

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

目 次

課題番号			
2.0000970A 31015	結核菌の迅速薬剤感受性試験法の開発	山崎 利雄	1
971A 31028	バイオテクノロジーを用いた薬物代謝酵素の特性解析と医薬品の適正使用化に関する研究	頭金 正博	9
972A 31064	感染症予防効果のある糖鎖を付加した多機能食用難消化性多糖類の開発とその有効性及び安全性を評価する方法の開発	小西 良子	23
973A 31065	食中毒細菌の検出方法の開発と評価	山本 茂貴	29
974A 31093	リポソームを用いた遺伝子導入法の開発、その有効性、安全性に関する研究	北川 隆之	39
975A 31112	ラット初代培養肝細胞を用いる毒性評価系の確立	四宮 貴久	47
977A 31219	生殖細胞系列の完全連続培養系の開発	佐藤 英明	52
978A 31238	精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備	井上 達	55
979A 31239	加速試験で評価できない製剤機能の安定性評価に関する研究	吉岡 澄江	66
980A 31240	新開発食品の食品化学的特性の解析と評価に関する研究	豊田 正武	74
981A 31242	糖タンパク質及び糖鎖関連物質の糖鎖の機能及び構造解析と品質等評価技術の開発	早川 堯夫	83
982A 31244	食品添加物の開発手法及び食品添加物の品質・安全性の評価・試験方法に関する研究	米谷 民雄	93
983A 31249	遺伝子改変テスターを用いる第二世代変異原性試験法の開発	能美 健彦	102
984A 31266	培養細胞を用いたインビトロ発熱性物質試験法の開発に関する研究	村井 敏美	108
985A 31267	薬物代謝活性の多型性とハイリスク患者における薬物評価に関する研究	大野 泰雄	116
2.0000976A 32146	トランスポーター遺伝子発現細胞を用いた薬物吸収・分布・排泄動態評価系の開発	辻 彰	126

精巣細胞各種分化系列を標識する抗体の作成と精巣障害解析の技術基盤の整備

所属 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部
主任研究者 井上 達

分担研究者

堀井郁夫 日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部
加藤千明 日本ロシュ研究所 前臨床科学研究部
北嶋 聡 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部

(要旨)精子形成過程の迅速・鋭敏な解析技術を確立する目的で、1)ラット round spermatid 細胞の 24%及び elongating spermatid 細胞の 73%と強く反応するモノクローナル抗体 (6F 抗体) を作成し、2) この抗体の有用性を、精巣障害性化学物質を用いて検討した。

1. 研究目的

本研究の目的は、精巣における精子形成過程(spermatogenesis)の状態を、迅速かつ鋭敏に把握する解析技術を確立することにある。具体的には、1) ラット精子形成細胞の 1 つ、round spermatid の細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の作成、およびその抗体の認識分子を明らかにすることを目指す。また、あわせて、2) 独自に開発したセルソーターを用いた精子形成過程の解析法の有用性を、ラットに、種々の精巣障害性化学物質を投与することにより検討する。

精子形成過程の状態を把握することは、ダイオキシンをはじめ、環境中の内分泌障害性物質などの暴露による精巣毒性を鋭敏に検出することとなり、他方医薬品の開発にとっても、精巣細胞の分化や増殖への有効性や安全性の評価に役立つこととなる。また、本研究により、精子形成過程の検索技術基盤の構築が期待されるだけでなく、新たな精子形成細胞の分化制御因子の発見を展望する。精子形成細胞の中で先ず、以下の 3 点の見地から、精子細胞の分化に則したサブグループである、round spermatid を標的とする。A)セルソーターによる回収率が量、質ともに高いこと、B) round spermatid は、精母細胞が減数分裂して直後に現れる細胞であり、形態変化の分化制御因子の標的細胞である可能性が高いこと、C)精子形成サイクルの複雑な形態学的ステージ鑑別は、精子細胞を指標としており、この細胞マーカーの作成は、その簡便化にもつながること。そのために、1) セルソーターを用いて、ラット round spermatid 細胞を回収し、細胞として、マウスに免疫し、モノクローナル抗体を作成する。2) 得られた抗体の反応性をラットの各ステージの精巣細胞および各種組織を用いて検討する。3) 得られた抗体の認識分子の遺伝子を分子生物学的手法を用いて明らかにする。

平成 11 年度までに、有望なモノクローナル抗体 (6F 抗体) を得た。これを受け、本年度は、主として上記 2) と 3) について検討した。

2. 研究方法

本報告では、「6F 抗体の反応性」と「6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の妥当性」という観点から、実験を2つに大別し報告する。前者を実験 A、後者を実験 B とする。

[実験 A] 6F 抗体の精巣細胞および各種組織との反応性の検討

2-A-1. セルソーターによる解析と細胞分取

雄性 Sprague-Dawley ラット (13 週齢) [Crj:CD(SD)]の両精巣を摘出し、0.25% コラゲナーゼ 処理の後、ピペッティングとナイロンメッシュにより単離精巣細胞を得た。溶液は、Ca²⁺、Mg²⁺不含 PBS 溶液を用いた(以下、同様)。抗体反応に際しては、先ず1次反応として、6F 抗体(精製腹水抗体: 0.88 mg/ml stock; Isotype: IgG1, κ)を、0.1 μg/10⁶ cells で反応させ、続いて2次反応を、FITC ラベルした2次抗体(FITC-conjugated goat anti-mouse Ig, Pharmingen)を、0.1 μg/10⁶ cells で反応させることでおこなった。なお、コントロール1次抗体として、purified mouse IgG1, κ isotype standarad (Pharmingen)を用いた。DNA の染色に際しては、抗体反応後の精巣細胞を70%冷メタノールで固定の後(1時間)、0.25% RNase 処理を20分間施し、50 μg/ml propidium iodide (PI)を用いて、30分間遮光・氷冷下で反応させ、その後10⁶ [cells/ml]の単離精巣細胞後(細胞分取の場合は、10⁷ [cells/ml])を、セルソーター(FACSCalibur, Becton Dickinson あるいは FACS Vantage, Becton Dickinson)を用いて解析、細胞分取をおこなった。

