

## ラット辜丸に及ぼすビタミン B<sub>12</sub> 欠乏の影響

河田 哲典<sup>1)</sup>・武田 裕子<sup>1)</sup>・田中 信夫<sup>2)</sup>・山田 和弘<sup>3)</sup>  
 和田 政裕<sup>3)</sup>・田所 忠弘<sup>3)</sup>・前川 昭男<sup>3)</sup>

<sup>1)</sup>岡山大学教育学部, <sup>2)</sup>東京慈恵会医大青戸病院, <sup>3)</sup>東京農業大学農学部

### はじめに

現在, 臨床医学の立場からヒトの B<sub>12</sub> 欠乏症のみならずある種の疾患に対する B<sub>12</sub> 投与成績の報告が多く見られる。1962年 Sharp ら<sup>1)</sup>は悪性貧血

のヒトに対する B<sub>12</sub> 投与は精液所見を改善すると成績を得, B<sub>12</sub> が男性生殖機能に影響を及ぼすことを示唆した。以後日本において男性不妊症に対する B<sub>12</sub> 特にメチルコバラミン (CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub>) の投与成績が蓄積されている<sup>2-4)</sup>。また doxorubicin

表1 ビタミン B<sub>12</sub> と生殖機能の関連に関する文献

Human	Experimental animal
1962 Watson, A. A. et. al.: Lancet, 1, 644. Seminal vitamin B <sub>12</sub> and sterility.	1965 梅村泰一: ビタミン, 31, 26-43. 実験的ビタミン B <sub>12</sub> 欠乏症の病理組織学的研究.
1962 Sharp, A. A. et. al.: Lancet, 2, 779. Seminal vitamin B <sub>12</sub> and sterility.	1966 Dryden, et. al.: J. Nutr., 90, 377-381. Effect of vitamin B <sub>12</sub> on the weight of certain organs in the rat.
1967 永田正夫 et. al.: 診療と新薬, 4, 455-459. ビタミン B <sub>12</sub> の辜丸組織におよぼす影響についての一考察.	1978 Parvinen, L. M. et. al.: Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys., 18, 585-594. Biochemical studies of the rat seminiferous epithelial wave.
1968 Blair, J. H.: Lancet, 2, 49-50. Vitamin B <sub>12</sub> and fertility.	1984 木村正一 et. al.: 基礎と臨床, 18, 575-583. 制癌剤投与ラットの Spermatogenesis に対する Mecobalamine の効果.
1969 白井将文 et. al.: 日泌尿会誌, 60, 321-330. 泌尿器科領域におけるビタミンの研究 第一報 ビタミンと性腺機能.	1987 押尾茂 et. al.: メチル B <sub>12</sub> をめぐって, 内野治人編, p.101-109 (協和企画通信, 東京), 実験的精巣障害マウスに及ぼすメコバラミンの影響.
1976 Jathar V. S. et. al.: Andrologia., 8, 355-358. Dietic habits and quality of semen in Indian subjects.	1988 山川弦一郎 et. al.: 西日本泌尿器科, 50, 1163-1167. DNA 量分布より見た可逆的造精機能障害ラットの造精機能回復過程におよぼすメコバラミンの効果.
1976 Hirwe, R. et. al.: J. Biosoc. Sci., 8, 221-227. Vitamin B <sub>12</sub> and potential fertility in male.	1988 押尾茂 et. al.: 日本不妊学会雑誌, 33, 174-179. 実験的精巣障害マウスの精巣機能に及ぼすメコバラミンの影響.
1981 木村正一 et. al.: 日本不妊学会雑誌, 26, 408-413. 乏精子数, 精子運動率に対する methylcobalamine の効果.	1988 尾崎覚 et. al.: 日本薬理学雑誌, 91, 197-207. 実験的造精機能障害ラットの作製ならびにその障害におよぼす Mecobalamine の効果.
1984 磯山理一郎 et. al.: 泌尿紀要, 30, 581-586. 男子不妊症に対する Methylcobalamine の使用経験.	1988 河田哲典 et. al.: ビタミン, 63, 401-408. ラットのビタミン B <sub>12</sub> 欠乏状態の発現に及ぼす飼料タンパク質の影響.
1986 岡田弘 et. al.: 日本泌尿学会誌, 77, 701-706. 乏精子症患者に対するメチルコバラミンの臨床的検討.	1989 Oshio, S. et. al.: Andrologia, 21, 167-173. Mecobalamin promotes mouse sperm maturation.
1986 飯塚理八 et. al.: 産婦人科の世界, 38, 171-177. Methylcobalamine (CH <sub>3</sub> -B <sub>12</sub> ) の男性不妊症に対する投与成績.	1991 押尾茂 et. al.: 日本不妊学会雑誌, 36, 179-184. ビタミン B <sub>12</sub> 欠乏食飼育で惹起したマウス造精機能障害に及ぼすメコバラミンの効果.
1987 大森弘之 et. al.: 日本不妊学会雑誌, 32, 200-205. 特発性男子不妊症に対する Methylcobalamine の検討.	1992 Oshio, S. et. al.: Vitamins and Biofactors in Life Science, p. 118-121, (Center for Academic Publications Japan), Effects of methyl vitamin B <sub>12</sub> on sperm quality.
1987 森山浩之 et. al.: 泌尿紀要, 33, 151-156. 乏精子症に対する methylcobalamine 大量療法の有効性に関する研究.	1992 Kawata, T. et. al.: J. Nutr. Sci. Vitaminol., 38, 305-316. Effects of vitamin B <sub>12</sub> -deficiency on testes tissue in rats.
1988 熊本悦明 et. al.: 泌尿紀要, 34, 1109-1132. Oligozoospermia に対する Mecobalamine の臨床効果.	
1989 瀧原博史 et. al.: 臨床成人病, 19, 1221-1223. 男性不妊とビタミン B <sub>12</sub> .	
1991 Sanfilippo, J. S. et. al.: Int. J. Fertil., 36, 36-38. Vitamin B <sub>12</sub> deficiency and infertility: Report of a case.	

