

## ラット精巣、精巣上部および精管精子頭部 における酸性ホスファターゼの 電子顕微鏡的観察

小山久一\*・山口政二\*・平尾和義\*

### Fine Structure Localization of Acid Phosphatase in the Head Region of Rat Spermatozoa from the Testes, the Epidymidis and the Ductus Deferens

Hisaichi KOYAMA\*, Seiji YAMAGUCHI\*  
and Kazuyoshi HIRAO\*

(May, 1983)

精巣上部は頭、体および尾の3部位からなり、精巣で形成された精子はこの各部を移行する過程で代謝能、運動能および受精能が付与される<sup>2,6,7,8)</sup>。一方、精液中にはホスファターゼ活性が認められ、特に牛精漿中の酸性ホスファターゼ (ACP と略記) 活性は精子運動率、精子生存率および精子奇形率などの精液性状に影響することが知られている<sup>10)</sup>。一般に精漿中の ACP 活性の一部は精子に由来するものと解されており、主に精子頭部および細胞質滴に観察されている<sup>1,4)</sup>。また精子 ACP 活性は精巣上部移行に伴う精子の形態的および機能的成熟と関連が深いものと推察されている。しかし精子 ACP に関する報告はこれまで射出精子に関するものが多く<sup>3,11,12)</sup>、精巣上部精子の ACP 活性については詳細に検討されていない<sup>9)</sup>。

本研究はラット精巣、精巣上部および精管における精子頭部 ACP 活性の分布を透過型電子顕微鏡を用い明らかにしようとした。

#### 材料および方法

供試材料は体重 250~345 g の Tokyo 系ラット 5 匹を用い、精巣、精巣上部頭、体、尾近位端、尾遠位端および精管の 6 部位より約 1 mm<sup>3</sup> の組織片を採取した。採取組織の前固定は 0.1 M ショ糖を含む冷 2.5% グルタルアルデヒド・0.1 M カコシル酸ナトリウム緩

\* 酪農学科、家畜繁殖学研究室

Laboratory of Animal Reproduction, Department of Dairy Science, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

衝液で2時間行ない、固定後、0.1 M ショ糖を含む0.1 M カコシル酸ナトリウム緩衝液で洗浄し、クリオスタットにより厚さ約40  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。ACP 活性の検出は凍結切片を Gomori の金属塩法に準じ、 $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウムを含む基質液に37°C、1時間浸漬した。対照は  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウムを含まない基質液を用い同様に行なった。ついで冷1% 四酸化オスmium酸溶液中で30分間固定し、常法の如くアルコール脱水、エポン812に包埋後 Porter-Blum MT-1 型ウルトラマイクロームで超薄切片を作製し、酢酸ウラニルによる単染色を施し、日立 HS-8 または JEM-100 S 型電子顕微鏡で観察した。

## 結 果

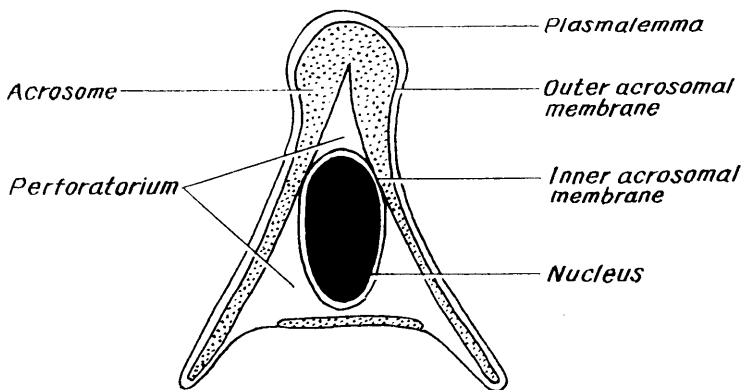
本研究で観察対象とした精子頭部の各部の名称は Text Fig. 1 に示した。精巢、精巢上体4部位および精管の6部位から採取した各精子の頭部における ACP 活性分布は Table 1 に示したとおりである。

### 精巢精子

ACP 活性は精子アクロゾーム形成時期にある精子細胞では凸レンズ状に変形した先体胞の周囲に出現し、アクロゾームがほぼ完成し、縮小過程にある先体期の精子細胞では細胞膜とアクロゾーム外膜の間、核とアクロゾーム内膜の間および穿孔器腹面に電子密度の高い顆粒状の沈着物として観察された (Pl. I, Figs. 1 and 2)。またこれらの ACP 陽性顆粒は後帽においても観察された。

### 精巢上体頭精子

精巢上体頭精子の ACP 陽性部位は精巢精子と類似していたが、その他にアクロゾーム



Text Fig. 1. Diagrams illustrating the structure of the rat sperm head at mid-transverse section.

