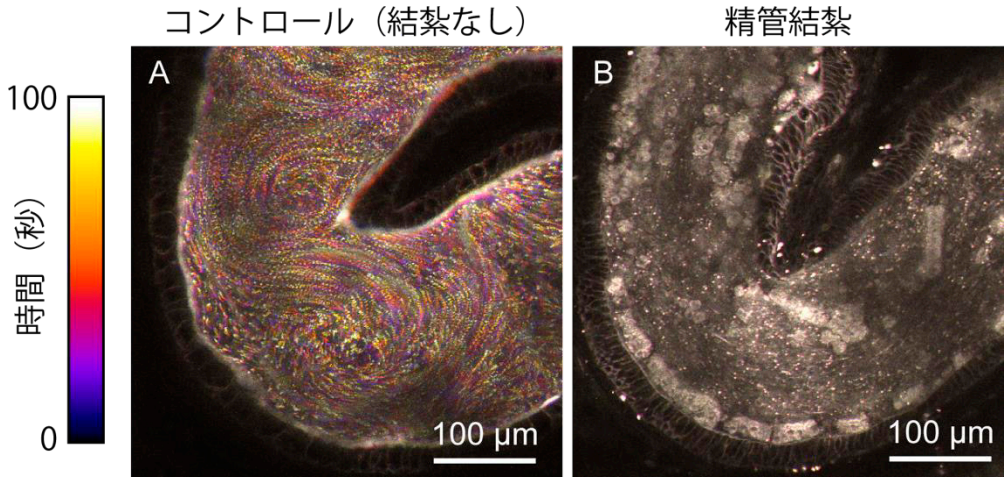
148　精巣上体炎における精子の*in vivo*イメージング	平島　剛志

【目的】精巣上体は、未熟な精子が受精能を獲得する生殖器官である。精巣から運ばれる精子は、精巣上体内部に位置する上皮管腔（精巣上体細管）中を輸送され、精巣上体尾部に到達するまでに、上皮から分泌される様々な化学因子に暴露されることで受精能を獲得する。精巣上体の炎症は、男性不妊の原因のひとつと考えられている。精巣上体炎は、微生物などが尿道から精管を上行し精巣上体に到達することで引き起こされるものや、軽度の精管捻転に起因するものがある。いずれの場合においても、精巣上体炎は受精能獲得過程における精子に影響を与えると考えられているが、これまでに精巣上体細管中の精子の振る舞いに関する観察報告はなく、精巣上体炎が精子の運動に与える影響は未解明である。

【方法】はじめに、蛍光レポーターマウスの作出を行った。精子及び精巣上体細管を標識する蛍光レポーターマウス（Pax2-Lyn-Venus）を作出した。次に、二光子顕微鏡によるマウス精巣上体の *in vivo* イメージング法を確立した。麻酔の程度や体温保持、また、体動による撮像ブレを防ぐために両脚を粘着テープで固定するなどの工夫により、倒立顕微鏡下で数時間の安定したライブイメージング技術を確立することができた。精巣上体炎の誘導法については、1. グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である lipopolysaccharide（LPS）の投与、2. 精巣上体体部もしくは精管の結紮の 2 種類の方法を検討した。検討の結果、2. の精巣上体体部もしくは精管の結紮を本研究では用いることとした。全ての実験には、12 週齢から 24 週齢までのオスマウスを使用した。

【結果】精巣上体体部を結紮した個体については、コントロールと比べてわずかに精子の運動速度（精子集団の流速）が増加したものの顕著な違いは認められなかった。一方で、精管結紮した個体については、精巣上体細管および精子運動に関しコントロールと比べて顕著な差が認められた。精巣上体細管については、結紮による管の太さへの影響は認められないものの、精巣上体細管を構成する上皮細胞のアピカルーベーサル軸に直交する断面を観察したところ、細胞の大きさが著しく減少していることが明らかとなった。また、精巣上体細管内腔の精子運動への影響については、コントロール群では精子集団が管腔部に精子が多数存在し渦を巻くように運動していたが、結紮群では精子の数は少なく運動は認められなかった（下図）。また、管腔内の上皮に接した領域で脱落した細胞が認められた。これらの結果から、精管結紮によって、精巣上体細管中に存在する精子数は減少し精子運動は著しく抑制されることが明らかとなった。

精管結紮による精巣上体細管及び管内の精子運動への影響



148. 精巣上体炎における精子の *in vivo* イメージング

平島　剛志

京都大学 大学院医学研究科 病態生物医学分野

Key words：*in vivo* イメージング，精巣上体，精子運動

緒　言

精巣上体は、未熟な精子が受精能を獲得する生殖器官である。精巣から運ばれる精子は、精巣上体内部に位置する上皮管腔（精巣上体細管）中を輸送され、精巣上体尾部に到達するまでに上皮から分泌される様々な化学因子に暴露されることで受精能を獲得する［1］。

