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 (特に酸性ムコ多糖類を中心に)

	欄	芳	郎
名古屋大学医学部泌尿器科学教室 (主任: 三矢英輔教授)	三	宅	弘
	三	矢	英
			輔

THE HISTOCHEMISTRY OF THE TESTIS TISSUES FROM PATIENTS OF IDIOPATHIC MALE INFERTILITY

Report I. Studies on Complex Carbohydrate (Localization of Acid
Mucopolysaccharides)

Yoshiro Maseki, Koji Miyake and Hideo Mitsuya

Department of Urology, Nagoya University School of Medicine, 65 Tsuruma-cho,
Schowa-ku, Nagoya

(Director: Prof. Hideo Mitsuya)

In the present study, testis tissues were obtained from patients (in 23 cases) of idiopathic male infertility whose semen specimens were diagnosed to be either oligozoospermia or azoospermia. Testis tissues were furthermore obtained from patients (in 4 cases) of cryptorchism, eunuchoidism, bilateral congenital absence of the vas deferens and postvasectomized azoospermia. At the time of each surgical procedure, control specimens were dissected out from 6 individuals who were not clinically suffering from idiopathic male infertility. In all cases, Charny's accepted biopsy technique was employed. The tissue specimens were subjected to the following three types of fixation, 1) Carnoy's fluid (for 2 hours at room temperature), 2) 1% cetylpyridinium chloride (cpc) in Carnoy's fluid (for 2 hours at room temperature) and 3) 1% cpc in Carnoy's fluid (for 2 hours at room temperature) following treatment with cpc-urea for 2 hours at 53°C. After fixation, all the tissue specimens were embedded in paraffin and then stained with hematoxylin-eosin for general observation as well as the following histochemical methods for the demonstration of complex carbohydrates: 1) alcian blue (AB) (pH 1.0), 2) AB (pH 2.5), 3) dialyzed iron ferrocyanide (DI-FCY), 4) periodic acid-Schiff (PAS). For identifying individual acidic and neutral carbohydrates, the following procedures of enzyme digestion were performed upon some tissue sections prior to histochemical staining, a) sialidase [prior to staining with AB (pH 2.5)], b) streptomyces hyaluronidase [prior to staining with AB (pH 2.5)], c) testicular hyaluronidase [prior to staining with AB (pH 1.0) or (pH 2.5)], d) chondroitinase ABC [prior to staining with AB (pH 1.0) or pH 2.5)], e) chondroitinase AC [prior to staining with AB (pH 1.0) or (pH 2.5)], f) α -amylase [prior to staining with PAS].

The results are summarized as follows:

- 1) The seminiferous tubular walls and interstitial connective tissue in the testis tissues from both the normal and infertile individuals were believed to contain acidic complex carbohydrates with sulfate esters and carboxyl groups.
- 2) The present effects of digestion with chondroitinase ABC and AC upon AB (pH 1.0 and 2.5) reactions of the seminiferous tubular walls in the testis tissues from normal individuals and patients of male infertility were taken to indicate the presence of isomeric chondroitin sulfates (A and/or C) in these structure.

3) The interstitium of the testis tissues from normal individuals and patients of male infertility contained chondroitin sulfate B.

4) According to the present results obtained by the PAS staining procedure employed in combination with digestion with α -amylase, the germinal and supporting cells in the infertile testis tissues were thought to contain a large amount of glycogen than those in the cells in normal testis tissues.

要旨：今回われわれは無精子症および乏精子症と診断された特発性男子不妊症23例と、停留精巣、類宦官症、先天性両側精管欠損症、精管結紮後の無精子症の各4例と、各疾患手術時に生検して得た6例の正常精巣の計33例の精巣組織を用いて研究した。生検は Charny の方法により実施し、採取された組織は以下の3方法により固定した。1) カルノア液（室温で2時間）2) 1%塩化セチルビリジン（CPC）を含むカルノア液（室温で2時間）3) 53°C 2時間尿素—CPC で処理後、1% CPC を含むカルノア液（室温で2時間）。以上3種の固定液で固定後、パラフィン包埋しヘマトキシリン—エオジン染色および、以下の組織化学的方法を実施した。1) アルシアン青（AB）染色（pH 1.0）。2) アルシアン青（AB）染色（pH 2.5）。3) 透析鉄フェロシアンド（D1-FCY）⁷法。4) Periodic acid-Schiff（PAS）法、そしておのおのの中性、酸性ムコ多糖の同定を目的とし、組織化学的染色の前に以下のような酵素にて処理し染色した。酵素消化法。a) シアリダーゼ [AB（pH 2.5）染色前に]。b) 放線菌ヒアルロニダーゼ [AB（pH 2.5）染色前に]。c) 臍丸ヒアルロニダーゼ [AB（pH 1.0, 2.5）染色前に]。d) コンドロイチナーゼ ABC [AB（pH 1.0, 2.5）染色前に]。e) コンドロイチナーゼ AC [AB（pH 1.0, 2.5）染色前に]。f) α -アミラーゼ（PAS 染色前に）以上の酵素消化法の実施により以下のような結果を得た。1) 正常および特発性男子不妊症の精巣において精細管壁、間質には酸性ムコ多糖が存在する。2) AB pH 1.0および2.5染色とコンドロイチナーゼ ABC および AC 消化法の結果より、正常および特発性男子不妊症精巣の精細管壁には、コンドロイチン硫酸 A, C が存在した。3) そして、間質にはコンドロイチン硫酸 B が存在した。4) α -アミラーゼ消化法を併用した PAS 染色の結果より、正常精巣の精上皮、セルトリ細胞よりも特発性男子不妊症のそれらにより多くのグリコゲンが存在した。

緒 言

不妊の問題は、男女ともに等しく原因を追求されるべきであるが、従来本邦においては、その原因を女性側においていた傾向が強く、従つて泌尿器科の分野での原因追求もやや欠ける点があつた。近年になつて andrology および内分泌学の進歩、家庭内の環境の変化等より、男子不妊症が注目を浴びるようになった。いわゆる特発性男子不妊症—無精子症あるいは乏精子症のみを主所見とし、他に血中、尿中ホルモン等の臨床検査所見、理学的所見に特徴的な変化を認めない不妊症—の患者について、三宅¹⁾らは、不妊症の精巣において生検を行ない、連続切片を作製し精細管にみられる管腔の狭小化と精細管壁にみられる肥厚を、光学顕微鏡の観察結果より、この部位が走査型電子顕微鏡によつて観察される、精細管の“くびれの部”に一致することを指摘した。また連続切片法による光顕像の立体的再構築的観察から狭小化した精細管が正常な管腔を有する精細管へと移行していくことを指摘している。そして以上のような変化が特発性男子不妊症時に発生する精細管における第1次の変化と

みなし、精細管壁の肥厚により、精上皮への栄養物質の移行が妨げられて生ずるところの栄養障害と精細管壁の収縮障害による精子輸送障害が、特発性男子不妊症の本態と主張しているが、その原因は不明であり種々の程度に肥厚した精細管壁の変化と、管腔の狭小化の広範な研究が本態解明に必要だと主張している。

今回著者は組織化学的方法を用いて、各種精巣組織内の物質の消長を追求するため実験を試みた。すなわち、正常成人精巣、停留精巣、類宦官症、先天性両側精管欠損症、精管結紮後の無精子症等の精巣組織内の物質の消長と特発性男子不妊症精巣組織内におけるそれとを比較検討することにより、その不妊症の原因を追求しようとしたものであり、若干の観察結果を第1報としてここに報告する。

文献的考察

最近諸家の報告によりこれまで以上に男子不妊症が多く存在し²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾、しかも不妊症夫婦の半数以上に男子側に原因があると報告され⁷⁾⁸⁾⁹⁾、また漸次増加の傾向にあることが明らかになつている¹⁰⁾。この男子不妊症につ

