P³²投与鶏精巢の組織・細胞学的研究

西田司一・望月公子・塩田俊朗

東京大学農学部家畜解剖学教室

(昭和 38 年 7 月 10 日受付)

哺乳動物においては、放射線の生殖腺に及ぼす影響について多くの研究がなされ、組織学的・細胞学的にもかなり多数の報告があるが、鶏においては少なく、とくに P³² に関するものは、わずかに数編をかぞえるに過ぎない。著者らは、P³² 投与による鶏の内分泌腺の形態学的変化の研究を行なっているが、今回は精巢変化の組織学的・細胞学的所見について報告する。

材料および方法

組織学的観察に使用した動物は、白色レグホーン種の雄雛（体重 300~400g）41 羽（うち、対照 9 羽）および雄成鶏 2 羽で、材料採取は断頭屠殺により、採取部位は精巢の中央部とした。投与方法は、全例ともに腹腔内注射により、投与量は雛では、大量の例は 5 または 10 $\mu\text{C/g}$ 、少量の例は 1 $\mu\text{C/g}$ で、材料採取時期は投与後 2~33 日で剖検採取した。雛の材料には、松岡ら^{8,9)}と同一のものが含まれている。また成鶏では、投与 3 日前 biopsy によって、造精機能が正常であることを確かめ、1 例は、5 $\mu\text{C/g}$ 投与して 10 日後に剖検した（衰弱はなほだしく、斃死直前と考えられた）。他の 1 例は、0.6 $\mu\text{C/g}$ 投与して 30 日後に剖検した。

細胞学的観察に使用したものは、白色レグホーン種の雄成鶏 9 羽で、著者らの報告¹¹⁾の材料の一部をも含んでいる。投与量はいずれも 0.5 $\mu\text{C/g}$ で、腹腔内注射した。投与前と投与後は経時的に、biopsy によって材料を採取し、7 カ月後に剖検・採取した。材料採取部位は、左精巢の中央部にほぼ一定した。

精巢の固定には Allen-Bouin 液を用い、常法により、5~8 μ のパラフィン連続切片を作り、Heidenhain の鉄ヘマトキシリン、ライトグリーン染色を施した。

観 察

1. 組織学的所見

日獣誌 26, 141~146 (1964)

a. 雛における実験：対照動物の精巢は、剖検時の日令によって、発育に差があり、組織像も異なっていた。投与動物の精巢は、本実験の剖検時期の範囲内（最長 33 日）においては、各例ともよく類似した組織像を示した。そこで、対照動物は最後のもので代表させ、投与動物は一括して対照と比較し、記述することとする。

実験雛の精巢においては、精細管の口径は小さく精上皮はほとんど単層で、長紡錘形の未分化型の精細胞と、セルトリ細胞とらかなる、第 I 精母細胞 (Primary spermatocyte) の分裂像と思われる像 1~2 個が散在する部分が、まれに認められた。精上皮の連続的分裂増殖を示すと考えられるような組織像はみられなかった (Fig. 1)。間質は、線維芽細胞 (Fibroblast) 様の未分化型の細胞によって占められていた。

これに反して、対照動物の精巢では、精細管の口径が大きく、精上皮では精祖細胞 (Spermatogonia)、精母細胞 (Spermatocyte)、精子細胞 (Spermatid) およびセルトリ細胞の区別が比較的明瞭で、多数の有糸分裂像が存在し、連続的分裂増殖を思わせ、投与動物のものと著しい対比を示した (Fig. 2)。間質においても、投与動物に比べて、やや細胞質に富み、核も円形または楕円形で大型の細胞が認められた。しかし、間質に関しては、投与群との間に、精上皮にみられたような著しい差はなかった。

以上の観察結果から、本実験に用いた投与量と、投与後の日数の範囲内においては、少なくとも雛の精巢の組織像によって判定する限り、発育は遅延しているが、精細胞の明確な破壊像は認められなかった。

b. 成鶏における実験：大量 (5 $\mu\text{C/g}$) 投与のものは、投与後、日数を経るにつれて衰弱したので、斃死直前と考えられる投与 10 日後に屠殺・剖検した。投与 3 日前、対照材料採取のとき開腹して精巢