**Table 1.** Distribution of acid phosphatase in the rat sperm head from various regions of the male reproductive tract

Source of Spermatozoa	Post-nuclear cap	Between nucleus and inner acrosomal membrane or nuclear side of inner acrosomal membrane	Between outer acrosomal membrane and plasmalemma	Ventral surface of perforatorium
Testis	+	+	+	+
Caput epididymidis	+	+	+	+
Corpus epididymidis	-	-	-	-
Cauda epididymidis				
Proximal segment	-	+	+	+
Distal segment	-	±	+	+
Ductus deferens	-	±	-	±

The presence of reaction products is indicated by +, and its absence by -; + indicates a greater amount of products and ± indicates a scanty of products.

内膜の核側にも陽性顆粒がみられ (Pl. II, Fig. 3), 後帽では顆粒はやや増加した (Pl. II, Fig. 4)。しかし後帽における ACP 活性は精巣上体頭以下の体, 尾および精管では観察されなかった。また対照の  $\beta$ -グリセロリン酸ナトリウムを含まない基質液では ACP 活性は検出されなかった (Pl. III, Fig. 9)。

#### 精巣上体精子

精巣上体精子では ACP 活性は 1 例を除き全く観察されなかった。ACP 陽性反応の認められた個体の精子頭部はアクロゾーム内膜の核側および穿孔器腹面に陽性顆粒が観察された (Pl. II, Fig. 5)。

#### 精巣上体尾精子

精巣上体尾近位端精子では細胞膜とアクロゾーム外膜との間, 穿孔器腹面ならびにアクロゾーム内膜の核側に ACP 陽性顆粒が検出され, とくに細胞膜全域に ACP 活性が拡散していた (Pl. II, Fig. 6)。尾遠位端精子では近位端精子と類似した部位に ACP 活性がみられたが, アクロゾーム内膜の核側の陽性顆粒は近位端精子に比べやや少なかった (Pl. III, Fig. 7)。

#### 精管精子

精管精子では ACP 活性はアクロゾーム内膜の核側および穿孔器腹面で弱い反応がみられた以外は陰性であった (Pl. III, Fig. 8)。

### 考 察

本研究の結果は Poier<sup>9)</sup> のマウス精巣上体精子の ACP 陽性部位とおおむね一致したが,

ラットでは精巣上体以外、精巣、精巣上体および精管精子の穿孔器腹面においても ACP 陽性顆粒が検出された。

精巣上体の機能については Glover and Nicander<sup>5)</sup> は豚精巣上体頭は精子の形態的ならびに機能的成熟に、また尾は精子貯留に関与することを報告した。Poier<sup>9)</sup> はマウス精巣上体頭における精子頭部の膜構造の形態的变化に ACP の関与することを示唆した。ラット精子頭部における ACP 活性は精巣、精巣上体頭および尾において観察され、これらの部位における精子頭部形成に ACP の関与していることが推察された。また Jones<sup>8)</sup> は豚精子では精巣上体移行に伴いアクロゾーム形態の変化および核との密着性の増加が起こるが、細胞膜は精巣上体尾以外の部位ではアクロゾームから遊離しやすいことを示し、精巣上体は部位により精子におよぼす機能が異なることを示唆した。ラット精子 ACP 活性は精巣、精巣上体および精管において陽性顆粒の出現する部位が異なり、精巣上体頭では主にアクロゾーム内膜と核およびアクロゾーム外膜と細胞膜の間に、尾近位端では細胞膜とアクロゾームおよび穿孔器の間に多く検出された。これらの所見から精巣ではアクロゾームの形成作用、精巣上体頭ではアクロゾームおよび穿孔器の濃縮ならびにアクロゾーム膜と核の密着性の増加に、また尾近位端では細胞膜とアクロゾーム外膜の密着性を促進させる作用を有するものと考えられた。一方、精巣上体は 1 例以外は ACP 活性は陰性であり、尾遠位端および精管精子の ACP 陽性顆粒が減少したことから、精巣上体は精子頭部 ACP 活性を抑制し、また尾遠位端および精管は精巣上体移行過程で形態的に成熟を遂げた精子が貯留しているものと推察された。

## 要 約

ラット精巣上体移行に伴う精子 ACP 活性の変動を知るため、精巣、精巣上体および精管精子を金属塩法により染色し、透過型電子顕微鏡を用い観察した。

精子頭部の ACP 陽性反応は精巣精子および精巣上体では後帽、アクロゾーム内膜と核の間またはアクロゾーム内膜の核側、アクロゾーム外膜と細胞膜の間および穿孔器腹面に、精巣上体尾ではアクロゾーム内膜の核側、アクロゾーム外膜と細胞膜の間および穿孔器腹面に電子密度の高い陽性顆粒として観察された。しかし精巣上体精子では 1 例を除いて全て陰性であった。また精管精子では極めてわずかの陽性顆粒が散在するに過ぎなかった。