いて内外の研究者により、分類、発生病理、診断、治療に関して多数の文献がみられるが、なお多くの問題が未解決のまま残されている。最近 andrology の進歩に伴ない Hafez¹¹⁾ らは、不妊症の発生機序を以下のような8項目に分類しおのおの鑑別診断法をあげている。

i) 発育的 (developmental), ii) 発生的および染色体性 (genetic & chromosomal), iii) 精巢性 (testicular), iv) 内分泌性 (endocrine), v) 神経内分泌性および精神学的 (neuroendocrine & psychological), vi) 精液因子 (semen factor), vii) 感染 (infection), viii) 免疫性 (immunological), さらに, iii) 精巢性 (testicular) を機序から停留精巢 (cryptorchism), 下降遅延移動精巢 (retarded descent floating testis), 萎縮精巢 (testicular atrophy) (外傷, 炎症), 放射線障害 (radiation injury) の6項目に分けている。鑑別診断として、精巢生検により、組織学、組織化学的観察、および細胞の組織培養法や陰囊温度図、超音波診断等の検査をあげている。この精巢生検の歴史は1905年 Posner¹²⁾ にはじまり、その後、1928年 Huhner¹³⁾ は男子不妊症患者に対して精巢上体精管吻合術を試みた際、精巢を直接穿刺吸引し、その吸引物中に精子の有無を検した。いわゆる, testicular aspiration をとなえ、1947年 Engle¹⁴⁾、1951年 Hotchikiss 等¹⁵⁾は精巢組織片を観血的に採取し、検索することを提唱した。

同じ時期に Charny¹⁶⁾ もこれを臨床的に応用して組織学的分類を発表し、診断に重要であると主張した。しかし、重要な検査である精巢生検の是非について、生検後、精液所見の悪化があり注意すべき検査法であるという報告もある¹⁷⁾。20世紀初頭から実施されたこの検査においてヘマトキシリン-エオジン染色にもとづいた組織像の分類を主として、内外の研究者により多くの研究がなされた¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾²²⁾²³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾²⁸⁾²⁹⁾。

なかでも現在までに代表的な文献は Engle¹⁴⁾ および Nelson²²⁾ の分類である。

Nelson の分類 (数百例の精巢生検)

1. 正常な造精機能 25%
2. 完全あるいは基本的に完全な精細管周囲線維形成 18%
3. 精細胞形成不全 35%
4. 精細胞完全停止 22%

Engle の分類

1. 進行性精細管周囲線維形成
2. 精細胞形成不全

3. 精子形成停止

次に精巢の一部を採取するためこの生検部位が全体の精巢組織をどの程度あらわすかという生検標本の信頼性に関して、1957年 Tillinger³⁰⁾ により広範な検討がなされ生検小片診断と精巢全体の剖面診断を比較検討し、一致率96%と報告しているが同一切片上で異なつた組織像が混在する場合も少なくなく、最悪の所見で表わすのか、占める割合の大ききで表わすのかなどの問題も残されている。

ゆえに Michelson³¹⁾ はおのおのの精巢において2、3の標本をとることが当を得ているとしながらも、局麻下に精巢の表層 (convex) での生検が診断的価値ありと述べている。けれどもこれらの分類は組織像、特に精細管内の造精機能の状態および間質の細胞成分を主眼にして分類したものばかりで³²⁾³³⁾、精細管壁および間質の結合組織の変化を組織化学的に検討し原因を追求したものは少ない。

組織化学的検索を文献的にみても Arzac³⁴⁾ は Hotchikiss¹⁵⁾ の方法により17例に精巢生検を行ない、Lillie の periodic acid-leucofuchsin 法、ヘマトキシリン-エオジン法などで、グリコゲンが hypoplastic process でセルトリ細胞に増加することを指摘し、完全に萎縮した例では、グリコゲンもなくなつていと報告している。また Mancini³⁵⁾ らは26歳から70歳の健康人の精巢生検で詳細な組織化学的検査結果を述べ、また60例の生検、剖検標本より胎児から成人での詳細な報告をしている。なかでも研究の対象としている精細管壁の肥厚のところでは、Mancini は精細管壁を基底膜と固有層に分け、ムコ多糖を含み睾丸ヒアルロニダーゼに抵抗する糖蛋白を含んでいるといい、精細管壁の構造および壁内に存在するムコ蛋白は壁の透過性に関与していることを強調し、さらに間質の結合組織中には肥満細胞を含み、さらに他の結合組織細胞がみつけれうとしている。Hooker³⁶⁾ は間質の変化を指摘し、間質はより線維化すると述べている。de la Balze³⁷⁾ は精上皮の病変の病因論に関して興味のある報告をしている。すなわち23例の前立腺癌患者の精巢組織を組織学的および組織化学的に調べ、5~10mg のディエチルスチルベストロール投与により精細管内容と精細管壁と精細管間結合組織に進行性の病変を形成し、その程度を軽度、中等度、高度の3種類に分類し、精細管では造精機能障害を伴なつた精上皮の解離と剝離、精細管壁では線維芽細胞の増殖、また間質ではフィディッヒ細胞の減少をみたものを

軽度、中等度の変化とし精細管では腔の狭小化と造精機能の低下および停止、精細管壁では線維症と硝子様変性による肥厚、間質ではライディッヒ細胞の著減、多くの線維芽細胞の増殖を高度の変化と記載し、その病因論については、精細管壁に存在する線維芽細胞の機能異常が壁の形態ならびに、機能に変化をおこして、精細管内の細胞成分と間質との間の物質の交流に異常が生じその結果、精上皮に上記のような病変が生ずると結論している。de la Balze の形態的造精機能の障害を追求した論文と異なっており Setchell³⁸⁾は、血漿から諸種の物質が精巣網液と精巣リンパへ透過する比率を検討し、それらの物質を3種に分け記載している。

① 血漿より精巣リンパと精巣網液へ容易に移行する物質 (tritiated water, urea, ethanol, bicarbonate)

② 血漿より精巣リンパへ容易に移行するが精巣網液へは移行が遅い物質

(creatinine, galactose, Na⁺, K⁺, Rb⁺, Cl⁻, CNS⁻, I⁻)

③ 血漿より精巣リンパへ移行は容易、しかし精巣網液へはあられない物質

(inulin, [⁵¹Cr]-chromium EDTA, P-aminohippuric acid, glutamic acid, albumin)

以上の実験より精細管壁の物質の透過性に関しては以下のように述べている。

精巣網液は精細管内と間質組織の精巣リンパ液に起源を発している。そしてカドミウムにより精細管壁が破壊されると壁が関門としての機能を失ない、血漿より精巣リンパへ容易に物質が移行するようになる。この事実より精細管壁は周囲に対して諸種の液の分泌をコントロールする透過性関門を有し、常時機能をはたしていると考えられる。以上の事実より精細管壁に原因不明な肥厚が生ずると、間質より精細管内細胞成分への栄養物資の移行が妨げられても不思議ではない。このような生理学的事実を記載した Setchell の他に文献を検索すると Montagna³⁹⁾⁴⁰⁾, Long and Engle⁴¹⁾, Engle⁴²⁾, Sniffen⁴³⁾, Heller⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾, de la Balze⁴⁷⁾⁴⁸⁾⁴⁹⁾, Jirásek, J.E. et al⁵⁰⁾などの論文があり、また特殊なところでは de la Balze⁵¹⁾の Klinefelter's syndrome や停留精巣における組織化学的観察がある。しかし組織化学的方法による特発性男子不妊症組織への詳細な観察を報告した文献はほとんど見当たらない。

実験試料の採取および固定

実験試料は不妊を主訴として名古屋大学医学部附属病院泌尿器科外来を受診し、無精子症または乏精子症を

表 1

Patients	Age	Diagnosis	Johnsen's score	Semen analysis
		Idiopathic male infertility		
Y.M.	27		10	Azoospermia
M.T.	28	*	10	Oligozoospermia
U.O.	33	*	10	Azoospermia
K.H.	28	*	9	Oligozoospermia
A.K.	24	*	9	Oligozoospermia
M.M.	27	*	9	Azoospermia
A.K.	32	*	9	Azoospermia
M.O.	27	*	9	Oligozoospermia
M.O.	29	*	8	Azoospermia
S.T.	37	*	8	Oligozoospermia
M.H.	34	*	4	Oligozoospermia
T.H.	26	*	4	Azoospermia
T.K.	29	*	4	Oligozoospermia
M.N.	31	*	2	Oligozoospermia
T.T.	33	*	2	Azoospermia
K.A.	32	*	2	Oligozoospermia
K.T.	26	*	2	Oligozoospermia
K.B.	32	*	2	Azoospermia
Y.M.	32	*	2	Azoospermia
K.O.	28	*	2	Azoospermia
T.T.	29	*	2	Azoospermia
H.K.	33	*	2	Azoospermia
M.O.	27	*	1	Azoospermia
H.H.	44	Epididymitis	10	Normospermia
Y.K.	49	Spermatocele	10	Normospermia
Y.I.	30	Bilateral congenital absence of the vas deferens	10	Normospermia
T.T.	64	Penile cancer	10	Normospermia
H.Y.	44	Epididymitis	10	Normospermia
H.Y.	32	Vasectomized azoospermia	10	Normospermia
Y.T.	28	Testicular tumor	10	Normospermia
T.N.	52	Benign hyperplasia of the prostate gland	10	Normospermia
K.H.	17	Cryptorchism	4	Azoospermia
M.S.	36	Eunuchoidism	2	Azoospermia

* : Idiopathic male infertility.

