睾丸毒性に関する超微形態学的研究

CDDP のラット精細管細胞への影響

日本医科大学泌尿器科学教室 (主任: 秋元成太教授)

大 原 正 雄

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF TESTICULAR TOXICITY

Effects of CDDP on the Rat Seminiferous Tubules

Masao Ohara

Department of Urology, Nippon Medical School

(Director: Prof. M. Akimoto)

Adult male rats of Wistar strain received an intra-abdominal administration of Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP). The experimental animals were divided into two groups; one was the high dose & short duration group (trio dose group) which received CDDP $2.8 \mu\text{g/gBW/day}$ for three serial days, and the other was the low dose & long duration group (multi dose group) which received CDDP $0.8 \mu\text{g/gBW}$ twice a week for one through eight weeks. The testicular tissue was observed by the electron microscope (TEM) freeze fracture method. The first changes in spermatogonia were, in both groups, the nuclear deformity and swelling of mitochondria. In a later stage, nuclear destruction, and mitochondrial myelinization and/or disarranged cristae were noted. The degree of these changes was more prominent in the multi dose group than in the trio dose group after equal amount of CDDP. In Sertoli cells, cytoplasmic vacuolation, swelling and/or myelinization of mitochondria were observed in both groups. However, the nuclei were not changed. The characteristic junctional configuration formed between neighbouring Sertoli cells and particles of cell membrane showed no significant changes in findings by the freeze fracture method. Thus the results in these experiments suggest that CDDP causing lethal damage to spermatogonia impairs local Sertoli cells. It is possible that the influence on the energy producing capacity of mitochondria in Sertoli cells retards the recovery of injured spermatogonia.

要旨: Cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) による造精機能障害に関して, ラット睾丸の精祖細胞・Sertoli 細胞への CDDP 投与の影響を超微形態学的に検討した。

実験は11週齢の雄性ラットを使用し, 大量短期投与群として CDDP $2.8 \mu\text{g/g/day}$ 3日間連続腹腔内投与, 少量長期投与群として $0.8 \mu\text{g/g}$, 2回/週, 1~8週間施行した。観察は光顕, 透過型電顕(TEM), フリーズフラクチャー法を用いた。その結果, 精祖細胞で短期群, 長期群ともに核不整凝集から核質融解に至る核変性が観察され, さらに核変性に遅れて両群ともミトコンドリアの空胞化・内部クリスタ不整がみられた。それらの変化は CDDP 総投与量が同程度のときは長期群の方が強かった。Sertoli 細胞では, TEM 像で両群とも細胞質内の空胞増加, ミトコンドリアのミエリン化・膨化変性が観察された。しかし Sertoli 細胞の核・核小体には何らかの変化も認めなかった。フリーズフラクチャー法による観察では, Sertoli 細胞間結合および膜内蛋白粒子に重大な変化を認めなかった。CDDP は正常ラット睾丸の精祖細胞に対して, 核およびミトコンドリアの変性を起こし造精障害をもたらすことが電顕的に確認された。一方, Sertoli 細胞に対しては, 核変性は起こさず, ミトコンドリア変性を生じさせる。Sertoli 細胞ではミトコンドリアのエネルギー産生能低下が示唆され, これが精祖系細胞の回復遅延に関与する可能性が疑われた。

緒 言

尿路性器悪性腫瘍に対する癌化学療法は近年様々な治療方法が施行されており、臨床的にめざましい治療効果をあげている。そのなかで睾丸腫瘍、特に germ cell testicular tumor に対しては Cis-diammine-dichloroplatinum (以下 CDDP) が良好な治療成績を上げており、完全寛解も得られるようになった。Germ cell testicular tumor は青壮年に多く発症する疾患であり癌化学療法により患者の長期生存が可能となった現在、癌化学療法後の妊孕性の有無を知ることが重要な問題として提起される。他の多くの抗癌剤と同様、CDDP は睾丸毒性を有しており、その投与により不妊傾向が発現することは以前から臨床によく知られている¹⁾。癌化学療法後の残存睾丸に対する障害発生機序について下垂体・精巣系の内分泌学的研究や組織学的報告がなされているが、精細管そのものの超微形態学的観察報告は少ない。今回著者はラットを実験動物として、CDDP の大量短期投与および少量長期投与の2群に分け、睾丸毒性を検討した。とくに精祖細胞および Sertoli 細胞の変化について超微形態学的観察を中心に検索を試みた。