これらのことから、精子頭部における ACP 活性は精巣でのアクロゾーム形成および精巣上体における精子頭部の形態的成熟変化に大きく関与しているものと推察された。

## 文 献

- 1) Allison, A. C. and E. Fhartree, 1970. Lysosomal enzymes in the acrosome and their possible role in fertilization. *J. Reprod. Fert.*, **21**: 501-515.
- 2) Bedford, J. M., H. Calvin and G. W. Cooper 1973. The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **18**: 199-213.
- 3) Bernstein, M. H. and R. J. Teichman 1973. A chemical procedure for extraction of the acrozomes of mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **33**: 239-244.
- 4) Dott, H. M. and J. T. Dingle 1968. Distribution of lysosomal enzymes in the spermatozoa and cytoplasmic droplets of bull and ram. *Expl. Cell Res.*, **52**: 523-540.
- 5) Glover, T. D. and L. Nicander 1971. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **13**: 39-50.
- 6) Glover, T. D., L. Nicander and P. W. Reed 1970. Enzyme profile of the cytoplasmic droplet from bovine epididymal spermatozoa. *Boil. Reprod.*, **3**: 327-337.
- 7) Horan, A. H. and J. M. Bedford 1972. Development of the fertilization ability of spermatozoa in the epididymis of the syrian hamster. *J. Reprod. Fert.*, **30**: 417-423.
- 8) Jones, R. C. 1971. Studies of the structure of the head of boar spermatozoa from the epididymis. *J. Reprod. Fert., Suppl.*, **13**: 51-64.
- 9) Poirer, G. R. 1975. Fine structure distribution of non-specific acid phosphatase in the head region of mouse spermatozoa from various regions of the male reproductive tract. *J. Reprod. Fert.*, **43**: 495-499.
- 10) Roussel, J. D. and O. T. Stallcup 1966. Relationships between phosphatase activity and other characteristics in bull semen. *J. Reprod. Fert.*, **12**: 423-429.
- 11) Stanbaugh, R. and M. Smith 1973. A comparison of several extraction procedures for rabbit acrosomal enzymes. *J. Reprod. Fert.*, **35**: 127-130.
- 12) Teichman, R. J. and M. H. Bernstein 1971. Fine structure localization of acid phosphatase in rabbit and bull sperm head. *J. Reprod. Fert.*, **27**: 243-248.

## Summary

The fine structure distribution of acid phosphatase was determined in the head region of rat spermatozoa from the testis, epididymis and ductus deferens. Electron microscopic localization was achieved by the method of Gomori-type medium using sodium glycerophosphate as the substrate.

The reaction products were shown in the postnuclear cap, the space between the outer acrosomal membrane and the plasmalemma, between the nucleus and the inner acrosomal membrane or nuclear side of inner acrosomal membrane and the ventral surface of the perforatorium of spermatozoa from the testis and caput epididymidis. Spermatozoa of the cauda epididymidis showed enzymatic activity on the ventral surface of the perforatorium, the space between the outer acrosomal membrane and the plasmalemma and the nuclear side of the inner acrosomal membrane. Spermatozoa from the corpus epididymidis and ductus defrens showed few or no reaction products in the head region.

These findings indicate that the distribution of acid phosphatase in the sperm head during epididymal transport may reflect its maturational process.

### Explanation of Plates

Figs. 1 to 8. Section of rat spermatozoa after incubation in complete Gomori's medium.

#### Plate I

Figs. 1 and 2. A spermatid showing formation of the acrosome. The reaction products associated with sperm head is localized in the skull-cap form acrosome (arrow in Fig. 1) and also in the narrow space between the outer acrosomal membrane and the plasmalemma (O in Fig. 2), between the nucleus and the inner acrosomal membrane (I in Fig. 2) and on the ventral surface of perforatorium (V in Fig. 2).  $\times 46,000$ .

#### Plates II

Figs. 3 and 4. Transverse and frontal section of the spermatozoa from the caput epididymidis. The reaction products associated with the sperm head is visible in the nuclear side of the inner acrosomal membrane (arrow in Fig. 3,  $\times 20,000$ ), the ventral surface of the perforatorium (V in Fig. 3,  $\times 20,000$ ) and postnuclear cap (P in Fig. 4,  $\times 15,000$ ).

Fig. 5. Transverse section through a spermatozoon from the corpus epididymidis.  $\times 32,000$ .

Fig. 6. Transvers section through a spermatozoon from the proximal segment of the cauda epididymidis.  $\times 28,000$ .

#### Plate III

Fig. 7. Transverse section through a spermatozoon from the distal segment of the cauda epididymidis.  $\times 21,000$ .

Fig. 8. Transverse section though a spermatozoon from the ducts deferens. Enzyme reaction is scanty on the ventral surface of the perforatrium and between the outer acrosomal membrane and plasmalemma.  $\times 44,000$ .

Fig. 9. Section through a spermatozoon from the caput epididymidis after incubation in incomplete Gomori's medium. No enzyme reaction is observed.  $\times 41,000$ .