抗体の精巣細胞に対する反応性の検討に際しては、主として、PI 蛍光[DNA 含量] - FITC 蛍光[抗体反応量]プロットを用いて解析した。また、実験によっては、上記の手法を用いて、各種系統の実験動物、具体的には、3系統のマウス[C57BL/6NCrj、C3H/HeNCrj、Crj:CD-1]、2系統のラット[Crj:Wistar、F344/DuCrj]、モルモット[Std: Hartley]、ハムスター[Slc: Syrian]、の各精巣を用いた。さらに、各日齢(生後7, 14, 21, 28, 35, 42, 49日)のSprague-Dawley ラットの精巣も用いた。

2-A-2. 免疫組織化学的解析

6F 抗体は、これまでの解析により、ウエスタンブロッティング法での変性条件下(SDS と加熱処理[95℃と65℃ 30min])では、抗原との反応性がなくなるという特徴を有することが明らかとなっている。そこで、6F 抗体を用いた免疫組織化学的検討は、凍結切片を用いて検討した。組織は、雄性 Sprague-Dawley ラット (13 週齢) の各種組織(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、精巣、精管、精巣上体)を用いて検討した。固定は、4%パラフォルムアルデヒドを用いて6日間行ない、sucrose 置換(10%, 20%, 30%)の後、OCT compound に包埋後、-80℃にて保存し、薄切は5 μm で行なった。免疫組織化学的反応は、ペルオキシダーゼで抗体を標識し、3,3'-ジアミノベンチジンを基質として、発色させた。具体的には、H₂O₂で内因性のペルオキシダーゼの阻止処理後、1次反応は、6F 抗体(精製腹水抗体: 0.88 mg/ml stock)を、18 μg/ml で反応させた。2次反応ならびに発色は、市販のキット(VECTASTAIN ABC MOUSE IgG KIT, Vector Laboratorie, Inc.)を用いた。コントロール1次抗体には、purified mouse IgG1, κ isotype standarad (Pharmingen)を用いた。

2-A-3. 6F 抗体の認識分子(抗原)の同定の検討

6F 抗体のラット精巣細胞との反応性は、ウエスタンブロッティング法では検討できなかったため、SDS を用いない、Native-PAGE 法を検討した。

[実験 B] 6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の有用性・妥当性の検討

2-B-1. 精巣障害モデルラットの作製

実験 1. Adriamycin (0, 1, 2 mg/kg) を 6 週齢雄ラットに 4 週間経口投与した。

実験 2. Ethynylestradiol (0, 3, 10 mg/kg) を 9 週齢雄ラットに 2 週間経口投与した。

2-B-2. セルソーターを用いた精巣細胞の分類と解析

上記の各精巣障害モデルラットより精巣を摘出し、0.25% コラゲナーゼ処理の後、ピペッティンクとナイロンメッシュにより単離精巣細胞を得た。6F 抗体は、実験 A と同様に、最終濃度が $0.1 \mu\text{g}/10^6$ 個細胞となるように添加し、4℃、遮光下で 30 分、次いで二次抗体を加え、4℃で 30 分間反応させた。DNA 染色は、精巣細胞を 70% 冷メタノールで固定(1hr)の後、0.25% RNase 処理を 20 分間施し、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ propidium iodide(PI)を用いて 30 分間、遮光、氷冷下で行った。その後、 10^6 cells/ml の単離細胞をフローサイトメーター(FACS Calibur, Becton Dickinson, San Jose, CA)を用いて DNA 量と細胞の大きさに基づき、7つのサブクラスに分類、定量するとともに、6F 抗体の陽性率を求めた。また、回収した全単離精巣細胞数は添加した既知濃度の蛍光標識ビーズ(Immuno check, Epics)との比により求め、薬剤投与による精巣毒性を各分面の細胞数の変化として捉え、評価した。

3. 研究成果

[実験 A] 6F 抗体の精巣細胞および各種組織との反応性の検討

3-A-1. セルソーターによる解析と細胞分取

(分担：国立医薬品食品衛生研究所)

平成 11 年度までに、有望なモノクローナル抗体 (6F 抗体) を得た。これを受け、6F 抗体の精巣細胞、特に round spermatid 細胞との反応性を、詳細に解析することを目的として、I) 13 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの単離精巣細胞、II) 他の系統の各種実験動物の単離精巣細胞、III) 各日齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの単離精巣細胞、を用いて、セルソーターによる解析を検討した。このセルソーター解析に際しては、PI 蛍光[DNA 含量] - FITC 蛍光[抗体反応量]プロットを用いた。なお、平成 11 年度までに、半数体精子細胞分画(ploidy: n, sub-n)に関して、n 分画には round spermatid 細胞及び elongating spermatid 細胞が、sub-n 分画には、elongated spermatid 細胞が分布することを、すでに明らかにしている。

3-A-1-I) 6F 抗体の、13 週齢 Sprague-Dawley ラット単離精巣細胞との反応性の検討

単離精巣細胞に対する 6F 抗体 (FITC 標識) の反応性を、PI 蛍光[DNA 含量] - FITC 蛍光[抗体反応量]プロットで、コントロール (図 1a) と比較し、解析した (図 1b)。その結果、6F 抗体は、半数体精子細胞(ploidy: n と sub-n の分画)と反応し、特に、round spermatid 細胞の 24% の細胞集団および、elongating spermatid 細胞の 73% の細胞集団と強く反応した (図 1b、図 2) (各定量データについては下記に示す)。なお、以降、6F 抗体との反応性の強弱は、FITC 蛍光の強弱で判断した。