材料・方法

実験動物は11週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 350~450g) を使用した。1週間予備飼育したのち以下の3群を作成した。(1) 未処置対照群、(2) 大量短期投与群 (Trio dose group)、(3) 少量長期投与群 (Multi dose group)。CDDP は 0.5mg/ml 水溶液を使用した。

大量短期投与群では CDDP 2.8 μ g/g/day を3日間連続腹腔内投与施行後、3匹を1群として計8群を作成し、1, 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28日目にエーテル麻酔下に1群ずつ睾丸を摘出した。摘出睾丸は重量測定の後、細切し2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド/燐酸緩衝液を用いて固定した。少量長期投与群では、1群を3匹として1回に0.8 μ g/g 腹腔内投与を1週に2回施行し、1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8週の計8群の投与群を作成した。各群とも投与終了後1週間目に大量短期投与群と同様に睾丸を摘出し、固定した。

固定した睾丸組織は、光顕観察用にパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施行した。透過型電子顕微鏡観察用には、2%四酸化オスミウム酸/緩衝液にて後固定ののち、エタノール系列で脱水し、エポン樹脂にて包埋した。電顕用超薄切片は酢酸ウラン・クエン酸鉛で二重電子染色を施し、日立

H500透過型電子顕微鏡にて観察した。更に、形質膜の観察法として対照群および一部の実験群にフリーズフラクチャー法による観察をおこなった。フリーズフラクチャー用に、2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド/緩衝液で固定した細切組織片を冷却保存し、使用に際し10~30%グリセリン/緩衝液にて浸透後、液体フロン及び液体窒素で急速凍結を施し、Balzer 社製フリーズエッチング装置を用いて組織割断、Pt-Ca 蒸着を施しレプリカを作成し、透過電顕にて観察した。

結 果

1) 睾丸重量と体重比

大量短期投与群では、対照群と比較して、投与後第1日と3日に睾丸体重比が有意に増加 ($p < 0.05$) したが、第4日以後は対照群と比べ差を認めなかった。少量長期投与群では、第1週で睾丸体重比が有意に増加 ($p < 0.01$) したが、他の群では差がみられなかった。

2) 組織像の変化

A) 対照群の光顕・電顕像

対照群にみる精細管の光顕像 (Fig. 1) では、精細管基底膜上に Sertoli 細胞が並び、各々の Sertoli 細胞間に分化誘導された精上皮細胞が密に、腺腔側に存在している。これら精上皮細胞は、基底膜側から腺腔中心にむかって精祖細胞、精母細胞、精子細胞が識別される。精娘細胞は判然としない。Sertoli 細胞はその細胞底面が精細管基底膜に密着しており、樹枝状構造 (lateral processus structure) を呈して内腔側に細長く延び、精上皮細胞との境界は光顕上明瞭ではない。

一方、超薄切片の電顕観察 (TEM) では、精祖細胞は楕円形の大型な核を有すが、細胞質内小器官の発達は乏しく、わずかに少数の円形なミトコンドリアが見られる程度である (Fig. 2)。

核は暗調 A 型精祖細胞では核内クロマチン濃度が高く TEM 像で高電子密度に観察される。また、明調 A 型精祖細胞では、やや粗大な核クロマチンを有し、核電子濃度は暗調 A 型精祖細胞に比べ低い。B 型精祖細胞では、核内周辺に核膜に接して1ないし2個の核小体を持つものが多く観察される。Sertoli 細胞の核は不規則な核膜陥凹を示し、細胞質内には豊富なミトコンドリア、滑面小胞体、低電子物質がみられ、ゴルジ装置も発達している。各 Sertoli 細胞の基底側側面の形質膜には特殊な細胞接合が観察できる。とくに注目すべき形態として30~50配列の畝状構造 (parallel row of particle, いわゆる tight junction) および所々