(adriamycin) を投与した実験的造精障害モデルマウスでは  $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$  の投与が doxorubicin による造精障害を軽減することから、 $\text{B}_{12}$  が睪丸の機能維持に重要な役割を有する可能性が報告されている<sup>5,6)</sup>。著者らが参考にした現在までの  $\text{B}_{12}$  の男性生殖機能に及ぼす影響に関する報告を表-1 に示した。しかし睪丸に及ぼす  $\text{B}_{12}$  の影響、その詳細な作用機序は未だ不明な点が多く残されている。

生体内の  $\text{B}_{12}$  の機能の解明には  $\text{B}_{12}$  欠乏アニマルモデルが極めて有用である。しかしラットを用いた場合、一般的に極度の食餌性  $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの飼育は困難とされていた<sup>7)</sup>。現在、食餌性  $\text{B}_{12}$  欠乏動物で睪丸組織、精液性状の変動が認められた例はわずかに日本において報告されているにすぎない<sup>8,9)</sup>。このことは睪丸機能に及ぼす  $\text{B}_{12}$  の作用機序解明の隘路となっていると考えられる。著者

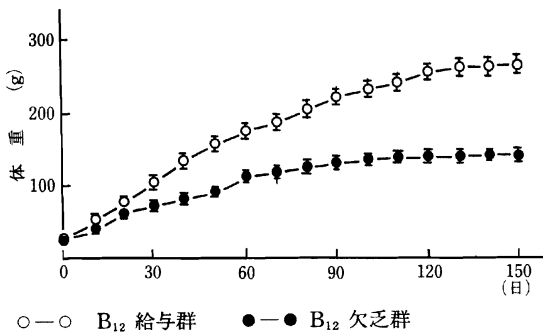


図1 ビタミン $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの成長  
(5例の平均値±標準偏差)

