

未成熟マウスにおける精子形成周波の形成

杉本 亮^{*}, 小林 大祐^{**}, 横田 秀夫^{†#}, 姫野 龍太郎[†], 濱野光市^{*}

^{*} 信州大学 農学研究科

長野県 上伊那郡南箕輪村 8304

^{**} 埼玉大学大学院 理工学研究科

埼玉県さいたま市桜区下大久保 255

[†] 理化学研究所 生体力学シミュレーション特別研究ユニット

埼玉県和光市広沢 2-1

[#] 理化学研究所 もの作り情報技術統合化研究プログラム V-CAT 開発チーム

埼玉県和光市広沢 2-1

e-mail : khamano@gipmc.shinshu-u.ac.jp

e-mail : hyokota@riken.jp

e-mail : koba@me.ics.saitama-u.ac.jp

要旨 本研究は、成熟動物の精細管の長軸方向で生殖細胞の分化過程が並ぶ特徴である精子形成周波の形成過程を明らかにすることを目的に未成熟期のマウス精細管を長軸方向に組織化学的に解析した。精細管およびその中の生殖細胞の中心点をコンピュータ上で三次元再構築し、得られた三次元画像から、精細管の全長および細胞の位置を数値化することで細胞局在の解析が可能になった。0 日齢の精細管内では、長軸方向に胚芽細胞が不斉一に存在していることが明らかとなり、精細管の長軸方向に領域間で差異が存在することが示唆された。6 日齢では、初期精母細胞の形態を示し、分化段階の進んだ細胞型であるⅢ型生殖細胞が、精細管の長軸方向においてほぼ一定の間隔で存在したことから、生殖細胞の分化を誘導する領域がほぼ一定の間隔で出現することが示唆された。

1. 始めに

哺乳動物の精子形成は精巣の精細管内で行われる。精細管内では、生殖細胞が基底膜側から管の中央に向かって、分化・増殖しながら移動し、最終的に精子として管腔に放出される。生殖細胞は分化段階と形態から細かく分類されている。各精細管断面において、構成している生殖細胞集団のパターンは異なり、マウスにおいて 12 種類に分類できることが知られている⁽¹⁾。精細管断面ではこの生殖細胞集団の変遷が周期的に見られ、精上皮周期と呼ばれている(図 1)。

