ラット精子形成に及ぼす制限給餌の影響

島田 信・鹿内ゆかり・原田 滋雄

第一製薬株式会社 安全性研究所 〒134 東京都江戸川区北葛西1-16-13

要 約 ラット精子形成に及ぼす制限給餌の影響を検討した。11週齢の雄ラットに飽食時の75%、50%および25%の飼料を与えて4週間飼育すると、体重は飽食で飼育したラットのそれぞれ90%、72%および54%まで減少した。さらに飽食時の25%の飼料を与えた群では精巣重量が減少した。しかし、いずれの群においても精巣内精子数に変化は認められなかった。精巣の組織学的検討の結果、飽食時の25%の飼料を与えた群では、ステージ7のパキテン精母細胞の変性および減少が認められた。これらのことから4週間の制限給餌で体重が対照群の72%まで減少しても、精子形成に障害を及ぼさないが、54%まで減少した場合にはステージ7の精細管のパキテン精母細胞の変性などの変化が惹起されることが明らかとなった。

キーワード : Food restriction, Rat, Seminiferous tubule, Spermatocytes, Testicular toxicity.

(Journal of Reproduction and Development, 42 : j69-j75, 1996)

ラットに薬物を投与して精子形成障害が認められる場合、体重減少を伴っていることが多い [1]。このような場合、精子形成障害が投与した薬物の毒性に起因するのか、あるいは体重減少に伴う非特異的な変化であるのかを明確に区別することは困難である。そこで、今回我々はラットを制限給餌により飼育し、体重減少の影響が精子形成障害の発現にどの程度関与しているかについて検討した。

材料および方法

1. 使用動物および飼育環境

11週齢のSD系雄ラット（日本エスエルシー株式会社）を20匹用いた。動物は、室温 23 ± 2 ℃、湿度 55 ± 15 ％、換気回数15回／時、照明時間12時間（午前8時点灯、午後8時消灯）の環境下で、アルミ製ケージに1ケージ当たり1匹を収容して飼育した。飼料はマウス・ラット用固形飼料（繁殖用MB-1、船橋農場）を用いた。飲料水は塩素添加上水道水を自動給水ノズルを介して自由に摂取させた。

2. 群構成および処置方法

対照群は飽食群とし、残りの3群は当研究室における同系統同週齢雄ラットの平均摂餌量（25 g/day）の75%（18.75 g/day）、50%（12.5 g/day）および25%（6.25 g/day）をそれぞれ与える群とし、給餌は一日一回とし、1群5匹で4週間実施した。

3. 測定および検査

1) 体重および精巣重量測定

体重は、0、5、8、12、15、19、22、26日および屠殺日（28日）に測定した。なお、制限給餌開始日を0日とした。また、精巣重量については、動物をエーテル麻酔下で放血屠殺後、精巣を摘出し、その重量を測定した。

2) 精巣内精子数の測定（スパームヘッドカウント法）[2]

左精巣の白膜を剥離した後、ディスパーズミキサー（Ultra-Turrax, Janke & kunkel IKA 社）でホモジナイズし、さらに超音波細胞破碎装置（SONIFIER-200, BRANSON SONIC POWER 社）にて組織を粉碎した。その後、サン

プル液を1滴取りマクラー精子分析カウントチャンバー (SEFI-MEDICAL INSTRUMENTS 社) にて、位相差顕微鏡下で精子頭部の計数を行い精巣1個当たりの精子数を算出した。

3) 精巣の組織学的検討

放血屠殺後右精巣をブアン固定し、パラフィン切片を作製し、HE および PAS 染色を施し組織学的に検討した。また、変性生殖細胞および変性精細管（退行性変化を示した精細胞が存在する精細管を変性精細管と呼ぶ）を以下に示す方法で算出した。