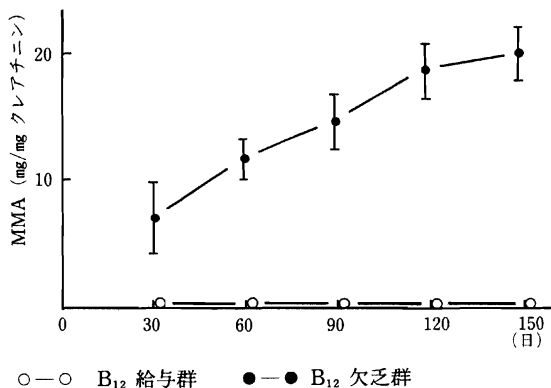


図2 ビタミン $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの尿中メチルマロン酸排泄量  
(5例の平均値±標準偏差)

らは睪丸機能に及ぼす  $\text{B}_{12}$  の作用機序解明の端緒として、ラットの睪丸組織に及ぼす  $\text{B}_{12}$  欠乏の影響を検討しているが、今回は著者らが得ている基礎成績を紹介する。

### ラットのビタミン $\text{B}_{12}$ 欠乏状態

前報<sup>10)</sup>に示した18%ダイズタンパク質飼料で150日間飼育した  $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの典型的な成長曲線、尿中メチルマロン酸 (MMA) 排泄量を図-1、図-2に示した。既に前報において報告したが、ダイズタンパク質飼料で飼育した  $\text{B}_{12}$  欠乏ラットでは  $1 \mu\text{g}/\text{rat}/\text{day}$  経口投与した対照ラットに比べ顕著な成長遅延が観察される。また  $\text{B}_{12}$  欠乏状態の判定指標となる尿中 MMA 排泄量の著明な増加が見られ、明確な欠乏状態であることが認められる。

### ビタミン $\text{B}_{12}$ 欠乏ラットの睪丸重量及びビタミン $\text{B}_{12}$ レベル

$\text{B}_{12}$  欠乏ラットの臓器重量を図-3に示した。 $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの臓器重量に関して、Dryden ら<sup>11)</sup>は20

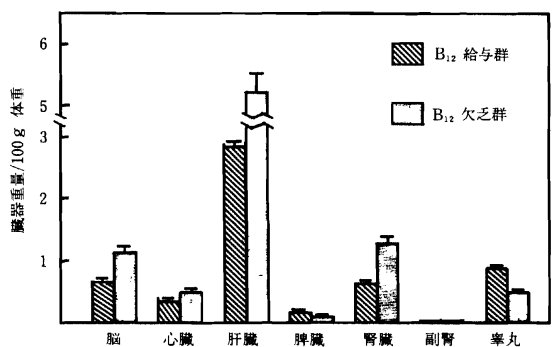
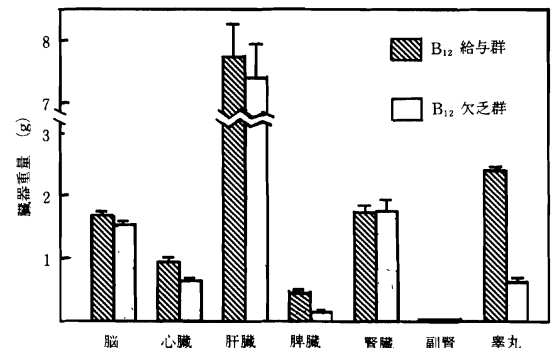


図3 ビタミン $\text{B}_{12}$  欠乏ラットの臓器重量  
(5例の平均値±標準偏差)