1~10 : Johnsen's score (See Johnsen, S.G. : Acta. Endocr., 64, 193, 1970)

指摘され、生検を受けた際に得られた組織で（合計23例）、他に停留精巣、類宦官症、先天性両側精管欠損症、精管結紮後の無精子症の精巣組織4例を含む。また正常精巣組織例として、精巣上体炎、陰嚢水腫、陰茎癌、精上皮腫、前立腺肥大症（合計6例）の手術の際に精巣生検し組織を得た（表1に各症例の年齢、精液所見、Johnsen's score等をまとめて記載する）。

精巣生検の手法は Charny¹⁶⁾の方法に準じ、Michel-son³¹⁾の報告に従って観血的に2回圧出法で採取した。採取された組織片は約5mm³の大きさで、各種の染色法

に使用するため次の3種類の固定法で材料を作製した。

① 生検試料は採取後直ちに53°C、2時間の尿素一塩化セチルピリジニウム処理後、1%塩化セチルピリジニウムカルノア液にて2時間固定（以下固定①とす）

② 生検試料は直ちに1%塩化セチルピリジニウムカルノア液にて2時間固定（以下固定②とす）

③ 生検試料は直ちにカルノア液にて2時間固定（以下固定③とす）

各症例いづれもパラフィンにて包埋し、厚さ5~7μにて切片を作製した。

実験方法

第1節

予備実験1（ヘマトキシリン—エオジン染色（HEX染色））

実験試料は固定③を用い、Harrisのヘマトキシリン液を用いた。精巢生検の全体像を把握するとともに、とくに精細管内の造精機能の状態やJohnsen's scoreの判定に用いた。

予備実験2（Periodic acid-Schiff（PAS）染色）

実験試料は固定③を用い、方法はMc Manus (1948)⁵²⁾に従った。

予備実験3（PAS染色とアミラーゼ消化法）

アミラーゼ消化はLillieの麦芽ジアスターゼ消化法を行なった。塩化ナトリウム8g、無水第2リン酸ソーダ(Na_2HPO_4) 1.8g、第1リン酸カリ(KH_2PO_4) 0.8gを蒸留水1,000mlに溶解した緩衝液で1%麦芽ジアスターゼ溶液をつくり、PAS染色前に固定③の試料を脱パラ水洗後この溶液で37°C、1時間、ジアスターゼ消化を施行、次いでMc Manus (1948)のPAS染色を行なった。

予備実験4（臨界電解質濃度（CEC）の測定）

実験試料は固定③を用い、Scott and Dorling (1968)⁵³⁾の方法に従って測定した。

染色液は、

1.0%アルシアン青8GX (ICI製)

5M塩化マグネシウム水溶液

を用いてモル濃度の異なる3種(0.1, 0.4, 0.9M)のアルシアン青(pH 5.8)- MgCl_2 溶液を作製する。

染色方法は次のとおりである。

- (1) 脱パラし水洗する。
- (2) MgCl_2 を表3のように3段階に含む各染色液で染色(30分)する。
- (3) 水洗後、エタノール剤で脱水し、

(4) キシロールで透徹、封入する。

予備実験5〔透析鉄フェロシアンイド(dialized-iron-ferrocyanide (DI-FCY)法〕

実験試料は固定③を用い方法はYamada (1972)⁵⁴⁾(1973)⁵⁵⁾に従って施行した。

染色方法

(1) 切片を脱パラし水に入れる。

(2) コロイド鉄染色液* (pH 1.8) 中で120分染色

〔*コロイド鉄原液** (10容), 氷酢酸 (12容), 蒸留水 (18容)。

**コロイド鉄原液: 250mlの沸騰蒸留水中に20%塩化第二鉄液4.4mlを注入して振とうする。液が暗赤色となつたら室温に放置して冷却する。ついで5~10倍量の蒸留水を3回かえて24時間透析する。

(3) 20%酢酸でそれぞれ10分ずつ3回洗う。

(4) 流水で5分洗う。

(5) 蒸留水で洗う。

(6) 切片を新調したフェロシアン化カリ塩酸溶液*中に20分入れる。

〔*2%フェロシアン化カリウム (1容), 2%塩酸 (1容)〕

(7) 流水で5分洗う。

(8) 必要ならばヘマトキシリンなどで対照染色を行ない水洗する。

(9) エタノール剤で脱水しキシロールが透徹し封入する。

判定: 酸性ムコ糖は青染する。

第2節

本実験1. アルシアン青 (AB) 染色

アルシアン青はICI製 (Blackley, Manchester) の8GXを用いた。なお染色液のpHは1.0 (Lev and Spicer, 1964)⁵⁶⁾とpH 2.5 (Pearse, 1968)⁵⁷⁾の2種類を作製使用した。

染色法

アルシアン青法 (pH 1.0)

(1) 切片を脱パラし水に入れる。

(2) 1.0%アルシアン青 8GX-0.1N 塩酸溶液 (pH 1.0) にて30分染色する。

(3) 切片を濾紙でおおい色素液を吸いとる。

(4) 100%エタノールを2回かえて脱水。

(5) 100%エタノールとキシロールの等量混合液に入れる。

(6) キシロールで透徹、封入する。

判定：硫酸ムコ多糖だけが青く着色する。

アルシアン青法 (pH2.5)

- (1) 切片を脱パラシ水に入れる。
- (2) 1.0%アルシアン青8GX-3%酢酸溶液 (pH 2.5) (新調し濾過したもの) にて30分染色する。
- (3) 流水で5分洗う。
- (4) エタノール剤にて脱水した後キシロールで透徹し封入する。

判定：弱酸性硫酸ムコ糖，ヒアルロン酸，シアル酸ムコ糖は青く染色する。強酸性硫酸ムコ糖は淡青色に着色するか染まらない。

本実験2. (酵素消化後アルシアン青染色)

シアリダーゼ，放線菌ヒアルロンダーゼ，臈丸ヒアルロンダーゼ，コンドロイチナーゼ ABC コンドイチナーゼ AC，の5種の酵素を使用した。切片を脱パラ水洗後，酵素処理し第2節の AB 染色を行なった。

実験試料は固定① が使用された。各酵素の酵素消化法は次の通りである。

① シアリダーゼ (Boehringer Gm bH, West Germany) AB (pH 2.5) 染色前に [1mg/ml, 0.1M acetate buffer (pH 5.3) 含有0.04M CaCl₂, 40°C, 12時間] (Spicer et al, 1967)⁵⁸⁾で処理する。

② 放線菌ヒアルロンダーゼ (天野製薬) AB (pH 2.5) 染色前に [100TRU/ml, 0.1M phosphate buffer (pH 5.0), 40°C, 3時間] で処理する (Yamada, 1973)⁵⁹⁾

③ 臈丸ヒアルロニダーゼ (生化学工業) AB (pH 1.0) および AB (pH 2.5) 染色前に [0.5~1.0mg/ml, 0.1M phosphate buffer (pH 5.5), 37°C, 3時間] で処理する (Leppi and Stoward, 1965)⁵⁹⁾。

④ コンドロイチナーゼ ABC (生化学工業) AB (pH 1.0) および AB (pH 2.5) 染色前に [1.25 U/ml, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 37°C 2時間] で処理する (Yamada, 1972, 1974)⁵⁴⁾⁶⁰⁾。

⑤ コンドロイチナーゼ AC (生化学工業) AB (pH 1.0) および AB (pH 2.5) 染色前に [1.25 U/ml, 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.3) 37°C, 2時間] で処理する (Yamada, 1972, 1974)⁵⁴⁾⁶⁰⁾。

なお，酵素消化法では常に3種類の対照(無処理の切片，酵素の溶媒で処理した切片，および熱などで失活させた酵素液で処理した切片)を作り比較検討した。

実験結果

1. HEX 染色：正常精巣組織の生検像では精細管壁

表2 PAS (Periodic Acid-Schiff) 染色

	熊 本	Johnsen	PAS
S. Y.	II	2	deepest M
K. T.	II	2	deeper M
H. M.	IIIa	4~5	deep M
Y. K.	IIIb	6~7	moderate M
K. Y.	IIIc	9	faint M