精巣上体の炎症は、男性不妊の原因のひとつと考えられている。精巣上体炎は、微生物などが尿道から精管を上行し精巣上体に到達することで引き起こされるものや、軽度の精管捻転に起因するものがある［1］。いずれの場合においても、精巣上体炎は精子の受精能獲得過程に影響を与えると考えられるが、これまでに生体、特に精巣上体細管中の精子の振る舞いに関する観察報告はなく、精巣上体炎が精子の運動に与える影響は不明である。本研究では、精巣上体炎を誘発したマウスを用いて、精巣上体における精子および精巣上体細管を生きた状態で顕微鏡観察（*in vivo* イメージング）し、正常時と病態時の精子ダイナミクスを比較することで、運動学的側面から精巣上体炎における生殖機能不全の理解を深めることを目的とした。

はじめに、精子と精巣上体細管を蛍光標識するレポーターマウスを作出し、マウス麻酔下での精巣上体イメージング法を確立した。精管結紮による精巣上体尾部の炎症誘発の結果、精巣上体細管中の精子数の減少と精子運動の阻害をライブイメージングにより明らかにした。

方法および結果

1.　蛍光レポーターマウスの作出

精子及び精巣上体細管の蛍光レポーターマウスとして、Pax2 のプロモーター下流で DNA 組換え酵素 Cre が発現するマウス系統 Pax2-Cre［2］と Cre 特異的に組換え反応が起こり細胞膜に蛍光タンパク質 Venus が局在するマウス系統 R26R-Lyn-Venus［3］を掛け合わせ、新たに蛍光レポーターマウス（Pax2-Lyn-Venus）を作出した。Pax2-Lyn-Venus マウスの精巣上体尾部から無作為に精子を取り出し、Venus シグナルの局在を調べたところ、300 標本中すべての標本で精子体部と尾部が標識されていた（図 1）。また、無作為に取り出した精子標本中のおよそ 1 割（27／300）は精子頭部まで標識されていたが、それ以外のほとんどの精子では頭部の蛍光標識は確認されなかった（図 1）。また、 精巣上体細管の上皮細胞も蛍光標識されることがわかった。

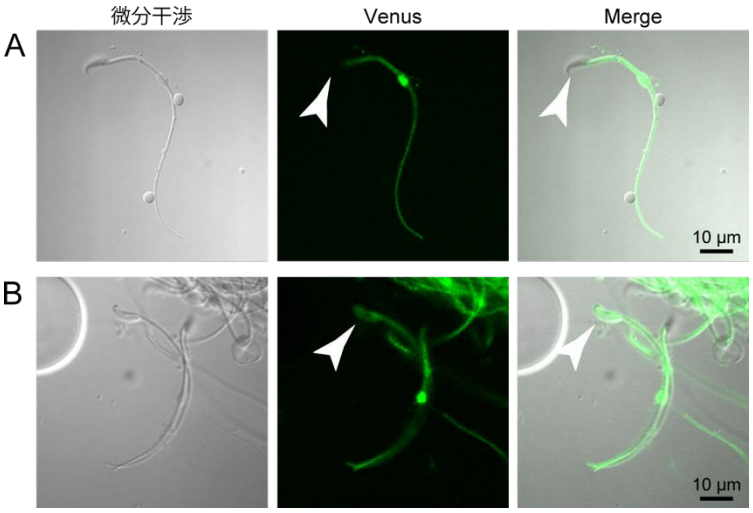


図 1. Pax2-Lyn-Venus マウスの精子における Venus シグナルの局在

Pax2-Lyn-Venus マウスの精巣上体尾部から取り出した精子。左列は微分干渉像、中央列は Venus 蛍光像、右列はマージ像。矢頭は精子頭部を示す。精子の体部と尾部が Venus 標識されている。

A) 頭部が蛍光標識されていない精子。

B) 頭部が蛍光標識されている精子。

スケールバー：10 μm。

2. 二光子顕微鏡によるマウス精巣上体の *in vivo* イメージング法

生きた状態でマウスの深部組織をライブイメージングするために、イソフルラン麻酔下でマウスを顕微鏡ステージに静置し、倒立型二光子顕微鏡（IX83、Olympus）システムにて Pax2-Lyn-Venus マウスの精巣上体を撮像した（図 2）。麻酔の程度や体温保持、また、体動による撮像ブレを防ぐために両脚を粘着テープで固定することなどの工夫により、数時間の安定したライブイメージング技術を確立することができた。