の長径および中央部の最大横径を測定し、その大きさは $2.75 \times 1.3 \text{ cm}$ であったが、剖検時には $1.5 \times 0.8 \text{ cm}$ に萎縮していた。組織学的には、投与前のものは、精細管の口径が大で、種々の段階の精細胞が認められ、分裂像や精子も多数認められ、造精機能は正常であった (Fig. 3)。

剖検時の精巣の所見は、精細管の口径が著しく減少し、精上皮の細胞配列はきわめて不整となり、細胞境界も不明瞭で、明らかな輪郭を示す細胞はきわめてわずかで、染色性も減退した。精祖細胞とセルトリ細胞の区別は困難である。精子はほとんど完全に消失し、精子細胞や精母細胞も、ほとんど消失した。また精細管の内腔は、変性した精細胞の集団によって満たされているものがあつた。精細胞では空胞変性像はほとんど認められず、核溶解 (Karyolysis) や、核濃縮 (Pyknosis) 様変化を示すものが、比較的多数観察され、分裂像は少なかった。精細管の基底膜は肥厚し、強染する傾向があつた。間質細胞も幾分萎縮する傾向があつたが、とくに著しい変性像は認められなかった (Fig. 4)。

$0.6 \mu\text{c/g}$ 投与 30 日後に剖検したものでは、精細管の口径は縮小し、精上皮の大部分は、精祖細胞およびセルトリ細胞からなる単層の上皮であつたが、一部の精細管の上皮には、少数ながら、第 II 精母細胞 (Secondary spermatocyte) の分裂像までを示すものがあつた。このような組織像を示すものには数個の分裂像の認められるものから、ときには数層ないし十数層に精細胞が重なっている場合もあり、種々の段階の組織像が散在的に認められた (Fig. 5)。

このような像が、回復かあるいは破壊のいずれの過程にあるものかは、にわかに決定することは困難である。この例では、大量投与例と同様に、精子を欠くが、反対に、管腔内に変性もしくは破壊細胞破片とみなされるものが認められない。このことから、上述のような組織像は、それを示す部位のみが、 P^{32} の障害の遅延をきたして、造精機能を維持していたと考えるよりも、回復期を示すものとみなすほうが妥当であろう。すなわち、 P^{32} を $0.6 \mu\text{c/g}$ 投与すれば、精巣構造は著しい障害を受けるが、この障害は、30 日後には回復に向うことを示すものであろう。この点を確認めることも目的の一つとして、次のように、投与後経時的に細胞学的観察を行なった。

2. 細胞学的所見

本観察に用いた材料は、前述の実験を除き、同一個体から、投与後 10 日～7 カ月の間に、経時的に biopsy によって材料を採取し、最後の 7 カ月目に屠殺採取したものである。前実験において、 $0.6 \mu\text{c/g}$ 投与でかなり著しい組織学的変化を認めた。そこで本実験では、 $0.5 \mu\text{c/g}$ を投与し、時間的経過を追って、核の変化を主として観察した。

その結果、投与後 10 日に、すでに精細胞は破壊されて、精子は消失し、精上皮は単層となり、腔内には脱落細胞またはその破砕物が認められた。これらの破砕物は、1 カ月後には消失していた。10 日後では、精祖細胞の分裂像はまれである。20 日後になると、残存精祖細胞に分裂像が現われ、以後投与後 1 カ月ないし 1.5 カ月ごろまでの分裂像中には、種々の染色体異常が認められた (Figs. 6～10)。すなわち、環状 (完全な環ではなく、切れ目をもつものを含む)、馬蹄形、染色体橋、染色体の遅滞、分断増数、その他の異常像が認められ、数的には、環状のものが最も多く、ついで橋および遅滞型をあわしたものがこれにつぎ、分断、馬蹄型その他は比較적の少なかった。

