

令和3年度 分担研究報告書

Vimentin抗体を用いた免疫組織化学によるセルトリ細胞の機能評価法の検討

研究分担者 齊藤 洋克

国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 研究員

研究要旨

これまでの研究報告により、哺乳類における正常な精子形成過程において、精子細胞と精細管内に存在しているセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。本分担研究では、化学物質曝露によって生じる、セルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin に着目した機能評価法の確立を試みた。

ビタミンE欠乏マウスの精巣組織切片をサンプルとして用い、vimentin 抗体による免疫組織化学を行った結果、精細管周期に応じて、vimentin の染色性の差異が認められた。また、ビタミンE欠乏マウスの精巣組織切片において、精細管横断面の表面積に対する vimentin 陽性領域の面積比が増加することが明らかとなった。さらに、メタカン液および4%パラホルムアルデヒドにて固定した精巣組織切片の染色性の比較を行った結果、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められず、複数の固定方法に適用可能であると考えられた。

画像処理による精細管横断面に対する vimentin 陽性領域が占める面積の割合の算出結果から、ビタミンE欠乏マウスの精巣組織切片において認められた vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害と関連した変化を示すものであると考えられ、本解析手法により精巣内環境の変化に伴うセルトリ細胞の機能的変化を捉えることが可能であることが示唆された。すなわち、本研究において試みた vimentin 抗体を用いたセルトリ細胞の機能評価法は、今後行うモデル化学物質を用いた影響評価においても妥当性をもって解析することが可能であると考えられる。

A. 研究目的

本研究では、食をとりまく環境変化に対応するため、食品のリスク評価・管理体制の迅速化・高度化に資することを見据え、食品成分により生じる造精機能障害を高感度・高精度に検出するハザード評価体系の基盤構築を行うことを目的とする。今年度の分担研究として、化学物質曝露によって生じる、セルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みる。

これまでの研究報告により、哺乳類における正

常な精子形成過程において、精子細胞と精細管内に存在しているセルトリ細胞の密接な相互作用が重要であることが分かっている。セルトリ細胞は精細胞の支持、栄養供給、精子離脱の補助、貪食作用、免疫学的障壁など精巣内環境を維持するための様々な機能を有する。Vimentin は、間葉細胞がもつ細胞骨格中間径フィラメントの一種であり、主として機械的支持を担い、細胞骨格としての細胞の形の維持、核の位置の固定などの役割を持ち、セルトリ細胞を検出するマーカーの1つとしても用いられる。セルトリ細胞の細胞骨格系と造精機能障害がどのように関わるのか、その機能的変化

については不明な点が多いが、精子細胞とセルトリ細胞の相互作用の重要性を考えると、造精機能障害が顕在化する際、あるいはその前段階として、細胞骨格系への影響として現れることも十分に考えられる。また、セルトリ細胞の機能変化を鋭敏に検出する評価系が存在しないことから、本評価手法の検討は、きわめて有用であると考えられる。

B. 研究方法

サンプル

細胞の酸化障害を抑制する働きをもつビタミン E の欠乏 (以下 VED) により、精子形成不全をはじめ、マウス雄性生殖機能に及ぼす影響を評価した過去の研究 (Saito et al. (2020) “Effect of vitamin E deficiency on spermatogenesis in mice and its similarity to aging”, *Reprod. Toxicol.* 98:225-232. PMID: 33045311) で用いた、28 週齢 (コントロール群および 24 週間 VED 給餌群) マウスから採取した精巣サンプルを使用した。

精巣組織切片の免疫組織化学

メタカン液 (メタノール:クロロホルム:酢酸=6:3:1) あるいは 4% パラホルムアルデヒド固定液にて固定した精巣組織について、パラフィン切片 (7 μ m) を作製し、セルトリ細胞マーカーとして、細胞骨格タンパク質である vimentin 抗体を用いて免疫組織化学を行った。パラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし、エタノール (100、95、90、80、70%) にて段階的に再水和した。HistoVT One (ナカライテスク、京都、日本) により 90 $^{\circ}$ C、30 分で抗原賦活化処理し、Blocking One (ナカライテスク) と共に 4 $^{\circ}$ C で 1 時間ブロッキング処理した後、一次抗体処理を行い、4 $^{\circ}$ C で一晚インキュベートした。一次抗体には以下のものを用いた: rabbit monoclonal anti-Vimentin (Abcam; ab92547; 500 倍希釈)。PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 標識抗体 (Invitrogen; 1,000 倍希釈) を用い、4 $^{\circ}$ C