M : Magenta

の肥厚もみられず，間質，精上皮にもとくに異常所見は見られなかつた (図1)。特発性男子不妊症の生検像では精細管壁の肥厚，精細管腔の狭小化，間質の細胞の増加および造精機能の低下を認めた (図2)。

2. PAS 染色：Johnsen's score 2より9までと正常組織の各5症例に実施した (表2)，図3は正常精巣組織の PAS 染色を，図4は特発性男子不妊症の精巣組織の PAS 染色で，精上皮，間質とも図3と比較して濃く染色されていた。すなわち表2で示すように不妊症の程度が進行するほど精細管内の PAS 染色の染色性が強度となることが判明した。

3. PAS 染色とアミラーゼ消化法を組み合わせ実施 (図5と6)。精細管内の PAS 陽性物質はアミラーゼで消化されるが，精細管壁のそれはアミラーゼで消化されにくい。図5は正常精巣組織のアミラーゼ消化後の PAS 染色を，図6は特発性男子不妊症組織のアミラーゼ消化後の PAS 染色を示す。

4. CEC の測定：表3に示すように AB (pH 5.8) の溶液に MgCl₂ のモル濃度をそれぞれ0.1, 0.4, 0.9 モルとなるように調節し，不妊症の精巣組織を計5例染

表3 Staining of human testis in AB pH 5.8 MgCl₂

	Molarity of MgCl ₂		
	0.1	0.4	0.9
F. H.	+	+	±
S. T.	+	+	±
G. S.	+	+	±
H. Y.	+	+	±
F. H.	+	+	±

AB : alcian blue
In this table, the following symbols denote strength of staining : + : Strong, + : Moderate, ± : Weak

色した。その結果、0.9モル $MgCl_2$ -AB (pH 5.8) 溶液まで組織は染色された。

5. DI-FCY 法：不妊症の精巣組織においては全例とも精細管壁，精上皮，間質とも同反応陽性を示した。

6. 本実験1：正常精巣組織および不妊症の精巣組織を AB (pH 1.0, 2.5) にて染色した結果を図7, 8, 9, 10に示す。図7に示すように AB (pH 1.0) 染色において正常精巣組織では精細管壁が強く反応し，間質の結合組織，細胞は中等度に反応した。図8に示すように AB (pH 2.5) 染色においては，精上皮が強く反応するが精細管壁および間質の細胞は中等度陽性を示した。次に図9は，男子不妊症の精巣組織の AB (pH 1.0) 染色である。正常精巣組織の AB (pH 1.0) 染色と同じよう

表4 Effects of digestion with Sialidase upon alcian blue reaction of human testis

	熊 本	Johnsen	AB (pH 2.5)			
			Tubular wall		Interstitial	
			Control	Sialidase	Control	Sialidase
TM	IV	10	2B	2B	4B	4B
OY	IV	10	1B	1B	2B	1B
HK	IIIc	9-10	1~2B	1B	4B	3B
IY	IIIc	9-10	2B	2B	3B	3B
MM	IIIc	9-10	1B	1B	2B	2B
KS	IIIc	9	1B	1B	1B	1B
HM	IIIa	4-5	2B	2B	4B	2B
KT	IIIa	3-5	1B	±	1~2B	1B
IT	II~IIIa	2-5	2B	2B	4B	2B
FT	IIIa	4	1B	1B	4B	3B
BK	IIIa	2-3	1B	2B	2B	3B
YT	IIIa	3	2B	2B	2B	1B
KH	II	2	2B	2B	4B	4B
OK	II	2	1B	±	2B	±
TK	II	2	1B	2B	2B	2B
TT	II	2	2B	1B	2B	1B
MY	II	2	2B	1B	3B	1B
TS	II	2	1B	1B	1B	1B
TT	II	2	1B	1B	2B	2B
AK	I~II	1-2	2B	1B	2B	2B
MK	I	1	2B	2B	2B	2B
OM	I	1	2B	2B	2B	2B
FM	I	1	2B	1B	2B	1B

AB: alcian blue. Control: control tissue.

Sialidase: sialidase digested tissue

(Sialidase from clostridium perfringens)

B: blue

O: negative reaction

±: A feeble or doubtful reaction

1~n: The number being proportional to the intensity of reaction.

な傾向を示すが全体の染色強度が中等度ないし弱であつた。図10は，男子不妊症精巣組織の AB (pH 2.5) 染色であるが，これも正常精巣組織と同じような傾向を示すが全体の染色程度が中等度ないし弱であつた。

7. 本実験2：AB (pH 1.0) おび AB (pH 2.5) 染色を実施する前に5種類の酵素を用いて消化処理をした。表4はシアリダーゼ消化実験の結果を男子不妊症においてまとめたものである。表の上方より，Johnsen's score count のよいものより順に記載し，シアリダーゼ消化効果は精細管壁と間質を分けて検討した。

同様にその他の酵素，すなわち放線菌ヒアルロニダーゼ，臍丸ヒアルロニダーゼ，コンドロイチナーゼ ABC，コンドロイチナーゼ AC についても行ない，表5から表8に示す。代表的な消化酵素としてコンドロイチナーゼ ABC，AC の酵素消化実施前後の所見を図11より14までに示す。図11は正常精巣組織においてコンドロイチ

表5 Effects of digestion with Streptomyces hyaluronidase upon alcian blue reaction of human testis

	熊 本	Johnsen	AB (pH 2.5)			
			Tubular wall		Interstitial	
			Control	Hyaluronidase	Control	Hyaluronidase
TM	IV	10	2B	2B	4B	4B
OY	IV	10	1	1	2	2
HK	IIIc	9-10	1~2	1~2	4	4
IY	IIIc	9-10	2	2	3	3
MM	IIIc	9-10	1	1	2	2
KS	IIIc	9	1	2	±	2
HM	IIIa	4-5	2	2	4	4
KT	IIIa	3-5	2	2	1~2	1~2
IT	II~IIIa	2-5	2	2	4	4
FT	IIIa	4	1	1	4	4
BK	IIIa	2-3	1	1	2	2
YT	IIIa	3	2	1	2	1
KH	II	2	2	2	4	4
OK	II	2	1	1	2	2
TK	II	2	1	4	±	3
TT	II	2	2	2	2	2
MY	II	2	2	2	3	3
TS	II	2	1	1	1	1
TT	II	2	1	1	2	2
AK	I~II	2	2	2	2	2
MK	I	1	2	1	2	1
OM	I	1	2	2	2	2
FM	I	1	2	2	2	2

AB: alcian blue. Control: control tissue.

Hyaluronidase: streptomyces hyaluronidase digested tissue.

表6 Effects of digestion with Testicular hyaluronidase upon alcian blue reaction of human testis

	熊 本	Johnsen	AB (pH 2.5)				AB (pH 1.0)			
			Tubular wall		Interstitial		Tubular wall		Interstitial	
			Control	Hyaluro- nidase	Control	Hyaluro- nidase	Control	Hyaluro- nidase	Control	Hyaluro- nidase
TM	IV	10	2B	±	4B	±	4B	±	4B	±
OY	IV	10	1	±	2	±	1	0	±	0
HK	IIIc	9-10	1~2	±	4	±	4	±	2	±
IY	IIIc	9-10	2	±	3	±	3	±	1	0
MM	IIIc	9-10	1	±	2	2	3	0	1	0
KS	IIIc	9	1	±	1	±	3	±	2	±
HM	IIIa	4-5	2	1	4	2	1	0	1	0
KT	IIIa	3-5	±	2	2	1	2	0	2	0
IT	II~IIIa	2-5	2	1	4	2	3	±	1	0
FT	IIIa	4	1	1	3	±	3	0	1	0
BK	IIIa	2-3	1	±	2	±	4	±	3	±
YT	IIIa	3	2	0	2	0	2	1	1	±
KH	II	2	2	±	4	±	3	±	1	0
OK	II	2	1	±	2	±	1	0	±	0
TK	II	2	1	0	1	±	4	±	3	±
TT	II	2	2	0	2	±	4	±	3	1
MY	II	2	2	0	3	±	4	0	3	2
TS	II	2	1	0	1	0	3	0	2	0
TT	II	2	1	0	2	±	2	0	1	0
AK	I~II	1-2	2	±	2	±	4	2	2	2
MK	II	1	2	1	2	1	1	1	±	1
OM	II	1	2	2	2	2	4	3	3	±
FM	II	1	2	±	2	±	4	±	2	±

AB: alcian blue. Control: control tissue.

