

ラット精巢上体におけるシステイン
プロテアーゼの局在に関する研究

1993

友 政 宏

寄	贈
友	平成
政	年
宏	月
氏	日

筑波大学

医学博士学位論文

帝京大学医学部

友政 宏

ラット精巢 上体におけるシステイン
プロテアーゼの局在に関する研究

1993

友政 宏

目次

第1章	緒言	1
第2章	文献的考察	3
	1 精巣上体の解剖	
	2 精巣上体の生理	
	1) 吸収作用	
	2) 分泌作用	
	3) Spermiphagy	
	3 精巣上体の酵素に関する研究	
	4 各種病態における精巣上体の形態学的変化	
	1) 精管結紮	
	2) 精巣摘除術	
	3) 精巣輸出小管結紮	
	4) 精巣高位固定	
	5 システインプロテアーゼの機能	
	1) プロテアーゼの分類	
	2) システインプロテアーゼ	
	A. 歴史	
	B. 分布	
	C. 構造と機能	
	D. システインプロテアーゼの役割	

3) システインプロテアーゼの局在に関する研究

第3章 正常ラット精巣上体におけるシステイン

プロテアーゼの局在に関する研究 20

1 研究対象および方法

1) 実験動物

2) 免疫組織化学

A. 試薬

B. 操作

3) 酵素活性

A. 試薬

B. 精巣上体全体での活性測定

C. 精巣上体上皮および精液の測定

2 研究成績

1) 免疫組織化学

2) 酵素活性

A. 精巣上体全体での活性測定

B. 精巣上体上皮および精液の測定

第4章 各種病態における精巣上体のシステイン

プロテアーゼの局在に関する研究 28

1 研究対象および方法

1) 実験動物

- 2) 精管結紮
- 3) 精巢摘除
- 4) 精巢輸出小管結紮
- 5) 精巢高位固定

2 研究成績

- 1) 精管結紮
- 2) 精巢摘除
- 3) 精巢輸出小管結紮
- 4) 精巢高位固定

第5章 考察 32

1 実験方法について

- 1) 免疫組織化学
- 2) 酵素活性

2 結果について

- 1) 精巢上体上皮による蛋白の吸収について
- 2) 正常ラットの精巢上体におけるシステインプロテアーゼの分布に関して
- 3) 各種病態におけるラット精巢上体のシステインプロテアーゼの分布に関して
 - A. 精管結紮
 - B. 精巢摘除

C. 精巢輸出小管結紮および精巣高位固定

第6章 総括	47
図表	49
謝辞	66
参考文献	67

第1章 緒言

不妊はかつて婦人の業病とされていたが、生殖医学の進歩により現在ではその原因は男女ほぼ同率に存在するとされ、男性不妊症は泌尿器科の中でも重要な分野となってきた¹⁾。男性不妊の原因は大きく4つに分類され、1.造精機能障害が全体の80%を占め、2.精子輸送路通過障害と3.副性器の炎症がそれぞれ10%、4.性機能不全が数%となっている²⁾。造精機能障害としては精索静脈瘤によるものが30%と最も多いが、他のほとんどは精液性状が不良なことから造精機能障害と分類されている。これらの原因は未だ特定されていないため特発性男性不妊症と呼ばれている。精子輸送路通過障害は、先天性、炎症性、医原性などの原因で精巣上体、精管に閉塞を生じるものである。また、副性器の炎症は主に前立腺、精囊の感染により惹起され、その結果精漿を構成する成分が変化して精子の活動性が低下し不妊の原因となる。性機能不全は性交障害、射精障害などがあげられる。男性不妊症の大部分を占める特発性男性不妊症は機能障害が主な原因と考えられているが、実際にこれらの症例の精巣生検を行なうと精子形成過程はほぼ正常に近いことが多い。このことは特発性男性不妊症においては、精巣機能ばかりでなく精巣上体や精囊などの副性器の機能障害が関与している可能性が考えられる。

精巣上体は精巣に附属する形で存在し、精巣から出た精子を精管に輸送する1本の管状器官である。その機能として、精子の運搬路及

び貯留の場としての作用、精子が運動能および受精能を獲得する場としての作用に加えて、貯留した余剰精子の吸収の場としての作用も考えられている³⁾。精巣上体を精子が移動するには、精巣側からの圧力、精巣上体管の蠕動運動、精巣上体上皮の線毛運動などが関与している。精巣上体を通過する間に水分の吸収により精子濃度は約20倍に濃縮され、また、精巣上体尾部は精子の貯留機能が高いことが知られている。精巣で採取された精子には妊孕性がないが、精巣上体を通過する間に精子は運動能と受精能を獲得することが観察されている。その機序としては、単に精子が精巣上体を通過する間に成熟するだけでなく、精巣上体の上皮細胞から分泌されるある種の物質などによりその成熟を促しているものと考えられている。

そこで著者は、精巣上体上皮細胞の分泌物や内容物の吸収によって精巣上体管内の環境が整えられることが精子の成熟過程や精子吸収過程などの精巣上体機能にとって重要であると考え、本研究では特に精巣上体上皮細胞の蛋白質の代謝に深く関与するリソゾームシステインプロテアーゼの局在及びその活性の分布を免疫組織化学的かつ生化学的に検討した。また実験的精路閉塞モデル動物を用いて、そのシステインプロテアーゼの活性と分布の変動を検索した。

第2章 文献的考察

1 精巣上体の解剖

精巣輸出管は精巣網から発する管で、種によって異なるが、4ないし20本の管からなる⁴⁾。これらが合流して1本の精巣上体管となる。精巣上体管の長さは人では34m、馬では80mにも及ぶ⁵⁾。精巣上体はその形態から大きく頭部 (Head, Caput)、体部 (Body, Corpus)、尾部 (Tail, Cauda) の3ヶ所に分けられるが、組織形態学的な特徴から頭部と精巣輸出管との間を起始部 (Initial segment) として別に分類することもある⁶⁾。精巣上体管は、厚い筋層に包まれた管である精管に移行し、尿道へとつながり、精子の輸送経路を形作る。

組織学的には精巣上体の上皮細胞は、主細胞 (Principal cells)、狭細胞 (Narrow cells)、明調細胞 (Clear cells)、基底細胞 (Basal cells)、ハロー細胞 (Halo cells) の5種類に分類される⁶⁾。これら上皮細胞の分布は部位により異なる。

主細胞は精巣上体上皮中もっとも多く見られる細胞である。起始部及び頭部においては上皮細胞中の約80%を占める。体部では頭部に比べやや減少し、尾部においては約60%に減少する。主細胞はまた部位によりその形態を異にし、起始部では背の高い円柱上皮細胞の形態をとるが、他の部分ではその背は低くなる。いずれも中程度の酸好性の染色性を示す細胞質と淡染性の核を持ち、管腔側に向かって線毛を有する。核上部には顆粒を多数含むがその染色性、大きさ

は部位により異なる。狭細胞は起始部にのみ存在する細胞で、酸性に濃染する細胞質に細長い核を持つ逆三角形の細長い細胞である。明調細胞は、頭部、体部、尾部に見いだされ、特に尾部では全細胞数の約10%に達する。細胞の上部に空胞を有し、核周囲の細胞質に多数の濃染性顆粒が見られる。電子顕微鏡ではこれらの濃染性顆粒はリソゾームと考えられている⁷⁾。基底細胞は、精巣上体のすべての部位に分布し、基底膜に接して存在する背の低い細胞である。ハロー細胞は精巣上体のすべての部位に分布し、淡染性の細胞質に濃染性の細胞核を有する。

2 精巣上体の生理

精巣上体の上皮細胞の主な機能として分泌と吸収が挙げられる。その他に管腔内の精子を取り込み処理する可能性も考えられている。

1) 吸収作用

多くの哺乳類では精巣上体で水分を吸収することが証明されているが、その程度については種によって異なる。ウシやブタでは精巣から分泌される液成分の90%は精巣輸出管から頭部の間で吸収されることが示されている⁸⁾。しかし、ラットで水分の吸収量をみるとこの部分で吸収されるのは50%と少ない⁹⁾。穿刺法 (micropuncture) を用いたラットの研究では精巣網と頭部を通過する間に精子の密度は8倍になり、さらに尾部に至るまでには20倍になる¹⁰⁾。こうした精巣上体での水分の吸収は受動拡散によること^{11,12)}、またその機能はテ

ストステロンに依存することが実験的に示されている¹³⁾。

精巣上体では水分量のみ変化するのではなく、イオン濃度や有機物質の濃度も変化することが示されている。特にナトリウムイオン、塩素イオンは精巣上体の上皮細胞から多量に吸収され^{11,12)}、実際、精巣上体各部位でイオン濃度は変化する¹⁴⁾。

カルニチンは頭部ではナトリウム依存性に吸収され、尾部では純粹に受動的に取り込まれることが知られている¹⁵⁾。FerritinやHorse Radish Peroxidase (HRP) を標識物質として注入した実験では、上皮細胞が endocytosis によりこれら物質を取り込むことが証明されている^{16,17,18)}。これらの物質は細胞内で大型の被覆小胞、エンドゾームを経てリソゾームに取り込まれる。このように上皮細胞が標識蛋白を取り込むことから、精巣上体の上皮細胞は管腔内液の蛋白成分を選択的に取り込んでいるものと考えられている。実際、精巣のセルトリ細胞で産生される Androgen-結合蛋白を精巣輸出管や精巣上体頭部の主細胞が取り込むことは免疫組織学的に示唆されている^{19,20)}。

Alpha-2-macroglobulin や Transferrin に関しても電子顕微鏡レベルで検討され、ラットを用いて頭部の主細胞内の顆粒やエンドゾーム内に局在することが観察されている。興味あることに、吸収されたこれらの物質のうち Alpha-2-macroglobulin はリソゾームにて処理されるが、Transferrin は精巣上体管内に再分泌されることが知られている^{21,22)}。Louis は電子顕微鏡での観察から、精巣から運搬される精子

の細胞質小体 (Cytoplasmic droplets) は尾部の管腔内で分解され、その分解産物を Clear cells が取り込み、同細胞のリソゾームで処理されることを示唆している²³⁾。

2) 分泌作用

精巣上体上皮はイオン、有機物、糖、糖蛋白など多くの物質を管腔内に分泌していることが知られている。

精巣上体内では精巣輸出管から尾部に向かうに従って塩素イオン、ナトリウムイオンが減少し、カリウムイオンが増加することが知られている¹⁴⁾。こうしたイオン濃度の変化には、上皮細胞によるイオン交換が関与しているがその詳細は現在のところ不明である。

精巣上体内に高濃度に存在する Carnitine は、精巣から送られてくるのではなく、精巣上体尾部で分泌されることが示されている²⁴⁾。Inositol も同様に精巣上体管内に高濃度に分布するが、同物質は精巣及び精巣上体上皮細胞から分泌されるものと考えられている^{25,26)}。精巣上体内の蛋白組成に関しては、各領域から採取された管腔液成分が電気泳動法により解析され、その蛋白成分の違いから精巣上体上皮細胞が蛋白質を分泌するものと考えられている²⁷⁾。1978年に Lea らは主細胞に特異的に存在する 33000 の分子量をもつ Acid epididymal glycoprotein (AEG) を同定した²⁸⁾。その後 Forward motility protein (FMP)²⁹⁾, protein DE³⁰⁾, protein 4³¹⁾, 32K protein³²⁾, 37K dalton glycoprotein³³⁾ などの糖蛋白の存在が報告されている。これらの物質

は構造的に同一の物質あるいは類似した物質であり、精子の成熟に重要な役割を果たしているものと考えられている。

3) Spermiphagy (精子の貪食)

射精されなかった精子の運命に関しては未だ不明な点が多い。動物種によっては尿中に排泄されることが証明されているが、それだけではすべての余剰精子の排泄を説明できない。もう一つの可能性として、精路の上皮細胞が余剰精子を食べ込んで処理することが示されている。

Lino らは羊を用い、精巣での精子の産生量と尿中排泄量との比較実験からほとんどの精子が尿中に排泄され、精路での吸収はあっても極くわずかであると報告している³⁴⁾。Barratt らは禁欲中のヒト男性の24時間尿中の精子数を計測し、尿中に排泄される精子数が少ないことから、余剰精子のほとんどは精路中の上皮細胞で吸収されるものと考えた³⁵⁾。動物種によっては精路の管腔内に精子を貪食したマクロファージが存在することも知られている³⁶⁾。Cooper らはラットの精管末梢部での上皮細胞による精子の取り込みを観察した³⁷⁾。また、Alexander らはラットの精巣上体尾部の明調細胞に精子の一部が取り込まれているのを電顕で観察している³⁸⁾。

3 精巣上体の酵素に関する研究

精巣上体のリソゾーム酵素の分布に関する研究は少ない。Moniem³⁹⁾らは5 μ mの凍結切片で酵素基質を用いて哺乳動物の精巣上体上皮

での酸フォスファターゼ、 β -グルクロニダーゼ、エステラーゼの局在を検討した。その結果ラットにおいては酸フォスファターゼと β -グルクロニダーゼは主細胞の核上部と明調細胞の核周囲の顆粒に局限し、リソゾームにその活性が集まっていること、さらに頭部尾部に比較してこれらの酵素活性は体部において最も強いことを見いだした。

4 各種病態における精巣上体の形態学的変化

精子の輸送経路には様々な病態が存在することが知られている。本研究ではそうした病的状態をラットの実験モデルで作成し、精巣上体の変化をシステインプロテアーゼの分布の変化として検討した。作成した実験モデルは1) 精管結紮動物、2) 精巣摘除動物、3) 精巣輸出管結紮動物、4) 精巣高位固定動物について検討を行なった。

1) 精管結紮

精管結紮術は男性に対する最も一般的で簡便な避妊手術として広く行なわれている⁴⁰⁾。この手術によって精巣、精巣上体に起こる変化や、精巣で産生される精子のゆくえに関しては不明な点が多い。精管結紮後も精巣内では精子の産生は続くものとされるが、精管結紮を施行してから長期間を経て行なった精管精管吻合術後の精液所見は不良である⁴¹⁾。このことは精管結紮による精巣や精子輸送路の機能的変化を示唆するものと思われる。精管結紮後の精子のゆくえに関してはいくつかの経路が考えられている。これらは動物種によっ

でも異なり、ヒトやラットにおいては精管結紮術後ほとんどの例で精子肉芽腫が形成されその中で組織球による精子の貪食が行なわれているものと見なされている^{42,43}。マウスでは精巣上体管腔内での精子の破壊が観察されている⁴⁴。サルでは管腔内でのマクロファージによる取り込みも観察されている^{45,46}。Ballら⁴⁷はヒトでの大動脈リンパ節に多量の精子を見いだした。さらに彼らは羊やブタで精管結紮後に所属リンパ節やリンパ管に精子そのものが存在することを見いだした⁴⁸。Barret⁴⁹らは放射性同位元素でマウス精子を標識し、精管結紮後のみならず正常のマウスでもリンパ管に精子やその分解産物が流出することを証明した。しかしこうした精子やその分解産物の一部は精巣上体上皮に取り込まれる³⁸。Flickingerらは精管結紮後のラット精巣の形態学的変化を詳細に検討した結果⁵⁰、精巣に形態学的変化が起こったときには精巣上体にも組織学的な変化が起こりやすく、血中の抗精子抗体もそれと共に上昇することから、これらの変化を免疫学的機序によるものと説明している⁵¹。Alexander³⁸はラットの精管を結紮し、その後10週の間一週ごとに精巣上体を電子顕微鏡で観察した結果、5週目以降では頭部の主細胞にリソゾームと考えられる粗大顆粒が出現するのを観察した。しかし、尾部の上皮細胞における精子貪食能の亢進は見られなかった。

2) 精巣摘除術

精巣摘出により、精子形成の場及び間細胞から分泌される

testosterone の消失に伴う影響がある。Dyson⁵²⁾らは脳下垂体摘除および精巣摘除によるラット精巣上体内の精子の変化を検討した。精巣摘除により、精子の受精能は3日間でなくなり、脳下垂体除去では4日間で消失する。このような精子の受精能の変化は testosterone を同時に注射することで防げる。また、精巣輸出管結紮ラットと精巣除去ラットにおける精巣内精子の濃度変化を検討し、Androgen の消退により精子の精巣上体内での移動が早くなることが示唆されている。Sujarit⁵³⁾らも精巣摘除により精巣上体内の精子の輸送が早くなることを同位元素を用いて証明し、精巣上体管自身の収縮性が亢進することも観察している。

Moore ら⁵⁴⁾は精巣摘除後の精巣上体の変化を顕微鏡および電顕で詳細に検討し、精巣摘除4日後より、精巣上体の特に主細胞に変化が見られ、その細胞内のリソゾームの数、大きさの増加が始まることを報告している。彼らはまた、精巣摘除後の精巣上体の吸収機能をHRPを用いて検討した⁵⁵⁾。正常ラットにおいてはHRPは主に頭部の狭細胞と尾部の明調細胞に取り込まれるが、精巣除去ラットでは主細胞での取り込みが亢進し、他の細胞と差がなくなることを示している。

3) 精巣輸出管結紮

精巣輸出管の結紮により、精巣からの精子および液性成分の流入が阻止される。ただし、精巣摘除術と違い血中のテストステロン値

には影響がない。ラット、マウスにおいては精巣輸出管を結紮あるいは切除することによって起始部に変化が起こることが知られている。Nicander⁵⁶⁾らはラットの精巣輸出管を結紮しその後の変化を経時的に顕微鏡および電顕で観察し、初期には上皮細胞が変性壊死、それに伴う細胞の処理、ついには扁平な上皮へと置き変わることを明らかにし、その原因として精巣より流入するテストステロンや精巣上体の成長を促す未知の物質がなくなるためではないかと考えた。一方、Abe⁵⁷⁾らはマウスでの同様な実験において精巣上体起始部の上皮細胞に変性壊死が起こり、上皮内のマクロファージや他の主細胞、基底細胞などが壊死に陥った細胞の残骸を貪食するのを観察し、これら一連の変化が起始部付近の毛細血管の障害に起因するものであることを示した。彼らは精巣輸出管結紮後の頭部の主細胞にリソゾームと考えられる粗大な顆粒が出現するのを観察している⁵⁸⁻⁶⁰⁾。さらに、彼らは、精巣上体管腔内には頭部で分泌されるPAS陽性物質がみられ、この物質は精子に付着すること、また、このPAS陽性物質（おそらくは精子に運動性を与える糖蛋白）は精巣輸出管結紮により精子に付着できず精巣上体体部の上皮細胞に吸収されることを示している。