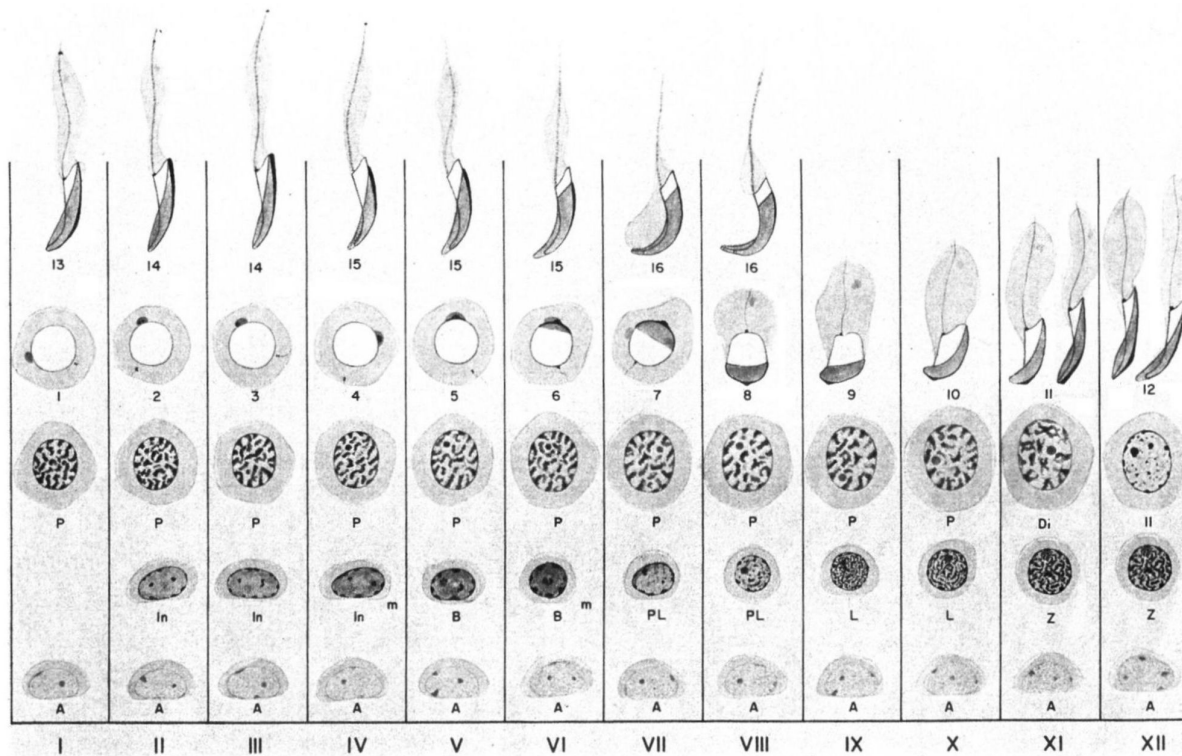


図1 マウスの精上皮周期表

縦の細胞集団は一つの精細管断面を構成する生殖細胞型を示している。マウスでは12種類に分類されている。分類された集団をステージと呼ぶ。生殖細胞が分化することでステージはI～XIIまで変遷し、再びIのステージに戻る（Pereyら, 1961; Oakberg, 1956 一部改変）。

また、この周期性を有する生殖細胞集団は、精細管の長軸方向に規則正しく並び、精子形成周波と呼ばれる特徴を形成している。その規則性から、精細管を長軸方向に観察することで生殖細胞の分化過程を知ることができる(図2)。

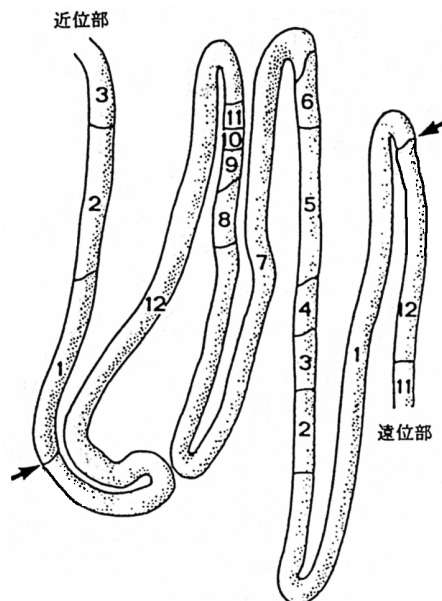


図2 マウス精細管の精子形成周波
精上皮周期の各ステージは精細管の長軸方向に規則正しく並ぶ。1～12のステージが連続して、繰り返す（Pereyら, 1961 一部改変）。

本研究は、未成熟マウスの雄性生殖細胞の発生と分化、および精子形成周波の形成を解明することを目的に、三次元再構築し、細胞位置を数値化することで0日齢および6日齢の精細管と生殖細胞を解析した。

2. 材料及び方法

2-1. 供試動物および精巢の準備

雄マウスは、ICR 成熟雌雄マウスを交配し、出生した幼若マウスを供試した。出生した日を0日齢として、0日齢、6日齢をジエチルエーテルによる過麻酔で賭殺し、精巢を摘出した。マウスの飼育管理および実験操作は信州大学農学部動物実験のガイドラインに準じて行った。

2-2. 連続切片の作成および染色

0, 6日齢のマウス精巢は摘出直後にブアン溶液に浸潤し、一晚固定した。精巢はパラフィンに包埋し、ミクロトームにより $5\mu\text{m}$ の厚さで薄切し、連続切片を作成した。全切片はPAS染色した。

2-3. 精細管の再構築と組織の観察

染色後の全ての切片は、光学顕微鏡(OLYMPUS, BX40, $\times 1000$)に接続したデジタルカメラ(Nikon, coolpics5300)で撮影・印刷し、以下の観察と同定に利用した。精細管は精巢網から順に各精細管断面に番号をつけ、折り返すごとに番号を変えることで識別し、全ての切片にわたり精細管を追跡することで再構築し、1本の精細管の全部を認識した(図3)。