Hyaluronidase: hyaluronidase digested tissue.

(Testicular hyaluronidase from Bull testes. Grade IV)

表7 Effects of digestion with Chondroitinase ABC upon alcianblue reaction of human testis

	熊 本	Johnsen	AB (pH 2.5)				AB (pH 1.0)			
			Tubular wall		Interstitial		Tubular wall		Interstitial	
			Control	Ch-ABC	Control	Ch-ABC	Control	Ch-ABC	Control	Ch-ABC
TM	IV	10	2B	±	4B	±	4B	1B	4B	1B
OY	IV	10	1	±	2	±	1	0	±	0
HK	IIIc	9-10	1~2	±	4	±	4	±	2	0
IY	IIIc	9-10	2	±	3	±	3	±	3	1
MM	IIIc	9-10	1	±	2	±	3	0	1	0
KS	IIIc	9	2	±	2	±	3	±	2	±
HM	IIIa	4-5	2	1	4	3	1	0	1	0
KT	IIIa	3-5	1~2	0	1	0	2	0	1~2	±
IT	II~IIIa	2-5	2	1	4	2	3	±	1	0
FT	IIIa	4	1	±	4	±	3	0	1	0
BK	IIIa	2-3	2	±	2	±	4	±	3	±
YT	IIIa	3	2	±	2	0	2	±	1	0
KH	II	2	2	±	4	±	3	±	1	0
OK	II	2	1	±	2	±	1	0	±	0
TK	II	2	1	0	2	0	2	2	1	1
TT	II	2	2	±	2	±	4	±	3	1
MY	II	2	2	±	2	±	4	±	2	±
TS	II	2	1	0	1	±	3	1	2	1
TT	II	2	1	±	2	1	2	0	1	0
AK	I~II	1-2	2	±	2	±	4	±	2	±
MK	I	1	2	0	2	±	1	±	±	±
OM	I	1	2	±	2	±	4	3	3	±
FM	I	1	2	0	2	±	4	±	2	±

AB: alcian blue. Control: control tissue.

Ch-ABC: chondroitinase ABC digested tissue.

ナーゼ ABC で消化後 AB (pH 1.0) で染色した結果であるが、図7と比較して精細管壁も、間質もよく消化されている。図12は不妊症においてコンドロイチナーゼ ABC で消化後 AB (pH 1.0) で染色した像であるが、図11と同じようによく消化された所見を示している。図13は正常精巣組織においてコンドロイチナーゼ AC で消化後 AB (pH 1.0) で染色した所見を、図14は不妊症においてコンドロイチナーゼ AC で消化後 AB (pH 1.0) で染色した像を示す。コンドロイチナーゼ ABC 消化とコンドロイチナーゼ AC 消化を比較すると、正常精巣組織においても不妊症組織においてもコンドロイチナーゼ AC 消化効果が精細管壁、間質、ともに弱かつた(図7と図11、13の比較) および(図9と図12、14の比較)。

考 按

特発性男子不妊症とは明らかな尿中、血中ホルモン等の検査所見に特徴的な変化もなく、理学的所見も他の正常成人とほとんど変わるところはないが、何らかの原因で精巣の造精機能の低下および停止をおこし、無精子症および乏精子症をひきおこしている疾患と考えられる。この疾患に対して、Charny 以来現在広く行なわれている方法により多くの精巣の生検がなされ、すぐれた文献を内、外に散見する。しかし、造精機能に着目しすぎるあまり、精上皮に対する研究は多いが、その原因究明の一つの方法である物質論的に追求した論文はほとんどない。また単に精巣組織の生検目的が HEX 染色を施した後、Nelson らに代表されるような組織学的分類を行ない、造精機能の程度を判定するのみであるならば、初

表8 Effects of digestion with Chondroitinase AC upon alcian blue reaction of human testis

	熊 本	Johnsen	AB (pH 2.5)				AB (pH 1.0)			
			Tubular wall		Interstitial		Tubular wall		Interstitial	
			Control	Ch-AC	Control	Ch-AC	Control	Ch-AC	Control	Ch-AC
TM	IV	10	2B	±	4B	2B	4B	±	4B	±
OY	IV	10	1	±	2	2	1	0	±	0
HK	IIIc	9-10	1~2	±	2	0	4	±	2	±
IY	IIIc	9-10	2	±	3	1	3	±	3	0
MM	IIIc	9-10	1	±	2	1	3	0	1	±
KS	IIIc	9	2	2	2	2	2	2	2	2
HM	IIIa	4-5	2	2	4	3	1	0	1	±
KT	IIIa	3-5	1	0	1	±	3~4	1	2	1
IT	II~IIIa	2-5	2	1	4	4	3	±	1	±
FT	IIIa	4	1	±	4	2	3	0	1	±
BK	IIIa	2-3	2	±	2	1	4	±	3	1
YT	IIIa	3	2	1	2	1	2	1	1	1
KH	II	2	2	1	4	4	3	±	1	±
OK	II	2	1	±	2	2	1	0	±	±
TK	II	2	1	0	2	±	3	1	2	1
TT	II	2	2	±	1	1	4	±	3	3
MY	II	2	2	±	1	3	4	±	3	1
TS	II	2	1	1	1	0	3	0	2	1
TT	II	2	1	0	2	±	2	0	1	±
AK	I~II	1-2	2	±	2	1	4	±	2	±
MK	II	1	2	2	2	1	1	±	±	1
OM	I	1	2	1	2	1	4	3	3	1
FM	I	1	2	0	2	1	4	±	2	±

AB: alcian blue. Control: control tissue.

Ch-AC: chondroitinase AC digested tissue.

診時の精巣の重量および容積の測定により、精巣の組織像はある程度推定できるし、また予後も推測可能である⁶¹⁾⁶²⁾。

それゆえに HEX 染色により組織学的検査を実施する目的のみの生検は特発性男子不妊症の診断および予後には大きな役割をはたさないものと考ええる。今回著者は、さらにこの分野での研究を押しすすめるために特発性男子不妊症患者の精巣生検組織に組織化学的染色方法を用いて研究を行なった。

図1, 2の HEX 染色の標本が示すように特発性男子不妊症患者の組織像は精細管腔の狭小化と管壁の肥厚が著明になり、精上皮は萎縮をおこし、間質の結合組織細胞は異常に増加しているのが特徴的である。このような症例に PAS 染色およびアミラーゼ消化試験を実施すると、精上皮の PAS 陽性物質はアミラーゼでよく消化されるのが精細管壁の PAS 陽性物質はアミラーゼで消

化されない(図3, 4)。すなわち、精上皮はグリコゲンを多く含み、精細管壁には糖蛋白が多く存在していることを示す。

この事実は Mancini⁵⁹⁾の精細管壁の性状に関する記述と一致する。またこの精上皮のグリコゲンの量は Johnsen's score が低下し、造精機能が低下するほど多くなり、それと同時に PAS 染色の陽性反応が強度となる。このことは内分泌諸器官の機能が低下するほどグリコゲンがその器官に蓄積するという一般的事実と一致する。

精細管壁の構造に関して Mancini らは種々の見解を述べている。それは、精細管壁の細胞間の無定形物質はムコ多糖類で構成され、その構成成分はコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸が推定されるとし、またこの物質の性状は睾丸ヒアルロニダーゼに抵抗性があると述べている。そして精巣の機能において、この壁の構造と糖蛋白は精上皮およびセルトリ細胞で使用する栄養物質の透過性に関連していると述べている。

これらの事実にかんがみ著者も、何らかの原因により精細管壁が肥厚、変性しそこに変化した物質が蓄積し、また間質より精上皮への栄養物質の通過が妨げられるため二次的に精上皮の萎縮がすすみ、特発性男子不妊症の特異な病像がおこると考え、肥厚をひきおこしている物質、および間質に蓄積されてくると考えられる物質の同定をすすめた。まず最初に Mancini らの主張する糖蛋白に着目し、その性状および量の変化を追求するため、複合糖質の組織化学的染色方法より実験をすすめた。最初 Scott and Dorling⁵⁹⁾らの CEC の原理に基づく染色と Yamada⁵⁴⁾⁵⁵⁾の DI-FCY 法を実施した。