4) 精巣高位固定

精巣輸出管の結紮により精巣からの精子の流入が妨げられるが、同時に精巣内で産生される物質の流入も妨げられる。精巣上体に対

する精子の影響をみるためには精子の産生だけを阻止することが必要である。精巣を一時的に腹腔内に固定することにより、一過性の無精子状態が得られることが知られている^{61,62}。Abe⁶³らはマウスの精巣を腹腔内に1週間固定することにより一過性の無精子状態を作り、精巣上体に精巣輸出管結紮時と同様の変化が起こることを観察した。この実験により、1週間の精巣高位固定により精巣上体内での無精子状態は約4週間持続し、その後約6週間かけてもとの状態に戻ることに、さらに、体部のPAS陽性物質は無精子状態になると同時に出現し、精子の再出現に伴って減少することが明らかにされた。

5 システインプロテアーゼの機能

1) プロテアーゼの分類

ペプチド結合の加水分解を触媒する酵素をプロテアーゼと総称する。これらは大きくペプチド鎖内部の結合を加水分解する酵素であるエンドペプチダーゼと、アミノ(N)末端やカルボキシル(C)末端のアミノ酸残基を加水分解する酵素であるエキソペプチダーゼとに分けられる⁶⁴。エキソペプチダーゼはN末端から切断するアミノペプチダーゼとC末端から切断するカルボキシペプチダーゼとに分けられる。プロテアーゼはさらにその活性中心に 1) セリンをもつセリンプロテアーゼ、2) システインをもつシステインプロテアーゼ、3) アスパラギン酸をもつアスパラギン酸プロテアーゼ、4) 金属をもつメタロプロテアーゼの4種類に分けられ、これらの範疇に入らないプロ

テアーゼは統括して5)その他として分類されている(図1)。

2) システインプロテアーゼ

リソゾームに存在するプロテアーゼをカテプシンと呼ぶ⁶⁵⁾。リソゾームに存在するシステインプロテアーゼとしてカテプシン B、カテプシン C、カテプシン H、カテプシン L、カテプシン N⁶⁶⁾、カテプシン S⁶⁷⁾、カテプシン T⁶⁸⁾などが知られている。本研究ではこれらの中でも代表的なリソゾームシステインプロテアーゼとして知られるカテプシン B、カテプシン H、カテプシン L を対象とした。

A. 歴史

カテプシン B は牛の脾臓から抽出され、システインの存在下で Benzoylarginine amide を加水分解する酵素と定義された^{69,70)}。その後 Otto らはラット肝臓のリソゾーム抽出液をクロマトグラフィーにより分離し、分子量 52000 のカテプシン B2 と分子量 25000 のカテプシン B1 に分離した^{71,72)}。しかし、カテプシン B2 はカルボキシペプチダーゼであることが判明し⁷³⁾、カテプシン B1 がカテプシン B と呼ばれるようになった。Kirschke⁷⁴⁻⁷⁶⁾らはラット肝臓のリソゾームからカテプシン B とは異なる酵素—カテプシン H、カテプシン L—を見いだした。ほぼ同時に Towatari^{77,78)}らもラット肝臓から新しいカテプシンを抽出したが、これはカテプシン L と同じものであった。

B. 分布

リソゾームのシステインプロテアーゼのなかではカテプシン B が

最も古くから知られ、研究されている。同酵素は哺乳類での研究で肝⁷⁹⁾、脾⁸⁰⁾、陰核⁸¹⁾、肺⁸²⁾、副甲状腺⁸³⁾、乳房、脳⁸⁴⁾、などから抽出精製されている。Kominami⁸⁵⁾ら、Bandoら⁸⁶⁾はエンザイムイムノアッセイ法により全身15臓器でカテプシンB、H、Lの蛋白あたりの量を調べ、腎、膵、脾、肝、副腎にこれら酵素の量が多く存在することを明らかにした。カテプシンBの活性を組織化学的に人で調べた結果、肝、マクロファージ、腎、消化管、線維芽細胞、移行上皮、唾液腺、膵、神経系などに分布することが証明されている⁸⁷⁾。カテプシンHはラットの肝臓から抽出され⁷⁶⁾、その後人の肝臓⁸⁸⁾、ラットの表皮⁸⁹⁾、ウサギの肺⁹⁰⁾などから抽出されている。カテプシンLもラットの肝臓から抽出された^{77,78)}がその後ウサギ骨格筋⁹¹⁾、ラット腎⁹²⁾などからも抽出された。

C. 構造と機能

リソゾームシステインプロテアーゼの性質、機能の概略を表1に示した。これらのタンパク質ならびに遺伝子配列は勝沼ら、D. Steinerらのグループによって決定された⁹³⁻⁹⁸⁾。さらにX線解析により、これらカテプシン群の立体構造はN末端近くにある活性基システイン(29番)の-SHとC末端近くのヒスチジン(199番)のイミダゾール基のNHが立体構造的に近くに位置し、基質結合ポケットを形づくっていることが明かとなった。基質特異性はこのポケットの型と電荷により生じるものと考えられている⁹⁹⁾。しかし、多くの場合プロテ

アーゼは基質特異性や切断部位のアミノ酸に対する特異性も低い。わずかに塩基性アミノ酸の次を切りやすいこと、芳香族アミノ酸の次を切りやすいこと、プロリンの次を切ることなどの特徴がみられる¹⁰⁰⁾。

これらのシステインプロテアーゼ群には特異的な阻害剤が存在することが知られている。システインプロテアーゼに対する阻害剤として最初に登場したのは微生物由来のロイペプチンである¹⁰⁰⁾。その後、より特異性が高く毒性が弱い阻害剤として開発合成されたのがE-64であり、現在最も優れた阻害剤として利用されている¹⁰¹⁾。最近の研究により生体内にも内在性システインプロテアーゼ阻害剤が存在することがわかってきた。リソゾームシステインプロテアーゼの阻害剤としては分泌型のシスタチン α と γ 、また、非分泌型のシスタチン β とが知られ、細胞質システインプロテアーゼとして知られるカルパインとその阻害剤としてカルバスタチンなどが報告されている¹⁰²⁾。

D. システインプロテアーゼの役割

生体においては細胞の内外に存在する構造蛋白や調節蛋白を様々なレベルの細胞が合成と分解を繰り返すことにより恒常性を保っている。このような一見無駄とも思える代謝回転が行なわれる意義として以下のようなことが考えられる。1.生命維持には絶えず膨大なエネルギー(ATP)が消費されている。それは通常は食物摂取によ

り供給されるが生体内に存在する蛋白の分解でまかなわなければならないこともある。2.おのこの蛋白には寿命があると考えられ、機能を果たした蛋白は立体構造を崩し、機能低下を来たしてくる可能性がある。それゆえ、生体の機能維持のために蛋白の更新が必要となる。3.生体内外の環境変化に応答した蛋白量の調節のためには蛋白は絶えず代謝回転の中で動的平衡を保った状態にあるのが合理的である。4.新しく必要になった蛋白や生理活性ペプチドを合成するためにアミノ酸の再利用が必要である。5.多くの蛋白やペプチドは分子量の大きな前駆体として合成されプロセッシングにより生物活性のある成熟型となる。つまり蛋白の分解、活性化を通して生体に必要な活性物質を供給しているのである。6.不必要になったり有害になった蛋白を分解処理することが必要である。このような理由からプロテアーゼは蛋白の分解や活性化を通して生体内の蛋白の働きを制御している。一方、プロテアーゼ自身も他のプロテアーゼによりその働きを調節されており、複雑なカスケードが形成されている。

リソゾームシステインプロテアーゼはプレプロ蛋白としてリボソーム上で合成され、すぐに粗面小胞体内でプレ部が切断された後ゴルジ複合体に輸送されて糖鎖の修飾を受ける。これらプロテアーゼの前駆体が細胞内のどこでプロ部分の切断を受け活性型となるのか、また、この活性化が他の酵素によるものか自身の作用で起こるもの

かは現在のところ不明である。これらの酵素はその生体内各臓器における分布の違いや細胞内での局在の範囲が異なることからそれぞれの酵素には役割の分担があるものと考えられる。カテプシンBはカルボキシペプチダーゼ作用とエンドペプチダーゼ作用をあわせ持ち、autophagyのみならずheterophagyへの関与も大きいと推定され、カテプシンLは強いエンドペプチダーゼ作用を持ち、リソゾームでの蛋白質分解の開始反応への関与が大きいと考えられている。

3) システインプロテアーゼの局在に関する研究

木南ら⁸⁵⁾の方法により抽出されたウサギ抗ラットカテプシン抗体を用い、ラットの各種臓器におけるリソゾームシステインプロテアーゼの局在が明かにされてきている。

肝においてはカテプシンB、Hは肝細胞に、またカテプシンLはクッパー細胞に特に多く分布する¹⁰³⁾。Watanabeら¹⁰⁴⁾はラット膵島内分泌細胞におけるカテプシン群およびその阻害剤であるシスタチン β 、インスリンの局在を光顕および電顕レベルで詳細に検討した結果、膵島内分泌細胞のクリノファジー小体（分泌顆粒を食べ込んだ小体で分泌顆粒のコアー蛋白を有している一種のリソゾーム）にカテプシンBとHとが局在すること、B細胞の分泌顆粒にシスタチン β とインスリンとが共存することを見いだした。さらに膵島内分泌細胞にはカテプシンLは認められないことを明らかにした。ラット心房のmyoendocrine cellsにおいてはAtrial natriuretic peptides(ANP)お

よび カテプシンB が核周囲の分泌顆粒に共存し、カテプシンBが ANP を活性化する可能性を示唆している¹⁰⁵⁾。甲状腺の濾胞細胞においてもカテプシンB、H、Lおよび甲状腺ホルモン(T4)の細胞内での局在が光顕的、電顕的に検索され、カテプシンBとHのいずれかが甲状腺ホルモンの産生に関与することが推測されている¹⁰⁶⁾。ラット腎尿管にはカテプシンB,H,L が広く分布する。また、レニン産生細胞として知られる傍糸球体細胞においては、プロレニン、レニン、カテプシンB の細胞内分布様式から、成熟途中のレニン顆粒(中間顆粒)でレニンの活性化がおこること、さらにこの活性化にはカテプシンB が関与することが明らかにされている¹⁰⁷⁾。ラット肺においてもカテプシンB,H,Lの局在が免疫組織化学および免疫電気泳動にて検索されている。これらのプロテアーゼは主に気管支の上皮細胞と肺胞マクロファージ内に局在し、さらにカテプシンHはII型肺胞上皮細胞の分泌顆粒(サーファクタント顆粒)に局在する。肺の洗浄液中にはカテプシンB、Hの活性及び蛋白が認められ、少なくともカテプシンHはII型肺胞上皮に由来するものと考えられている¹⁰⁸⁾。ラット下垂体での免疫組織化学的な観察から、Uchiyama¹⁰⁹⁾らはカテプシンBは前葉のACTH細胞と中葉のMSH細胞では分泌顆粒を処理するクリノファジー小体に、またカテプシンHは分泌顆粒に局在することを明らかにしている。さらに、興味あることには、カテプシンBは前葉のGH、プロラクチン、TSHの各細胞のリソゾームに局在する一

方、LH/FSH 細胞ではその分泌顆粒にLH、レニン、プロレニンと共存することを明らかにし、同酵素は腎傍糸球体細胞におけると同様にレニンの活性化に関与することを示唆している。さらに上部消化管においてもカテプシンHはリソゾーム内のみならずガストリン細胞やCCK 細胞の分泌顆粒にも局在することが示され¹¹⁰⁾、これらシステインプロテアーゼ群は取り込まれた蛋白や細胞内の蛋白の代謝に関与するだけでなく、分泌されるホルモンや蛋白の活性化の過程にも関与していることが示唆された。

第3章 正常ラット精巣上体におけるシステインプロテアーゼ の局在に関する研究

1 研究対象および方法

1) 実験動物

13週齢の Wistar 系雄ラット（体重約350g）を用いた。飼料や水分は自由に摂取させた。

2) 免疫組織化学

A. 試薬

免疫組織化学に以下の試薬を用いた。

a. 洗浄液； Phosphate buffer saline-A (PBSA)

0.01M Phosphate buffer (pH 7.2)

0.5M NaCl

0.1% Tween 20

b. 抗体希釈液； Tween phosphate buffer saline (TPBS)

0.01M Phosphate buffer (pH 7.2)

0.15M NaCl

0.05% Tween 20

c. Diaminobenzidine (DAB) 反応液； Tris-HCl buffer

0.05M Tris (hydroxymethyl) aminomethan

HCl でpH 7.6に調整

B. 操作

ラットを全身麻酔下に断頭後ただちに下腹部正中切開で開腹し、精巣上体を摘出した。精巣上体を起始部、頭部、体部、尾部の4部に切断し、さらに頭部を3ヶ所、体部を2ヶ所に分割した(図-2)。それぞれを約1mm角に細切した後、液体窒素で冷却したフロン中にて瞬間凍結し、使用時まで-80℃の低温槽に保存した。同組織を-35℃の真空凍結乾燥器内にて72時間凍結乾燥を行なった後、80℃の高温槽でパラホルムアルデヒドの蒸気固定を1時間施し、エポキシ樹脂に包埋した。

エポキシ樹脂が硬化した後、ウルトラミクロトーム(Reichert-Nissei, Ultracut N)にて1 μ mの切片を作成し、加熱処理によりスライドガラス上に添付した。Sodium methoxideによりレジンを除去し、PBSAで20分間洗浄した後、ペルオキシダーゼのブロッキングのため、0.3%過酸化水素水メタノール溶液に30分、さらに非特異反応を防ぐため2%正常ヤギ血清に20分間反応させた。洗浄後、次に記した1次抗体に4℃で72時間反応させた。1次抗体として、ウサギ抗ラットカテプシンB抗体(2 μ g/ml)、ウサギ抗ラットカテプシンH抗体(5 μ g/ml)、ウサギ抗ラットカテプシンL抗体(20 μ g/ml)をそれぞれ用いた。1次抗体の希釈液としてTPBS(上記)を用いた。2次抗体としてビオチン化ヤギ抗ウサギIgG抗体を37℃で20分間反応させた後、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(ヒストファイン酵素試薬)を同じく室温で20分間反応させた。Tris-HCl bufferで軽く洗浄した

後、発色反応は0.0125% DAB に0.002% 過酸化水素水を添加した
0.05M Tris-HCl buffer 中で行なった。

3) 酵素活性

A. 試薬

酵素活性測定に際し以下の試薬を用いた。

a. 抽出液

0.05M Sodium Acetate Buffer (pH 5.2) を用いた。

b. Buffer : カテプシンB、カテプシンLの活性測定時には0.4M

Sodium Acetate Buffer (pH 5.5) を、カテプシンHの活性測定時には0.4M Phosphate-Na Buffer (pH 6.8) を用いた。

c. Medium : Buffer 12.5ml、0.2M システイン 2ml、蒸留水22ml を 混合して用いた。

d. 酵素基質

カテプシンBの酵素基質としては Z-Arg-Arg-MCAを用いた。カテプシンHの基質としてはArg-MCAを用い、エキソペプチダーゼ活性として測定した。カテプシンLの特異基質はないため、Z-Phe-Arg-MCAを用い、カテプシンBと合わせた活性として測定した。

Z : Benzoyloxycarbonyl 基

MCA : Methylcoumarylamide

Arg : Arginine

Phe : Phenylalanine

e. Stopping Reagent

$\text{ClCH}_2\text{COONa}$ (クロロ酢酸ナトリウム) を0.1Mの割で加えた
0.1M Acetate Buffer を用いた。

B. 精巣上体全体での活性測定

ラット 5 匹を全身麻酔下に断頭後ただちに開腹し精巣上体を摘出した。以下の操作は水中で行なった。頭部 (zone I-IV)、体部 (zone V, VI)、尾部 (zone VII) の3ヶ所に分割し、それぞれを約 1 mm角に細切した後、各組織の重量の4倍量の抽出液を加え、Ultrasonic homogenizer で約 1 分間粉碎した。10500g で20分間遠沈した後、上清を検体として用いた。検体 (Z-Arg-Arg-MCA では $10\ \mu\text{l}$ 、Z-Phe-Arg-MCA では $1\ \mu\text{l}$ 、Arg-MCA では $20\ \mu\text{l}$) にMediumを加えて総量 $750\ \mu\text{l}$ とし 37°C 恒温槽にて2分間preincubationした後、酵素基質を加えてさらに6分間 Incubation してStopping reagent 1mlを加えて反応を終了した。蛍光分光光度計で酵素の作用により遊離したAMC (Aminomethylcoumarin) の濃度として測定した (Ex: 370nm, Em: 460nm)。検体中の蛋白量をLowry法¹¹⁾により測定し、蛋白量あたりの活性として計算した。

C. 精巣上体上皮および精液の測定

同様にラットを断頭固定し、精巣上体を摘出した。各組織を1mm角に細切した後精巣上体管内の内容液を洗浄するため抽出液中に懸濁し、1000gで2分間遠沈した。上清を捨ててさらに抽出液を加え遠沈を行なった。以上の洗浄操作を5回繰り返して、上清中の精子がほぼ消失したのを確認した後、沈渣に組織の4倍量の抽出液を加え Ultrasonic homogenizer で粉碎後、前記と同様に遠沈し、上清を検体とした。以下の測定法を同様に行なった。同時に精液中の活性を測定するため、精液の一部も検体とした。

2 研究成績

1) 免疫組織化学

精巣上体起始部では主細胞がほとんどを占める。その背は高く、精巣上体管腔は最も細くなり、内腔に精子を認める。システインプロテアーゼの免疫組織化学的局在を光顕的に検索してみると、カテプシンBの免疫反応性は上皮細胞の核上部を中心に顆粒状の強い陽性反応として認められた(図3a)。カテプシンHの免疫反応性はカテプシンBと同様に顆粒状に見られたがその数は少数であり反応も弱かった(図3b)。カテプシンLはカテプシンB、Hと異なり、この部の上皮には陰性であったが、間質のマクロファージや血管壁に陽性であった(図3c)。

精巣上体頭部におけるシステインプロテアーゼの局在は起始部と同様の所見が得られた。本領域ではカテプシンBの免疫反応性が最

も強く、カテプシンLの反応性はほとんど認められなかった（図4a-c）。カテプシンBの免疫陽性反応は主細胞の核上部を中心に核周囲に及ぶたくさんの小顆粒反応として認められた（図4a, d）。その数、顆粒の大きさ、反応の強さとも起始部より増加していた。カテプシンH陽性の顆粒はやはり主細胞の核上部に見られたがその数はカテプシンBより少なく、顆粒の大きさも小さかった（図4b, e）。しかし、出現頻度は少なかったが、核周囲にカテプシンHに強陽性の粗大な顆粒を豊富に有する細胞が見られた（図3e）。この細胞は、おそらく主細胞ではなく尾部に多く見られる明調細胞と思われた。同細胞は頭部の尾側に多く出現していた。カテプシンLの反応は上皮では細胞質にびまん性の染色性を示す細胞が認められたが、むしろ上皮細胞より間質のマクロファージに分布していた（図4c, f）。主細胞のカテプシンBの免疫反応性はこの部位が最も強い（図4a）。しかし、カテプシンBの免疫反応の濃度は明調細胞では主細胞に比べて弱かった（図4d）。