で 2 時間処理した。核は Hoechst 33342 (ナカライテスク; 5,000 倍希釈) で染色した。一次抗体および二次抗体、Hoechst 33342 は、Blocking One および PBS の混合溶液で希釈して用いた。染色像は、BX51 蛍光顕微鏡および付属の cellSens ソフトウェア (オリンパス、東京、日本) で取得した。

取得した染色像の画像解析方法の検討

精巣内環境の変化に伴うセルトリ細胞の機能的変化を捉えることを目的として、セルトリ細胞の機能評価に利用するための画像解析方法を検討した。画像の解析には、Image J Fiji (Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. et al. (2012), “Fiji: an open-source platform for biological-image analysis”, *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID: 22743772) を用いた。同一条件にて染色・撮影した原画像をグレースケールに変換後、二値化の設定値を調整し、Binary 画像を作成 (二値化処理) することにより、vimentin 陽性領域を抽出した。その後、各精細管横断面の表面積 (μm^2) に対して、vimentin 陽性領域 (μm^2) が占める面積の割合 (%) を算出した。精細管横断面は 1 個体あたり 60 個以上観察し、各群 3 個体の平均値を算出した。

(倫理面への配慮)

動物実験の計画及び実施に際しては、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、所属の研究機関が定める「国立医薬品食品衛生研究所・動物実験等の適正な実施に関する規程」を遵守した。

C. 研究結果

Vimentin 抗体によって染色したマウス精巣組織切片の観察

Vimentin 抗体を用いた精巣組織切片の免疫組織化学の結果、Stage I ~ VI、VII ~ VIII、IX ~ XII の精細管周期に応じて、vimentin の染色性

に差異がみられた。vimentin は基底から管腔に向かって伸長しており、特に精細管周期の Stage I ～VIにおいて顕著であった(図1)。

画像処理による vimentin 陽性領域が占める面積の割合の算出

メタカン液にて固定した精巣組織切片の免疫組織化学により得られた画像について、二値化処理を施した後、各精細管横断面の表面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合(%)を算出した結果、コントロール群と比較して、VED 給餌群の精巣組織切片において、精細管横断面に占める vimentin 陽性領域の面積の割合が有意に増加した(Control 群:6.1±0.4%、VED 給餌群:9.1±0.7%; 図2)。

固定液の違いによる vimentin 抗体の染色性の比較

メタカン液および 4%パラホルムアルデヒドにて固定した精巣組織切片の染色性の比較を行った結果、どちらの固定液を用いたサンプルにおいても、染色性は良好であり、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった(図3)。

D. 考察

Vimentin 抗体を用いた免疫組織化学の結果、マウス精巣組織切片において、精細管周期に応じて、vimentin の染色性に差異がみられた。定量評価の必要はあるものの、精細管周期に応じて変化する生殖細胞系列と同調するように、セルトリ細胞骨格が変化している可能性が考えられた。

画像処理による、精細管横断面の表面積に対する vimentin 陽性領域が占める面積の割合の算出結果から、VED 精巣組織切片において認められた vimentin 陽性領域の割合の変化は、精巣内環境の悪化に伴う造精機能障害(精上皮の剥脱、精子頭部の形態異常率の増加等)と関連した変化を示すものであると考えられた。

すなわち、本画像解析手法により精巣内環境の変化に伴うセルトリ細胞の機能的変化を捉えることが可能であることが示唆された。本研究において試みた vimentin 抗体を用いたセルトリ細胞の機能評価手法は、今後行うモデル化学物質を用いた影響評価においても妥当性をもって解析することが可能であると考えられる。Vimentin 陽性領域の定量解析については、今後、精細管 Stage 依存的な vimentin の面積比の変化が存在するかどうか解析することで、各精細管周期における、特定の Stage に対する影響の有無も検討することが重要である。