に細胞接合(cell contact)をみる(Fig. 3). この Sertoli 細胞と精細管基底膜で囲まれた領域に精祖細胞が存在している。フリーズフラクチャーレプリカ像の観察では、とくに隣接する Sertoli 細胞間において、畝状構造(parallel row of particle, strand)を特徴とする30~50層の閉鎖帯(tight junction)が、規則的に基底部より細胞中央付近まで発達してみられる。接着斑(Gap junction)の形態は認めない。また、部分的に膜粒子の線条構造(linear pattern)を示す特殊構造も散見される(Fig. 4)。

B) 実験群の光顕・電顕像

a) 光学顕微鏡的観察所見(短期群・長期群)

大量短期投与群では、いずれの観察期間においても、精上皮細胞の配列および個々の細胞形態において著明な変化はみられず、精細管断面あたりの精上皮細胞数と Sertoli 細胞数は対照群と比較して変化を認めなかった。少量長期投与群では4週投与群から軽度の精上皮細胞の減少と配列の乱れを認め、この変化はCDDP 投与期間すなわち総投与量に比例して増強し、7週、8週投与群で著明にみられた。精上皮細胞数の減少は精祖細胞、精母細胞を含め更に分化した精細胞でみられたが、精祖細胞の完全消失には至らなかった。特に、7週以後でも、精細管基底膜に接する精祖細胞は、細胞数の減少をみる以外、細胞形態の変化は捉えられない。しかし、精母細胞では核クロマチンの不均一な凝集像や細胞質の空胞変性が生じ、細胞は膨化していた。互いの精上皮細胞間隙および Sertoli 細胞との間隙は開大していた(Fig. 5a, 5b)。

b) 超微形態学的観察所見

大量短期投与群

1. 精祖細胞における微細構造変化

CDDP 投与後第4日群から初期変化が観察された。細胞形態としては全般に精細管基底膜に位置し、ほぼ正常構造と同様な精円形形態を維持しているが、側細胞膜は小さな陥凹蛇行像を呈しており、隣接細胞間隙の開大がみられる。核の変化についてみると、一部の細胞で核内クロマチンの不整凝縮像が観察され、光顕像では捉えられなかった細胞質内の空胞の増加を認めた。しかし、細胞質内オルガネラに関しては注目すべき変化はみられない(Fig. 6)。

第7日群では、隣接細胞間隙は第4日群にみる変化と比べ更に開大し、細胞膜の蛇行像はより強いが、精祖細胞の精細管基底膜からの解離はみられない。核内クロマチンの不整凝縮像は程度を増すものの、核膜の

連続性や構造上の変化には著変を認めない。細胞質では、空胞変性の他に一部のミトコンドリアに部分的な膨化あるいは濃縮像が観察される。

第14日群からは細胞破壊傾向が明らかに観察される。すなわち精祖細胞の精細管基底膜からの開離はみられないが、形質膜は複雑な不整陥凹を示し、一部に細胞膜の融解像を認める。核膜はその連続性は保つが、細胞質からの分離がしばしばおこり、核形態は軽度の不整像が観察される。細胞質内での変化は第7日群にみられる変化に加えて、ミトコンドリアのクリスタ配列に乱れがみられ、ミトコンドリア内部の空胞やミエリン化像として認める(Fig. 8)。

第21日群以後は第14日群での変化が一段と亢進しており、特に、ミトコンドリアの大きさが不整であることが注目される。

尚、精母細胞以上の分化型精上皮細胞は精祖細胞より極端な不整細胞形態を有し、細胞膜融解像が著明である。しかし、細胞間橋(inter cellular bridge)はなお維持されている。

2. Sertoli 細胞における微細構造変化

CDDP 投与後、第4日群までは対照群と比較して変化は示さない。第7日群で細胞質内に限界膜をもつ空胞の出現をみる。

第14日群で細胞形態上の変化があらわれはじめてい。すなわち精上皮細胞を包み込む Sertoli 細胞の細胞構造(樹枝状構造 lateral processus)は退縮しはじめ、細胞質内には第7日群でみられた空胞の増加を認める(Fig. 8)。更に、細胞質には円形で高電子密度を示す2次性ライソゾームの増加がみられる。ミトコンドリアは軽度の膨化像が観察されるがその他、核などのオルガネラには変化が認められない。