精巣上体体部では、管腔径はより増大し、内部に多数の精子を含む。この領域ではシステインプロテアーゼの免疫反応陽性細胞は主に主細胞である（図5a-c）。しかし、カテプシンBの免疫反応陽性顆粒は数、大きさともに頭部に比べ減少し、カテプシンHのそれが上昇した（図5a, b, d, e）。これら酵素の陽性反応は頭部同様核上部を中心に顆粒状の反応として認められたが頭部に比較するとその範囲

は限局したものであった。カテプシンLに対する反応は頭部と同様で、細胞質にびまん性の染色性を示す上皮細胞が見られた。間質にはマクロファージでの強い反応が観察された(図5c, f)。

精巢上体尾部ではカテプシンBの免疫反応性は全体的に弱くなり、主細胞の核上部に点在する数少ない顆粒状の陽性反応と明調細胞の核周囲に免疫反応性の低い顆粒状の反応として見られるのみであった(図6a,d)。一方カテプシンHに対する免疫反応性はこの部位で最も強く見られた。主細胞での反応性はカテプシンBと同様に弱い、明調細胞においては細胞基底部から核上部にかけて粗大顆粒状の強い陽性反応が見られた(図6b,e)。カテプシンLに対する反応性はこの領域の上皮細胞でもびまん性に認められたが他の領域に比べ明らかに強いものであった(図6c,g)カテプシンL陽性の細胞はその形から主細胞と思われた。間質のマクロファージにも陽性反応が認められた。

2) 酵素活性

A. 精巢上体全体での活性測定

測定結果は表2および図7に示した。カテプシンB(基質はZ-Arg-Arg-MCA)の活性は頭部で最も強く、体部、尾部と末梢に行くに従って活性の低下がみられた。カテプシンH(基質はArg-MCA)の活性は尾部で最も高く、体部での活性が最も低かった。これらは免疫組織化学による検討結果とほぼ一致するものであった。カテプ

シンL（基質はZ-Phe-Arg-MCA：活性としてはカテプシンBとLとを含むが主にLに基づく）の酵素活性はカテプシンBの活性とほぼ同様の傾向が見られた。

B. 精巣上体上皮および精液の測定

精巣上体上皮での測定結果を表3、図8に示した。同時に同部位で採取した精液の活性も示した。カテプシンBおよびHの活性は精巣上体全体での測定とほぼ同様の傾向を示した。精液中のこれらの酵素の活性は低く、上皮における活性の約20分の1程度であった。しかし、精液中におけるカテプシンLの活性は比較的強く認められた。

第4章 各種病態における精巣上体のシステインプロテアーゼの局在に関する研究

1 研究対象および方法

1) 実験動物

9週令の Wister 系雄ラット（体重約270g）を用いた。飼料や水分は自由に摂取させた。

2) 精管結紮

ラットをペントバルビタールで麻酔後、下腹部正中切開で開腹し、両側の精巣を露出した。精巣および精巣上体への血流を損傷することなく精管を精巣上体尾部より約2cmの位置で4-0絹糸にて結紮した。28日後断頭し、精巣上体を摘出し、正常ラットと同様の手技にて免疫組織化学的な検討を行なった。

3) 精巣摘除

麻酔、切開は精管結紮群と同様に行なった。精巣を露出した後、精巣上体への血流を損傷しないよう注意しながらまず精巣に流入する動静脈を精巣上体より末梢にて結紮切断し、次いで精巣輸出管を結紮切断し、精巣を摘出した。28日後断頭し、正常ラットと同様の手技にて免疫組織学的検討を加えた。

4) 精巣輸出管結紮

精管結紮時と同様に麻酔、開腹し、精巣を露出した。精巣に向かう血流を温存しながら精巣輸出管を4-0絹糸にて結紮、陰嚢内に還納

した。28日後全身麻酔下で断頭し、上記と同様に処理した後、免疫組織学的検討に供した。

5) 精巣高位固定

精管結紮時と同様に麻酔、開腹し、精巣を露出し、精巣への血流を障害しないよう注意しながら周囲を剥離し、両側とも肝直下の腹膜に絹糸にて縫合固定した。7日後、固定した絹糸を切断し両側精巣を陰嚢内に還納した。さらに21日後、断頭し、精巣上体を摘出し、同様の方法を用いて免疫組織学的に検討した。

2 研究成績

1) 精管結紮

精管結紮4週間後の精巣上体起始部では対照群に比べてカテプシンB,H,Lの免疫反応性が明らかに上昇した(図9a-c)。カテプシンBの陽性反応は上皮細胞の核周囲から管腔側にかけて粗大で濃度の濃い顆粒として観察された(図9a)。対照群の上皮にはカテプシンHの免疫反応性は極くわずかにみられたが(図3b)、本実験群では同細胞の核上部を中心にたくさんの顆粒状の陽性反応として認められた(図9b)。カテプシンLの免疫反応性は対照群では間質マクロファージにのみ認められたが、本群では弱いながら細顆粒状の陽性反応が上皮にもみられた(図9c)。精巣上体頭部においてもこれらシステインプロテアーゼの免疫反応性は上昇した(図9d-f)。特に、頭部の最も体部側では明調細胞の出現数が対照群に比し増加した(図9e)。

対照群尾部の上皮でみられた明調細胞のようにカテプシンHに対する免疫反応陽性の粗大顆粒を核周囲に豊富に備えた同細胞が本領域（頭部）の上皮にも比較的多数認められた（図9e, 10a）。

精巣上体体部および尾部においては対照群に比して著大な変化は見られなかった（図10b-d）。

2) 精巣摘除

精巣摘除術4週後の精巣上体では管腔が狭小化し、管腔内には精子を認めず、上皮も萎縮していた。カテプシンB,H,Lの免疫反応性は全ての領域において既に低下していた。しかし精巣上体頭部の一部の領域では他の領域と異なり、興味深い変化が見られた。すなわちカテプシンHの免疫反応性はこの部位では他の部位と同様に萎縮した精巣上体管上皮において明瞭に低下していたが、カテプシンBおよびLの反応性はむしろ上昇していた。上皮細胞管腔側では散在性に存在する顆粒状の、また、基底側では大型の強陽性物質として認められた（図11a-e）。基底側の顆粒の分布は不規則であり、活性の強さ、顆粒の大きさとも対照群に見られたものとは明らかに異なっていた。

3) 精巣輸出管結紮

精巣輸出管結紮4週間後の精巣上体は全体としてシステインプロテアーゼの免疫反応性は低下していた。しかし、起始部においてはこれら酵素の免疫反応性は他の領域と異なり、明らかに上昇していた

(図12a-c)。最も特記すべき変化は尾部において観察された。対照群ラットの尾部では明調細胞が数多く出現するのが認められたが

(図6)、本実験群では典型的なカテプシンH陽性の明調細胞が見られなかった(図12d-f)。また、精巢上体管の径は小さくなり、背の高い上皮細胞が大部分を占めた。これらの上皮細胞では対照群ラットの精巢上体尾部における主細胞にみられたシステインプロテアーゼの免疫反応と同様の反応が認められた。すなわちカテプシンB、Hにおいては核上部を中心とする小顆粒状の陽性顆粒を認め、カテプシンLの反応は細胞質の均質な反応として認められた。

4) 精巢高位固定

1週間の精巢高位固定術後の無精子状態による変化は精巢輸出管結紮時とほぼ同様であった。すなわち、起始部および頭部でのシステインプロテアーゼの免疫反応性の増強と尾部における明調細胞でのカテプシンH陽性顆粒の消失が観察された(図13a-f)。

第5章 考察

1 実験方法について

1) 免疫組織化学

各システインプロテアーゼ抗体の作製のため、カテプシン B およびカテプシン L は Towatari⁷⁸⁾らの方法によりラット肝から、また、カテプシン H の抽出は Kirschke⁷⁶⁾らの方法により精製した。これら酵素の精製過程では、Barrett¹¹²⁾ら、Kirschke⁷⁶⁾らの方法に従って、Z-Arg-Arg-MCA, Arg-MCA, Z-Phe-Arg-MCA を基質としてそれぞれの酵素活性を測定しながら行なった。このようにして約2000倍の純度で精製したカテプシン B、H、L と Freud の完全アジュバンドとを混合した液を抗原としてウサギの皮下に2週間間隔で3回注射した。最終免疫から一週間後に試験採血し抗体が上昇したのを確認後、本採血を施行した。各血清はアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。さらにこれら抗体が互いに交差反応がないことも確認した^{86,113)}。(以上の操作は順天堂大学生化学第2講座で行なわれたものである。本研究では同講座木南英紀教授のご好意により譲り受けた抗体を用いた。)

免疫組織化学で問題となるのは組織の固定と抗原性の保存である。固定を良くすると組織中の抗原性は減弱する。このため本実験では組織を液体窒素で冷却したフレオン (Fleon22、液体フレオンで-150℃以下となる) 中で急速に凍結した後、凍結乾燥機にて3日間かけ徐々

に乾燥した。同標本をパラフォルムアルデヒドの蒸気で1時間固定（80℃恒温室）した。本法はGrube¹¹⁴⁾らが開発した方法で、細胞内膜（限界膜）に囲まれた物質の同定に適している。固定した標本をさらにエポキシ樹脂に包埋する。このことにより準超薄切片の作成や、細胞内の構造を観察することが可能となるとともに、連続切片の作成が容易になる。切片を熱によりスライドガラスに添布した後、エポキシ樹脂の除去は Mayor¹¹⁵⁾らの方法に従って行なった。免疫染色はABC法を用いた¹¹⁶⁾。抗原抗体反応を施行した後、組織の洗浄にはイオン反応により生ずる疑反応を防ぐため塩濃度を高くし、さらに表面活性剤（Tween 20）を加えた洗い液で行なった。

2) 酵素活性

酵素活性測定はBarrett¹¹²⁾およびKirschke⁷⁶⁾の方法で行なった。

MCA の構造式を図14に示す。この方法で最も問題となったのは酵素活性および蛋白量に対する精巢上体内の精液の影響であると思われた。精巢上体上皮と精巢上体管腔内容物とを分離する方法として、トリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白分解酵素により細胞を分離する方法^{117,118)}や、上皮細胞のリソゾーム分画だけを抽出する方法¹¹⁹⁾精巢上体管内をBufferで還流する方法¹²⁰⁾などが考えられるが、いずれも手技が複雑で、ある程度の時間を要するため、酵素の活性が失われる可能性がある。そこで本研究では比較的短時間に容易にできる方法として、精巢上体を細切して遠沈、洗浄を繰り返す方法を施行

した。全ての内容液を洗い出すのは困難であるが、この方法によりある程度精巣上体管内の精液の蛋白量や酵素活性への影響を回避するとともに精液そのものの活性も測定することが可能であったものと思われる。

2 結果について

1) 精巣上体上皮による蛋白の吸収について

Androgen-結合蛋白はSertoli細胞で合成分泌される蛋白で、精巣輸出管を経て精巣上体に流入することが知られている。Gerardら¹²¹⁾は¹²⁵Iで標識したAndrogen-結合蛋白を用いこれらの蛋白の一部は精巣輸出管の上皮でも吸収されるが、ほとんどはリセプター依存性に精巣上体頭部の主細胞に吸収されることを示した。Transferrinは精巣のSertoli細胞から分泌される蛋白で、精子の輸出経路において精子の成熟に重要な働きを持つものと考えられている¹²²⁾。Djakiewら²¹⁻²²⁾はIn vitroの実験とMicropunctureおよび金でラベルしたTransferrinを用いて精子排泄路のなかでのこの蛋白は精巣上体頭部から体部にかけて急激に減少すること、ラベルした蛋白は頭部から体部にかけての主細胞のCoated vesiclesやEndosome内にリセプター依存性に取り込まれることを見いだした。さらに彼らは同様に取り込まれる α 2-macroglobulinは最終的にリソゾーム内で分解されるのに対し、Transferrinは管腔内に再分泌されることを明らかにした。以前から精巣上体には精子の成熟に重要な役割を持つ糖蛋白の存在が知られ

ている。それらはAcid epididymal glycoprotein (AEG)²⁸⁾、Forward motility protein²⁹⁾、protein DE³⁰⁾、protein 4³¹⁾、32K protein³²⁾、37K dalton glycoprotein³³⁾などの名称がついているが、これらの物質が全く同一のものであるのか、類似した別の物質であるのかは不明である。これらの物質は精巣上体頭部から体部の近位部の主細胞で合成分泌され精子に結合してその役割を果たすことが知られている。

Kopecny¹²³⁾らは³Hでラベルした糖蛋白をマウスとモルモットに注射し、そのゆくえを電顕的に追跡したところ、その多くは精巣上体内で精子の頭部に付着するが一部は精巣上体尾部の明調細胞に吸収されることを見いだした。AbeらはPAS染色陽性の物質（おそらくは糖蛋白で上述の糖蛋白と同一あるいは類似の物質と考えられる）が精巣上体頭部で分泌され精子に付着し、付着できなかった物質の多くは体部の主細胞に吸収されることを示唆した⁵⁸⁻⁶⁰⁾。また彼らはこれらの糖蛋白の一部は尾部の明調細胞でも取り込み分解されると考えた¹²⁴⁾。精子はその成熟過程において精巣上体尾部で細胞質小体を放出する。Hermon²³⁾は電子顕微鏡での詳細な検討で細胞質小体中に見られる構造物が精巣上体尾部の明調細胞のリソゾーム内にも見られること、細胞質小体に付する抗体を用いた免疫組織化学的検討で尾部の明調細胞が陽性にでることからこの細胞質小体の吸収が尾部明調細胞の主な役割の一つであると推論した。上述した特殊な蛋白だけでなく、蛋白の電気泳動法による各部位での組成の違いから多く

の蛋白が精巢上体内で吸収されるものと考えられている²⁷⁾。

2) 正常ラットの精巢上体におけるシステインプロテアーゼの分布に関して

精巢上体の上皮細胞には古くからリソゾームが豊富に存在することが報告されてきた⁶⁾。しかし、リソゾームプロテアーゼの局在や活性についての研究はこれまでに全くなされていない。精巢上体上皮細胞の主たる細胞は主細胞であり、その形態的特徴の一つは管腔側に良く発達した微絨毛を有していることである。管腔側に発達した微絨毛を備えた細胞として消化管、尿細管、甲状腺濾胞などの上皮細胞が知られ、これら細胞は物質の吸収機能が主ではあるが分泌機能をも有することが知られている。さらにこれらの細胞には核上部から管腔側にかけて豊富なリソゾームが存在することが知られている。精巢上体上皮における主細胞も、特に起始部や頭部においては水の吸収、 α -2-macroglobulin, Androgen 結合蛋白など精漿中に溶解した蛋白、糖蛋白、電解質の吸収と分解に関与することが報告されてきた^{9,16-22)}。本実験においては同細胞の核上部から管腔側にかけてたくさんの細顆粒状の構造物にカテプシンBが局在することが明かとなった。主細胞におけるカテプシンB陽性顆粒の出現頻度は精巢上体の部位によって異なり起始部や頭部に多く、尾部では明らかに減少した。リソゾームの機能の一つとして消化管や尿細管上皮細胞で明らかのように、取り込んだ物質を分解することが知られている。おそ

らくカテプシンB陽性顆粒の出現頻度が部位によって異なることは部位によって取り込む物質が異なること、また、その量的な違いを反映しているものと思われる。さらに興味あることに主細胞のカテプシンB陽性顆粒にはカテプシンHの免疫反応性は起始部や頭部ではほとんど陰性であったが体部から尾部にかけては陽性を示す顆粒の数が増加した。このことは、体部から尾部において主細胞が取り込み分解する物質（分解する基質）が頭部と異なることを示すものと思われる。

明調細胞は主細胞程数は多くないが、精巣上体の尾部に多く認められる細胞である。明調細胞は主細胞とは異なり管腔側に微絨毛を有さず、核周囲に多くのリソゾームを持つ細胞として知られる。明調細胞はカテプシンHに強陽性の粗大な顆粒を核周囲に豊富に有していたが、カテプシンBやLの反応性はほとんどみられなかった。明調細胞は主細胞と同様に多くのリソゾームを有するが、微絨毛を有する主細胞とは異なりendocytosisによる物質の吸収分解に関与するよりも、大きな構造物の取り込みと分解（おそらくmacroengulfmentによる）に関与するものと思われる。Alexanderらが報告しているような精子の取り込み分解³⁸⁾や精子から放出される細胞質小体²³⁾、糖蛋白などの大きなものを取り込んでいることは十分考えられる。本実験では精巣上体の上皮細胞において明らかな顆粒状の構造物にカテプシンLの免疫反応性を認めることはできなかった。一部の主細胞

にびまん性の陽性反応が見られたが現在のところいかなる構造物に局在するかは不明である。今回検索した3種類のシステインプロテアーゼはリソゾームプロテアーゼとして良く知られている。しかし、精巣上体組織ではこれら酵素の分布は明らかなheterogeneityを示した。このような局在におけるheterogeneityは他の組織でもみられる。例えば十二指腸上皮細胞のリソゾームにはカテプシンBが局在するがカテプシンHやLは認められない。カテプシンHやLは十二指腸粘膜固有層のマクロファージに強く局在する¹¹⁰⁾。脾臓B細胞とA細胞のクリノファジー小体（リソゾームの一種）にはカテプシンBが局在するがカテプシンHはA細胞のクリノファジーのみに認められる¹⁰⁴⁾。このように、システインプロテアーゼの分布の違いは様々な組織で見出され、それぞれの細胞のリソゾームで分解される基質の違いを示すものと考えられている¹⁰⁴⁾。それ故、精巣上体におけるこれら酵素の分布の違いは部位により、また、細胞により取り込む基質が異なることを意味するものと思われる。今回の免疫組織化学的検索によってカテプシンBは頭部の特に主細胞に、カテプシンHは尾部の明調細胞を中心に分布することがわかった。この事実は活性測定の結果ともよく一致する。カテプシンLについては活性測定で精巣上体の各部位で強い活性が認められた。精漿と上皮を分けてシステインプロテアーゼの活性を測定した結果、精漿ではカテプシンBとHの活性はほとんど測定できなかったが、（上皮における活性の1/20）カテプシンL