固定液の違いによる vimentin 抗体の染色性を比較した結果から、少なくともメタカン液および4%パラホルムアルデヒドの2種の固定液については、染色性は良好であり、固定方法の違いによる明らかな染色性への影響は認められなかった。そのため、本画像解析手法が、複数の固定法に適用可能であると考えられた。実際は、条件によっては切片の厚みや固定液の種類に応じて再度検討が必要となるが、今回確立した解析手法をベースとして、条件を微修正することにより対応可能であると考えられる。

さらに、今回用いたサンプルにおける vimentin の免疫染色の結果から、セルトリ細胞が基底膜から遊離していると思われる染色像が散見され(図4)、vimentin 抗体を用いた造精機能障害を検出する新たな指標としての利用可能性についても並行して検討する必要があると考えられた。

E. 結論

本分担研究では、化学物質曝露によって生じる、セルトリ細胞の機能影響に起因する造精機能障害を検出する有用な解析方法を検討するため、セルトリ細胞マーカーである vimentin を用いた機能評価法の確立を試みた。

その結果、マウス精巣組織切片に対し、精巣

内環境の悪化に伴う造精機能障害を精細管に占める vimentin の面積比の変化というかたちで検出し、本画像解析手法により精巣内環境の変化に伴うセルトリ細胞の機能的変化を捉えることが可能であることを示した。今後、造精機能障害を誘発するモデル化学物質を用いた投与実験を行い、本評価手法を適用し、妥当性を検証することで、将来的には、健康被害を未然に防ぐための食品の安全性評価の迅速化・高度化に資する食品安全行政施策の提案にも貢献することが期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Taquahashi Y, Saito H, Kuwagata M, Kitajima S. Development of an inhalation exposure system of a pressurized metered-dose inhaler (pMDI) formulation for small experimental animals. Fundam Toxicol Sci. 8: 169-175, 2021.

Sasaki T, Saito H, Hiradate Y, Hara K, Tanemura K. Behavioural effects in mice orally exposed to domoic acid or ibotenic acid are influenced by developmental stages and sex differences. Biochem Biophys Res Commun. 558:175-182, 2021.

2. 学会発表

齊藤 洋克、北嶋 聡、菅野 純、種村 健太郎、低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価-発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に、第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.8)、神戸、シンポジウム

菅野 純、北嶋 聡、相崎 健一、齊藤 洋克、

種村 健太郎、肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析、第48回日本毒性学会学術年会(2021.7.8)、神戸