第21日群では細胞形態は縮小し、樹枝状構造の退縮が目立つ。細胞質の空胞は大きさと数が増加し、滑面小胞体の拡張が認められる。2次性ライソゾームは精細管内腔側とともに基底膜側の細胞質にも増加が観察された。ミトコンドリアは第14日群に比べより膨化浮腫状の変化が強くみられる。Sertoli 細胞の細胞膜は部分的に明らかな破壊が認められ、精上皮細胞の細胞質との融合像が散見される。しかし核に関しては、対照群と同等の形態を維持しており、核膜、核質、核小体とも特に注目すべき変化は認めない(Fig. 7)。

第28日群では第21日群での変化と同様の観察結果を示しているが、所により変化が著明な細胞もみられる。

少量長期投与群

LEGENDS TO FIGURES

Fig. 1 LM of seminiferous tubules in the control rat ($\times 100$).

Fig. 2 Electronmicrograph of seminiferous tubules in the control rat. Spermatogonium (Sg), spermatocyte (Sp), Sertoli cell (Se).

Fig. 3 Characteristic Sertoli cell's junction (arrow), mitochondria (M),

Fig. 4 Note the parallel row of particles showing tight junction.

Fig. 5 Multi dose group (LM). Prominence is decrease in number of germ cells. a) 7 weeks group $\times 100$. b) 8 weeks group $\times 100$.

Fig. 6 Trio dose group (4 days group), electronmicrograph. Notes were intra cytoplasmic vacuolation (V), mitochondrial swelling (M) in spermatogonium (Sg).

Fig. 7 Trio dose group (21 days group). Micrograph shows destruction of cytoplasmic membrane (arrow), mitochondrial swelling (M) and appearances of dens material (D) in Sertoli cell (Se).

Fig. 8 Trio dose group (14 days group). Remarks are interruption of cell membrane (arrow), and nuclear destruction, nuclear condensation (asterisk) in spermatogonia (Sg). Sertoli cell (Se) with mitochondrial swelling (M).

Fig. 9 Multi dose group (6 weeks group). Micrograph shows detachment of spermatogonium (Sg) from basement membrane (BM).

Fig. 10 Multi dose group (7 weeks group). Prominences are irregularity of nuclear envelope and condensation in spermatogonium (Sg), Sertoli cell (Se).

Fig. 11 Multi dose group (7 weeks group). Notes are mitochondrial swelling and myelinization (M), cytoplasmic vacuolation (V), and appearance of lysosomal bodies (Ly).

Fig. 12 Multi dose group (8 weeks group). Evidences are disarrangement of mitochondrial cristae in Sertoli cell.

Fig. 13 Multi dose group (3 weeks group). Photograph shows unchangeable configuration of junctional network observed in replica.

1. 精祖細胞における微細構造変化

CDDP 投与後 1, 2, 3 週群では対照群と比較してとくに変化はみられない。第 4 週投与群では核内クロマチンの不規則凝集と核膜細胞質分離のみが注目すべき変化である。

第 5 週群では細胞間隙が開大しはじめ、また核膜の不整陥入像が観察される。細胞質の変化としてはこの群では明らかではない。

第 6 週群では細胞形質膜の不整陥凹や膜融解像がみられはじめ、核膜細胞質分離現象は更に強く認められる (Fig. 9)。

第 7 週群では大量短期投与群での最も強い変化を上まわる精祖細胞の変性破壊像が認められた。すなわち、形質膜の不整陥凹像、精細管基底膜からの部分的遊離がみられ、核膜の陥入蛇行が著しくなった。核クロマチンの著明な不規則凝集に加えて、核質融解像が観察される。細胞質においてはミトコンドリアの膨化や空胞変性が主体で、他のオルガネラの変化には乏しい。また、隣接細胞膜の部分的な融解所見も見られる (Fig.

10)。

第 8 週群では、第 7 週群での変化と同程度ないし部分的に増強された変化像が認められる。

2. Sertoli 細胞における微細構造変化

第 1 週群から 4 週群までは対照群と比較して変化がみられず、第 5 週群においてわずかに樹枝状構造の退縮が観察される。その他細胞内オルガネラの変化は軽微である。

第 6 週群で樹枝状構造の退縮に加え、細胞質オルガネラの変化としてミトコンドリアの軽度膨化像が示される。

第 7 週群では細胞質内の空胞が増加し、ミトコンドリアの膨化とともにミエリン化像が認められる。滑面小胞体は内腔の拡張を示しているが、膜破壊像はみられない。高電子物質の貯留像として 2 次性ライソソームは明らかな増加を示している (Fig. 11)。