の活性は比較的高かった。培養マクロファージを用いてカテプシンLの細胞内輸送を解析した結果、合成されたカテプシンLの40%は培養上清に分泌されることが報告されている¹²⁵⁾。このことはリソゾームシステインプロテアーゼが細胞外に分泌されることを示すものである。また、精子は精巣内から精路中に放出される前にSertoli細胞に一時的に付着して余分な部分を切り離すことが知られているが、精子がSertoli細胞から離れるときにその付着部分を解離する物質としてCyclic protein-2 (CP-2) がみつまっている¹²⁶⁻¹²⁷⁾。さらに最近の研究でそのCP-2がカテプシンLの前駆体であることがわかっている¹²⁸⁾。それ故、精漿中に測定されたカテプシンLの活性の一部は精巣のセルトリ細胞から、また、その一部は精巣上体の上皮細胞から分泌されたカテプシンLに基づくものと考えることができよう。分泌されるカテプシンLが前駆体であることを考慮すれば¹²¹⁾、精巣上体のほとんどの上皮細胞で同酵素の免疫反応性が陰性であることと良く一致する。さらに精子は精巣上体尾部において細胞質小体を精液中に放出するが²³⁾この過程へのカテプシンLの関与も否定できない。システインプロテアーゼインヒビターが精液中に存在することが報告されている¹⁰²⁾。しかし、本研究で精巣上体管内にはシステインプロテアーゼの活性が存在したことから、これらのインヒビターは精路の最後の部分で分泌されるものと思われる。この事実も精巣上体管内で、システインプロテアーゼが何らかの作用を有しているとする

る仮説を支持するものと思われる。

3) 各種病態におけるラット精巣上体のシステインプロテアーゼの分布に関して

A. 精管結紮

精管結紮により、精巣上体内の精子や精漿成分は排泄経路を失う。精管結紮後のシステインプロテアーゼの局在の変化を検討した結果、精巣上体頭部と起始部の上皮でカテプシンB, H, Lの免疫反応陽性顆粒が増加した。しかし、体部や尾部では明瞭な局在の変化は認められなかった。精管結紮後の精巣上体の組織学的変化は動物種によって異なり、また同じ種でも個体によって異なることが知られている。サルにおける研究でRatna Kumar¹²⁹⁾らは精管結紮6ヵ月後の精巣上体で管腔の拡大と主細胞、狭細胞における管腔側での食胞の増加、管腔内でのマクロファージによる精子の貪食を認めた。Alexander⁴⁶⁾はサルの精管結紮1、3ヵ月後および3、5、7年後の精巣上体および精巣輸出管を電顕的に観察し、マクロファージによる精子の貪食が主に精巣輸出管および精巣上体頭部で行なわれること、それらは1、3ヵ月後には見られず長期間を経て出現してくることを示した。さらに蛍光抗体法により補体を検出し、精管結紮後の精子貪食の反応への免疫の関与を示唆した。ウサギでの検討では15日後の短期間では形態的な変化は見られないが、15ヵ月後には精巣上体頭部を中心に主細胞内に多くの食胞やリソゾームが出現し上皮細胞での吸収機能が

亢進していることが示唆された¹³⁰⁾。Flickingerら⁵¹⁾はラットの精管結紮後7ヶ月間にわたり精巣上体の形態変化を電顕的に観察した。33匹のラットを用いたが結果は同一のものではなかった。すなわち20匹においては結紮部位での精子肉芽腫の形成以外には精巣上体の著名な形態的变化はおこらなかったが、残る13匹では間質、管腔内へのリンパ球、マクロファージの浸潤、上皮細胞における多くの巨大なリソゾームの出現が見られた。上皮細胞は形態からは主細胞なのか明調細胞なのかは鑑別しがたかった。また精巣上体にこうした変化を呈した群では精巣の萎縮、精子産生能の低下、血中での抗精子抗体の上昇が見られ、これらの所見が免疫学的機序からおこるものであることを示唆した。Alexander³⁸⁾は比較的短期間（10週間まで）の観察を電顕および酸性フォスファターゼの活性を用いて行なった。電顕では5週目より頭部の主細胞の核上部にリソゾームと思われる巨大な顆粒が出現した。また酸性フォスファターゼは同一部位で活性の上昇を示した。一方尾部には形態的变化はおこらず、また管腔内液の白血球やリンパ球などの増加も見られなかった。ラットにおいては精管結紮後初期の段階での精液や精子の処理には精巣上体の中では頭部の主細胞が中心として働いていると考えられた。

今回の我々の実験では精管結紮後観察までの期間が4週間と短くAlexanderが捕えた変化より前の段階を見ていると考えられる。我々の観察した精巣上体頭部にだけに見られるシステインプロテアーゼ

の分布の増加はAlexander³⁸⁾の観察結果を裏付けるものと考えられる。

B. 精巣摘除

精巣摘除により、精巣から精巣上体への精液の流入はなくなり、またテストステロンの分泌も消失する。精巣上体は血液および精巣輸出管を通して流入する精液の両方からテストステロンの作用を受けることが知られている。これらが消失することにより精巣上体上皮の吸収分泌、代謝に変化がくる。Holland¹³¹⁾らは精巣輸出管結紮、片側精巣摘除術、両側精巣摘除術を行なったラットおよびマウスで精巣上体上皮の分泌する蛋白の変化を詳細に検討した結果、精液の流入の遮断により精巣上体上皮から分泌されなくなる蛋白や逆に新たに分泌されるようになる蛋白が存在することを示した。そうした上皮細胞の機能的変化はテストステロンの静脈内投与でも防止できないことからテストステロン以外の未知の蛋白により精巣上体上皮の機能が制御されている可能性を示した。しかし精巣上体上皮の形態や代謝、機能の多くがテストステロンにより維持されていることは古くから知られている。精巣摘除後長期を経過した後の精巣上体の形態的变化はよく知られていないが、Moore⁵⁴⁾らは精巣摘除後短期間（2週間）での変化を検討している。彼らは精巣摘除後の精巣上体上皮の形態および特にその吸収機能に着目し、電顕的観察およびHRPをマーカーとして用い、主細胞の吸収機能の亢進および上皮の萎縮、管腔の狭小化を見出した。吸収機能の亢進は管腔内に残存し

た物質の吸収および自己消化に基づくものと考えられた。こうしたことから主細胞はテストステロンに対する依存性が強く、テストステロンの消退により明調細胞に機能的、形態的に類似してくるものと考えられた。本研究においても精巣上体全体にわたる管径の狭小化と上皮の萎縮が認められた。術後4週間の時点では既に上皮を構成する細胞の数も明瞭に減少し、システインプロテアーゼの免疫反応性も低下していた。これはテストステロンによって維持されていた上皮細胞の機能が低下してきたためと考えられる。しかし精巣上体頭部の末梢側においては上皮細胞にカテプシンBやLの強い免疫陽性反応が認められた。これら陽性反応の形態は円形ではなく様々な形態を取り、その細胞内局在も不均一であった。このような免疫反応を示す細胞は、その形態からは主細胞か明調細胞であるか不明であった。おそらく細胞変性に陥る過程で生じたリソゾームの反応性の上昇と思われる。これらの細胞でのリソゾームの局在は正常の上皮のように核上部に限局しておらず、特に大きな顆粒はむしろ基底側に多く存在したことから吸収機能の亢進よりむしろautophagyに関与しているものと思われる。ホルモン消失に伴う細胞死の過程にリソゾームが関与する可能性があり、興味深い結果と思われる。

C. 精巣輸出管結紮および精巣高位固定

精巣輸出管を結紮することで精巣からの精子をはじめとする精液の流入が遮断される。一方、一過性の精巣高位固定術により一時的

な無精子症の状態を作れることが知られており^{61,62,132)}、精液の流れを遮断せずに精巣上体内での無精子症を作り出すことができる。精巣上体での酵素の機能に対する精子そのものの影響を見るためのモデルとしてこの実験を行なった。いずれの場合にも血中テストステロンの濃度には影響はなく、精巣摘除術後に見られた精巣上体管を構成する細胞の数の減少はない。

システインプロテアーゼの分布は両群で類似した変化を示した。すなわち起始部、頭部においてはカテプシンB、H、Lともに免疫反応の増強が見られた。本来精巣から流入する液成分を吸収するとされる同部位で精巣輸出管を結紮した場合にも蛋白分解酵素の増強が見られるのは非常に興味深い。Paulson¹³³⁾らは精巣輸出管を結紮したラット精巣上体頭部の主細胞の食胞を電顕で定量的に観察した結果正常ラットに比べて細胞内の吸収にあずかる小器官は減少せずむしろ基底膜付近ではEndocytosisに関与すると考えられる被覆小胞が増加してくるのを観察した。この変化に対し、彼らは細胞でのEndocytosisとExocytosisは絶えず並行して行なわれており、精巣輸出管結紮により管腔内から摂取できなくなった物質を血管などから吸収するようになるのではないかと考えた。我々の観察で精巣上体起始部でのリソゾーム酵素の陽性顆粒の増加がなぜおこってくるのかは現在のところ不明である。さらに、精巣輸出管結紮後早期の変化として起始部の上皮細胞の萎縮、変性、壊死などがおこることが知

られているが^{56,57)}、今回の検討では4週間後の変化を見ているため、自己消化や壊死によるカテプシン陽性反応の亢進とは考えがたい。Abe⁵⁸⁾らはマウス精巣輸出管あるいは精巣上体を結紮し、精巣上体に現われる形態的变化を観察した。彼らは精巣上体を頭部3ヶ所、体部、尾部の5ヶ所に分割してそれぞれの場所で結紮実験を行なったところ Segment IIより中枢側で結紮した場合に約7日後から精巣上体体部の主細胞内にリソゾームと考えられる巨大な顆粒が多数出現することを見いだした。これらの顆粒はPAS染色で濃染し、頭部 (Segment II) で分泌される糖蛋白と考えられた。これらの糖蛋白は正常のマウスでは精子と結合し、精子の成熟に重要な役割を果たすと考えられるが、精巣輸出管結紮により精子と結合できなくなり、体部の主細胞に吸収されるものとされた。ラットにおいてはHolland¹³¹⁾らが精巣輸出管結紮後の精巣上体体部に巨大な上皮細胞が出現することを認めているが、Abeらがマウスで観察したのと同じ変化かどうかは不明である。我々の観察ではこのような巨大な上皮細胞や大きなリソゾームは見られなかった。Hollandらがラットで見いだした変化は8ヵ月後であり、動物種により又結紮後の期間により形態が異なるものと考えられる。精巣上体尾部に多数見られる明調細胞の生理的機能については未だ詳細は不明であるが、精子が精巣上体内で放出する細胞質小体の分解産物²³⁾あるいは精子そのものの吸収分解³⁸⁾に参与している可能性が示唆されている。三田¹²⁴⁾らはマウスにおける実験か

ら明調細胞の主な働きは精巣上体頭部で産生される糖蛋白の吸収であると考えた。本実験では、精子の消失した状態（精巣摘除、精巣輸出管結紮、精巣高位固定）ではいずれも尾部の明調細胞特有のカテプシンHの免疫反応は著しく減少した。これは、明調細胞そのものの脱落あるいは消失なのか、明調細胞内でのリソゾームの減少によるものか、カテプシンHの発現量が減少しただけなのかは不明であるが、少なくともラット精巣上体においては、これらの細胞の吸収機能が精巣上体内の精子の存在に強く依存していることは間違いないものと思われる。

第6章 総括

精巣上体は男性生殖機能において重要な役割をもつものとされながら未だその機能、役割については不明な点が多い。本研究では精巣上体内のリソゾームシステインプロテアーゼであるカテプシンB、H、Lに注目しその免疫組織化学的および酵素活性学的局在を検討した。以下にその結果を記す。

1.正常ラットでの免疫組織化学的な検討で、カテプシンBは頭部側に多く分布し、特にその主細胞に豊富な顆粒状の陽性反応として認められた。それに対しカテプシンHは尾部に多く分布し、特に明調細胞に強い局在が観察された。カテプシンLは間質マクロファージに分布し、上皮内では一部の細胞の細胞質内にびまん性の陽性反応として観察されるのみであった。

2.正常ラットでの酵素活性測定ではほぼ形態学的検討に一致した所見が得られ、カテプシンBは頭部に強い活性を示し、逆にカテプシンHは尾部に強い活性を示した。また精漿中にはカテプシンLの活性が観察され、精巣あるいは精巣上体上皮による分泌の結果を反映するものと思われた。

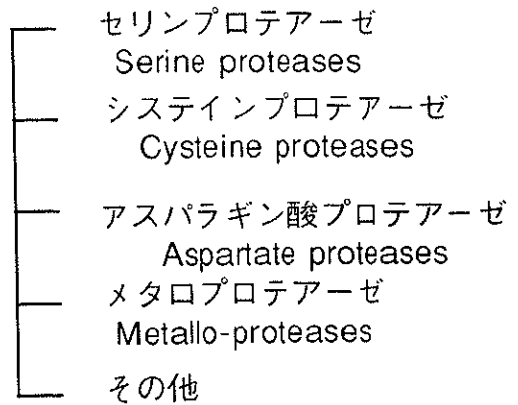
3.精管結紮したラットの精巣上体では、尾部におけるシステインプロテアーゼの分布には変化はみられなかったが、頭部においてはこれら酵素の免疫反応の増強が認められた。

4.精巣除去したラットの精巣上体は全体に萎縮し、上皮を構成す

る細胞の数の減少が顕著であった。これら細胞でのシステインプロテアーゼの免疫反応性も低下していたが一部の上皮細胞では未だ自己融解像に一致してカテプシンBおよびLの強い免疫反応性が見られた。

5.精巣輸出管結紮、精巣高位固定を施行したラットでは、頭部にカテプシンB、H、Lの免疫反応性の増強が見られ、また、尾部においては明調細胞に特有なカテプシンHの免疫反応が失われていた。

a. 活性基による分類



b. 切断様式による分類

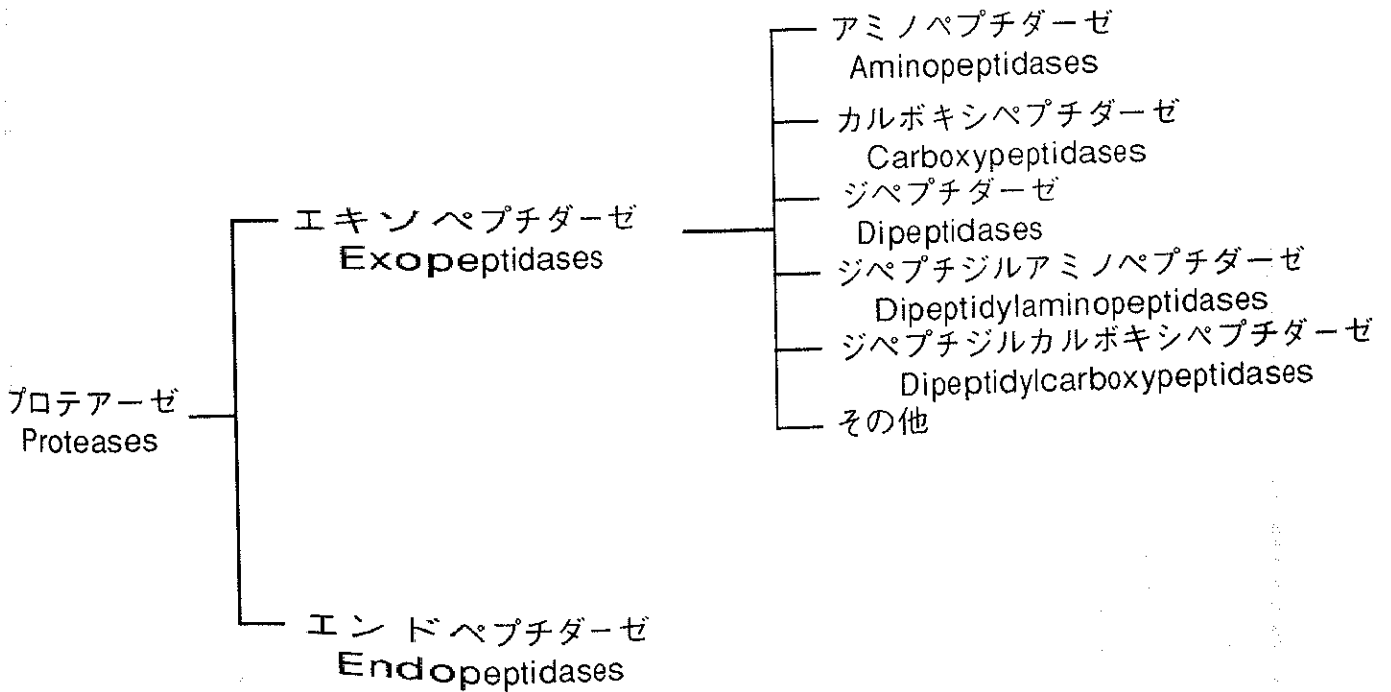


図1 プロテアーゼの分類

表1 リンゾームシステムプロテアーゼの性質、機能

	カテプシンB	カテプシンH	カテプシンL
分子量	29000 (重鎖 26000)	28000 (重鎖 23000)	29000 (重鎖 24000)
等電点	4.9~5.3	6.5~7.5	5.8~6.1
最適 pH	6.2	6.5	5.5
活性型	ジペプチジルカルボキシペプチダーゼ作用	アミノペプチダーゼ作用：強	
	エンドプロテアーゼ作用：中等度	エンドプロテアーゼ作用：弱	エンドプロテアーゼ作用：最強
特異合成基質	Z-Arg-Arg-MCA	Arg-MCA	Z-Phe-Arg-MCA
ロイペプチンによる阻害	強	弱	強
E-64による阻害	強	弱	強