表3にも示したように特発性男子不妊症の組織では 0.9モル・MgCl₂-AB (pH 5.8) のモル濃度の染色液まで精細管壁、間質が染色された。このことは CEC の原理より炭酸基(—COOH)とエステル硫酸基(—OSO₃H)を含む硫酸ムコ多糖が主に存在していることを証明する。また、DI-FCY 法によつても同様に精細管壁と間質が強〜中等度陽性に染色され、軽度ではあるが精上皮も染色される。この2つの染色法の結果より、精細管壁、間質には硫酸ムコ多糖類が多く存在することが証明された。このため酸性ムコ多糖の検出に用いられるフタロシアニン色素すなわち、アルシアン青、アルシアン緑、アストラ青などを用いてさらに実験をすすめた。このうち最も一般的なものはアルシアン青である。アルシアン青は最初 Steedman によつてムコ物質の検出に用いられたが、その後改良され pH 値の異なつたアルシアン青溶

液や種々の濃度の電解質を含む色素溶液を用いて酸性度の異なるムコ糖を識別して検出することができるようになった。

アルシアン青はその他の塩基性色素と異なり組織の核酸、酸性蛋白質、酸性脂質などと反応しにくいので酸性ムコ糖の検出には、もつともすぐれた試薬の1つである。このためアルシアン青8GX (ICI 製) を用いて AB (pH 1.0), AB (pH 2.5) の2つの染色液を作製して特発性男子不妊症患者の精巣生検組織の染色を試みた。しかし通常の Carnoy 液の固定による組織 (固定③) ではアルシアン青可染性が弱く未染色標本と識別できなかったため Sugiyama⁶³⁾ の方法に従って組織を処理した (固定①)。

すなわち, Sugiyama の尿素処理の原法は,

1. 1mm 以下の厚さに新鮮な組織をつくり, 次の成分をもった溶液で58°C, 4~16時間保温する。

溶液 8M 尿素 3ml

2% 塩化セチルピリジジ (CPC) 1ml

2. 組織は室温で1昼夜1% CPC を含む10%ホルマリンで固定する。

3. 次に流水でよく洗う (過度の尿素と CPC を除くため)。

4. パラフィン包埋して, 5~7μ 厚の切片を作製する。

対照としては尿素液を蒸留水でおきかえたもの, 2% CPC 液を蒸留水でおきかえたものを用いている。

Sugiyama が用いているこの原法は生後5~10カ月の Long Evans 種の雌ラットの尾の腱, 皮膚, 肝を試料としているが, 著者の処理する精巣組織は熱処理で精上皮が精細管壁より容易にはがれたりする可能性があるため, 温度と時間の条件をそれぞれ2時間より16時間までの間と, 40°Cより58°Cまでの間で各種組合せて予備実験したところ, 53°C, 2時間処理という条件で最もよく AB 可染性が増強され, 組織の保存性がよいことが判明したので以後はこの条件で尿素—CPC 処理 (固定①) したもので, AB 染色を行なった。正常な精巣組織においては, 精細管壁も間質の結合組織も強度あるいは中等度に AB (pH 1.0) (図7), AB (pH 2.5) (図8) で染色された。また特発性男子不妊症の精巣組織も, 精細管壁, 間質ともに, AB (pH 1.0) と AB (pH 2.5) (図9, 10) で染色された。そしてこの反応強度は正常精巣における染色性とほとんど変化がないか, または少し低下するのみであった。以上の観察結果と AB (pH 1.0)

(Lev and Spicer)⁵⁶⁾, AB (pH 2.5) (Spicer, Horn and Leppi)⁵⁸⁾ と DI-FCY (Yamada)⁵⁴⁾⁵⁵⁾ の基質特異性より, 正常な精巣組織においても, また特発性男子不妊症の精巣組織においても, 酸性ムコ多糖類の存在を精細管壁と間質に認める結果となった。

酸性ムコ多糖類の存在を証明し得たので, 次に酵素を用いて消化実験を行ない, 各種酸性ムコ多糖の同定を試みた。すなわち本法は組織を特定のムコ多糖またはムコ多糖群を基質とする酵素液で消化した後にムコ多糖の検出反応を行ない, 個々のムコ多糖またはムコ多糖群を同定する方法である⁵⁴⁾。

表4は男子不妊症23例のシアリダーゼ消化の効果をまとめたものである。対照は無処理切片で, シアリダーゼ消化後 AB (pH 2.5) で染色したものと比較した。比較して染色強度を0, 土, 1~4, に分類し表現した。以下表8まで同様に各種酵素の消化前後の比較を染色強度で表現した。表4のシアリダーゼ消化試験 (Spicer and Warren)⁶⁴⁾ および表5の放線菌ヒアルロナーゼ消化試験 (Yamada and Hirano)⁶⁵⁾ の結果より, 精細管壁と間質においては, 正常精巣においても, 不妊症の精巣においても組織化学的に有意に認めらるべきシアリ酸もヒアルロン酸も存在しなかつた。

Weismann⁶⁶⁾ らの睾丸ヒアルロナーゼの基質特異性

表9 Localization of acid mucopolysaccharide in testicular tissue by digestive enzyme

附 図 説 明

- 図1 HEX 染色 (× 110) 正常精巢生検像, 造精機能は正常にみられ, 精細管壁の肥厚, 間質の細胞の増加等も認められない。
- 図2 HEX 染色 (× 110) 特発性男子不妊症の精巢生検像, 精細管腔は狭小化し, 精細管壁も肥厚し, 間質の細胞も増加している。造精機能はほとんど認められない。
- 図3 PAS 染色 (× 110) 正常精巢生検像, 精上皮, セルトリ細胞, 精細管壁, 間質ともに PAS 反応陽性である。
- 図4 PAS 染色 (× 110) 特発性男子不妊症の精巢生検像, 精上皮, セルトリ細胞は正常精巢と比較して PAS 反応強陽性を示し, 精細管壁, 間質は変化に富んだ陽性反応を示している。
- 図5 α -アミラーゼ消化法と PAS 染色 (× 110) 正常精巢生検像, 精上皮およびセルトリ細胞の PAS 反応は酵素消化により消失している。しかし, 精細管壁および間質はごくわずかに消化されるかあるいはほとんど消化されない。
- 図6 α -アミラーゼ消化法と PAS 染色 (× 110) 特発性男子不妊症の精巢生検像, 精上皮およびセルトリ細胞は酵素によつてよく消化され, PAS 反応は陰性となつている。精細管壁, 間質は正常精巢と同じく, ほとんど影響されない。
- 図7 アルシアン青 (pH 1.0) 染色 (× 110) 正常精巢生検像, 精細管壁, 間質は AB に染色される。とくに精細管壁は強陽性を示す。
- 図8 アルシアン青 (pH 2.5) 染色 (× 110) 正常精巢生検像, 精細管壁, 間質は AB に染色される。AB (pH 2.5) では核がよく染色される。
- 図9 アルシアン青 (pH 1.0) 染色 (× 110) 特発性男子不妊症の精巢生検像, AB (pH 1.0) の可染性は精細管壁および間質において, 正常精巢においてよりも明らかに弱い。
- 図10 アルシアン青 (pH 2.5) 染色 (× 110) 特発性男子不妊症の精巢生検像, AB (pH 2.5) の可染性は精細管壁および間質において正常精巢においてよりも明らかに弱い。
- 図11 コンドロイチナーゼ ABC 消化法と AB (pH 1.0) 染色 (× 72) 正常精巢生検像, 精細管壁, 間質ともよく消化され, AB (pH 1.0) 可染性が弱くなつている。(図7と比較)
- 図12 コンドロイチナーゼ ABC 消化法と AB (pH 1.0) 染色 (× 72) 特発性男子不妊症の精巢生検像, 精細管壁, 間質ともよく消化され AB (pH 1.0) 可染性が弱くなつている。(図9と比較)
- 図13 コンドロイチナーゼ AC 消化法と AB (pH 1.0) 染色 (× 72) 正常精巢生検像, 精細管壁, 間質も消化され AB (pH 1.0) の可染性が弱くなつているが, コンドロイチナーゼ ABC で消化した標本よりは, 精細管壁, 間質とも弱くなつていない。(図11と比較)
- 図14 コンドロイチナーゼ AC 消化法と AB (pH 1.0) 染色 (× 72) 特発性男子不妊症の精巢生検像, 精細管壁, 間質も消化され, AB (pH 1.0) 可染性が弱くなつているが, コンドロイチナーゼ ABC で消化した標本よりは, 精細管壁, 間質も弱くなつていない。(図12と比較)