%カゼイン飼料を189~301日給与した B<sub>12</sub> 欠乏ラットでは心臓、肝臓、脾臓、腎臓、副腎及び睪丸重量/100 g 体重比が増加することを報告している。著者らもこれらの臓器の重量/100 g 体重比が増加する成績を得ている。この変動は B<sub>12</sub> 欠乏ラットの体重低下、体脂肪等体組成の変動と関連すると考えられる。しかし Dryden ら<sup>11)</sup>は睪丸重量/100 g 体重比の増加を報告しているにもかかわらず、著者らの18%ダイズタンパク質飼料で飼育した明確な B<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸重量は約0.7 g、睪丸重量/100 g 体重比は約0.6を示し、対照ラットの睪丸重量約2.4 g、睪丸重量/100 g 体重比約0.9に比べいずれも著しい低下を示す成績が得られた。B<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸を図-4に示した。

次に B<sub>12</sub> 欠乏ラット睪丸の B<sub>12</sub> レベルを図-5に示した。著者らのラットの睪丸 B<sub>12</sub> レベルは B<sub>12</sub> 欠乏により激減するが、この低下は従来の報告に比べ顕著である。また B<sub>12</sub> 欠乏ラット睪丸の B<sub>12</sub> 依存性酵素であるメチオニンシンターゼ活性は著減を示す成績を得ている(未発表)。このことは B<sub>12</sub> 欠乏ラット睪丸のメチオニン合成が著しく障害されていることを示している。既に著者らは B<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸重量及び睪丸重量/100 g 体重比の低下はカゼイン飼料では見られず、ダイズタンパク質飼料で観察されることを報告している<sup>12)</sup>。B<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸重量の変化は飼料タンパク質のアミノ酸組成、特に含硫アミノ酸組成に影響され、睪丸におけるメチオニンバイオアベイラビリティと何らかの関連を有するものと推察される。

#### ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸組織

B<sub>12</sub> とヒト男性生殖機能の関連について、B<sub>12</sub> の投与は男性不妊の治療に有効であるとする報告は多い。1962年 Sharp ら<sup>1)</sup>は乏精子症の悪性貧血のヒトに B<sub>12</sub> を投与し、B<sub>12</sub> の投与は精液所見を改善すると報告した。次いで1968年 Blair<sup>13)</sup>は血液学的に正常な乏精子症のヒトにおいても B<sub>12</sub> は有効であると報告している。現在日本において CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub> は男性不妊症に対する治療効果が多く報告され<sup>2-4)</sup>、B<sub>12</sub> がヒト男性生殖機能に影響を及ぼしていることが示唆されている。一方、doxorubicin はラット睪丸の核酸合成を阻害し、doxorubicin の投

与により実験的造精障害モデルラットの作成が可能なが知られている。尾崎ら<sup>5)</sup>、Oshio ら<sup>6)</sup>は doxorubicin 投与マウスを用い、睪丸組織の変化、精子数等の低下は CH<sub>3</sub>-B<sub>12</sub> により軽減されることを認め報告した。これら実験的造精障害モデル動物を用いた成績から、B<sub>12</sub> が doxorubicin による DNA 合成障害を軽減することが明らかにされている。しかし睪丸機能に及ぼす B<sub>12</sub> の詳細な作用機