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

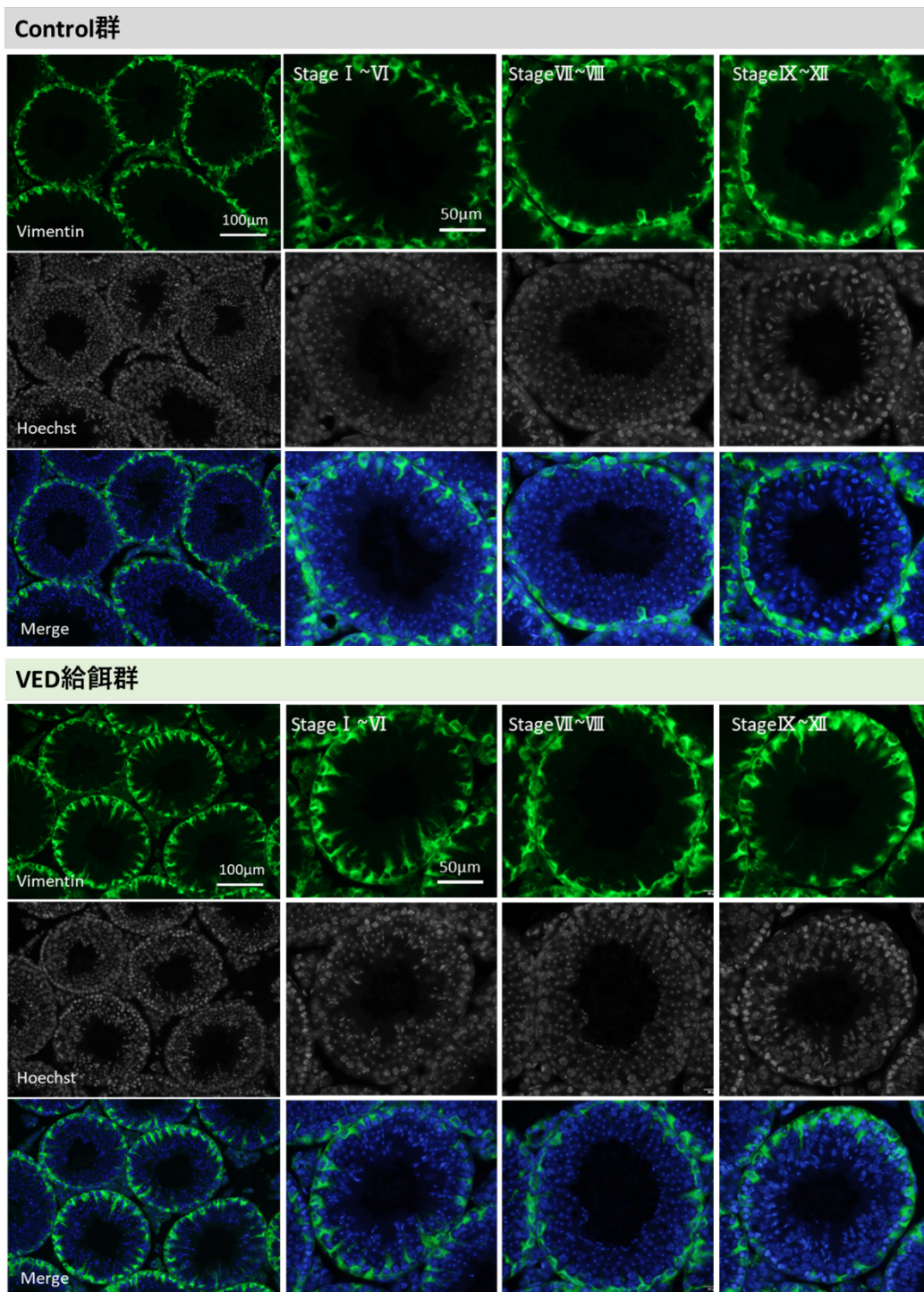