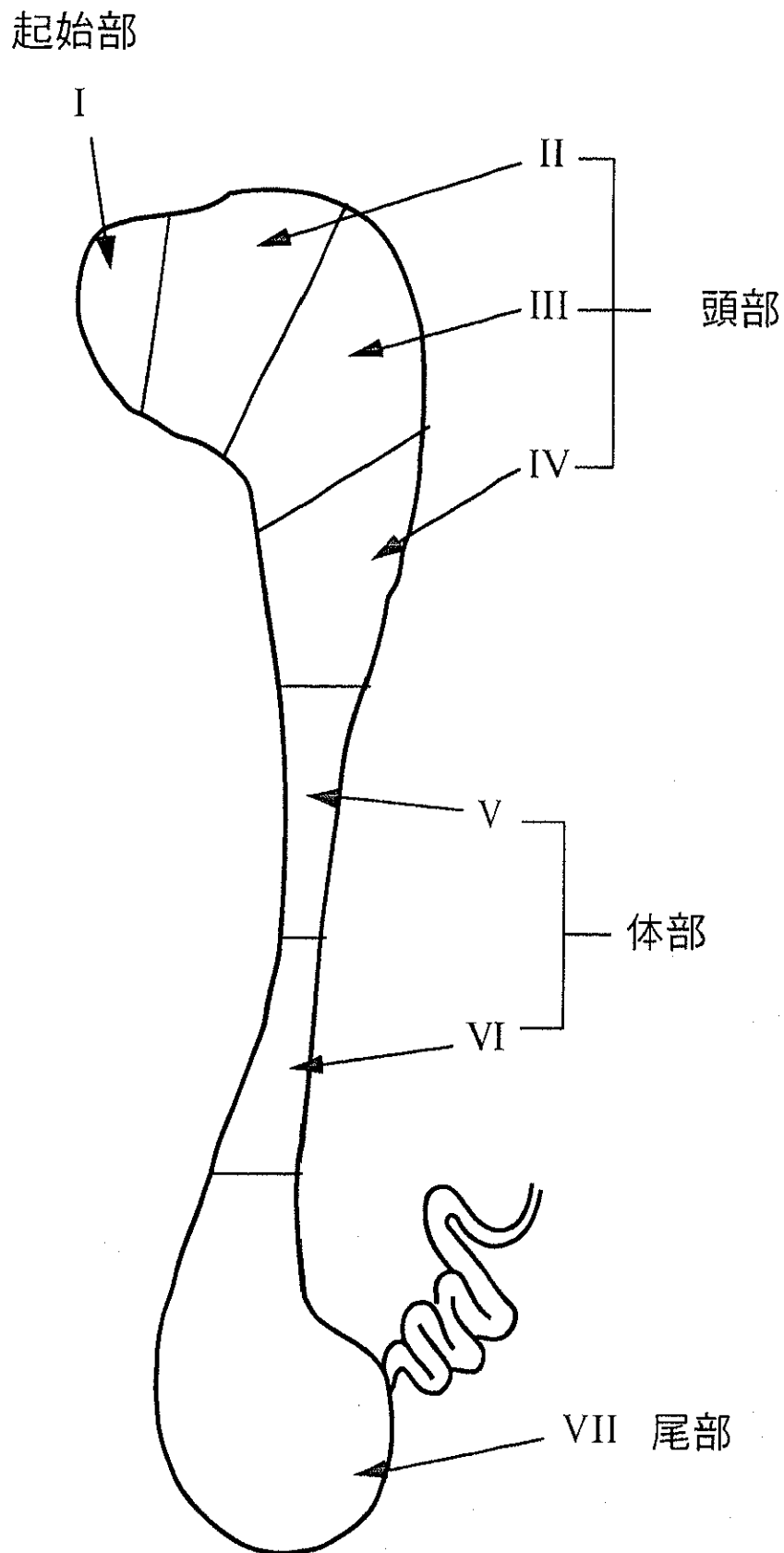


図2 精巣上部の解剖

上図のように起始部、頭部、体部および尾部を7ヶ所に分割した。

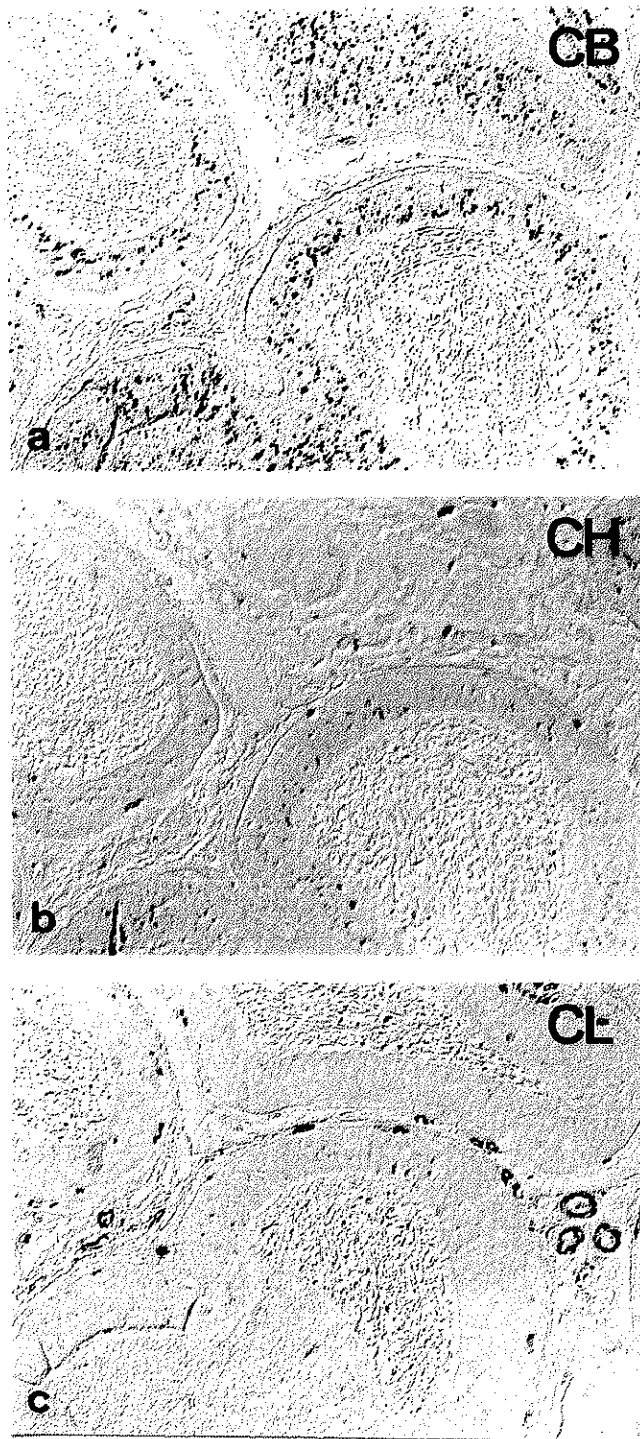


図3 a-c 正常ラット精巣上体起始部 (zone I) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。
a. カテプシンBの局在。200倍。
b. カテプシンHの局在。200倍。
c. カテプシンLの局在。200倍。

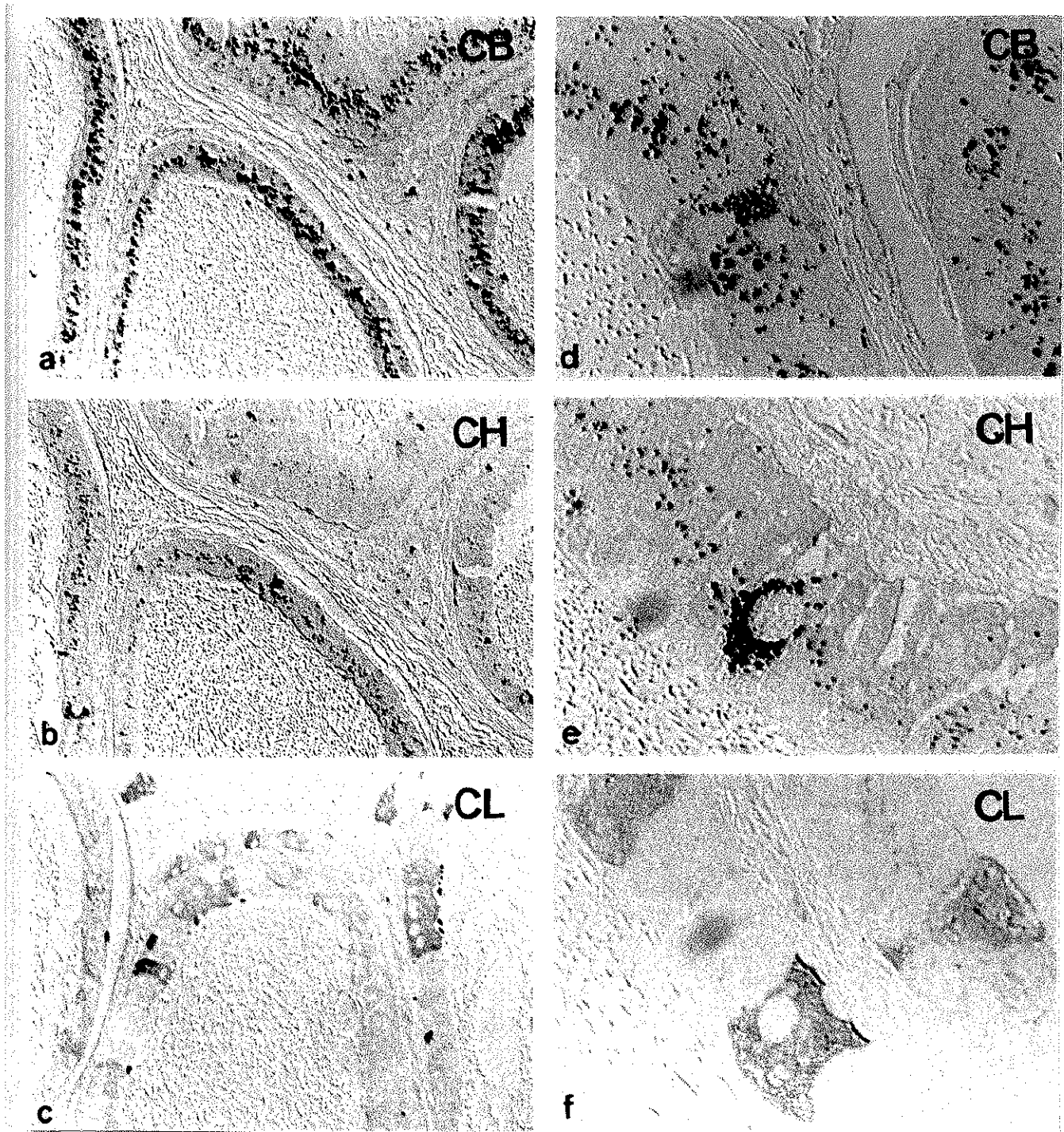


図4 a-f 正常ラット精巣上体頭部 (zone III) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。750倍。
- e. カテプシンHの局在。750倍。
- f. カテプシンLの局在。750倍。

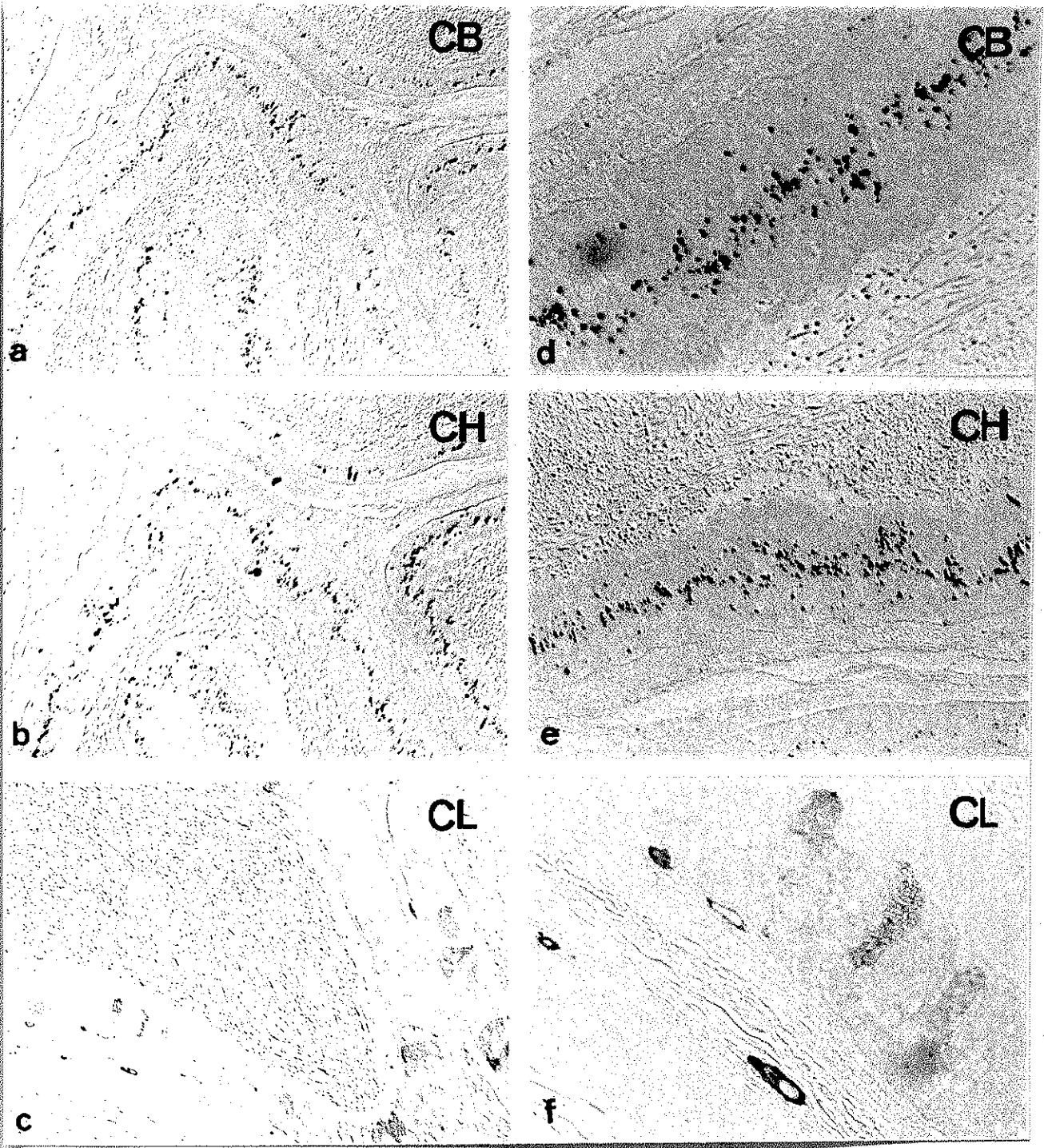


図5 a-f 正常ラット精巣上体体部 (zone VI) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。750倍。
- e. カテプシンHの局在。750倍。
- f. カテプシンLの局在。750倍。

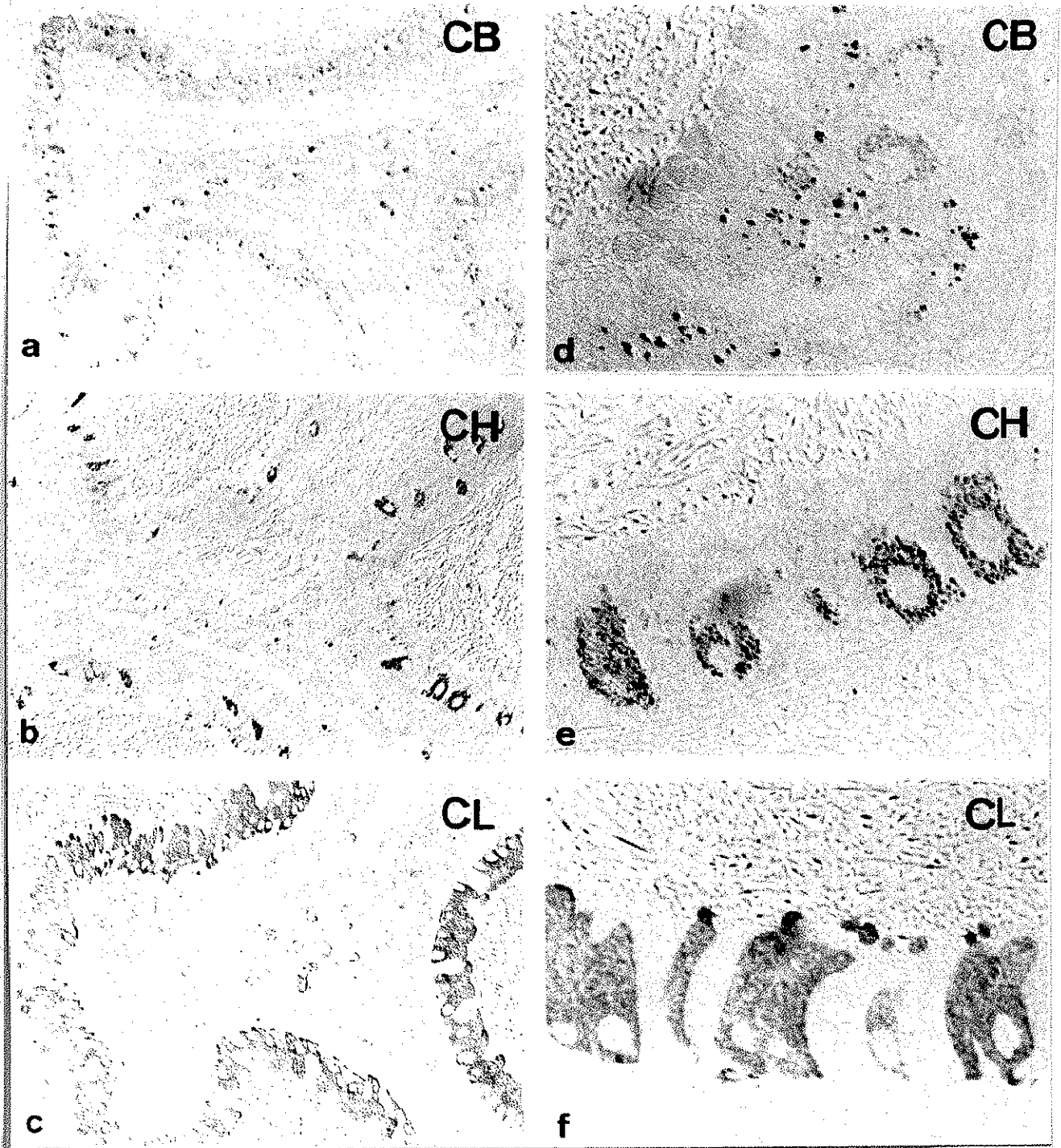


図6 a-f 正常ラット精巢上部尾部 (zone VII) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。750倍。
- e. カテプシンHの局在。750倍。
- f. カテプシンLの局在。750倍。

表2 精巢上体各部位における酵素活性 (pmol/min./mg protein ; Mean±SD)

部位	頭部	体部	尾部
カテプシンB (Z-Arg-Arg-MCA)	3.37±0.21	2.23±0.41	2.02±0.44
カテプシンL (Z-Phe-Arg-MCA)	31.89±2.362	23.43±5.41	24.26±5.69
カテプシンH (Arg-MCA)	0.40±0.054	0.35±0.044	0.48±0.098

