽性像が得られ、最終的には両種で pachytene 精母細胞はアポトーシスを起こしたものと判定された。この様に種々の薬剤で精子形成細胞にアポトーシスが誘導されることが明らかとなってきたが、その好発生殖上皮周期についても興味ある知見が報告されつつある。Cai 等 21) は、抗ガン剤である cyclophosphamide のラットへの投与による生殖細胞アポトーシスの誘導がステージ I-IV と XI-XIV で顕著であることを示し、methoxyacetic acid 投与の場合 33) と同様に減数分裂の分裂期前後が影響を受けやすいことが判明した。更に Lee 等 34) は、成熟マウス精巣にて mono-(2-ethylhexyl)phthalate や 2,5-hexanedione 等の Sertoli 細胞障害剤投与により TUNEL 染色からみた生殖細胞アポトーシスの増大を認めた。

8. 精子形成細胞アポトーシスと Fas/Fas ligand 系

アポトーシスが注目を集めている最も大きな理由は、その死過程が特定の遺伝子によって制御されているという点にある。我々は、Fas/Fas ligand 系の生殖細胞アポトーシス誘導への関与を考え種々のアプローチを行ってきた。Fas 35) は膜貫通型の糖蛋白質抗原で、この抗原に対する IgM 抗体を作用することによりアポトーシスを引き起こすことが知られる。Fas の遺伝子は後にクローニングされ TNF/nerve growth factor 受容体 family に属することが判明し、更に Fas と同様の機能を持つ APO-1 と同一物質であることも判明した。Fas の天然のリガンドとして type II の膜貫通型蛋白である Fas ligand が発見され 35)、自己免疫疾患等での免疫系に絡んだ役割を中心として解析が進められている。更に免疫系以外でも、卵巣での卵胞閉鎖への関与 36) や潰瘍性大腸炎 37) 或いは腎虚血再灌流における尿細管上皮のアポトーシスの誘導 38) には Fas/Fas ligand 系の関与が強く示されている。成熟マウス精巣では、正常でもある程度の TUNEL 陽性細胞が認められ特に精原細胞と精母細胞に生じる。我々が独自に作製した抗 Fas 及び抗 Fas ligand 抗体は、ホルムアルデヒド固定パラフィン切片で特異的シグナルを検出できるユニークなものであるが、これらを用いて精巣での発現を検討した 3,39)。その結果、Fas は Leydig 細胞と生殖細胞に散発的に発現しており、Fas ligand は Sertoli 細胞に特異的に検出された。しかしながら、切片上では同一精細管内での両者の同時発現は観察されず自然に生じているアポトーシスの関与については現在疑問が残る。また、常染色体劣性遺伝突然変異マウスである lpr (lymphoproliferation) (レトロウイルストランスポゾンの Fas 遺伝子第二イントロンへの挿入があり、転写活性が著しく低下している) や gld (generalized lymphoproliferative disease) マウス (Fas ligand の細胞質部分に点突然変異がありその機能を失っている) でも、TUNEL 陽性細胞を多数検出することから Fas 系が精巣でのアポトーシス誘導の唯一の系ではないことが明らかである 3)。Sertoli 細胞が発現する Fas ligand の生理的機能については、精巣内への免疫細胞の進入を阻止するためである可能性が指摘されている。抗原刺激等で活性化された T 細胞はしばしば Fas 陽性であるからである。

最近になって、Lee 等 35) は我々の結果と同様に成熟マウス精巣にて Fas 並びに Fas ligand 発現を確認し、更に mono-(2-ethylhexyl)phthalate や 2,5-hexanedione 等の Sertoli 細胞障害剤投与により両遺伝子発現の顕著な増大と TUNEL 染色からみた生殖細胞アポトーシスの増大が認められ、障害モデルに於ける生殖細胞死誘導への Fas 系の関与が示唆された。我々もマウス虚血再灌流精巣モデル並びにエストロゲンの大量投与精巣モデルに於いて同様の知見を得た 30,39)。

9. ヒト精巣病態とアポトーシス

ヒトの精子形成過程に於いてアポトーシスの詳細な研究は見当たらないが、少なくとも減数分裂過程、特に第二次精母細胞当たりで約 45%の細胞が消失していることが知られている。我々は、ヒト精巣性不妊に於ける病態の一つとして知られている maturation arrest への生殖細胞死の関与を検討しているが 40)、多くの症例で残り少ない生殖細胞集団で TUNEL 陽性精原細胞並びに精母細胞を見い出しており、電顕的検討でもアポトーシスが好発しているのが認められている。面白いことにこれらの症例では、Fas 陽性生殖細胞と Fas ligand 陽性 Sertoli 細胞が隣接して存在しており、Fas 系がアポトーシス誘導原因となっている可能性が示唆された。

10. 結語

以上述べてきたように哺乳類精子形成過程に於いて、特に生殖細胞死に関してはその生理的特性や個体発生的変化はもとより種々の生殖毒性を示す化学物質の影響も分子レベルで解析が可能となってきている。現在、内分泌攪乱物質による影響として社会的に大きな衝撃を起こしている精子数の減少問題は、いたずらに驚き恐れるのではなく個々の物質について直接的な評価系を用いて検証することが必要であると強く思われる。このための検証系として、マウス精子形成過程に於ける生殖細胞アポトーシス誘導作用の検討は、個体レベルで胎仔、新生仔、幼若及び成熟期に渡って科学的な因果関係をもって種々の物質の内分泌生殖毒性の評価を可能とする点多いに魅力ある評価系と思われる。