これらの染色体異常を示す分裂と正常分裂との比率は、計測しなかったが、異常像は P^{32} 投与後初期 (1.5 カ月ごろまで) に多く、600 倍拡大で 1 視野に少なくとも数個含まれていた。その後減少し、投与後 2 カ月たったころには、かなり減少し 1 視野 1 個以下となった。7 カ月後には、正常とほとんど変わらない頻度を示し、精査した各例 (小組織片) では、2～3 ないし数個の程度であつた。なお投与後 2 カ月の例で、3 極分裂と思われる像も認められたが、紡錘糸は明瞭には認められなかった (Fig. 11)。

以上のほかに、核濃縮や、細胞の癒合によって生じたと考えられる巨大細胞も、少数ながら認められた。ただし巨大細胞は、投与後 2 カ月以後のものにおいては存在しなかった。成鶏における大量投与の例と異なる今一つの点として、精細胞の空胞化が、投与後約 1 カ月までの精祖細胞に認められた (Figs. 7, 9)。これは 2 カ月以後のものにおいては、まれであつた。なお投与後 4 カ月では、精細管上皮はほぼ正常に近く回復している。このようなものの 1 例において、精子形成が盛んな精細管にまじって、セルトリ様細胞のみからなり、しかもその内腔に多数の精子を有する精細管が認められた (Fig. 12)。

考 察

哺乳動物において、放射性物質あるいはX線による外部照射が、生殖腺に及ぼす影響については、多くの報告がある。しかし内部照射に関する報告は、比較的少ない。著者らの研究室において行なわれたものとしては、柏原・近藤³⁻⁵⁾のマウスにおけるX線照射が生殖腺に及ぼす影響についての詳細な組織学的・細胞学的研究がある。

これに対し、鶏における研究は少ない。とくにP³²投与が生殖腺に及ぼす影響については、二、三の研究があるに過ぎない^{1,8,9,12,15,16)}。なおX線、γ線の照射実験については、わが国では柏原ら^{6,7)}のものがある。したがって本研究の結果と厳密に対比される研究成績は、ないといっても過言ではない。先人の研究結果は、使用動物の種類や放射線の種類などによって、それぞれ異なるが、総括的にみれば、放射線は生殖腺に対して破壊的に作用するといえる。

本研究の結果は、鶏において、P³²が精巣に及ぼす影響は、鶏の日令によって異なることを示している。すなわち雛では、本実験の範囲内においては、投与量の多少にかかわらず、精巣の発育分化を遅延させるように働くが、成鶏では精上皮に対して破壊的に作用する。このように日令によって差がある理由は、明らかではないが、放射線に対する未分化細胞またはセルトリ細胞の抵抗性が比較的強いことによるか、あるいは雛においては、生殖腺に摂取されるP³²の量が少ないためかもしれない。このことは、鶏において、雌雄ともに、原始生殖細胞がP³²に対して感受性をもつが、精子発生中のものが最も感受性が高いこと(WARREN and DIXON¹⁵⁾)、また生殖腺刺激物質の増量につれて、生殖腺に摂取されるP³²の量が増加すること(BRENEMAN et al.¹¹⁾)からも考えられる。なおセルトリ細胞が強い抵抗性をもつことは、よく知られた事実である。

哺乳動物において認められている精細胞の空胞化現象は、雛および大量投与の成鶏では、ほとんどみられなかった。ただ0.5μc/g投与の成鶏で、マウスほど著明ではないが、投与1カ月後まで空胞化を認めることができた。これも日令による差と考えられる。大量投与の成鶏で認められなかったのは、投与量が過大であったために、精細胞が急激に変性し、破壊されたためであろう。5μc/gは致死量である(本実験例は、斃死直前に屠殺したものであり、松岡

