

V. 分担研究者・研究協力者の報告書

9. 雄ラットの発育に伴うビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

分担研究者 渡邊 敏明 姫路工業大学 教授

研究要旨 Vitamin B₁₂ is an important nutrient for maintaining normal fertility in males. We have previously demonstrated that vitamin B₁₂ deficiency during pregnancy may induce irreversible damage in the germ cells of rat embryos, and affect the maturation of spermatozoon. However, its mechanism and biological significance remain unclear. Therefore, to evaluate the role of cobalamin on spermatogenesis, the effect of dietary vitamin B₁₂ deficiency on early spermatogenesis was examined in embryos and F1 males. There was no difference in the number of primordial germ cells and supporting cells in embryos and F1 males on 0 day of age between vitamin B₁₂-deficient and control groups. However, on 21 days of age, numerous TUNEL positive cells were located in spermatocytes of the spermatogenic epithelium. The incidence of seminiferous tubules with apoptosis was 51.5% in the vitamin B₁₂-deficient group. On 60 days of age, aplasia of spermatids and sperms were detected in the vitamin B₁₂-deficient group. Spermatogenesis in F1 males was not sufficiently recovered in the vitamin B₁₂-deficient group even if the control diet was given after weaning. From these findings, vitamin B₁₂ deficiency during pregnant and lactating period may affect the germ cells, and especially damage spermatocytes in F1 male rats, which indicate that vitamin B₁₂ may be an essential constituent in meiosis of spermatogenesis.

A. はじめに

ビタミン B₁₂ は、メチオニン合成酵素やメチルマロニル CoA ムターゼの補酵素として知られている。ビタミン B₁₂ の生理機能としては、骨髄における細胞の分化や中枢神経の維持などにおいて重要な役割を果たしている。とくにビタミン B₁₂ は、DNA 合成に不可欠である葉酸の代謝と深く関わりを持っている。このためビタミン B₁₂ が欠乏すると、ホモシステインが上昇し、神経系や血管系に影響を及ぼすことが示唆されている。

ビタミンB₁₂の欠乏症状としては、貧血によるめまい、動悸、息切れ、易疲労性、集中力減退、全身倦怠感などの他に、舌炎、口内炎、脱毛などが知られている。また血液学的には、DNA合成が抑制されて、赤血球細胞の分裂が進行しないため、骨髄では巨赤芽球が特徴的に認められる。近年、乏精子症患者にビタミンB₁₂の大量投与を行うと精子形成の改善がみられ、妊娠が認められることが報告されている^{1),2)}。しかし、この詳細な機序については明らかにされていない。

著者ら^{3),4)}は、これまでに実験動物を用いて、妊娠中ビタミンB₁₂欠乏にすると、出産児において、成熟後精子の数および運動能の低下、精子の形態異常の増加することを明らかにした。そこで、今回はビタミンB₁₂欠乏状態の

精子形成に及ぼす影響を、胎生期から成熟までの発育段階において検討した。

B. 実験方法

1. 材料および実験方法

実験に供したのは、成熟雌ラット (kwl:Wistar)であり、室温23℃、相対湿度60%の動物飼育室で飼育した。交配3週間前からビタミンB₁₂欠乏飼料（欠乏群）、ビタミンB₁₂添加飼料(添加群)あるいは一般固形飼料（CRF-1）（対照群）を与え、正常雄ラットと交配させた。実験群の設定およびサンプルの採取などは、図1に示したとおりである。妊娠動物から妊娠16日齢の雄胎児、生後0日齢、21日齢および60日齢に雄ラットF1児を得た。なお、生後21日齢から、F1児の一部に、欠乏群では添加飼料（欠乏-添加群）を、また添加群では欠乏飼料（添加-欠乏群）を与えた。これらの動物から精巣を摘出し、精細管の発育および精子形成の様子を病理組織学および免疫組織化学的に観察した。使用したビタミンB₁₂欠乏飼料の組成は、表1のとおりである。また、妊娠16日齢胎児の雌雄は、性染色質の有無によって判定した。なお、動物実験は、すべて山形大学医学部動物実験指針に従って行った。