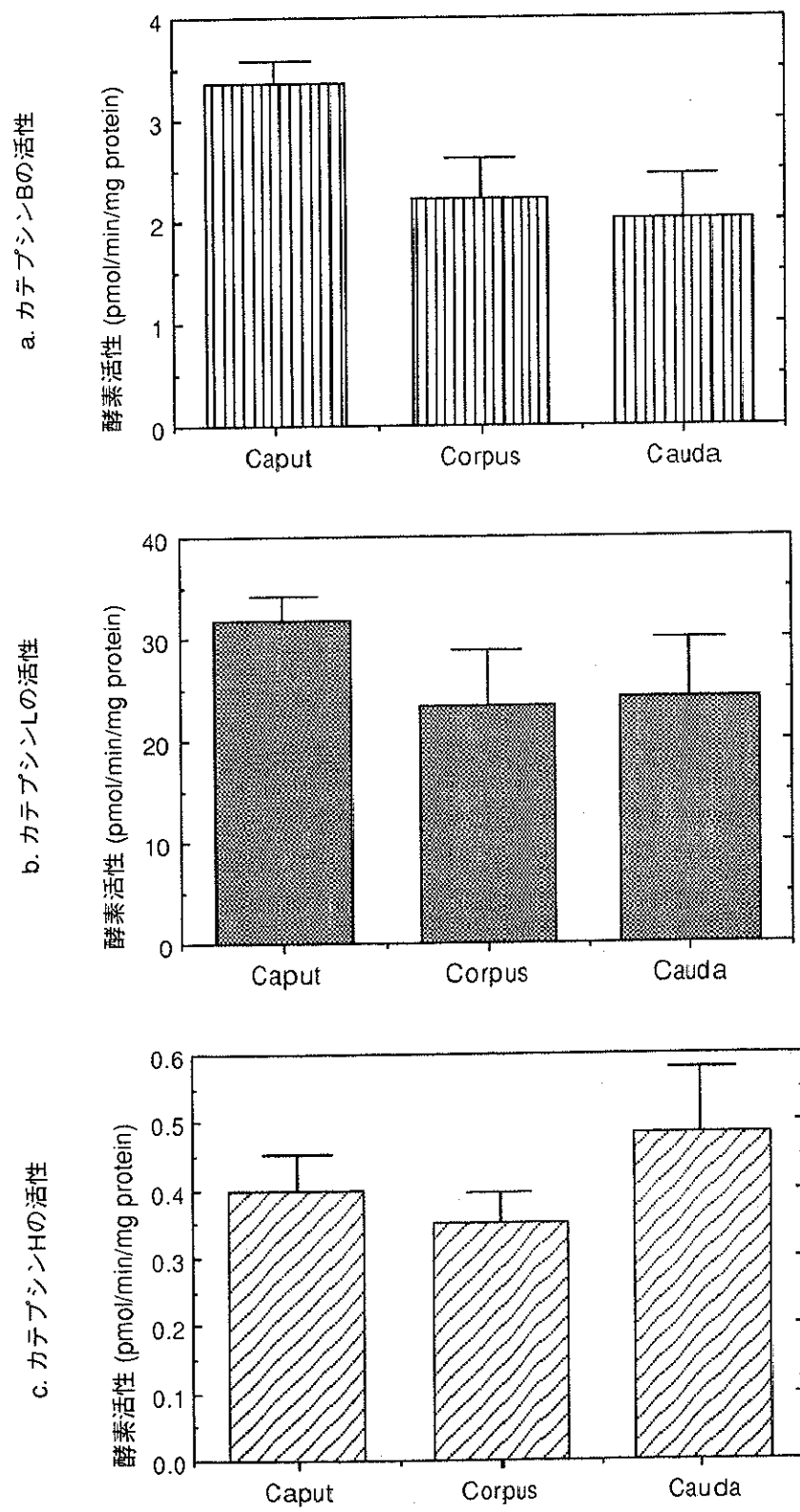
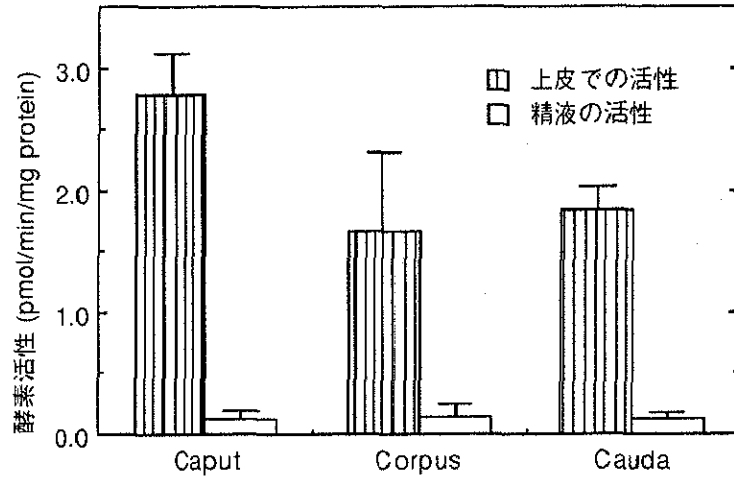


図7 a-c 精巣上体各部位での酵素活性 (Mean±SD)

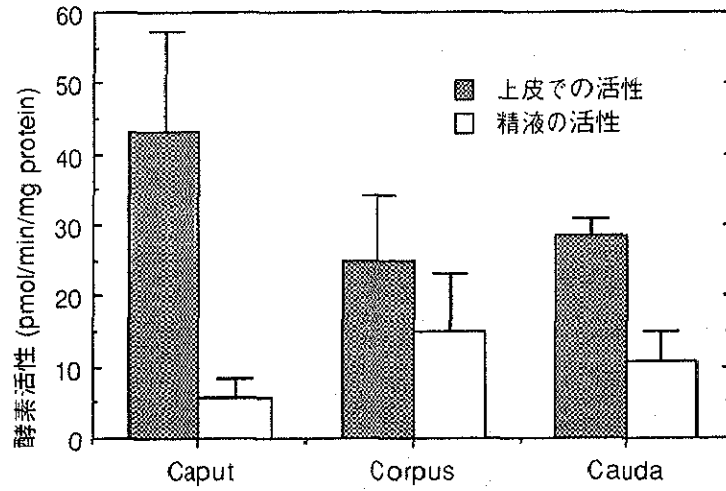
表3 精巢上体各部位の上皮および精液中の酵素活性
(pmol/min./mg protein ; Mean±SD)

	部位	精巢上体頭部	精巢上体体部	精巢上体尾部
上皮の活性	カテプシンB (Z-Arg-Arg-MCA)	2.78±0.33	1.66±0.65	1.84±0.19
	カテプシンL (Z-Phe-Arg-MCA)	43.3±14.1	25.5±9.2	28.4±2.5
	カテプシンH (Arg-MCA)	0.42±0.11	1.54±0.68	1.31±0.25
精液の活性	カテプシンB (Z-Arg-Arg-MCA)	0.13±0.07	0.14±0.11	0.13±0.04
	カテプシンL (Z-Phe-Arg-MCA)	5.78±2.67	14.86±8.14	10.72±4.21
	カテプシンH (Arg-MCA)	0.023±0.012	0.041±0.018	0.060±0.022

a. カテプシンBの活性



b. カテプシンLの活性



c. カテプシンHの活性

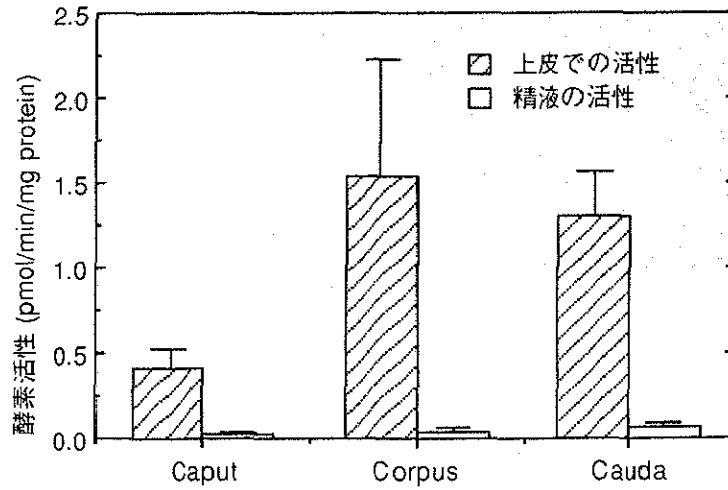


図8 a-c 精巣上体上皮および精液中の酵素活性 (Mean±SD)

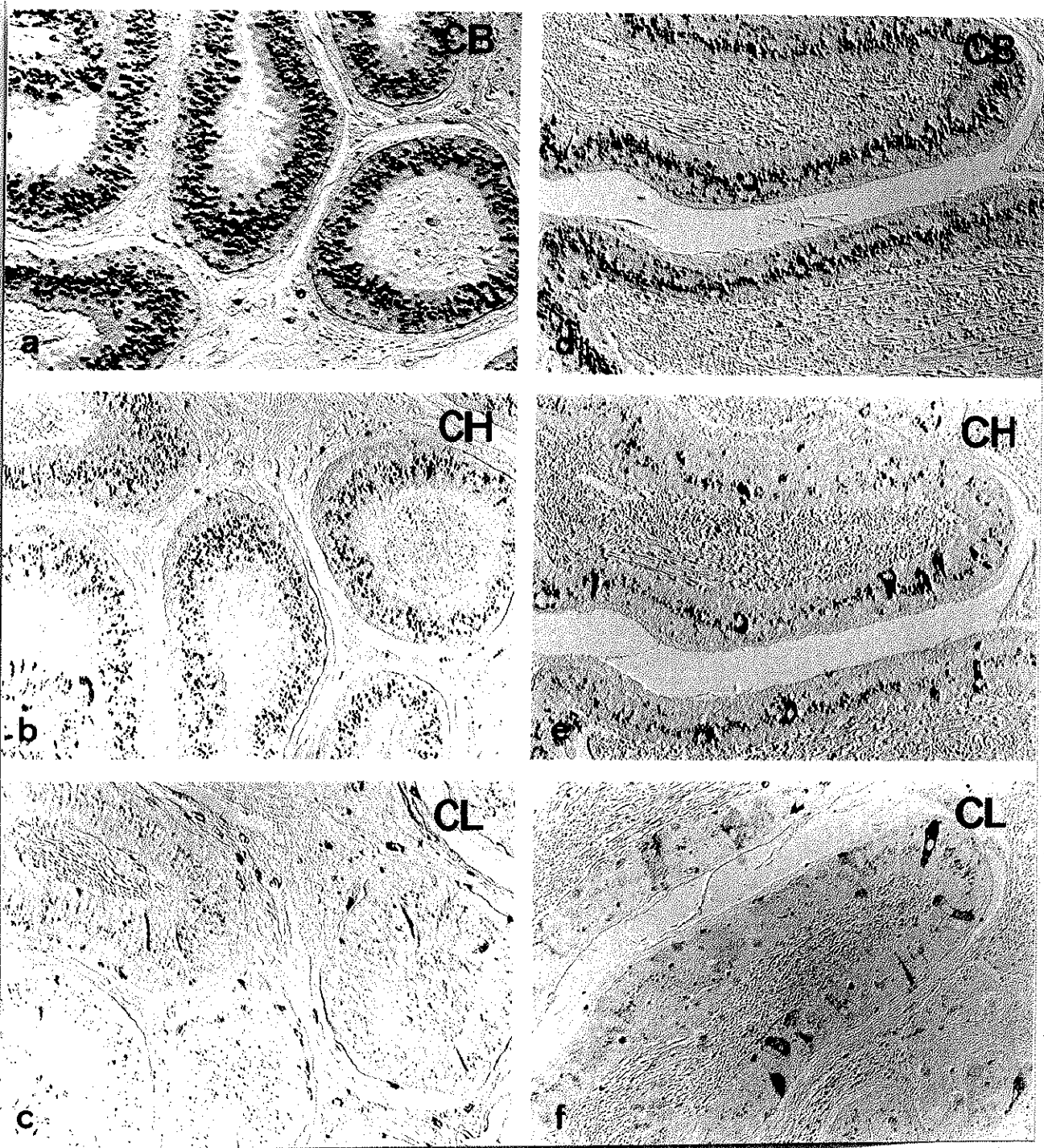


図9 精管結紮ラット精巣上部起始部 (zone I) (a-c)
 および精巣上部頭部 (zone IV) (a-c) における
 システインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。200倍。
- e. カテプシンHの局在。200倍。
- f. カテプシンLの局在。200倍。

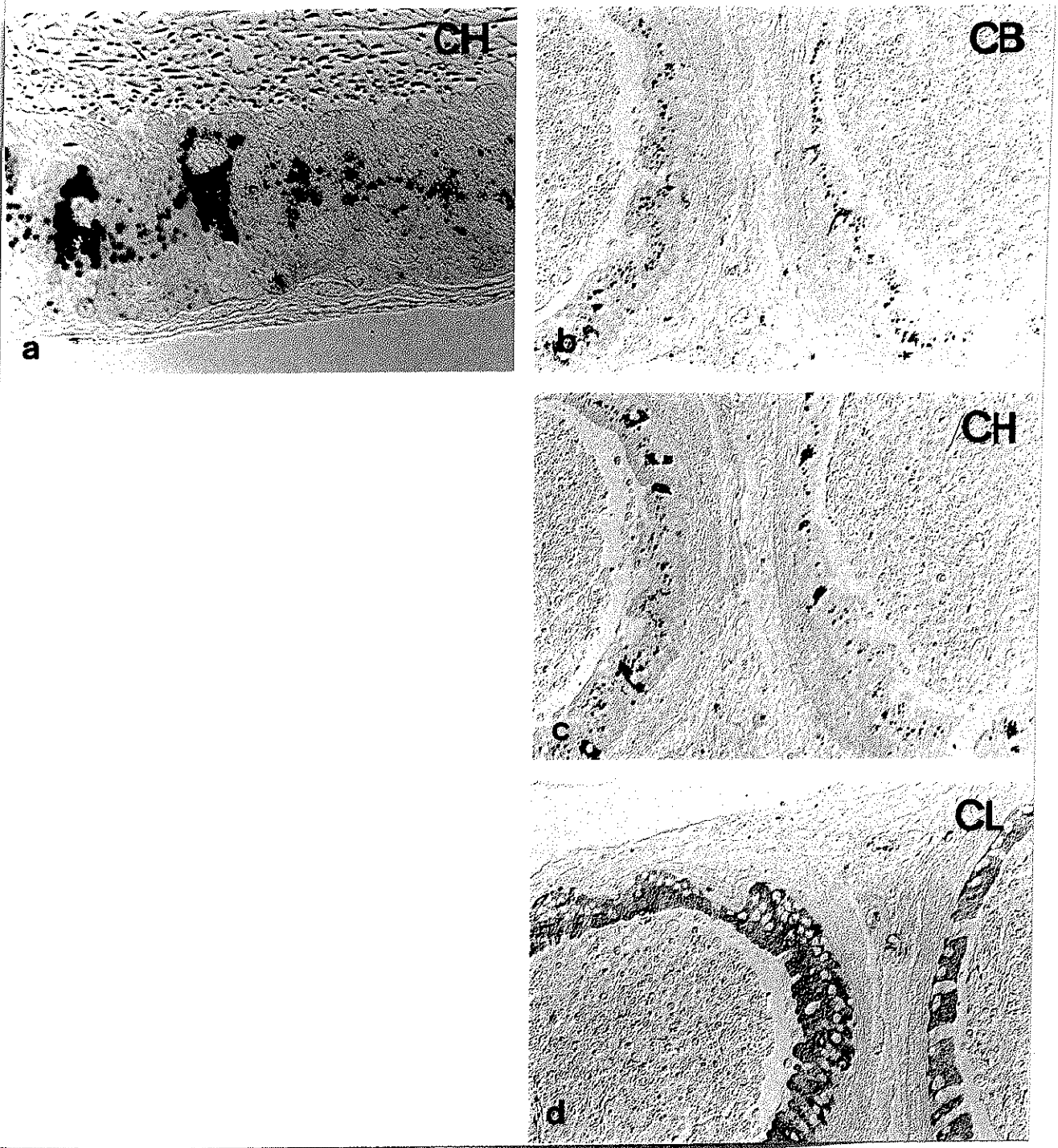


図10 精管結紮ラット精巢上部頭部 (zone IV) (a) および精巢上部尾部 (zone VII) (b-d) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンHの局在。750倍。
- b. カテプシンBの局在。200倍。
- c. カテプシンHの局在。200倍。
- d. カテプシンLの局在。200倍。

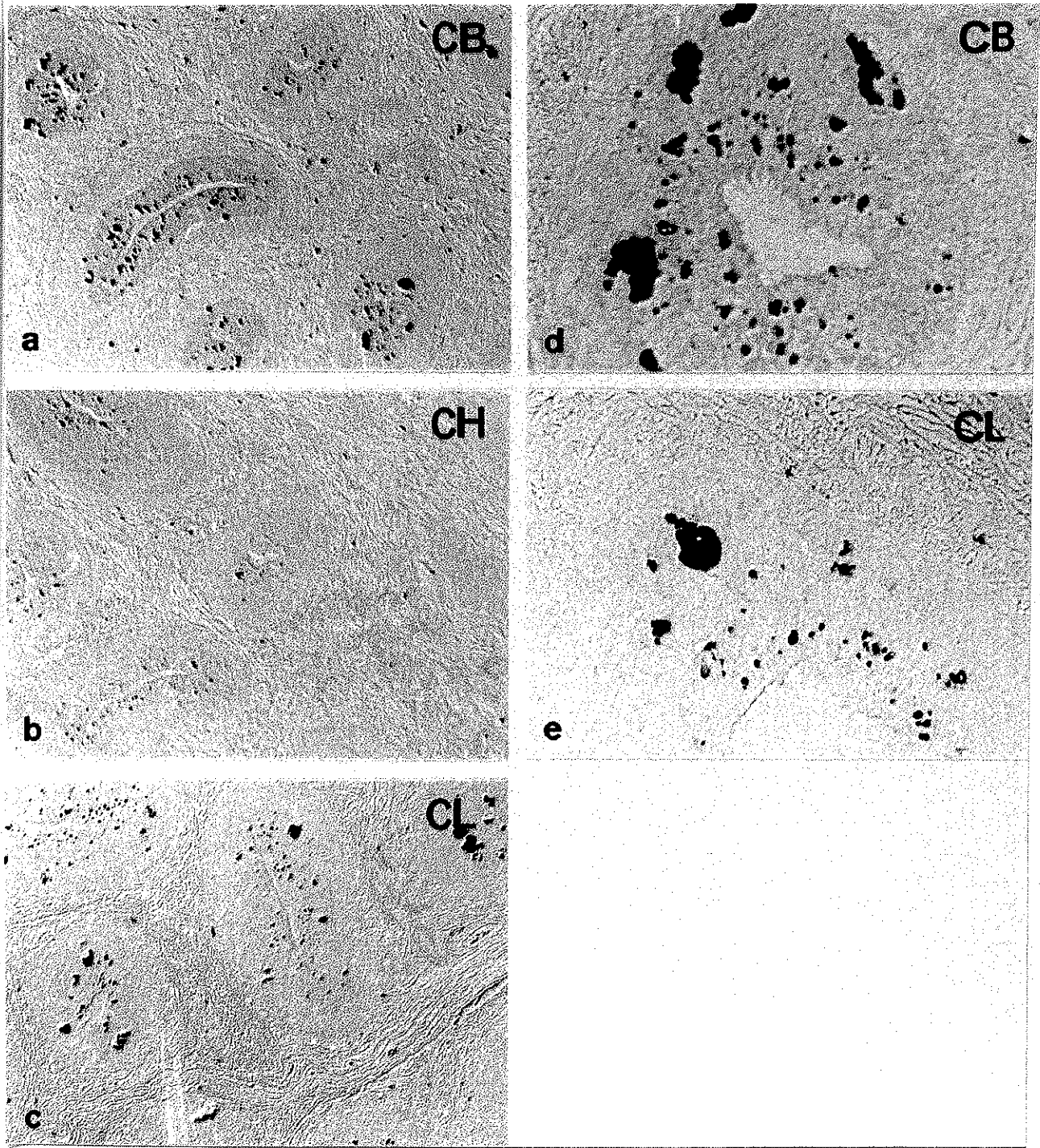


図11 精巣摘除ラット精巣上体頭部 (zone IV) (a-e) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。750倍。
- e. カテプシンLの局在。750倍。

