

氏 名 (国籍)	CRUZANA, Maria Bella Chavez (フィリピン共和国)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第144号
学 位 授 与 年 月 日	平成16年3月15日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学
学 位 論 文 題 目	Lectin-histochemical and Immunohistochemical Studies on Glycoconjugates, Cytoskeletal Proteins, Regulatory Factors, Steroidogenic Enzymes and Steroid Receptors in the Testis of the Swamp-type Water Buffalo (<i>Bubalus bubalis</i>) (フィリピン水牛 (<i>Bubalus bubalis</i>) 精巣における 複合糖質, 細胞骨格タンパク, 制御因子, ステロイ ド合成酵素およびステロイド受容体に関するレクチ ン組織化学的および免疫組織化学的研究)
審 査 委 員	主査 帯広畜産大学 教授 山 田 純 三 副査 帯広畜産大学 教授 三 宅 陽 一 副査 岩 手 大 学 教 授 谷 口 和 之 副査 東京農工大学 教 授 田 谷 一 善 副査 岐 阜 大 学 教 授 坪 田 敏 男

論 文 の 内 容 の 要 旨

水牛は、フィリピンを含む東南アジアの多くの国で重要な家畜であるが、その繁殖に重要な精巣の制御因子について組織化学的および免疫組織化学的研究はほとんどなされていない。そこで、フィリピン水牛の精巣を用いて、基本構造を組織学的および組織化学的に、複合糖質をレクチン組織化学的に、細胞骨格タンパク、各種制御因子、ステロイド合成酵素およびステロイド受容体を免疫組織化学的に研究を行い、これらの基礎的データをまとめることによって、フィリピン水牛（以下、水牛と略記する。）精巣の形態学的特徴を明らかにし、それらに考察を加えた。

フィリピン水牛精巣の組織学的構造は牛のそれと類似しており、フィリピン水牛の精上皮周期 (seminiferous epithelial cycle, SEC) が牛と同様な 8 つのステージであることを初めて確認し、以下の研究の基礎的資料とした。

レクチンは、複合糖質の糖鎖と特異的な結合親和性を持つ蛋白である。レクチン組織化学は、細胞分化や細胞間相互作用を検索するための有益な方法である。本研究では、性成熟に達した水牛の精巣における精子発生過程と糖鎖の発現様式との関係を明らかにするために、レクチン組織化学的方法を用いて水牛精巣を検索した。レクチンは主に精子細胞とセルトリ細胞においてステージ依存性に特徴的な親和性を示した。

水牛の精巣における各種の細胞骨格タンパク、制御因子、ステロイド合成酵素およびステロイド受容体の局在は精巣の特異的な細胞に認められた。

水牛の精巣における α -チューブリン、アクチンとビメンチンの分布パターンは、羊および牛の精巣における研究結果と一致していた。しかし、デスミンとサイトケラチンの2つの中間径フィラメントの分布は、羊や牛とは異なっていた。すなわち、羊と牛の精巣では、デスミンは血管壁だけに観察され、水牛の精巣では、未成熟個体のセルトリ細胞、曲精細管終末部のセルトリ細胞および筋様細胞に認められたが、成熟個体では、セルトリ細胞から消失した。サイトケラチン陽性反応は、水牛では、成熟個体のセルトリ細胞だけに認められたが、羊と牛では認められていない。

細胞内Ca結合タンパクであるS-100タンパク質とそのサブユニット(S100- α 、S100- β)は、水牛の精巣においてはじめて認められた。S-100タンパク質はセルトリ細胞、精細管終末部の変形セルトリ細胞、直精細管および精巣網の上皮細胞に認められた。S100- β サブユニットはセルトリ細胞、精細管終末部の変形セルトリ細胞、直精細管および精巣網の上皮細胞に認められたが、一方、S100- α サブユニットは精細管終末部の変形セルトリ細胞のみに認められた。この成績は、S100- β サブユニットが精子形成の調節と精巣内導管(直精細管および精巣網)上皮の分泌調節とそれらの分泌物による精子成熟に関与している可能性を示唆している。