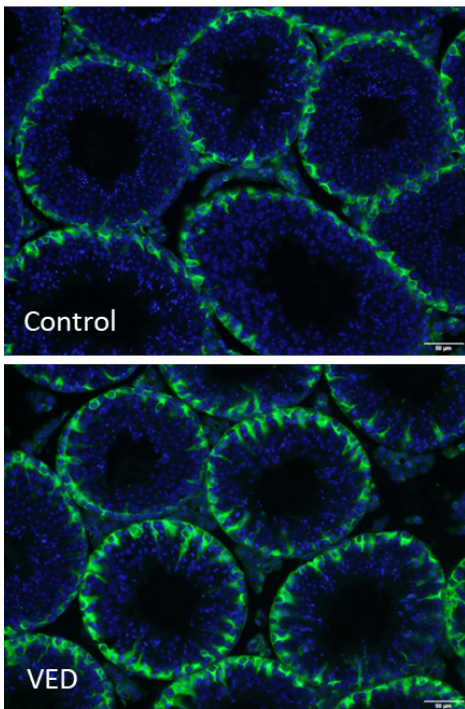
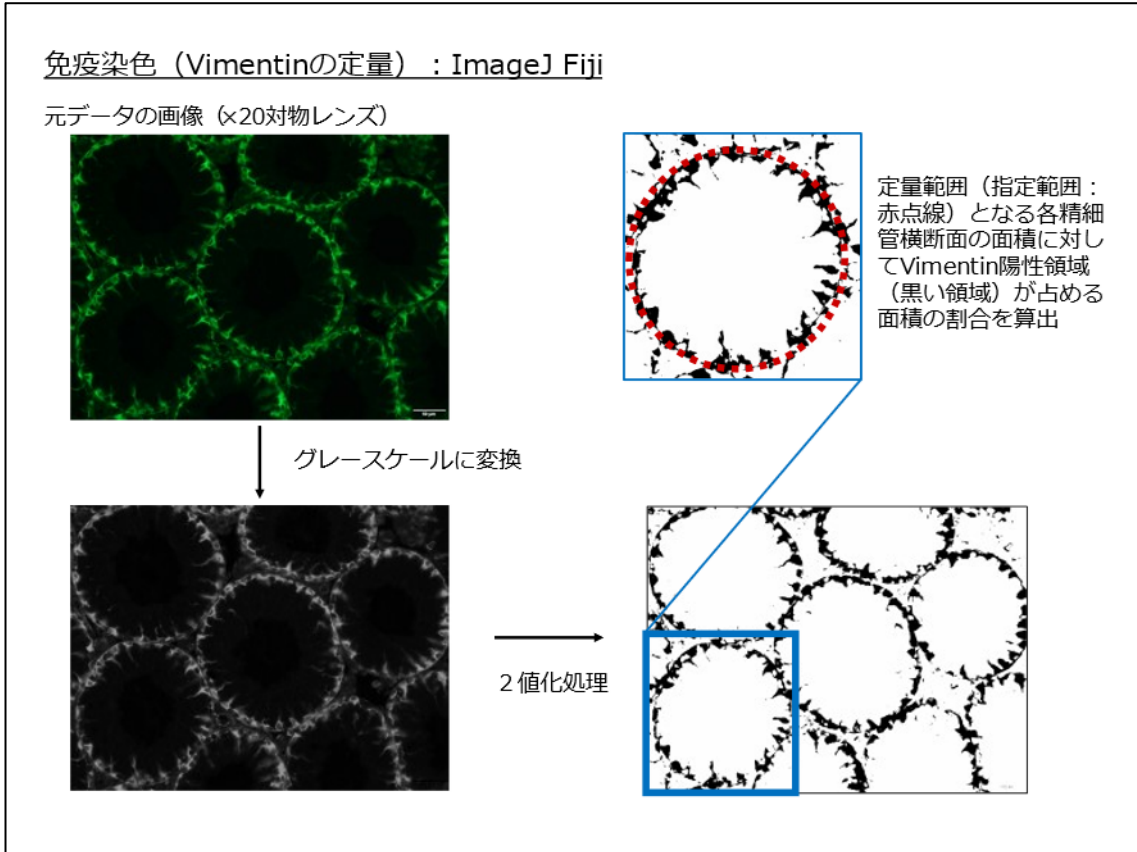