6F 抗体との反応性を ploidy の視座から検討すると、ploidy: n 分画には、1) 強陽性分画、2) 弱陽性分画、および 3) 陰性分画が存在し、ploidy: sub-n 分画には、1) 弱陽性分画、および 2) 陰性分画が存

在した(図 1b)。なお、ploidy: 2n 分画にも弱陽性分画が一部認められた。セルソーターを用いて、細胞分取したところ、ploidy: n 分画では、全て分画(強陽性、弱陽性、陰性)において、round spermatid 細胞および elongating spermatid 細胞を含んでいた(図 1c)。以上の結果を定量化したものを図 2a に示す。この場合、全精巣細胞数をそれぞれの 100%とした。具体的には、6F 抗体に対して、ploidy: n 分画は、 $21.7 \pm 3.7\%$ (n=5)が強陽性、 $22.9 \pm 3.2\%$ (n=5)が弱陽性、 $5.4 \pm 1.6\%$ (n=5)が陰性の反応を示し、ploidy: sub-n 分画は、 $3.4 \pm 0.9\%$ (n=5)が弱陽性、 $9.4 \pm 1.0\%$ (n=5)が陰性を示した。

また、6F 抗体との反応性を、半数体精子細胞の各サブグループ分画について、定量化したものを図 2b に示す。この場合、各サブグループ分画の細胞数を、それぞれの 100%とした。具体的には、6F 抗体に対して、round spermatid 細胞は、 $24.4 \pm 5.3\%$ (n=5)が強陽性、 $71.0 \pm 4.5\%$ (n=5)が弱陽性、 $4.4 \pm 5.1\%$ (n=5)が陰性を示し、elongating spermatid 細胞は、 $73.1 \pm 5.4\%$ (n=5)が強陽性、 $12.6 \pm 2.1\%$ (n=5)が弱陽性、 $14.1 \pm 3.7\%$ (n=5)が陰性を示し、elongated spermatid 細胞に対しては、 $26.2 \pm 4.7\%$ (n=5)が弱陽性、 $73.8 \pm 4.7\%$ (n=5)が陰性を示した。したがって、陰性分画にも round spermatid 細胞および elongating spermatid 細胞が存在することとなる。

3-A-1-II) 6F 抗体の、各種実験動物由来の単離精巣細胞との反応性の検討

以上までは、13 週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットの単離精巣細胞を用いて解析してきた。引き続き、6F 抗体の精巣細胞に対する反応性の種差ならびに系統差を検討する目的で、PI 蛍光[DNA 含量] - FITC 蛍光[抗体反応量]プロットを用いて、セルソーター解析を検討した。各種実験動物ならびに系統は、1) 3 系統のマウス[C57BL/6NCrj, C3H/HeNCrj, Crj:CD-1]、2) 2 系統のラット[Crj:Wistar, F344/DuCrj]、3) モルモット[Std: Hartley]、4) ハムスター[Slc: Syrian]、用いた。

その結果、6F 抗体との反応性は、各系統のラットのみで認められ、そのラットに対する種特異性が明らかとなった(data not shown)。

3-A-1-III) 6F 抗体の、各日齢の Sprague-Dawley ラット由来単離精巣細胞との反応性の検討

引き続き、6F 抗体の反応陽性細胞分画と精子形成過程との関連性を明らかにする目的で、各日齢(生後 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 日)の Sprague-Dawley ラットの精巣細胞用いて、セルソーター解析を検討した。パラメーターとしては、PI 蛍光[DNA 含量]ならびに FITC 蛍光[抗体反応量]を用いた。

その結果、PI 蛍光[DNA 含量]のヒストグラム解析から、ploidy: n 分画は、生後 28 日には認められ、ploidy: sub-n 分画は、生後 42 日には認められた(図 3-a)。この際、PI 蛍光[DNA 含量] - FITC 蛍光[抗体反応量]プロットで 6F 抗体との反応性を加味して解析したところ、生後 28 日では、ploidy: n 分画の 6F 抗体に対する反応性は、弱陽性分画のみ、認められ、強陽性分画は認められなかった。しかし、生後 35 日には、強陽性分画も認められるようになった(図 3-b)。ここで、注目すべき点は、各日齢において、この陽性分画が現れても、陰性分画が常に存在することである。

したがって、6F 抗体との反応陽性分画の細胞は、精子形成過程時系列、つまり細胞分化時系列に従って現われ、またその反応性の強度もその時系列とともに増加することが明らかとなった。ただし、陰性分画の細胞については、この細胞分化時系列に従っていない可能性も同時に示唆された。

3-A-2. 免疫組織化学的解析

(分担：国立医薬品食品衛生研究所)

ラット各組織に対する 6F 抗体の反応性を、コントロール 1 次抗体の場合と比較しつつ、DAB 発色を指標に、免疫組織化学的に検討した。組織は、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、精巣、精管、精巣上体を用い、凍結切片にて検討した。

その結果、コントロール 1 次抗体と比較して、6F 抗体と強く特異的に反応する組織は、精巣のみであった。また、精巣組織内でも、精細管によっては、6F 抗体と反応するものと、反応しないものが認められた (図 4)。

3-A-3. 6F 抗体の認識分子 (抗原) の同定の検討

6F 抗体のラット精巣細胞との反応性は、ウエスタンブロッティング法では検討できなかったため、SDS を用いない、Native-PAGE 法を検討したが、今回の実験条件では、検出できず、今後さらなる条件検討が必要と考えられた(data not shown)。

[実験 B] 6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の有用性・妥当性の検討

(分担： 日本ロシユ)

6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の有用性・妥当性を検討することを目的として、精巣障害性化学物質をラットに投与することで検討した。なお、この実験の濃度設定などの、基本的な部分の条件検討は、すでに平成 11 年度までに検討済みである。