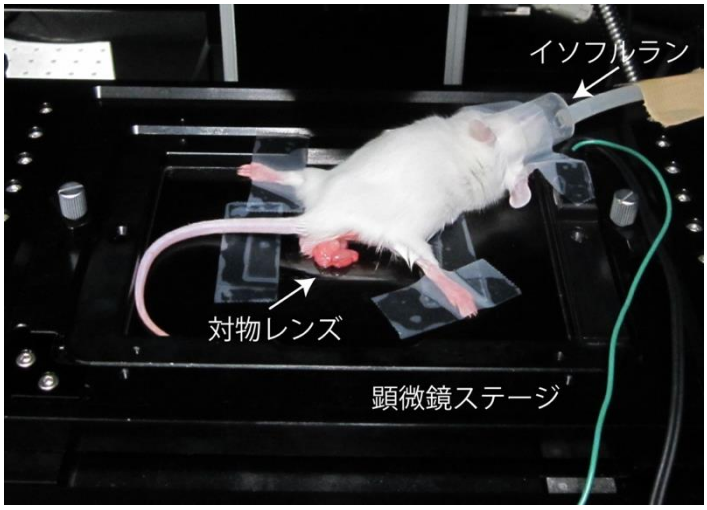


図 2. マウス精巣上体の *in vivo* イメージング

Pax2-Lyn-Venus マウスをイソフルラン麻酔下で顕微鏡ステージに静置し、倒立型二光子顕微鏡（IX83、Olympus）システムにて精巣上体を撮像。体動による撮像ブレを防ぐために両脚を粘着テープで固定した。

3.　精巣上体炎の誘導

精巣上体炎の誘導は、1）グラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分である lipopolysaccharide（LPS）の投与、2）精巣上体体部もしくは精管の結紮の 2 種類の方法を検討した。実験には、12 週齢から 24 週齢までの C57BL/6 オスマウスを用いて実験を行った。いずれの実験もイソフルラン（導入 5%、維持 3%）を用いて吸入麻酔下で行った。

1）LPS 投与

精管側から精巣上体に 1 mg/mL の LPS 溶液（超純水 100 μL に対し LPS 100 μg を溶解）を投与し、7 日後に精巣上体を摘出した。精巣上体が全体的に白濁し一部組織が壊死していたため、本研究の目的には不適切であると結論づけた。

2）結紮

片側の精巣上体の体部もしくは精管を縫合糸で強く結紮し、もう片側の精巣上体の対応箇所には縫合糸を取り巻くようにくくり付け（非結紮、コントロール）、7 日後に精巣上体を摘出した。精巣上体体部もしくは精管いずれの場合においても、軽度の急性精巣上体炎が引き起こされていため、結紮による精巣上体炎の誘導法を用いることとした。

4.　結紮による精巣上体細管上皮および精子への影響

12 週齢から 24 週齢までの Pax2-Lyn-Venus マウスに対し上述した結紮処置を行い、精巣上体尾部の *in vivo* イメージングを行った。精巣上体体部を結紮した個体については、結紮による精巣上体細管への影響はコントロールと比べてほとんど認められなかった。精子運動に関しては、精巣上体体部の結紮によりわずかに精子の運動速度（精子集団の流速）が増加した。

一方で、精管結紮した個体については、精巣上体細管および精子運動に関しコントロールと比べて顕著な差が認められた。精巣上体細管については、結紮による管の太さへの影響は認められないものの、精巣上体細管を構成する上皮細胞のアピカルーベーサル軸に直交する断面を観察したところ、細胞の大きさが著しく減少していることが明らかとなった（図 3）。また、Second harmonic generation イメージングを用いることで、精管結紮によりコラーゲンなどの繊維性の細胞外マトリックス量が増加することがわかった。

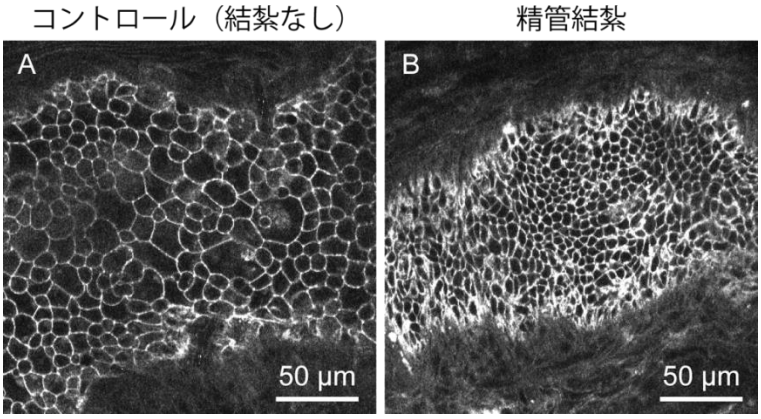


図 3. 精管結紮による精巣上体細管上皮の形態への影響

Pax2-Lyn-Venus マウスの精巣上体細管（尾部）における Venus シグナル像。精巣上体細管を構成する上皮細胞のアピカルーベーサル軸に直交する断面像。