ら⁹⁾によれば、5μc/g投与で雛は80%斃死する)から、精巣に対する影響も急激であったためであろう。

柏原・近藤⁵⁾は、マウスにおけるX線照射実験において、細胞学的に、弱照射では異常分裂を、中照射では核濃縮、核溶解および分裂抑制を、強照射では核固定(分裂停止)および核濃縮を特徴と認めた。WHITE¹⁷⁾やSAX¹⁸⁾も、中照射の特徴は、核濃縮にあるとしている。WARREN and DIXON¹⁶⁾は、P³²の大量投与では、骨髓における細胞分裂の停止や、造血細胞の成熟も停止するという。本研究においても5μc/g投与の成鶏においては、核溶解や核濃縮が比較的多数認められたが、分裂はかえって抑制的であった。この点、哺乳動物およびWARRENらの雛における成績と一致する。

また本例において、精子がほとんど完全に消失していた点は、X線の大量照射がマウスにおける精子発生の後半に強い影響を与えるという柏原・近藤⁵⁾の所見と一致する。しかし、X線の局部照射が、成鶏における精子発生の初期に、とくに著しい影響を与えるという柏原ら⁷⁾の所見とは一致しない。佐伯ら¹²⁾によれば、精液にP³²を加えると、精子はこれを多量に摂取するが、生体に注射すると摂取量は少ない。したがって、P³²注射による精子の消失をP³²の摂取量のみによって説明することは、できないであろう。

成鶏における少量(0.6μc/g)投与では、30日後に回復が始まると考えられる所見を得た。この点は、P³²投与による雛の精巣の障害は回復しにくいというWARREN and DIXON¹⁵⁾の報告とやや異なるが、おそらく投与の方法、投与の時期などによる差であろう。

成鶏において、0.5μc/g投与の1~1.5カ月後に、精巣に種々の異常分裂像を認めた。これは、マウスにおいて、弱照射の破壊期および回復初期に、異常分裂像を認めた柏原・近藤⁵⁾と一致する所見である。しかも異常染色体の種類として、環状染色体や染色体橋などが多くみられることも、マウスの場合と一致する現象である。これらの異常染色体は、正常の精巣にもごく少数は認められる。さらに西田¹⁰⁾によれば、家鴨においても、10月ごろの退行的の、また3~4月の発育あるいは回復中の精巣にも存在する。またSNEIDER¹⁴⁾は、未成熟ラットや猫の卵巢で認めている。したがって、これらの染色体異常は、必ずしも退行中のもののみ出現するとは考えられない

が、一般的には、退行期または回復期に多出するといえるであろう。

これらの異常染色体の形成機構については、BUTLER and SMITH²⁾ は、染色体の物理・化学的变化、とくに核酸の変化に起因するであろうといい、柏原もこれを支持しているが、本実験のみでは、この点についての論議はできない。本実験では、単極分裂は認められず、3極分裂らしい像はあったが、明らかな紡錘糸はみられなかった。これは柏原らのマウス、西田の家鴨その他についての報告と異なる点である。

0.5 μ c/g 投与した成鶏で2カ月後までの精巣に巨大精細胞を認めたことは、柏原・近藤⁵⁾がX線の弱い中照射マウスにおいて、また西田¹⁰⁾が家鴨において、認めたことと一致している。投与4カ月後には精巣はほぼ回復を完了しているが、なお正常の精細管の間に、セルトリ様細胞のみからなり、腔内に多数の精子をもつ精細管が混在していた。このようなものの成因は、本実験のみでは不明であるが、吉田¹⁸⁾は、同様の現象を、換羽回復期の成鶏の精巣で報告している。

要 約

白色レグホーン種の雄雛および成鶏において、P³²を0.5~10 μ c/g 腹腔内に注射し、精巣に及ぼす影響を組織学的・細胞学的に観察して、次のような結果を得た。

1) 雛においては、本実験の範囲内では、精巣の發育遅延をきたすが、精細胞に対する破壊作用は認められなかった。

2) 成鶏においては、5 μ c/g 投与は致死的で、精巣は明らかに萎縮した。精細管の口径は退縮し、精上皮の細胞配列は不規則で、細胞の境界は不明瞭となった。精子も、精子細胞もほとんど消失し、管腔は変性した細胞で充満していた。しかし精細胞の空胞変性像はほとんど認められず、核溶解、核濃縮様変化が比較的多く観察され、分裂像は少なかった。