(1) 精細管変性の出現率

1 匹当たり 100 の精細管を観察し、精細胞の変性の認められた精細管を数え、精細管変性の出現率を算出した。

(2) 一精細管当たりの変性細胞数

全精細管を検索し、いくつの変性細胞があるか数え、一精細管当たりの変性細胞数を算出した。

(3) 変性のみられた精細管のステージの出現率

25 % 給餌群で精細管変性の出現率が飽食群に比べ増加したため、25 % 給餌群について 1 匹当たり 100 個の精細管を観察し、変性の有無の確認および変性した精細管のステージ分類を行った [3]。さらに、変性のみられた精細管数のステージごとに、観察した精細管数で除して、変性のみられた精細管のステージの出現率を求めた（変性のみられた精細管数のステージ/観察した精細管数×100）。

(4) 生殖細胞数の測定

25 % 給餌群で変性した生殖細胞がステージ 7 の精細管に最も高頻度に認められたため、対照群および 25 % 給餌群のステージ 7 の精細管を 1 匹当たり無作為に 10 個選び、セルトリ細胞当たりのタイプ A 精祖細胞、プレプトテン精母細胞およびパキテン精母細胞の割合を算出した。

4. 統計学的解析

各群の平均値を算出し、対照群と各制限給餌群との間の検定には、複合検定（Bartlett の検定後、差があった場合 Dunnett および Dunnett 型平均順位検定）を行った。しかし、2 群間の検定（生殖細胞数）には F 検定を行い、分散に差がなかったため Student の t 検定を行った。なお、体重と摂餌量については検定を実施しなかった。

成 績

1. 体重 (図 1)

対照群の体重はほぼ直線的に増加した。しかし、制限給餌を行った 3 群ではそれぞれ給餌量に依存して体重の減少が認められた。すなわち、75 %、50 % および 25 % 給餌群の 4 週間の制限給餌終了時点の体重は対照群の体重のそれぞれ 90 %、72 % および 54 % であった。

2. 摂餌量 (図 2)

対照群の平均摂餌量は 23.96 g であり、75 % 給餌群は 18.38 g、50 % 給餌群は 12.41 g および 25 % 給餌群は 6.30 g であった。従って、対照群に対する制限給餌の割合は、75 % 給餌群で 77 %、50 % 給餌群で 52 % および 25 % 給餌群で 26 % であった。

3. 精巣重量 (図 3)

25 % 給餌群の精巣重量は対照群と比べ有意に減少した。しかし、75 % 給餌群および 50 % 給餌群には差は認められなかった。

図 1. 4 週間給餌制限による体重変化. 各値は平均±SD (n = 5).

図 2. 1 日の摂餌量 Control は飽食とし、75 % 群は約 18.75 g、50 % 群は約 12.5 g および 25 % 群は約 6.25 g を 4 週間ラットに与えた。各値は平均±SD (n = 5)。

図3. 4週間給餌制限による精巣重量変化
各値は平均±SD (n = 5). **はControl (飽食群) に対する有意差 (P < 0.01) (Dunnett).

図4. 4週間給餌制限による精巣内精子頭部数変化
各値は平均±SD (n = 5).

4. 精巣内精子数 (図4)

制限給餌群の精巣内精子数はいずれも対照群の値と同程度であり、有意な差は認められなかった。

5. 精巣の組織学的検討

1) 組織学的所見 (表1, 図5, 6, 7)

精巣の組織変化として精母細胞の変性および壊死が25%給餌群に全例認められたが、精細管の変性は認められなかった。また、ライディッヒ細胞の若干の萎縮が25%給餌群の全例および50%給餌群の1/5例にみられた。さらに、精細管の空胞化が25%給餌群の1/5例にみられた。精巣上体の変化としては、管腔に変性細胞がみられた動物が、75%給餌群および50%給餌群にそれぞれ2/5例ならびに25%給餌群に3/5例認められた。しかし、何れも変化の程度は弱いものであった。

2) 精細管変性の出現率 (図8)