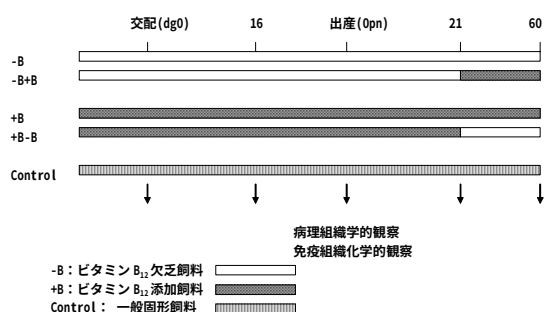


図1. 実験手順

表1. ビタミンB₁₂欠乏飼料

組成	g/kg飼料
脱脂大豆 ^a	400
グルコース	443
大豆油	100
無機塩混合物	50
ビタミン混合物 ^b	5
塩化コリン	2

^a粗タンパク質約50%

^bシアノコバラミンを除去

ビタミンB₁₂添加飼料:シアノコバラミン5μg/kg飼料を添加。

2. 組織学的観察

摘出した精巣は、常法に従い、ブアン固定、脱水、パラフィン包埋の後、4μm厚の切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンにて染色をした。精細管の直径、管壁の厚さなどを計測した。パラフィン切片の一部は、必要に応じて、TUNEL染色をして、DNA切断による細胞死を検出した。

3. 統計学的解析

得られたデータの統計学的解析については、スチューデントt検定およびχ²検定によってビタミンB₁₂添加群と欠乏群とを比較した。またデータの解析には統計ソフトStatView 5.5 (Abacus Concepts社)を用いた。

C. 結果

妊娠16日齢の雄胎児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の影響をみると、生殖巣の形成および始原生殖細胞の増殖に変化は観察されなかった。また、生後0日齢のF₁児においては、ビタミンB₁₂欠乏によって、精細管の発育および精細管にみられる始原生殖細胞や支持細胞(セルトリ細胞)の数に差異はみられな

った。

表2は、生後21日齢のラットF₁児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響をまとめたものである。離乳直後の未成熟なF₁児においては、ビタミンB₁₂添加群では、分裂中期像をもつ精子産生細胞(精原細胞および精母細胞)が多数観察され、減数分裂の開始も認められた。一方、ビタミンB₁₂欠乏群では、精細管の発育の抑制がみられ、精原細胞は半数以