の見地からすると睾丸ヒアルロニダーゼ消化試験を実施した AB (pH 1.0) および AB (pH 2.5) の染色が示す結果は, その組織にコンドロイチン硫酸 A および C の存在の有無を示すことになる。正常および特発性男子不妊症の精巢組織において精細管壁, 間質ともに睾丸ヒアルロニダーゼでよく消化された。

すなわちこの事実は同組織にコンドロイチン硫酸 A, C の存在を示している。次に Saito⁶⁹⁾ ら, Yamada⁶⁹⁾ らのコンドロイチナーゼ ABC および AC の基質特異性と Lev and Spicer⁵⁶⁾ の AB (pH 1.0) 染色の基質特異性の研究結果をもとにして, 表6より表8までの特発性男子不妊症組織における各種酵素の消化効果と正常組織における消化効果を比較検討すると, 精細管壁にはコンドロイチン硫酸 A および C が, 間質にはコンドロイチン硫酸

B が有意に存在することが分つた。

以上の結果を表9に模式化してまとめた。表9において円い輪は精細管壁を, 周囲は間質を表わす。1段目はシアリダーゼによる消化前後を示す, 左側が未消化の対照組織を AB (pH 2.5) で染色したもの, 右側がシアリダーゼ消化後 AB (pH 2.5) で染色したものを示す。間質のみが blue より mild blue へ染色度が低下しておりこのことは少量のシアル酸が精巢の間質に存在していることを示している。また精細管壁については, 表4より分かるように1部消化されるが, 有意な差はないと思われる。2段目は, コンドロイチナーゼ ABC 消化に関する結果で, 3段目がコンドロイチナーゼ AC 消化に関する結果である。コンドロイチナーゼ ABC 消化すると, 間質および精細管壁の大部分が消化される。コンド

ロイチナーゼ AC で消化すると精細管壁の1部と間質が blue より mild blue となる。しかしコンドロイチナーゼ ABC ほど消化効果はない。この2つの消化試験より精細管壁にはコンドロイチン硫酸 A および C、間質にはコンドロイチン硫酸 B が有意に存在することが判明した。

すなわち Mancini らの指摘した精細管壁に mucoprotein が増加するという事実をさらにすすめて、それは酸性ムコ多糖であるとし、それを酵素消化法によりその主要な構成成分まで同定し得たが、造精機能障害の程度と酸性ムコ多糖類の消長との間の関連性をみつけることはできなかった。

結 語

男子不妊症23例、正常成人6例、他に停留精巢（17歳）、類宦官症、先天性両側精管欠損症、精管結紮後の無精子症、各1例に精巢生検を実施し、精巢組織における物質の消長を組織化学的方法により検索した。

① PAS 染色および α -アミラーゼ消化試験により、造精機能が低下するほど精細管内の PAS 陽性物質すなわちグリコゲンが増加した。また精細管壁は糖蛋白を多く含んでいた。

② 透析鉄フェロシアンid法により精細管壁、間質に酸性ムコ多糖が存在することが判明した。

③ 尿素処理により精巢組織の AB 可染性を増加させることができた。

④ Scott and Dorling の CEC の原理より、炭酸基とエステル硫酸基を含む、硫酸ムコ多糖類が多く存在することが分つた。

⑤ シアリダーゼ、放線菌ヒアルロニダーゼ、睾丸ヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼ ABC および AC の5種の酵素消化法を行ない、組織中にシアル酸とヒアルロン酸は有意な量を認めなかつた。またコンドロイチナーゼ ABC、AC 両消化試験より精細管壁にはコンドロイチン硫酸 A および C が、間質には、コンドロイチン硫酸 B が有意に存在することが判明した。

⑥ 正常精巢と特発性男子不妊症患者の精巢組織においてシアル酸、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸 A、B、C、の各種のムコ多糖の量的、質的差異は認められなかつた。またこれらの物質の消長と造精機能の程度 (Johnsen's score count) および精液所見（無精子症、乏精子症）に相関関係も認められなかつた。

稿を終るに臨み、本論文の御指導、御校閲を賜りました名古屋大学医学部泌尿器科学教室三矢英輔教授に心か

ら感謝の意を表します。また種々の御協力、御教示をいただいた当教室三宅弘治助教授、当医学部第2解剖学教室山田和順助教授に深く感謝いたします。さらに種々の御協力をいただいた教室員諸兄に深く感謝いたします。

尚本論文の要旨は第22回日本不妊学会総会（昭和52年10月4日）、第66回日本泌尿器科学会総会（昭和53年4月5日）において発表した。

文 献

- 1) 三宅弘治、三矢英輔：走査型電子顕微鏡による不妊精細管の外形観察、日泌尿会誌、66、6—14、1975。
- 2) 坂倉啓夫：不妊性の研究、日産婦誌、13、625—643、1961。
- 3) 鷺見 敏、交告益朗、宮河昭夫、大口善市、内田 正、中島貞利、井寛重彦、河村勝也、佐原金吾：当教室における最近5年間の不妊症の統計的観察、日産婦会誌、11、1285—1290、1957。
- 4) 岡村 泰、滝波祐子、提 志津、小田島栄一、吉田 豊、杉田茂仁、会田雄一、阿部 進：当科不妊外来患者の統計的観察、日本不妊学会雑誌、10、62—68、1965。
- 5) 碓井 亜、林 睦雄、中津 博、石部知行：男子不妊症の臨床的観察、西日泌尿、38、40—45、1976。
- 6) 長沼弘三郎、後藤俊弘、前山泰典、岡元健一郎：男子不妊症の臨床的観察—G 剤、ATP 製剤、循環ホルモン剤 (Carnaculin) の併用治療成績および妊娠調査成績—、西日泌尿、39、611—618、1977。
- 7) 田坂純雄：泌尿器科不妊患者の現況、日本不妊学会雑誌、8、28、1963。
- 8) 加藤篤二、柳原正志、田辺泰民、田中広見：男子不妊症の臨床統計的観察、日本不妊学会雑誌、10、1—5、1965。
- 9) 入沢俊氏、白井将文、松下 弘三郎、加賀山学、一条貞敏：男子不妊症の統計的観察、日本不妊学会雑誌、11、50—55、1966。
- 10) 黒田恭一、島木 彰、美川郁夫、松浦 一：男子不妊症の統計的観察、日本不妊学会雑誌、12、19—23、1967。
- 11) Hafez, E.S.E.: Technique of human andrology. Amsterdam, New York, Oxford. North Holland Publishing Company, 3—7, 1977。
- 12) Posner, C.: Diagnostische Hodenpunktion, Berliner Klinische Wochenschrift, 42, 1119—1121, 1905。
- 13) Huhner, Max.: Aspiration of the testicle in the diagnosis and prognosis of sterility. J. Urol., 19, 31—41, 1928。
- 14) Engle, E.T.: The testis biopsy in infertility, J. Urol., 57, 789—798, 1947。