図1. Vimentin 抗体による精巣組織切片の免疫組織化学



精細管横断面の面積に対して、vimentin 陽性領域が占める面積の割合 (%)

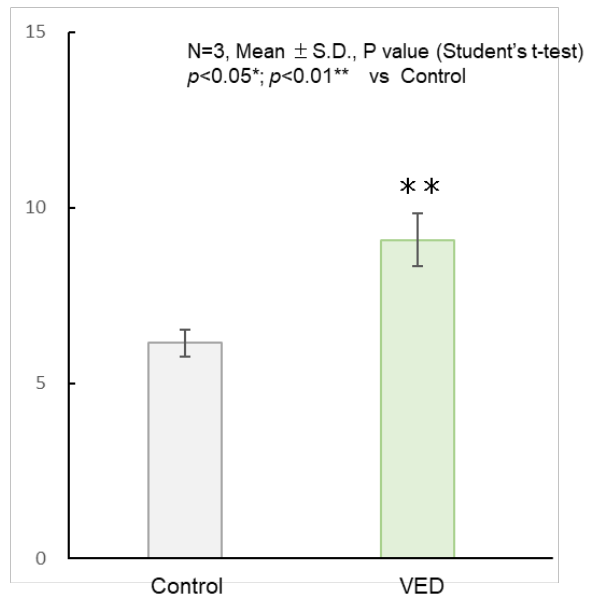


図2. 二値化処理による vimentin 陽性領域の画像解析方法および vimentin 陽性領域の割合の比較