水牛の精巣では、インヒビンの α サブユニットと β サブユニットがセルトリ細胞とライディッヒ細胞の両方に認められたので、インヒビンとアクチビンの存在の可能性がある。インヒビン β Bは、セルトリ細胞の核だけに認められた。これはこれまでに報告がない。さらに、曲精細管終末部のセルトリ細胞、直精細管および精巣網の上皮にもインヒビン β Aサブユニットおよび β Bサブユニットの存在が認められた。これはこれらの導管でのアクチビンの存在を示唆し、精子の成熟にアクチビンが作用している可能性を示唆している。

水牛の精巣において、ライディッヒ細胞とセルトリ細胞に一連のステロイド合成酵素の存在が確認され、これらの細胞がステロイド合成に関与していると考えられた。Cytochrome P450 aromataseは未成熟精巣のライディッヒ細胞および成熟精巣のセルトリ細胞にその局在が認められたことより、エストロゲンは未成熟精巣のライディッヒ細胞と成熟精巣のセルトリ細胞によって合成されていると推測される。

アンドロゲン受容体は成熟精巣のセルトリ細胞と未成熟および成熟精巣のライディッヒ細胞に、エストロゲン受容体 α は未成熟および成熟精巣のライディッヒ細胞に、そしてエストロゲン受容体 β は生殖細胞に免疫組織化学的に認められた。これらのことより、アンドロゲンはライディッヒ細胞とセルトリ細胞に作用し、さらに、エストロゲンはライディ

ッヒ細胞と生殖細胞に対して異なるタイプの受容体を介して作用していることが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

水牛は、フィリピンを含む東南アジアの多くの国で重要な家畜であるが、その繁殖に重要な精巣の制御因子についてはほとんど研究なされていない。そこで、フィリピン水牛（以下、水牛と略記する。）の精巣を用いて、基本構造を組織学的および組織化学的に、複合糖質をレクチン組織化学的に、細胞骨格タンパク、各種制御因子、ステロイド合成酵素およびステロイド受容体を免疫組織化学的に研究し、次のような水牛精巣の形態学的特徴を明らかにし、考察を加えた。

フィリピン水牛精巣の組織学的構造は牛と類似し、精上皮周期が牛と同様な8つのステージであることを初めて確認した。

性成熟水牛の精巣での精子発生過程と糖鎖の発現様式との関係を明らかにするために、レクチン組織化学的に水牛精巣を検索した。レクチンは主に精子細胞とセルトリ細胞においてステージ依存性に特徴的な親和性を示した。

水牛の精巣での α -チューブリン、アクチンとビメンチンの分布パターンは、羊および牛の精巣での結果と一致した。しかし、デスミンとサイトケラチンの2つの中間径フィラメントの分布は、羊や牛とは異なり、羊と牛では認められていないサイトケラチンは、水牛では、成熟個体のセルトリ細胞だけに認められた。これらは精巣構造タンパクが水牛と近縁種でも異なることを明らかにした。

細胞内Ca結合タンパクであるS-100タンパクとそのサブユニット(S100- α 、S100- β)は、水牛精巣で初めて検索され、S-100タンパクはセルトリ細胞、精細管終末部、直精細管および精巣網の上皮細胞に認められた。S100- β サブユニットはセルトリ細胞、精細管終末部の変形セルトリ細胞、直精細管および精巣網の上皮細胞に認められたが、S100- α サブユニットは精細管終末部の変形セルトリ細胞のみに認められた。この成績は、S100- β サブユニットが精子形成の調節と精巣内導管上皮の分泌調節とそれらの分泌物による精子成熟に関与を示唆した。