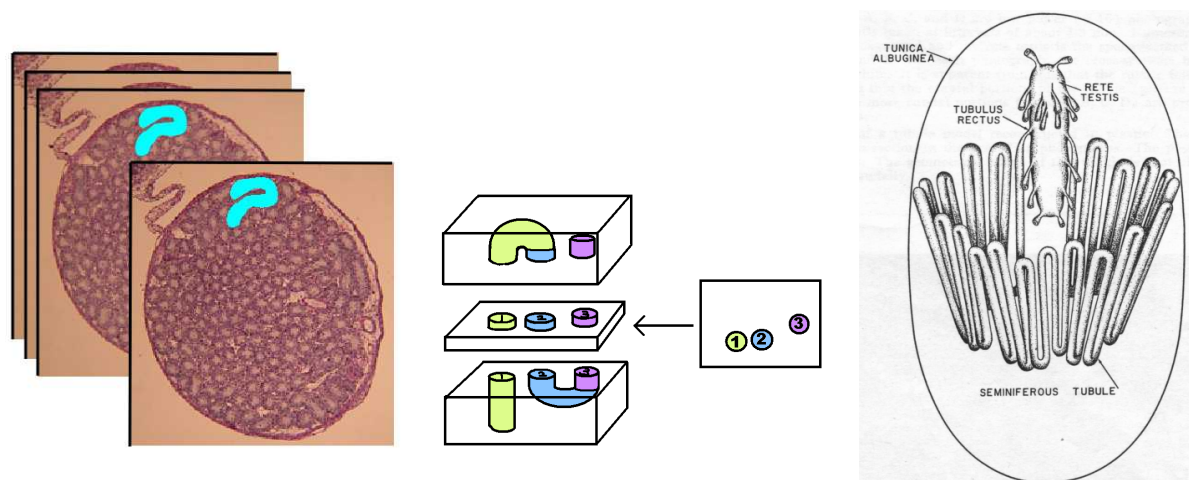


図3 精細管の再構築

連続隣接切片では、ほぼ同じ精細管断面が現れるため、連続した精細管断面を認識できる。成熟動物の精細管は図のように波状形態を形成することが知られており、精巢網に2点で連結している (Clermont, 1961)。

再構築した精細管の写真を基に、組織切片を光学顕微鏡($\times 1000$)で観察した。生殖細胞は、マウスの精上皮周期と精子形成周波に関する以前の報告⁽¹⁾に準じ、核の染色性、形態、精細管内での局在を指標に細胞型を同定した。

2-4. 三次元化

デジタルカメラにより、0および6日齢において撮影した連続組織切片画像(0日齢 213枚、6日齢 273枚、2560×1920 pixels、jpg)のうち、精細管を含む画像(0日齢 173枚、6日齢 270枚)はファイル形式を bmp に変換し、640×480 pixels に縮小した後、抽出予定部位を含む 480×480 pixels に切り出した。変換後の画像はソフトウェア；REditor(RIKEN, ver 1.00)により撮影画像のうち、抽出予定部位(再構築して全長を認識した精細管および生殖細胞)にマスク処理操作を行った。マスク処理の終了後、画像のファイル形式を PGM に変換したマスクデータ(PGM)は精細管の中心線を構築し、解析するために細線化プログラム(saisen_cpp, RIKEN)を利用し中心線画像(pgm)を得た。得られた中心線画像を bmp に変換後、細線化した精細管の三次元画像を再構築した。距離算出処理のために細胞の三次元位置情報を必要とするため、マスク処理した細胞の中心点画像は細胞位置算出プログラム(cell_list, RIKEN)を利用し、すべての細胞位置情報を得た。得られた位置情報と細線化処理した精細管画像は、距離算出プログラム(celldistance, RIKEN)を利用しすべての細胞の精巣網からの距離および精細管の全長を認識した。

2-5. 統計処理

三次元化後に細胞位置を数値化した0日齢および6日齢のデータは、ノンパラメトリック一元分散分析を用いて検定し、student の t 検定により対比較を行った。

3. 結果

3-1. 組織切片の解析

組織切片は0, 6日齢で各々213, 369枚作製した。各日齢で検査に供試した精細管は各々213枚, 273枚の切片に渡って存在した。また本実験で用いた精細管すべてに分岐が存在し、2~3本に分かれていたが、最長の精細管を選択し全長とした。

3-2. 0日齢の精細管断面の解析

0日齢のマウス精細管内には以前の報告⁽²⁾と同様、唯一の生殖細胞である胚芽細胞と体細胞であるセルトリ細胞が存在した(図4)。胚芽細胞はセルトリ細胞と比較して細胞径が大きく、ヘマトキシリンによる核染後の核の染色性が低いために明るい核を有する。一方、セルトリ細胞は非球形の小さな核を有する。このように、胚芽細胞はセルト