A)　非結紮（コントロール）した精巣上体細管上皮。

B)　精管結紮した精巣上体細管上皮。非結紮に比べて精管結紮した精巣上体細管上皮では細胞が小さい。

スケールバー：50 μm。

次に、精管結紮による精巣上体細管内腔の精子運動への影響を調べた。コントロール群では、精子集団が管腔部に精子が多数存在し、渦を巻くように運動していたが、結紮群では精子の数は少なく運動は認められなかった（図 4）。また、管腔内の上皮に接した領域で脱落した細胞が認められた。これにより、精管結紮により、精巣上体細管中に存在する精子の数や運動は著しく抑制されることが明らかとなった。

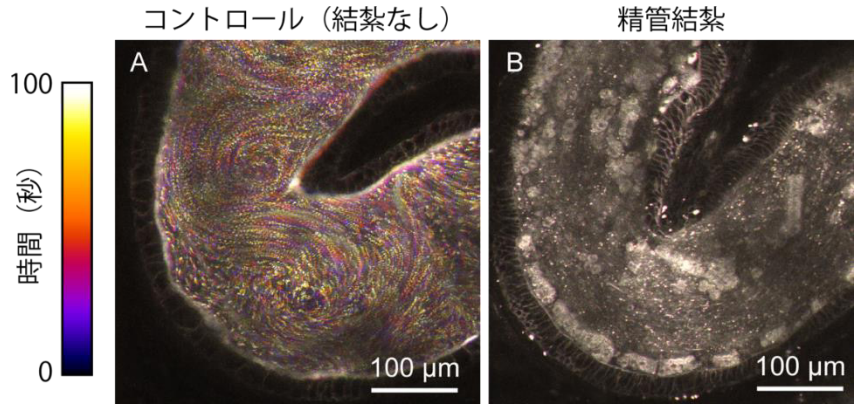


図 4. 精管結紮による精巣上体細管内での精子運動への影響

Pax2-Lyn-Venus マウスの精巣上体細管（尾部）における Venus シグナル像を異なる時間で色分けし投影した（時間投影像）。精巣上体細管の中央断面像。

A) 非結紮（コントロール）した精巣上体細管の中央断面。管腔部に精子が多数存在し、渦を巻くように運動している。

B) 精管結紮した精巣上体細管の中央断面。管腔内の上皮に接した領域で脱落した細胞が認められる。また、内部に存在する精子の数は少なく運動は認められない。

スケールバー：100 μm。

考　察

本研究では、精管結紮による精巣上体尾部の炎症誘発の結果、精巣上体細管中の精子数の減少と精子運動の阻害を *in vivo* ライブイメージングにより明らかにした。慣習的な病理学では静的な情報を取り扱うことが多い。すなわち、たとえば精巣上体炎などの病態時に伴う細胞や組織形態の異常を化学固定条件下で調べる場合がほとんどである。本研究では、マウスの *in vivo* ライブイメージングを行うことで、病態時の細胞や組織のダイナミクスを調べることができ、病理学分野におけるダイナミクスの重要性を示すことに貢献するものと考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科大学人体構造学講座の伊藤正裕教授である。伊藤教授と同教室の表原拓也助教には、マウス精管の結紮法や解剖学的知見を教授していただいた。また、本研究のイメージング実験には、京都大学医学支援センター蛍光生体イメージング室の共通機器を利用した。記して謝意を表す。

文　献

1) B. Robaire, B. T. Hinton, in Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Elsevier, pp. 691–771, 2015. ISBN: 978-0-12-397175-3 , DOI: 10.1016/C2011-1-07288-0

2) T. Ohyama, A. K. Groves, Generation of Pax2-Cre Mice by Modification of a Pax2 Bacterial Artificial Chromosome. Genesis. 38, pp. 195–199, 2004. PMID: 15083520, DOI: 10.1002/gene.20017

3) T. Abe et al., Establishment of conditional reporter mouse lines at ROSA26 locus for live cell imaging. Genesis. 49, pp. 579–590, 2011. PMID: 21445964, DOI: 10.1002/dvg.20753