25%給餌群に細胞変性を伴った精細管が19.8%認められた。しかし、50%給餌群および75%給餌群はいず

図5. Control (飽食群) の精巣 (A : ×40, B : ×100)

れも2.2%であり対照群の1.2%と同程度であった。

3) 一精細管当たりの変性細胞数 (図8)

25%給餌群で、二つの精細管に一個の割合 (0.5個) で変性細胞が認められた、一方対照群、50%給餌群および75%給餌群では、100個に一から二個の割合 (0.013 ~ 0.026) で変性細胞が認められた。

4) 精細管の各ステージにおける変性率 (図9)

精細管変性の出現率が25%給餌群で飽食群に比べ明らかに増加したため、25%給餌群について、変性を伴った精細管のステージの出現率を算出した。その結果、ステージ7の精細管に78%と一番多く変性が認められ、ついでステージ8の36%、ステージ12の32%の順であった。

5) 生殖細胞数の測定 (図10)

ステージ7の精細管について調べると、対照群と比較し25%給餌群ではセルトリ細胞当たりのパキテン精母細胞の若干の減少が認められた。しかし、タイプA精祖細胞およびプレレプトテン精母細胞に細胞数に変化は認められなかった。

図6. 25%給餌群の精巣（精母細胞の変性：矢印，空胞：矢頭，ライディヒ細胞の萎縮）（C：×40，D：×100）

図7. Control（飽食群）の精巣上体頭部（E：×40）および25%給餌群の精巣上体頭部（変性細胞の出現：矢印）（F：×40）

Table 1. Histopathological findings in the testis and epididymis

Animal: RAT	Strain: Slc: SD	Male											
Group		Control			75 %			50 %			25 %		
Number of animals		5			5			5			5		
Grade		—	±	+	—	±	+	—	±	+	—	±	+
Testis													
Degeneration of spermatocytes		5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	4	1
Vacuolation of seminiferous epithelium		5	0	0	5	0	0	5	0	0	4	1	0
Atrophy of Leydig cells		5	0	0	5	0	0	4	1	0	0	1	4
Epididymis													
Desquamation of cells		5	0	0	3	2	0	3	2	0	2	2	1

Grade are expressed as follows; —: no change, ±: minimal, +: slight.

図 8. 4 週間給餌制限による精細管の変性出現率
精巣内で変性の認められた精細管の割合. 各値は平均±SD (n=5).
**は Control (飽食群) に対する有意差 (P<0.01) (Dunnett).

図 11. Control (飽食群) と 25% 給餌群のステージ 7 の生殖細胞の比較 (変性の最も多く認められた精細管)
各値は平均±SD (n=5). *は Control (飽食群) に対する有意差 (P<0.05) (t-test).

図 9. 一精細管当たりの変性細胞数
各値は平均±SD (n=5). **は Control (飽食群) に対する有意差 (P<0.01) (Dunnett).

図 10. 変性の見られた精細管のステージの出現率
変性の認められた精細管のステージの出現率=変性の認められたステージの精細管数/観察した精細管数×100. 各値は平均±SD (n=5).

考 察

11 週齢のラットが摂取する平均摂餌量の 75%, 50% および 25% の飼料を与えて 4 週間飼育すると, 体重は対照群のそれぞれ 90%, 72% および 54% まで減少し, 体重減少は, 与えた餌の量に依存していた.

体重が対照群の 54% まで減少した 25% 給餌群では, 精巣重量が有意に減少した. しかし, 体重が対照群の 72% および 90% に減少した 50% 給餌群と 75% 給餌群では精巣重量に変化は認められなかった. また, いずれの制限給餌群でもスパームヘッドカウント法 [2] で検出される発生段階の精子細胞 (ステップ 12 からステップ 19) には障害を与えないことが明らかとなった.