図4 マウス0日齢の精細管断面
光学顕微鏡写真(×1000)。Gは生殖細胞の胚芽細胞、Sは体細胞のセルトリ細胞を示す。バーは10μm。

り細胞と明らかに異なる形態を示すことから、容易に識別できた。

3-3. 0日齢における精細管および細胞の三次元化

本研究では、RVeditor を利用して精巣組織切片画像から目的領域のみをマスク処理することでマウス0日齢の精細管および胚芽細胞の中心点の三次元画像を得た(図5)。

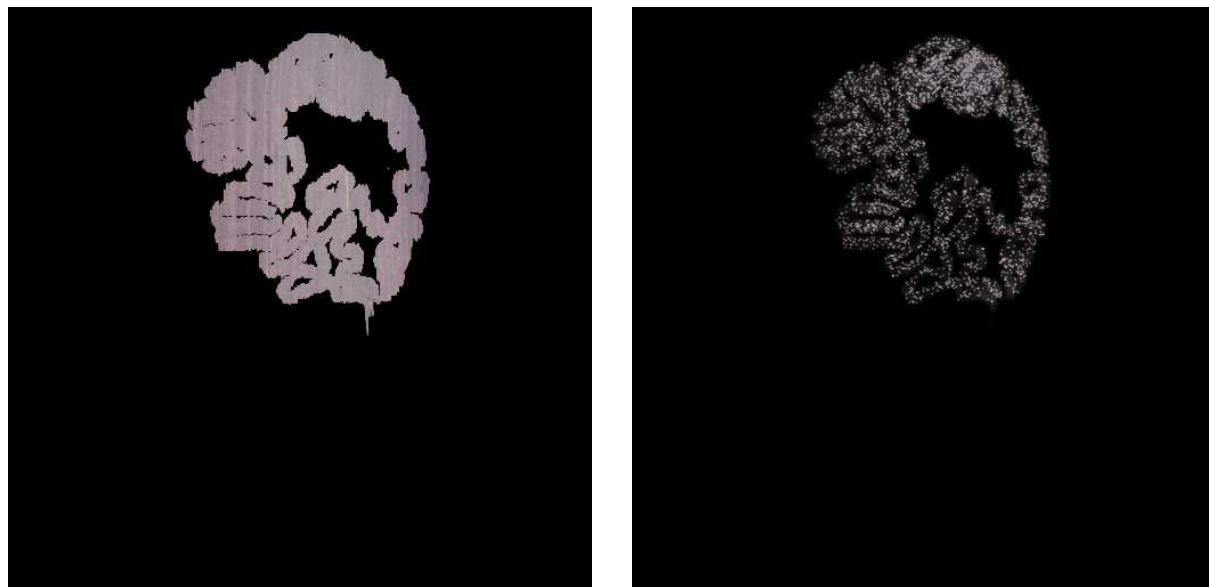


図5 0日齢のマウス精細管(左)および胚芽細胞の中心点(右)の三次元再構築像
全ての切片の精細管断面に含まれる胚芽細胞の再構築像は、光学顕微鏡で観察しながら胚芽細胞の中心点を確認し、作製した。

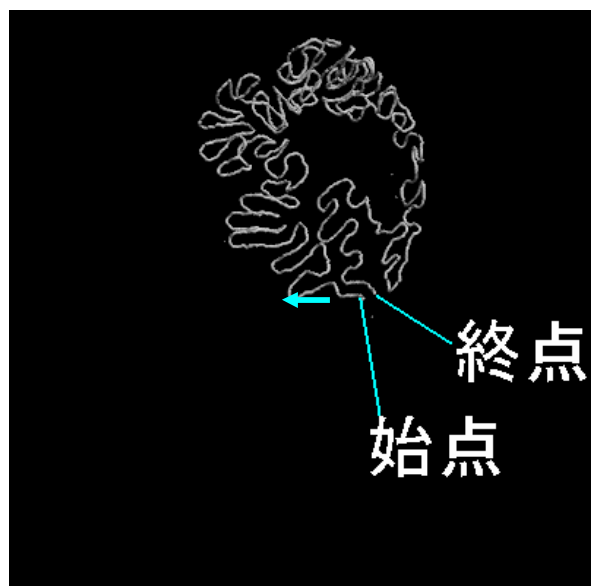


図6 0日齢のマウス精細管の中央線
細線化処理により作成した中央線は一方を始点、もう一方を終点と定め、始点から中央線上の各点までの距離(ピクセル数)を算出することが可能になった。胚芽細胞の中心点から最も近い中央線上の点を精細管の長軸上の位置とし、始点から各細胞の位置までの中央線に沿った距離を求めた