単離精巣細胞は、セルソーターを用いて、DNA ploidy(sub-n, n, 2n, 4n)と細胞の大きさに基づき、7 つの分画に分類した(細胞の大きさは FSC-Ploidy contour plot の相対的な位置から L と R で識別した。R には、より大きな細胞が plot される)。また、精巣細胞における 6F 抗体の陽性率の変化を解析した。

3-B-1. 実験 1：Adriamycin 投与

Adriamycin を 4 週間投与後、精巣重量の用量依存的な減少が認められた。セルソーターを用いた解析から、投与群での n-R、2n-L、4n-L 及び 4n-R の減少が見られ、2mg/kg 群では、さらに Sub-n の増加が認められた (図 5)。精巣細胞の 6F 抗体に対する反応性では、round spermatids での陰性及び弱陽性分画細胞数の減少が認められた (図 5)。強陽性分画の細胞数については、2mg/kg 群で減少する傾向は認められたが、それ程大きな変化ではなかった。elongating と elongated spermatids においては、6F 抗体陰性及び陽性分画とも 2mg/kg 群で増加する傾向が認められた (図 5)。

3-B-2. 実験 2：Ethinylestradiol 投与

Ethinylestradiol を 2 週間投与後、投与群で雄生殖器 (精巣、精巣上体、精囊、前立腺) の減少が認められた。特に、副生殖器重量の低下が顕著に認められた。セルソーターを用いての解析では、投与群で、n-L の減少、n-R、4n-R の減少傾向及び 2n-L の増加傾向が認められた。6F 抗体染色では、round spermatids における弱陽性と強陽性分画細胞数の減少傾向が見られ、比率では、弱陽性分画の増加傾向と強陽性分画の減少傾向が round spermatids で認められた。

4. 考察

平成 11 年度までに、有望なモノクローナル抗体 (6F 抗体) を得たが、本年度はこの作成した 6F 抗体を用いて、セルソーターによる解析を検討した。その結果、6F 抗体は、半数体精子細胞(ploidy: n と sub-n の分画)と反応し、特に、round spermatid 細胞の 24%の細胞集団および、elongating spermatid 細胞の 73%の細胞集団と強く反応することが明らかとなり (図 1b、図 2)、また、精巣障害モデルラットを用いた検討からも、6F 抗体の有用性が示唆された (図 5)。これまでの精子形成細胞の表面マーカーは、マウス精粗細胞に対する抗 c-kit 抗体以外は、細胞系列標識の特異性が低く、詳細な解析には不適であった。本研究における 6F 抗体の開発は、目的に叶う形でほぼ成功し、独創的なものとなった。したがって、ほぼ当初の目的を達成したものと考えられるが、以下、さらに詳細に考察する。

[実験 A] 6F 抗体の精巣細胞および各種組織との反応性の検討

4-A-1. 6F 抗体のラット精巣細胞との反応性について

半数体精子細胞は、形態学的に以下の 3 つのサブグループに分類され、これらを時系列で並べると、1) round spermatid 細胞、2) elongating spermatid 細胞および 3) elongated spermatid 細胞となる。

Sprague-Dawley ラット由来単離精巣細胞を用いた本実験結果から、6F 抗体は、一部の round spermatid 細胞分画および一部の elongating spermatid 細胞分画と、強く反応すると同時に、一部の両細胞分画とは、反応しないことが明らかとなった。具体的に定量化すると (各分画での細胞数をそれぞれの 100% とした場合)、round spermatid 細胞分画は、強陽性 (24%)、弱陽性 (71%)、陰性分画 (4%) に、elongating spermatid 細胞分画は、強陽性 (73%)、弱陽性 (13%)、陰性分画 (14%) に、また elongated spermatid 細胞分画は、弱陽性 (26%)、陰性分画 (74%) に、それぞれ分類された (図 1、2)。

(6F 抗体の認識分子 (抗原) の発現と精子細胞分化の時系列との関連性について)

しかし、以上までの結果からだけでは、「精子細胞分化の時系列 (経時変化) と 6F 抗体の認識分子 (抗原) の発現時期との関連性」は不明なままである。そこで、生後の各日齢の精巣を用いて、分化の時系列との関連性の視点から解析したところ、6F 抗体との反応陽性分画は、先ず弱陽性分画が現れ、次いで強陽性分画が現れた (図 3)。したがって、精子細胞分化の時系列に従って、6F 抗体の認識分子 (抗原) が発現し、その反応性も経時的に増加することが示唆された。また、elongated spermatid 細胞には、強陽性分画は存在せず、弱陽性分画のみであることから、この 6F 抗体の認識分子 (抗原) の発現量増加は、一過性であることが示唆された。免疫染色の結果でも、6F 抗体は、より分化の進んだ精巣上体内の精子および精管内の精子とは、反応せず、この可能性を支持する。

他方、生後の各日齢の精巣を用いた実験でも、ploidy: n 分画には、6F 抗体陰性分画が常に存在している。このことは、6F 抗体と反応しない半数体精子細胞系列が存在することを示唆している。この点に関して、免疫組織化学的解析結果から、精巣組織内でも、精細管によっては、6F 抗体と反応するものと、反応しないものが認められた (図 4)。このことも、6F 抗体と反応しない半数体精子細胞系列が存在することを示唆している。

したがって、以上までの考察をまとめると、半数体精子細胞系列は、6F 抗体と反応するサブグループと、反応しないサブグループとに分けられ、反応するサブグループにおいては、6F 抗体の反応性は、細胞分化の時系列に従って、ploidy: n 分画で一過性に増加することが示唆された。