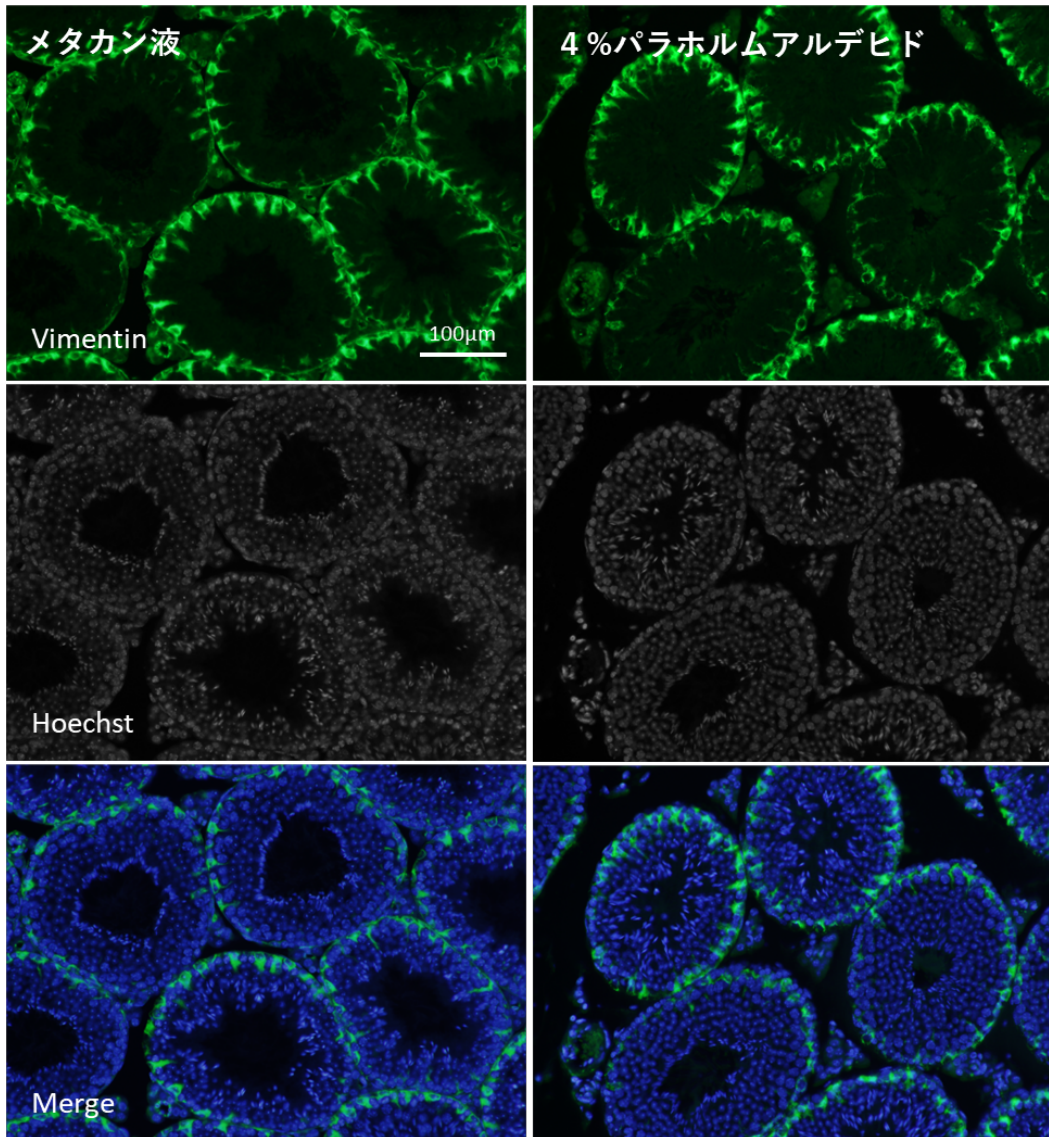


図3. コントロール切片を用いた固定液の違いによる vimentin 抗体の染色性の比較

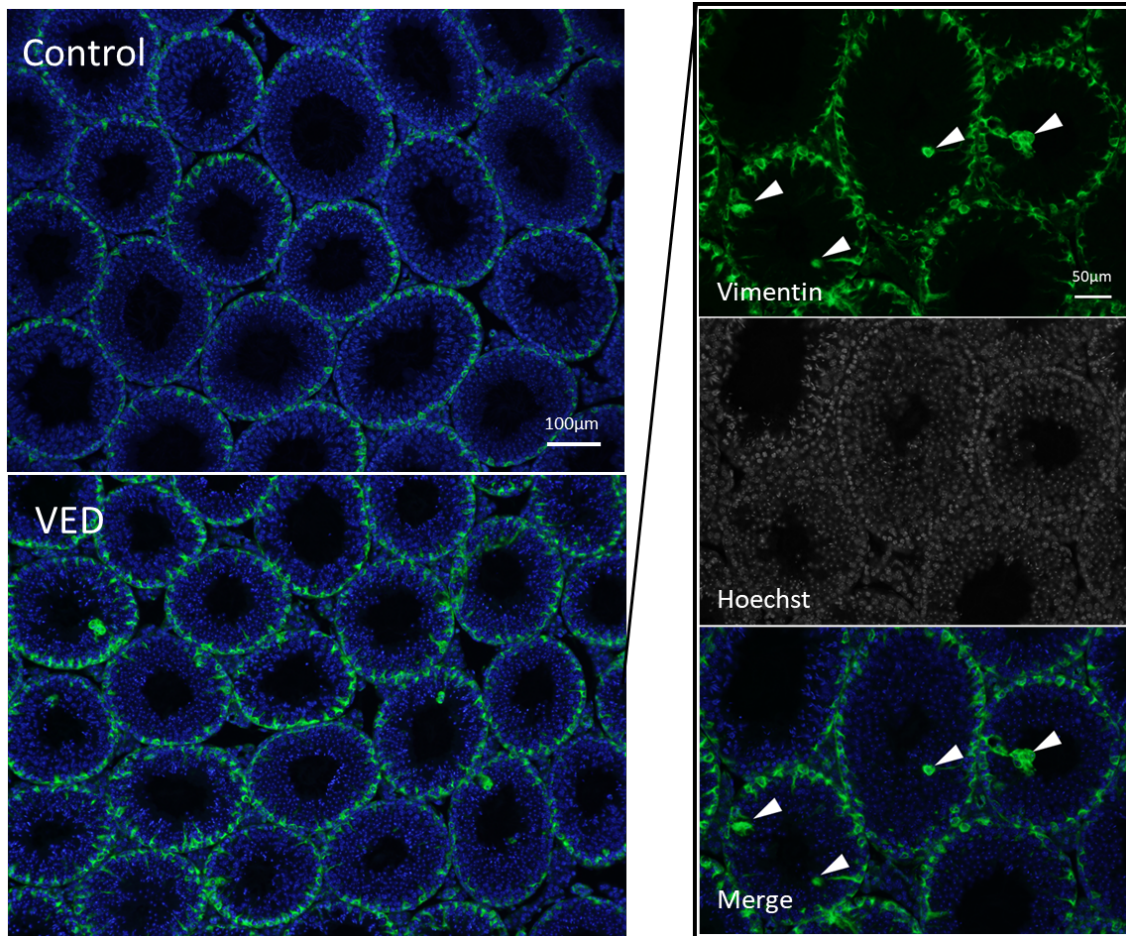


図4. VED 給餌群で頻繁に認められたセルトリ細胞が基底膜から遊離していると考えられる染色像 (矢頭)