本研究で調べた0日齢の精細管の全長は $19230.71 \mu\text{m}$ で、存在する胚芽細胞

胞は 3007 個だった。精細管が精巣網に接続する二つの接着点 $[(x, y, z)=(290, 271, 47), (280, 277, 56)]$ の内、一方(290,271,47)を始点、もう一方(280,277,56)を終点とした(図6)。始点から精細管の長軸方向 500 μm ごとに含まれる平均胚芽細胞数は 78.16 個であった。最少は 5500 μm ~ 6000 μm 区間と 15500 μm ~ 16000 μm 区間で 60 個、最多細胞数は 15000 μm ~ 15500 μm 区間の 105 個であった。また、各々の区間における細胞数の比較では 1500 ~ 2000 μm 、8500 ~ 9000 μm 、11500 ~ 12000 μm 、16500 ~ 16000 μm および 18000 ~ 18500 μm の 5 つの区間において他区より有意に多い胚芽細胞が存在していた ($P < 0.05$, 図7)。

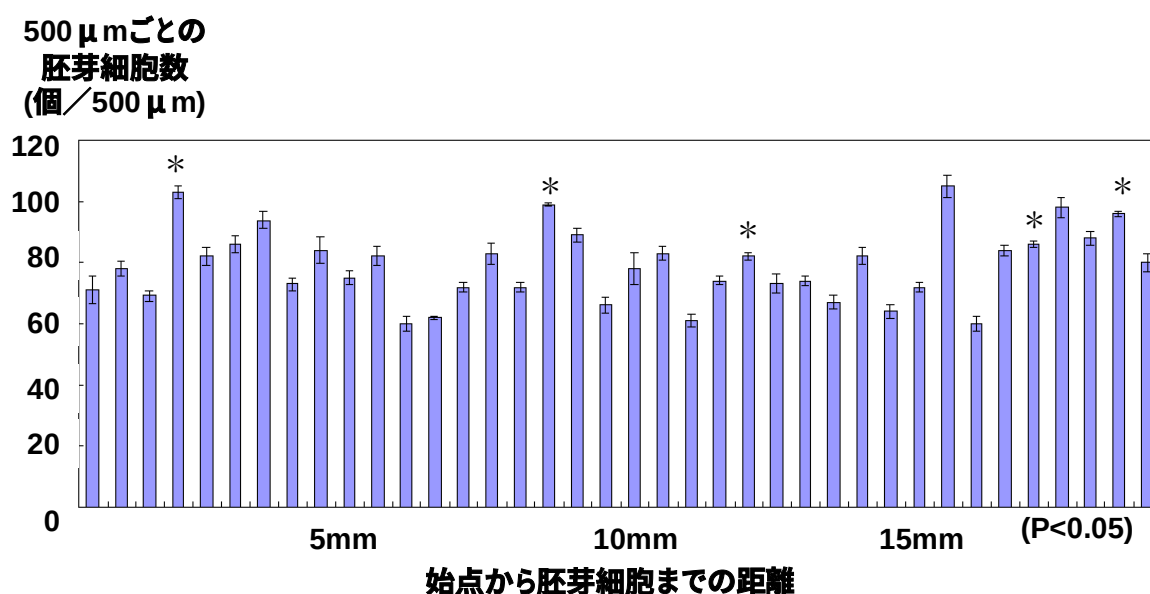


図7 0日齢マウス精細管の長軸方向における胚芽細胞の局在
横軸は始点から胚芽細胞までの距離、縦軸は長軸方向に 500 μm ごとに含まれる胚芽細胞数。5区間において他区より有意に多い胚芽細胞が存在した ($P < 0.05$)。 -

3-4. 6日齢の精細管断面の解析

6日齢マウスの精細管において、存在する生殖細胞は異なる特徴により I 型、II 型、III 型の 3 種類に分類できた(図8)。I 型生殖細胞は胚芽細胞に類似した形態を有し、典型的な特徴として、核が大きい、核内に濃染する大きな核小体様構造物を 2~3 個有する、基底膜に接して存在する、核の染色性が低く明るい、などがあげられる。II 型生殖細胞は成熟個体で観察される B 型精原細胞に極めて近い特徴を示す。この細胞型の典型的な特徴は、核が I 型より小さい、核の染色性は I 型よりも高い、濃染し球形である、核内に I 型に比べ小さく濃染する核小体様構造物を複数有する、基底膜に接して存在するか管腔近位に存在する、などである。III 型生殖細胞は 5 日齢以前では極めて少ない細胞型である。また、成熟動物で観察されるプレプトテン期精母細胞に類似した形態を示し、管腔側に位置する。III 型の細胞は II 型と比べ小さな暗い核を有する、核内に濃染する構造を複数有する、などの特徴があげ