3) 成鶏に0.6 μ c/gを投与して30日後に観察すると、精細管は萎縮し、大部分は、精祖細胞およびセルトリ様細胞からなる単層の上皮を有していたが、一部の精細管では、第II精母細胞の分裂像も認められ、上皮は数層ないし十数層をなし、回復しつつありと考えられる像があった。

4) 成鶏に0.5 μ c/gを投与すると、10日後に精

子は消失し、精上皮は破壊されて単層となり、管腔内に細胞破砕物が存在し、精祖細胞の分裂はまれであった。投与20日後には、残存精祖細胞に分裂像が認められた。

5) 成鶏では、0.5 μ c/g 投与後1~1.5カ月ごろまで、精巣に、環状、馬蹄型、染色体橋、染色体の遅滞、分断増数などの染色体異常が認められたが、時間の経過とともに減少した。そのほか核濃縮、投与後2カ月までの精巣では、巨大細胞、1カ月ぐらいいまでは精細胞の空胞化がみられた。空胞化は2カ月以後にはまれであった。

6) 投与4カ月後には、精細管上皮はほぼ正常に近く回復した。1例において、精子形成の盛んな精細管にまじって、上皮がセルトリ様細胞のみからなり、内腔に多数の精子を有する精細管が存在した。

本研究の一部は文部省科学（総合）研究費の補助によった。記して謝意を表する。

文 献

- 1) BRENNEMAN, W. R., ZELLER, F. J. and CREEK, R. O. (1962): *Endocrinol.*, **71**, 790~798.
- 2) BUTLER, J. A. V. and SMITH, K. A. (1950): *Nature*, **165**, 714.
- 3) 柏原, 近藤 (1954): 日畜会報, **24**, 184~186.
- 4) 柏原, 近藤 (1954): 日畜会報, **25**, 14~18.
- 5) 柏原, 近藤 (1954): 日畜会報, **25**, 19~24.
- 6) KASHIWABARA, T., TANAKA, R., MASUI, S. and EZAKI, K. (1958): *Sci. Rep. Fac. Agr., Ibaraki Univ.*, **6**, 139~141.
- 7) 柏原, 田中, 飯田 (1958): 家畜繁殖誌, **4**, 57~59.
- 8) 松岡, 池田, 大久保 (1958): 日獣学誌, **20**, 151~157.
- 9) 松岡, 池田, 大久保 (1958): 日獣学誌, **20**, 241~251.
- 10) 西田 (1953): 日畜会報, **23**, 186~189.
- 11) 西田, 望月, 塩田 (1960): 家畜繁殖誌, **6**, 91~92.
- 12) 佐伯, 葛城, 田名部 (1958): 農技研報, G-15, 65~68.
- 13) SAX, K. (1940): *Genetics*, **25**, 41~68.
- 14) SNEIDER, M. E. (1940): *Amer. J. Anat.*, **67**, 471~499.

- 15) WARREN, S. and DIXON, F. J. (1949): *Radiol.*, **52**, 714~729.
16) WARREN, S. and DIXON, F. J. (1949): *Radiol.*, **52**, 869~880.
17) WHITE, M. T. D. (1935): *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, **119**, 61~84.
18) 吉田 (1934): 日畜会報, **7**, 183~208.

EFFECTS OF P³² UPON THE TESTIS OF FOWL

Shiichi NISHIDA, Koshi MOCHIZUKI and Toshiro SHIODA

Department of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, University of Tokyo

(Received for Publication July, 10, 1963)

The effects of P³²-administration upon the testis of fowl were studied histologically and cytologically. In this study, immature and adult White Leghorn chickens were exposed to irradiation by intraperitoneal injection of P³² (doses: 0.5–10 μ C/g). The results obtained are summarized as follows.