11. References

- 1) Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, et al: Evidence for decreasing quality fo semen during past 50 years. *Br Med J* 305: 609-613, 1992
- 2) Sharpe RM & Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395, 1993
- 3) 小路武彦: 精巣機能とアポトーシス. *ホルモンと臨床* 45 (3): 255-262, 1997
- 4) Kerr JFR, Wyllie AH & Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 5) 小路武彦 & 中根一穂: アポトーシス概論. in *現代病理学大系 補遺 1*, 東京, 中山書店, 35-45, 1995
- 6) Blanco-Rodriguez J & Martinez-Garcia C: Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 29: 13-31, 1996
- 7) Dini L, Coppola S, Ruzittu MT & Ghibelli L: Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation. *Exp Cell Res* 223: 340-347, 1996
- 8) Koji T: Nonradioactive in situ nick translation: A useful molecular histochemical tool to detect single-stranded DNA breaks. *Acta Histochem Cytochem* 29: 71-79, 1996
- 9) Gavrieli Y, Sherman Y & Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 10) Hashimoto S, Koji T, Niu J, et al: Differential staining of DNA strand breaks in

- dying cells by non-radioactive in situ nick translation. *Arch Histol Cytol* 58: 161-170, 1995
- 11) Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284: 555-556, 1980
 - 12) Troiano L, Faustini Fustini M, Lovato E, et al: Apoptosis and spermatogenesis: evidence from an in vivo model of testosterone withdrawal in the adult rat. *Biochem Biophys Res Commun* 202: 1315-1321, 1994
 - 13) Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, et al: Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 209: 238-247, 1993
 - 14) Wang R-A, Nakane PK & Koji T: Autonomous cell death of mouse male germ cells during fetal and postnatal period. *Biol Reprod* 58: 1250-1256, 1998
 - 15) Roosen-Runge EC & Leik J: Gonocyte degeneration in the postnatal male rat. *Am J Anat* 122: 275-300, 1968
 - 16) Miething A: Germ-cell death during prespermatogenesis in the testis of the golden hamster. *Cell Tissue Res* 267: 583-590, 1992
 - 17) Koji T & Wang R-A: Male germ cell death in mouse testes. In *Apoptosis: Its role and Mechanism* (ed by Yamada T & Hashimoto Y), Tokyo, Business Ctr. for Acad. Soc. Japan, 85-96, 1998
 - 18) Rodriguez I, Ody C, Araki K, et al: An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO J* 16: 2262-2270, 1997
 - 19) Allan DJ, Harmon BV & Roberts SA: Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif.* 25: 241-250, 1992
 - 20) Kerr JB: Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J Reprod Fert* 95: 825-830, 1992
 - 21) Cai L, Hales BF, & Robaire B: Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 56: 1490-1497, 1997
 - 22) Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, et al: Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol* 7: 643-650, 1993
 - 23) Russel LD & Clermont Y: Degeneration of germ cells in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 187: 347-366, 1977
 - 24) Billig H, Furuta I, Rivier C, et al: Apoptosis in testis germ cells: developmental changes in gonadotropin dependence and localization to selective tubule stages. *Endocrinology* 136: 5-12, 1995
 - 25) Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, et al: Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 136: 2770-2775, 1995

- 26) Shikone T, Billig H & Hsueh AJW: Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod* 51: 865-872, 1994
- 27) Henriksen K, Hakovirta H & Parvinen M: In-situ quantification of stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: effects of short-term experimental cryptorchidism. *Int J Androl* 18: 256-262, 1995
- 28) Allan DJ, Harmon BV & Kerr JFR: Cell death in spermatogenesis. In *Perspective on Cell Death* (ed by Potten CS), NY, Oxford University Press, 229-259, 1987
- 29) Libbus BL & Schuetz AW: Reinitiation of spermatogenesis by hormones as assessed by cellular parameters in vitro. *Biol Reprod* 21: 353-364, 1979
- 30) Koji T, Ohta H & Kobayashi N: Involvement of Fas/Fas ligand system in the induction of germ cell apoptosis in ischemia-reperfusion and estrogen-treated mouse testes. *Zool Sci* 15 (Suppl): 15, 1998
- 31) Nonclercq D, Reverse D, Troubeau G, et al: In situ demonstration of germinal cell apoptosis during diethylstilbestrol-induced testis regression in adult male Syrian hamsters. *Biol Reprod* 55: 1368-1376, 1996
- 32) Ku WW, Wine RN, Chae BY, et al: Spermatocyte toxicity of 2-methoxyethanol (ME) in rats and guinea pigs: evidence for the induction of apoptosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 134: 100-110, 1995
- 33) Brinkworth MH, Weinbauer GF, Schlatt S, et al: Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *J Reprod Fertil* 105: 25-33, 1995
- 34) Lee J, Richburg JH, Younkin SC, et al: The Fas system is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology* 138: 2081-2088, 1997
- 35) Nagata S & Golstein P: The Fas death factor. *Science* 267: 1449-1456, 1995
- 36) Hakuno N, Koji T, Yano T, et al: Fas/APO-1/CD95 system as a mediator of granulosa cell apoptosis in ovarian follicle atresia. *Endocrinology* 137: 1938-1948, 1996
- 37) Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, et al: Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol* 180: 152-159, 1996
- 38) Nogae S, Miyazaki M, Kobayashi N, et al: Induction of apoptosis in ischemia-reperfusion model of mouse kidney: Possible involvement of Fas. *J Am Soc Nephrol* 9: 620-631, 1998
- 39) Koji T, Ohta H, Kobayashi N, et al: Involvement of Fas /Fas ligand system in the induction of germ cell apoptosis in normal and ischemia-reperfusion testis of adult mouse. *Cell Struct Funct* 22: 757, 1997
- 40) Eguchi J, Koji T, Nomata K, et al: Involvement of apoptotic cell death through the Fas-Fas ligand system in "maturation arrest" of the male infertility status. *Contracept Fertil Sex* 23: S84, 1995.