第 8 週群では、細胞質の空胞、滑面小胞体の浮腫、およびミトコンドリアの膨化変性が第 7 週群より一段と増強しており (Fig. 12)、細胞膜の融解部分も多数観

察された。

しかし Sertoli 細胞の核については、各観察群を通して目立った変化は認められなかった。

c) 細胞間接合 (intercellular junction) の変化
フリーズフラクチャーレプリカを用いての観察は、大量短期投与群の第 3 日群および少量長期投与群の第 3 週群を用いて検討した。両群にみられる変化はほぼ同様なものであった。とくに、閉鎖帯(tight junction)においては、対照群にみられた規則的配列を示す畝状構造(strand)は基底側寄りにその間隙の狭小化がみられるものの、全体としてその構造の破壊、膜内蛋白粒子の断裂像は軽微なものであった。これら実験群においても、閉鎖帯内には接着斑は観察できなかった(Fig. 13)。

考 察

CDDP は白金原子を含む分子量300.05の金属錯体で、その抗腫瘍活性は他のアルキル化剤と同様に DNA 合成阻害作用に基づくものと考えられている。CDDP と DNA の結合様式はいくつか考えられており、DNA の鎖間架橋および鎖内架橋、またはそのいずれかと推定されている²⁾。今日 CDDP は睾丸腫瘍をはじめとして泌尿生殖系腫瘍はもとより、多種臓器の腫

瘍に抗腫瘍剤として広く用いられている。泌尿器科医がかかえる臨床的問題として、CDDP を含む多剤併用癌化学療法に乏精子症が発生することが従来から多く報告されている¹⁾。

M.L. Meistrich らは、抗腫瘍剤によるマウス睾丸障害に関して single dose 法による実験を報告している³⁾。彼らは精細管の光顕観察、精子頭部数の算定から、CDDP は精祖細胞の A 型精祖細胞 (特に2~In 型精祖細胞) に障害を起こすと結論づけている。本邦の後藤らもラットでの CDDP 投与実験から、精祖細胞 A1に細胞障害が発生したことを報告している⁴⁾。これら現在までに報告されている CDDP の精祖細胞障害は、光学顕微鏡の観察あるいは精子数の減少からの推定に基づくものであり、精祖細胞自身の微細構造上の変化については報告が未だない。

またいくつかの抗腫瘍剤による動物実験、あるいは臨床報告を文献的に検討しても、Sertoli 細胞の形態上の変化はないものとされてきた⁵⁾。この Sertoli 細胞に関して、事実無変化であるのか、また隣接細胞接合機構を含む微細構造上の影響についても未解決であり、CDDP の睾丸毒性の作用検討とその解析は興味ある点といえる。

Table Details of Morphological Changes of Organelles in CDDP induced Rat Seminiferous Tubular Cells

	Experimental Groups															
	trio dose group(days)								multi dose group(weeks)							
	1	2	3	4	7	14	21	28	1	2	3	4	5	6	7	8
CDDP dose (μg/g)	8.4	←	←	←	←	←	←	←	1.6	3.2	4.8	6.4	8.0	9.6	11.2	12.8
Spermatogonia																
increase in cell size	-	-	-	-	-	+	+	±	-	-	-	±	+	+	+	+
intercellular dilatation	-	-	±	+	+	+	+	+	-	-	±	+	+	+	+	±
nuclear deformity	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	±	±	+	+	±	±
chromosomal degradation	-	-	±	±	±	+	+	+	-	-	-	+	+	+	±	±
perinuclear detachment	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	±	+	+	+	±	±
cytoplasmic degeneration	-	-	±	±	±	±	+	+	-	-	±	±	±	±	+	+
mitochondrial destruction	-	-	-	-	±	+	+	±	-	-	±	±	±	+	+	+
Sertoli cell																
decrease in size	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+
regression of lateral processus	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	+	+	+	+
nuclear deformity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-
nucleolar change	-	-	-	-	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
cytoplasmic vacuolation	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	±	±	±	+	+
mitochondrial degeneration	-	-	-	-	±	+	+	+	-	-	-	±	±	±	+	+
change of Se-Se junction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
change of Se-SG and SP junction	-	-	-	±	±	+	+	+	-	-	-	±	±	±	±	+
abnormal dense bodies	-	-	-	-	-	±	+	+	-	-	-	-	±	±	+	+