1) With the doses and intervals used in the present study, there was a delay in germ cell differentiation, but germ cells suffered no significant destructive effect in the immature birds.

2) Administration of a dose of 5 μ C/g seemed to have a lethal effect on an adult bird, which showed a significant decrease in size of the testis. Histologically, the tubules decreased in diameter, the germ cells became irregular in arrangement, and the spermatozoa and spermatids disappeared nearly completely. No vacuolization was observed in the germ cells and mitotic figures were rare. On the contrary, comparatively numerous karyolytic and pyknotic figures were present.

3) In adult chickens, some tubules of the testis decreased in diameter on the 30th day after injection of P³² (0.6 μ C/g). In such tubules, almost all germinal epithelia were of a single layer, consisting of spermatogonia and Sertoli cells only. Some other tubules, however, had stratified germinal epithelia containing mitotic secondary spermatocytes. These findings were considered as recovering evidence.

4) In adult chickens, when observed 10 days after administration of 0.5 μ C/g of P³², the germinal epithelium was a single-layered one. Mitotic cells were very few among the spermatogonia. The lumina of the tubules were filled with cell remnants. On the 20th day after administration, however, mitosis appeared among the spermatogonia.

5) In adult chickens injected with 0.5 μ C/g of P³², many abnormal mitotic figures were observed in the testes during 30 or 45 days after injection. These figures decreased in number with the lapse of time after injection. In those chickens, giant cells appeared in the testes by the end of the 2nd month and vacuolization in germ cells within 1 month after injection. These facts indicate that there are age differences and dose differences in the testis response of chickens to P³²-injection.

6) By the end of the 4th month after injection, germinal epithelia had recovered nearly completely. In one of the chickens showing such recovery, some tubules consisting of Sertoli-like cells alone and containing numerous spermatozoa in their lumina were observed among normal tubules.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1. Testis of a chick, 23 days after injection (dose $4\mu\text{C/g}$). Seminiferous tubules are small in diameter. The germinal epithelium consists of elongate undifferentiated cells alone. $\times 400$.
- Fig. 2. Testis of an untreated control chicken 63 days old. Seminiferous tubules are large in diameter. Many mitotic figures are seen in the germinal epithelium. $\times 400$.
- Fig. 3. Testis of an adult normal control bird, obtained by biopsy 3 days before P^{32} -injection. Seminiferous tubules are very large in diameter. Many mitotic figures and spermatozoa are seen. $\times 200$.
- Fig. 4. Testis of the same bird as in Fig. 3, 10 days after injection ($5\mu\text{C/g}$). Tubules have decreased in diameter. Spermatozoa or spermatids cannot be found. Cell fragments are seen in the tubules. Basement membrane has become thick. $\times 200$.
- Fig. 5. Testis of an adult chicken 30 days after injection ($0.6\mu\text{C/g}$). Recovering tubules with mitotic figures of secondary spermatocytes are present among degenerated tubules. $\times 200$.
- Figs. 6-10. Testes of adult chickens 1 or 1.5 months after injection ($0.5\mu\text{C/g}$). Abnormal mitotic figures and vacuoles are seen. $\times 900$.
- Fig. 6. 1.5 months after injection. Ring-and bridge-type abnormal chromosome are seen.
- Fig. 7. 1 month. Bridge-type chromosomes and vacuoles are seen.
- Fig. 8. 1.5 months. Delayed-type chromosomes are seen.
- Fig. 9. 1 month. Fragmentation-type chromosomes and vacuoles are seen.
- Fig. 10. 1.5 months. U-shaped chromosomes are seen.
- Fig. 11. Testis of an adult bird 2 months after injection ($0.5\mu\text{C/g}$). Tripolar-mitosis-like figure is seen, but no spindle fibers can be recognized. $\times 400$.
- Fig. 12. Testis of an adult bird 4 months after injection ($0.5\mu\text{C/g}$). Among normal seminiferous tubules, there are some tubules which have an epithelium consisting of Sertoli cells alone and contain many spermatozoa in the lumen. $\times 900$.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

Fig. 12