精巣の組織学的検査を行った結果, 25% 給餌群で精細管内の生殖細胞の変性が増加しており, それらの変性の認められた精細管をステージ別に集計してみると, ステージ 7 の精細管に多く変性が認められた. 更にステージ 7 の精細管内について詳しくみてみるとパキテン精母細胞の減少が認められた. このことから, 今回実施した実験条件ではステージ 7 の精細管のパキテン精母細胞が最も障害を受けやすいことが明らかになった.

なぜステージ 7 の精細管のパキテン精母細胞が障害されやすいかについては今回の実験から明らかにできなかったが, ラットに低タンパク食や制限給餌を行うと生殖臓器, ギナドトロピンおよびテストステロンの減少がみられる [4-10]. またステージ 7, 8 の精細管では DNA 合成量やテストステロン含量が最大となり [11, 12] テストステロンの供給を停止すると, このステージの生殖細胞がまず変性する [13-15] ことが報告されている.

またセルトリ細胞についてみると、ゴルジ装置が周期的にステージ7, 8で上方に移動することが電顕的形態計測 [16] や蛍光染色 [17] で示されている。この時期を中心としてミトコンドリアと粗面小胞体も増加しており活発な蛋白合成が行われていることが知られている [18, 19]。そのために、ステージ7は給餌制限による栄養障害に対して敏感であると推察される。

ところで今回の実験で、精巣の組織変化が認められたのは精母細胞であることから今回実施したスパームヘッドカウント法 [2] では精巣内精子数が変動しなかったものと思われる。パキテン精母細胞がステップ12の精子細胞に分化するには約3週間を要することから、[20]、精巣内スパームヘッドカウント法 [2] により変化がとらえられるのは制限給餌を4週間実施した後、約3週間経過した後ではないかと考えられる。実際我々の研究室で、制限給餌を4週間実施した後、3週間飽食で飼育したラットでは、精巣内精子数の減少傾向が認められており、精巣、精巣上体および前立腺重量が減少することが確かめられている。しかし、組織学的検査では制限給餌を4週間実施した時に認められたパキテン精母細胞の変性は何れの精巣にもみられず、精巣の組織学的変性は既に回復していた。

ところで、Chapinらは、体重を対照群の70%で15週間維持した雄動物では、交配率、妊娠率、胎児成績、精巣重量、精巣上体中の精子運動性、精子数および精子奇形率に変化を認めないことを報告している [21]。

今回の実験において、体重が74%まで減少した50%給餌群でも精巣重量、精子数および精巣の組織的变化は認められずChapinらの報告 [21] と矛盾するものではなかった。

以上の結果から、飼料の摂取を抑制して体重が対照群の70%程度まで減少するような条件下では、精巣障害は発現しないが、50%程度まで減少する場合にはステージ7の精細管のパキテン精母細胞の変性などの変化が惹起されることが明らかとなった。