られる。そこで、本研究ではプレプトテン期精母細胞の形態的特徴を示し、最も分化段階が進んでいると考えられるⅢ型生殖細胞に注目して三次元再構築を行った。セルトリ細胞は様々な形態を示し、基底膜に接して、球形の核を有するもの、基底膜側から管の中央に向けて生殖細胞をはさむように局在し、楕円型の核を持つもの、管の中央側に位置し、球形の核を有するものが認められた。

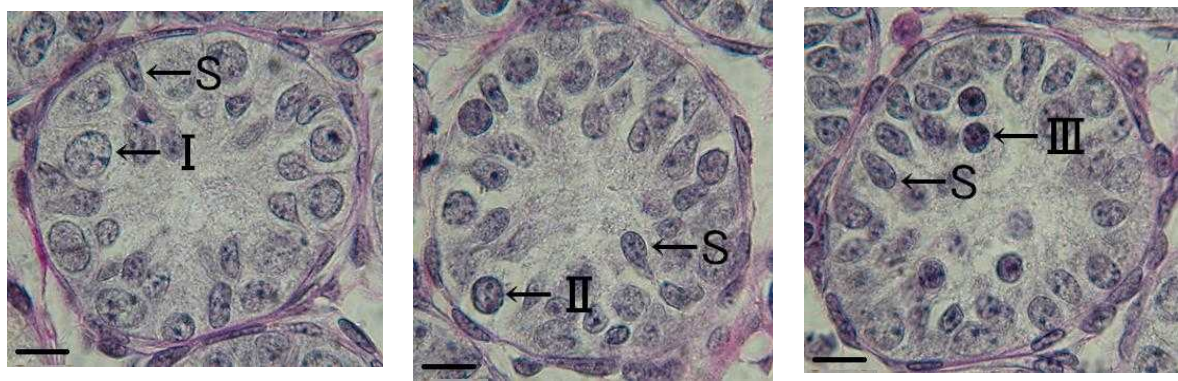


図9 6日齢マウスの精細管断面

光学顕微鏡写真（×1000）。ⅠはⅠ型生殖細胞、ⅡはⅡ型生殖細胞、ⅢはⅢ型生殖細胞、Sは体細胞のセルトリ細胞を示す。バーは10 μ m。Ⅲ型生殖細胞が最も分化が進んだ形態を示し、この細胞型について三次元再構築を行い解析した。

3-5. 6日齢における精細管および細胞の三次元化

RVeditor を利用し精巣組織切片画像から精巣領域のみをマスク処理することで精細管およびⅢ型生殖細胞の三次元画像を得た(図11)。

6日齢の精細管の全長は85484.89 μ mであった。再構築した三次元画像により、6日齢の精細管は上下に波状の構造を示しながら精巣内に存在していた。全精細管において、精巣網から37914.89 μ mの区間には7078個のⅢ型生殖細胞が存在した。精細管に局在する細胞の位置情報を得るため、精細管が精巣網に接続する二つの接着点[(x,y,z)=(137,115,215),(108,167,224)]の内、一方(137,115,215)を始点、もう一方(108,167,224)を終点として、精細管長軸上におけるすべてのⅢ型生殖細胞までの距離を計測した。始点から精細管の長軸方向500 μ mごとに含まれる細胞数を計測し比較したところ、最少細胞数は8000 μ m~9500 μ m区間の1個、最多細胞数は15500 μ m~16000 μ m区間の373個であった。全区間の平均は93.34個だった。2500~3000 μ m、15000~15500 μ m、15500~16000 μ m、16000~16500 μ m、26500~27000 μ m、27000~27500 μ m、35500~36000 μ m、36000~36500 μ mの8つの区間において、他区と比べ有意に多いⅢ型生殖細胞が存在していた(P<0.001, 図11)。