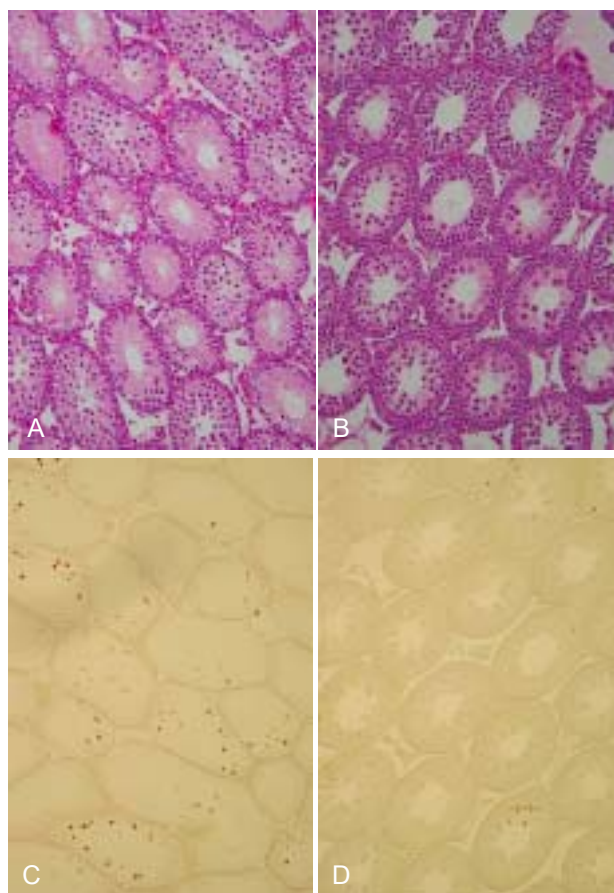


図2. 生後21日齢のF₁ラットの精巣の病理組織像

- A: ビタミンB₁₂欠乏(HE染色)
- B: ビタミンB₁₂添加(HE染色)
- C: ビタミンB₁₂欠乏(TUNEL染色)
- D: ビタミンB₁₂添加(TUNEL染色)

表2 生後21日齢のラットF1児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

	ビタミンB ₁₂ 欠乏群	ビタミンB ₁₂ 添加群	対照群
分析した精細管数	20	20	20
精細管の直径(μm)	110.7±5.95 ^{a,*}	128.5±7.31	129.3±5.52
精子産生細胞数	73.2±10.7 [*]	172.0±16.9	164.4±21.0
アポトーシス率(%) ^b	51.5(35/68) [#]	4.2(3/70)	6.4(7/109)

平均値±標準偏差（精細管あたり）。

アポトーシスを持つ精細管の割合。

^{*}p<0.01, [#]p<0.01（ビタミンB₁₂添加群との比較）。

表3 生後60日齢のラットF1児におけるビタミンB₁₂欠乏状態の精子形成に及ぼす影響

	ビタミンB ₁₂ 欠乏群	ビタミンB ₁₂ 添加群	対照群
分析した精細管数	20	20	20
精細管の直径(μm)	141.4±11.9 ^{a,*}	293.0±19.7 [#]	282.0±17.0 [#]
細胞層(μm)	23.0±9.7 [*]	78.0±11.1 [#]	66.8±12.5 ^{*,#}
精子産生細胞数	64.6±15.9 [*]	336.4±79.2 [#]	352.8±70.16 ^{#4}

欠乏-添加群	添加-欠乏群
20	20
162.2±17.4 ^{*,#}	289.8±20.3 [#]
40.5±21.6 ^{*,#}	64.8±10.7 ^{*,#}
133.4±69.2 ^{*,#}	331.6±83.3 ^{#*}

^a平均値±標準偏差（精細管あたり）。
^{*}p<0.01（ビタミンB₁₂添加群との比較）。
[#]p<0.01（ビタミンB₁₂欠乏群との比較）。

下に減少し、精母細胞はほとんど認められなかった。また精母細胞には、核が濃染された細胞が高率(精細管の51.5%)に観察された。これらは、図2に示すとおり、TUNEL染色によって陽性を示し、アポトーシスによるものであることが明らかになった。

生後60日齢の成熟ラットF1児においては、ビタミンB₁₂添加群では、精細管に多数の精原細胞、精母細胞および成熟精子が認められた(表3)。一方、ビタミンB₁₂欠乏群では、精細管が顕著に萎縮し、精細管に成熟精子は

まったく観察されなかった。また、精母細胞もほとんど認められなかった。ビタミンB₁₂欠乏飼料を与えていたF1児に、生後21日後からビタミンB₁₂添加飼料を与えたが、生後60日までに、精細管の発育や精子産成細胞の増殖に十分な回復はみられなかった。一方、生後21日後から、ビタミンB₁₂欠乏飼料を与えても、生殖器官や精子形成への影響は観察されなかった。

D. 考察

精子形成過程に及ぼす因子として栄養、ホルモンや温度などが明らかにされている。微量栄養素としては、ビタミンA、E、あるいはB群ビタミンが欠乏すると精子形成が障害されることが知られている。B群ビタミンについては、乏精子症を合併した悪性貧血患者にビタミンB₁₂を投与すると、貧血の正常化とともに、精液所見の改善がみられることから、ビタミンB₁₂が乏精子症の治療に用いられている⁵⁾。しかしながら、その詳細な機序については明らかにされていない。