4-A-2. 6F 抗体の種特異性、組織特異性について

(種特異性について) 精巣細胞に対する、6F 抗体の種特異性および系統特異性を明らかにする目的で、ラット・マウス・モルモット・ハムスターの各精巣を用いて解析したところ、ラットに対する種特異性が明らかとなった。なお、Sprague-Dawley ラットに加えて、さらに2系統のラット[Crj:Wistar、Fisher/Ducrl]の精巣にも反応性を示し、系統差は認められなかった。このような種特異性の生じる原因としては、サイトカイン受容体などでも知られるように、6F 抗体の認識分子(抗原)が、種によって異なる可能性が示唆される。

(組織特異性について) また、6F 抗体の組織特異性を検討する目的で、ラット各種組織を用いて、免疫組織化学的に解析した結果、6F 抗体は、精巣特異的な反応を示すことが明らかとなった。このことは、6F 抗体の認識分子(抗原)が、精巣のみに発現していることを示唆しており、精巣細胞分化に特異的な分子を6F 抗体が認識している可能性が示唆された。

今後、6F 抗体の認識分子(抗原)の遺伝子の特定を通して、新たな精子形成細胞の分化制御因子の発見が期待された。

[実験 B] 6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の有用性・妥当性の検討

4-B-1. 実験1: Adriamycin 投与について

Adriamycin 投与動物で認められた 2n-L の減少傾向と 4n-L、4n-R 及び n-R の減少は、4 週間投与により、精原細胞から round spermatid 細胞までの生殖細胞が障害を受けていることを示すものと考えられた(図5)。

6F 抗体に対する反応性では、round spermatid 細胞における弱陽性細胞の減少が最も顕著に認められた。round spermatid 細胞の 6F 抗体陰性分画についても細胞数は減少していたが、強陽性細胞数に大きな変化は認められなかった(図5)。個別別にみると、1mg/kg 群と 2mg/kg 群の一部の動物では、n-L 及び n-R には大きな変化は見られないが、round spermatid 細胞の弱陽性細胞数の減少が認められ、6F 抗体の機能検査としての有用性が示唆された。

4-B-2. 実験2: Ethynylestradiol 投与について

Ethynylestradiol、2 週間の投与による n-L の減少、n-R と 4n-R の減少傾向は、round spermatid 細胞と pachytene 期細胞の減少及び変性像が見られるという文献結果と符合している。また、2n-R の減少傾向は、ライディッヒ細胞の変性と符合している。2n-L の増加傾向については、10mg/kg の ethynylestradiol 投与 2 週目で spermatogonia 細胞の増加を認めた報告もあるが、ライディッヒ細胞の萎縮に伴う plot 位置の変化に基づく可能性も考えられた。

6F 抗体との反応性では、round spermatid 細胞の弱陽性分画と強陽性分画細胞数の減少傾向が認められた。比率では、round spermatid 細胞の強陽性分画の割合が減少して、弱陽性分画の割合が増加する傾向が見られ、精巣障害の強く見られた動物でより顕著であった。Ethynylestradiol による精巣障害は、testosterone 産生の減少に起因した stage 特異的な変化であることが報告されており、今回認められた変化は作用メカニズムや作用部位を類推する上で有用であると考えられる。

5. 結論

本研究の広義の目的は、精巣における精子形成過程(spermatogenesis)の状態を、迅速かつ鋭敏に把握する解析技術を確立することにあるが、狭義の目的は、1) ラット精子形成細胞の1つ、round spermatidの細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体の作成とその抗体の認識分子を明らかにすることと、あわせて、2) 独自に開発したセルソーターを用いた精子形成過程の解析法の有用性を、作成した6F抗体の有用性とあわせて、精巣障害性化学物質を実験動物に投与することにより検討することである。

[実験 A] 6F 抗体の精巣細胞および各種組織との反応性の検討

5-A-1. 作成した6Fモノクローナル抗体は、ラット半数体精子細胞(round spermatid細胞、elongating spermatid細胞、elongated spermatid細胞)と反応し、その反応強度から、1) 強陽性分画、2) 弱陽性分画、3) 陰性分画に分けられる。

5-A-2. この6F抗体の反応強度と形態学的な分類を対応させると、6F抗体との反応性は、強陽性分画は、round spermatid細胞の中の24%、elongating spermatid細胞の中の73%の細胞集団が相当し、他方、弱陽性分画は、round spermatid細胞の中の71%、elongating spermatid細胞の中の13%、elongated spermatid細胞の中の26%の細胞集団が相当した。なお、6F抗体は、精巣上体管内の精子および精管内の精子とは反応しなかった。

5-A-3. 精巣切片(精細管)を用いた解析では、精子形成サイクル上、6F抗体と反応するステージと反応しないステージが存在した。

5-A-4. 6F抗体は、ラットに対する種特異性が認められた。

5-A-5. 6F抗体は、精巣組織特異的である可能性が示唆された。

[実験 B] 6F 抗体を用いた精子形成過程解析法の有用性・妥当性の検討

5-B-1. 精巣に障害を起こすことが知られている薬剤(adriamycinとethynylestradiol)を用いて、6F抗体の有用性を検討した結果、従来の手法に比べ、より感度よく、的確に障害を把握できる可能性が示唆された。

6. 研究発表

1) Kitajima, S., Kitabayashi, A., Hirabayashi, Y., Saga, Y., & Inoue T.: A novel haploid germ cell-specific antigen during rat spermatogenesis detected with monoclonal antibody. Cold Spring Harbor Meeting 2000- Germ Cells (2000).

2) Katoh, C., Horii, I. Kitajima, S., Saga, Y., & Inoue T.: The assessment of dual parameter flow cytometry analysis to detect the testicular toxicity caused with cyclophosphamide in rats. 第27回日本トキシコロジー学会学術年会(2000).