文 献

1. Takayama S, Akaike M, Kawashima K, Takahashi M, Kurokawa Y. A collaborative study in Japan on optimal treatment period and parameters for detection of male fertility disorders induced by drugs in rats. *J Am Coll Toxicol* 1995; 14: 266-292.
2. Meistrich ML. Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head counts. *J Am Coll Toxicol* 1989; 8: 551-567.
3. Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Staging for laboratory species. In: Histological and Histopathological Evaluation of the Testis. Clearwater: Cache River Press; 1990: 62-194.
4. Umapathy E. Diet-induced changes in the male reproductive system of rats. *Archives of Andrology* 1992; 28: 49-58.
5. Oishi S, Oishi H, Hiraga K. The effect of food restriction for 4 weeks on common toxicity parameters in male rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1979; 47: 15-22.
6. Glass AR, Mellitt R, Vigersky RA, Swerdloff RS. Hypoandrogenism and abnormal regulation of gonadotrophin secretion in rats fed a low protein diet. *Endocrinology* 1979; 104: 438-442.
7. Chapin RE, Williams J. Mechanistic approaches in the study of testicular toxicity: Toxicants that affect the endocrine regulation of the testis. *Toxicologic Pathology* 1989; 17: 446-451.
8. Howland BE. The influence of feed restriction and subsequent re-feeding on gonadotrophin secretion and serum testosterone levels in male rats. *J Reprod Fert* 1975; 44: 429-436.
9. Vawda AI, Mandlwana JG. The effects of dietary protein deficiency on rat testicular function. *Andrologia* 1990; 22: 575-583.
10. Bergendahl M, Perheentupa A, Huhtaniemi I. Starvation-induced suppression of pituitary-testicular function in rats is reversed by pulsatile gonadotrophin-releasing hormone substitution. *Biology of Reproduction* 1991; 44: 413-419.
11. 上野 浩, 森 浩志. 精子発生周期を支えるセルトリ細胞. *電子顕微鏡* 1994; 29: 35-41.
12. Parvinen M, Ruukonen A. Endogenous steroids in the rat seminiferous tubules. Comparison of the stages of the epithelial cycle isolated by transillumination-assisted microdissection. *J Androl* 1982; 3: 211-220.
13. Russell LD, Clermont Y. Degeneration of germ cell in normal, hypophysectomized and hormone treated hypophysectomized rats. *Anat Rec* 1977; 187: 347-364.
14. Russell LD, Malone JP, Karpas SL. Morphological patterns elicited by agents affecting spermatogenesis by disruption of its hormonal stimulation. *Tissue Cell* 1981; 13: 369-380.
15. Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied using Leydig cell destruction and testosterone replacement. *Am J Anat* 1990; 188: 3-20.
16. Ueno H, Mori H. Morphometrical analysis of Sertoli cell ultrastructure during the seminiferous epithelial cycle in rats. *Biol Reprod* 1990; 43: 769-776.
17. Johnson KJ, Boekelheide K. Visualization of golgi complexes and spermatogonial cohorts of viable intact seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 299-306.
18. Ye SJ, Ying L, Ghosh S, de Franca LR, Russell LD. Sertoli cell cycle: A reexamination of the structural changes during the cycle of the seminiferous epithelium of the rat. *Anat Rec* 1993; 237: 187-198.
19. Kerr JB. An ultrastructural and morphometric analysis of the Sertoli cell during the spermatogenic cycle of the rat. *Anat Embryol* 1988; 179: 191-203.
20. Meistrich ML, Trostle PK, Brock WA. Association of nucleoprotein transitions with chromatin changes during rat spermatogenesis. In: Jagiello GA, Vogel HJ (eds.), Bioregulators

- of Reproduction. New York: Academic Press; 1981: 151–167.
21. **Chapin RE, Dushyant KG, Leta HB, Janet LT.** The Effects of feed restriction on reproductive function in Sprague-Dawley rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993; 20: 23–29.

Effects of Food Restriction on Spermatogenesis in Rats

Makoto SHIMADA, Yukari SHIKANAI and Shigeo HARADA

Drug Safety Research Laboratory, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo R & D Center 16-13, Kita-Kasai 1-Chome, Edogawa-ku, Tokyo 134.

Summary. Effects of food restriction on spermatogenesis were examined. A total of 20 male Slc: SD rats were used. Food intake was restricted to 25, 50 and 75% of ad libitum consumption over 4 weeks. Body weights in 25, 50 and 75% groups showed 54, 72 and 90% of control group, respectively. Although a significant decrease in testicular weights was recorded in 25% group, there was no significant difference between food restricted and control groups in sperm head count analysis. Histologically, degenerated spermatocytes were detected in the stage 7 tubules, however, the number of the affected cells was quite a few. The incidence (%) of seminiferous tubule containing degenerated spermatocytes was 1.2 in control, 2.2 in 75% group, 2.2 in 50% group and 19.8 in 25% group.

These results suggest that nutritional deficiency associated with marked reduction of body weight induced the mild damage of spermatocytes.