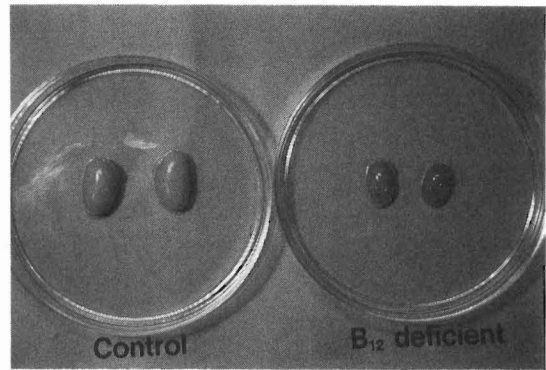


図4 ビタミンB<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸

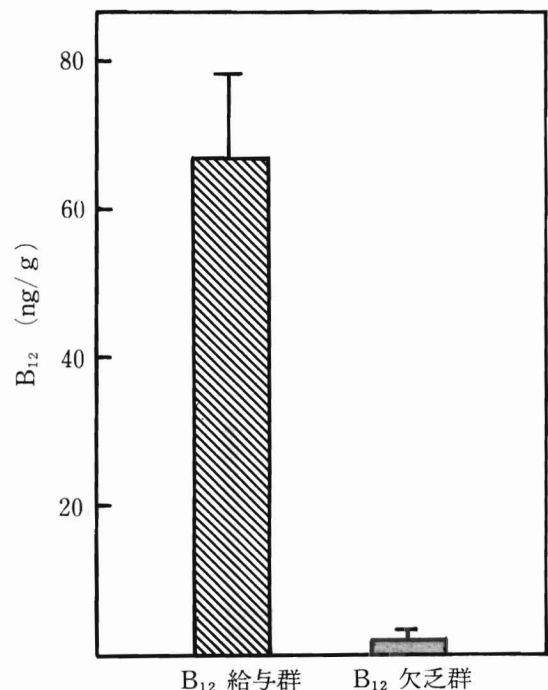


図5 ビタミンB<sub>12</sub> 欠乏ラットの睪丸ビタミンB<sub>12</sub> レベル (5例の平均値±標準偏差)

序は未だ不明な点が多く残されている。

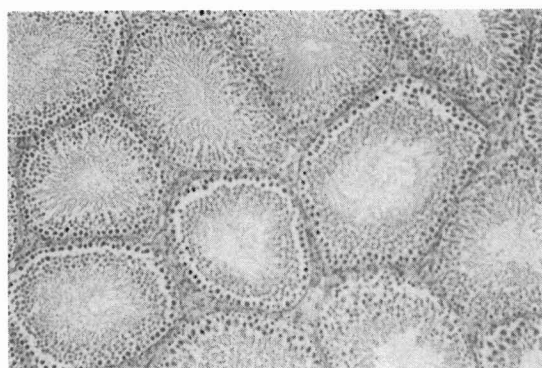
睪丸機能に及ぼす  $B_{12}$  の詳細な作用機序解明には実験的造精障害モデル動物のみならず食餌性  $B_{12}$  欠乏動物が極めて有用と考えられる。著者らのダイズタンパク質飼料で飼育した明確な  $B_{12}$  欠乏ラットでは精子、精子細胞の無形成等極めて明確な変化が認められる。 $B_{12}$  欠乏ラットの睪丸組織像を図-6に示した。現在までに食餌性  $B_{12}$  欠乏ラット及びマウスの睪丸組織、精液性状の変動が観察された例はわずかに日本において報告されているにすぎない。すなわち1964年梅村<sup>14)</sup>は  $B_{12}$  欠乏ラットの睪丸では軽度の成熟精子の減少が観察されると報告したが、睪丸組織像は記載されていない。1991年及び1992年押尾ら<sup>8,9)</sup>は  $B_{12}$  含量0.3ng/g 飼料の  $B_{12}$  欠乏飼料でマウスを10週飼育し、睪丸組織の変化、精子性状の変化が観察されたことを報

告した。著者らの得ている成績を含めこれらの知見は食餌性  $B_{12}$  欠乏によりラットまたはマウスの睪丸組織の変化が惹起されることを明らかにするばかりでなく、食餌性  $B_{12}$  欠乏ラットが  $B_{12}$  の睪丸機能に及ぼす作用機序を追究するモデル動物になり得る可能性を示唆している。しかも著者らの  $B_{12}$  欠乏ラットは明確な  $B_{12}$  欠乏状態を示し、睪丸組織の変化が顕著であり、再現性が極めて高く、 $B_{12}$  の機能解明の小動物モデルとして有用と考えられる。