7. 知的所有権の取得状況

特許取得準備中

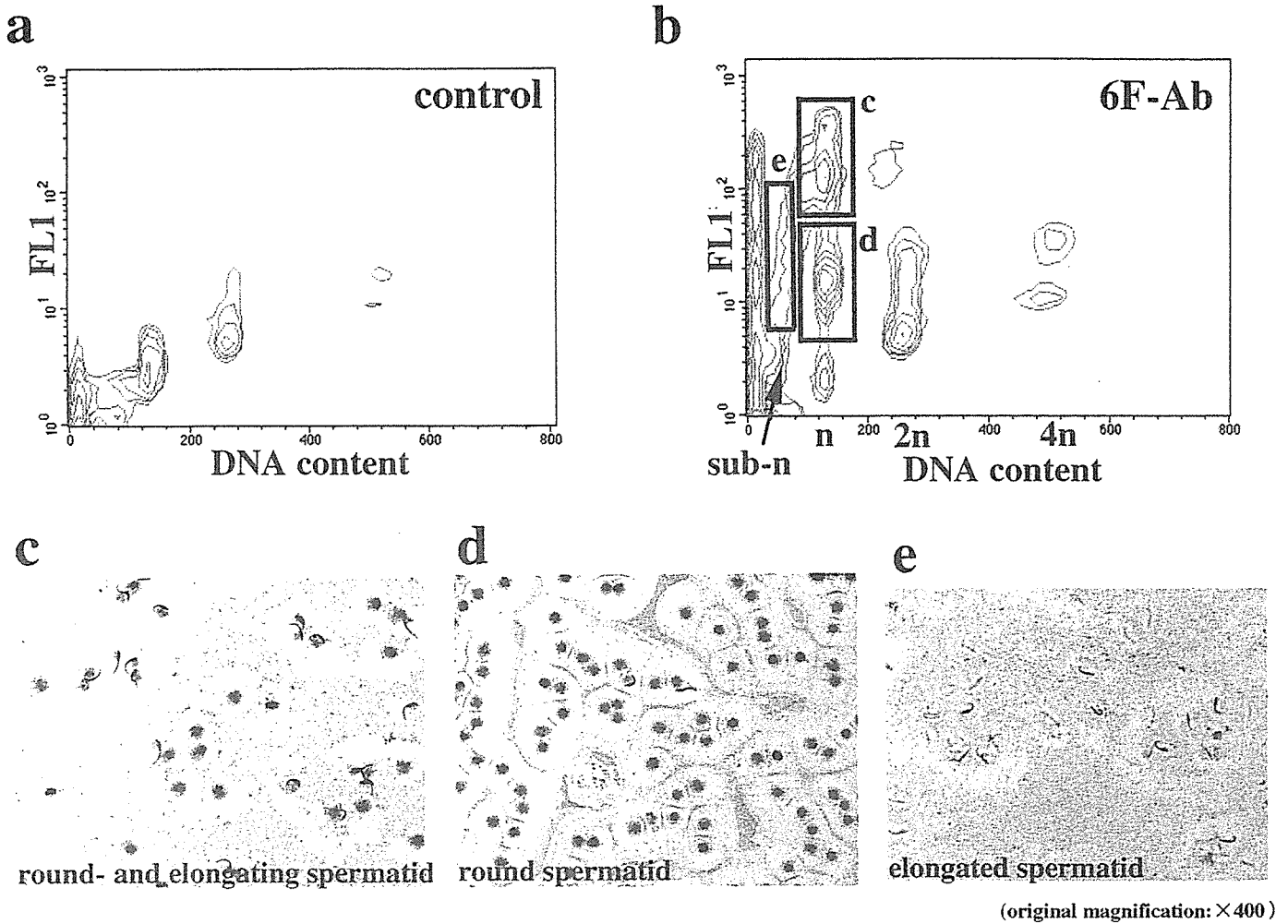


図 1 6F抗体を用いた単離精巢細胞のセルソーター解析

縦軸：抗体との反応性、横軸：DNA含量。a: コントロール1次抗体。b: 6F抗体。
 反応陽性分画を□で囲んだ。c-e: 図bでの各陽性分画部分をセルソーティングした像。

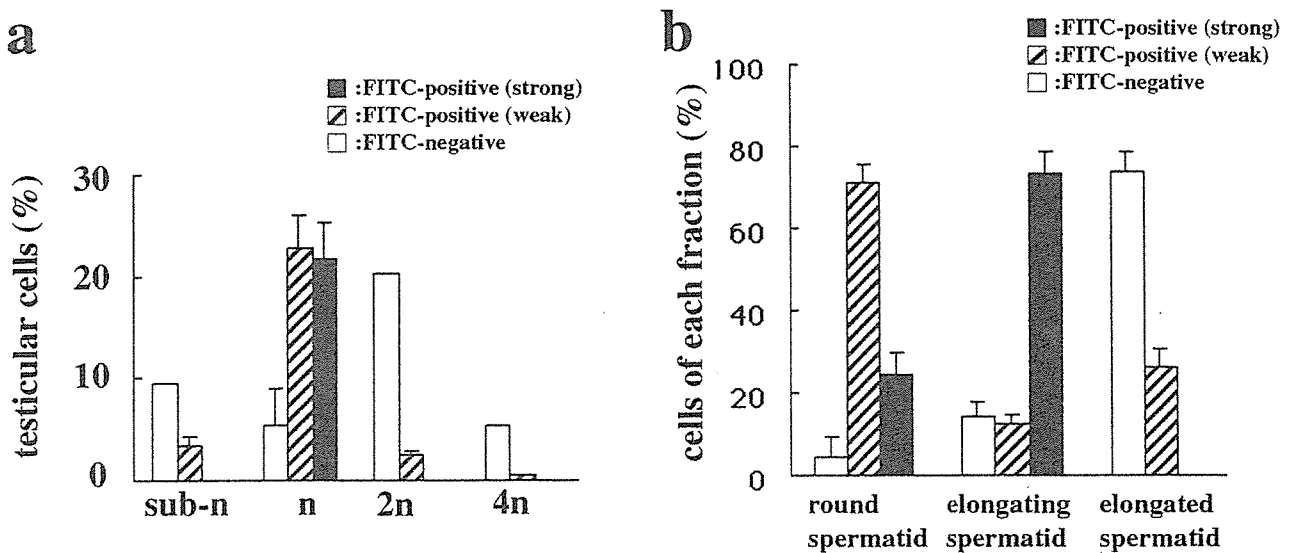


図 2 6F抗体を用いたセルソーター解析の定量

a: 各 ploidy 分画に対する 6F 抗体の反応性 (全精巢細胞数を 100% とした)。b: 半数体精子細胞の各分画に対する 6F 抗体の反応性 (各分画における各細胞総数を 100% とした)。