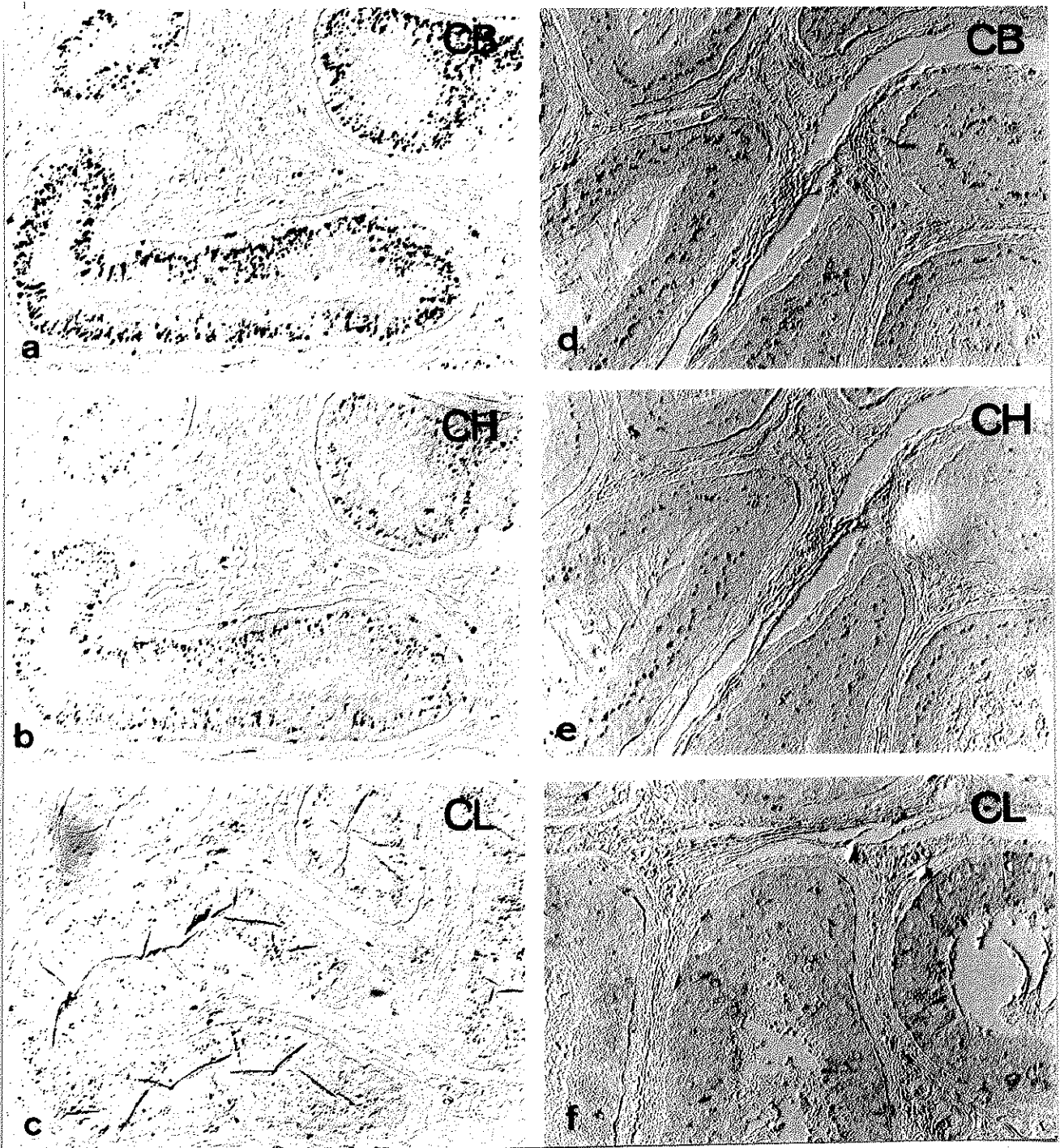


図12 精巣輸出小管結紮ラット精巣上部起始部 (zone I) (a-c)
 および精巣上部尾部 (zone VII) (d-f) における
 システインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。200倍。
- e. カテプシンHの局在。200倍。
- f. カテプシンLの局在。200倍。

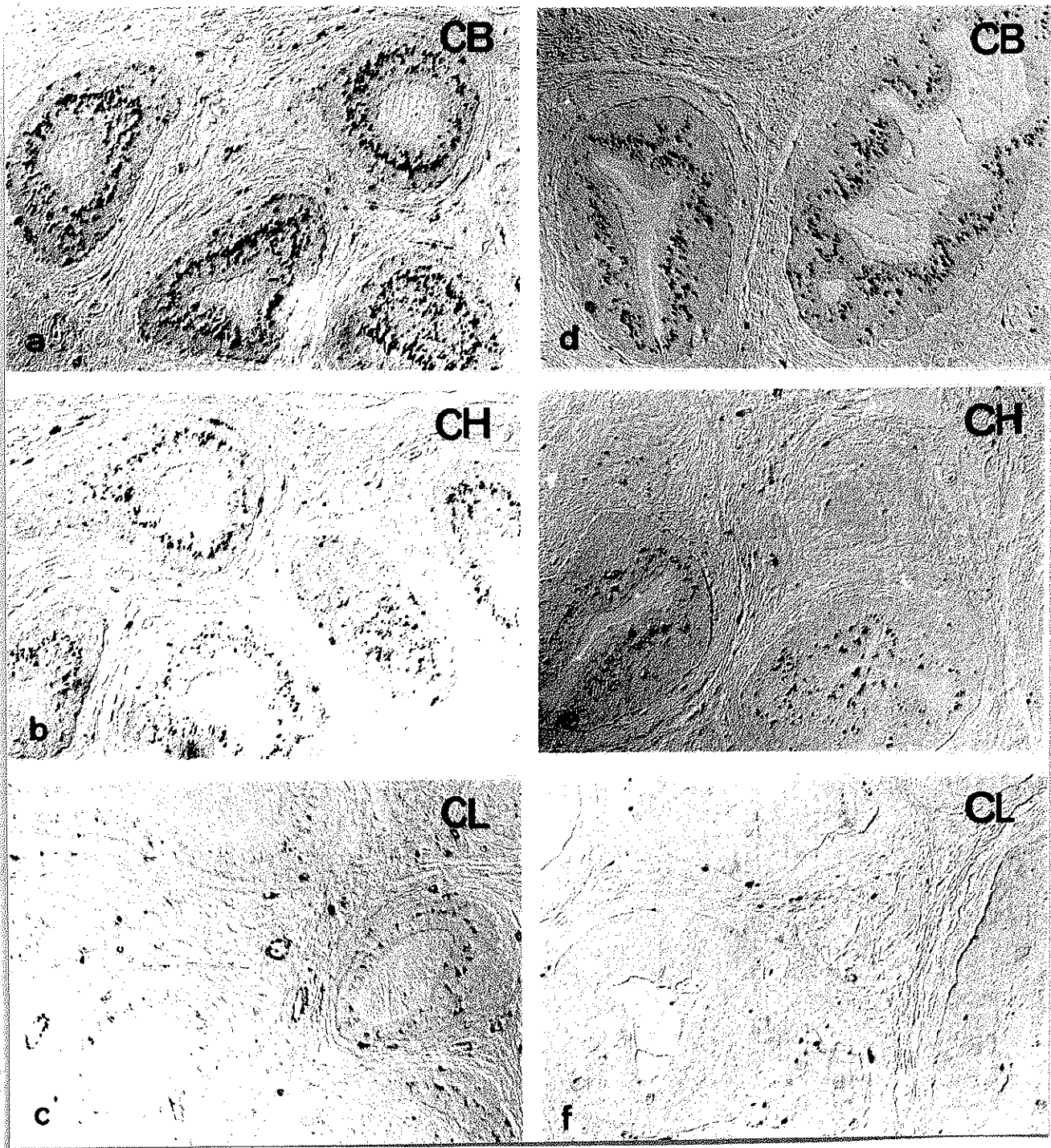


図13 精巣高位固定術後ラット精巣上部頭部 (zone II) (a-c) および精巣上部尾部 (zone VII) (d-f) におけるシステインプロテアーゼの免疫組織化学。

- a. カテプシンBの局在。200倍。
- b. カテプシンHの局在。200倍。
- c. カテプシンLの局在。200倍。
- d. カテプシンBの局在。200倍。
- e. カテプシンHの局在。200倍。
- f. カテプシンLの局在。200倍。

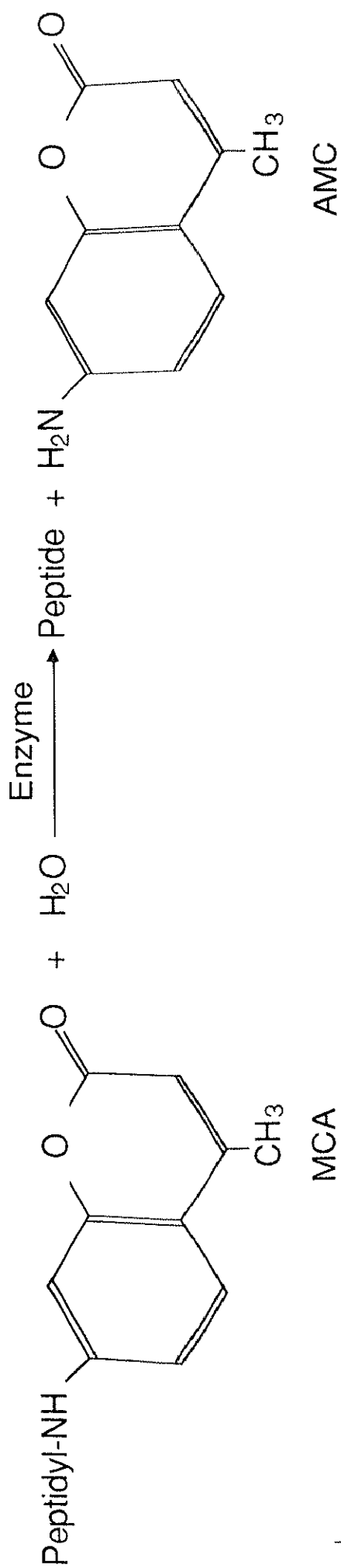


図14 MCAの構造

ペプチド鎖と結合したMethyl coumarylamide (MCA) が酵素による
 触媒で加水分解され、Aminomethylcoumarin (AMC) が遊離する。
 このAMC量を蛍光分光光度計で測定する(Ex: 370nm, Em: 460nm)。

謝辞

本研究は著者が筑波大学臨床医学系泌尿器科に所属していた1987年小磯謙吉教授（現病院長）および石川博通講師（現東京歯科大学附属市川総合病院泌尿器科助教授）のご指導により筑波大学基礎医学系解剖学内山安男助教授（現岩手医科大学解剖学第2講座教授）のもとで始められたものであります。研究全般に亘ってご指導して頂いた内山安男教授や同研究室の渡辺雅彦先生（現北海道大学助教授）、渡辺剛先生（現筑波大学講師）、和栗聡先生（現岩手医科大学助手）を始め他の皆様にはなみなみならぬご協力をいただきまして深く感謝するものであります。また活性測定に関してのご指導をいただいた順天堂大学生化学第1講座の木南英紀教授、無野大作先生を始め教室の皆さんに大変ご迷惑をおかけいたしました。また、本研究を進めるにあたって様々なかたちで御援助頂いた帝京大学医学部泌尿器科梅田隆教授、矢崎恒忠助教授ならびに教室の方々に深謝いたします。

本研究の一部は内分泌懇話会および男性不妊症研究会に発表し、The Vth International Congress of Andrology (1993年5月、東京) に発表した。

参考文献

1. 片山喬：男性不妊。日泌尿会誌、81:1287-1301,1990.
2. 男性不妊の診断と治療。産婦人科治療、62:901-904,1991.
3. Robaire, B., Hermo, L.: Efferent ducts, epididymis, and vas deference: structure, functions, and their regulation. The physiology of reproduction : 999-1080, 1988.
4. Hemeida, N.A., Sack, W.O., and McEntee, K.: Ductuli efferentes in the epididymis of boar, goat, ram, bull, and stallion. Am. J. Vet. Res., 39: 1892-1900, 1978.
5. Maneely, R. B. : Epididymal structure and function. A historical and critical review. Acta Zool., 40: 1-21, 1959.
6. Reid, B. L., and Cleland, K.W.: The structure and function of the epididymis. 1. The histology of the rat epididymis. Aust. J. Zool., 5: 223-246, 1957.
7. Hermo, L., and Clermont, Y. : The role of the clear epithelial cells of the epididymis of the rat in the disposal of cytoplasmic droplets derived from spermatozoa. J. Cell Biol., 101: 420A. 1985.
8. Crabo, B., and Gustafsson, B.: Distribution of sodium and potassium and its relation to sperm concentration in the epididymal plasma of the bull. J. Reprod. Fertil., 7: 337-345, 1964.
9. Levine, N., and Marsh, D. J.: Micropuncture studies of the

- electrochemical aspects of fluid and electrolyte transport in individual seminiferous tubules, the epididymis and vas deferens in rats. *J. Physiol.*, 213:557-570, 1971.
10. Turner, T.T., Jones, C. E., Howards, S. S., Ewing, L. L., Zegeye, B., and Gunsalus, G. L.: On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. *Endocrinology*, 115:1925-1932, 1984.
 11. Wong, P. Y. D., Au, C. L., and Ngai, H. K.: Electrolyte and water transport in rat epididymis; Its possible role in sperm maturation. *Int. J. Androl.*, (Supple.2): 608-628, 1978.
 12. Wong, P. Y. D., and Yeung, C. H.: Hormonal regulation of fluid reabsorption in isolated rat cauda epididymis. *Endocrinology*, 101: 1391-1397, 1977.
 13. Wong, P. Y. D., and Yeung, C. H.: Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. *J. Physiol.*, 275: 13-26, 1978.
 14. Jenkins, A. D., Lechene, C. P., and Howards, S. S.: Concentrations of seven elements in the intraluminal fluids of the rat seminiferous tubules, rete testis, and epididymis. *Biol. Reprod.*, 23: 981-987, 1980.
 15. Hinton, B. T., and Hernandez, H.: Selective luminal absorption of L-carnitine from the proximal regions of the rat epididymis. Possible relationships to development of sperm motility. *J. Androl.*, 6: 300-305, 1985.

16. Hoffer, A. P., Hamilton, D. W., and Fawcett, D. W.: The ultrastructure of principal cells and intraepithelial leucocytes in the initial segment of the rat epididymis. *Anat. Rec.*, 175: 169-202, 1973.
17. Friend, D. S.: Cytochemical staining of multivesicular bodies and Golgi vesicles. *J. Cell Biol.*, 41: 269-279, 1969.
18. Moore, H. D. M., and Bedford, J. M.: The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymis before and after castration. *Anat. Rec.*, 193: 313-328, 1979.
19. Pelliniemi, L. J., Dym, M., Gunsalus, G. L., Musto, N. A., Bardin, C. W., and Fawcett, D. W.: Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in the rat reproductive tract. *Endocrinology*, 108: 925-931, 1981.
20. Attramadal, A., Bardin, C. W., Gunsalus, G. L., Musto, N. A., and Hansson, V.: Immunocytochemical localization of androgen-binding protein in rat Sertoli and epididymal cells. *Biol. Reprod.*, 25: 983-988, 1981.
21. Djakiew, D., Byers, S. W., and Dym, M.: Receptor-mediated endocytosis of alpha-2-macroglobulin and transferrin in rat caput epididymal epithelial cells in vitro. *Biol. Reprod.*, 31: 1073-1085, 1984.
22. Djakiew, D., Byers, S. W., Lewis, D. M., and Dym, M.: Receptor-mediated endocytosis of alpha-2-macroglobulin by principal

- cells in the proximal caput epididymidis in vivo. *J. Androl.*, 6: 190-196, 1985.
23. Hermo, L., Dworkin, J., and Oko, R.: Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.*, 183: 107-124, 1988.
24. Casillas, E. R., and Erickson, B. J.: Studies on carnitine synthesis in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 44: 287-291, 1975.
25. Robinson, R., and Fritz, I. B.: Myoinositol biosynthesis by Sertoli cells, and levels of myoinositol biosynthetic enzymes in testis and epididymis. *Can. J. Biochem.*, 57: 962-967, 1979.
26. Cooper, T. G.: Secretion of inositol and glucose by the perfused rat cauda epididymidis. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 373-379, 1982.
27. Dacheux, J. L., and Voglmayr, J. K.: Sequence of sperm cell surface differentiation and its relationship to exogenous fluid proteins in the ram epididymis. *Biol. Reprod.*, 29: 1033-1046, 1983.
28. Lea, O. A., Petrusz, P., and French, F. S.: Purification and localization of acidic epididymal glycoprotein (AEG): A sperm coating protein secreted by the rat epididymis. *Int. J. Androl.*, [Suppl.2]: 592-607, 1978.
29. Acott, T.S., and Hoskins, D. D.: Bovine sperm forward motility protein. Partial purification and characterization. *J. Biol. Chem.*,

- 253:6744-6750, 1978.
30. Brooks, D. E., and Higgins, S. J.: Characterization and androgen-dependence of proteins associated with luminal fluid and spermatozoa in the rat epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, 59: 363-375, 1980.
 31. Jones, R., Brown, C. R., Von Glos, K. I., and Parker, M. G.: Hormonal regulation of protein synthesis in the rat epididymis. Characterization of androgen-dependent and testicular fluid-dependent proteins. *Biochem. J.*, 188: 667-676, 1980.
 32. Wong, P. Y. D., Tsang, A. Y. F., and Lee, W. M.: Origin of the luminal fluid proteins of the rat epididymis. *Int. J. Androl.*, 4: 331-341, 1981.
 33. Olson, G. E., and Hamilton, D. W.: Characterization of the surface glycoproteins of rat spermatozoa. *Biol. Reprod.*, 19: 26-35, 1978.
 34. Lino, B. F., Braden, A. W. H. and Turnbull, K. E.: Fate of unejaculated spermatozoa. *Nature*, 213: 594-595, 1967.
 35. Barratt, C. L. R. and Cooke, I. D.: Sperm loss in the urine of sexually rested men. *Int. J. Androl.*, 11: 201-207, 1988.
 36. Roussel, J. D., Stallcup, O. T. and Austin, C. R.: Selective phagocytosis of spermatozoa in the epididymis of bulls, rabbits and monkeys. *Fertil. Steril.*, 18: 509-516, 1967.