- 15) Hotchkiss, R.S.: Diagnosis of testicular deficiencies. *Bul. N.Y. Acad. Med.*, **27**, 510—520, 1951.
- 16) Charny, C.W.: Testicular biopsy. its value in male sterility. *J.A.M.A.*, **115**, 1429—1433, 1940.
- 17) 小松洋輔, 友吉唯夫, 岡田謙一郎, 高山秀則: 男子不妊症の臨床統計的観察ならびその追跡調査成績について, 日本不妊学会雑誌, **14**, 72—79, 1969.
- 18) Charny, C.W. and Meranze, D.R.: Testicular biopsy. Further studies in Male infertility. *Surg, Gynec. & Obst.*, **74**, 836—842, 1942.
- 19) Nelson, W.O.: Some problems of testicular function. *J. Urol.*, **69**, 325—338, 1953.
- 20) Engle, E.T.: The life history of the human testis. *J. Urol.*, **74**, 379—386, 1955.
- 21) Howard, R.P., Sniffen, R.C., Simmons, F.A. and Albright, F.: Testicular deficiency: A clinical and pathologic study. *J. Clin. Endocrinol.*, **10**, 121—186, 1950.
- 22) Nelson, W.O.: Interpretation of testicular biopsy. *J.A.M.A.*, **151**, 449—454, 1953.
- 23) 森 昭: 男子性腺機能失調症の研究. 第2篇 睾丸組織像の考察, 泌尿紀要, **3**, 687—700, 1957.
- 24) 酒徳治三郎: 男子性機能障害症の睾丸生検像について. 第II篇 男子不妊症の睾丸生検像, 泌尿紀要, **4**, 610—622, 1958.
- 25) 百瀬剛一, 島崎 淳, 片山 喬: 男子不妊症の研究 (第1報) 無精子症患者の睾丸組織像, 日本不妊学会雑誌, **4**, 21—29, 1959.
- 26) 市川篤二, 熊本悦明, 小野田康雄: 無精子症の研究, 最新医学, **15**, 105—116, 1960.
- 27) 市川篤二, 熊本悦明, 広瀬欽次郎, 木下健二, 松本恵一: 睾丸の形態学的検査法, ホルモンと臨床, **11**, 15—25, 1963.
- 29) 山本 浩: 男性不妊の研究, 第II篇. 睾丸組織像の観察, 泌尿紀要, **9**, 229—251, 1963.
- 30) Tillinger, K.G.: Testicular morphology. *Acta. End. Supp.*, **30**, 1—192, 1957.
- 31) Michelson, L.: Azoospermia: An analysis of 146 cases., **57**, 512—518, 1947.
- 32) Albert, A., Underdahl, L.O., Greene, L.F. and Lorenz, N.: Male hypogonadism. II. Classification. *Proc. Staff meetings of mayo clinic.*, **28**, 557—567, 1953.
- 33) Tillinger, K.G., Birke, G., Franksson, C. and L.-O. Plantin.: The steroid production of the testicles and its relation to number and morphology of Leydig cells. *Acta Endocrinol.*, **19**, 340—348, 1955.
- 34) Arzac, J.P.: Glycogen in human testicular biopsy material. *J. Clin. Endocrinol.*, **10**, 1465—1470, 1950.
- 35) Mancini, R.E., Narbaitz, R., Lavieri, J.C.: Origin and development of the germinative epithelium and sertoli cells in the human testis. Cytological, cytochemical and quantitative study. *Anat. Rec.*, **136**, 477—489, 1960.
- 36) Hooker, C.W.: The intertubular tissue of the testis. In: *The testis*, A.D. Johnson, W.R. Gomes and N.L. Vandemark, eds. New York: Academic press, 483—550, 1970.
- 37) de la Balze, F.A., Gurtman, A.I., Janches, M., Arrillaga, F., Alvarez, A.S. and Segal, L.: Effects of estrogens on the adult human testes, with special referens to the germinal epithelium. A histologic study. *J. Clin. Endocrinol.*, **22**, 1251—1261, 1962.
- 38) Setchell, B.P., Voglmayer, J.K. and Waites, G.M.H.: A blood-testis barrier restricting passage from blood into rete testis fluid but not into lymph. *J. Physiol.*, **200**, 73—85, 1969.
- 39) Montagna, W. and Hamilton, J.: Histochemical studies of human testes. II. The distribution of glycogen and other HIO₄-Schiff reactive substances. *Anat. Rec.*, **112**, 237—249, 1952.
- 40) Montagna, W.: The distribution of lipids, glycogen, and phosphatases in the human testis. *Fertility & Sterility.*, **3**, 27—34, 1952.
- 41) Long, M.E. and Engle, E.T.: Cytochemistry of the human testis. *Ann. New Yrok Acad. Sc.*, **55**, 619—629, 1952.
- 42) Engle, E.T.: Part IV. Spermatogenesis and effect of steroids on the testis. The cytological problem in spermatogenic arrest. *Ann. New York Acad. Sc.*, **55**, 703—706, 1952.
- 43) Sniffen, R.C.: The testis. 1. Normal testis. *Arch. Path.*, **50**, 259—284, 1950.
- 44) Heller, C.G., Nelson, W.O., Hill, I.B., Hender-son, E., Maddock, W.O., Jungck, E.C., Paulsen, C.A. and Mortimore, G.E.: Improvement in spermatogenesis following depression of the human testis with testosterone. *Fertil. & Steril.*, **1**, 415—422, 1950.
- 45) Heller, C.G. and Nelson, W.O.: Hyalinization of the seminiferous tubules associated with normal or failing leydig cell function. Discussion of relationship to eunuchoidism, Gynecomastia, Elevated gonadotrophins, Depressed 17-Ketosteroids and Estrogens. *J. Clin. Endocrinol.*, **5**, 1—12, 1945.
- 46) Heller, C.G. and Nelson, W.O.: Classification of male hypogonadism and a discussion of the pathologic physiology, diagnosis and treatment. *J. Clin. Endocrinol.*, **8**, 345—

- 366, 1948.
- 47) de la Balze, F.A., Mancini, R.A., Arrillaga, F., Andrada, J.A., Vilar, O., Gurtman, A.I. and Davidson, O.W.: Puberal maturation of the normal human testis. A histologic study. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **20**, 266—285, 1960.
 - 48) de la Balze, F.A., Mancini, R.E., Bur, G.E. and Irazu, J.: Morphologic and histochemical changes produced by estrogens on adult human testes. *Fertil. & Steril.*, **5**, 421—436, 1954.
 - 49) de la Balze, F.A., Mancini, R.A., Arrillaga, F.A., Andrada, J.A., Vilar, O., Gurtman, A.I. and Davidson, O.W.: Histologic study of the undescended human testis during puberty. *J. Clin. Endocrinol. & Metab.*, **20**, 286—297, 1960.
 - 50) Jirásek, J.E. and Raboch, J.: Histochemical study of testicular material from patients with various disorders. *Fertil. & Steril.*, **14**, 237—245, 1963.
 - 51) de la Balze, F.A., Arrillaga, F.C., Irazu, J. and Mancini, R.E.: Klinefelter's syndrome: A study of 5 cases. Histophysiologic basis for a pathogenic interpretation. *J. Clin. Endocrinol.*, **12**, 1426—1444, 1952.
 - 52) McManus, J.F.A.: Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technol.*, **23**, 99—108, 1948.
 - 53) Scott, J.E. and Dorling, J.: Differential staining of acid glycosaminoglycans (mucopolysaccharides) by alcian blue in salt solution. *Histochemie*, **5**, 221—231, 1965.
 - 54) Yamada, K.: Histochemical and cytochemical methods for study of mucosaccharides. *Protein. Nucleic Acid. Enzyme.*, **17**, 775—790, 1972.
 - 55) Yamada, K.: The effect of digestion with *Streptomyces hyaluronidase* upon certain histochemical reactions of hyaluronic acid-containing tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 794—803, 1973.
 - 56) Lev, R. and Spicer, S.S.: Specific staining of sulphate groups with alcian blue at low pH. *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 309, 1964.
 - 57) Pearse, A.G.E.: *Histochemistry, theoretical and applied*. Vol. 1. 344—349, Churchill Ltd., London & New York, 1968.
 - 58) Spicer, S.S., Horn, R.G. and Leppi, T.J.: *Histochemistry of connective tissue mucopolysaccharides*. The connective tissue, 251—303, Baltimore. Williams Wilkins Company, 1967.
 - 59) Leppi, T.J. and Stoward, P.J.: On the use of testicular hyaluronidase for identifying acid acid mucins in tissue section. *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 406—407, 1965.
 - 60) Yamada, K.: The effect of digestoin with chondroitinases upon certain histochemical reactions of mucosaccharide-containing tissues. *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 266—275, 1974.
 - 61) 熊本悦明：睾丸機能不全の臨床的研究（第1編 身体医学の問題），*日泌尿会誌*，**54**，1063—1108，1963.
 - 62) 高崎 登，岡野 准，大西真尚，宮崎 重：当教室における3年間の男性不妊症の統計的観察，*泌尿紀要*，**22**，281—287，1976.
 - 63) Sugiyama, T.: The mechanism of specific staining of acid mucopolysaccharide by alcian blue. On the influence of urea treatment on the stainability. *Acta Histochem. Cytochem.*, **1**, 16—30, 1968.
 - 64) Spicer, S.S. and Warren, L.: The histochemistry of sialic acid containing mucoproteins. *J. Histochem. Cytochem.*, **8**, 135—137, 1959.
 - 65) Yamada, K. and Hirano, K.: The histochemistry of hyaluronic acid-containing mucosubstances. *J. Histochem. Cytochem.*, **21**, 469—472, 1973.
 - 66) Weissmann, B., Hadjiioanon, S. and Tornheim, J.: Oligosaccharase activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase of beef liver. *J. Biol. Chem.*, **239**, 59—63, 1964.
 - 67) Saito, H., Yamagata, T. and Suzuki, S.: Enzymatic methods for the determination of small quantities of isomeric chondroitin sulfates. *J. Biol. Chem.*, **243**, 1536—1542, 1968.

(1980年1月29日受付)