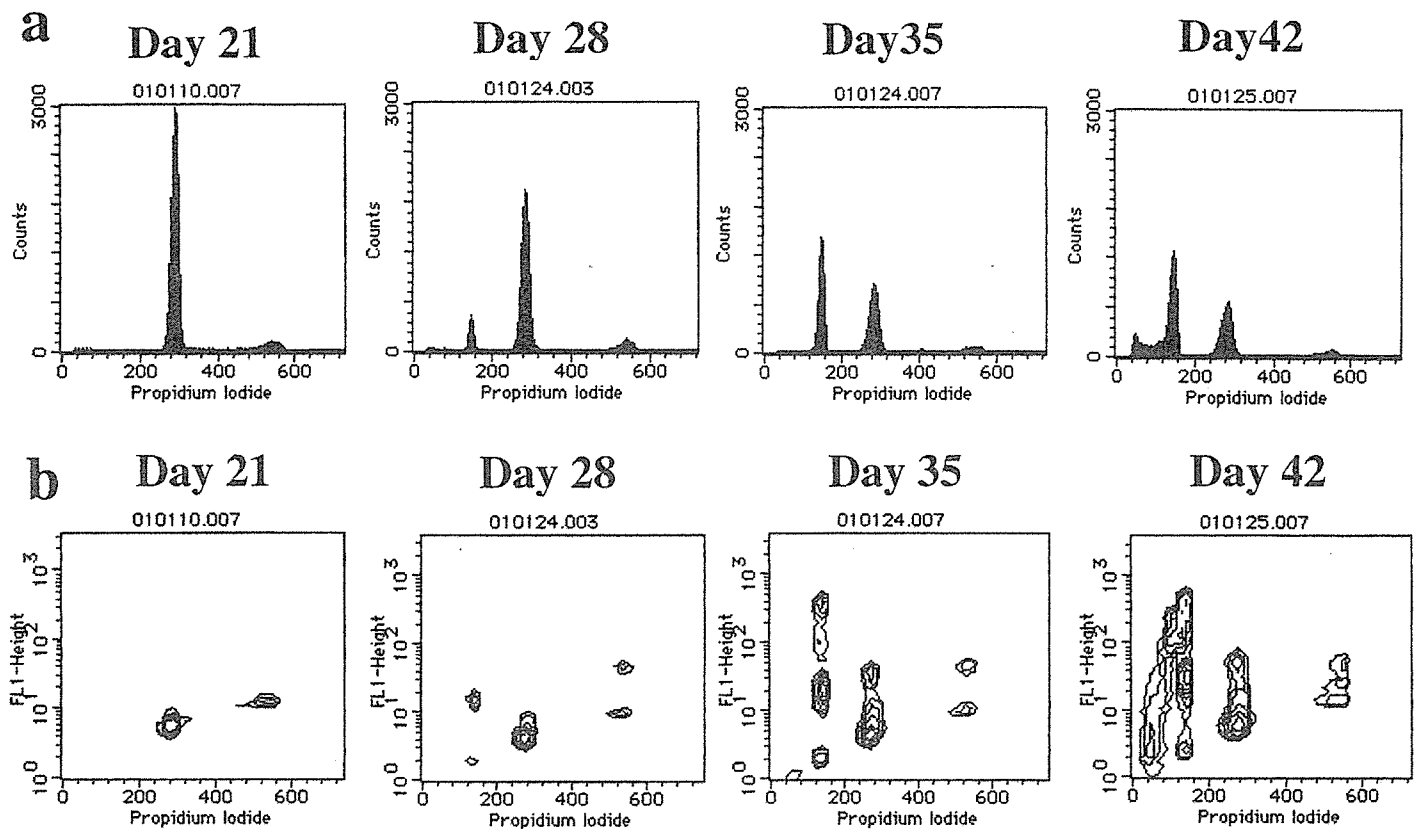
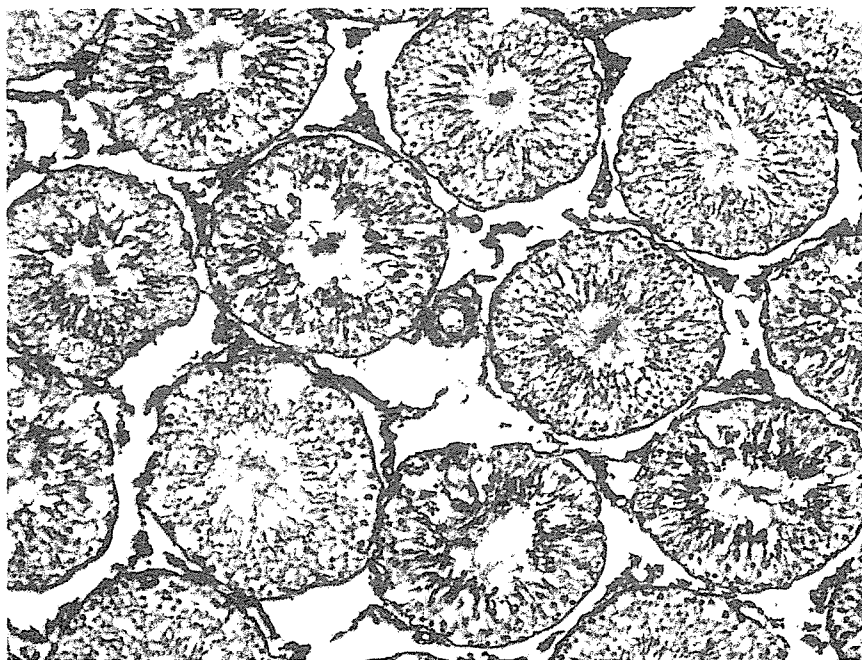