*degree of changes ; none(-), mild(±), moderate(+), severe(±)

〔精祖細胞に対する CDDP の影響についての考察〕

CDDP 投与後の精祖細胞への影響について、微細構造の変化を経時的に比較検討した (Table)。

大量短期投与群では投与終了後第 4 日群で初期変化が観察され、少量長期投与群では第 4 週群で初期変化がみられている。すなわち、大量短期群、少量長期群とも精祖細胞の核クロマチンの不規則な凝集と細胞形質膜の小規模な陥凹蛇行像、また細胞質内の空胞の増加が主体であった (Fig. 6, 8)。この変化は両群とも経時的に増強し、核形態不整、核膜細胞質分離、核質融解とともにミトコンドリア変性、形質膜融解まで至った (Fig. 8)。大量短期群と少量長期群を比較すると、総投与量が同程度であっても、後者の方が細胞破壊傾向は強い。このことから、CDDP の精祖細胞障害は、CDDP の短期間大量投与方法よりも少量長期頻回な投与のほうが強いと考えられる。

CDDP による初期変化は、短期群・長期群とも核から観察され、核クロマチンの不整凝集から始まる。CDDP の抗腫瘍活性は核 DNA の架橋に作用することから生ずると考えられており、この実験結果もそれを裏付けている。

次に、核以外の障害部位として、ミトコンドリアが指摘できる。もともと精祖細胞は細胞内オルガネラの発達が乏しく、細胞質内の変化は核に比べ顕著なものではないが、空胞増加とミトコンドリアの変性が観察されている。大量短期群では第 14 日群、少量長期群では第 7 週群でミトコンドリア形態の不整と内部クリスタ配列の乱れが観察されており (Fig. 8)、ミトコンドリア内部の代謝機構に何らかの障害が生じていると考えられる。CDDP の腎障害の報告では、近位尿細管細胞での刷子縁の変性とミトコンドリア内空胞変性・クリスタの不整が報告されている⁹⁾。腎と同様に精祖細胞においても CDDP はミトコンドリア代謝に影響を与えていることが示唆される。

また、核膜と細胞質分離現象は、核膜の本体が粗面小胞体と連続性をもった機構として考えると、粗面小胞体に腫脹が生じている可能性を示唆している。

CDDP は核 DNA のみならず高分子量 RNA や蛋白にも結合するといわれており⁷⁾、その抗腫瘍活性は細胞周期と無関係に発現するとされる。今回の実験結果をみても G0 期またはそれに近いゆっくりした細胞回転を行っている精祖細胞において、CDDP の細胞障害が微細構造的に確認された。

〔Sertoli 細胞に対する CDDP の影響についての考

察〕

従来の光学顕微鏡の観察によると、抗腫瘍剤によって精細胞数が極端に減少しても、Sertoli 細胞だけは細胞数、細胞形態、構造様式とも正常精細管にみる所見と同様に観察されてきた。その結果、Sertoli 細胞は抗腫瘍剤によって組織学的には影響を受けない細胞と考えられてきた。一方、内分泌学的検査から、CDDP 投与後に血中 FSH が増加するという報告がみられ¹⁾⁸⁾、CDDP による Sertoli 細胞の代謝異常が Sertoli 細胞での inhibin 分泌低下をもたらし、その結果、下垂体への feed back 機構を介して FSH の上昇を惹起している可能性が考えられる。

本実験において、CDDP 投与により Sertoli 細胞に細胞質内の空胞増加とミトコンドリアの膨化変性など微細構造上の変化が観察された (Fig. 8, 11)。しかし、Sertoli 細胞の核および核小体には変化を認めなかった。光顕像で観察できなかった変化として Sertoli 細胞の樹枝状構造 (lateral process) の退縮という構造異常は、Sertoli 細胞自身の代謝異常による結果なのか、あるいは精細胞退縮に付随した変化なのか判断し難い。Sertoli 細胞のミトコンドリア変化としては、一部にミエリン化像を示す膨化変性が主体であって、完全なミトコンドリア破壊像や破壊されたミトコンドリアの明らかなライソゾーム食食能は認められなかった (Fig. 12)。精祖細胞と同様にほぼ同じ観察時期において Sertoli 細胞についても、CDDP はミトコンドリアの代謝に影響をもたらししていると考えられる。腎の近位尿細管細胞での細胞化学的検討から、CDDP のミトコンドリア障害機序がいくつか推定されている⁹⁾。