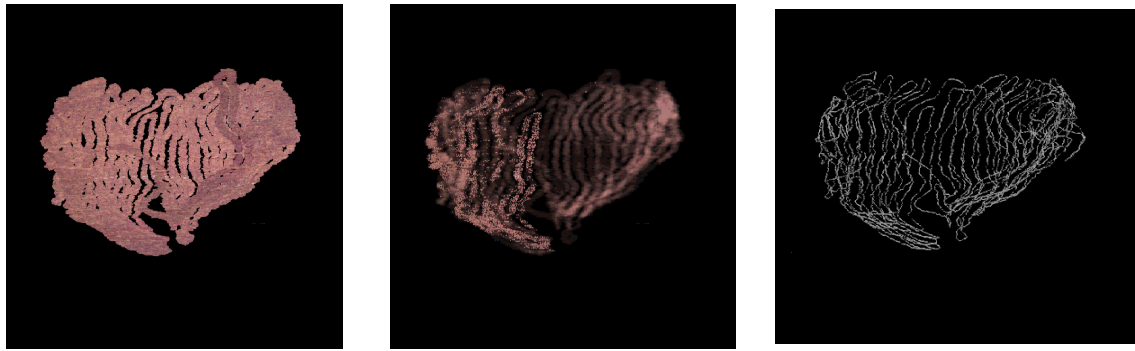


図 10 マウス 6 日齢の精細管(左)、Ⅲ型生殖細胞(中央)および精細管の中央線(右)の三次元再構築像

全ての切片の精細管断面に含まれるⅢ型生殖細胞の三次元再構築像は、光学顕微鏡で観察して中心点の位置を確認して作製した。6 日齢の精細管の全長は約 8.5cm あり、始点から 3.7cm までのⅢ型生殖細胞の局在を 0 日齢と同様の手法により解析した。

500 μm ごとの
Ⅲ型生殖細胞数
(個/500 μm)

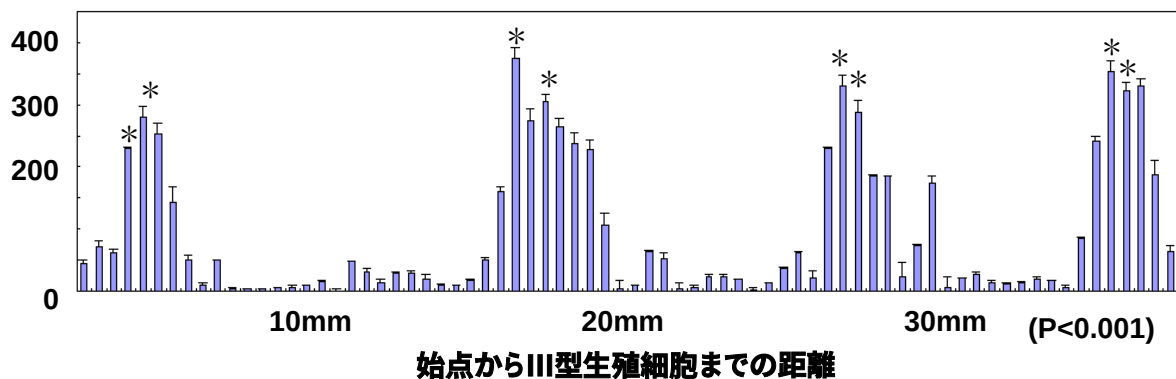


図 11 精細管の長軸方向におけるⅢ型生殖細胞の局在
横軸は始点からⅢ型生殖細胞までの距離、縦軸は長軸方向において 500 μm ごとに含まれるⅢ型生殖細胞数。Ⅲ型生殖細胞が有意に多い区間が 8 区間存在した ($P < 0.001$)。各ピークはほぼ一定の間隔で存在し、生殖細胞が精細管の長軸方向において一定の間隔で分化することが示唆された。 -

4. 考察

胚芽細胞は胎齢約 13 日から出生するまで有糸分裂を停止する。出生後約 2 日で DNA 合成を再開し、精原細胞に分化・増殖を始める。そこで本研究では、停止期にあたる胚芽細胞のみが存在する ICR マウス 0 日齢において、三次元再構築による三次元情報から、精細管長軸方向で胚芽細胞の局在を調べた。その結果、精細管の全長において胚芽細胞が有意に多く存在する領域が 5 区間存在した。0 日齢の精細管の長軸方向において胚芽細胞が局在する