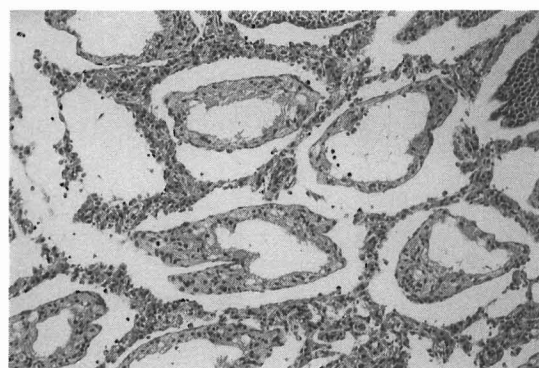
本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜った前岡山大学教授猪貴義博士、岡山大学農学部教授湯原正高博士、また組織写真の撮影にご助言、ご協力を頂いた岡山大学薬学部見尾光庸博士に深謝致します。

## 文 献

- 1) Sharp, A. A. and Witts, L. J. (1962): Seminal vitamin  $B_{12}$  and sterility. *Lancet*, ii, 779.
- 2) 木村正一・光川史郎・松田尚太郎・石川博夫・折笠精一 (1981): 乏精子症の精子数、精子運動率に対する methylcobalamin の効果。日本不妊学会雑誌, **26**, 408-413.
- 3) 大橋輝久・永井 敦・入江 伸・大橋洋三・古川雅人・山下良孝・東條俊司・武田克治・大森弘之 (1987): 突発性男子不妊症に対する methylcobalamin の検討。日本不妊学会雑誌, **32**, 200-205.
- 4) 瀧原博史・石津和彦・山川弦一郎・酒徳治三郎 (1989) 男性不妊とビタミン  $B_{12}$ 。臨床成人病, **56**, 409-413.
- 5) 尾崎 覚・大川 功・加藤義則・田島鉄也・木村正一・折笠精一 (1988): 実験的造精機能障害ラットの作成ならびにその障害に及ぼす methylcobalamin の効果。日本薬理学雑誌, **91**, 197-207.
- 6) Oshio, S., Ozaki, S., Tajima, T., Kaneko, S. and Mohri, H. (1981): Methylcobalamin promotes mouse sperm maturation. *Andrologia*, **21**, 167-173.
- 7) Williams, D. L., Spray, G. H., Newman, G. E. and O'Brien, R. P. (1969) Dietary depletion of vitamin  $B_{12}$  and the excretion of methylmalonic acid in the rat. *Br. J. Nutr.*, **23**, 343-352.
- 8) 押尾 茂・矢崎恒忠・梅田 隆・尾崎 覚・大川 功・毛利秀雄 (1991): ビタミン  $B_{12}$  欠乏食飼育で惹起し



$B_{12}$  給与群



$B_{12}$  欠乏群

図6 ビタミン  $B_{12}$  欠乏ラットの睪丸組織像

たマウス造精機能障害に及ぼすメコバラミンの影響。  
日本不妊学会雑誌, **36**, 178—184.

- 9) Oshio, S., Yazaki, T. and Umeda, T. (1992) : Effect of methyl vitamin B<sub>12</sub> on sperm quality. *Vitamin and Biofactors in Life Science*, p. 118—121, (Center for Academic Publications Japan).
- 10) 河田哲典・山田和弘・和田政裕・田所忠弘・前川昭男 (1992) : ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏ラットの飼育. 岡山実験動物研究会報, **9**, 13—18.
- 11) Dryden, L. P. and Hartman, A. M. (1966) Effects of vitamin B<sub>12</sub> on the weight of certain organs in the rat. *J. Nutr.*, **90**, 377—381.
- 12) 河田哲典・土居 忠・飯島健志・前川昭男 (1989) ラットのビタミン B<sub>12</sub> 欠乏状態の発現に及ぼす飼料タンパク質の影響. *ビタミン*, **63**, 401—408.
- 13) Blair, J. H. (1968) : Vitamin B<sub>12</sub> and fertility. *Lancet*, i, 49.
- 14) 梅村泰一 (1965) : 実験的ビタミン B<sub>12</sub> 欠乏症の病理組織学的研究. *ビタミン*, **31**, 26—43.