(1) CDDP 水解物によってミトコンドリア内部に Ca^{2+} が蓄積し、ミトコンドリア内膜の腫脹が生ずる。そして Ca^{2+} がミトコンドリア外部に放出され、細胞質内に Ca^{2+} が増加する。その結果、細胞質内のアクチン様細繊維や微小管の解縮 (depolymerization) に影響し細胞骨格の維持に障害を与える。(2) CDDP 水解物がミトコンドリアの ATPase 活性を阻害し、ミトコンドリアでのエネルギー産生が低下する。腎の場合は CDDP の尿中排泄における重要臓器であり、高濃度に CDDP が集積されることから睾丸における CDDP の作用と単純には比較できないが、本実験結果からみて Sertoli 細胞においても、CDDP はミトコンドリアのエネルギー産生機構に障害を与えている可能性が考えられる。現在 Sertoli 細胞は精細胞に栄養を供給し、かつ精細管内の支持組織の一つと考えられて

いる¹⁰⁾。従って、Sertoli 細胞のミトコンドリアでエネルギー産生能の低下は、結果として精細胞への栄養補給を障害することになる。

ところで Sertoli 細胞では CDDP 投与による核および核小体の変化が全く観察されていない。このことは Sertoli 細胞の核は CDDP に対して、精祖細胞に比較しはるかに高い抵抗性を持つことを示している。この結果だけから推察すれば、Sertoli 細胞の核機能に支配されるリボゾームなど他の胞体内蛋白合成器官に、CDDP は重篤な障害をもたらしておらず、ミトコンドリアの障害が可逆的な変化である可能性を示すものであろう。また、フリーズフラクチャー法で観察した Sertoli 細胞間接合は、短期群、長期群とも対照群と比較しその結合様式において際だった変化がみられなかった (Fig. 13)。結論として、形質膜機能を支配する核の変化がみられぬ点をあわせ考えると、Sertoli 細胞機能がミトコンドリアのエネルギー産生能で障害を受けているものの、細胞自身が破壊される程には重大な障害を受けていないことを裏づける結果であった。

〔CDDP の精細胞への到達機序について〕

精細管内腔は精細管基底膜と Sertoli 細胞間結合が形成する隔壁によって、精細管基底側部 (basal compartment) と腺腔部 (adluminal compartment) のふたつに区分される。Sertoli 細胞間には閉鎖帯 (tight junction) が存在しており、この隔壁はいわゆる Blood-Testis-Barrier を形成している¹¹⁾。基底側部には、精祖細胞と一部の精母細胞が存在し、腺腔部には精母細胞とさらに分化した精子細胞等が存在している。Meistrich らの報告では CDDP による精細胞障害は、精祖細胞 (A2~In) の障害が中心としているが、high dose 実験では同時に全精祖系細胞 (精祖細胞~精子細胞) にまで細胞障害が及んでいると報告している³⁾。彼らは腺腔部への影響については Sertoli 細胞の機能障害が関与している可能性を示唆しているが、CDDP 投与時に全精祖系細胞に CDDP が吸収されている可能性については何ら議論されていない。ところで精巣内毛細血管にランタンを注入した TEM 像の観察¹²⁾によると、硝酸ランタン ($\text{La}(\text{NO}_3)_3$) は精細管基底膜を通過し、基底側部の精祖細胞間隙に侵入するが、Sertoli 細胞間接合を越えて腺腔部に侵入する所見は得られていない。また、硝酸ランタンは精祖細胞内部や Sertoli 細胞内部にも侵入していない。この結果から推察すると CDDP は単純な濃度勾配による拡散で精細胞に侵入するのではなく、イオン状態あるいは蛋