37. Cooper, T. G. and Hamilton, D. W.: Phagocytosis of spermatozoa in the terminal region and gland of the vas deferens of the rat. *Am. J. Anat.*, 150: 247-268, 1977.
38. Alexander, N. J.: Ultrastructural changes in rat epididymis after vasectomy. *Z. Zellforsch*, 136: 177-182, 1973.
39. Moniem, K. A., Glover, T. D.: Comparative histochemical localization of lysosomal enzymes in mammalian epididymides. *J. Anat.*, 111: 437-452, 1972.
40. 狩野健一：精管切断術。臨泌、33: 541-542, 1979.
41. 松田公志、西村一男、野々村光生、岡田謙一郎、吉田 修、真田俊吾、高橋陽一：閉塞性無精子症に対する精巣上体精管吻合および精管精管吻合術の経験。日不妊誌、32: 352-358, 1987.
42. Kwart, A. M., Coffey, D. S.: Sperm granulomas; an adverse effect of vasectomy. *J. Urol.*, 110: 416-422, 1973.
43. Schmidt, S. S., Morris, R. R.: Spermatic granuloma: the complication of vasectomy. *Fertil. Steril.*, 24: 941-947, 1973.
44. Barratt, C. L. R., Cohen, J.: Quantitation of sperm disposal and phagocytic cells in the tract of short- and long-term vasectomized mice. *J. Reprod. Fertil.*, 81: 377-384, 1987.
45. Bedford, J. M.: Adaptations of the male reproductive tract and the fate of spermatozoa following vasectomy in the rabbit, rhesus monkey,

- hamster and rat. *Biol. Reprod.* 14: 118-142, 1976.
46. Alexander, N. J.: Vasectomy; long term effect in the rhesus monkey. *J. Reprod. Fertil.*, 31: 399-406, 1972.
47. Ball, R. Y., Naylor, C. P. E., Mitchinson, M. J.: Spermatozoa in an abdominal lymph node after vasectomy in a man. *J. Reprod. Fert.*, 66: 715-716, 1982.
48. Ball, R. Y., Setchell, B. P.: The passage of spermatozoa to regional lymph nodes in testicular lymph following vasectomy in rams and boars. *J. Reprod. Fert.*, 68: 145-154, 1983.
49. Barratt, C. L. R., Cohen, J.: Fate of superfluous sperm products after vasectomy and in the normal male tract of the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 78: 1-10, 1986.
50. Flickinger, C. J.: Ultrastructure of the rat testis after vasectomy. *Anat. Rec.*, 174: 477-494, 1972.
51. Flickinger, C. J.: Inflammatory changes in the epididymis after vasectomy in the Lewis rat. *Biol. Reprod.*, 43: 34-45, 1990.
52. Dyson, A. L. M. B., Orgebin-Crist, M. -C.: Effect of hypophysectomy, Castration and androgen replacement upon the fertilizing ability of rat epididymal spermatozoa. *Endocrinology*, 93: 391-402, 1973.
53. Sujarit, S., Pholpramool, C.: Enhancement of sperm transport through

- the rat epididymis after castration. *J. Reprod. Fert.*, 74: 497-502, 1985.
54. Moore, H. D. M., Bedford, J. M.: Short-term effect of androgen withdrawal on the structure of different epithelial cells in the rat epididymis. *Anat. Rec.*, 193: 293-312, 1979.
55. Moore, H. D. M., Bedford, J. M.: The differential absorptive activity of epithelial cells of the rat epididymus before and after castration. *Anat. Rec.*, 193: 313-328, 1979.
56. Nicander, L., Osman, D. I., Ploen, L., Bugge, H. P., Kvisgaard, K. N.: Early effects of efferent ductule ligation on the proximal segment of the rat epididymis. *Int. J. Androl.*, 6: 91-102, 1983.
57. Abe, K., Takano, H.: Early degeneration of the epithelial cells in the initial segment of the epididymal duct in mice after efferent duct cutting. *Arch. Histol., Cytol.* 52: 299-310, 1989.
58. Abe, K., Takano, H., Ito, T.: Response of the epididymal duct in the corpus epididymidis to efferent or epididymal duct ligation in the mouse. *J. Reprod. Fertil.*, 64: 69-72, 1982.
59. Abe, K., Takano, H., Ito, T.: Interruption of the luminal flow in the epididymal duct of the corpus epididymidis in the mouse, with special reference to differentiation of the epididymal epithelium. *Arch. Histol. Jap.*, 47: 137-147, 1984.
60. Abe, K., Takano, H., Ito, T.: Appearance of peculiar multivesicular

- bodies in the principal cells of the epididymal duct after efferent duct cutting in the mouse. *Arch. Histol. Jap.*, 47: 121-135, 1984.
61. Atkinson, P.M.: The effects of early experimental cryptorchidism and subsequent orchiopexy on the maturation of the guinea-pig testicle. *Brit. J. surg.*, 60: 253-258, 1973.
62. Jones, T.M., Anderson, W., Fang, V.S., Landau, R.L., Rosenfield, R. L. Experimental cryptorchidism in adult male rats: Histological and hormonal sequelae. *Anat. Rec.*, 189: 1-28, 1977.
63. Abe, K., Takano, H.: Response of the mouse epididymal duct to the disappearance and reappearance of spermatozoa induced by temporal cryptorchidism. *Arch. Histol. Jap.*, 50: 315-324, 1987.
64. 村地 孝：タンパク質の分解—プロテアーゼ研究50年の流れを辿る—。蛋白質 核酸 酵素、27：794-807, 1982.
65. Barrett, A. J., McDonald, J. K.: Nomenclature: a possible solution to the 'peptidase anomaly". *Biochem. J.*, 231: 807-808, 1985.
66. Etherington, D. J.: Bovine spleen cathepsin B1 and collagenolytic cathepsin. *Biochem. J.*, 153: 199-209, 1976.
67. Turnsek, T., Kregar, I., Lebez, D.: Acid sulfhydryl protease from calf lymph nodes. *Acta Biochem. Biophys.*, 403: 514-520, 1975.
68. Gohda, E., Pitot, H. C.: A new thiol proteinase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 256: 2567-2572, 1981.

69. Tollan, H. H., Jones, M. E., Fruton, J. S.: On the proteolytic enzymes of animal tissues. X. Beef spleen cathepsin C. *J. Biol. Chem.*, 194: 793-805, 1952.
70. Greenbaum, L. M., Fruton, J. S.: Purification and properties of beef spleen cathepsin B. *J. Biol. Chem.*, 226: 173-180, 1957.
71. Otto, K.: Uber ein neues Kathepsin. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 348: 1449-1460, 1967.
72. Otto, K., Bhakadi, S.: Zur Kenntnis des Kathepsins B': Spezifitaet und Eigenschaften. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 350: 1577-1588, 1969.
73. McDonald, J. K., Ellis, S.: On the substrate specificity of cathepsins B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. *Life sci.*, 17: 1269-1276, 1975.
74. Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., Hanson, H.: Intracellular protein breakdown. VII. Cathepsin L and H - two new proteinases from rat liver lysosomes. *Acta Biol. Med. Ger.*, 35: 285-299, 1976.
75. Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P.: Cathepsin L; a new proteinase from rat-liver lysosomes. *Eur. J. Biochem.*, 74: 293-301, 1977.
76. Kirschke, H., Langer, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., Hanson, H.: Cathepsin H: An endoaminopeptidase from rat liver

- lysosomes. Acta Biol. Med. Ger., 36, 185-199, 1977.
77. Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D., Katsunuma, N.: Separation of a new protease from cathepsin B1 of rat liver lysosomes. FEBS Lett., 67: 284-288, 1976.
78. Towatari, T., Tanaka, K., Yoshikawa, D., Katsunuma, N.: Purification and properties of a new cathepsin from rat liver. J. Biochem., 84: 659-671, 1978.
79. Quinn, P.S., Judah, J. D.: Calcium-dependent golgi-vesicle fusion and cathepsin B in the conversion of proalbumin into albumin in rat liver. Biochem. J., 172: 301-309, 1978.
80. McDonald, J. K., Ellis, S.: On the substrate specificity of cathepsin B1 and B2 including a new fluorogenic substrate for cathepsin B1. Life sciences, 17: 1269-1276, 1975.
81. Szego, C. M., Seeler, B. J., Smith, R. E.: Lysosomal cathepsin B1; Partial characterization in rat preputial gland and re-compartmentation in response to estradiol-17 β . Eur. J. Biochem., 69: 463-474, 1976.
82. Singh, H., Kalnitsky, G.: Separation of a new α -N-Benzoylarginine- β -naphthylamide hydrolase from cathepsin B1. J. Biol. Chem., 253: 4319-4326, 1978.
83. MacGregor, R. R., Hamilton, J. W., Shofstall, R. E., Cohn, D. V.: Isolation and characterization of porcine parathyroid cathepsin B. J.

- Biol. Chem., 254: 4423-4427, 1979.
84. Suhar, A., Marks, N.: Purification and properties of brain cathepsin B.
Eur. J. Biochem., 101: 23-30, 1979.
85. Kominami, E., Tsukahara, T., Bando, Y., Katsunuma, N.: Distribution
of cathepsins B and H in rat tissues and periferal blood cells. J.
Biochem., 98: 87-93, 1985.
86. Bando, Y., Kominami, E., Katsunuma, N.: Purification and tissue
distribution of rat cathepsin L. J. Biochem., 100: 35-42, 1986.
87. Howie, A. J., Burnett, D., Crocker, J.: The distribution of cathepsin B
in human tissues. J. Pathology, 145: 307-314, 1985.
88. Schwartz, W. N., Barrett, A. J.: Human cathepsin H. Biochem. J., 191:
487-497, 1980.
89. Jaervinen, M., Hopsu-Havu, V.K.: α
-N-Benzoylarginine-2-naphthylamide hydrolase (Cathepsin B1?) from
rat skin. 1. Preliminary experiments with skin extract. Acta Chem.
Scand., Ser. B, 29: 671-676, 1975.
90. Singh, H., Kalnitsky, G.: α -N-Benzoylarginine- β -naphthylamide
hydrolase, an aminoendopeptidase from rabbit lung. J. Biol.Chem., 255:
369-374, 1980.
91. Okitani, A., Matsukura, U., Kato, H., Fujimaki, M.: Purification and
some properties of a myofibrillar protein-degrading protease, cathepsin

- L, from rabbit skeletal muscle. *J. Biochem.*, 87: 1133-1143, 1980.
92. Strewler, G. J., Manganillo, V. C.: Purification and characterization of phosphodiesterase activator from kidney. *J. Biol. Chem.*, 254: 11891-11898, 1979.
93. Takio, K., Towatari, T., Katsunuma, N., Teller, D. C., Titani, K.: Homology of amino acid sequences of rat liver cathepsins B and H with that of papain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 3666-3670, 1983.
94. Ishidoh, K., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kominami, E., Katsunuma, N., Suzuki, K.: Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cathepsin L. *FEBS Lett.*, 223: 69-73, 1987.
95. Chan, J. C., Segundo, B. S., McCormick, M. B., Steiner, D. F.: Nucleotide and predicted amino acid sequences of cloned human and mouse preprocathepsin B cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83: 7721-7725, 1986.
96. Towatari, T., Katsunuma, N.: Amino acid sequence of rat liver cathepsin L. *FEBS Lett.*, 236: 57-61, 1988.
97. Ishidoh, K., Imajoh, S., Emori, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Minami, Y., Kominami, E., Katsunuma, N., Suzuki, K.: Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cathepsin H. *FEBS Lett.*, 226: 33-37, 1987.
98. Ishidoh, K., Kominami, E., Katsunuma, N., Suzuki, K.: Gene structure of rat cathepsin H. *FEBS Lett.*, 253: 103-107, 1989.

99. Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T., Katsunuma, N., Bode, W.: The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.*, 10: 2321-2330, 1991.
100. 勝沼信彦：細胞内タンパク質分解—機構・調節・病態—東京化学同人, 1992.
101. Hashida, S., Towatari, T., Kominami, E., Katsunuma, N.: Inhibitions by E-64 Derivatives of rat liver cathepsin B and cathepsin L in vitro and in vivo. *J. Biochem.*, 88: 1805-1811, 1980.
102. Kominami, E., Wakamatsu, N., Katsunuma, N.: Purification and characterization of thiol proteinase inhibitor from rat liver. *J. Biol. Chem.*, 257: 14648-14652, 1982.
103. Ii, K., Hizawa, K., Kominami, E., Bando, Y., Katsunuma, N.: Different immunolocalizations of cathepsins B, H, and L in the liver. *J. Histochem. Cytochem.*, 33: 1173-1175, 1985.
104. Watanabe, M., Watanabe, T., Ishii, Y., Matsuba, H., Kimura, S., Fujita, T., Kominami, E., Katsunuma, N., Uchiyama, Y.: Immunocytochemical localization of cathepsins B, H, and their endogenous inhibitor, cystatin β , in islet endocrine cells of rat pancreas. *J. Histochem. Cytochem.*, 36: 783-791, 1988.
105. Watanabe, T., Watanabe, M., Ishii, Y., Matsuba, H., Kimura, S.,

- Fujita, T., Kominami, E., Katsunuma, N., Uchiyama, Y.: An immunocytochemical study on co-localization of cathepsin B and atrial natriuretic peptides in secretory granules of atrial myoendocrine cells of rat heart. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 347-351, 1989.
106. Uchiyama, Y., Watanabe, T., Watanabe, M., Ishii, Y., Matsuba, H., Waguri, S., Kominami, E.: Immunocytochemical localization of cathepsins B, H, L, and T4 in follicular cells of rat thyroid gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 691-696, 1989.
107. Matsuba, H., Watanabe, T., Watanabe, M., Ishii, Y., Waguri, S., Kominami, E., Uchiyama, Y.: Immunocytochemical localization of prorenin, renin, and cathepsins B, H, and L in juxtaglomerular cells of rat kidney. *J. Histochem. Cytochem.*, 37: 1689-1697, 1989.
108. Ishii, Y., Hashizume, Y., Watanabe, T., Waguri, S., Sato, N., Yamamoto, M., Hasegawa, S., Kominami, E., Uchiyama, Y.: Cystein proteinases in bronchoalveolar epithelial cells and lavage fluid of rat lung. *J. Histochem. Cytochem.*, 39: 461-468, 1991.
109. Uchiyama, Y., Nakajima, M., Munro, D., Watanabe, T., Ishii, Y., Waguri, S., Sato, N., Kominami, E.: Immunocytochemical localization of cathepsins B and H in corticotrophs and melanotrophs of rat pituitary gland. *J. Histochem. Cytochem.*, 38: 633-639, 1990.
110. Furuhashi, M., Nakahara, A., Fukutomi, H., Kominami, E., Grube,

- D., Uchiyama, Y.: Immunocytochemical localization of cathepsins B, H, and L in the rat gastro-duodenal mucosa. *Histochemistry*, 95: 231-239, 1991.
111. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J.: Protein measurements with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
112. Barrett, A. J., Kirschke, H.: Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L. *Methods Enzymol.*, 80: 535, 1981.
113. Kominami, E., Katsunuma, N.: Immunological studies on cathepsins B and H from rat liver. *J. Biochem.*, 91: 67-71, 1982.
114. Grube, D.: Immunoreactivities of gastrin (G-) cells. II. Non-specific binding of immunoglobulins to G-cells by ionic interactions. *Histochemistry*, 66: 149, 1980.
115. Mayor, H. D., Hampton, J. C., Rosario, B.: A simple method for removing the resin from epoxy-embedded tissue. *J. Cell Biol.*, 9: 909-910, 1961.
116. Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H.: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29: 577-580, 1981.
117. Olson, G.E., Jonas-Davies, J., Hoffman, L. H., Orgebin-Crist, M. C.:

- Structural characterization of isolated rat epididymal epithelial cells.
Gamete Research, 6: 161-178, 1982.
118. Byers, S. W., Djakiew, D., Dym, M.: structural features of rat epididymal epithelial cells in vitro. J. Reprod. Fert., 75: 401-411, 1985.
119. Yamada, H., Hayashi, H., Natori, Y.: A simple procedure for the isolation of highly purified lysosomes from normal rat liver. J. Biochem., 95: 1155-1160, 1984.
120. Wong, P. Y. D., Yeung, C. H.: Absorptive and secretory functions of the perfused rat cauda epididymidis. J. Physiol., 275: 13-26, 1978.
121. Gerard, A., Khanfri, J., Gueant, L., Fremont, S., Nicolas, P., Grignon, G., Gerard, H.: Electron microscope radioautographic evidence of in vivo androgen-binding protein internalization in the rat epididymis principal cells. Endocrinology, 122: 1297-1307, 1988.
122. Skinner, M. K., Griswold, M. D.: Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein. J. Biol. Chem. 255: 9523-9525, 1980.
123. Kopečný, V., Flechon, J. E., Pirko, J.: Binding of secreted glycoproteins to spermatozoa in the mammalian epididymis: A fine-structure autoradiographic study. Anat. rec. 208: 197-206, 1984.
124. 三田昌輝、安部和厚：マウス精巢上体における明調細胞の形態および出現頻度の部位的差異と逐齡推移—組織学的研究—。解剖学雑誌、61：97-106, 1968.

125. Kominami, E., Tsukahara, T., Hara, K., Katsunuma, N.: Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. *FEBS Lett.*, 231: 225-228, 1988.
126. Zabludoff, S. D., Erickson-Lawrence, M., Write, W. W.: Sertoli cells, proximal convoluted tubules in the kidney, and neurons in the brain contain cyclic protein-2. *Biol. Reprod.*, 43: 15-24, 1990.
127. Zabludoff, S. D., Karzai, A. W., Write, W. W.: Germ cell-Sertoli cell interactions: the effect of testicular maturation on the synthesis of cyclic protein-2 by rat sertoli cells. *Biol. Reprod.*, 43: 25-33, 1990.
128. Erickson-Lawrence, M., Zabludoff, S. D., Write, W. W.: Cyclic protein-2, a secretory product of rat sertoli cells, is the proenzyme form of cathepsin L. *Mol Endo*, 5: 1789-1798, 1991.
129. Ratna Kumar, B. V., Shipstone, A. C., Setty, B. S.: Effect of vasectomy on the ultrastructure of epididymal epithelium in rhesus monkey. *Int. J. Fertil.* 35: 180-191, 1990.
130. Lohiya, N. K., Mathur, N., Tiwari, S. N., Watts, N.: Ultrastructural changes in the rabbit epididymis following vasectomy and clip occlusion. *Acta Europaea Fertilitatis* 19: 233-237, 1988.
131. Holland, M. K., Vreeburg, J. T. M., Orgebin-crist, M. C.: Testicular regulation of epididymal protein secretion. *J. Androl.* 13: 266-273, 1992.

132. Kort, W. J., Hekking-Weijma, I., Vermeij, M.: Temporary intraabdominal cryptorchidism in the weanling rat leads to irreversible azoospermia. *J. Surg. Res.*, 51: 138-142, 1991.
133. Paulson, H. L., Byers, S. W., Dym, M.: Morphometric analysis of coated pits and vesicles in the proximal and distal caput epididymidis. *Biol. Reprod.*, 32: 191-202, 1985.

筑波大学附属図書館



本学関係