インヒビンの α サブユニットと β サブユニットがセルトリ細胞とライディッヒ細胞の両方に認められたので、インヒビンとアクチビンの存在の可能性が示された。さらに、曲精細管終末部のセルトリ細胞、直精細管および精巣網の上皮にもインヒビン βA サブユニットおよび βB サブユニットの存在が認められた。この成績はインヒビンとアクチビンが精子形成の調節に、導管のアクチビンが精子の成熟に関与している可能性を示唆した。

一連のステロイド合成酵素の存在がライディッヒ細胞とセルトリ細胞に確認され、これらの細胞のステロイド合成を明らかにした。Cytochrome P450 aromatase は未成熟精巣のライディッヒ細胞および成熟精巣のセルトリ細胞にその局在が認められたことより、エストロゲン合成は未成熟精巣のライディッヒ細胞と成熟精巣のセルトリ細胞でなされていると推測された。

アンドロゲン受容体は成熟精巣のセルトリ細胞と未成熟および成熟精巣のライディッヒ細胞に、エストロゲン受容体 α は未成熟および成熟精巣のライディッヒ細胞に、そして

エストロゲン受容体 β は生殖細胞に認められた。これらのことより、アンドロゲンはライディッヒ細胞とセルトリ細胞に作用し、エストロゲンはライディッヒ細胞と生殖細胞に対して異なる受容体を介して作用することが示唆された。

以上の内容について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Differential localization of inhibin α -, β A- and β B-subunits in the testis of the adult swamp-type water buffalo (*Bubalus bubalis*)

著 者 名 : Cruzana, M. B. C., Budipitojo, T., Matsuzaki, S., de Ocampo, G., Watanabe, G., Taya, K., Sasaki, M., Kitamura, N. and Yamada, J.

学術雑誌名 : Biomedical Research

巻・号・頁・発行年 : 22・5・235-239・2001

- 2) 題 目 : Immunohistochemical distribution of S-100 protein and subunits (S100- α and S100- β) in swamp-type water buffalo (*Bubalus bubalis*) testis

著 者 名 : Cruzana, M. B. C., Budipitojo, T., de Ocampo, G., Sasaki, M., Kitamura, N. and Yamada, J.

学術雑誌名 : Andrologia

巻・号・頁・発行年 : 35・3・142-145・2003

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Differential localization of immunoreactive α - and β -subunits of S-100 protein in feline testis

著 者 名 : Cruzana, B. C., Hondo, E., Kitamura, N., Matsuzaki, S., Nakagawa, M. and Yamada, J.

学術雑誌名 : Anatomia Histologia Embryologia

巻・号・頁・発行年 : 29・2・83-86・2000

- 2) 題 目 : Immunolocalization of gastrin-releasing peptide in the bovine uterus and placenta

著 者 名 : Budipitojo, T., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B. C., Baltazar, E. T., Hondo, E., Sunaryo, S., Kitamura, N. and Yamada, J.

学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 63・1・11-15・2001

- 3) 題 目 : Immunohistochemical localization of inhibin subunits in the testis of the bull
著 者 名 : Matsuzaki, S., Cruzana, M. B. C., Budipitojo, T., Hondo, E., Watanabe, G., Taya, K., Sasaki, M., Kitamura, N. and Yamada, J.
学術雑誌名 : Anatomia Histologia Embryologia
巻・号・頁・発行年 : 30・6・375-378・2001
- 4) 題 目 : Prepubertal changes in immunoreactive inhibin concentration in blood serum and testicular tissue in Holstein bull calves.
著 者 名 : Matsuzaki, S., Uenoyama, Y., Okuda, K., Watanabe, G., Kitamura, N., Taya, K., Cruzana, M. B. C. and Yamada, J.
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : 63・12・1303-1307・2001
- 5) 題 目 : Molecular cloning of cDNA encoding gastrin-releasing peptide (GRP) precursor from the bovine endometrium
著 者 名 : Budipitojo, T., Sasaki, M., Matsuzaki, S., Cruzana, M. B. C., Kitamura, N. and Yamada, J.
学術雑誌名 : Biomedical Research
巻・号・頁・発行年 : 24・4・181-186・2003