実験動物においては、これまでに、Kawataら^{6),7)}が、ビタミンB₁₂欠乏ラットにおいて、精細管の萎縮に伴って、精子産生細胞の脱落を観察している。著者ら³⁾の観察では、妊娠前から妊娠期間をとおしてビタミンB₁₂欠乏状態にすると、出産児においては、成熟しても生殖器官の発育が著しく抑制され、精巣上体にはほとんど精子が観察されなかった。また、これらの精子については、生存率および運動能の著しい低下がみられ、精子の形態異常が高率にみられた。今回の結果では、生後21日齢においては、ビタミンB₁₂欠乏群では精原細胞の増殖はみられたが、精母細胞に多数のアポトーシスが認められた。このことが、ビタミンB₁₂欠乏状態における精子形成障害と関連があるものと考えられる。また、これらの結果では、離乳後に、栄養生理学的、つまり通常量(5μg/kg飼料)のビタミンB₁₂を含む添加飼料を与えても精子形成の回復は認められなかった。しかしながら、薬理学的な大量のビタミンB₁₂を与えると、ヒトと同じように精子形成の回復がみられるのかもしれない。

以上より、妊娠前からビタミンB₁₂欠乏状態にすると、雄ラットにおいては、精母細胞にアポトーシスによる細胞死がされた。つまり、ビタミンB₁₂欠乏状態では、精母細胞の減少などが主な原因とみられる精子形成障害の誘発されることが明らかになった。このことは、ビタミンB₁₂が、精子形成、とくに精母細胞の分裂に不可欠な栄養因子であることを示唆している。

E. 結論

1)母体のビタミンB₁₂欠乏によって、胎児および生後0日齢のF1児において、生殖細胞への影響はみられなかった。

2)生後21日齢のF1児では、ビタミンB₁₂欠乏によって、精原細胞の増殖はみられたが、精母細胞が著しく減少し、精母細胞に多数のアポトーシスが認められた。

3)生後60日齢のビタミンB₁₂欠乏F1児では、精細管に精母細胞および成熟精子は全くみられなかった。

4)ビタミンB₁₂は精子形成に不可欠であり、とくに精母細胞の分裂や精子の成熟に関与していることが示唆された。

F. 文献

- 1) Watson, A.A. (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii: 644.
- 2) Sharp, A.A. and L.J. Witts (1962) Seminal vitamin B₁₂ and sterility. *Lancet* ii: 779.
- 3) 山川めぐみ, 渡辺敏明, 渡辺皓, 榎原周平, 中野長久 (2000) ビタミンB₁₂欠乏によるラット精巣の形態学的変化. *微量研* 17: 75-82.
- 4) Watanabe, T., K. Ohkawa, S. Kasai, S. Ebara, Y. Nakano, and Y. Watanabe (2003) The effects of dietary vitamin B₁₂ deficiency on sperm maturation in developing and growing male rats. *Congenital Anom.* 43: 57-64.
- 5) 渡辺敏明, 島田和彦, 大川恵子 (2001) 乏精子症におけるビタミンB₁₂の効果についての評価. *ビタミン* 75: 128-131.
- 6) Kawata, T., T. Takada, F. Morimoto, N. Fujimoto, N. Tanaka, K. Yamada, M. Wada, T. Tadokoro and A. Maekawa (1992) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testes tissue in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 38: 305-316.
- 7) Kawata, T., A. Tamiki, A. Tahiro, K. Suga, S. Kamioka, K. Yamada, N. Wada, N. Tanaka, T. Tadokoro and A. Maekawa (1997) Effect of vitamin B₁₂-deficiency on testicular tissue in rats fed by pair-feeding. *Res. J. Vit. Nutr. Int.* 67: 17-21.