図 3 6F 抗体の各日齢のラット精巣細胞に対する反応性

a: DNA 含量のヒストグラム (縦軸:細胞数、横軸:DNA 含量)。

b: 6F 抗体との反応性 (縦軸:反応性 [FITC 蛍光強度]、横軸:DNA 含量)。



(original magnification $\times 100$)

図 4 6F 抗体を用いた精巣組織の免疫組織化学染色

ラット精巣をパラホルムアルデヒド固定後、凍結切片とした ($5 \mu\text{m}$)。抗体濃度: $17 \mu\text{g/ml}$ 。DAB 発色 (褐色)。

6F 抗体は、精細管内の round-、elongating-、elongated- spermatid 細胞と反応した。また、精子形成サイクルのステージにより、6F 抗体の反応性が異なることが明らかとなった。

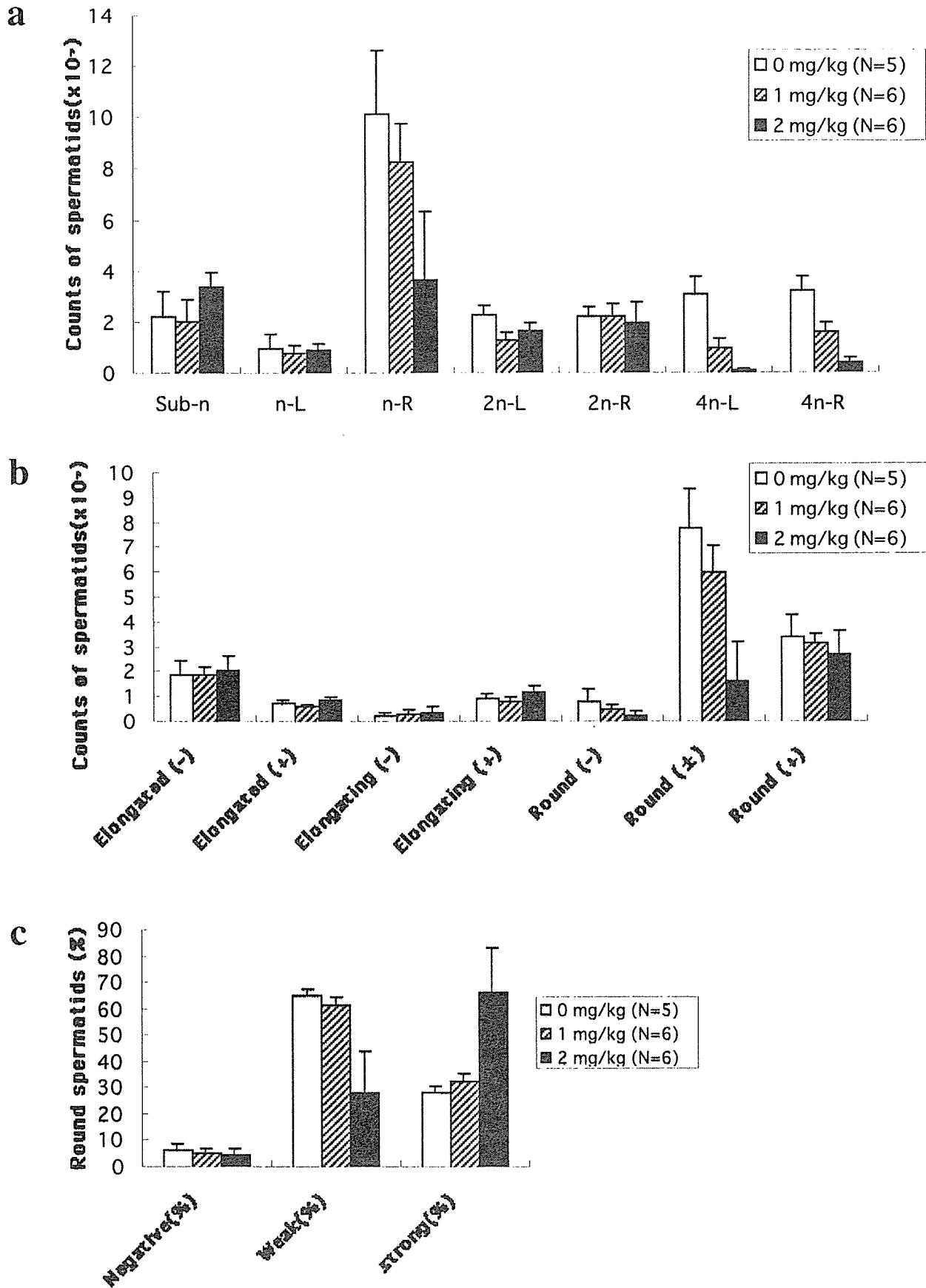


図5 アドリアマイシン4週間投与後のラット精巣細胞のセルソーター解析
 a：前方散乱光[FSC]-PI蛍光[DNA量]プロットによる解析、b：各半数体精子細胞分画に対する6F抗体との反応性 (+:強陽性分画、±:弱陽性分画、-:陰性分画)、c：round spermatid分画における6F抗体との反応性 (round spermatid細胞総数を100%とした。)

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第3分野

医薬品等の評価・試験方法の開発に関する研究

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社