ことは、精細管の長軸の領域間には生殖細胞の制御に何らかの違いが存在することが示唆される。近年、胎仔期で既にセルトリ細胞の周期的な遺伝子発現が行われており、これが精上皮周期の原型となるということが報告された⁽³⁾。本研究において、観察された胚芽細胞の局在はこのセルトリ細胞の働きに起因するのかもしれない。

本研究において6日齢の精細管内では0日齢よりも顕著に多数の細胞が局在することが明らかとなった。この6日齢で見られるⅢ型生殖細胞の豊富な精細管領域は、細胞を測定した領域(37914.89 μm)において4つ存在したため、全長(85484.89 μm)で細胞数を測定した場合、おそらく6～8箇所存在することが推察される。有意に多く細胞が存在する区間の連続は、一つの精原幹細胞が形成した領域、あるいはいくつかの精原幹細胞が同調して分化・分裂を行うことで形成した領域と考え、一つの同期的に発生する領域と考えると、それぞれの有意に細胞が多く存在する領域同士の間は、精細管の長軸方向において約1cm ずつ距離が開いており、精原幹細胞の分化が、精細管の長軸方向において一定の距離を有して起こることが推察された。

6日齢の精細管において、進んだ分化段階の細胞型と考えられるⅢ型生殖細胞の局在が、0日齢の胚芽細胞の局在に由来すると仮定すると、胚芽細胞の豊富な(もしくは乏しい)領域が生殖細胞の分化を支持する領域であると推察される。また、6日齢のⅢ型生殖細胞の局在が0日齢の胚芽細胞の局在に由来しないと仮定すると、0～6日齢にかけて起こる胚芽細胞のアポトーシスと精細管の基底膜上への移動、および出生後2日頃のDNA合成再開が影響しているのかもしれない。

6日齢のⅢ型生殖細胞の局在に基づく精子形成周波の形成過程として、生殖細胞は細胞間架橋でつながりを保ちながら同期的に発生することで、同じ発生段階の生殖細胞集団を形成するという特性を考慮すると、分化を促進する因子が精細管の長軸方向に一定の距離を有して6日齢より以前の精原細胞に作用している可能性が考えられる。また、データとしては示さないが、本研究においてⅢ型生殖細胞が多く含まれる領域の前後にはⅡ型生殖細胞が豊富に含まれることが確認されており、これらの領域が成熟動物で隣接した生殖細胞集団を形成すると推察された。これらのことから、6日齢の精細管において生殖細胞の分化促進因子の伝達に関して以下のような仮説が立てられる。

6日齢以前の精細管内において、セルトリ細胞あるいは他の因子の影響により、長軸方向に一定の間隔を有して生殖細胞の分化を支持する領域が形成される。その領域での生殖細胞の分化の進行後に、分化促進因子は精細管の長軸の一方向あるいは両方向に広がることにより、一定時間後に隣接領域で分化が進行する。

以上のとおり、未成熟期のマウスにおける生殖細胞集団の配列、特に、精子形成周波の形成の解明は不十分であり、更なる解析が必要と考えられる。

5. 終わりに

本研究により、未成熟マウスにおいて、6日齢で既に精細管の長軸方向における生殖細胞の分化に局在性が認められた。今後、II型生殖細胞の局在を三次元的に解析することで、分化促進因子の伝達様式を明らかにできると考えられる。精子形成は精細管内で三次元的に行われており、3次元情報による解析は、極めて有効な解析手法である。今後、本研究で用いた手法に加え、GFPマウスと3D-ISMを併用することにより、さらに多くのことが明らかになるだろう。

参考文献

- (1) **Clermont Y. and Huckins C.** (1961) Microscopic anatomy of the sex cords and seminiferous tubules in growing and adult male albino rat *Am.J.Anat.* **108** 79-97
- (2) **Oakberg F.E.** (1956) A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal *Am.J.Anat.* **99(3)** 391-413
- (3) **Perey B. , Clermont Y. and Leblond C.P.** (1961) Wave of the seminiferous epithelium *Am.J.Anat.* **108** 47-77
- (4) **Sapsford S.C.** (1962) Changes in the cells of the sex cords and seminiferous tubules during the development of the testis of the rat and mouse *Aust.J.Zool.* **10** 178-192
- (5) **Timmons M.P. ,Rigby J.W. and Poirier F.** (2002) The murine seminiferous epithelial cycle is pre-figured in the sertoli cells of the embryonic testis *Development* **129** 635-647