白と結合した状態で精細胞に取り込まれる可能性をもつものと考えられる。CDDP の細胞膜通過機構に関しては、アミノ酸輸送機構を介して取り込まれるとする報告がある¹³⁾。さらにまた、Sertoli 細胞間には接着斑 (gap junction) がみられるとする報告もあり¹⁴⁾、CDDP がその接着斑を通じ Sertoli 細胞から腺腔部に存在する精細胞に自由に浸透している可能性も否定し得ない。しかし本実験において接着斑の存在およびその吸収可能性については確証を得ていない。いずれにしても、CDDP の精細胞浸透機序に関して詳細はなお不明であり、この点に関する形態学的観察は、CDDP 類似構造をもつプラチナ化合物の tracer を利用した細胞浸透機序の分析が必要であらう。

結 語

1. CDDP のラット精祖細胞と Sertoli 細胞に対する影響を、電顕的に検討した。
2. CDDP 投与により、精祖細胞では細胞核から障害が発生し、経時的に障害は強まり、核崩壊に至った。また、核変性にやや遅れてミトコンドリアに膨化・変性が生じた。
3. Sertoli 細胞では、核・核小体に変化はなく、ミトコンドリアのミエリン化・膨化変性が認められた。Sertoli 細胞間接合には著明な変化が観察されなかった。
4. 精祖細胞、Sertoli 細胞の変化は、CDDP の総投与量が同程度のとき、短期間に投与するより長期に頻回にわたり投与した場合のほうが強く認められた。

文 献

- 1) 古畑哲彦, 小川勝明, 穂坂正彦, 菅原敏道: 睾丸腫瘍患者の治療後の睾丸機能に関する研究. 第3編. 化学療法後の下垂体-精巣系機能について. 日泌尿会誌, 76, 1035-10411, 1985.
- 2) Zwelling, L.A. and Kohn, K.W.: Effects of cisplatin on DNA and the possible relationship to the cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells. In Prestayko, A.W.: Cisplatin current status and new developments. p. 21-35, Academic press INC. New York, 1980.
- 3) Meistrich, M.L., Finch, M., Da Cunha, M.F., Hacker, U. and Au, W.W.: Damaging effects of fourteen chemotherapeutic drugs on mouse testis cells. Cancer Research, 42, 122-131, 1982.
- 4) 後藤修一, 立花裕一, 東 四雄, 福井 巖, 高木健太郎, 竹内健一: DDP のラット精上皮への影響. 泌尿紀要, 30, 1195-1199, 1984.
- 5) Thachil, J.V., Jewett, M.S.A. and Rider, W.D.: The effects of cancer and cancer therapy on male fertility. J. Urol., 126, 141-145, 1981.

- 6) 木村茂三, 中藺昌明, 田崎 寛: Cis-Diammine-dichloroplatinum (11) 投与の腎毒性の電顕的観察. 日泌尿会誌, 76, 1439—1453, 1985.
- 7) Pascoe, J.M. and Roberts, J.J.: Interactions between mammalian cell DNA and inorganic platinum compounds-I. Biochem. Pharmac., 23, 1345—1357, 1974.
- 8) Fossa, S.S., Ous, S., Åbyholm, T., Norman, N. and Loeb, M.: Post-treatment fertility in patients with testicular cancer. British J. Urol., 57, 210—214, 1985.
- 9) Aggarwal, S.K., Whitehouse, M.W. and Ramachandran, C.: Ultrastructural effects of cisplatin. In Prestayko, A.W.: Cisplatin current status and new developments. p. 70—111, Academic press INC, New York, 1980.
- 10) 穂坂正彦, 木下裕三: セルトリー細胞機能. 臨泌, 40, 1—11, 1986.
- 11) Schulze, C.: Sertoli cells and Leydig cells in man. In Advances in anatomy, embryology and cell biology, 88, p. 61, Springer-Verlag, Berlin, 1984.
- 12) 高山秀則: 透過性関門としての精巣内毛細血管の微細構造. 日泌尿会誌, 77, 1840—1850, 1986.
- 13) John, E.B. and Paula, M.C.J.: Carrier-dependent and carrier-independent transport of anti-cancer alkylating agents. nature, 249, 281—283, 1981.
- 14) Dennis, M., Zoltan, P. and Martin, P.: Inter cellular junctional complexes of the rat seminiferous tubules: A freeze-fracture study¹. Anat. Rec., 189, 211—232, 1977.

(1988年1月12日受理, 特別掲載)